

MTA Doktori Értekezés Tézisei

**A testhőmérséklet-szabályozás mechanizmusai egészségben és
szisztémás gyulladásban: tranziens receptor potenciál ioncsatornák és
endogén molekuláris mediátorok szerepe**

Dr. Garami András



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Transzlációs Medicina Intézet

Termofiziológia Tanszék

Pécs, 2023

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	2
2. Bevezetés és irodalmi háttér	3
2.1. A testhőmérséklet-szabályozás általános jellemzői	3
2.2. Hőmérsékleti ingerekkel aktiválható tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatornák	5
2.3. Az akut szisztémás gyulladás általános jellemzői és hőszabályozási sajátosságai: láz és hipotermia	8
3. Célkitűzések	11
3.1. Thermo-TRP ioncsatornák szerepének tanulmányozása a testhőmérséklet szabályozásában	11
3.2. Thermo-TRP ioncsatornák vaszkuláris biológiai szerepének experimentális vizsgálata	12
3.3. Szisztémás gyulladási állapotok élettani és molekuláris mechanizmusainak tanulmányozása experimentális modellekben és humán adatok alapján	12
4. Anyagok és módszerek	12
4.1. Experimentális modellek	12
4.2. Humán adatok elemzése (metaanalízis, matematikai modellezés, klinikai vizsgálat)	14
5. Eredmények	15
5.1. Thermo-TRP ioncsatornák szerepének tanulmányozása a testhőmérséklet szabályozásában	15
5.2. Thermo-TRP ioncsatornák vaszkuláris biológiai szerepének experimentális vizsgálata	26
5.3. Szisztémás gyulladási állapotok élettani és molekuláris mechanizmusainak tanulmányozása	28
6. Megbeszélés	35
6.1. Thermo-TRP ioncsatornák szerepe a testhőmérséklet szabályozásában	35
6.2. Thermo-TRP ioncsatornák szerepe vazomotor válaszok kialakulásában	43
6.3. Szisztémás gyulladási állapotok termoregulációs, élettani és molekuláris mechanizmusai	45
7. Legfontosabb új tudományos eredmények	52
9. Saját közlemények jegyzéke	54
10. Scientometriai összesítő adatok	59
11. Köszönetnyilvánítás	60

1. Rövidítések jegyzéke

AEA	anandamid (N-arachidonoylethanolamine)
ANOVA	varianciaanalízis (analysis of variance)
C1 és C2	első és a második cervikális csigolya
CCK	kolecisztokinin
CI	95%-os konfidenciaintervallum
DA	dorzális hipotalamikus area
DLF	dorzolaterális funiculus
DMH	dorzomediális hipotalamusz
DMSO	dimetil-szulfoxid
GABA	gamma-amino-vajsav (gamma-aminobutyric acid)
<i>H</i>	hipertermiás index
H ₂ S	hidrogén-szulfid
HCl	hidrogén-klorid
HLI	hőleadási index
IL	interleukin
i.c.v.	intracerebroventrikuláris(an)
i.g.	intragasztrikus(an)
i.m.	intramuszkuláris(an)
i.p.	intraperitoneális(an)
i.v.	intravénás(an)
IC ₅₀	50%-os inhibitor koncentráció
KO	génkiütött (knock out)
LPS	lipopoliszacharida
MIF	makrofág migráció inhibitor faktor
MnPO	medián preoptikus nukleusz
MPO	mediális preoptikus terület
Na ₂ S	nátrium-szulfid
NaOH	nátrium-hidroxid
NK1	neurokinin-1
PACAP	hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)
PBS	foszfát puffer oldat (posphate buffer solution)
PG	prostaglandin
POA	preoptikus terület/area
rRPa	rostrális raphe pallidus
RTX	reziniferatoxin
s.c.	szubkután
SE	standard hiba (standard error)
SIRS	szisztémás gyulladáshoz vezető válasz szindróma (systemic inflammatory response syndrome)
SMD	standardizált átlagos különbség (standardized mean difference)
SP	P anyag (substance P)
T _b , T _k és T _m	bőr, környezeti és testmag hőmérséklet
TNF	tumor nekrosis faktor
TRP	tranziens receptor potenciál; A: ankirin, M: melasztatin, V: vanilloid
VMH	ventromediális hipotalamusz
VO ₂	oxigénfogyasztás
WT	vad típusú (wild type)

2. Bevezetés és irodalmi háttér

2.1. A testhőmérséklet-szabályozás általános jellemzői

A termoreguláció rendszerének alapvető célja a normál testhőmérséklet fenntartása. Szervezetünk különböző pontjain hőszabályozási szempontból különböző hőmérsékleti értékeket mérhetünk. Lényeges elkülöníteni két alapvetően különböző paramétert, a testmag és a testfelszín hőmérsékletét. A maghőmérséklet (T_m) szervezetünk belső szerveinek hőmérsékletét jelenti és termoreguláció szempontjából a szabályozott tényezőnek tekintendő, míg a testfelszín (bőr) hőmérséklete (T_b) a test környezet felé történő hővesztésének az indikátora, így szabályozó, azaz termoeffektor, tényezőnek tekinthető.

A T_m normál ($36-37^\circ\text{C}$) tartománytól való, mindössze néhány Celsius fokos eltérése irreverzibilis, akár halálos következményekkel járhat, például hóguta vagy nagyfokú kihülés (hipotermia) során. Ennek a finoman szabályozott rendszernek a működésében több olyan alapvető élettani mechanizmus (termoeffektor) is szerepet játszik, amelyek révén a termoreguláció más homeosztatikus szabályozó rendszerekkel is szoros kapcsolatban áll, így például a testtömeg, vérnyomás és só-vízháztartás szabályozásával. A termoeffektorok két nagy csoportba sorolhatók: autonóm effektorok (például didergéses és nem-didergéses hőtermelés, verejtékezés, bőr értónus) és viselkedési tényezők (például hideg/meleg preferencia, öltözködés). A különböző effektorok leghatékonyabb működése úgy biztosítható, hogy a T_m emelését vagy csökkenését célzó mechanizmusok összehangoltan aktiválódnak, vagy kerülnek gátlás alá, ennek alapján funkciójuk szempontjából elkülöníthetünk hideg elleni, illetve meleg elleni védekezési mechanizmusokat. A hideg elleni védekezés legfontosabb tényezői a meleg iránti preferencia, fokozott hőtermelés és a bőr ereinek konstriktója (csökkent hővesztés). A meleg elleni védekezésben a hideget kereső magatartás, valamint a bőr ereinek dilatációjával, illetve verejtékezéssel kiváltott fokozott hőleadás játszanak kiemelt szerepet.

Az újabb teóriák szerint testhőmérsékletünk nem egyetlen rendszer által, egyetlen irányítóval szabályozott, hanem sokkal inkább egymástól független, anatómiailag különálló termoeffektor hurkok működése által. Egy-egy termoeffektor hurok nem más, mint egy poliszinaptikus és többrétegű reflexív, amely afferens és efferens pályákból áll. Az afferens pályák a termoreceptoroktól és primer afferens érző neuronoktól a hőmérsékleti szignálokat (különböző idegi kapcsolódási pontokon keresztül) közvetítik a rostrálisan elhelyezkedő termoeffektor (efferens) neuronokhoz, amelyek a hipotalamuszban és más központi idegrendszeri struktúrákban találhatóak. A termoeffektor neuronok többszöri idegi átkapcsolás révén szabályozzák a periférián lévő autonóm és viselkedési termoeffektorok aktivitását. A hurkok afferens és efferens ágai között is találunk olyan részeket, melyek kapcsolatban állhatnak más, különböző hurkokkal. Működésüket tekintve a termoeffektor hurkok különböző, specifikus aktiválási küszöbértékekkel rendelkeznek, azaz a termoeffektor hurkok más-más hőmérsékleten aktiválódnak. Azok az effektorok, amelyeknek működése kevesebb energiát igényel (például erősszehúzódás) elsőként lépnek működésbe. A több energiát igénylő effektorok (például didergéses hőtermelés) csak később lépnek működésbe, akkor ha az első védelmi vonal nem volt elegendő. Bizonyos termoeffektor hurkok, ha aktivált állapotban vannak, csökkentik a T_m -et, ezek a meleg elleni védekező mechanizmusok. Más termoeffektor hurkok aktivációja pedig emeli a T_m -et. Ezek a hideg elleni védekező mechanizmusok. Amikor a testhőmérséklet normál tartományban van, rendszerint nincs termoeffektor hurok aktiváció. A termoeffektorok közötti kommunikáció megvalósul a közös, szabályozott változójukon keresztül, amely nem más, mint a T_m .

Orvosi vonatkozásban elsősorban a T_m -nek a normálértéktől való eltérései kiemelt jelentőségűek, amelyek szisztémás gyulladás során leggyakrabban lázként, más súlyos esetekben (például sokkban) hipotermiaként jelenhetnek meg. Előbbiek mellett, a társadalom elöregedése, illetve a globális klímaváltozások miatt ugyancsak egyre nagyobb jelentőséggel bírnak a külső hatások miatt kialakuló hőszabályozási rendellenességek, mint a hóguta és kihülés. Annak ellenére, hogy az előbb említett hőszabályozási eltérések régóta ismertek és könnyen mérhetők, a testhőmérsékletet fenntartó mechanizmusok részletei napjainkban sem kellően világosak. Nem teljes mértékben ismert például, hogy melyik idegpályákon és központi idegrendszeri struktúrákon

keresztül történik az egyes hőszabályozó mechanizmusok aktiválása. Érdekesnek tűnhet, de azt sem tudjuk kellő bizonyossággal, hogy milyen molekulák érzékelik a túl hideg vagy túl meleg környezetet, vagyis hogy hőszabályozási szempontból melyik receptorok szervezetünk valódi termoszenzorai. Ez lehet az oka annak, hogy egyetlen olyan gyógyszerrel sem rendelkezünk, amit emberben alkalmazhatnánk célzottan a T_m csökkentésére vagy növelésére, vagyis a termofarmakológia alkalmazott felhasználása jelenleg megoldatlan.

2.2. Hőmérsékleti ingerekkel aktiválható tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatornák

Jelenleg is kutatások tárgya, hogy melyek azok a fehérjék (termoreceptorok), amelyeknek hőmérsékleti szignálokkal való stimulációja az egyes termoeffektor szabályozó körök aktivációját eredményezi. Nagy áttörést jelentett a termoreceptorok molekuláris hátterének felderítésében a TRP csatornák termoszenzitív alcsoportjának, az úgynevezett termo-TRP csatornáknak a felfedezése.

A hőmérsékleti hatásokra történő aktivációjuk a termo-TRP ioncsatornákat kiválóan alkalmas jelöltté teszi arra, hogy termoszenzor szerepet töltsenek be szervezetünk hőszabályozási rendszerében. Önmagában ez a tulajdonság azonban korántsem elegendő ahhoz, hogy valódi termoszenzornak nevezzük őket termofiziológiai szempontból. A hőmérsékleti aktiváción kívül további lényeges tulajdonságok megléte szükséges az igazi termoszenzor szerep betöltéséhez:

- a szervezet perifériás és/vagy centrális hőérzékelő idegi struktúráiban megtalálható;
- legalább egy termoeffektor szabályozó hurok valamelyik részéhez kapcsolódik;
- hőmérsékleti ingerekkel való stimulációja egy vagy több termoeffektor aktiválásához vagy gátlásához vezet.

Bizonyos termo-TRP ioncsatornák esetében már igazolódott a fenti feltételeknek megfelelő termoszenzor szerep, míg más csatornák hőszabályozási funkciója továbbra is kutatások tárgyát képezi. A TRP vanilloid-4 (V4) farmakológiai modulációjával termofiziológiai kísérletekben arra lehetett következtetni, hogy szerepet játszik a fájdalomtalan (feltehetően bőrt érintő) meleghatások érzékelésében és a meleg elleni autonóm és viselkedési termoeffektorok aktiválásában. A hideggel aktiválható TRP ankirin-1 (A1) és M8, valamint a meleggel aktiválható TRPV1 hőszabályozási szerepének összefoglalása az alábbi alfejezetekben található.

2.2.1. A melegérzékeny TRPV1 ioncsatorna

2.2.1.1. A TRPV1 ioncsatorna aktivációs módjai és szöveti eloszlása

A TRPV1 – korábbi nevén kapszaicin vagy fájdalom receptor – már évtizedek óta a fájdalommal kapcsolatos kutatások egyik központi eleme, felfedezésének jelentős magyar vonatkozásai is vannak. A kapszaicin és más vanilloidok is képesek aktiválni a TRPV1 ioncsatornát, ilyen például a reziniferatoxin (RTX), amely egyes *Euphorbia* növényfajokban fordul elő és a kapszaicinnél több nagyságrenddel potensebb agonista. Az endogén TRPV1 agonisták közé tartozik az anandamid (AEA), az oleoiletanolamid és az N-arachidonoildopamin, amelyek esetében hőszabályozási hatásokat is leírtak. Nemcsak kémiai ligandok, hanem egyéb hatások is képesek aktiválni a TRPV1 ioncsatornát, ezek közül kiemelendő a magas (42°C feletti) hőmérséklet és a savi behatások (6,1 alatti pH). Gyógyszerfejlesztési szempontból a vanilloid, hő és proton aktivációs módok tekinthetők a TRPV1 ioncsatorna 3 legfőbb aktivációs módjának, a legtöbb gátló anyag (antagonista) hatását is leggyakrabban ezekre az aktivációs módokra tesztelik.

A TRPV1 ioncsatorna legnagyobb mértékben a hátsógyöki és trigeminális elsődleges szenzoros neuronokon expresszálódik rágcsálókban és emberekben egyaránt. Előbbiek között megtalálható a vékony mielinhüvellyű A δ és a mielinhüvely nélküli C rostok perifériás és centrális végződésein, de ugyancsak kimutatták a nodózus ganglion bizonyos peptiderg neuronjain is. Ezek a kapszaicin-szenzitív primer afferens idegvégződések beidegzik a testfelszínt (fej, törzs és végtagok bőre) és a belső szerveket egyaránt, így a TRPV1 csatorna eloszlása szervezetünkben ezeknek az idegeknek révén meglehetősen kiterjedt. A felső gasztrointesztinális rendszert, vastagbelet és húgyhólyagot beidegző spinális afferensek legalább 60%-ában, míg a bőrt és vázizmot beidegző spinális afferensek 30%-ában mutatható ki a TRPV1 ioncsatorna jelenléte. Továbbá, az afferens vagális ideg felső gasztrointesztinális rendszerhez futó rostjainak legalább 20%-a szintén expresszál

TRPV1 ioncsatornát. A TRPV1 ioncsatorna expresszióját kimutatták a központi idegrendszer számos struktúráján is, közülük különösen nagyszámú *Trpv1* gén transzkriptumot detektáltak a hipotalamuszban. A TRPV1 fehérje kismértékű jelenlétét is kimutatták az anterior hipotalamikus magokban.

Az idegrendszeri struktúrákon kívül, TRPV1 ioncsatorna expresszió kimutatható volt számos nem-neurális sejt- és szövettípusban is, amelyek felsorolása meghaladná jelen értekezés kereteit. Hőszabályozási szempontból fontos kiemelni, hogy vannak köztük termoeffektor szövettípusok is, amely felveti a TRPV1 ligandok közvetlenül ezeken a nem-neurálisan expresszálandó TRPV1 ioncsatornákon való direkt hatásának lehetőségét. Az artériák falában kimutatott TRPV1 ioncsatornák például szerepet játszhatnak a kapszaicin hatására bekövetkező bőr vazodilatáció, így fokozott hőleadás létrejöttében. A barnazsírszöveti TRPV1 ioncsatornák szerepe felmerült az elhízás kialakulásának elősegítésében, de a teljesen ellentétes szerep (vagyis a zsírfelhalmozódás megelőzése) szintén felvetődött. A kapszaicin és a TRPV1 ioncsatorna hőszabályozási szerepének tisztázására irányuló kutatások során fontos kérdés maradt, hogy a csatorna melyik aktivációs módja vagy módjai vesznek részt a normál T_m fenntartásában emlősökben, illetve, hogy a termoregulatórikus szereppel rendelkező TRPV1 ioncsatornák hol helyezkednek el a szervezetben.

2.2.1.2. A TRPV1 csatorna agonisták és antagonisták termális hatásai

A TRPV1 ioncsatorna hőszabályozási szerepének tisztázására irányuló tudományos kutatások kezdetben a farmakológiai agonisták, elsősorban a kapszaicin és RTX, termális hatásainak vizsgálatára alapultak. Ezek során fény derült arra, hogy a kapszaicin és az RTX akutan hipotermiát okoz akár szisztémás [intramuszkuláris (i.m.), intraperitoneális (i.p.), intravénás (i.v.), *per os* és szubkután (s.c.)], akár központi idegrendszeri [intracerebroventrikuláris (i.c.v.), intrapreoptikus, intratekális] anyagadás esetén sokféle állatfajban (egér, patkány, tengerimalac, bizonyos mókusfélék, nyúl, vadászmenyét, kecske, macska, kutya). Bizonyos állatok (például a madarak) azonban érzéketlenek a kapszaicin hipotermiás (és fájdalomkeltő) hatásával szemben. A különböző állatfajok eltérő érzékenysége kapszaicinnal szemben felhívja a figyelmet a TRPV1 ioncsatorna termoregulatórikus szerepének fajok közötti esetleges különbözőségére is.

A TRPV1 agonisták testhőmérsékleti hatásaival kapcsolatos irodalmi adatok összesítése alapján valószínűsíthető, hogy a hipotermia kiváltásának támadáspontja a hipotalamusz medián preoptikus magjában (MnPO) TRPV1 ioncsatornát expresszáló glutaminerg neuronok egy csoportja, amelyek a meleg elleni védekező mechanizmusok termoeffektor hurkainak afferens szárán helyezkednek el. Normál testhőmérsékleti (bőr és mag) tartományban ezek a neuronok nem aktívak, TRPV1 agonista hatására azonban ingerületbe jönnek és ezáltal aktiválják a meleg elleni védekező mechanizmusok autonóm és viselkedési termoeffektorait.

A TRPV1 antagonistákra sokan úgy tekintettek, mint a nem opioid típusú fájdalomcsillapítók új, mellékhatásoktól mentes generációjára. *In vivo* tesztelésük során szinte azonnal fény derült arra, hogy közülük több is hipertermiát okoz laboratóriumi állatokban, később pedig kiderült, hogy emberekben is. Ez a hipertermia az antagonisták célmolekuláján keresztül kiváltott (on-target) mellékhatásnak bizonyult, vagyis a TRPV1 ioncsatorna modulációja révén jött létre. Feltételezhető volt, hogy a TRPV1 antagonisták a hideg elleni autonóm termoeffektorok (barnazsírszöveti hőtermelés és bőr vazokonstriktió) tónusos gátlásának felfüggesztésével hozzák létre a hipertermiát. Ez a tónusos gátlás a TRPV1 ioncsatornák hőmérséklettől független folyamatos aktivációja révén valósul meg valahol a hasban, talán a hasfal izmaiban vagy a hasüregi szervekben. Később az is bebizonyosodott, hogy hipertermia csak olyan antagonisták adása esetén alakul ki, amelyek erősen gátolják a TRPV1 ioncsatorna protonok (alacsony pH) általi aktivációs módját, vagyis amelyek a polimodális (mindhárom fő aktivációs módot gátló), vagy másnéven első generációs antagonisták közé tartoznak. A második generációs, vagyis mód-szelektív antagonisták, amelyek nem (vagy csak részlegesen) gátolták a proton aktivációs módot, nem váltottak ki hipertermiát. Tisztázatlan maradt azonban, hogy a proton aktivációs mód kizárólagos gátlása elegendő-e a hipertermia kialakulásához, vagy szükséges-e ehhez a vanilloid aktivációs mód részleges gátlása is.

Bizonyos TRPV1 antagonisták esetében nem hiper-, hanem hipotermizáló hatást mutattak ki, például JYL1421, 5'-jodo-RTX, AMG7905 és AMG8562, A-425619, illetve egy polipeptid antagonista, az APHC3 esetében is. Összhangban azzal, hogy a TRPV1 agonisták hipotermiát okoznak, az 5'-jodo-RTX esetén kiderült parciális agonista hatás, míg az APHC3 potenciózta kis koncentrációjú kapszaicin hatását. A többi hipotermizáló TRPV1 antagonista esetében azonban nem írtak le sem agonista sem kapszaicin hatást felerősítő aktivitást. Nem került sor továbbá célzottan a hipotermizáló hatást rendszerezetten vizsgáló tanulmány elvégzésére sem, ezért nem lehetett megállapítani, hogy a TRPV1 antagonisták által okozott hipotermia és hipertermia mechanizmusai közösek vagy egymástól eltérő támadásponton keresztül jönnek létre. Felderítetlen maradt továbbá az is, hogy a hasból a tónusosan aktivált TRPV1 ioncsatornákból származó szignálok milyen afferens idegpályákon keresztül jutnak el az agyba, hogy ott kifejtsék folyamatos gátló hatásukat az autonóm termoeffektor hurkok efferens neuronjain.

Fontos hangsúlyozni, hogy a fentiekben összefoglalt kísérleteket patkányokban végezték, ami felveti emberekre való transzlációjuk megkérdőjelezését. Valóban, fajok közti különbségekre több esetben is fény derült a TRPV1 ioncsatorna farmakológiai tulajdonságait illetően. A fajok közötti különbségek miatt, a TRPV1 antagonisták hipertermiás hatásának hátterében álló farmakológiai profil meghatározását emberekben gyűjtött hőmérsékleti adatok felhasználásával is el kell végezni ahhoz, hogy kiderüljön, vajon a patkányokhoz hasonlóan emberek esetében is a proton aktivációs mód gátlása (önmagában vagy más mód gátlással együtt) felelős-e a T_m emelkedéséért.

2.2.1.3. A TRPV1 csatorna genetikai hiányának hőszabályozási hatásai

A TRPV1 ioncsatorna farmakológiai modulációját illetően tehát összefoglalva elmondható, hogy a TRPV1 agonisták hipotermiát okoznak, míg a TRPV1 antagonisták többsége hipertermiát, néhány közülük hipotermiát okoz, míg egyesek nem befolyásolták a T_m -et. A farmakológiai módszerekkel szemben, a genetikailag módosított állatokkal végzett tanulmányokban nem sikerült egyértelműen tisztázni olyan hőszabályozási fenotípust, amely jellemezné a *Trpv1* KO állatokat. Annak tudatában, hogy egerekben különösen bonyolult a hőszabályozási válaszok szakszerű tanulmányozása, a *Trpv1* KO egerek termoregulatórikus fenotípusának felderítéséhez alapos termofiziológiai és -farmakológiai megközelítésre van szükség komplex *in vivo* kísérletekben. Tekintettel arra, hogy az egyes termoeffektorok aktivitásának szabályozása egymástól független módon megy végbe, a különböző autonóm és viselkedési effektor mechanizmusok vizsgálatára is szükség lenne.

2.2.2. Hidegérzékeny receptorok: TRPM8 és TRPA1 csatornák

2.2.2.1. TRPM8 ioncsatorna

A TRPM8 csatorna korábbi neve elsőként felfedezett aktivátorai alapján hideg-, illetve mentol-1 receptor volt. Később számos más hidegérzetet keltő ligand aktivátort azonosítottak, úgy mint Cooling Agent 10, geraniol, linalool vagy PMD38, illetve fény derült a TRPM8 antagonistáira is, például M8-B, PBMC és BCTC. *In vitro* kísérletekben kimutatták, hogy mérsékelt hideg (22-27°C közötti aktivációs küszöbérték), valamint exogén, hidegérzetet keltő anyagok, mint például a mentol vagy az icilin, képesek aktiválni a TRPM8 csatornát. Az aktivációt kiváltó hőmérsékleti tartomány alapján feltételezhető volt, hogy a TRPM8 ioncsatorna elsősorban a fájdalomtalan hidegingerek érzékelésében játszik szerepet, míg a fájdalmas hideg érzékeléséért más receptorok lehetnek felelősek (például az alábbiakban tárgyalt TRPA1 ioncsatorna). Expresszióját tekintve, a TRPM8 ioncsatorna jelen van a hátsógyöki és trigeminális neuronokban, valamint perifériáisan a bőr és a szájüreg elsődleges szenzoros idegrostjaiban. A TRPM8 megtalálható az A δ - és C-idegroston, nociceptorokon és nem fájdalomérzékelő neuronokban egyaránt.

In vivo tanulmányokban a TRPM8 szerepe igazolódott a preferált T_k kiválasztásában, amelyet mentol i.v. adását vagy lokális (epidermális) alkalmazását követő meleg iránti preferencia igazolt egerekben és patkányokban, de megválaszolatlan maradt, hogy a TRPM8 valódi hidegszenzorként funkcionál-e a T_m fenntartása szempontjából. Erre a kérdésre leginkább a TRPM8 ioncsatorna genetikai vagy farmakológiai gátlásával lehetne megadni a választ.

2.2.2.2. TRPA1 ioncsatorna

A TRPA1 ioncsatornát egy csaknem univerzális kemoszenzornak és polimodális receptornak tekintik. Aktivátorai között található növényi eredetű anyagok, például tioszulfínatok (hagyma), Δ^9 -tertrahidrokanabinol (kannabisz), allil-isotiocianát (AITC; wasabi, mustár), cinammaldehyd (fahéj) és gingerol (gyömbér), továbbá környezeti irritánsok (például könnygáz, toluén, formalin) és endogén molekulák, mint például hidrogén-peroxid, reaktív oxigén gyökök és hidrogén-szulfid (H_2S).

Emlősökben a TRPA1 ioncsatorna elsősorban a perifériás idegrendszer struktúráiban található meg, különösképpen az A δ - és C-idegrostokon, és expressziója jelentős átfedést mutat a TRPV1 ioncsatornával, ami jól alátámasztja a TRPA1 és a TRPV1 csatornák, valamint az őket expresszáló rostok fájdalomérzéklésben betöltött szerepét.

A termo-TRP csatornák között a TRPA1 egyedülállónak tekinthető abban az értelemben, hogy kiterjedt kutatómunka ellenére hőmérséklettel való aktivációjának pontos mibenléte továbbra is ellentmondásos maradt. A legtöbb emlősökben végzett tanulmányban a szerzők a TRPA1 csatorna nocifenzív válaszokban betöltött szerepének vizsgálatára összpontosítottak, amely nem annyira meglepő, tekintvén, hogy az ioncsatorna *in vitro* aktivációs küszöbe $<17^\circ C$, amely közel van a fájdalmas hőküszöbhez emberekben. Vizsgálták, hogy perifériás TRPA1 csatornák szerepelhetnek-e a termoregulációs rendszer valódi hidegszenzoraiként, de nem derült fény egyértelműen a válaszra. Egy tanulmányban azt találták, hogy a *Trpa1* gén kiütése egerekben nem vonta maga után alacsonyabb T_k választását, ami arra utalt, hogy a TRPA1 csatorna nem játszik szerepet a hőpreferencia szabályozásában. Fontos azonban hozzátenni, hogy a kísérletben használt egerek nem voltak kitéve tartós hideghatásnak, amely szükséges feltétele lehetett volna a TRPA1 ioncsatorna aktivációjának. Továbbá, az egerek T_m -ét nem mérték a kísérletekben, amely nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy alacsonyabb T_m esetén a belső szervek TRPA1 csatornától különböző hidegszenzorai működésbe léptek a bőrből származó TRPA1 által mediált hideg szignálok kiesésének kompenzálására. Egy másik tanulmányban azt mutatták ki, hogy egy potens és szelektív TRPA1 antagonistá, az A967079, nem befolyásolta patkányok T_m -ét termoneutrálshoz közeli környezeti körülmények között, vagyis olyan T_k -n, amely feltehetően magasan a TRPA1 aktivációjához szükséges küszöb felett van. Az A967079 hatásait hidegben (vagyis amikor a TRPA1 csatorna aktivációja valószínűsíthető) nem vizsgálták a szerzők. Kérdéses maradt tehát, hogy a TRPA1 ioncsatorna genetikai vagy farmakológiai blokádjá, milyen hatással bír a T_m -re és a termoeffektorok aktivitására nagyfokú hideghatásnak kitett egerekben és patkányokban.

A TRPA1 ioncsatorna termoregulációban betöltött szerepével kapcsolatos további megválaszolatlan kérdés volt az is, hogy a szervezetben endogén módon is előforduló ligand agonistái között található-e olyan, amely jól karakterizálható testhőmérsékleti hatással bír. Ilyen jelölt a gáztranszmitter H_2S , amelynek hipotermiát és hipometabolizmust kiváltó hatását korábban leírták. A lehetséges hatásmechanizmus szempontjából fontos kiemelni, hogy a TRPA1 csatorna részvételét kimutatták számos szulfid donor és poliszulfid hatásának közvetítésében a fájdalom, gyulladás, vazomotor válaszok, valamint idegi, urológiai és kardiovaszkuláris funkciók kísérleti modelljeiben, azonban termoregulatórikus hatásokról nem esett szó. Mindazonáltal, a szerteágazó bizonyítékok a TRPA1 csatorna H_2S általi aktivációjára különböző homeosztatisz szabályozási folyamatokban felvetik annak lehetőségét, hogy a hőszabályozási hatások mediálásában is szerepet játszik.

2.3. Az akut szisztémás gyulladás általános jellemzői és hőszabályozási sajátosságai: láz és hipotermia

A szisztémás gyulladás témaköre a szervezetet érő fertőző és nem-fertőző faktorok által kiváltott teljes testünket érintő reakciók egész sorát magában foglalja, úgymint „betegség viselkedés/szindróma” (sickness behavior/syndrome), „szisztémás gyulladási válasz szindróma” (systemic inflammatory response syndrome, SIRS), „szepszis szindróma” (septic syndrome), szepszis, súlyos szepszis, szepszikus sokk és „többszervi működészavar szindróma” (multiple organ dysfunction syndrome).

2.3.1. Az akut szisztémás gyulladás klinikai jelentősége és manifesztációja

A sepszis mindig mikroorganizmusok inváziójával, szövetkárosodással van összefüggésben, felismerése, kezelése alapvető orvosi feladat. Világviszonylatban a tizedik leggyakoribb halálok, naponta nagyjából 1400 áldozatot követel, az esetek harmadában a diagnózis felállítását követő egy hónapon belül. Évek óta folyamatosan kutatások tárgyát képezi olyan biomarker azonosítása, ami diagnosztikai szempontból biztonsággal alkalmazható lenne sepszisben, de ilyen rutinszerűen mérhető, nagy szenzitivitású és specificitású marker még nem áll rendelkezésre. Alkalmos jelölt lehet a makrofág migrációs inhibitor faktor (MIF), amely szisztémás gyulladás során korán felszabaduló proinflammatorikus citokin, és hőszabályozási szerepét is bizonyítottuk, azonban diagnosztikai és prognosztikai szerepe sepszisben ellentmondásos maradt. Az is tisztázatlan maradt továbbá, hogy hogyan alakul a MIF szintjeinek kinetikája septicus betegek vérében és vizeletében intenzív osztályra kerülésük után, amely hátráltatja a sepszis prediktív biomarkereként való használatát.

2.3.2. A szisztémás gyulladás kísérletes vizsgálata az alap kutatásban

Az akut szisztémás gyulladás olyan mértékű összefüggésben áll a T_m változásaival, hogy annak klinikai diagnózisa szinte minden esetben magában foglalja az abnormális testhőmérsékleti eltéréseket. A szisztémás gyulladásban szenvedő betegek többsége (kb. 90%-a) lázas, a páciensek kb. 10%-ának T_m -e viszont alacsonyabb a normálisnál. Az alap kutatásokban a leginkább elterjedt modell a szisztémás gyulladás vizsgálatára az endotoxin hatásokkal rendelkező bakteriális lipopoliszacharida (LPS) adásával hozható létre. Ezekben a kísérletes modellekben a T_m változása a T_k -tól és a beadott LPS dózistól függ. Neutrális vagy szupraneutrális (meleg) T_k -n láz alakul ki, ami kisdózisú LPS adása esetén monofázisos, de polifázissá válik az LPS dózisének növelésével. Előbbiekkel ellentétben szubneutrális (hideg) környezeti hőmérsékleten LPS hatására hipotermia jön létre, amelynek mértéke a beadott LPS dózistól függ.

Mind a láz, mind a hipotermia része az akut szisztémás gyulladás tünettanának. Az utóbbi évtizedekben a láz biológiai jelentőségét illetően megállapításra került, hogy a láz a szervezet szempontjából előnyös. A láz szervezetre kifejtett jótékony biológiai hatásával szemben a szisztémás gyulladás során időnként kialakuló hipotermia szerepe szinte teljesen elhanyagolt maradt. A hipotermia megléte korántsem feltétlenül káros, amelyet több kísérleti eredmény is alátámaszt. Meg kell azonban azt is jegyezni, hogy a kísérleti modellekkel szemben, klinikai vizsgálatok ellentétes eredményekre jutottak a hipotermia mortalitásra kifejtett hatásával kapcsolatban. Bizonyos humán vizsgálatok a hipotermia jótékony hatását igazolták szisztémás gyulladásban: azoknál a kritikus állapotú betegeknél, akiknél a megfelelő intenzív terápia mellett hűtést is alkalmaztak a hipotermia életmentőnek bizonyult, ezzel ellentétben más tanulmányokban a hipotermia kialakulása pozitív korrelációt mutatott a halálozási aránnyal. A septicus láz és hipotermia mortalitással való összefüggésének megállapítása nagy elemszámú betegpopulációból származó adatok átfogó analízisével lenne lehetséges.

2.3.3. Az akut szisztémás gyulladás molekuláris mechanizmusai

Fertőzés során az immunrendszer többféle mechanizmuson keresztül aktiválódik. Több immunsejt rendelkezik gyakori makromolekulákat felismerő receptorral, így például a CD14 képes az LPS megkötésére, ami Toll-like receptor 4 aktiválásán keresztül intracelluláris jelátviteli útvonalak és immunválasz kiváltását eredményezi. Ez a veleszületett immunválasz az aktivált sejtekből hormonok és citokinek felszabadulását eredményezi, mint például interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor nekrosis faktor (TNF)- α , illetve a korábban említett MIF. Bizonyos citokinek további immunsejtek odahívását segítik, míg mások a perifériás szövetek gyulladással mediátorainak felszabadulását idézik elő. Utóbbiak közé tartoznak a proszttaglandinok (PG) is. A PG-ok az arachidonsav származékai, amelyből ciklooxygenáz (COX) hatására alakul ki a PGH₂. A COX-nak két formája ismert a COX-1, ami állandóan jelen van több szövettípusban és a COX-2, ami többnyire gyulladás által indukálható. A COX-2 folyamatosan expresszálódik az agy neuronjaiban, de szisztémásan adott LPS hatására elsősorban az agy kis vénáinak perivaszkuláris és endotél sejteiben indukálható. Ezek a venulák legsűrűbben a POA-ban, ventrolaterális medullában és nukleusz szolitariuszban találhatók. A PGH₂

aztán tovább metabolizálódik PG-k, prosztaciklin és IL-ek formájába, amelyek közül a szisztémás gyulladás szempontjából különösen fontos a PGE₂ és a PGD₂. A PGE₂-t a mikroszómális PGE-szintáz-1 hozza létre és négy különböző receptora van EP1-4, amelyek az agy több különböző részén expresszálódnak. A PGD₂ a lipokalin PGD-szintáz terméke és elsősorban DP1 receptoron keresztül hat, amely az agyhártyában található, emellett a hipotalamusztól ventrálisan fekvő régióban. A betegség szindrómában a PGE₂ szerepe igazolt a szisztémás gyulladás korai fázisának létrehozásáért (lásd alább), míg a PGD₂ elsősorban a késői fázis tüneteinek kialakításáért felelős, így az aluszékonyság, étvágytalanság, analgészia és feltételezhetően a hipotermia létrejöttéért.

A szisztémás gyulladás tünetei közül az egyik legfontosabb a testhőmérséklet változása, leggyakrabban láz. Az, hogy a lázválasz hiányzik COX gátlók adása esetén és olyan egerekben, amelyekben genetikusan hiányzik a mikroszómális PGE-szintáz-1, azt mutatja, hogy a lázat PGE₂ hozza létre. A láz különböző fázisait mediáló PGE₂ azonban több helyről is származhat a szervezetben. Az első (korai) fázis létrehozásáért például a periférián termelő PGE₂ felelős, amit az is bizonyít, hogy a vér-agy gáton át nem jutó PGE₂ ellenes antitest adásával a láz első fázisának kialakulása kivédhető. Az LPS a máj Kupffer sejtjei és pulmonáris makrofágok által expresszált Toll-like receptor 4-hez kötődve a foszfolipáz A₂, COX-2 és mikroszómális PGE-szintáz-1 enzimek mRNS- és fehérjeszintű termelésének fokozódását váltja ki, ami az artériás és vénás vér PGE₂ szintjének emelkedéséhez vezet. Ez a PGE₂ albuminhoz kötődik, ami megvédi az enzimátikus lebomlástól, majd a vér-agy gáthoz jutva az albuminról disszociál és a hipotalamuszba jut, ahol kifejti hatását. A láz későbbi fázisait (kb. 1 órával az LPS adást követően) már az agyi perivaszkuláris és endotél sejtekben fokozott COX-2 aktivitás által termelt PGE₂ tartja fenn.

A PGE₂ hatásának legfőbb mediátora az EP3 receptor, amely leginkább az MnPO neuronjaiban expresszálódik. Ennek bizonyítéka, hogy az EP3 receptorok MnPO-ra lokalizált kiiktatása a szisztémásan adott LPS és agykamrába adott PGE₂ lázkeltő hatását is kivédi. A preoptikus EP3 receptort expresszáló neuronok gamma-amino-vajsavat (GABA) termelnek, így gátolják azokat az idegi elemeket, amelyek a T_m emelkedését hoznák létre. Amikor PGE₂ kötődik hozzájuk aktivitásuk csökken, így a T_m emelését létrehozó mechanizmusok gátlásuk alól felszabadulnak és láz alakul ki. A láz létrejöttében szerepet játszik egyrészt a bőrerek konstriktója, amelyért az MnPO-ból a rostrális raphe pallidus magokba (rRPa), majd onnan a szimpatikus preganglionáris neuronokba futó idegpálya aktiválása felelős. Másrészt, az MnPO-ban található neuronok másik csoportja a dorsomediális hipotalamuszsal (DMH) áll összeköttetésben szintén az rRPa magokon keresztül és a barnazsír-szöveti hőtermelés szabályozásáért felelős. Előbbiek alapján tehát PGE₂ hatására rágcsálókban az autonóm hideg elleni effektorok (fokozott hőkonzerválás és hőtermelés) aktiválása jön létre a POA GABAerg, EP3 receptort kifejező neuronjainak csökkent aktivitásán keresztül, aminek eredménye a bőr vazokonstriktóra és barnazsír-szöveti hőtermelésre ható szimpatikus aktivitás gátlásának feloldása.

A TRPV1 csatornák aktivációja az idegvégződéseken (úgynevezett kapszaicin-szenzitív afferens idegrostokon) gyulladásos mediátorok markáns felszabadulását is eredményezi. A felszabaduló anyagok közé tartozik, többek között, a P anyag (SP), a kolecisztoxinin (CCK) és a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP). Figyelembe véve, hogy a neurokinin-1 (NK1) receptor, korábbi nevén SP receptor, szintén szerepet játszik lokális és szisztémás gyulladásos folyamatokban, az SP jelátviteli útvonal szerepe is felmerül a láz mediálásában. Rágcsálók kezelése antagonistá hatású SP analógokkal, az LPS-re adott lázválasz gátlását okozta, illetve az LPS-indukálta láz csökkenése patkányokban megfigyelhető volt NK1 receptor blokkoló adása esetén is. Ezek a tanulmányok erősen altátámasztják, hogy az SP jelátviteli útvonal hozzájárul az LPS-indukálta láz kialakulásához, de az nagyrészt tisztázatlan maradt, hogy a láz folyamatainak mediátorai közül melyeket befolyásolja az SP és annak NK1 receptora.

A CCK, amely gasztrointesztinális hormonként és agyi neurotranszmitterként is funkcionál, kétféle receptoron fejti ki a hatását: a CCK₁ receptoron, amely főleg a gasztrointesztinális traktusban található meg, és a CCK₂ receptoron, amely elsősorban a központi idegrendszerben lelhető fel. A CCK energetikai szabályozásban betöltött szerepét már korábban leírták: patkányokon, majmokon és embereken végzett vizsgálatokban a CCK táplálékfelvétel-csökkentő (anorexigén) hatását figyelték

meg. A CCK perifériásan adva a CCK₁ receptoron keresztül hipotermiát idéz elő, míg a központi idegrendszerbe juttatva a CCK₂ receptoron hatva lázszerű hipertermiás választ hoz létre. Ezek alapján a centrális CCK által indukált hipertermia szerepet játszhat a szisztémás gyulladásban megjelenő láz kialakulásában. Hasonlóan a PGE-indukált testhőmérséklet emelkedéshez, az i.c.v. adott CCK-oktapeptid is bőr vazokonstriktó és barnaszírszöveti termogenezis aktivációja által hoz létre hipertermiát. Azonban az indometacin általi COX gátlás nem volt hatással a CCK által indukált hipertermiára és CCK receptor inhibitorok sem gátolták a PGE-indukált hipertermiát. Utóbbi eredmények megkérdőjelezzik a CCK jelátviteli út termális hatásait és a COX-PGE útvonal közti kapcsolatot a centrálisan adott CCK és PGE által kiváltott termoregulatórikus hatások hasonlósága ellenére.

A PACAP 38 aminosavból álló formája (PACAP38) különös figyelmet érdemel, mert komplex szerepe erősen megalapozott különböző gyulladási folyamatokban. Továbbá, a polipeptid és receptorai széleskörben megtalálhatók az agy legfontosabb termoregulatórikus területein, köztük a hipotalamusz POA-ban, amely a lázválasz kiváltásának kiemelt fontosságú helye. Élettani kísérletekben a PACAP38 központi idegrendszerbe injektálása a T_m emelkedését hozta létre, amely a nem-didergéses hőtermelés és a lokomotoros aktivitás fokozása révén alakult ki, de nem derült fény arra, hogy a PACAP38 kiváltja-e az autonóm termoeffektorok egyidejű aktivációját is, amely a lázszerű válaszhoz mutatna hasonlóságot. A kérdés megválaszolásához szükség lenne a PACAP38 termoregulatórikus hatásainak karakterizálására.

3. Célkitűzések

Kutatásaink során főként állatkísérletek elvégzésével terveztük feltárni a testhőmérséklet szabályozásában szerepet játszó mechanizmusokat egészséges szervezetben és szisztémás gyulladásban. Vizsgálatainkat kiterjesztettük a termoregulatórikus folyamatok szabályozásában szerepet játszó alapvető élettani mechanizmusok, idegi struktúrák, valamint molekuláris és receptorális mediátorok tanulmányozására. Átfogó céljaink a hőszabályozási rendszer élettanának alaposabb megértésén túl, új diagnosztikai és prognosztikai markerek azonosítására, gyógyszerfejlesztési irányvonalak feltárására is kiterjedtek. Az állatkísérletek során nyert eredményeink emberekre való transzlációjának érdekében, néhány vizsgált témakör esetében humán adatok metaanalízisét is elvégeztük, illetve egy prospektív klinikai vizsgálatra is sorkerült. Specifikus célkitűzéseink az alábbiakban foglalhatók össze:

3.1. Thermo-TRP ioncsatornák szerepének tanulmányozása a testhőmérséklet szabályozásában

3.1.1. A TRPV1 ioncsatorna termoregulációban betöltött szerepének vizsgálata experimentális modellekben és humán adatok alapján

I. Experimentális modellek:

- TRPV1 ioncsatorna genetikai hiányában fellépő termoregulatórikus fenotípus tisztázása
- hipotermizáló TRPV1 antagonisták hatásmechanizmusának vizsgálata
- a TRPV1 antagonisták által indukált hipertermia idegi mechanizmusainak vizsgálata
- TRPV1 antagonisták által indukált hipertermia farmakológiai kihasználásának (repurposing) vizsgálata altatás során kialakuló hipotermia kivédésében

II. Humán adatok matematikai modellezése és metaanalízise:

- TRPV1 antagonisták termoregulatórikus hatásának vizsgálata

3.1.2. A TRPM8 ioncsatorna fájdalomtalan hidegérzékelésben betöltött szerepének vizsgálata rágcsálókban

3.1.3. A TRPA1 ioncsatorna hőszabályozási szerepének vizsgálata állatkísérletekben

- a TRPA1 ioncsatorna hidegszenzor szerepének vizsgálata a hőszabályozási rendszerben
- a TRPA1 ioncsatorna szerepének tisztázása a H₂S által indukált hipotermia kialakulásában

3.2. *Termo-TRP ioncsatornák vaszkuláris biológiai szerepének experimentális vizsgálata*

3.2.1. *A TRPV1 ioncsatorna szerepének vizsgálata a pH változásai által okozott vazomotoros válaszokban*

3.2.2. *Új kísérleti módszer kidolgozása vazomotor válaszok hőmérséklettől függő változásainak ex vivo tanulmányozására*

3.3. *Szisztémás gyulladásoz állapotok élettani és molekuláris mechanizmusainak tanulmányozása experimentális modellekben és humán adatok alapján*

I. Experimentális modellek:

- a TRPV1 ioncsatorna szerepének vizsgálata szisztémás gyulladásban fiatal és idős állatokban
- az SP jelátviteli útvonal hozzájárulásának vizsgálata LPS-indukálta láz kialakulásához NK1 receptor KO egerekben
- a CCK-COX interakció szerepének vizsgálata LPS-indukálta láz kialakulásában patkányokban
- a PACAP termoregulatórikus szerepének karakterizálása patkány és KO egér állatmodellekben

II. Metaanalízisek:

- a T_m eltéréseinek (láz és hipotermia) és a halálozás összefüggésének elemzése szeptikus betegekben
- a MIF diagnosztikai biomarker értékének elemzése szepszisben

III. Prospektív klinikai vizsgálat:

- a szérum és vizelet MIF szintek kinetikája és a szepszis kimenetele közötti összefüggés vizsgálata

4. Anyagok és módszerek

4.1. *Experimentális modellek*

4.1.1. *Kísérleti állatok és tartásuk*

Állatkísérleteinkben felnőtt Wistar és Spargue-Dawley patkányokat, valamint szintén felnőtt C57BL/6, illetve KO és WT egereket tanulmányoztunk. Vizsgálatainkban a következő gének homozigóta léziójával rendelkező KO egértörzseket (-/-) és WT társaikat (+/+) használtuk fel: *Trpv1*, *Trpa1*, *Trpm8*, *Pacap* és *Tacr1* (amely az NK1 receptort kódolja).

4.1.2. *Műtéti beavatkozások*

A műtéteket ketamin + xilazin i.p. adásával indukált narkózisban végeztük. Stresszmentes anyagadás érdekében a következő műtétek valamelyikére került sor: i.p. katéter implantáció, i.v. katéter implantáció és laterális agykamrai (i.c.v.) kanül implantáció. Szabadon mozgó egerekben az abdominális hőmérséklet (a T_m egyik formája) méréséhez az állatokba egy miniatúr telemetria transzmittert (Mini Mitter) vagy adatgyűjtőt (Subcue Dataloggers) implantáltunk. A termoregulatórikus idegpályák vizsgálatához a következő idegi léziót célzó beavatkozásokat alkalmaztuk: teljes szubdiafragmatikus vagotomia, bilaterális splanchnicotomia és bilaterális cervikális funiculotomia.

4.1.3. *TRPV1 ioncsatorna deszenzitizáció*

A deszenzitizáció fogalmát általánosságban kapszaicin vagy RTX hatására kialakult, exogén vagy endogén vanilloidokkal és más, a TRPV1 csatornát expresszáló idegsejtet aktiváló – például fájdalmas hőhatás – stimulusokkal szemben mutatott neuronális érzéktelenségi állapot leírására használjuk. Egerekben, a teljes szervezetre kiterjedő (szisztémás) TRPV1 ioncsatorna deszenzitizáció eléréséhez három egymást követő napon, altatásban, egyre emelkedő dózisu RTX kezelést (10, 30, majd 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.c.) végeztünk. Lokális, hasüregre korlátozódó TRPV1 ioncsatorna deszenzitizáció elérésére patkányokban i.p. RTX kezelést alkalmaztunk 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dózisban.

4.1.4. Termofiziológiai kísérleti elrendezések

4.1.4.1. Termoelem termometria

Termoelem termometriai kísérleteinkben az állatokat egy henger alakú szűkítőketrecbe helyeztük és réz-konstantán termoelemekkel szereltük fel a farkon a T_b , a kolonban pedig a T_m mérése céljából. A szűkítőketrecbe helyezett állatokat az adott kísérlethez meghatározott állandó T_k -t biztosító inkubátor kamrában helyeztük el. A stresszmentes anyagbeadáshoz az előzetesen beültetett i.p. vagy i.v. katéter végéhez, illetve az i.c.v. kanülbe a kísérlet napján behelyezett injektor végéhez PE-50 toldalékot csatlakoztattunk, amelynek végét az inkubátor kamra falának nyílásán keresztül kiveztettük.

4.1.4.2. Respirometriás termometria

A szűkítőketrecbe helyezett állatokat termoelemekkel és PE-50 toldalékkal szereltük fel, ugyanúgy, mint a termoelem termometriás elrendezésben végzett kísérleteknél. Ezután az állatokat a ketrecel együtt indirekt kalorimetria elvén alapuló anyagcsere meghatározásra szolgáló berendezés egyik plexikamrájába helyeztük. A kamrába belépő és a kamrából kilépő levegőben mértük az oxigén frakcionált koncentrációját, és a gyártó utasításai szerint szoftver segítségével kiszámítottuk az állatok oxigénfogyasztásának (VO_2) mértékét, amely rágcsálókban a nem-didergéses barnazsír-szöveti termogenezis aktivitásának az indikátora.

4.1.4.3. Telemetriás termometria

Szabadon mozgó állatokon végzett kísérleteinkben az egerek T_m -ét és általános lokomotoros aktivitását telemetriás módszerrel folyamatosan monitoroztuk i.p. implantált rádiotelemetriás transzmitter segítségével. Ez a módszer tette lehetővé a cirkadián hőmérsékleti változások analízisét.

4.1.4.4. Termográdiens rendszer

A termográdiens berendezés hat, egymással párhuzamos, 200 cm hosszú alumínium csatornából állt. A „meleg” oldalon a csatornában a T_k -t $30,0^\circ\text{C}$ -on tartottuk a „hideg” oldalon $20,0^\circ\text{C}$ -on. Ezekkel a beállításokkal minden csatornában egy nagyjából lineáris, hosszanti T_k grádiens alakult ki $0,05^\circ\text{C}/\text{cm}$ változással. Az egerek pozícióját a termográdiens apparátus csatornáiban egymástól egyenlő távolságra (3,5 cm) elhelyezett 56 vízszintesen futó infravörös sorompó segítségével határoztuk meg.

4.1.5. Lézeres folt interferencián alapuló áramlásmérés (laser speckle contrast imaging)

A vérátáramlás mértékét az egerek lumbális bőrében és a patkányok hasizmában PeriCam PSI rendszerrel mértük, amely lézer folt interferencián alapuló képalkotást alkalmaz. A vérátáramlás változását (amely mesterséges egységekben került meghatározásra), az anyagadás előtti alapvonalhoz viszonyított változás értékében fejeztük ki.

4.1.6. Izometriás erő mérés izolált artéria szegmentumokban ex vivo

Az állatokat elaltattuk, majd a karotisz kommunisz artériát vagy a fark bőr artériájának középső részét izoláltuk. Az érszakaszokat ezután 2 mm hosszú gyűrűkre daraboltuk. Az érgyűrűkben az izometriás erő változásainak mérését négy, 5 ml-es szervfürdőt tartalmazó DMT 610M miográf rendszerrel végeztük. Ehhez az érgyűrűket két volfrám drótra fűztük fel, amelyeket a miográf transzdúcereihez rögzítettünk. Egyik tanulmányunkban a szervfürdő hőmérsékletét a kísérlet során folyamatosan 37°C körüli értéken tartottuk, az oldat pH-ját azonban hidrogén-klorid (HCl) vagy nátrium-hidroxid (NaOH) oldat hozzáadásával változtattuk, míg egy másik tanulmányunkban állandó, 7,4-es pH érték mellett, egy általunk erre a célra kifejlesztett hűtő-fűtő kiegészítő berendezés segítségével az oldat hőmérsékletét 13, 16 vagy 37°C -ra állítottuk.

4.1.7. Molekuláris biológiai mérések és immunhisztokémia

Vérminták gyűjtéséhez az LPS beadását követően az adott kísérletben meghatározott időpontnál – 40 perc vagy 12 óra – az egereket elaltattuk, majd a mellkas felnyitása után a szív bal kamrájából vért gyűjtöttünk (~0,5 ml). A levett vért azonnal EDTA tartalmú csövekbe tettük, centrifugáltuk és a plazmát az immunoesszé mérésekig -80°C -on tároltuk. A mintagyűjtés végéig az állatokat túlaltattuk.

Tüdő-, máj- és agyszövet gyűjtésekor – immunoesszé, Westren blot és kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció mérésekhez – az LPS beadása után 40 perccel elaltatott egereket a bal kamrán keresztül foszfáttal pufferolt fiziológias sóoldattal (PBS) perfundáltuk. A májból és a jobb tüdőből vett szövetmintákat folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk. Az egeret ezután dekapitáltuk, majd a teljes agyat eltávolítottuk és lefagyasztottuk. Minden szövetmintát -80°C -on tároltuk a mérések elvégzéséig.

A c-Fos expresszió és TRPA1 mRNS *in situ* hibridizáció vizsgálatához az állatokat elaltattuk, a mellkast feltártuk, majd a bal kamrán keresztül PBS-sel perfundáltuk, amelyet hűtött, 0,2 mol/l koncentrációjú Millonig-féle pufferben oldott 4%-os paraformaldehiddel végzett perfúzió követett. Az állatokat dekapitáltuk, ezt követően agyukat eltávolítottuk, melyeket 12-24 órán át ugyanilyen oldatban posztfixáltunk. A c-Fos fehérje a sejtmagban felhalmozódva akut neuronális aktivációs markerként szolgál. Expressziójának immunhisztokémiai vizsgálatához az agyukat koronális síkban vibratómmal 30 μm vastagságú szeletekre metszettük, majd fagyálló oldatban -20°C -on tároltuk. Állatonként öt különböző síkból származó metszeten számoltuk meg a c-Fos pozitív idegsejteket Image J képanalizáló program (NIH) segítségével. A vizsgált agyterületek egerek esetén a mediális preoptikus terület (MPO) és az MnPO, patkányoknál az MPO, dorzális hipotalamikus area (DA), rRPa és a ventromediális hipotalamusz (VMH) voltak. RNAscope vizsgálatához az agyukat posztfixálás után PBS-ben öblítettük, dehidratáltuk és paraffinba ágyaztuk. Paxinos és Franklin atlaszának koordinátái alapján az MPO, a DMH, a laterális parabrachialis mag (LPB) és az rRPa régiókról fluoreszcens képeket készítettünk konfokális mikroszkóp és képgyűjtő szoftverrendszer segítségével.

4.1.8. Adatfeldolgozás és statisztikai analízis

A hőleadási állapot jelzésére a hőleadási indexet (HLI) használtuk, amely index akár gyorsan változó T_k mellett is jól alkalmazható: $\text{HLI} = (T_b - T_k) / (T_m - T_k)$. Az egyenlet alapján belátható, hogy a HLI értékei mindig 0 és 1 között ingadoznak, a nullához közelítő HLI értékek csökkent, az egyhez közelítők fokozott hőleadási állapotra utalnak.

Több csoport eredményeinek összehasonlításakor a statisztikai értékelés leggyakrabban varianciaanalízis (ANOVA) segítségével történt indokolt esetben *post hoc* tesztet is lefuttattunk. Két csoport összehasonlítása Student t-teszt vagy Mann-Whitney U teszt segítségével történt az adott kísérlet mintájától függően.

4.2. Humán adatok elemzése (metaanalízis, matematikai modellezés, klinikai vizsgálat)

4.2.1. Metaanalízisek

Metaanalíziseinkben a PubMed, EMBASE és Cochrane Library (CENTRAL) adatbázisokban végeztünk keresést. Mindegyik tanulmányt a PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis Protocols) iránymutatásai szerint végeztük el. A kereséseket szűrők beállításával emberekben végzett tanulmányokra korlátoztuk. A statisztikai elemzést a metaanalízisek standard módszereinek megfelelően végeztük biostatistikus kollégák segítségével. Az eredményeket legtöbbször erdő-grafikonok („forest plot”) formájában összegeztük. A tanulmányok közötti heterogenitást Q homogenitási teszttel és I^2 statisztikai teszttel vizsgáltuk ($I^2 > 50\%$ jelentett szignifikáns heterogenitást).

4.2.2. A hipertermiás index (H) és matematikai modellezése

A TRPV1 antagonisták termoregulatórikus hatásának elemzésére a humán adatok metaanalízise mellett matematikai modellezést is felhasználtunk. A matematikai modell alapjául a Ph.D. munkám során állatokban kifejlesztett és alkalmazott módszernek a humán adatokhoz való módosítása szolgált. Röviden, a hipertermiás indexet (H) egy TRPV1 antagonista esetében a szer beadása előtti (0. órai) és a beadást követő 3. óránál mért T_m különbségeként határoztuk meg. Feltételeztük, hogy a hipertermizáló hatás a három, egymástól függetlennek tekintett TRPV1 csatorna aktivációs mód gátlásaként jön létre. A gátlás mértékét minden aktivációs módban az alkalmazott dózis (D) függvényének tekintettük. A $H(D)$ összefüggést minden antagonista esetén külön

meghatároztuk az összegyűjtött adatok alapján. Szükséges volt megállapítani, hogy a H mennyire szenzitív az egyes TRPV1 csatorna aktivációs módok gátlásának mértékével szemben, vagyis meghatározni a szenzitivitási koefficiens k_i -t. Magas k_i érték azt jelenti, hogy az antagonistá hatáserőssége az i -edik aktivációs módban erősen és pozitívan korrelál a hipertermiás válasszal; nulla érték ilyen korreláció teljes hiányát jelenti; negatív érték pedig azt, hogy az i -edik aktivációs mód negatívan korrelál a H értékkel.

4.2.3. A MIF kinetikájának vizsgálata szeptikus betegek vérében és vizeletében prospektív klinikai tanulmányban

A PTE Klinikai Központ Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Osztályán a vizsgálatba olyan szeptikus betegeket vontunk be, akiknél az intenzív osztályra való felvételkor a szérumban prokalcitonin szintje emelkedett volt. Kizártuk azokat a betegeket, akik 18 év alattiak vagy 85 éven felüliek voltak, illetve akik megtagadták a vizsgálatban való részvételt. A halálozást az intenzív osztályra való felvételtől számított 90 napig követtük nyomon. A laboratóriumi paramétereket, beleértve a C-reaktív fehérjét, a prokalcitonint, a laktátot, a karbamidot és a kreatinint a szérumban, valamint a sejtszámokat az intenzív osztályra való felvételtől számított 0., 2. és 4. napon mértük. Ugyanezeket a napokon meghatároztuk a kreatinint és az összfehérje vizeletkoncentrációját, valamint a becsült glomeruláris filtrációs rátát is. Az intenzív osztályra való felvételkor kiszámítottuk a klinikai állapot súlyosságát pontszámokkal. A MIF szintjének méréséhez vizelet- és vénás vérmintákat gyűjtöttünk az intenzív osztályra való felvételtől számított 0., 2. és 4. napon. A MIF szintjét a vizeletben és a szérumban standard immunoesszé módszerekkel (katalógusszám: DY289; R&D Systems) határoztuk meg a gyártó ajánlásainak megfelelően. Az adatok statisztikai elemzését az R szoftverrel végeztük (3.6.1 verzió).

5. Eredmények

5.1. Thermo-TRP ioncsatornák szerepének tanulmányozása a testhőmérséklet szabályozásában

5.1.1. A TRPV1 ioncsatorna

5.1.1.1. Experimentális modellek

5.1.1.1.1. A TRPV1 ioncsatorna genetikai hiányában fellépő termoregulatórikus fenotípus tisztázása egerekben

Nagyszámú $Trpv1^{+/+}$ és $Trpv1^{-/-}$ egérben tanulmányoztuk a T_m és a termoeffektorok aktivitásának cirkadián változásait termogradiens, telemetria és respirometria rendszereinkben. A $Trpv1^{-/-}$ egerek T_m -e mindhárom rendszerben kismértékben ugyan, de szignifikánsan ($p < 0,05$) alacsonyabb volt a kontrollokénál a világos fázisban. A sötét (aktív) fázisban azonban a genotípusok közti különbség csökkent mértékű volt a respirometria rendszerben és teljesen eltűnt telemetriában. A termogradiens rendszerben pedig ellentétjére változott a különbség, vagyis a KO egerek T_m -e a sötét fázisban $0,5^\circ\text{C}$ -kal magasabb volt, mint a kontroll egereké ($p < 0,05$). Ennek a bifázisos dinamikának köszönhetően, a $Trpv1$ KO egerek teljes napi átlag T_m -e vagy hasonló volt vagy csak kissé volt alacsonyabb, mint a WT egereké minden berendezésben. A világos-sötét fázis közti változás amplitúdója azonban szignifikánsan kifejezettebb volt KO egerekben a kontrollokhoz képest a termogradiens rendszerben ($0,8 \pm 0,2$ vs. $0,2 \pm 0,1^\circ\text{C}$; $p < 0,05$) és a telemetria rendszerben ($1,0 \pm 0,1$ vs. $0,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$; $p < 0,01$), míg a respirometria rendszerben tendenciaszerű növekedést mutatott ($0,5 \pm 0,1$ vs. $0,2 \pm 0,2^\circ\text{C}$; $p < 0,1$). Összefoglalva, eredményeink alapján a $Trpv1$ KO egerek T_m -e kismértékben eltér a kontroll egerekétől a nap során, és ez az eltérés napszakra specifikus, továbbá bizonyos mértékben a kísérleti berendezéstől is függ.

A T_m eltéréseknél sokkal nagyobb különbséget találtunk a genotípusok között a T_m szabályozásához használt viselkedési és autonóm termoeffektorok mintázatában. Viselkedési szempontból, a $Trpv1$ KO egerek alacsonyabb T_k -t választottak $Trpv1^{+/+}$ társaikhoz képest függetlenül a napszaktól (napi átlagok tekintetében $26,3 \pm 0,2$ vs. $27,2 \pm 0,2^\circ\text{C}$; $p < 0,05$). A $Trpv1$ KO egereknek emellett a lokomotoros aktivitása magasabb volt, különösen a világos napszakban. Az

autonóm termoeffektorok aktivitásának vizsgálata során a respirometria rendszerben azt találtuk, hogy a *Trpv1* KO egerekre alacsonyabb metabolikus ráta és fokozottabb bőr vazokonstrikció volt jellemző, mint kontroll társaikra, függetlenül a sötét-világos napszaktól. Az átlagos VO_2 és T_b értékek a KO egerekben a kontrollokkal szemben sorrendben $18,9 \pm 1,0$ vs. $26,3 \pm 1,3$ ml/kg/min ($p < 0,0001$) és $35,0 \pm 0,2$ vs. $35,7 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$) voltak. Tekintve, hogy ezeket a kísérleteket mozgásukban részlegesen korlátozott egerekben végeztük (részletekért, lásd 4.1.4.2. fejezet), a VO_2 -ben talált különbséget lényegesen nem befolyásolhatta a két genotípus lokomotoros aktivitásában fentiekben bemutatott különbség. Összefoglalva, a *Trpv1* KO egerek hőszabályozási fenotípusában egy egyedi termoeffektor mintázatot találtunk: hűvösebb környezetet kedvelnek, hiperaktívak, hipometabolikusak és bőrükben fokozottabb a vazokonstrikció.

A nyugalmi állapotban meghatározott eltérő termoeffektor mintázat leírása után, tanulmányoztuk a *Trpv1* KO egerek hőszabályozási válaszát hőterhelés és hidegterhelés során. Nagyfokú hőterhelésnek ($T_k = 39,0^\circ\text{C}$) való kitételkor sem a T_b , sem pedig a T_m válaszban nem volt különbség a genotípusok között. Nagyfokú hidegterhelés ($T_k = 5,0^\circ\text{C}$) modellben, mindkét genotípushoz tartozó egerek bőrér vazokonstrikcióval (csökkent T_b) és hideg-indukálta termogenezissel (emelkedett VO_2) reagáltak, de mindezen hideg elleni védekező mechanizmusok ellenére, T_m -ük több, mint 14°C -kal csökkent. A termoregulatórikus válasz dinamikája azonban különböző volt a két genotípus között. A *Trpv1* KO egerekben a VO_2 60 perccel a hidegexpozíció kezdetét követően már tetőzött, majd platózott a kísérlet végéig (kb. 150 percig), viszont a kontroll egerekben a VO_2 elérte ugyan ugyanazt a maximális szintet, de kb. a 100. perctől kezdve csökkenni kezdett ($p < 0,0001$) és ennek megfelelően T_m -ük is esett ($p < 0,0001$). Eredményeink arra utalnak, hogy a *Trpv1* KO egerek nyugalmi anyagcseréje alacsonyabb ugyan, de a hideg-indukálta termogenezist mégis valamelyest hosszabb ideig tudják fenntartani, mint genetikailag nem módosított kontroll társaik.

A *Trpv1* KO egerek hiperaktivitásának felismerése után, megvizsgáltuk, hogy RTX csökkenti-e a lokomotoros aktivitást. Ennek érdekében, i.p. RTX-et adtunk *Trpv1*^{-/-} egereknek, illetve két *Trpv1*^{+/+} törzshöz tartozó egereknek, C57BL/6x129 és C57BL/6 háttérrel. Az RTX-et bólusban injektáltuk az állat rövid ideig tartó felemelésével és akut hasfalon keresztüli megszurásával. Ennek az eljárásnak köszönhetően az egér kézbevétele és a tűszúrás (amelyek szükségesek voltak az anyag beadásához) megemelték az állatok egyébként alacsony aktivitását, amely a világos (inaktív) napszakra jellemző. A vehikulum beadása mérsékelt hiperaktivitást és tipikus stressz-indukálta hipertermiát váltott ki mindegyik vizsgált genotípusban. Az RTX (200 ng/kg, i.p.) azonban meggátolta mind a hiperaktivitást, mind a hipertermia kialakulását a *Trpv1*^{+/+} törzsű egerek mindkét csoportjában ($p < 0,0001$ mindkét törzs esetén), annak ellenére, hogy a beadott alacsony RTX dózis tényleges hipotermiát nem váltott ki. Kísérleteinkben ugyanaz az RTX dózis, amely anti-hiperkinetikus és anti-hipertermiás hatással bírt a kontroll egerekben, nem befolyásolta ezeket a stressz-indukálta válaszokat a *Trpv1* KO egerekben. Eredményeink arra utalnak, hogy perifériásan adott RTX csökkenti a stressz-indukálta lokomotoros aktivitást és hipertermiát a TRPV1 ioncsatornán keresztül.

Ezek után megvizsgáltuk, hogy az AEA, egy endokannabinoid, amely a TRPV1 csatorna teljes értékű agonistája, hasonló módon befolyásolja-e a stressz-indukálta lokomotoros aktivitást, mint az RTX. Kísérleteink során a vehikulum akut i.p. injektálása a lokomotoros aktivitást emelkedését váltotta ki, de stressz-indukálta hipertermia nem alakult ki ebben az esetben. A vehikulummal összehasonlítva, az AEA (15 mg/kg) szignifikánsan csökkentette a T_m -et és erősen redukálta a lokomotoros aktivitást (azaz szuppresszálta a stressz-indukálta hiperkinézist) a *Trpv1*^{+/+} egerek mindkét törzsében. Ezek az eredmények összhangban vannak az AEA korábban leírt hipotermizáló és hipokinetikus hatásával egerekben és patkányokban nagy dózisok beadása esetén. A *Trpv1*^{-/-} egerekben azonban ezek közül a hatások közül egyik sem alakult ki AEA injekció hatására. Az AEA testhőmérsékletet csökkentő és aktivitást redukáló hatásainak teljes hiánya a *Trpv1* KO egerekben azt jelzi, hogy a kannabinoid receptorok nem vesznek részt ezeknek a hatásoknak a mediálásában. Tudomásunk szerint ez volt az első olyan megfigyelés, amely direkt módon igazolta,

hogy az AEA a TRPV1 csatornán keresztül fejti ki a T_m -et és a lokomotoros aktivitást csökkentő hatását.

Következő lépésként azt vizsgáltuk, hogy az AMG0347, egy potens és szelektív TRPV1 antagonistá, milyen hatásokkal bír a *Trpv1*^{-/-} és *Trpv1*^{+/+} egerek T_m -ére és lokomotoros aktivitására. A TRPV1 agonistákkal kapott eredményeink alapján, arra számítottunk, hogy az antagonistá fokozni fogja a lokomotoros aktivitást. Annak érdekében, hogy az emelkedést ki tudjuk mutatni, kivédtük a stressz-indukálta hiperkinézist olyan módon, hogy az AMG0347-et vagy vehikulumát stresszmentes módon egy korábban implantált i.p. katéteren keresztül adtuk be az inkubátor kamrán kívülről. A vehikulumhoz képest az AMG0347 (50 µg/kg, i.p.) hipertermiát és hiperkinézist váltott ki a *Trpv1*^{+/+} egerekben ($p < 0,0001$ mindkét paraméter esetén). Amíg a TRPV1 antagonistá által indukált hipertermia kialakulása várható volt korábbi adatok alapján, addig a lokomotoros aktivitás emelkedése új eredmény, hiszen patkányokkal végzett korábbi tanulmányokban nem írtak le változást a lokomotoros aktivitásban több tesztelt TRPV1 antagonistá esetében sem. Az idézett közleményekben azonban minden esetben stresszkeltő módon (gyakran i.g. szondával) került sor a TRPV1 antagonisták beadására, így a kialakuló stressz-indukálta hiperkinézis könnyen elfedhette a rövid időtartamú, mérsékelt lokomotoros aktivitás fokozódást, amelyet mi megfigyeltünk. Az AMG0347 ugyanakkorra dózisa, mint ami hipertermiát és hiperkinézist váltott ki a kontroll egerekben, semmilyen hatással nem volt a *Trpv1* KO egerek T_m -ére és lokomotoros aktivitására. Kísérleteink során először mutattuk ki az AMG0347 hiperkinetikus hatását és azt, hogy ez a hatás célspecifikusan a TRPV1 csatornán keresztül jön létre.

Arra is kerestük a választ, hogy RTX i.p. beadása az agyban vagy azon kívül hatva fejti ki anti-hiperkinetikus hatását. Ennek érdekében RTX nagyon alacsony dózist, 20 ng/kg-ot adtuk be az egereknek vagy i.p. vagy a laterális agykamrába (i.c.v.). I.p. anyagadás során ez a dózis csökkentette a injekciós stressz által indukált hipertermiát és lokomotoros aktivitás fokozódást ($p < 0,0001$ mindkét paraméter esetén). Ezzel szemben, ugyanekkora dózisu RTX i.c.v. beadása egyik vizsgált paraméterre sem volt hatással.

Az egerek termoregulatórikus fenotípusának vizsgálata során, tanulmányukban váratlan megfigyelésként azt vettük észre, hogy az életkor előrehaladtával mindkét nemhez tartozó *Trpv1* KO egerek súlya nagyobb volt, mint *Trpv1*^{+/+} társaiké. Nyolc hónapos korukban, például, a hím *Trpv1* KO egerek testtömege 14%-kal haladta meg azonos korcsoportú hím kontroll társaikét: 49 ± 1 vs. 43 ± 1 g ($p < 0,0001$). Elsősorban haskőrfogatuk volt nagyobb, illetve viscerális és szubkután zsírszövetük is vastagabbnak látszott a műtéti beavatkozások során. A korábban ismertett hiperaktivitás (amelyet fiatalokorú egerekben figyeltünk meg) és a túlsúly (amely idősebb egerekre volt jellemző) egymásnak ellentmondani látszik, de hasonló megfigyelésre más szerzők által egészséges emberekben is sorkerült: azoknak az egyéneknek, akik fiatalokorukban fizikailag aktívabbak voltak, testtömegük az életkor előrehaladtával jobban nőtt. Megfigyeléseink alapján feltételezhető volt, hogy a TRPV1 csatorna védő szereppel rendelkezik a korfüggő elhízás kialakulásával szemben.

A *Trpv1* KO egerekben fiatal korukban talált hiperaktivitás és idősebb korukban kialakuló túlsúly közötti paradoxon feloldására, további vizsgálatokat végeztünk mindkét genotípushoz tartozó öregedő (több, mint 40 hetes) egerekben, amelyek során összehasonlítottuk lokomotoros aktivitásukat és testtömegüket. Kimutattuk, hogy hasonlóan a fiatal egerekben találtakhoz, a napi testhőmérséklet-ingadozások amplitúdója idősebb *Trpv1* KO egerekben is meghaladja kontroll társaikét: a világos fázisban alacsonyabb, a sötét fázisban magasabb volt a KO egerek T_m -e a kontrollokhoz képest. Az idősebb (42 \pm 1 hét) korú hímekeket és nőstényeket is tartalmazó egércsoportok testtömegének összehasonlításakor a *Trpv1*^{-/-} egerek ebben a tanulmányban is több, mint 21%-kal nagyobb súlyúak voltak a *Trpv1*^{+/+} egereknél (48 ± 1 vs. 43 ± 1 g; $p = 0,001$). A megválaszolendő kérdés szempontjából azonban nagyobb jelentőségű, hogy ellentétben a fiatal egerekben találtakkal, a 40 hétnél idősebb egerek esetében a *Trpv1* KO egerek lokomotoros aktivitása alacsonyabb – nem pedig magasabb – volt az egész nap során kontroll társaikénál (napi átlagok: 9 ± 1 vs. 14 ± 1 egység/min; $p = 0,001$).

5.1.1.1.2. Hipotermizáló TRPV1 antagonisták hatásmechanizmusának vizsgálata rágcsálókban

Arra a kérdésre is kerestem a választ, hogy a hipertermiát okozó TRPV1 antagonistáknál kisebb számban elérhető, hipotermiát kiváltó TRPV1 antagonisták milyen mechanizmusokon keresztül fejtik ki testhőmérsékleti hatásukat. Ennek érdekében egy szelektív és potens, kollaborátoraink által újonnan szintetizált TRPV1 antagonista, az A-1165901 termoregulatórikus hatásait tanulmányoztuk egerekben és patkányokban, illetve összehasonlítottuk egy korábról már ismert hipotermizáló TRPV1 antagonista, az AMG7905 hatásaival.

Az A-1165901 hatásainak precíz karakterizálásához az anyagot stresszmentes módon adtuk be az állatoknak, majd vizsgáltuk a T_m -üket és termoeffektor mechanizmusait különböző hőmérsékleti körülmények között: 26°C-on (amely ebben a rendszerben a termoneutrális zóna alsó határát jelenti) vagy 17°C-on (hideg környezetben) hajtottuk végre. Az A-1165901 (3 mg/kg, i.p.) mindkét T_k -n csökkentette a T_m -et kb. 1,0°C-kal, amelynek nadírja 50-70 perccel anyagadás után alakult ki. A 26°C-os környezetben mindegyik patkány esetében enyhe farokbőr vazodilatáció és relatíve alacsony termogenezis volt jellemző az anyagadást megelőzően. Az A-1165901 ezen a T_k -n a hőleadás hirtelen emelkedését váltotta ki, ennek megfelelően a HLI szignifikánsan magasabb volt az A-1165901-gyel kezelt patkányokban a vivőanyaggal kezeltékhez képest az anyagadást követő 10. és 60. perc között ($p < 0,05$). Annak ellenére, hogy az A-1165901-gyel kezelt állatok VO_2 -je alacsonyabbnak tűnt a kontrollokénál, a különbség nem mutatkozott statisztikailag szignifikánsan ezen a T_k -n. Az előbbiekkal ellentétben, 17°C-on a patkányok farokbőrében erős vazokonstriktió volt jelen a kísérlet teljes időtartama alatt, viszont anyagadás előtti VO_2 -jük magasabb volt a termoneutrális körülményekhez képest, amely a hideg által indukált termogenezis kialakulására utalt. Az A-1165901 nem okozott vazodilatációt a farokbőrben ezen a T_k -n, de nagymértékben csökkentette a termogenezist a kontrollokhoz képest ($p < 0,05$).

Annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy az A-1165901 hipotermizáló hatásának kiváltásában szerepet játszanak-e a hasi régió szenzoros idegvégződése, lokalizált abdominális TRPV1 deszenzitizációt hoztunk létre, majd vizsgáltuk a deszenzitizált patkányok termoregulatórikus reakcióját A-1165901 (vagy vehikulum) adására enyhén szubneutrális környezetben ($T_k = 27^\circ\text{C}$). Az A-1165901 adása (3 mg/kg, i.p.) a vivőanyaggal előkezelt (kontroll) patkányokban a T_m nagyfokú csökkenését és a HLI emelkedését váltotta ki. A testhőmérsékleti válasz azonban sokkal kisebb mértékű volt a deszenzitizált patkányokban, és a HLI változása teljes mértékben elmaradt. Az A-1165901 hatása szignifikánsan különbözött az RTX és vehikulum előkezelést kapott csoportok között mind a T_m , mind a HLI tekintetében ($p < 0,001$ mindkettő esetében). Az abdominális TRPV1 csatornák deszenzitizációjának igazolására ebben és az alábbiakban ismertett tanulmányokban is megvizsgáltuk az RTX kis dózisének (0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) i.p. adásával kiváltott, úgynevezett vonaglasi reakciót, amely csaknem teljes mértékben hiányzott a deszenzitizált patkányokban ($p < 0,001$). Annak megerősítésére, hogy a deszenzitizáció nem terjedt ki a teljes szervezetre, tanulmányoztuk az állatok topikálisan alkalmazott RTX-re adott szemtörlési reakcióját, amelynek során nem találtunk szignifikáns különbséget a deszenzitizált és a kontroll patkányok között. Korábbi adatokkal összhangban, ezek az eredmények arra utaltak, hogy a TRPV1 csatornák funkciója kizárólag a hasban károsodott a deszenzitizált patkányokban.

Ezek után *Trpv1*^{-/-} és *Trpv1*^{+/+} egerek felhasználásával arra kerestük a választ, hogy a TRPV1 antagonisták által kiváltott hipotermia valóban a célmolekulán, tehát a TRPV1 csatornán keresztül kiváltott (on-target) hatás-e. A *Trpv1*^{+/+} egerekben az A-1165901 és az AMG7905 nagyfokú T_m csökkenést (>2,0°C) okozott a vivőanyaggal kezelt csoporthoz képest ($p < 0,001$). A WT egerekkel ellentétben, sem az A-1165901, sem pedig az AMG7905 nem volt hatással a *Trpv1*^{-/-} egerek T_m -ére.

Annak ismeretében, hogy a hipertermiát okozó TRPV1 antagonisták erősen gátolják a TRPV1 csatorna protonok általi aktivációs módját (részletekért, lásd 2.2.1.2. fejezet), gyógyszerfejlesztő kollaborátoraink segítségével megvizsgáltuk a hipotermizáló TRPV1 antagonisták hatását is erre az aktivációs módra. A kísérletek során az A-1165901 és az AMG7905 egyaránt potensen gátolta a TRPV1 csatorna kapszaicin általi aktivációját, az IC_{50} értékeik sorrendben $3,7 \pm 1,4$ nmol/l és $29,3 \pm 12,4$ nmol/l voltak. Ellentétben a vanilloid aktivációs módban találtakkal, mindkét anyag koncentrációfüggő módon potenciózta a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételt a protonok általi aktiváció során. Az A-

1165901 esetében ez a hatás már nagyon alacsony, 1 nmol/l alatti koncentrációk alkalmazása esetén is kimutatható volt.

5.1.1.1.3. A TRPV1 antagonisták által indukált hipertermia idegi mechanizmusainak vizsgálata

Azok után, hogy fényt derítettünk arra, hogy a hipotermizáló TRPV1 antagonisták is abdominális TRPV1 csatornákon hatva, de protonok általi aktivációjuk ellentétes irányú modulálásával fejtik ki testhőmérsékleti hatásukat mint a hipertermizáló TRPV1 antagonisták, kíváncsi voltam arra is, hogy a hasi régióknak pontosabban melyik részén található a termális hatás támadáspontjaként szolgáló TRPV1 populáció, illetve, hogy onnan milyen afferens idegi mechanizmusokon keresztül jut el a termoeffektor hurkok afferens neuronjaihoz az információ.

Annak megerősítésére, hogy a TRPV1 antagonisták hasi támadásponton keresztül okoznak hipertermiát, abdominálisan deszenzitizált patkányokban megvizsgáltuk három különböző TRPV1 antagonistá (AMG0347, AMG 517 és AMG8163) beadása után a kialakuló termoregulatórikus választ. Összhangban korábbi eredményekkel, az AMG0347 (50 µg/kg) i.v. beadása kontroll patkányokban a T_m kifejezett emelkedését okozta, míg RTX előkezelésen átesett (abdominálisan deszenzitizált) patkányokban ugyanilyen dózissal AMG0347 nem befolyásolta a T_m -et ($p < 0,001$). Ezután megvizsgáltuk, hogy a hasi TRPV1 csatornáknak deszenzitizációja ugyancsak kivédi-e az AMG 517-re és az AMG8163-ra adott hipertermiás válaszokat. Vivőanyaggal előkezelt patkányokban az AMG 517 (100 µg/kg) i.v. adása a T_m jelentős emelkedését váltotta ki, deszenzitizált patkányokban azonban ugyanez a dózis nem okozott jelentős változást a T_m -ben. Az AMG 517 hatása szignifikánsan különbözött a kontroll és deszenzitizált előkezelési csoportok között ($p < 0,001$). Az AMG0347-hez és az AMG 517-hez hasonlóan az AMG8163-ra (70 µg/kg, i.v.) adott hipertermiás válasz sem jött létre a deszenzitizált patkányokban a kontrollokhoz képest ($p < 0,001$).

Annak tesztelésére, hogy az abdominális vagus részt vesz-e a TRPV1 antagonisták által kiváltott hipertermia kialakulásában, megvizsgáltuk az i.v. AMG0347-re adott hőszabályozási válaszokat teljes szubdiafragmatikus vagotomián átesett patkányokban. A vagotomizált és a kontroll patkányok egyaránt a $T_m \sim 0,7^\circ\text{C}$ -os emelkedésével reagáltak az AMG0347 (50 µg/kg) i.v. beadására, és nem volt különbség a műtéti csoportok között. A vagotomia sikerességét megerősítve a kísérletek végén a gyomortömeg szignifikánsan ($p < 0,001$) nagyobb volt a vagotomizált patkányokban, mint a kontrollokban.

Annak vizsgálatára, hogy a splanchnicus major idegek közvetítik-e a TRPV1 antagonisták által kiváltott hipertermia kialakulását, bilaterális splanchnicotomián átesett patkányok AMG0347 (50 µg/kg) i.v. adásával kiváltott hőszabályozási válaszait vizsgáltuk. Az AMG0347 hatására a splanchnicotomizált és kontroll patkányokban is kifejezett ($\sim 0,7^\circ\text{C}$) hipertermia alakult ki, ami nem különbözött a csoportok között. A splanchnicotomia sikerességét megerősítette, hogy a splanchnicotomizált patkányokban a vér kortikoszteronszintjének stresszre adott emelkedése szignifikánsan elmaradt a kontroll állatokétól (19 ± 4 vs 139 ± 46 ng/ml; $p = 0,01$).

Ezután megvizsgáltuk, hogy a dorzolaterális funiculusból (DLF) futó gerincvelői pályák szükségesek-e a TRPV1 antagonistákra adott hipertermiás válasz kialakulásához. Ehhez kétoldali dorzolaterális funiculotomiát (vagy kontroll beavatkozást) végeztünk, és a patkányokat AMG0347-tel kezeltük. Azt találtuk, hogy az inkomplett lézió vagy kontroll beavatkozáson átesett állatokban az AMG0347 a $T_m \sim 0,6^\circ\text{C}$ emelkedését okozta, amely a beadást követő 5-10. percnél kezdődött és a 25-55. percnél tetőzött. A kontroll állatokkal ellentétben a komplett dorzolaterális funiculotomián átesett patkányokban az AMG0347-re adott hipertermiás válasz mértéke jelentősen csökkent ($p < 0,001$). A lézió teljességét minden egyes állatnál funkcionálisan hideg folyadékból való fark kirántási teszttel és morfológiailag szövettanilag igazoltuk. A komplett (12 ± 2 s; $p = 0,013$) és inkomplett (10 ± 1 s; $p = 0,019$) dorzolaterális funiculotomia csoportban a fark kirántásának latenciája szignifikánsan meghosszabbodott a kontroll patkányokhoz képest (6 ± 1 s).

A fentiekben ismertetett kísérletek arra utalnak, hogy a TRPV1 antagonisták által kiváltott hipertermia mechanizmusában szerepet játszanak a hasi régióban található TRPV1 csatornákat expresszáló érzőidegek, és hogy az ezen idegek által közvetített szignálok nem a vagus közvetítésével, hanem a gerincvelőn keresztül jutnak el az agyba; azonban nem a splanchnicus major

idegeken keresztül. Feltételeztük, hogy az ilyen spinálisan közvetített (de splanchnicus idegektől független) szignálok a hasi vázizomzat TRPV1 csatornáiból származhatnak. Ha ez a hipotézis igaz, akkor a kisdózisú RTX i.p. beadása után fellépő deszenzitizációnak a hasfal izmaiban lévő TRPV1 csatornát expresszáló afferenseket is érintetnie kell. Ennek tesztelésére, megvizsgáltuk, hogy a külső ferde hasizom vérátáramlásának lokálisan adott kapszaicin hatására kialakuló változásait befolyásolja-e a kisdózisú i.p. RTX hatására kialakuló deszenzitizáció. A kapszaicin lokális, i.m. (a külső és a belső ferde hasizom közé) beadása a kontroll patkányokban az izom vérátáramlásának jelentős csökkenését okozta, azonban ugyanolyan dózisú kapszaicinnek nem volt hatása az RTX előkezeléssel deszenzitizált patkányokban. A kapszaicin vérátáramlásra gyakorolt hatása szignifikánsan különbözött az RTX és a vivőanyag előkezelésben részesült csoportok között ($p < 0,001$). Az alkalmazott dózisban a kapszaicin i.m. injekciója nem befolyásolta a nyaki verőérben mért szisztolés vérnyomást.

5.1.1.1.4. TRPV1 antagonisták által indukált hipertermia farmakológiai kihasználásának (repurposing) vizsgálata altatás során kialakuló hipotermia kivédésében rágcsálókban

A TRPV1 antagonisták testhőmérsékleti hatásmechanizmusainak tanulmányozása mellett, az a kérdés is felmerült, hogy ezt a termális „mellékhatást” ki lehetne-e használni gyógyszerfejlesztési szempontból speciális körülmények között. Ennek kapcsán teszteltük azt a hipotézist, miszerint a hipertermizáló TRPV1 antagonisták beadása az altatás indukciójakor felhasználható lehetne az általános anesztézia által indukált hipotermia megelőzésére.

Először azt vizsgáltuk, hogy TRPV1 antagonistával kivédhető-e az i.v. anesztézia által indukált hipotermia *Trpv1*^{+/+} és *Trpv1*^{-/-} egerekben. Az egértörzsek összehasonlításával továbbá azt is tisztázni kívántuk, hogy a hatás specifikusan a TRPV1 csatorna gátlásán keresztül alakul-e ki. Ennek érdekében, az anesztézia létrehozására ezekben a kísérletekben 50 mg/kg ketamint adtunk be stresszmentesen az egereknek preimplantált i.p. katéteren keresztül. Négy perccel később, AMG 517 1 mg/kg-os dózist (vagy vivőanyagát) adtuk be ugyancsak az i.p. katéteren keresztül. Az AMG 517 vivőanyagával kezelt *Trpv1*^{+/+} egerekben a ketamin hipotermiát okozott $35,2 \pm 0,4^\circ\text{C}$ -os nadírral ($p < 0,001$) 20 perccel anyagadás után. Az egerek T_m -e a kiindulási értéknél szignifikánsan alacsonyabb maradt még 240 perccel a ketamin adását követően is. Akkor azonban, amikor a *Trpv1*^{+/+} egereket a vivőanyag helyett AMG 517-tel kezeltük, a ketamin által indukált hipotermia megszűnt az injekciót követő 40. percnél, és onnantól fogva T_m -ük egyszer sem csökkent a kiindulási érték alá a kísérlet során. Az AMG 517-tel kezelt *Trpv1*^{+/+} egerek T_m -e szignifikánsan ($p < 0,05$) magasabb volt a vivőanyaggal kezelt egerekénél 40-240 perccel a ketamin injekció után. A *Trpv1*^{-/-} egerekben a ketamin szintén kifejezett hipotermiát hozott létre 10-240 perccel az injekció beadása után, amelynek dinamikája hasonló volt a *Trpv1*^{+/+} egerek esetében látottakhoz. Ellentétben azonban a *Trpv1*^{+/+} egerekkel, az AMG 517 adása a *Trpv1*^{-/-} egerekben nem védte ki a ketamin által indukált hipotermiát. Nem találtunk szignifikáns különbséget az AMG 517-tel és vivőanyaggal kezelt *Trpv1*^{-/-} egerek T_m -e között a kísérlet teljes időtartama alatt.

Ezek után megvizsgáltuk, hogy melyik autonóm termoeffektor járul hozzá az AMG 517 ketamin által indukált hipotermiára kifejtett hatásához. A ketaminnal kezelt patkányokban, az AMG 517 i.v. beadása kivédte az altatás által indukált hipotermia kialakulását. Az AMG 517-tel kezelt patkányokban a T_m szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollokban 70-240 perccel az anyagadás után. A termoeffektor mintázatot illetően azt találtuk, hogy a ketamin által indukált VO_2 csökkenés sokkal kisebb mértékű volt AMG 517 adása után a vehikulum kezeléshez képest ($p < 0,05$).

Tekintettel arra, hogy bizonyos TRPV1 antagonisták éber (nem anesztetizált) rágcsálókban és emberekben hipertermiát okozhatnak, fontosnak tartottuk annak vizsgálatát is, hogy az altatott patkányoknak adott TRPV1 antagonista kivált-e hipertermiát az anesztézia lecsengése utáni periódusban. Ennek lehetőségét ketaminnal és izofluránnal indukált anesztézia esetében is megvizsgáltuk. Először, AMG 517-tel (vagy vivőanyagával) kezeltük a ketaminnal elaltatott állatokat, és mértük a T_m -üket kiterjesztett, 480 perces időtartamban. Általánosságban a ketamin által indukált altatásból kb. 60 perc alatt térnek magukhoz az állatok. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy az AMG 517 infúzió kivédte a ketamin által indukált hipotermiát, ahogy korábban ismertetett

eredményeink alapján várható is volt. Kiemelendő azonban, hogy az AMG 517-tel kezelt állatok T_m -e nem tért el szignifikánsan a kiindulási (anyagadás előtti) T_m értéktől még 480 perccel az infúzió után sem. Ehhez hasonlóan, az izoflurán anesztézia 20 perces fenntartása, majd a gáz adagolásának kikapcsolása után, az állatok kb. 15 percen belül tértek magukhoz, míg T_m -ük az anesztézia felfüggesztését követő 50. percnél tért vissza kiindulási értékéhez. Hangsúlyozni kell, hogy az AMG 517 az izoflurán által indukált hipotermiát is kivédte, azonban a ketaminhoz hasonlóan a kiindulási értékhez képest nem okozott hipertermiát az anesztézia felfüggesztése után 20-70 perccel sem.

5.1.1.2. A TRPV1 antagonisták termoregulatórikus hatásának vizsgálata embereken matematikai modellezéssel és metaanalízissel

A TRPV1 ioncsatorna termofiziológiai és energetikai szabályozásban betöltött szerepének experimentális modellekben való tanulmányozása után transzlációs kutatási megközelítéssel eredményeink humán vonatkozásaira is kíváncsi voltam. A TRPV1 antagonisták termoregulatórikus hatásával kapcsolatban azt szeretnénk volna tisztázni, hogy a rágcsálókban felderített farmakológiai profil embereken is érvényesül-e a testhőmérsékleti hatások kiváltása során. Ennek érdekében összegyűjtöttük az irodalomban fellelhető releváns humán adatokat, majd kiegészítettük azokat korábban még nem publikált, gyógyszerfejlesztő kollaborátoraink által gyűjtött adatokkal és két különböző megközelítéssel analizáltuk az összeállított adathalmazt: 1) klasszikus metaanalízis módszerekkel, és 2) egy korábbi tanulmányunk során állatokban kifejlesztett matematikai modell felhasználásával, amelyet humán adatok elemzéséhez alkalmassá módosítottunk (részletekért, lásd 4.2.2.)

A TRPV1 antagonisták embereken kifejtett termoregulatórikus hatásának elemzéséhez 87 humán vizsgálatot azonosítottunk, amelyek közül 18 tanulmányban mértek valamilyen módon T_m -et. A matematikai elemzéshez és a metaanalízishez *a priori* meghatározott beválogatási és kizárási kritériumok ellenőrzése után végül 4 tanulmány adatait tudtuk felhasználni, egy további TRPV1 antagonistával (V116517) szerzett humán adatokat pedig szerzőtársaink a fejlesztő gyógyszercégtől (Purdue Pharma) bocsátották rendelkezésünkre.

A matematikai modellezéssel végzett elemzésünk azt az eredményt hozta, hogy embereken a TRPV1 antagonisták hipertermizáló hatása a humán TRPV1 csatorna protonok általi aktivációs módjának gátlásával szemben mutatja a legnagyobb érzékenységet. A hipertermizáló hatás érzékenységi együtthatója a proton aktivációs módban (átlag \pm SE) $1,37 \pm 0,00$ volt ($p < 0,001$). Ebben az értelemben, a TRPV1 antagonistákra adott hipertermiás válasz embereken hasonló a patkányokban korábban találtakhoz: mindkét fajban a proton aktivációt erősen gátló anyagok okozzák a T_m emelkedését.

Analízisünk során, továbbá, azt is megállapítottuk, hogy a patkányokban kialakuló hipertermiás válasszal szemben (amely nem mutat érzékenységet a hő általi aktivációs mód megváltozásával), embereken ez a válasz magasfokú érzékenységet mutat az antagonista hő általi aktivációját gátló hatáserősségével. Az embereken kialakuló válasz esetén, a hő általi aktivációs módban a hipertermizáló hatás érzékenységi együtthatója $1,09 \pm 0,00$ volt ($p < 0,001$). A kapszaicin aktivációs módot illetően, annak gátlása sem patkányokban (a JYL1421 adatainak felhasználásával), sem pedig embereken nem volt lényeges a hipertermizáló hatás kifejtése szempontjából. Embereken, a hipertermiás válasz érzékenysége a kapszaicin mód gátlásával szemben negatív volt és hatszor kisebb mértékű, mint a proton aktivációs módban. Szám szerint az érzékenységi együttható az embereken kialakuló hipertermia esetén $-0,23 \pm 0,00$ volt ($p < 0,001$).

A fentiekben felsorolt átlagos érzékenységi együtthatók meghatározásán kívül, kerestük a legjobban illeszkedő érzékenységi együttható adatsort Monte-Carlo technika felhasználásával, melynek során a modellt véletlenszerűen generált paraméterekkel futtatuk le. A legjobban illeszkedő adatsor a következő érzékenységi együtthatókból állt: $-0,21$ (kapszaicin mód), $1,25$ (proton mód) és $1,00$ (hő mód). Ezzel az adatsorral a modell lefedi a hipertermizáló hatás eloszlásának 83%-os maximális részét ($r^2 = 0,83$). A legjobban illeszkedő modell kiegészíti a fentiekben leírt átlagértékeket annak karakterizálásában, hogy a TRPV1 antagonisták hatáserőssége az egyes aktivációs módokban, hogyan járul hozzá a hipertermiás válasz kialakulásához embereken. A magas r^2 érték mellett,

modellünkben az adatillesztés nagy pontosságát bizonyítja az úgynevezett „pontatlansági hibák” alacsony értéke is, vagyis az analízisünkben felhasznált klinikai vizsgálatokban alkalmazott 16 antagonistá dózis kapcsán létrejött hipertermiás válasz és a modellünk alapján hozzájuk tartozó válasz közötti eltérés. Analízisünkben a bizonytalansági hiba $-0,3^{\circ}\text{C}$ és $0,4^{\circ}\text{C}$ között volt, $0,2^{\circ}\text{C}$ négyzetes középpel.

A TRPV1 antagonistákra adott hipertermiás válasz komplexebb mivolta embereknél a patkányokhoz képest (vagyis nem egy, hanem két aktivációs módtól való függése), abból is nyilvánvaló, hogy mennyire változó a különböző módokban az antagonistá hatásereőség hozzájárulása a hipertermiás válaszhoz. Patkányokban, a hipertermiás válasz statisztikai valószínűségét több, mint 81%-ban a proton mód határozza meg; a kapszaicin és hő általi aktivációs módok hozzájárulása elhanyagolható (kb. 1-1%); a modell által nem ismert faktorok hozzájárulása pedig 16%. Emberekben, ezek a hozzájárulási arányok a következők: 35% proton mód, 37% hő mód, 10% kapszaicin mód és 17% ismeretlen faktorok.

A matematikai modellezés mellett klasszikus metaanalízis módszerekkel is elemeztük a humán adatokat. Ennek során azokat a tanulmányokat tudtuk felhasználni, amelyekben leírták a T_m értékeket mind TRPV1 antagonistával, mind pedig placebóval kezelt csoportokban legalább két időpontban: (i) anyagadáskor vagy közvetlen azelőtt és (ii) 3 órával az anyagadást követően. Mindegyik beválogatott tanulmány esetében kiszámoltuk a T_m változást, amelyet a 3 órával anyag (vagy placebó) adás utáni T_m és a beadáskor (0 óránál) mért T_m különbségeként határoztunk meg. Matematikai modellezésünkben (lásd fent) ezt az értéket tekintettük a hipertermiás válasz H értékének. Ezek után kiszámoltuk az anyag és a placebó által indukált T_m változások közötti különbséget (átlagértékek különbsége), amelyet az anyagok termális hatásának tekintettünk metaanalízisünkben. Minden dózis esetében, a különbséget standardizáltuk (variancia alapján), hogy megkapjuk az SMD-t. Az SMD-t és a 95%-os CI-t tekintettük az elsődleges hatásereőségnek metaanalízisünkben. Az anyagokat két csoportba osztottuk: nem mód-szelektív (ABT-102, AZD1386 és V116517) vagy mód-szelektív (NEO6860).

A nem mód-szelektív csoportban mindhárom antagonistá hipertermiát okozott, amely dózisfüggőnek látszott azoknál az anyagoknál, ahol különböző dózisokat is alkalmaztak, vagyis az ABT-102 és a V116517 esetében. A legkifejezettebb hipertermiás hatás (SMD: 2,5; CI: 1,4, 3,5) az ABT-102 anyag 86 μmol dóziséval kezelt csoportban alakult ki. Mindegyik nem mód-szelektív TRPV1 antagonistá minden dózisének termális hatását összesítve az SMD értéke 1,2 volt (CI: 0,9, 1,6; $p < 0,001$). Metaanalízisünk eredményei összhangban vannak a matematikai modellezés során találtakkal olyan értelemben, hogy a humán TRPV1 csatorna protonok és hő általi aktivációjának gátlása – ami jellemzően megfigyelhető a polimodális TRPV1 antagonisták esetében – hipertermia kialakulását eredményezi.

A NEO6860, az egyetlen olyan TRPV1 antagonistá, amely mód-szelektív és be tudtuk vonni az analízisünkbe, nem okozott hipertermiát az alkalmazott 1,2 mmol dóziséval, hanem helyette csökkentette a T_m -et (SMD: -0,7; CI: -0,3, -1,1; $p < 0,001$). A hipertermia hiánya szintén összhangban van matematikai modellezésünk eredményeivel, hiszen ez az anyag nem gátolja a humán TRPV1 csatornánek sem a protonok sem pedig a hő általi aktivációs módját. A NEO6860 hipotermizáló hatása magyarázható ennek az anyagnak a humán TRPV1 csatornára kifejtett részleges agonista hatásával. A TRPV1 csatorna agonistái jól ismert hipotermiát okoznak (lásd 2.2.1.2. fejezet). Több olyan TRPV1 antagonistá esetén, amelyeknek részleges agonista tulajdonságuk van, mint például az 5'-jodo-RTX, vagy az Abbvie Compound 3 nevű anyaga, szintén leírtak hipotermizáló hatást.

5.1.2. A TRPM8 ioncsatorna fájdalomtalan hidegérzékelésben betöltött szerepének experimentális vizsgálata

A hidegre érzékeny receptorok közül először a TRPM8 csatorna termoregulatórikus szerepét tanulmányoztuk. Ennek érdekében megvizsgáltuk, hogy egy kollaborátoraink által kifejlesztett és szintetizált TRPM8 antagonistá, az M8-B, milyen hatást fejt ki patkányok T_m -ére szubneutrális, 19°C -os T_k -n a termoelem termometria rendszerben. Az általunk alkalmazott környezeti körülmények között az M8-B nagy dózisének (6 mg/kg) 20 percig tartó i.v. infúziója jelentős ($\sim 0,9^{\circ}\text{C}$ -os) T_m

csökkenést okozott a vehikulumhoz képest ($p = 0,031$). Ezek után telemetriás termometriával megvizsgáltuk, hogy az M8-B T_m hatásai jelen vannak-e $Trpm8^{-/-}$ és $Trpm8^{+/+}$ egerekben. Ezeket a kísérleteket szintén szubneutrális körülmények között végeztük ($T_k = 26^\circ\text{C}$). A patkányokhoz hasonlóan, az egereknek is stresszmentes módon, korábban (pre)implantált katéteren keresztül adtuk be az M8-B-t (6 mg/kg) vagy vivőanyagát. A $Trpm8^{+/+}$ egerek az M8-B beadására nagyfokú ($\sim 0,8^\circ\text{C}$ -os) abdominális T_m csökkenéssel reagáltak, míg a vehikulumnak nem volt hatása a T_m -re ($p < 0,001$). Ellentétben a WT egerekkel, a $Trpm8^{-/-}$ egerek abdominális T_m -ére az M8-B nem volt hatással.

Fontos volt azt is megállapítani, hogy a $Trpm8^{-/-}$ egerekben az M8-B nem azért volt hatástalan, mert azok egyáltalán nem képesek hipotermiássá válni. Ennek tisztázása érdekében további kísérleteket végeztünk. Amikor a KO egereket a TRPV1 agonista RTX-szel (150 ng/kg, i.p.) kezeltük ugyancsak 26°C -on, annak érdekében, hogy TRPM8 csatornától függetlenül váltsunk ki hipotermiát, akkor azok nagymértékű ($2,5^\circ\text{C}$ -os) T_m csökkenéssel reagáltak a vehikulumhoz képest ($p < 0,001$), amely válasz nagyban hasonlított a $Trpm8^{+/+}$ egerek RTX-re adott hipotermiás válaszához.

Eredményeink alapján feltételezhető volt, hogy az M8-B a periférián, szenzoros idegvégződéseken hatva fejt ki hipotermizáló hatását, ehhez azonban az is szükséges, hogy eljusson célpontjaihoz a bőrben. Annak érdekében, hogy teszteljük ezt a hipotézist, patkányokban végrehajtottunk nyolc fiziológiai kísérletet az M8-B egy alacsony i.v. dóziséval (1 mg/kg) különböző mértékű bőr vérátáramlási és bőrt érő hideghatás körülmények között. Az első két kísérletben a T_k -t állandó szinten tartottuk: vagy 15°C -on, ami a termoneutrális zóna alatt van vagy 32°C -on, ami a termoneutrális zóna felső határát jelenti. Ezekben a T_k -kon, a kisdózisú M8-B i.v. infúziója nem váltott ki szignifikáns hatást a T_m -re a vehikulumhoz képest. A 32°C -os T_k -n a patkányok bőreire erősen dilatáltak a használt kísérleti berendezésben, így az antagonistá valószínűleg könnyen eljuthatott a bőrbe, annak magas vérátáramlásával. A hidegszenzorok azonban nem valószínű, hogy aktiváltak voltak a bőrben, amely magas, 32°C -os T_k -nak volt kitéve, és még melegebb vérral lett átáramoltatva, hiszen a TRPM8 csatorna *in vitro* aktivációs küszöbe $22-27^\circ\text{C}$ alatt van. Ezzel ellentétben, 15°C -on a TRPM8 csatornák feltehetően aktiváltak voltak a hideg által, de ilyen körülmények között a bőr vérátáramlása minimális lehetett, mert patkányokban maximális mértékű bőr vazokonstrikció már sokkal magasabb, 27°C -os, T_k -n bekövetkezik. Következésképpen, ezekben a kísérletekben az M8-B valószínűleg nem jutott el megfelelő mértékben a bőr szenzoros idegvégződéseire expresszált TRPM8 csatornához. A fentiekben vázolt elméleti magyarázat bizonyítása céljából, a következő hat kísérletben fokozatosan változtattuk a T_k -t. Először, az M8-B ugyanazon dóziséval (vagy a vivőanyagot) 32°C -on infundáltuk a patkányoknak (ezzel elősegítve az anyag eljutását a bőr receptoraihoz). Ezután, amint az infúzió véget ért, a patkányokat áthelyeztük egy másik inkubátor kamrába, amelyben az elsőtől eltérő T_k -t állítottunk be: 28, 24, 21, 19, 14, vagy 11°C -ot. A második kamrában beállított T_k csökkenésével párhuzamosan, az M8-B-vel kezelt patkányokban a T_m esése volt megfigyelhető a vehikulummal kezelt kontrollokhoz képest. Amikor a T_k 14°C vagy 11°C volt, a kezelési csoportok közötti T_m különbség meghaladta az 1°C -ot, ami statisztikailag is szignifikáns volt (előbbinél $p = 0,01$, utóbbinál $p = 0,003$). Ezek az eredmények megerősítik azt a hipotézist, hogy mind az antagonistának a bőrbe történő sikeres eljutása (magas bőr vérátáramlás révén), mind pedig a bőr TRPM8 csatornáinak (hideg általi) aktivációja szükséges a hipotermiás válasz kialakulásához kisdózisú M8-B i.v. infúziója esetén.

További kísérletek során arra is fény derült, hogy a hipotermia kialakulása során az M8-B minden vizsgált hideg elleni védekezőmechanizmust (melegkereső magatartás, bőr vazokonstrikció, barnazsír-szöveti termogenezis) gátolt, amely eredmények összességében arra utalnak, hogy a TRPM8 csatorna a termoregulációs rendszer univerzális hidegszenzoraként funkcionál.

5.1.3. A TRPA1 ioncsatorna vizsgálata állatkísérletekben

5.1.3.1. A TRPA1 ioncsatorna hidegszenzor szerepének vizsgálata a hőszabályozási rendszerben

Annak érdekében, hogy biztosan elérjük a TRPA1 csatorna 17°C -os aktivációs küszöbét, az egerekben súlyos hidegexpozíciós kísérleti modellt ($T_k = 8^\circ\text{C}$ 180 percig) alkalmaztunk respirometriás termometriában. Ebben a modellben, a $Trpa1^{+/+}$ és a $Trpa1^{-/-}$ egerekben egyaránt kialakult bőr vazokonstrikció (csökkent T_b) és hideg-indukálta termogenezis (emelkedett VO_2),

azonban még ezen kifejezett hideg elleni védekező mechanizmusok ellenére is, a T_m (kolonban) meredeken csökkent. Sem a T_m válaszban, sem a termoeffektor válaszokban nem volt különbség a genotípusok között. Figyelemre méltó, hogy a fark T_b mindkét genotípusban 17°C alá esett már a hidegexpozíció kezdetén (~10. percnél). A kísérlet végére, már a kolon T_m is 13°C körüli volt (vagyis 4°C -kal alacsonyabb a TRPA1 csatorna aktivációs küszöbénél). A KO egerekben a TRPA1 csatorna funkcionális károsodása igazolható volt az intraplantáris mustárolajra adott 56%-kal csökkent talpnyalogatási és -rázási időtartammal (12 ± 3 vs. 27 ± 6 s a *Trpa1*^{+/+} egerekben; $p = 0,036$).

Annak érdekében, hogy az esetleges krónikus kompenzációs mechanizmusokból eredő téves következtetéseket elkerüljük, genetikailag nem módosított állatokat is felhasználtunk, amelyekben a TRPA1 csatornát akután, farmakológiailag gátoltuk az A967079 vagy a Compound 43 nevű TRPA1 antagonistával. Az A967079 (30 mg/kg, i.g.), a Compound 43 (30 mg/kg, i.g.), vagy vivőanyaguk beadása után megvizsgáltuk patkányok termoregulatórikus válaszreakcióit hidegexpozíció során termoelem termometriával. Az alkalmazott dózisban mindkét TRPA1 antagonistá analgetikus hatása igazolható volt. Annak ismeretében, hogy a TRPM8 csatorna farmakológiai blokája gátolni tudja a hideg elleni védekezést (lásd fent), az AMG 2850-et (30 mg/kg, i.g.), egy szelektív és potens TRPM8 antagonistát, használtuk pozitív kontrollként. Hideghatásra a patkányok bőrér konstrikióval, így a bőr vérátáramlásának drasztikus csökkenésével reagálnak, ami megakadályozhatja, hogy egy szisztémásan beadott anyag elérhesse célpontjait, hogyha azok a bőrben találhatók. Annak érdekében, hogy ezt áthidaljuk – hasonlóan a TRPM8 csatorna kapcsán leírt kísérletekhez – két inkubátor kamrát használtunk. Az anyagokat az első (meleg) kamrában adtuk be az állatoknak 30°C -os T_k -n, amelynél a bőr erei dilatáltak. Anyagadás után a patkányok még 30 percig ebben a meleg kamrában maradtak, amely lehetővé tette, hogy a beadott anyagok a bőrbe is eljussanak, majd áthelyeztük őket a második kamrába, amelyben a T_k vagy nagyon hideg (3°C) vagy meleg volt (30°C , kontrollként). Amikor az állatokat 30°C -ról 3°C -ra helyeztük át, nem találtunk lényeges változást a megfigyelt paraméterekben, és nem volt szignifikáns különbség a különböző kezelési csoportok T_m vagy T_b értékeiben sem. Ezek az eredmények megerősítik, hogy termoneutrális környezetben sem a TRPM8 antagonisták, sem a TRPA1 antagonisták nincsenek hatással a termoregulációra. Amikor a patkányokat 30°C -ról 3°C -ra helyeztük át, különböző termoregulatórikus válaszok alakultak ki a különböző kezelési csoportokban. A vehikulummal kezelt patkányokban egy kismértékű, átmeneti T_m emelkedést követően, fokozatos, mérsékelt (~ $0,9^\circ\text{C}$) csökkenés alakult ki. Ez nem volt meglepő, hiszen a patkányok a hideggel szemben sokkal jobban ellen tudnak állni, mint az egerek, és hidegexpozícióra gyakran reagálnak kezdeti T_m emelkedéssel. Kísérleteinkben a hidegnek kitett patkányokban hirtelen bőr vazokonstrikió alakult ki, farkukon a T_b percek alatt 4°C -kal esett és a kísérlet végéig ezen az értéken maradt. Az A967079 és Compound 43 kezelésben részesült patkányok hőszabályozási válaszai statisztikailag nem különböztek a vehikulummal kezelt állatokétól. Velük ellentétben, az AMG2850-nel kezelt patkányok T_m -e jelentős mértékben lecsökkent (nadír: $-1,8^\circ\text{C}$) hidegexpozíció hatására. A T_m csökkenés szignifikáns mértékű volt 60-180. percig ($p = 0,031$), és különbözött mindhárom másik kezelési csoporttól ($p < 0,001$). Az AMG2850 kezelésben részesült állatok esetében a T_m csökkenése feltehetően a hőtermelési válasz gátlása miatt alakult ki, ami magyarázhatja azt is, hogy miért maradt el a hidegexpozíció során a kezdeti T_m emelkedés. A kísérleteinkben megfigyelhető, csökkent mértékű ellenállóképesség hideggel szemben az AMG2850 kezelésben részesült patkányokban, összhangban áll az M8-B előzőekben bemutatott T_m hatásával hidegnek kitett rágszálókban. Tekintettel az általunk vizsgált mindkét TRPA1 antagonistá kapcsán kapott negatív eredményre, fontos volt meghatározni, hogy megfelelő mennyiségben voltak-e jelen a szisztémás keringésben ahhoz, hogy a TRPA1 csatornát gátló hatásukat megfelelően kifejtse vizsgálatainkban. A kísérletek végén, az anyaggal kezelt patkányok plazmájában az A967079 koncentrációja $2,2 \pm 0,5$ $\mu\text{mol/l}$ volt, a Compound 43 koncentrációja pedig 468 ± 86 nmol/l , amelyek messze magasabbak, mint IC_{50} értékeik, tehát megerősítik az alkalmazott dózisok TRPA1 csatornát gátló hatásosságát.

5.1.3.2. A TRPA1 ioncsatorna szerepének tisztázása a H₂S által indukált hipotermia kialakulásában

Annak ellenére, hogy a TRPA1 csatorna hidegszenzor szerepét a termoregulációs rendszerben a fentiekben ismertetett kísérletek segítségével elvetettük, ez még nem zárja ki, hogy a TRPA1 más módon, például ligandok általi aktiváció útján szerepet játszik a T_m szabályozásában. Hasonló példát a TRPV1 ioncsatorna kapcsán is bemutattam, hiszen rágcsősekben a melegszenzor szerepe a hőszabályozási rendszer számára elhanyagolható, ugyanakkor protonok általi tónusos aktivációja révén a TRPV1 csatornák abdominális populációja a hideg elleni autonóm termoeffektorok folyamatos szuppressziója által lényeges szerepet játszik a normál T_m fenntartásában (részletekért, lásd 2.2.1.2. fejezet). A TRPA1 csatornát illetően, endogén gáztranszmitter ligandja, a H₂S termoregulatórikus hatásait tanulmányoztuk.

Először, respirometriás termometria segítségével megvizsgáltuk a centrálisan beadott Na₂S, egy H₂S-t gyorsan felszabadító donor, hőszabályozási hatását C57BL/6 egerekben. Azt találtuk, hogy i.c.v. injektált Na₂S hatására az egereknél a T_m csökkenése alakult ki, amely a nagyobb dózissal kifejezettebb volt, míg a fiziológiás sóoldat nem okozott hőmérsékleti hatást. Az Na₂S-re adott hipotermiás válasz mindkét alkalmazott dózissal gyorsan kialakult, és 20 perc alatt érte el a legnagyobb átlagos csökkenést: 0,5 mg/kg-nál $-0,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ -ot, 1 mg/kg-nál pedig $-0,8 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ -ot ($p = 0,045$ és $0,005$). A hatás mind az alacsonyabb, mind pedig a magasabb Na₂S dózisok esetében szignifikáns volt a sóoldathoz képest ($p < 0,001$ mindkét esetben). Ugyanezekben a kísérletekben mértük a VO₂-t is. Azt találtuk, hogy az Na₂S által kiváltott hipotermia kialakulásában szerepet játszott a VO₂ csökkenése, amely a T_m-hez hasonló dinamikával változott. A VO₂ csökkenése mind az alacsonyabb, mind a magasabb Na₂S dózis esetében szignifikáns volt a sóoldathoz képest ($p = 0,024$, illetve $p < 0,001$). Mivel a várt hatás hipotermia volt, ezeket a kísérleteket 22°C-os szubtermoneutrális T_k-n végeztük. Mindez nem tette lehetővé, hogy ebben a kísérleti elrendezésben vizsgáljuk a bőr vazodilatációjának lehetséges hozzájárulását a Na₂S által kiváltott hipotermiához.

Annak megállapítása érdekében, hogy a bőr vérátáramlását befolyásolja-e az Na₂S centrális adása, következő lépésként lézer speckle kontrasztos képalkotással mértük a bőr vérátáramlás intenzitásának változásait altatott egerek hátának lumbális régiójában. Az Na₂S (1 mg/kg) i.c.v. beadása a bőr vérátáramlási intenzitásának azonnali emelkedését okozta, amely már 2 perc múlva elérte a legmagasabb, átlagosan $14 \pm 6\%$ -os értéket, majd némileg csökkent, de a kísérlet során végig magasabb maradt, mint a sóoldattal kezelt egereknél ($p < 0,001$).

A centrálisan injektált Na₂S-re adott hipotermiás és hipometabolikus válaszreakció gyors, dózisfüggő kialakulása arra utal, hogy a felszabaduló H₂S támadáspontja a központi idegrendszerben található. Annak tesztelésére, hogy az Na₂S hipotermiás hatása kiváltható-e perifériás lokalizációból, megvizsgáltuk a nagy dózisú (5 mg/kg) Na₂S i.p. beadására kialakuló hőszabályozási választ. A várakozásoknak megfelelően, az i.c.v. adással ellentétben, amikor az egerek i.p. infúzióban kaptak Na₂S-t, T_m-ük nem különbözött szignifikánsan a sóoldattal kezelt egerekéthöz a kísérlet során egyetlen időpontban sem ($p > 0,05$), annak ellenére, hogy 10-szer nagyobb dózist adtunk be i.p., mint az i.c.v. adásnál már hipotermiát okozó alacsonyabb (0,5 mg/kg) dózis.

Arra is kíváncsiak voltunk, hogy az Na₂S esetében megfigyelt hőszabályozási hatásokat kiválthatja-e GYY4137, amely egy H₂S-t lassan felszabadító donor. A GYY4137 (3 mg/kg) i.c.v. injekciója a respirometriás termometria rendszerben a sóoldatos kezeléshez képest kifejezett hipotermiát és hipometabolizmust okozott. A kezelés hatása statisztikailag szignifikáns volt mind a kolon hőmérsékletre ($p < 0,001$), mind pedig a VO₂-re ($p < 0,001$).

Korábban kimutatták, hogy a TRPA1 csatorna közvetíti a H₂S különböző hatásait, beleértve a nociceptív, gyulladáscsökkentő, vazomotoros és neurofiziológiai hatásokat, de az ismeretlen maradt, hogy hozzájárul-e a H₂S által kiváltott hipotermia kialakulásához. Ezért a következőkben azt vizsgáltuk, hogy a TRPA1 csatorna részt vesz-e a különböző H₂S donorokra adott termoregulatórikus válasz kialakulásában. Ehhez összehasonlítottuk *Trpa1*^{-/-} és *Trpa1*^{+/+} egerek hipotermiás válaszait. A C57BL/6 egerekben végzett kísérleteinknek megfelelően, Na₂S (1 mg/kg) i.c.v. beadása *Trpa1*^{+/+} egerekben is hirtelen megjelenő, kifejezett mértékű csökkenést okozott a T_m-ben ($>1,5^{\circ}\text{C}$) és a VO₂-ben (>40 ml/kg/min). A *Trpa1*^{-/-} egerekben azonban az Na₂S ugyanazon dózisára adott hipotermiás és hipometabolikus hatás jelentősen mérséklődött ($p < 0,001$ mindkét paraméter esetén a genotípusok

között). A GYY4137 termoregulációs hatását is megvizsgáltuk *Trpa1*^{-/-} és *Trpa1*^{+/+} egerekben. A GYY4137 (3 mg/kg) i.c.v. beadása a *Trpa1*^{+/+} egerekben a T_m jelentős mértékű csökkenését okozta; azonban szignifikánsan kisebb mértékű hipotermiás választ találtunk az ugyanilyen dózisu GYY4137 esetén a *Trpa1*^{-/-} egerekben ($p < 0,001$).

Termofiziológiai eredményeink arra utaltak, hogy a különböző H₂S donorokra adott termális válaszok a központi idegrendszerből indulnak ki, ezért megvizsgáltuk a TRPA1 csatorna expresszióját a hőszabályozásban ismert szerepet játszó agyi struktúrákban. Az egereket gondosan perfundáltuk az agyszöveti mintavétel előtt, hogy a mintákból kimossuk a vért, amelyről többször is leírták, hogy kimutatható mennyiségű TRPA1 csatornát tartalmaz. Tekintettel arra, hogy a TRPA1 fehérje kopási rátája a neuronokban nem feltétlenül teszi szükségessé a nagymértékű mRNS átírást, ezután RNAscope *in situ* hibridizációt alkalmaztunk, azaz egy rendkívül érzékeny módszert, amely képes a transzkriptumokat egyetlen molekulaként kimutatni. Ezzel a módszerrel kimutatható *Trpa1* mRNS transzkriptumokat találtunk mindegyik vizsgált, hőszabályozással kapcsolatos magban, vagyis az MPO, a DMH, az LPB és az rRPa területén, bár meg kell jegyezni, hogy a *Trpa1* transzkriptumok száma alacsony volt.

5.2. Thermo-TRP ioncsatornák vaszkuláris biológiai szerepének experimentális vizsgálata

5.2.1. A TRPV1 ioncsatorna szerepének vizsgálata a pH változásai által okozott vazomotoros válaszokban

A korábbiakban bemutattam, hogy a TRPV1 ioncsatorna protonok általi aktivációs módja fontos szerepet játszik a termoregulációs homeosztázis fenntartásában, részben a bőrben futó erek tónusának szabályozásán keresztül (részletekért, lásd 5.1.1.1.1. és 5.1.1.1.2. fejezeteket). Annak ismeretében, hogy a TRPV1 csatorna a perivaszkuláris szenzoros idegvégződéseken és az érfal nem-neuronális elemein is expresszálódik, valamint, hogy ligandok (például kapszaicin) általi aktivációja szövetspecifikus érválaszhoz vezet (bőrben dilatáció, izomban konstriktió), arra is kíváncsi voltam, hogy a TRPV1 csatorna szerepet játszik-e a lokális pH változásai által indukált vazomotoros válaszok kialakulásában különböző értípusokban. Ennek érdekében megvizsgáltuk, hogy a TRPV1 csatorna genetikai vagy farmakológiai gátlása, továbbá deszenzitizációja befolyásolja-e a savas vagy bázikus behatások által indukált vazomotoros válaszokat egerekből izolált karotisz és farokbőr artériákon.

Először összehasonlítottuk az izolált karotisz és farokbőr artériák HCl-re és NaOH-ra adott vazomotoros válaszait *Trpv1*^{-/-} és *Trpv1*^{+/+} egerekben. A *Trpv1*^{+/+} egerek karotisz artériáiban HCl hozzáadása 10⁻² mol/l koncentrációnál az izometriás erő csökkenését váltotta ki (-1,16 ± 0,23 mN; $p < 0,001$ vehikulumhoz képest). A *Trpv1*^{-/-} egerek artériáiban a HCl szintén relaxációt idézett elő, amely 10⁻⁶ – 10⁻² mol/l koncentrációknál volt szignifikáns ($p < 0,01$) a vehikulumhoz képest, valamint a *Trpv1*^{+/+} egerekhez képest is jelentősen nagyobb mértékű volt az izometriás erő csökkenése ugyanezen koncentrációknál ($p < 0,01$ a genotípusok között). A HCl-lel ellentétben NaOH hozzáadása a *Trpv1*^{+/+} egerek karotisz artériáihoz az izometriás erő növekedését eredményezte 10⁻³ mol/l (0,41 ± 0,10 mN, $p < 0,001$) és 10⁻² mol/l koncentrációknál (2,48 ± 0,28 mN, $p < 0,001$) a vehikulumhoz képest. A *Trpv1*^{-/-} egerekben az NaOH által kiváltott összehúzódás 10⁻⁵ – 10⁻² mol/l koncentrációknál volt szignifikáns ($p < 0,01$) a vehikulumhoz képest, és jelentősen fokozódott a *Trpv1*^{+/+} egerekhez képest is ugyanezen koncentrációknál ($p < 0,05$ a genotípusok között). A funkcionális TRPV1 csatornák jelenlétének és hiányának megerősítésére a *Trpv1*^{+/+} és *Trpv1*^{-/-} egerekben kapszaicint adtunk az artériák fürdőoldatához. A *Trpv1*^{+/+} egerek ereiben a kapszaicin dózisfüggő összehúzódást váltott ki, amely 10⁻⁹ – 10⁻⁵ mol/l koncentrációknál szignifikáns volt a vehikulumhoz képest ($p < 0,05$). Ezzel ellentétben a *Trpv1*^{-/-} egerek karotisz artériáiban a kapszaicin nem okozott szignifikáns vazomotoros hatást egyik alkalmazott dózisban sem, megerősítve a funkcionális TRPV1 csatornák hiányát.

Ezután a perifériásan elhelyezkedő farokbőr artériákban is tanulmányoztuk a sav-bázis hatások által kiváltott vazomotoros válaszokat. A karotisz artériákhoz hasonlóan, a vehikulumhoz képest HCl hozzáadása a farokbőr artéria esetében is az izometriás erő csökkenését okozta 10⁻⁴ – 10⁻² mol/l koncentrációknál a *Trpv1*^{+/+} és a *Trpv1*^{-/-} egerekben egyaránt ($p < 0,001$ mindegyik koncentrációnál mindkét genotípusban). Ebben az értípusban a HCl-re adott vazomotoros válasz csak

a legmagasabb (10^{-2} mol/l) koncentrációnál volt kifejezettebb a *Trpv1*^{-/-} egerekben a WT kontrollokhoz képest ($p < 0,001$). Az NaOH alkalmazása *Trpv1*^{+/+} egerek farokbőr artériáiban az izometriás erő fokozatos emelkedését váltotta ki 10^{-5} – 10^{-2} mol/l koncentrációknál a vehikulumhoz képest ($p < 0,05$). *Trpv1*^{-/-} egerekben az NaOH által kiváltott kontrakció ugyancsak kialakult 10^{-5} – 10^{-2} mol/l között, azonban a WT kontrollokhoz képest 10^{-2} mol/l koncentrációnál szignifikánsan kifejezettebb volt ($4,65 \pm 0,31$ vs. $3,44 \pm 0,38$ mN, $p < 0,001$). A karotisz artériákban megfigyelt kontrakcióval ellentétben, a kapszaicin fokozatosan csökkentette az izometriás erőt a *Trpv1*^{+/+} egerek farokbőr artériáiban, amely 10^{-9} – 10^{-5} mol/l esetén statisztikailag szignifikáns volt a vehikulumhoz képest ($p < 0,001$). *Trpv1*^{-/-} egerek ereiben a kapszaicinnak nem volt szignifikáns hatása az izometriás erőre, ezzel megerősítve a TRPV1 csatornák hiányát. A KO egerek esetleges kompenzációs mechanizmusainak kizárására második megközelítésünkben a TRPV1 antagonistá BCTC hatását vizsgáltuk a savra és bázisra adott vazomotoros válaszokra C57BL/6 egerekből izolált artériákban. Összességében, a karotisz és farokbőr artériák BCTC kezelésével elért eredményeink megfeleltek a *Trpv1*^{-/-} egerekben látottaknak.

Ezután megvizsgáltuk, hogy azok a TRPV1 csatornák, amelyek az érfal neurális elemeiben expresszálódnak, hozzájárulnak-e a sav vagy bázis által kiváltott vazomotoros válaszok közvetítéséhez. Ehhez C57BL/6 egereknek nagy dózisú exogén vanilloidot (RTX) adtunk, amelyről már többször kimutatták, hogy főként a neurális struktúrákon lévő TRPV1 csatornákat károsítja, anélkül, hogy a TRPV1 csatornákat expresszáló nem-neurális sejtekre jelentős hatást gyakorolna. Ennek megfelelően, a szisztémásan TRPV1 deszenzitizált egereknél a kapszaicin által kiváltott szemtörlések száma (1 ± 1) lényegesen elmaradt a kontroll egerektől (13 ± 2), amely igazolta a TRPV1 ioncsatorna funkcionális károsodását az alkalmazott RTX előkezelés után. Az egerek RTX-szel történő előkezelése (deszenzitizációja) nem volt hatással a nyaki artériák HCl által kiváltott relaxációjára, mivel a HCl 10^{-3} és 10^{-2} mol/l koncentrációknál mind az RTX-szel, mind annak vehikulumával előkezelt egereknél az izometriás erő csökkenését okozta ($p < 0,001$), anélkül, hogy az előkezelési csoportok között szignifikáns különbség lett volna. NaOH adása a vehikulummal előkezelt (kontroll) egerek karotisz artériáiban az izometriás erő növekedését eredményezte 10^{-3} és 10^{-2} mol/l koncentrációban ($p < 0,001$), de a sav által kiváltott relaxációval ellentétben, az RTX-szel deszenzitizált egerekben az NaOH által kiváltott kontrakció mindkét előbbi koncentrációnál jelentősen fokozódott ($p < 0,001$ a vehikulum előkezeléshez képest). Kapszaicin hatására a karotisz artériákban mindkét előkezelési csoportban az izometriás erő növekedése alakult ki 10^{-7} – 10^{-5} mol/l koncentrációknál, amely RTX előkezelés hatására mérséklődni látszott, de a különbség nem érte el a szignifikancia szintjét ebben az érfajtában. Ezek az eredmények a neurális TRPV1 csatornák szerepére utalnak a karotisz artériák pH emelkedés által indukált kontrakciójában.

A farokbőr artériákban HCl adása mind a vivőanyaggal, mind az RTX-szel előkezelt egerekben az izometriás erő csökkenését váltotta ki, anélkül, hogy az előkezelési csoportok között szignifikáns különbség lett volna. Az NaOH által kiváltott összehúzódás szintén jelen volt mindkét előkezelési csoportban, de fontos kiemelni, hogy a legnagyobb (10^{-2} mol/l) NaOH koncentrációnál az RTX-szel előkezelt egerekben jelentősen fokozott mértékű volt a vehikulum előkezeléshez képest ($p < 0,001$). A farokbőr artériáiban a kapszaicin – a karotiszokkal ellentétben – relaxációt váltott ki mindkét előkezelési csoportban, azonban az RTX-szel előkezelt egerek ereiben a relaxáció mértéke szignifikánsan csökkent volt a vehikulummal előkezelt egerek artériáihoz képest 10^{-6} és 10^{-5} mol/l koncentrációknál ($p < 0,05$). Ezek az eredmények összhangban vannak a neurális TRPV1 csatornák károsodott működésével a deszenzitizált egerekben. A farokbőr artériákban kapott eredmények alátámasztják a neurális TRPV1 csatornák szerepét az erek pH emelkedés által indukált összehúzódásának korlátozásában.

5.2.2. Új kísérleti módszer kidolgozása vazomotor válaszok hőmérséklettől függő változásainak ex vivo tanulmányozására

A fentiekben ismertetett eredményeink bizonyítják az egyik termo-TRP csatorna, a TRPV1, pH változások által indukált vazomotoros válaszokban való komplex részvételét, arra azonban nem volt lehetőségünk, hogy a kialakuló válaszokat széles hőmérsékleti tartományban vizsgáljuk. A

használt kísérleti berendezés (részletekért, lásd 4.1.6. fejezet) ugyanis nem képes aktív hűtésre, így az érválaszok szobahőmérséklet alatti T_k -n való vizsgálatára. Annak érdekében, hogy ezt a lehetőséget jövőbeni kísérletek számára biztosítsuk, a PTE 3D Nyomtatási és Vizualizációs Központtal együttműködve, egy új, aktív hőcserét biztosító kiegészítő alkatrészt fejlesztettünk ki a miográf rendszerünkhöz.

A miográf készülék mind a négy szervfürdőjéhez egy vízzel átáramoltatható alátétet terveztünk rezinből. A hőcserélő lemez sikeres legyártása után elvégeztük annak tesztelését alapvető termofiziológiai kísérletekben is. Az új hűtő-fűtő eszköz alkalmazása hatékonyan csökkentette a vízfürdő hőmérsékletét a miográf rendszer valamennyi kamrájában és stabilan is tartotta a beállított hőmérsékletet (13 vagy 16°C) a kísérlet végéig. Ahogy az a korábbi vizsgálataink alapján várható volt, 60 mmol/l KCl hozzáadására szignifikáns izometriás erő növekedést regisztráltunk, amikor patkányokból izolált farokbőr artériák vízfürdőjét 36°C-on tartottuk. Ezzel ellentétben, amikor a vízfürdő hőmérsékletét az újonnan kifejlesztett hőcserélő eszközzel 13°C-ra vagy 16°C-ra csökkentettük, ugyanazon KCl koncentrációnak a hozzáadása nem volt jelentős hatással az izometriás erőre. Kísérleteinkben a 60 mmol/l KCl hatására kialakuló izometriás erő növekedés 36°C-on átlagosan 4,65 mN volt, míg 13°C-on és 16°C-on gyakorlatilag nem jött létre változás. Ennek megfelelően, szignifikáns különbséget találtunk a KCl által kiváltott izometriás erő változásában 13°C és 36°C között ($p = 0,005$), valamint 16°C és 36°C között ($p = 0,008$), míg 13°C és 16°C között nem volt statisztikailag kimutatható különbség. Amikor azonban a KCl koncentrációját 60 mmol/l-ről 90 mmol/l-re növeltük, 16°C-on szignifikáns ($p = 0,041$) növekedést találtunk a farokbőr artéria izometriás erejében. Ez utóbbi eredmény tovább erősíti a kifejlesztett kísérleti elrendezés alkalmasságát a hidegben történő vazomotoros válaszok tanulmányozására, továbbá, alátámasztja a vaszkuláris válaszok hőmérsékletfüggő különbségeinek meglétét.

5.3. Szisztémás gyulladásoz állapotok élettani és molekuláris mechanizmusainak tanulmányozása

5.3.1. Experimentális modellek

5.3.1.1. A TRPV1 ioncsatorna szerepének vizsgálata szisztémás gyulladásban fiatal és idős állatokban

A termo-TRP csatornák fiziológiai szerepének tanulmányozása mellett, arra is kerestem a választ, hogy a TRPV1 csatorna és más endogén mediátorok szerepet játszhatnak-e az orvosi szempontból legfontosabb testhőmérséklet-szabályozási rendellenességek közé tartozó, szisztémás gyulladás kapcsán kialakuló láz vagy hipotermia létrejöttében.

Először is megvizsgáltuk, hogy az AMG 517-tel történő előkezelés csökkenti-e fiatal felnőtt (12 hetes) C57BL/6 egerek mortalitását nagydózisú LPS által indukált SIRS-ben. Az egerek LPS-re (40 mg/kg, i.p.) kifejezett, gyorsan progrediáló SIRS kialakulásával reagáltak. Az AMG 517 előkezelés (210 µg/kg, s.c.) jelentősen rontotta a túlélési arányt több vizsgált időpontban, például 50%-ról 5%-ra 26 óránál ($p < 0,001$), illetve 15%-ról 5%-ra ($p < 0,05$) a teljes (48 órás) megfigyelési időtartam alatt. Az AMG 517 előkezelés a halálozásig eltelt átlagos időtartamot is lerövidítette 26 ± 2 órától 19 ± 1 órára ($p < 0,01$).

Annak vizsgálatára, hogy a TRPV1 antiinflammatorikus szerepe a SIRS során megmarad-e az életkor előrehaladtával, kísérleteket végeztünk öregedő (44 hetes) C57BL/6 egerekkel is. Az LPS által kiváltott SIRS kimenetele ezekben az idősebb egerekben súlyosabb volt, mint a fiatal egerekben: a vehikulummal előkezelte csoportban a halálozásig eltelt átlagos idő 16 ± 1 óra volt, és közülük egyik sem élt tovább 24 óránál. Az öregedő egerek AMG 517-tel (210 µg/kg, s.c.) történő előkezelése növelte a túlélési arányt ($p < 0,05$) és késleltette a halálozásig eltelt átlagos időt (19 ± 1 h) ($p < 0,05$) – hatása tehát pontosan az ellentettje volt annak, mint amit fiatalokban megfigyeltünk. Az AMG517-tel előkezelte öregedő egerek túlélési aránya 18 óra után 10-szer nagyobb volt, mint a vehikulummal előkezelte idősebb egereké (60% vs. 6%; $p < 0,001$). Megerősítve a TRPV1 csatornák szisztémás blokkolását, az AMG 517 ebben a kísérletben is megnövelte a T_m -et a vehikulumhoz képest ($p < 0,05$).

Megvizsgáltuk azt is, hogy a TRPV1 genetikai deléciója ugyanolyan hatással van-e a SIRS kialakulására öregedő egerekben, mint a farmakológiai gátlás. A kísérleteket 43-44 hetes, *Trpv1*^{-/-} és

Trpv1^{+/+} egerekkel végeztük. Nagydózisú (40 mg/kg i.p.) LPS beadása mindegyik *Trpv1*^{+/+} egérnél halálhoz vezetett, míg a *Trpv1*^{-/-} egerek közül 80%-nál ($p < 0,05$). A *Trpv1*^{-/-} egerek túlélési aránya 21 órán belül 3,5-ször nagyobb volt, mint a WT társaiké (70% vs. 20%, $p < 0,001$). A TRPV1 csatornák genetikai deléciója csökkentette a halálozás kockázatát és késleltette a halálozást ($p < 0,1$). Fontos adat az is, hogy a *Trpv1*^{-/-} egerekben a szérum TNF- α szint 70%-kal alacsonyabb volt 12 órával az LPS beadása után a WT egerekhez képest ($p < 0,05$). Meg kell jegyezni, hogy – a korábban leírtakkal összhangban (lásd 5.1.1.1. fejezet) – az idősebb *Trpv1*^{-/-} egerek ebben a vizsgálatban is túlsúlyosak voltak WT társaikhoz képest.

5.3.1.2. Az SP jelátviteli útvonal hozzájárulásának vizsgálata LPS-indukálta láz kialakulásához NK1 receptor KO (*Tacr1*^{-/-}) és WT (*Tacr1*^{+/+}) egerekben

A szisztémás gyulladás súlyos formáihoz társuló hipotermia molekuláris mechanizmusainak vizsgálata mellett, a betegség kevésbé súlyos formáiban megjelenő lázban szerepet játszó endogén mediátorok lehetséges szerepére is kíváncsi voltam. Elsőként, a TRPV1 csatornát expresszáló idegvégződésekből is felszabaduló SP jelátviteli útvonalának szerepével kapcsolatos eredményeinket ismertetem.

Az SP jelátviteli út pirogenezisben betöltött szerepének tanulmányozásához termofiziológiai kísérletekben összehasonlítottuk a *Tacr1*^{+/+} és a *Tacr1*^{-/-} egerek lázválaszát. Amikor LPS-sel (120 μ g/kg, i.p.) kezeltük az állatokat, mindkét genotípusban láz alakult ki a fiziológiás sóoldat kezeléshez képest. A *Tacr1*^{+/+} egerek LPS hatására tipikus lázválással reagáltak: T_m -ük a 20. perctől kezdett emelkedni, a 40. és 100. perc között tetőzött ($\sim 38,5^\circ\text{C}$), majd fokozatosan csökkent, de a kísérlet során végig emelkedett maradt a sóoldat kezeléshez képest ($p < 0,05$ a 30-360. percig). Ezek az eredmények összhangban vannak korábbi adatokkal az egerek lázválaszát illetően. A *Tacr1*^{-/-} egerekben az LPS hatására kialakuló lázválasz kevésbé volt kifejezett, mint a *Tacr1*^{+/+} egerekben: T_m -ük emelkedése mindössze a 40-110. percig volt szignifikáns a sóoldat kezeléshez képest ($p < 0,05$). Az LPS által kiváltott T_m emelkedést – legalábbis részben – a VO_2 fokozódása idézte elő, amely a T_m -mel azonos dinamikával változott mindkét genotípusban.

LPS kezelés hatására a VO_2 szignifikánsan magasabb volt a sóoldattal kezelt csoporthoz képest a 40-350. percig a *Tacr1*^{+/+} egerekben ($p < 0,05$), illetve a 40-140. percig a *Tacr1*^{-/-} egerekben ($p < 0,05$). Fontos, hogy az LPS-sel kezelt *Tacr1*^{-/-} egerek T_m -e jelentősen (0,5-0,7 $^\circ\text{C}$ -kal) alacsonyabb volt, mint a *Tacr1*^{+/+} egereké az LPS infúzióját követő 40. perctől kezdve a kísérlet végéig. A T_m -mel párhuzamosan a VO_2 LPS által kiváltott emelkedése is mérsékeltebb volt a *Tacr1*^{-/-} egerekben a *Tacr1*^{+/+} társaikhoz képest. Mindkét paraméter LPS által kiváltott emelkedése szignifikánsan csökkent mértékű volt a *Tacr1*^{-/-} egerekben a *Tacr1*^{+/+} egerekhez képest a 40-120. percig ($p < 0,05$). Eredményeink azt mutatják, hogy az LPS által kiváltott láz a *Tacr1*^{-/-} egerekben már a korai szakaszban (a ~ 40 . perctől kezdődően) csökkent mértékű. Ezután arra voltunk kíváncsiak, hogy a "pirogén citokin – COX-2 – PGE₂ tengely" melyik részének szupressziója felelős a lázválasz csillapításáért NK1 receptor hiányában. Megvizsgáltuk, hogy a PGE₂, azaz a láz kulcsfontosságú mediátora (részletekért, lásd 2.3.3. fejezet), szintén csökkent mértékű termális hatást hoz-e létre a *Tacr1*^{-/-} egerekben. A PGE₂ pirogén hatásának fő kiváltási helye a hipotalamuszban (POA) található, ezért i.c.v. beadás után hasonlítottuk össze a PGE₂ hőszabályozási hatását a *Tacr1*^{+/+} és a *Tacr1*^{-/-} egerek között. A PGE₂-re válaszul mindkét genotípus egereinél hirtelen kialakuló, nagymértékű T_m és VO_2 emelkedés jött létre, ellenben a vivőanyag beadása egyik genotípusnál sem okozott semmilyen hatást. Fontos kiemelni, hogy a *Tacr1*^{-/-} egereknél nem volt elmaradás sem a T_m , sem a VO_2 PGE₂ által indukált emelkedésének mértékében a *Tacr1*^{+/+} társaikhoz képest. A PGE₂-vel kapott eredményeink kizárják annak lehetőségét, hogy a *Tacr1*^{-/-} egerek nem képesek megfelelően aktiválni a termogenezisüket és növelni a T_m -üket LPS-től eltérő behatások esetén. Ennél is fontosabb talán, hogy a *Tacr1*^{-/-} egerekben a PGE₂ által kiváltott termoregulatórikus válasz elmaradásának hiánya arra utal, hogy az LPS-re adott csökkent mértékű lázválaszuk oka a pirogén molekuláris útvonal egy, a centrális PGE₂ hatást megelőző lépésénél található.

Külön kísérletsorozatban igazoltuk a funkcionális NK1 receptorok hiányát a *Tacr1*^{-/-} egerekben, illetve azok jelenlétét *Tacr1*^{+/+} társaikban SP (100 µg/kg) vagy vivőanyagának i.c.v. injektálása után.

Kísérleteinkben a TNF- α és az IL-6 szérumkoncentrációját is megmértük a *Tacr1*^{+/+} és *Tacr1*^{-/-} egerekben LPS és fiziológiás sóoldat kezelés után 40 perccel, de egyik esetben sem észleltünk szignifikáns különbséget a genotípusok között. Ezek után megvizsgáltuk a láz molekuláris jelátviteli útvonalának a pirogén citokin termelődést követő, de még a PGE₂ hatás előtti lépését: a COX-2 expresszióját mRNA és fehérje szinten. Ismert, hogy a COX-2 mRNA expresszió patkányokban már a lázválasz korai fázisában (~30-40 perccel az LPS infúzió után) fokozódik a perifériás szervekben (tüdő, máj), illetve – kisebb mértékben – az agyban is. Saját kísérleteinkben az LPS-sel kiváltott láz a *Tacr1*^{-/-} egerekben már ~40 perccel LPS adást követően csillapodott, ezért ennél az időpontnál gyűjtöttünk tüdő-, máj- és agymintákat a COX-2 mRNA expressziójának vizsgálatára. A sóoldattal kezelt egerek expressziós értékeivel összehasonlítva, LPS beadása a COX-2 mRNA transzkripció emelkedését okozta a *Tacr1*^{+/+} és *Tacr1*^{-/-} egerek tüdejében, májában és agyában egyaránt ($p < 0,001$ vs. fiziológiás sóoldat mindhárom szövetben). A genotípusok között azonban nem volt szignifikáns különbség a három szövetminta egyikében sem. A COX-2 mRNA expresszió szintjének LPS által kiváltott növekedése nem volt azonos mértékű a három vizsgált szervben: a tüdőben 5-szörös, a májban 17-20-szoros, az agyban 2-szeres.

A COX-2 mRNA LPS által kiváltott fokozott expressziója mellett korábban a COX-2 fehérje expresszióját is emelkedettnek találták a periférián (de nem az agyban) már a lázválasz korai szakaszában. Vizsgálatunkban ezért a COX-2 fehérje expresszióját is összehasonlítottuk LPS-sel kezelt *Tacr1*^{+/+} és *Tacr1*^{-/-} egerek között. A *Tacr1*^{+/+} egerekben LPS beadása a fiziológiás sóoldathoz képest a COX-2 fehérje expressziójának jelentős növekedését eredményezte a tüdőben ($p < 0,01$) és a májban ($p < 0,05$), de az agyban nem volt hatása ($p = 0,264$). A *Tacr1*^{+/+} egerekkel ellentétben a COX-2 fehérje expressziója nem változott jelentősen LPS-sel kezelt *Tacr1*^{-/-} egereknek sem a tüdejében, sem a májában a sóoldatos kezeléshez képest. Az LPS-sel kezelt csoportok esetén, a COX-2 fehérje expressziója a *Tacr1*^{-/-} egerek tüdejében szignifikánsan csökkent a *Tacr1*^{+/+} társaikhoz képest ($p < 0,01$), míg a májban tendencia mutatkozott a COX-2 expresszió csökkenésére ($p = 0,101$).

Annak vizsgálatára, hogy a COX-2 fehérje csökkent expressziója a PGE₂ csökkent termelését eredményezi-e LPS kezelés után a *Tacr1*^{-/-} egerekben, megmértük a PGE₂ koncentrációját az egerek tüdejében, májában és agyában szintén 40 perccel anyagadás után. Azt találtuk, hogy az LPS kezelés hatására a legnagyobb mértékben (~80%) a tüdőben nőtt a PGE₂ koncentráció, ezt követte a máj (~40%), majd az agy (~10%). Az LPS által kiváltott PGE₂ koncentráció növekedés szignifikáns volt a *Tacr1*^{+/+} egerek tüdejében a sóoldathoz képest ($p < 0,05$), míg a *Tacr1*^{-/-} egerek tüdejében a PGE₂ szintje nem emelkedett szignifikánsan LPS hatására ($p = 0,275$).

5.3.1.3. A CCK-COX interakció szerepének vizsgálata LPS-indukálta láz kialakulásában patkányokban

Az SP jelátviteli útvonalon kívül, egy másik, szintén TRPV1 aktiváció kapcsán is felszabaduló mediátor, a CCK részvételét is karakterizáltuk a lázválaszban. Első lépésként, megvizsgáltuk az i.c.v. beadott CCK termoregulatórikus hatását patkányokban. Amint az korábbi vizsgálatok alapján várható volt, CCK hatására a patkányokban kifejezett T_m emelkedés alakult ki, míg a kontrollként használt fiziológiás sóoldat beadása nem okozott semmilyen hatást. A CCK által indukált hipertermiás válasz szinte azonnal (kevesebb mint 10 perc alatt) kialakult, és a T_m 20 perc alatt érte el a maximális, átlagosan $0,4 \pm 0,1^\circ\text{C}$ emelkedést ($p = 0,007$), majd fokozatosan csökkent, de a kísérlet során végig magasabb maradt a sóoldatos kezeléshez képest. Annak érdekében, hogy a COX enzimek részvételét tanulmányozzuk a CCK által kiváltott hipertermia kialakulásában, a patkányokat a CCK i.c.v. beadása előtt 30 perccel a nem-szelektív COX gátló metamizollal (120 mg/kg; i.p.) kezeltük. A metamizollal i.p. előkezelt patkányokban gyakorlatilag egyáltalán nem alakult ki hipertermiás válasz a centrálisan beadott CCK hatására.

Arra is kíváncsiak voltunk, hogy a COX enzimek gátlása mérsékli-e a CCK anorexiás hatását. Ezért egy másik kísérletsorozatban 24 órán át éheztetett patkányokat kezeltünk i.p. metamizollal vagy

sóoldattal a CCK vagy sóoldat i.c.v. beadása előtt. A várakozásoknak megfelelően a sóoldattal előkezelt patkányoknál a CCK beadása szignifikánsan csökkentette a testtömeg-gyarapodást a 3 órás visszatáplálás során, összehasonlítva az i.c.v. sóoldatos kezeléssel ($1,6 \pm 0,3$ vs. $2,6 \pm 0,3\%$, $p < 0,05$). Fontos azonban megjegyezni, hogy nem észleltünk szignifikáns különbséget a CCK által kiváltott anorexia mértékében az i.p. metamizollal és sóoldattal kezelt patkányok között ($p = 0,474$). Annak ismeretében, hogy a CCK által indukált hipertermia során aktiválódnak az autonóm termoeffektor válaszok, azaz a barnazsír-szöveti hőtermelés és a bőr vazokonstrikció, feltételeztük, hogy a CCK hatására kialakuló hipertermia blokkolása COX gátlóval megváltoztatja az ezeket a válaszokat befolyásoló hipotalamikusan efferens neuronok aktivitását. Hipotézisünk tesztelésére megmértük az indukálható c-Fos transzkripció faktor expresszióját, amely a neuronális aktiváció markere, az MPO-ban, a DA-ban és az rRPa-ban, vagyis azokon az agyterületeken, amelyek ismert szerepet játszanak a hűtésre és a PGE₂-re adott autonóm termoregulatórikus válaszok kialakulásában. CCK hatására, 120 perccel az anyagadás után, a c-Fos pozitív sejtek számának szignifikáns csökkenését találtuk az MPO-ban, összehasonlítva a sóoldat i.c.v. beadásával ($8,3 \pm 0,9$ vs. $27,3 \pm 1,1$; $p < 0,001$), míg a CCK növelte a c-Fos immunreaktivitást a DA-ban ($69,1 \pm 1,9$ vs. $31,9 \pm 3,2$; $p < 0,001$) és az rRPa-ban ($11,3 \pm 1,6$ vs. $5,1 \pm 0,9$; $p < 0,01$) a sóoldathoz képest. A patkányok i.p. metamizol előkezeltel teljesen kivédte a centrális CCK injekció által kiváltott változásokat a c-Fos pozitív sejtek számában az MPO-ban ($36,1 \pm 5,9$; $p < 0,001$), a DA-ban ($28,7 \pm 3,9$; $p < 0,001$) és az rRPa-ban ($5,4 \pm 1,07$; $p < 0,01$) az i.p. sóoldat előkezeltelhez képest.

Meg akartuk erősíteni azt is, hogy a CCK által kiváltott anorexia neuronális aktivációval jár együtt a VMH területén, amely a táplálékfelvétel szabályozásában tölt be fontos szerepet, továbbá, azt is megvizsgáltuk, hogy az ott megfigyelt változások befolyásolhatók-e COX gátlással. A CCK a VMH-ban a c-Fos pozitív sejtek számának emelkedését idézte elő ($91,2 \pm 6,7$ vs. $35,7 \pm 13,0$; $p < 0,001$) az i.c.v. sóoldat beadásához képest. A termoregulatórikus magokban kapott eredményeinkkel ellentétben, a metamizollal történő i.p. előkezeltel nem volt hatással a CCK által kiváltott neuronális aktivációra a VMH-ban ($98,7 \pm 13,3$; $p = 0,505$) a sóoldatos előkezeltelhez képest.

Kimutattuk tehát, hogy a metamizol csökkenti a CCK hatását, azonban ez a gyógyszer a COX mindkét izoformáját gátolja. A szisztémás gyulladással járó hőszabályozási rendellenességekben a két COX izoforma különböző szerepet játszik: a COX-2 nélkülözhetetlen a láz kialakulásában, míg a COX-1 (és nem a COX-2) az az izoforma, amely a hipotermiás választ közvetíti. Mivel a CCK a T_m emelkedését idézte elő, feltételeztük, hogy a COX-2 felelős a termális hatás közvetítéséért. Hipotézisünk tesztelésére két különböző preferenciális COX-2 gátló, a meloxicam és az etoricoxib, hatását vizsgáltuk a CCK által kiváltott hipertermiára. Amikor a patkányokat 30 perccel korábban i.p. meloxicammal vagy etoricoxibbal előkezeltük, a CCK i.c.v. injekciója nem okozott változást a patkányok T_m-ében.

Miután kimutattuk, hogy a CCK által indukált hipertermiás választ a COX-2 közvetíti, arra is kíváncsiak voltunk, hogy a központi idegrendszerben a CCK jelátvitel hozzájárul-e az LPS által kiváltott lázhoz, amelyet ismert a COX-2 közvetít. Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a CCK által kiváltott hipertermia elsősorban a CCK₂ receptorokon keresztül alakul ki, ezért kísérleteinkben a CCK₂ receptor LPS által kiváltott lázban betöltött szerepére fókuszáltunk. Amikor a patkányok az LPS i.v. infúziója előtt 30 perccel CCK₂ receptor antagonistá YM022-t kaptak i.c.v., az LPS-re adott lázválasz első két fázisa nem különbözött a vehikulummal előkezelt patkányoknál megfigyelteltől, azonban a harmadik fázis jelentősen csillapodott, elérve a szignifikancia szintjét ($p < 0,05$) a 280. és a 300-360. percben.

5.3.1.4. A PACAP termoregulatórikus szerepének karakterizálása patkány és KO egér állatmodellekben

A CCK-n kívül egy másik, TRPV1 csatornát expresszáló idegvégződésekből is felszabaduló neuroendokrin mediátor, a PACAP termoregulatórikus hatásainak karakterizálását is elvégeztük. Tudni szerettük volna, hogy a PACAP domináns, 38 aminosavból álló formájának, a PACAP38-nak testhőmérsékleti hatásai hasonlíthatók-e lázszerű hatáshoz.

Ennek érdekében, 10 vagy 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PACAP38-at (vagy kontrollként fiziológiás sóoldatot) infundáltunk patkányok oldalsó agykamrájába, miközben mértük a T_m , T_b és VO_2 értékeiket a respirometriás termometria rendszerben. A PACAP38 mindkét alkalmazott dózisa már az injekciót követő 10. perctől kezdődően a T_m jelentős emelkedését váltotta ki ($p < 0,001$ mindkét dózisonál). A PACAP38 által kiváltott hipertermia nagysága dózisfüggő volt, a T_m maximális változása 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ esetén $2,0 \pm 0,3^\circ\text{C}$, míg 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ esetén $1,4 \pm 0,3^\circ\text{C}$ volt ($p < 0,001$ mindkét esetben a kontrollhoz képest). Ugyanakkor, a statisztikai elemzés szignifikáns különbséget ($p < 0,001$) mutatott a PACAP38 10 és 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dózisainak T_m -re gyakorolt hatásai között is. A centrálisan beadott PACAP38 hatására kialakult hipertermiás válasz összhangban van más kutatócsoportok patkányokban talált korábbi eredményeivel. A 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -os dózis esetében a hipertermia kialakulását jelentős farokbőr vazokonstriktió előzte meg (amit a csökkent HLI jelzett) ($p < 0,05$), amely eredmény tudomásom szerint elsőként mutatta be az i.c.v. PACAP38-ra adott bőr vazomotoros reakciót éber (nem anesztetizált) patkányokban. A PACAP38 termoregulatórikus (érszűkítő) hatása eltér a bőr ereire gyakorolt közvetlen (tágító) hatásától, amelyet korábban mutattak ki rágcsálókban. A HLI kezdeti csökkenése ~40 percre tartott, majd ezt követte a HLI kifejezett emelkedése – a farokbőr vazodilatációja miatt – amely a kísérlet végéig szignifikánsan ($p < 0,05$) magasabb maradt, mint a sóoldattal kezelt patkányoké, összhangban a PACAP38 korábban közölt vazodilatátor hatásával. A 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dózisú PACAP38-cal i.c.v. kezelt patkányok hőleadása már az anyag beadása előtt alacsony volt, így a HLI kezdeti csökkenése ebben a csoportban nem volt megfigyelhető, azonban ~50 perccel a PACAP38 infúziója után a HLI a kiindulási szint fölé emelkedett és magasabb volt, mint a kontrolloké ($p < 0,05$), bár emelkedésének mértéke és időtartama kisebb volt, mint a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dózis esetén.

A T_m -hez hasonlóan a VO_2 is dózisfüggő módon emelkedett már 10 perccel a PACAP38 i.c.v. beadása után a sóoldattal kezelt állatokhoz képest. A maximális emelkedés 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ esetén 21 ± 6 ml/kg/min, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dózisonál 14 ± 6 ml/kg/min értéket ért el ($p < 0,001$ mindkét dózisonál a kontrollhoz képest). Ez az eredmény összhangban van a korábbi vizsgálatokkal, amelyekben a PACAP38 megemelte az anyagcserét. Ezenkívül eredményeink azt mutatják, hogy a két autonóm hideg elleni termoeffektor (a bőr vazokonstriktió és a barnasírszöveti termogenezis) egyidejű, azonnali aktiválása hozzájárul a centrális PACAP38 által indukált hipertermia kialakulásához. A PACAP38 esetében megfigyelt termoregulatórikus hatások tehát nagy mértékben hasonlóak a bakteriális endotoxin által kiváltott láz során leírtakhoz.

A PACAP38 termoregulatórikus hatása háttérben álló perifériás támadáspont lehetőségének vizsgálatához tanulmányoztuk, hogy ugyanaz a PACAP38 dózis (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$), amely i.c.v. injekcióban kifejezett hipertermiát okozott, szisztémás (i.v.) beadás esetén is hasonló hatással van-e a T_m -re. A PACAP38 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -os dózisának i.v. infúziója a T_m enyhe, de szignifikáns ($p < 0,05$) emelkedését okozta, azonban mind a T_m maximális emelkedése (~0,3 $^\circ\text{C}$), mind a hipertermiás válasz időtartama (60 perc) jelentősen kisebb volt, mint amit ugyanezen dózis i.c.v. beadása váltott ki ($p < 0,05$). Fontos, hogy a PACAP38-ra adott válasz 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -os i.v. dózisonál lényegesen kisebb volt mind amplitúdójában (~5-ször kisebb), mind időtartamában (~2-szer rövidebb), mint amit az i.c.v. adagolt 10-szer kisebb dózisonál (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) tapasztaltunk. Ugyanakkor, az i.c.v. anyagadásnál megfigyeltekhez hasonlóan, a hipertermia a PACAP38 i.v. infúziója esetén is a hőleadás csökkenése és a VO_2 emelkedése révén jött létre, habár mindkét termoeffektor aktivitása sokkal kisebb mértékben változott, mint az i.c.v. anyagadás után. Az az eredmény, hogy a PACAP38 i.v. beadáshoz képest 10-szer kisebb i.c.v. dózisa is sokkal erősebb hipertermiát okozott, egyértelműen azt mutatja, hogy a PACAP38 termoregulatórikus hatásának támadáspontja a központi idegrendszerben található.

Azok után, hogy karakterizáltuk az exogén PACAP38 beadására kialakuló hőszabályozási választ, tudni szeretnénk volna azt is, hogy az endogén PACAP hiánya hogyan befolyásolja a T_m -et. Ennek érdekében először a T_m és a lokomotoros aktivitás cirkadián változásait vizsgáltuk szabadon mozgó *Pacap*^{-/-} és *Pacap*^{+/+} egerekben. A rágcsálókra jellemző cirkadián ritmusnak megfelelően, mindkét genotípusba tartozó egerek T_m és aktivitás szintjei alacsonyabbak voltak a világos (inaktív) fázisban, mint a sötét (aktív) fázisban. Azt találtuk, hogy a *Pacap*^{-/-} egerek aktívabbak voltak WT társaiknál mind a világos, mind a sötét fázisban ($p < 0,001$). A világos fázis nagy részében (reggel 5

és délután 3 óra között) a fokozott lokomotoros aktivitás a *Pacap*^{-/-} egereknél a WT kontrollokhoz képest mérsékelten magasabb (hasüregben mért) T_m értéket eredményezett ($p < 0,05$), de éjszaka nem volt szignifikáns különbség a T_m értékében a genotípusok között. Hasonló eredményeket kimutattak korábban is a hiperaktivitás T_m -re gyakorolt hatásáról csirkékben és egerekben, amelyek szerint az emelkedett fizikai aktivitás magasabb T_m -et eredményezett az inaktív fázisban, de az aktív fázisban nem. Feltételezhető, hogy a lokomotoros aktivitás eltérő hatása a T_m -re a világos-sötét ciklusok között, a bőr vazodilatációjának cirkadián változásaiból, így hőleadási eltérésekből származhat.

Következő lépésként, mozgásukban részlegesen korlátozott *Pacap*^{-/-} és *Pacap*^{+/+} egerekben megmértük a nyugalmi T_m és VO_2 értékeit. Ezeket a kísérleteket a respirometriás termometria rendszerben végeztük, így minimálisra tudtuk csökkenteni a lokomotoros aktivitás hatását a T_m -re és a VO_2 -re. A nyugalmi hőszabályozási paramétereket délelőtt 11 órától kezdve 60 percen keresztül rögzítettük, mivel ez az időszak esett egybe a legnagyobb T_m különbségekkel a szabadon mozgó *Pacap*^{-/-} és *Pacap*^{+/+} egerek esetében. A nyugalmi VO_2 a *Pacap*^{-/-} egereknél szignifikánsan alacsonyabb volt a kísérlet során a WT kontrollokhoz képest ($p < 0,001$). A megfigyelt hipometabolizmus következményeként a *Pacap*^{-/-} egerek nyugalmi T_m értékei is kissé alacsonyabbak voltak, mint kontroll társaiké ($p < 0,01$).

Annak felmérésére, hogy mely központi idegrendszeri neuronok aktivitásában bekövetkező változások lehetnek felelősek a *Pacap*^{-/-} egerek csökkent nyugalmi anyagcseréjének fenntartásáért, megmértük a c-Fos expresszióját az MnPO-ban és az MPO-ban. Az MnPO-ban nem találtunk statisztikai különbséget a c-Fos-pozitív sejtek számában a *Pacap*^{-/-} és *Pacap*^{+/+} egerek között, azonban az MPO-ban közel háromszor nagyobb volt a c-Fos expresszió a *Pacap*^{-/-} egerekben mint WT társaikban ($p < 0,05$). Figyelembe véve, hogy az MPO GABAerg neuronjai tónusosan gátolják a barnazsírszöveti termogenezist, valamint, hogy ezek a sejtek az autonóm termoeffektorok aktivitását szabályozó hurkok elsőszámú effektor neuronjainak tekinthetők, a *Pacap*^{-/-} egerekben talált eredményeink arra utalnak, hogy a PACAP hiánya a gátló MPO neuronok fokozott aktivációját eredményezi, ami a termogenezis erőteljesebb szuppressziójához vezet.

5.3.2. Metaanalízisek

5.3.2.1. A láz és hipotermia prediktív jelentőségének vizsgálata a szepszis súlyosságára és kimenetelére

A szisztémás gyulladás során fellépő testhőmérsékleti elváltozások jelentőségének és mechanizmusainak kísérleti modellekben való tanulmányozása mellett, arra is kerestem a választ, hogy a T_m eltérései milyen összefüggésben állnak a betegség kimenetelével septicus humán betegekben. Ennek áttekintő vizsgálatához metaanalízist használtam. Negyvenkettő olyan tanulmányt azonosítottunk, amelyeket be tudtunk vonni analízisünkbe, ezek összesen 10834 septicus beteg adatait tartalmazták.

Először megvizsgáltuk a szepsziszhez társuló láz esetén a mortalitási rátát: 29 tanulmányt találtunk, amelyekben a szerzők beszámoltak szepsziszben jelentkező lázról ($T_m > 38,0^\circ\text{C}$). Az összesen 6040 lázas septicus beteg adatainak metaanalízise átlagosan 22,2%-os (CI: 19,2, 25,5%) mortalitási rátát mutatott. Elemeztük azon betegek halálozási arányát is, akiknél sem láz, sem hipotermia nem alakult ki a szepszis során, ezért ez a populáció normotermiásnak tekinthető ($T_m = 36,1-38,0^\circ\text{C}$). A 25 beválogatott tanulmányból kinyert 3904 beteg adatai alapján azt találtuk, hogy az átlagos halálozási arány 31,2% (CI: 25,7, 37,3%) volt, vagyis magasabb, mint a lázas csoportban. Ezután megvizsgáltuk a mortalitás előfordulását a hipotermiás ($T_m \leq 36,0^\circ\text{C}$) septicus betegek körében. A 11 azonosított tanulmány, 890 hipotermiás septicus beteg adatait tartalmazta, amelyek alapján az átlagos halálozási arány ezeknél a betegeknél volt a legmagasabb, 47,3% (CI: 38,9, 55,7). További statisztikai megközelítésként metaregressziós elemzést is végeztünk az összegyűjtött adatokkal. Az elemzésbe bevont összes ($n = 42$) tanulmány alapján szignifikáns ($p < 0,001$) negatív lineáris korrelációt találtunk a T_m és a halálozási arány között (regressziós együttható: -0,43; CI: -0,67, -0,19). Végül a betegeket a mortalitási ráta alapján kialakított kvartilisekre (Q1-Q4) osztottuk (Q1: 0-25, Q2: 26-50, Q3: 51-75 és Q4: 76-100%), majd kiszámítottuk az egyes mortalitási kvartilisek átlagos T_m értékeit. A súlyozott T_m átlag a Q1 csoportban $38,1^\circ\text{C}$ (CI: 37,9, $38,4^\circ\text{C}$), a Q2-ben $37,8^\circ\text{C}$

(CI: 37,5, 38,2°C), a Q3-ban 37,6°C (CI: 36,5, 38,7°C) és a Q4-ben 37,1°C (CI: 36,7, 37,4°C) volt. Ezek az eredmények is azt jelzik, hogy szepszisben a magasabb T_m jobb kimenetellel, míg az alacsonyabb T_m emelkedett halálozási kockázattal van összefüggésben. Kiemelendő, hogy a Q1 és Q4 (azaz a legalacsonyabb, illetve a legmagasabb halálozási arányú) csoportok T_m értékei élesen elkülönülnek egymástól, mivel a 95%-os CI értékeik nem fedik egymást.

5.3.2.2. A MIF diagnosztikai biomarker értékének elemzése szepszisben

A testhőmérséklet prediktív szerepének vizsgálatán kívül, azt is tudni szerettem volna, hogy a MIF, amelynek hőszabályozási szerepét szisztémás gyulladás egérmodellben kollaboratív kutatás keretében kimutattuk, használható-e diagnosztikus és prognosztikus biomarkerként septicus betegekben. Ennek érdekében, előbb elvégeztük az irodalomban már fellelhető humán adatok összegyűjtését és metaanalízisét, majd pedig kiértékeljük saját prospektív klinikai vizsgálatunk során gyűjtött eredményeinket.

A metaanalízisünk elvégzéséhez használt irodalomkutatásunk során összesen 21 publikációt találtunk alkalmasnak a kvantitatív analízishez. Az azonosított cikkek összesen 1876 beteg adatait tartalmazták, akik között 1206 septicus, 134 fertőzéstől független szisztémás gyulladásban szenvedő és 536 kontroll (azaz szisztémás gyulladás nélküli) alany volt. Először megerősítettük, hogy szepszisben a MIF szintje a vérben megemelkedik egészséges kontrollokhoz képest. Ezután megvizsgáltuk, hogy a vérben a MIF szintje hasonló vagy különböző mértékben emelkedik-e szepszisben és nem fertőzések eredetű szisztémás gyulladásban. Ennek kvantitatív elemzésébe 6 tanulmányt tudtunk bevonni, amelyek 257 septicus és 134 nem septicus szisztémás gyulladásban szenvedő beteg adatait közölték. A vérben a MIF szintje minden elemzett tanulmányban magasabb volt septicus betegcsoportokban, mint nem septicus eredetű szisztémás gyulladásban. Az összegzett SMD 0,94 (CI: 0,51, 1,38) volt a csoportok között ($p < 0,001$), amely igazolja a MIF diagnosztikus értékét a két csoport elkülönítésében.

5.3.3. A szérum és vizelet MIF szintek kinetikája és a szepszis kimenetele közötti összefüggés elemzése prospektív klinikai vizsgálatban

Klinikai vizsgálatunk végső elemzésébe 50 beteg adatai kerültek be. A 90 napos halálozási arány 58% volt ebben a vizsgálati populációban, ami megfelel a szakirodalomban a közelmúltban közölt adatoknak. A betegek neme és életkor szerinti megoszlása hasonló volt a két csoportban, ahogyan a vese diszfunkcióban szenvedő betegek száma is. Fontos, hogy az intenzív osztályra való felvétel napján nem észleltünk szignifikáns különbséget a két csoport között egyetlen paraméter tekintetében sem, bár a klinikai állapot súlyossági pontszámai a nem túlélőknél tendenciózusan magasabbak voltak, mint a túlélőknél, ahogy az várható volt.

A szérum MIF szintek mediánja nem különbözött statisztikailag a túlélő és elhunyt septicus betegek között a 0. és a 2. napon, azonban a 4. napon szignifikánsan ($p = 0,039$) magasabb volt az elhunyt betegeknél, mint a túlélőknél, a medián (interkvartilis tartomány) értékei 3348 (2313-5961), illetve 2430 (1284-3691) pg/ml voltak. Ezek az eredmények a szérum MIF eltérő kinetikájára utaltak a szepszis túlélő és elhunyt betegcsoportjai között a 0. naptól a 4. napig.

A vizelet MIF tekintetében a mediánok nem változtak érdemben az idő múlásával egyik alcsoportban sem. A vizelet MIF szintje azonban minden napon alacsonyabb volt elhunyt betegeknél, mint a túlélőknél, és ez a különbség szignifikáns volt a 0. napon (638 vs. 1355 pg/ml; $p = 0,046$) és a 4. napon (672 vs. 1005 pg/ml; $p = 0,032$). A vizelet MIF szintjéhez hasonlóan a vizelet MIF/kreatinin arányban is kimutatható volt a szignifikáns különbség az elhunytak és a túlélők között a 0. napon és a 4. napon, amely eredmények arra utalnak, hogy a vizelet MIF szintjének a túlélők és elhunytak között megfigyelt különbségeit feltehetően a vese MIF kiválasztására specifikus különbségek okozták, nem pedig az általános vesefunkciókban mutatkozó különbségek.

A szérum MIF kinetikájának kvantitatívabb elemzése érdekében a következő megközelítésben a szérum MIF szintek átlagos változásait is összehasonlítottuk a 0. és a 4. nap között az elhunyt és túlélő alcsoportokban. Az elhunyt betegeknél az átlag (\pm SE) szérum MIF szint a 0. napi 2997 ± 373 pg/ml-ről a 4. napra 4394 ± 646 pg/ml-re emelkedett, míg a szepszist túlélőknél a szérum

MIF szintje 3137 ± 576 pg/ml-ről 2587 ± 384 pg/ml-re csökkent ugyanezen időintervallum alatt. A szérumban MIF szintjének napi változása szignifikánsan különbözött a túlélők és elhunytak között akkor, amikor mindkét nemből ($p = 0,01$) vagy csak a férfiakból ($p = 0,01$) származó adatokat elemeztük, azonban a nők esetében nem volt jelentős különbség az elhunyt és a túlélő csoportok között ($p = 0,230$). Összességében, a mindkét nemet vagy csak férfiakat tartalmazó betegcsoportok esetén elhunytakban növekedés, a túlélőkben pedig csökkenés volt tapasztalható, míg a nőknél mindkét kimenetelű csoportban átlagosan növekedés volt tapasztalható.

A szérumban MIF szintjének kinetikája mellett azt is megvizsgáltuk, hogyan változik a MIF szintje a vizeletben a szepszis betegek intenzív osztályra való felvételét követően. Ahogy korábban bemutattam, a vizelet MIF szintje a 0. és a 4. napon szignifikánsan alacsonyabb volt az elhunyt betegeknél, mint a túlélőknél. Amikor a különböző kimenetelű alcsoportokon belüli kinetikát vizsgáltuk, mindkét csoportban kismértékű, nem szignifikáns növekedést találtunk a 0. naptól a 4. napig: 3021 ± 797 pg/ml-ről 3457 ± 1016 pg/ml-re a túlélőknél és 1281 ± 340 -ról 1629 ± 654 pg/ml-re az elhunytaknál. Fontos, hogy a vizelet MIF szintjének napi változása sem különbözött szignifikánsan a túlélők és az elhunytak között (109 ± 192 vs. 87 ± 152 pg/ml; $p = 0,940$). Akkor sem találtunk szignifikáns különbséget a vizelet MIF szintjének napi változásában, amikor a férfiakat és a nőket külön-külön hasonlítottuk össze ($p = 0,136$ és $p = 0,228$). Ugyanakkor, mindkét nemből származó adatokat elemezve erős pozitív korrelációt ($R = 0,64$; $p < 0,001$) találtunk a 0. és a 4. napon mért vizelet MIF-szintek között, ami arra utal, hogy a 0. napon meghatározott szint előre jelzi a 4. napon mért értéket.

6. Megbeszélés

6.1. Termo-TRP ioncsatornák szerepe a testhőmérséklet szabályozásában

6.1.1. A TRPV1 ioncsatorna

Első lépésként, a TRPV1 csatornától genetikusan megfosztott egerek termoregulációs fenotípusát tanulmányoztuk. Korábbi vizsgálatokkal összhangban, nem találtunk kifejezett mértékű eltéréseket a *Trpv1* KO egerek nyugalmi T_m -ében. Azt is megerősítettük, hogy *Trpv1*^{+/+} társaikhoz képest a *Trpv1*^{-/-} egereknél a T_m cirkadián ingadozásának amplitúdója kissé nagyobb. Úgy tűnik, hogy a *Trpv1* KO egerek fő hőszabályozási eltérése nem a T_m megváltozott szintjében található, hanem a T_m fenntartására használt termoeffektorok eltérő mintázatából ered a különböző kísérleti körülmények között. A *Trpv1* KO egerek hipometabolikusak voltak (alacsonyabb volt a VO_2 -jük) és a kontrollokhoz képest alacsonyabb T_k -t preferáltak. Ezek a termoeffektor változások általában csökkentik a T_m -et. Ugyanakkor a KO egerek két, a T_m növelését okozó termoeffektor aktivációt is mutattak. Először is, kifejezettebb volt a farokbőr vazokonstriktiója, és ezzel összhangban magasabb volt a termoneutrális zónájuk. Másodszer, hiperaktívak voltak: átlagos mozgási sebességük az inaktív fázis második felében meghaladta a WT egereknél az aktív fázisban regisztrált értéket.

A *Trpv1* KO egerek fokozott lokomotoros aktivitása ellentmondásosnak látszik több olyan vizsgálathoz képest, amelyek szerint a *Trpv1* gén deléciója nem okoz változást a mozgásintenzitásban. Mindezek a vizsgálatok azonban sokkal rövidebb megfigyelési periódusokat használtak, néha csak 15 percet. Továbbá, bár ezek a vizsgálatok nem találtak statisztikailag szignifikáns eltérést a *Trpv1* KO egerek lokomotoros aktivitásában, némelyikben mégis erős tendencia mutatkozott, amely összhangban volt eredményeinkkel. Korábban például azt találták, hogy a *Trpv1* KO egerek több aktivitási tesztben is hajlamosak voltak magasabb pontszámokat elérni. A felfedező viselkedést vizsgáló „holeboard” tesztben a *Trpv1* KO egerek aktivitása 92%-kal haladta meg WT társaikét ($p = 0,12$).

Tekintettel arra, hogy a *Trpv1* KO egerek autonóm termoregulációs válaszaiban nem volt lényeges eltérés sem a mi kísérleteinkben, sem korábbi vizsgálatokban, a viselkedési termoeffektorokra koncentráltunk: egyrészt a T_k preferenciára, ami a viselkedési termoeffektorok klasszikus példája, másrészt a lokomotoros aktivitásra, amit sok szerző hőszabályozó effektornak tekint kis rágcsálókban. A termogradiens rendszerben azt láttuk, hogy a *Trpv1* KO egerek

alacsonyabb T_k -t preferáltak és hiperaktívak voltak a kontrollokhöz képest. Hasonlóan ahhoz, ahogyan az emberek is inkább hűvösebb környezetben végeznek fizikai munkát, a kísérleti állatok is alacsonyabb T_k -t választanak, amikor aktívabbak. A preferált T_k megváltozása együtt jár a patkányok és egerek lokomotoros aktivitásának növekedésével az inaktív (világos) fázisból az aktív (sötét) fázisba való átmenetkor. Miután hideg- és melegterheléssel közvetlenül kizártuk a két fő autonóm effektor károsodását, annak tudatában, hogy a termopreferendum csökkenése gyakran másodlagos következménye a fokozott lokomotoros aktivitásnak, feltételeztük, hogy a fokozott lokomotoros aktivitás a *Trpv1* KO fenotípus egyik "elsődleges" tünete lehet. Vizsgálatunk második részét ezután a lokomotoros aktivitásra összpontosítottuk.

Megvizsgáltuk, hogy a TRPV1 csatornák aktivitásának farmakológiai módosítása befolyásolja-e a lokomotoros aktivitást (és egyúttal a T_m -et). Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az RTX (egy exogén TRPV1 agonista) és az AEA (egy endogén TRPV1 agonista) egyaránt csökkentette a stressz által kiváltott hiperaktivitást két különböző törzszű *Trpv1*^{+/+} egérben. Ez a hatás összhangban áll az általunk is vizsgált és más TRPV1 agonisták több különböző tesztben leírt hipokinetikus tulajdonságával. Amikor *Trpv1* KO egerekben vizsgáltuk az RTX-re és az AEA-ra adott válaszokat, azt találtuk, hogy nem befolyásolták a lokomotoros aktivitást, tehát mindkét agonista anti-hiperkinetikus hatása a TRPV1 csatornán keresztül érvényesült. Ez összhangban van azzal a megállapítással, hogy a patkányok AEA által kiváltott lokomotoros aktivitásának csökkenését TRPV1 antagonisták blokkolják. A következő kísérletben az AMG0347-et, egy rendkívül potens és szelektív TRPV1 antagonistát használtunk. A hipertermiás hatás mellett, az AMG0347 stresszmentes i.p. beadása fokozta a *Trpv1*^{+/+} egerek lokomotoros aktivitását is. A *Trpv1* KO egerekben azonban az AMG0347 nem növelte a lokomóciót, ami arra utalt, hogy az AMG0347 hiperkinetikus hatása specifikusan a TRPV1 csatornán keresztül érvényesül. Az RTX, AEA és AMG0347 beadásával elért eredményeink alátámasztják azt a hipotézist, hogy a TRPV1 csatornák tónusosan gátlás alatt tartják az általános lokomotoros aktivitást.

Ezután arra kerestük a választ, hogy az érintett TRPV1 csatornák az agyon belül vagy kívül helyezkednek-e el. E kérdés megválaszolásához nagyon alacsony dózisú RTX-et adtunk be az állatoknak i.p. vagy az oldalsó agykamrába (i.c.v.). Az i.p. beadás jelentősen csökkentette az injektálási procedúra (mint stresszinger) hatására kialakuló lokomóciót, míg az i.c.v. beadásnak nem volt ilyen hatása, ami arra utal, hogy az RTX a vér-agy gáton kívül hatva váltja ki anti-hiperkinetikus hatását. Egy ilyen perifériás hatás összhangban van a TRPV1 csatornák hátsógyöki és nodózus ganglionok polimodális szenzoros neuronjain való domináló expressziójával. A perifériás TRPV1 csatornák tónusos aktiválása gátolta a termogenezist és a hőkonzerválást, egy másik vizsgálatban pedig befolyással bírt spinális lokomotoros hálózatokra, míg a jelen munkában gátolta az általános lokomotoros aktivitást.

Tanulmányunk során véletlen megfigyelésként azt vettük észre, hogy az életkor előrehaladtával a *Trpv1* KO egerek mindkét nemben (normál diétán tartva) nagyobb súlyúak lettek, mint WT társaik. Ez a megfigyelés ellentmondani látszott korábbi eredményeknek, amelyekben nem találtak eltérést a *Trpv1* KO egerek testtömegében a kontrollokhöz képest, ha normál vagy magas zsírtartalmú étrenden tartották őket. Továbbá, ellentmondott egy vizsgálatának, amelyben a *Trpv1* KO egerek a WT kontrollokhöz képest kevésbé voltak hajlamosak elhízni magas zsírtartalmú diéta során. Fontos tudni azonban, hogy az összes előbbieken említett vizsgálatban fiatal egereket használtak, amelyek testtömege 10-30 g közötti tartományban volt (normál diétán). Ebben a testtömeg-tartományban a mi vizsgálatunkban is kicsi volt a genotípusok közötti különbség, de az életkor előrehaladtával (az egereket 14 hónapos korukig figyeltük) a különbség nőtt. Érdekes módon a TRPV1 csatornák elhízás elleni védő szerepét korábban már felvetették, amit kétféle bizonyíték támaszthat alá. Először is, TRPV1 csatornákat mutattak ki preadipocitákban, valamint egerek és emberek zsigeri zsírszövetében. A szerzők kimutatták a TRPV1 szintézis redukcióját az adipogenezis során, valamint a TRPV1 csökkent expresszióját elhízott egerekből és emberekből származó viscerális zsírszövetben. Másodszor, a kapszaicin vagy kapszinoidek (nem csípős, kapszaicinhez hasonló TRPV1 agonisták) diétaszerű fogyasztása során többször kimutatták, hogy csökkenti a

viscerális zsír felhalmozódását, termogenezist indukál és megakadályozza a testtömeg növekedését laboratóriumi állatokban és emberekben.

A *Trpv1* KO egerekben fiatal korukban talált hiperaktivitás és idősebb korukban kialakuló túlsúly közötti paradoxon feloldására további vizsgálatokat folytattunk, amelyek során azt találtuk, hogy amikor a *Trpv1*^{-/-} egerek öregednek, hipoaktívvá és túlsúlyossá válnak (a WT alomtársaikhoz képest). Arra a kérdésre a válasz, hogy miért hiperaktívak a *Trpv1*^{-/-} állatok fiatalon, míg később kevesebbet mozognak (és túlsúlyosak lesznek) jelenleg nem világos, de hasonló összefüggésről számoltak be egészséges emberekben is. Ebben a csoportban azok, akik fiatal korban fizikailag aktívabbak voltak, 11 évvel később nagyobb testtömeg-gyarapodást mutattak.

Összefoglalva, feltételezzük, hogy bizonyos perifériáról érkező TRPV1 csatornák által közvetített szignálok tónusosan gátolják az általános lokomotoros aktivitást. Egyre világosabb, hogy a TRPV1 csatornák szoros kapcsolatban állnak mind az általános lokomotoros aktivitás, mind pedig a testtömeg szabályozásával, és hogy a TRPV1 csatornák általi szabályozás mindkettő esetében életkorfüggő.

A TRPV1 csatorna genetikai hiányának vizsgálata mellett arra is kíváncsi voltam, hogy a csatorna farmakológiai gátlása újonnan szintetizált antagonistákkal milyen hatással van a testhőmérsékletre rágcsálókban. Az A-1165901 *in vivo* tesztelése során kimutattuk, hogy az nem hipertermiát okoz, hanem hipotermiát, ami csak néhány korábbi antagonistá esetén fordult elő.

Kimutattuk, hogy T_k -tól függően a patkányok A-1165901-re adott hipotermiás válaszában a létrejöttében a farokbőr érrendszere és a termogenezis is részt vehet. Ebben a tekintetben az erre az anyagra adott hipotermiás válasz hasonló a hipertermizáló TRPV1 antagonistákra, azaz az AMG0347-re és az AMG 517-re adott válaszokhoz. Az AMG0347 és az AMG 517 ugyanis ugyanezekre a termoeffektorokra (de ellentétes irányban) hatva növeli a T_m -et patkányokban: farokbőr vazokonstriktió és termogenezis aktivációja révén. A hipertermizáló antagonisták esetében termoneutrális vagy meleg környezetben szintén a vazomotor hatás játszik fontos szerepet, míg hidegben a termogenezisre gyakorolt hatás a fő mechanizmus. A TRPV1 antagonistákra adott hipo- és hipertermiás válaszok tehát ugyanazonokon az autonóm termoeffektorokon keresztül valósulnak meg, amelyek aktiválásának módja a hipo- és hipertermiás válaszokban ugyanúgy függ a T_k -tól.

Azt is kimutattuk, hogy az A-1165901 által kiváltott hipotermia nem jelentkezik a korábban alacsony dóziszú i.p. RTX kezeléssel átesett patkányokban, amely deszenzitizálja az abdominális régió érzőidegeit, de a hason kívül, így a mellkasi viscerában, az agyban, a szaruhártyában vagy a bőrben nincs ilyen hatása. Ugyanez az abdominális RTX deszenzitizáció megakadályozza a hipertermia kialakulását az AMG0347 vagy az A-889425 valamint az AMG 517 vagy az AMG8163 hatására. Másképp fogalmazva, a TRPV1 antagonisták által indukált hipo- és hipertermiás válaszok ugyanabból a hasi lokalizációból indulnak ki.

Fontos volt azt is tisztázni, hogy a TRPV1 antagonisták hipotermiás hatása ténylegesen a TRPV1 csatornán keresztül jelentkezik-e. Korábban többen is feltételezték, hogy a hipotermia nem TRPV1 csatornán keresztül megvalósuló „on-target” hatás. Ugyanakkor olyan eredmények is születtek, amelyek szerint a különböző kemotípusú szelektív TRPV1 antagonisták hipotermiát okoznak, ami a hatás TRPV1-specifikus jellegére utal. Vizsgálatunkban végérvényesen kimutattuk, hogy az A-1165901 és az AMG7905 hipotermiás hatása kizárólag a TRPV1 csatornák jelenlétében alakul ki. A két vizsgált TRPV1 antagonistá egyike sem csökkentette a T_m -et *Trpv1*^{-/-} egerekben i.p. beadáskor, annak ellenére, hogy mindkét anyag kifejezett hipotermiát váltott ki *Trpv1*^{+/+} egerekben. Összehasonlításképpen, a hipertermiás hatás specifikus, „on-target” jellegét szintén bizonyították több TRPV1 antagonistá esetében is, szintén *Trpv1*^{-/-} egerek alkalmazásával.

Azt találtuk továbbá, hogy mindkét vizsgált hipotermizáló TRPV1 antagonistá (A-1165901 és AMG7905) gátlás helyett potencírozta a TRPV1 csatorna protonok általi aktivációját *in vitro*, miközben a kapszaicin módot nagymértékben blokkolta. Tekintettel a TRPV1 farmakológiai komplexitására, fontos megjegyezni, hogy sem az AMG7905, sem az A-1165901 nem mutat agonista aktivitást (azaz önmagában, agonisták hiányában, nem aktiválja a TRPV1 csatornát). Új eredményeink összhangban vannak korábbi adatokkal, melyek szerint az AMG7905 és az AMG8562

potenciózza a TRPV1 protonok általi aktivációját *in vitro*, amely feltételezhetően korrelált a TRPV1 antagonisták hipotermizáló hatásával. Következésképpen, míg a TRPV1 csatorna protonok általi aktivációs módját gátló TRPV1 antagonistákról egyértelműen bizonyítottnak látszik, hogy hipertermiát okoznak, az is egyre világosabbá válik, hogy az ugyanezt az aktivációs módot potenciózó anyagok hipotermiát hoznak létre.

A TRPV1 antagonisták hipo- és hipertermiás hatásainak ugyanazon termoeffektorok ellentétes modulációja kapcsán való kialakulását illetően a következő összefoglaló elméletet fogalmaztuk meg. A TRPV1 antagonisták egy nagyon szokatlan, valószínűleg egyedülálló mechanizmusra hathatnak, amely két ellenkező irányban is modulálható, hogy a T_m ellentétes irányú változásait váltsa ki. A hipertermizáló TRPV1 antagonisták a TRPV1 csatorna protonok általi aktivációs módjának hatékony gátlószerei. Azáltal okoznak hipertermiát, hogy specifikusan TRPV1 csatornákon hatnak (on-target hatás) a has meghatározott részén (részleteket lásd alább), és blokkolják e csatornák protonok általi tónusos aktivációját. Ez a gátlás az autonóm hideg elleni védekezés szuppressziójának megszűnését eredményezi, így hipertermia kialakulásához vezet. Az úgynevezett "termálisan neutrális" TRPV1 antagonisták (azok, amelyek nem befolyásolják a T_m -et) nem hatnak a TRPV1 csatorna proton aktivációs módjára, így nem befolyásolják a hasi TRPV1 csatornák hőszabályozási reflexíveit. A hipotermiát kiváltó TRPV1 antagonisták potenciózzák – nem pedig gátolják – a proton aktivációs módot. A hasi TRPV1 csatornákra hatva fokozzák a protonok általi tónusos aktivációt, tovább erősítve az autonóm hideg elleni védekezés tónusos gátlását, ami hipotermiához vezet. Ez az egységesítő koncepció megmagyarázza a TRPV1 antagonisták összes lehetséges hatását a T_m -re.

Tanulmányunk során annak a fontos kérdésnek a tisztázására is sorkerült, amely a hipertermizáló TRPV1 antagonisták farmakológiai profiljával kapcsolatos: gátolják-e a TRPV1 csatorna vanilloid (kapszaicin) módját a proton aktivációs mód nagyfokú gátlása mellett? Az A-1165901 és az AMG7905 segítségével végzett vizsgálatunk alapján most már tudjuk, hogy a TRPV1 antagonisták hipotermiás hatásában ugyanaz a mechanizmus játszik szerepet, mint a hipertermiás hatás létrejöttében. Ezek alapján matematikai modellünk eredménye szerint a hipertermizáló TRPV1 antagonisták farmakológiai profiljában szükségszerű a TRPV1 csatorna proton aktivációs módjának potens gátlása, viszont egyáltalán nem lényeges a hő általi vagy a kapszaicin aktivációs mód gátlásában kifejtett hatékonyság.

Arra is kerestem a választ, hogy mi lehet a TRPV1 antagonisták által kiváltott hipertermia létrejöttének idegi mechanizmusa. Ezirányú vizsgálataink során kimutattuk, hogy három TRPV1 antagonistára (AMG0347, AMG 517 és AMG8163) adott hipertermiás válasz nem alakult ki lokalizált hasi TRPV1 deszenzitizációon átesett patkányokban. A lokalizált hasi TRPV1 deszenzitizációról korábban kimutatták, hogy csillapítja az AMG0347 és az A889425 által indukált hipertermiát. Az a tény, hogy ez a jelenség így már négy különböző anyag esetében is igazolásra került, határozottan bizonyítja, hogy a TRPV1 antagonisták a hasban lévő TRPV1 csatornákon hatva váltanak ki hipertermiát.

Ezután azt vizsgáltuk, hogy a has különböző részein található afferens idegeken lévő TRPV1 csatornákból származó jelek hogyan jutnak el az agyba. A hasi zsigereket a test legnagyobb idegének számító nervus vagus innerválja, amely túlnyomórészt szenzoros ideg, és amelynek afferens rostjai TRPV1 csatornákat is expresszálnak. Kizártuk a vagus részvételét a TRPV1 antagonisták által kiváltott hipertermiában azzal, hogy kimutattuk, hogy a teljes (kétoldali) szubdiafragmatikus vagotomia nem befolyásolta a T_m i.v. AMG0347 által okozott emelkedését, annak ellenére, hogy a vagotomia eredményességét funkcionálisan igazolta a műtét hatására kialakult megnövekedett gyomortömeg.

A hasi zsigereket a nervus splanchnicus major, minor, minimus, lumbalis és pelvicius ágai is ellátják. A splanchnicus idegek szintén expresszálnak TRPV1 csatornákat, amelynek expressziós szintje általában magasabb a splanchnicus afferenseken, mint a vagus afferenseken. A nervus splanchnicus major kétoldali átmetszése azonban nem befolyásolta az AMG0347 által kiváltott hipertermiát, annak ellenére, hogy a splanchnicotomia eredményességét funkcionálisan igazoltuk a

mellékvesék stressz által indukált kortikoszteron termelésének blokkolásával splanchnicotomiát követően.

A vagotomiával és a splanchnicotomiával ellentétben a DLF kétoldali átvágása a gerincvelő C1 szintjén csökkentette az i.v. AMG0347-re adott hipertermiás válasz mértékét, ami arra utal, hogy az abdominális TRPV1 csatornákból származó, hipertermiás választ kiváltó jelek a gerincvelőn keresztül jutnak el az agyhoz. A TRPV1 antagonistákra adott hipertermiás válasz gerincvelői transzmisszióját támasztják alá azok az adatok is, amelyek azt mutatják, hogy intratekális kapszaicin által okozott TRPV1 deszenzitizáción átesett egerekben nem jött létre hipertermia AMG 517 hatására. Számos állatfajban mind a zsigeri, mind pedig a szomatikus fájdalmas és fájdalommentes szignálok a spinothalamicus és spinoparabrachialis idegpályák laterális funiculájában haladnak. Ezek közé tartoznak a törzsből és a végtagokból érkező hőmérsékleti jelek is. A nyaki gerincvelő DLF sérüléseiről kimutatták, hogy macskákban termoszenzoros hiányosságokat eredményez, patkányokban pedig károsítja a hidegkerülő viselkedési válaszokat. Tekintvén, hogy a major splanchnicus ideg kétoldali átmetszése nem befolyásolta az AMG0347-re adott hipertermiás választ, tisztában voltunk azzal, hogy a spinálisan továbbított jelek, amelyek a TRPV1 antagonisták által kiváltott hipertermiát létrehozzák, nem a major splanchnicus idegen keresztül jutnak el a gerincvelőbe. *A priori* a minor, minimus, lumbalis és pelvicus splanchnicus idegek is szerepet játszhatnak, de mindegyikük sokkal kisebb, mint a major splanchnicus ideg, és a hasüreg alsó részén lévő szervek viszonylag kis mennyiségű szövetét innerválják. Továbbá, a splanchnicus idegek közül mind a TRPV1 expresszió szintje, mind pedig a kapszaicin-érzékeny rostok százalékos aránya általában csökken caudalis irányban, a major idegtől a pelvicus idegig haladva.

A fentiek fényében meggyőzőbbnek látszik az a hipotézis, miszerint a keresett szignálok a hasfalat alkotó vázizmok masszív tömegéből szomatikus afferenseken keresztül jutnak el a gerincvelőbe. Ezek a szomatikus afferensek túlnyomórészt metaboszenzitív C-rostok, amelyek felszálló pályái a gerincvelői DLF-ben futnak. Megerőltető testmozgás során az összehúzó vázizmok metabolikus acidózist és hipertermiát okoznak, amelyek aktiválják a TRPV1 csatornákat. Ha a hasfal izmai valóban a TRPV1 antagonisták hipertermiás hatásának támadáspontját képezik, akkor vizsgálatunkban és korábbi vizsgálatokban az RTX alacsony dózisének i.p. beadása által okozott deszenzitizációnak a hasfalra is ki kellett terjednie, annak érdekében, hogy a törzs vázizomzatának TRPV1 csatornát expresszáló afferenseit károsítsa. Ennek kiderítése érdekében megvizsgáltuk, hogy egy kapszaicinnal kiváltott reflex gátolt-e az RTX előkezeléssel deszenzitizált patkányok külső ferde hasizmában. Azt találtuk, hogy kontroll (vehikulummal előkezelt) patkányoknál a kapszaicin lokálisan (hasfalba) történő beadása jelentősen csökkentette a vérátáramlást a külső ferde izomban azáltal, hogy az arteriolák vazokonstriktációját váltotta ki. Az érfali simaizomsejtekben expresszálódó TRPV1 csatornák fontos szerepet játszanak a rezisztenciaerek konstriktációjának létrejöttében, de az érválaszban a perivascularis idegeken, köztük a C-rostokon jelenlévő TRPV1 csatornák is részt vesznek. A vehikulummal előkezelt patkányokkal ellentétben a kapszaicin által kiváltott vérátáramlásbeli csökkenés teljes mértékben hiányzott a kisdózisú i.p. RTX előkezelésen átesett patkányoknál. Ez az eredmény arra utal, hogy az afferens idegek lokalizált hasi deszenzitizációja, amely a TRPV1 antagonisták által indukált hipertermia kialakulását gátolja, kiterjed a hasi vázizmokban lévő TRPV1 csatornákra is. Vizsgálatunk többi eredményével együtt, mindez ahhoz a következtetéshez vezet, hogy a TRPV1 antagonisták valószínűleg a törzs izomzatának TRPV1 csatornáin hatva váltják ki a hipertermiás hatásukat.

Vizsgálatunk további részében azt is igazoltuk, hogy az LPB-ben van egy olyan neuronpopuláció, amely szükséges az i.v. AMG0347-re adott hipertermiás válasz kialakulásához, és hogy az rRPa neuronjai szintén szükségesek az AMG0347 által indukált hipertermiához. Összességében arra következtethetünk, hogy a TRPV1 csatornát expresszáló abdominális afferensek az autonóm hideg elleni védekezést szabályozó agyi idegpályákhoz csatlakoznak. Legvalószínűbbnek az tűnik, hogy a gerincvelő hátsó szarva vagy az LPB az a hely vagy helyek, ahol a TRPV1 csatornát expresszáló afferensek kapcsolódnak a hideg elleni védekezés idegpályáihoz.

A TRPV1 antagonisták hipertermiás hatásmechanizmusával kapcsolatos fenti eredményeinket összegezve, arra következtethetünk, hogy patkányokban ezek a farmakológiai szerek

a törzs vázizomzatát innerváló afferens idegek TRPV1 csatornáira hatnak, és blokkolják e csatornák tónusos (protonok általi) aktivációját, ezáltal felszabadítják a gátlás alól a barnazsír szöveti termogenezist és a bőr vazokonstriktiót. E hatás idegi útvonala a gerincvelői DLF-ben aszcendál és csatlakozik a hideg elleni védekezés LPB-rRPa útvonalához. Ez az idegi útvonal tehát egyfajta acido-antitermogenezis és acido-antivazokonstriktor reflexet alkot. Ezek a reflexek fontos szerepet játszhatnak a T_m szabályozásában fizikai aktivitás során. A megerőltető fizikai aktivitás olyan hipertermiát okoz, amely korlátozza a teljesítményt és halálos lehet, ugyanakkor metabolikus acidózist is okoz, ezáltal fokozza a TRPV1 csatorna protonok általi aktivációját a nagytömegű törzsizmokban, amelyek részt vesznek a légzésben is. A TRPV1 csatorna aktivációjának fokozódása a termogenezis és a bőr vazokonstriktió fokozott gátlásához vezet, így megakadályozza a T_m további emelkedését vagy akár csökkentheti is a T_m -et. Előbbiek révén az acido-antitermogenezis és acido-antivazokonstriktor reflexek ellensúlyozzák a fizikai aktivitással járó hipertermiát. Vizsgálatunk újdonsága és jelentősége a TRPV1 csatorna által közvetített acido-antitermogenezis és acido-antivazokonstriktor reflexek idegi útvonalainak felfedezése.

A TRPV1 antagonisták által indukált hipertermia molekuláris és idegi mechanizmusainak tanulmányozása mellett az is érdekelt, hogy ez a hatás felhasználható lehet-e az altatás során kialakuló hipotermia kivédésére rágcsőknél (repurposing). Azt találtuk, hogy az AMG 517 képes volt visszafordítani az injekcióval vagy inhalációval kiváltott általános anesztézia során kialakuló hipotermiát. Fontos kiemelni, hogy az anyag hatására *per se* hipertermia nem alakult ki az általános anesztézia mellett. Azt is kimutattuk, hogy az altatás által indukált hipotermia ilyen jellegű visszafordítása specifikus a TRPV1 csatorna gátlására, mivel *Trpv1* KO egerekben a hatás nem jött létre. A TRPV1 antagonisták elsősorban valószínűleg a barnazsír szöveti termogenezis fokozása révén fordítják vissza az altatás okozta hipotermiát. Összességében ezek a preklinikai eredmények arra utalnak, hogy a TRPV1 antagonisták hasznosak lehetnek perioperatív fázisban a normotermia fenntartásában.

Érdekes módon az AMG 517 hosszú felezési ideje ellenére az alkalmazott dózisok mellett nem váltott ki hipertermiát az altatás utáni időszakban sem. Amennyiben a hipertermiás hatás hiánya az altatás utáni fázisban embereknél is igazolásra kerül, az nagyban elősegítheti a TRPV1 antagonisták perioperatív időszakban való használatával kapcsolatban felmerülő kétségek eloszlatását. Az altatás által kiváltott hipotermia dinamikája nem mutatott eltérést *Trpv1* KO egerekben WT társaikhoz képest, ami arra utal, hogy nem a TRPV1 csatorna az altatás által kiváltott hipotermia elsődleges támadáspontja. Mindazonáltal az AMG 517 hatása a TRPV1 csatorna jelenlététől függött. Mivel az AMG 517 a patkányok mellett WT egerekben is gátolta az altatás okozta hipotermiát, eredményeink azt mutatják, hogy a TRPV1 antagonisták altatás okozta hipotermiát kivédő hatása nem fajspecifikus. További vizsgálatokra van szükség annak megállapítására, hogy ezek a megfigyelt hatások embereknél is jelentkeznek-e. Az altatás okozta hipotermia klinikai következményei között szerepelhetnek vérzések, posztoperatív miokardiális infarktus és a műtéti terület fertőződése. Fontos lenne megvizsgálni, hogy a normotermia fenntartása TRPV1 antagonistákkal kivédi-e ezeket a komplikációkat. Ezenkívül a TRPV1 antagonisták a szisztémás gyulladás egérmódeljeiben befolyásolják a mortalitást is életkortól függő módon (lásd 5.3.1.1. fejezet), amely arra utal, hogy alkalmazásuk műtétek során további előnyökkel járhat. Tekintvén, hogy a vizsgált anyagot (AMG 517) már engedélyezték és tesztelték humán vizsgálatokban, ez az „újracélzási” (angolban: repurposing) hipotézis relatíve egyszerűen vizsgálható lenne általános anesztézia során embereknél.

A TRPV1 antagonisták hipertermizáló hatásának molekuláris mechanizmusaira vonatkozó patkányokban elért eredményeink emberekre való alkalmazhatóságát illetően fontos volt azt is megvizsgálni, hogy a humán TRPV1 csatorna esetében is a proton aktivációs mód gátlása felelős-e a hatás kialakulásáért. A fentiekben bemutatott „újracélzási” lehetőségen kívül, gyógyszerfejlesztési szempontból talán a legjobb megoldás egy olyan TRPV1 antagonisták megtervezése lenne, amely fájdalomcsillapítóként megfelelő hatékonysággal rendelkezik, de nem okoz semmilyen nem kívánt testhőmérsékleti hatást, azaz hipo- vagy különösen hipertermiát. Tanulmányunk alapján a termális

hatások valószínűleg minimálisak lesznek emberekben azon anyagok esetében, amelyek nem gátolják a humán TRPV1 csatorna protonok és hőmérséklet általi aktivációját, még akkor is, ha ezek az anyagok a csatorna kapszaicin aktivációs módjának potens gátlói. Ha a proton és hőmérséklet általi aktivációt gátló hatáserősség elég alacsony, azonban a kapszaicin módot gátló potenciál kellően magas, akkor egy ilyen anyag jó eséllyel megfelelően hatékony lesz (a humán TRPV1 csatorna vanilloidok általi aktivációjának potens blokkolásával) anélkül, hogy befolyásolná a testhőmérsékletet. Reményteli, hogy több TRPV1 antagonistát szintetizáltak már különböző fokú aktivációs mód-szelektivitással (második generációs antagonisták), és néhányat már embereken is teszteltek.

6.1.2. A TRPM8 ioncsatorna

A TRPM8 csatorna hidegszenzor szerepének vizsgálata során egy szelektív és erős TRPM8 antagonistá fiziológiai hatásainak felderítésével kimutattuk, hogy a T_m függ a bőr TRPM8 csatornáiról érkező hideg szignáloktól. Eredményeink azt sugallják, hogy a TRPM8 csatorna univerzális hidegszenzorként funkcionál a bőrben, olyan értelemben, hogy szabályozza az összes fő hideg elleni védekező mechanizmust (legalábbis rágcsálókban): a hidegkerülő viselkedést, a farokbőr vazokonstriktációját és a barnazsír-szöveti termogenezist. A TRPM8 ilyen univerzális szerepe a bőr afferenseken összhangban van azokkal a termofiziológiai és elektrofiziológiai vizsgálatokkal, amelyek azt mutatták, hogy a bőr legtöbb termoreceptora hidegérzékeny, és hogy a T_b -i szignálok jelentősen hozzájárulnak a legtöbb termoeffektor szabályozásához. Mindezek alapján egy olyan kép körvonalazódik, amely szerint az idegek végződésein és axonjain található TRPM8 csatornák a bőrben sűrű hálózatot alkotnak, amely fájdalomtalan hidegingerekre aktiválódik, így szabályozza több autonóm és viselkedési termoeffektor aktivitását.

Eredményeink azt is bizonyítják, hogy a bőrből érkező hideg szignálok blokkolása TRPM8 antagonistával inaktíválhatja a hideg elleni védekezést és csökkentheti a T_m -et éber állatokban. Beszámoltak arról, hogy egy másik TRPM8 antagonistá szintén hipotermiát okozott egerekben. Mivel a jelen tanulmány azt mutatja, hogy az M8-B-re adott hipotermiás válasz erősen függött a T_k -től, a TRPM8 antagonisták által indukált hipotermia az első példa arra, hogy egy állat T_m -ének változása specifikusan hőmérsékleti szignálok termoreceptorok szintjén való farmakológiai gátlásának eredményeként alakult ki. Megjegyzendő, hogy a TRPV1 antagonisták is befolyásolják a T_m -et (hipo- vagy hipertermiát válthatnak ki), de hatásuk a TRPV1 csatornáknak nem a termális (hanem protonok általi) aktivációjának modulációjából ered (lásd fent). A TRPM8 csatorna kapcsán bemutatott alapelv – a hőérzékelés szelektív farmakológiai modulációja – a jövőben felhasználható lehetne arra, hogy terápiás hipotermiát idézzenek elő altatásban nem részesülő betegeknél, például súlyos traumás agysérülés esetén, ahol hatása előnyös lehet a betegség kimenetele szempontjából. Mindezek alapján egy új tudományág, a termofarmakológia lehet kialakulóban.

6.1.3. A TRPA1 ioncsatorna

A TRPM8 csatorna tanulmányozása mellett azt is szerettem volna tisztázni, hogy a TRPA1 csatorna, amely *in vitro* adatok alapján szintén hideggel (17°C alatt) aktiválható, hozzájárulhat-e a normál testhőmérséklet fenntartásához *in vivo*. Elsőként a TRPA1 csatorna hideg elleni védekezésben betöltött szerepét vizsgáltuk.

Kísérleteinkben KO egerek alkalmazásával kimutattuk, hogy a *Trpa1* deléciója nem befolyásolja sem a T_m hideggel szembeni védelmét, sem pedig az autonóm termoeffektorok hideg általi aktivációját. A hidegexpozíció súlyossága ebben a kísérletben valószínűleg elegendő volt ahhoz, hogy a szervezet bármely pontján mért hőmérsékletet a TRPA1 aktivációs küszöbe alá csökkentse (a $T_m \sim 13^\circ\text{C}$ volt a kísérlet végére). Ez arra utal, hogy egerekben a TRPA1 csatornák nem kontrollálják a hideg elleni védekezés autonóm termoeffektorait. A KO egerekben lehetséges kompenzatórikus folyamatok kizárása érdekében a TRPA1 csatornák gátlását farmakológiai módszerekkel, a Compound 43 és az A967079 antagonisták akut beadásával is elvégeztük genetikailag nem módosított patkányokban. Ezekben a kísérletekben, kimutattuk, hogy sem a Compound 43, sem az A967079 nem befolyásolta a patkányok hidegexpozícióra adott T_m válaszát.

Ez arra utal, hogy a hőszabályozási rendszer nem használ TRPA1 csatornákról származó hőmérsékleti szignálokat, legalábbis patkányokban. Ahhoz, hogy ez a következtetés minél megalapozottabb legyen, módszertanilag több elővigyázatossági lépést is tettünk, amelyek alapján megalapozottnak látszik az a következtetésünk, hogy rágcsálókban a TRPA1 csatorna nem tartozik a termoregulációs rendszer testfelszíni hidegszenzorai közé. Még ha patkányokban vagy egerekben a TRPA1 csatorna aktiválható is hideggel és közvetíti a hideg által indukált fájdalmat, eredményeink alapján akkor sem vesz részt a hőszabályozásban. Ebből a szempontból a TRPA1 csatorna hasonlít a TRPV1 csatornához, amely rendkívül érzékeny a magas hőmérsékletre és az arra adott fájdalomválaszokat közvetíti, de termoszenzorként nem vesz részt a T_m szabályozásban, legalábbis rágcsálókban. A TRPV1 és a TRPA1 koexpresszálódnak a polimodális nociceptorokon, amelyek valószínűleg nem vesznek részt az autonóm és viselkedési termoeffektorokat szabályozó hőmérsékleti szignálok közvetítésében. Összefoglalva, egerekben és patkányokban végzett kísérleteink azt mutatják, hogy a TRPA1 csatornákat vagy nem aktiválja a hideg *in vivo*, vagy olyan sejteken expresszálódnak, amelyek nem csatlakoznak az autonóm termoeffektorokhoz, vagy mindkettő, de eredményeink szerint rágcsálókban a hőszabályozási rendszer nem használja őket termoszenzorként, még súlyos hideghatásnak való kitével során sem.

A TRPA1 csatorna termoregulatórikus hidegszenzor szerepének fentiekben ismertetett elvetése azonban nem zárta ki annak a lehetőségét, hogy ligand agonisták általi aktivációja révén szerepet játszik a testhőmérséklet szabályozásában – hasonlóan, ahogyan azt a TRPV1 csatorna protonok általi aktivációja kapcsán felderítettük. Következő vizsgálatunkban ezek alapján arra kerestem a választ, hogy a TRPA1 csatorna egyik endogén agonistája, a H_2S milyen termoregulatórikus hatásokkal bír.

A H_2S donorok injektálása a laterális agykamrába hipotermiát és hipometabolizmust okozott. Ezek a hatások Na_2S esetében nagyobb dózisoknál kifejezettebbek voltak. Eredményeink összhangban vannak H_2S inhalációja és $NaHS$ beadása esetén kialakuló hipotermiát leíró korábbi közleményekkel, ugyanakkor ellentmondanak más szerzők eredményeinek, amelyek szerint a centrálisan beadott Na_2S -nek nincs jelentős hőszabályozási hatása. Az Na_2S -sel kapott eredmények közötti ellentmondás magyarázata lehet, hogy a korábbi kísérletekben az Na_2S -t alacsony dózisban adták be. Valószínűsíthető, hogy a korábbi vizsgálatokban az Na_2S -t a termoregulatórikus hatások kiváltásához szükséges küszöbérték alatti koncentrációban adták be.

Ezután kimutattuk, hogy a hipotermiás kísérletekhez hasonló módon (1 mg/kg i.c.v.) beadott Na_2S növelte a vér perfúzióját is a törzs bőrében (lumbális háti régióban). Egereknél a törzs nagyobb mértékben járul hozzá a teljes test hőleadásához, mint patkányoknál, és valószínű, hogy egereknél a teljes hővesztés legnagyobb hányada a test törzséből származik. A bőr vazodilatációjának bizonyítása – a csökkent termogenezis mellett – a H_2S által kiváltott hipotermiában arra utal, hogy a H_2S két különböző efferens termoeffektor idegpályára hat, vagy olyan neuronokra, amelyek ezeknek a termoeffektor pályáknak a közös afferens vagy efferens részében helyezkednek el. Kísérleteinkben az Na_2S nagy dózisu (az i.c.v. hatásos dózisonál tízszer nagyobb) szisztémás (i.p.) beadása nem volt hatással a T_m -re, ami a termoregulatórikus hatások centrális (agyban található) kiváltási helyére utal.

Megvizsgáltuk a GYY4137, egy nagyon lassú H_2S felszabaduláshoz vezető donor, hőszabályozási hatását is. Ezt az anyagot többször használták már korábban a H_2S valódi fiziológiai funkcióinak tanulmányozására különböző kísérleti modellekben. A GYY4137 i.c.v. beadása az Na_2S -hez hasonlóan hipotermiát és hipometabolizmust okozott az egerekben. A válasz dinamikája azonban eltérő volt, mivel mind a VO_2 , mind pedig a T_m csökkenése lassabban, de kifejezettebb mértékben alakult ki, mint Na_2S esetében, ami összhangban van a H_2S felszabadulás különböző mértékével.

Végül a H_2S által indukált hipotermia molekuláris célpontját is vizsgáltuk. A H_2S TRPA1 csatornára gyakorolt hatását számos kísérleti modellben igazolták, de ismeretlen volt, hogy a TRPA1 csatorna szerepet játszik-e a H_2S hipotermizáló hatásának kialakulásában. Ennek felderítésére, megvizsgáltuk a H_2S donorokra (Na_2S és GYY4137) adott hőszabályozási választ *Trpa1*^{-/-} egerekben (és WT társaikban). Kimutattuk, hogy a hipotermiás és a hipometabolikus válaszok egyaránt attenuáltak *Trpa1*^{-/-} egerekben a *Trpa1*^{+/+} társaikhoz képest. Ezek az eredmények, ismereteink szerint,

először bizonyítják egyértelműen, hogy a H₂S-t gyorsan és lassan felszabadító donorok által kiváltott hipotermiát a TRPA1 csatorna közvetíti egerekben.

Kísérleteinkben azt is kimutattuk, hogy a hipotermiás válasz a központi idegrendszerből indul ki, ezért figyelmünket a TRPA1 csatorna agyi expressziójára összpontosítottuk. RNAscope segítségével kimutattunk néhány *Trpa1* mRNS transzkriptumot az autonóm termoeffektor pályákban valamennyi vizsgált agyi magban, de meg kell jegyeznünk, hogy az mRNS expresszió nem feltétlenül korrelál a fehérje transzlációs rátával, hiszen az alacsony mRNS expresszió magas fehérjeszinthez is társulhat, amint azt különböző vizsgálatokban kimutatták. Fontos, hogy alacsony mRNS expressziója ellenére a TRPA1 csatornáról úgy gondolják, hogy kritikus élettani funkciókat tölt be különböző szövetekben, tehát a *Trpa1* mRNS alacsony mennyisége ellenére is funkcionális TRPA1 fehérjék lehetnek jelen a neuronokban. Következésképpen lehetséges, hogy a TRPA1 csatorna fehérjeszinten elegendő mértékben expresszálódik ahhoz, hogy közvetítse a H₂S hatását egyenesen a vizsgált hőszabályozással kapcsolatos neuronokból. Nem zárható ki azonban, hogy más agyi struktúrákban található TRPA1 csatornák a H₂S hatásának elsődleges támadáspontjai, amelyek a termoregulátorikus pályák neuronjaihoz futó összeköttetéseiken keresztül modulálják a termoeffektorok aktivitását.

Eredményeink rávilágítanak a centrális TRPA1 csatornák által közvetített H₂S jelátvitel fontosságára a termoregulációban. A szisztémás gyulladás súlyos formáiban (például szeptikus sokk), amelyek gyakran járnak hipotermiával és fokozott H₂S termeléssel, a TRPA1 és a H₂S közötti interakció döntő szerepet játszhat a termoregulátorikus válasz kialakulásában, perspektívaként pedig terápiás célpontként szolgálhat.

6.2. Thermo-TRP ioncsatornák szerepe vazomotor válaszok kialakulásában

Legfőbb új eredményként kimutattuk, hogy a TRPV1 csatornák modulálják a centrális (karotisz) és a perifériás (farokbőr) artériák pH változások által kiváltott vazomotoros válaszait. Míg a neurális struktúrákon található TRPV1 csatornák jelentős szerepet játszanak a bázikus pH indukálta kontrakció korlátozásában, addig a savas pH indukálta relaxációt elsősorban a nem-neurális elemeken található TRPV1 csatornák szabályozzák.

Eredményeinket több szempontból is alátámasztottuk. Először is kimutattuk, hogy a savas és bázikus pH által indukált érrendszeri hatások fokozódnak a *Trpv1*^{-/-} egerek karotisz és farokbőr artériáiban *Trpv1*^{+/+} társaikhoz képest. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy egerekben a TRPV1 csatornák limitáló szerepet játszanak a savra és bázisra adott vazomotoros válaszok szabályozásában. A genotípusok közötti különbség már alacsony sav- és báziskoncentrációknál is szignifikáns volt a karotiszban, de a farokbőr artériában csak a legmagasabb dózisonál, ami arra utal, hogy a TRPV1 csatorna limitáló szerepe dominánsabb centrális (karotisz) artériákban, mint perifériás (farokbőr) artériákban. Második megközelítésünkben farmakológiai gátlást alkalmaztunk a TRPV1 antagonistá, BCTC akut adásával genetikailag nem módosított egerekben. A TRPV1 csatorna farmakológiai blokkolásával kapott eredményeink megerősítették a TRPV1 csatorna limitáló szerepét a pH változások által indukált vazomotoros válaszokban.

Bár a sav-bázis változások érrendszeri hatásait már korábban is vizsgálták, és más tanulmányokban a TRPV1 csatorna savas és bázikus ingerek általi aktivációját is kimutatták, tudomásom szerint előttünk még nem végeztek olyan vizsgálatokat, amelyekben a TRPV1 csatorna szerepét vizsgálták volna a savi és bázikus ingerek különböző értípusokra gyakorolt hatásaiban. A TRPV1 csatorna ismerten szerepet játszik exogén és endogén ligand agonistákra adott vazomotoros válaszok közvetítésében, illetve szerepét kimutatták a hő által kiváltott érrendszeri válaszok közvetítésében is. Előbbieket kiegészítve, mi elsőként bizonyítottuk, hogy a TRPV1 csatorna limitáló szerepet játszik a sav általi vazorelaxáció és a bázis általi vazokonstriktio létrejöttében.

Harmadik megközelítésünkben RTX deszenzitizációt alkalmaztunk az egerekben, amely kezelés elsősorban a neurális elemeken károsítja a TRPV1 csatornák működését, de a nem-neurális struktúrákban lévő TRPV1 csatornákra kevés hatással van. Azt találtuk, hogy az RTX adásával deszenzitizált egerek karotisz és farokbőr artériáiban a bázikus pH indukálta kontrakció fokozódott, de a savi pH indukálta relaxáció nem változott a kontroll egerekhez képest. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy neurális TRPV1 csatornák közvetítik a bázikus ingerek által indukált kontrakció

limitálását, míg a nem-neurális érstruktúrákon lévő TRPV1 csatornák járulnak hozzá a savi ingerek által indukált relaxáció szabályozásához. Tekintettel arra, hogy az acidózis csökkenti, míg az alkalózis fokozza a neuronális ingerlékenységet, a sav-indukálta relaxáció nem-neuronális és a bázis-indukálta kontrakció neuronális struktúrák általi mediációja fiziológiailag is plauzibilis.

Azt, hogy a különböző TRPV1 csatorna populációk aktivációja eltérő érrendszeri válaszokat eredményezhet, korábban már kimutatták ligand agonistákkal. A simaizomsejteken expresszálandó TRPV1 csatornák kapszaicin általi aktivációja vazokonstrikciónak vezetett, míg a neurális TRPV1 csatornáké vazodilatációt okozott egerekben és patkányokban. Hasonló szövetspecifikus különbségeket figyeltünk meg a kapszaicinre adott válaszban a saját vizsgálatunkban is. Karotisz artériákban kapszaicin adása funkcionális TRPV1 csatornák jelenlétében konstriktiót okozott, amelyet nem befolyásolt a neurális TRPV1 RTX általi deszenzitizációja. A karotisz artériákkal ellentétben a farokbőr artériák relaxációval reagáltak kapszaicinre, ami a neurális TRPV1 csatornák RTX előkezeléssel történő károsítása után jelentősen csökkent. Az idegvégződéseken lévő TRPV1 csatornák aktivációja szenzoros neurotranszmitterek (például kalcitonin gén-rokon peptid, SP) felszabadulásához vezet, amelyek stimulálják az endoteliális nitrogén-oxid szintézist, ennek következtében vazorelaxációt okoznak. Meg kell jegyezni, hogy a TRPV1 csatorna az endoteliásejteken is kifejeződik, ahol kapszaicin általi direkt aktivációja vazodilatációt okozhat. A kapszaicin ilyen közvetlen hatása az endoteliális TRPV1 csatornára lehet az oka annak, hogy kísérleteinkben az RTX előkezelésen átesett egerek farokbőr artériáiban némi dilatáció megfigyelhető volt, bár ez jelentősen kisebb mértékű volt, mint vivőanyag előkezelés után.

A savas és bázikus ingerekre adott vazomotor válaszokat a TRPV1 csatorna mindkét vizsgált értípusban limitálta, de korlátozó szerepe jelentősen kifejezettebb volt a karotisz artériákban a farok artériákhoz képest mindhárom kísérleti megközelítésünkben. Ez az eltérés fontos élettani szerepbeli különbségeket tükrözhet, miszerint a létfontosságú szerveket (például az agy) vérrel ellátó erekben a TRPV1 csatorna már kismértékű sav-bázis eltéréseknél kifejti vazomotoros szabályozó funkcióját, ezzel szemben a test perifériáján elhelyezkedő erekben, amelyeknek a szöveti perfúzió biztosításán kívül más funkciójuk is lehet – mint például termoregulatórikus érválaszok a bőr artériáiban – a TRPV1 csatorna csak nagyfokú sav-bázis eltéréseknél kezdi limitálni a vazomotor reakciókat.

A fentiekben ismertetett kísérletek elvégzése során azzal a módszertani akadállyal szembesültünk, hogy az általunk használt miográf rendszer csak korlátozott tartományban alkalmas az érszakaszokat körülvevő vízfürdő hőmérsékletének megváltoztatására, így a termo-TRP csatornák vaszkuláris biológiai szerepének széles hőmérsékleti tartományban, különösen szobahőmérséklet alatti hőmérsékleteken való vizsgálatára. Ezen technikai akadály áthidalása érdekében új hőcserélő lemezeket fejlesztettünk ki 3D nyomtatással, amelynek segítségével a miográf rendszer alkalmas lehet hidegben (akár 13°C-os hőmérsékleten) is a vazomotor válaszok mérésére.

Az újonnan kifejlesztett hőcserélő eszközünk alkalmazását ezután teszteltük patkányok izolált farokbőrének artériáin különböző hőmérsékleten. Bizonyítottuk, hogy az új eszköz sikeresen használható a miográf rendszer tartozékaként a vízfürdő hűtésére és hőmérsékletének állandó szinten tartására. Hidegben is ki tudtuk váltani az artériák konstriktióját, ezzel megerősítve az erek életképességét, valamint a rendszer alkalmasságát a vazomotor válaszok tanulmányozására 13-16°C-on. A KCl 60 mmol/l koncentrációban 36°C-on érzékületet idézett elő, míg 13 és 16°C-on nem volt hatása. A KCl által kiváltott vazokonstriktió hiányát korábban is kimutatták hidegben, de nagyobb emlősökből, például kutyákból és sertésekből izolált arteriolákban. Magyarozatként említhető, hogy bizonyos fajoknál kimutatták a Na⁺/K⁺ ATP pumpa ATP-hez való csökkent affinitását 20°C alatt, ami nátrium felhalmozódásához vezethet a sejteken belül. Ennek következtében a membránpotenciál pozitívabb értékek felé tolódik, ezáltal növelve a sejtek KCl általi depolarizációjához szükséges elektromotoros erőt. Ilyenkor megnövekedett extracelluláris KCl koncentráció elegendő elektromotoros erőt hozhat létre a sejtek depolarizációjához. Kísérleteinkben ezt a hipotézist teszteltük, és azt találtuk, hogy amikor a KCl koncentrációját 60 mM-ról 90 mM-ra emeltük, hidegben is létrejött a KCl által kiváltott vazokonstriktió. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az újonnan

kifejlesztett eszközünk alkalmas lehet a hideg által kiváltott vaszkuláris fiziológiai hatások mechanizmusainak vizsgálatára, beleértve a termo-TRP csatornák lehetséges szerepének feltárását.

Tudomásunk szerint mi vagyunk az elsők, akik beszámoltunk a hideg gátló hatásáról a KCl által kiváltott vazokonstrikcióna izolált patkány farokartériákban. Az ismertett kísérleti elrendezés új, széles körben hozzáférhető és gazdaságos kísérleti módszert jelenthet a hűtés vazomotor válaszokra gyakorolt hatásának tanulmányozására emlőskben.

6.3. Szisztémás gyulladással állapotok termoregulációs, élettani és molekuláris mechanizmusai

6.3.1. Új endogén mediátorok (TRPV1, SP, CCK, PACAP) a szisztémás gyulladás során kialakuló testhőmérsékleti eltérések mechanizmusai

A TRPV1 ioncsatorna termoregulációban betöltött, fentiekben ismertetett, élettani szerepének vizsgálata mellett, kóros körülmények között, azaz szisztémás gyulladással játszott szerepét is vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a TRPV1 csatorna fiatal rágsálókban bizonyított gyulladáscsökkentő szerepe az öregedéssel ellenkezőjére fordul. Míg a farmakológiai vagy genetikai TRPV1 csatorna gátlás csökkenti a túlélési arányt aszeptikus (LPS-indukált) SIRS-ben fiatal egerekben, a TRPV1 blokádnak mindkét típusa ellenkező hatást fejt ki öregedő egerekben. A TRPV1 csatorna gyulladással betöltött szerepének életkorfüggő változását eredményező mechanizmusok részleteikben ugyan még nem ismertek, de a TNF- α szinttel kapcsolatos eredményeink arra utalnak, hogy ez a változás a SIRS patogenezisének kezdeti szakaszában következik be: vagy a TNF- α termelésének szintjén vagy még azt megelőzően. Az LPS-re adott TNF- α válaszról kimutatták, hogy az érzőidegek TRPV1 csatornáinak szuppresszív kontrollja alatt áll. A TNF- α termelés TRPV1 csatornák általi szuppressziójának elvesztése idősebb állatokban a TRPV1 fehérje csökkent transzlációját és a perifériára történő kisebb mértékű transzportját tükrözheti, valószínűleg a ganglionokat érő csökkenő neurotrófikus hatások miatt. A TNF- α termelésében bekövetkező változások központi szerepet játszhatnak a szepszis patobiológiájának öregedéssel összefüggő változásaiban: az idős betegek magasabb TNF- α szintekkel reagálnak fertőzésekre, beleértve a septicus sokkot is, továbbá intenzív osztályon ápolat septicus betegek gyulladással citokinjeinek termelését befolyásolja a TNF- α genetikai polimorfizmusa. A TRPV1 csatorna gyulladáscsökkentő szerepének életkorfüggő proinflammatorikusra változása tehát valószínűleg – legalábbis részben – a TRPV1 csatorna TNF- α termelésre gyakorolt gátló hatásának ellenkezőjére fordulásával magyarázható.

A TRPV1 csatorna szisztémás gyulladással betöltött szerepének tanulmányozásán kívül, azt is tudni szerettem volna, hogy a TRPV1 csatornát expresszáló idegvégződésekből felszabaduló neuroendokrin mediátorok (SP, CCK és PACAP) jelátviteli útvonalai szerepet játszhatnak-e a testhőmérséklet lázszerű emelkedésének kialakulásában.

Közülük, az SP jelátviteli útvonal szerepe régóta ismert volt gyulladással folyamatokban, de az tisztázatlan maradt, hogy az SP–NK1 receptor útvonal hozzájárul-e a szisztémás gyulladáshoz társuló lázválasz kialakulásához. Tanulmányunkban *Tacr1*^{-/-} egerek segítségével elsőként mutattuk ki, hogy az NK1 receptor hiánya az LPS által indukált láz csökkenését eredményezi. Kísérleti modellünk lehetővé tette, hogy a láz kialakulásának elmaradását már a láz korai fázisában (~40 perccel az LPS infúziója után) kimutassuk, ami szintén újdonságnak számít. A molekuláris mechanizmus vizsgálata során, amikor a COX-2 expresszióját fehérjeszinten mértük, azt találtuk, hogy az LPS által kiváltott emelkedés jelentősen mérséklődött a *Tacr1*^{-/-} egerek tüdejében, májukban pedig tendenciózusan alacsonyabb volt a *Tacr1*^{+/+} alomtársaikhoz képest. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az NK1 receptor a COX-2 fehérje expressziójának fokozásán keresztül részt vesz a láz létrejöttében, méghozzá perifériás szervekben, mint a tüdő és a máj.

Korábbi tanulmányokban is beszámoltak az SP jelátvitel és az NK1 receptor részvételéről experimentális lázban. Amikor azonban a szerzők az NK1 receptor szerepét vizsgálták a láz jelátviteli útvonalában, a láz későbbi (azaz legalább 2 órával az LPS infúziót követő) fázisaira koncentráltak, feltehetően azért, mert a korai fázis, a stresszes (tűszúrással járó) gyógyszerinjekció következtében fellépő stressz által indukált hipertermia miatt, hiányzott kísérleteikben. Jelen vizsgálatban a kísérleteket olyan körülmények között végeztük (alapos habituáció, mérsékelt LPS dózis,

stresszmentes anyagadás és közel termoneutrális T_k), amelyek lehetővé tették, hogy az LPS által kiváltott lázas állapotot az infúzió után a 40.-tól a 360. percig vizsgálhassuk egerekben, így a válasz mértékének csökkenését már a 40. percben ki tudtuk mutatni a *Tacr1* gén hiánya esetében.

A láz későbbi fázisaiért főként az agyban zajló fokozott PGE_2 termelés a felelős, és jól ismert, hogy az agyból származó PGE_2 fontos mediátor az LPS által indukált láz fenntartásában. A láz korai (kialakulási) fázisa azonban perifériás szervekből indul ki, például a tüdőből és a májból. Ezért eredményeink arra utalnak, hogy az NK1 receptor genetikai hiánya az LPS által indukált láz korai fázisában a láz jelátviteli útvonalát egy perifériás támadásponton keresztül befolyásolja. Az NK1 receptor lázra kifejtett perifériás támadáspontját támasztottuk alá azon eredményünkkel is, hogy a *Tacr1*^{-/-} egerek ugyanúgy képesek voltak növelni termogenezisüket és T_m -üket PGE_2 i.c.v. beadása esetén, mint WT társaik. Vizsgálatunk második részében annak feltárására összpontosítottunk, hogy a láz jelátviteli útvonalának melyik lépése változik meg a *Tacr1*^{-/-} egerekben. Nem találtunk különbséget a gyulladáscitokin (TNF- α és IL-6) szérumszintjében LPS-sel kezelt *Tacr1*^{+/+} és *Tacr1*^{-/-} egerek között, ami arra utal, hogy a makrofágok aktivációja és citokintermelése nem károsodik NK1 receptor hiányában. Az LPS a gyulladáscitokinektől függetlenül is képes a COX-2 transzkripció és poszt-transzkripció modulációjára a makrofágokban. A COX-2 mRNS expressziójának meghatározásakor azt találtuk, hogy ebben a korai időpontban (~40 perc) az egerek tüdejében és májában, valamint kisebb mértékben az agyban szignifikánsan fokozódott, amely eredmények összhangban vannak a korábbi eredményekkel. A genotípusok közötti különbség hiánya arra utal, hogy a COX-2 transzkripciójának fokozódását nem befolyásolja az NK1 receptor. Meg kell jegyezni azonban, hogy az mRNS és fehérjeszintek korrelációja biológiai mintákban gyakran gyenge, ráadásul a COX-2 expressziója nemcsak a transzkripció, hanem a poszt-transzkripció és a transláció szintjén is szabályozott. Ezért a COX-2 fehérje expresszióját is meghatároztuk az egerek tüdő-, máj- és agyszövetében. A COX-2 fehérje fokozott perifériás expresszióját bizonyító korábbi eredményekkel összhangban, a *Tacr1*^{+/+} egerek tüdejében és májában mi is kimutattuk a COX-2 fehérje expressziójának LPS által kiváltott fokozódását a sóoldatos kezeléshez képest, míg az agyukban nem találtunk szignifikáns növekedést. Lényeges azonban, hogy a COX-2 fehérje expressziójának LPS által kiváltott emelkedése a *Tacr1*^{-/-} egerek tüdejében szignifikánsan, májukban pedig tendenciózusan mérséklődött *Tacr1*^{+/+} alomtársaikhoz képest. A genotípusok közötti eltérő COX-2 fehérje expresszióval összhangban az LPS beadása a *Tacr1*^{+/+} egerek tüdejében jelentős PGE_2 koncentráció emelkedést is okozott, ami a *Tacr1*^{-/-} egereknél hiányzott. A PGE_2 származékok lázat kiváltó hatásontja az organum vasculosum laminae terminalis és az annak környezetében lévő POA a hipotalamuszban. A periférián termelődött PGE_2 könnyedén bejuthat a perivaszkuláris térbe a periventrikuláris szervekben (például az organum vasculosum laminae terminalisban), és ott aktiválhat neuronokat és nem-neurális sejteket egyaránt, így elindítva a lázválasz kialakulását.

Eredményeink révén első alkalommal mutattuk ki, hogy a lázválasz kezdetén az NK1 receptor hozzájárul a COX-2 fehérje expressziójának fokozódásához a perifériás szervekben. Új eredményeink tovább bővítik az SP jelátvitel és a "citokin-COX-2- PGE_2 " tengely közötti kölcsönhatások megértését lázban. Perspektívaként eredményeink elősegíthetik az NK1 receptor azonosítását perifériás COX-2 aktivitást csökkentő gyógyszerek támadáspontjaként.

Az NK1 receptor mellett a CCK jelátvitel lehetséges szerepét is tisztázni szerettem volna a lázválaszban, hiszen ez a neuropeptid szintén felszabadulhat TRPV1 csatornát expresszáló neuronokból és termoregulatórikus hatása is régóta ismert. Tudomásom szerint először mutattuk ki, hogy a CCK i.c.v. beadása következtében kialakuló hipertermia a preoptikus (MPO), a dorzomediális hipotalamusz (DA) és a raphe (rRPa) neuronok aktivitásának változásával jár az autonóm termoeffektorok efferens idegpályáiban. A COX gátlása nem-szelektív és szelektív COX-2 inhibitorokkal csökkentette a centrális CCK ezen neuronális hatásait. Azt is kimutattuk, hogy a CCK₂ receptorok farmakológiai gátlása csökkenti az LPS által kiváltott láz késői fázisát. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a centrális CCK jelátvitel és a COX útvonal közötti kölcsönhatások részt vesznek a CCK által kiváltott hipertermia és az endotoxin által kiváltott láz későbbi fázisaiban. A termoregulatórikus hatásokkal ellentétben a CCK által kiváltott jóllakottságot nem befolyásolta a

COX gátlása, ami azt jelzi, hogy a CCK táplálékfelvételre gyakorolt hatása független a COX útvonaltól. Ebből a szempontból a CCK által kiváltott jóllakottság különbözik az LPS által kiváltott étvágytalanságtól, mivel ez utóbbi a COX aktivációjától függ.

A centrális CCK hipertermizáló hatása már régóta ismert. Az is ismert, hogy a két fő autonóm hideg elleni effektor érinti: a bőr vazokonstriktóját és a nem-didergés termogenezist. A CCK centrálisan indukált hipertermiás hatását a CCK₂ receptor közvetíti. Vizsgálatunkban azt mutattuk ki, hogy a CCK i.c.v. beadása változásokat okozott az MPO, az rRPa és a DA neuronális aktivációjában, amelyek mind jól ismert agyi struktúrák az autonóm termoeffektor válaszok efferens idegpályáiban. A centrálisan beadott CCK csökkentette a c-Fos immunreaktivitást az MPO-ban, de növelte azt a DA-ban és az rRPa-ban. Az MPO-ban GABAerg neuronok találhatóak, amelyek tónusosan elnyomják a barnazsír szövet termogenezisét és a bőr vazokonstriktóját a DA-hoz és rRPa-hoz futó gátló projekciókon keresztül, amelyek a barnazsír szövet, illetve a bőr ereinek szimpatoadrenerg szabályozását befolyásolják. Eredményeink arra utalnak, hogy a CCK csökkenti a GABAerg neuronok aktivitását az MPO-ban, ezáltal feloldja az excitatorikus DA és rRPa neuronok gátlását, ami a szimpatikus aktivitás növekedését eredményezi az autonóm hideg elleni effektorokban. A hipotalamikus neuronális aktivitás CCK által kiváltott változásainak egyik lehetséges magyarázata a CCK hatása magukon a neuronokon expresszált CCK₂ receptorokra, de sokkal valószínűbb, hogy a CCK indirekt módon hat az efferens termoeffektor pályák hipotalamikus neuronjaira.

Korábban megfigyelték, hogy a PGE₁ és a CCK által indukált hipertermia fiziológiai mechanizmusai hasonlóak, de nem állt rendelkezésre információ arról, hogy a CCK részt vesz-e a láz mediálásában. Később a CCK jelátvitel és az arachidonsav kaskád között több kölcsönhatást is felfedeztek. A CCK₂ receptor CCK általi aktiválása különböző sejt kultúrákban arachidonsav termeléshez vezet, és több sejtvonalban kimutatták a COX-2 mRNS és fehérje expressziójának CCK₂ receptor által közvetített növekedését, majd PGE₂ szekrécióját. Tanulmányunkban termofiziológiai és immunhisztokémiai bizonyítékot szolgáltatunk a CCK és a COX út vonal szoros kölcsönhatására. Először is kimutattuk, hogy a centrálisan beadott CCK hipertermiás hatása teljesen megszüntethető a COX enzimek nem-szelektív gátlása révén metamizollal. Ezután kimutattuk, hogy ugyanez a gátlás megakadályozta a c-Fos expresszió CCK által kiváltott változásait is az efferens termoeffektor pályákon belüli neuronokban (azaz az MPO-ban, a DA-ban és az rRPa-ban). Azt is megállapítottuk, hogy a COX-2 szelektív gátlása két különböző inhibitorral (meloxicammal és etoricoxibbal) ugyanolyan mértékben kivédte a CCK által kiváltott hipertermiát, mint a nem-szelektív COX gátlás.

Az alkalmazott 120 mg/kg dózisban a metamizol feltehetően mind a COX-1, mind pedig a COX-2 enzim maximális gátlását kifejtette, mivel emberekben már 14 mg/kg dózisban is 94-97%-os COX gátlást vált ki. A meloxicam és az etoricoxib erősebben gátolja a COX-2-t, mint a COX-1-et: a COX-2 IC₅₀ értéke (a COX-1-hez képest) 2-szer alacsonyabb a meloxicam esetében és 106-szor alacsonyabb az etoricoxib esetében. Az a megállapításunk, hogy ez a két szelektív COX-2 inhibitor a metamizollal azonos módon kivédte a CCK által kiváltott hipertermia kialakulását arra utal, hogy a COX-2 izoforma aktivációja szükséges a CCK-ra adott hipertermiás válasz kialakulásához.

Végül kimutattuk, hogy az YM022, egy szelektív CCK₂ receptor antagonist, i.c.v. beadása csillapította az endotoxin által kiváltott lázat. Adataink alátámasztják és ki is terjesztik a korábbi kutatások következtetéseit. Vizsgálatunkban az YM022-t használtuk, egy rendkívül szelektív és erős CCK₂ antagonistát, amely a CCK₂ receptorok rendkívül hosszán tartó blokkolását okozza; egyszeri adag beadását követően akár hetekig biológiailag hatékony marad. Amikor az YM022-t (0,01 mg/kg) patkányok agyába infundáltuk, a polifázisos LPS láz késői fázisát csillapította, de a korai fázist nem. Eredményeink kiegészítik más kutatók munkáját, akik egy másik CCK₂ antagonistát, az L-365,260-at használták és kimutatták, hogy s.c. beadva ez az antagonist csökkentette az LPS láz első fázisát (ez a hatás megfelel a perifériás beadási módnak), de nem volt hatással a későbbi fázisokra. Meg kell azonban jegyezni, hogy az L-365,260 rövid élettartamú vegyület; orális beadást követően a plazma felezési ideje patkányokban csak néhány perc. Ilyen rövid dinamika mellett nem valószínű, hogy a vegyület befolyásolná a későbbi lázas fázisokat, amelyek néhány órával az LPS beadása után jelentkeznek. Mivel a CCK₂ receptorok gátlása nem csillapítja az i.c.v. PGE-re adott hipertermiás választ, a CCK valószínűleg a PGE termelését modulálja, nem pedig a PGE-nek a receptoraira

gyakorolt hatását. Gyulladásos stimuláció hatására PGE₂-t az agyban különböző sejtípusok termelhetnek, beleértve az endotélsejteket, a perivaszkuláris makrofágokat és mikrogliaikat, az asztrocitákat és a neuronokat. E sejtípusok közül a CCK₂ receptor nagy mértékben expresszálódik az asztrocitákban, amelyek CCK-val történő stimulációja diacilglicerín-lipáz és foszfolipáz A₂ aktiválásán keresztül arachidonsav felszabadulásához vezet. Ez a két enzim a COX-2-mediált PGE₂ szintézisben is részt vesz a szisztémás gyulladásra adott lázas válasz során. Feltételezhető, hogy a COX-2–PGE₂ útvonal a CCK₂ receptor aktivációt követő mediátoraként működik, valószínűleg az asztrocitákban, de talán más sejtípusokban is.

Azt is meg kell említeni, hogy a metamizol a jelen vizsgálatban nem befolyásolta a CCK által kiváltott jóllakottságot és a VMH-ban a neuronális aktivációt. Ez azt jelzi, hogy a hipertermiás hatással ellentétben a CCK jóllakottsági hatása független a COX útvonaltól. A CCK-hoz hasonlóan más anyagok esetében is leírtak egymástól eltérő hatásmechanizmusokat láz és anorexia hátterében, például a vírusfertőzés modellként használt poliinozin:policitidilsav a lázat IL-1-től és PG-től függő mechanizmusokon keresztül váltja ki, de az anorexiát nem ezen a módon. Eredményeink elősegítik a CCK jelátvitel és az agyi COX útvonalak közötti kölcsönhatások megértését, valamint a CCK₂ receptornak, mint a láz farmakológiai támadáspontjának lehetséges azonosítását.

A kapszaicin-érzékeny idegrostokból felszabaduló neuromediátorok termoregulatórikus hatásaira irányuló vizsgálatsorozat utolsó részeként a PACAP hőszabályozási szerepét céloztam karakterizálni. Eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy a PACAP38 hipertermiás hatásában centrális (és nem perifériás) mechanizmusok játszanak szerepet. A PACAP38 által kiváltott hipertermiát korábban már vizsgálták rágcslókban, melyekben a PACAP38-at csak az agyba adták be, és ezzel kifejezett termoregulatórikus válaszokat váltottak ki, ami alapján centrális támadáspontra következtek. Figyelembe véve azonban a hőszabályozó rendszer szerveződését, amely egymástól függetlenül működő termoeffektor hurkokból áll, egy anyagnak a központi idegrendszerbe történő egyetlen injekciójával kapott eredmények értelmezése félrevezető lehet, mivel nem zárható ki, hogy ugyanazon termoregulatórikus idegpályában egy feljebb vagy lejjebb elhelyezkedő perifériás struktúra aktiválása is okozhat azonos vagy hasonló hatást. A kérdés megválaszolására vizsgálatunkban összehasonlítottuk a centrális és a szisztémás adagolás hatásait, és kimutattuk, hogy a PACAP38 azonos vagy akár tízszer kisebb dózisa is kifejezettebb hipertermiát idéz elő, ha i.c.v. adjuk, mint ha i.v. Ez az eredmény egyértelműen a centrális támadáspontú hipotézist bizonyítja. A perifériásan infundált PACAP38-ra kialakuló minimális T_m emelkedés az anyag vér-agy gáton való átjutásának tulajdonítható. Tudomásunk szerint a miénk az első olyan vizsgálat, amelyben a centrális és perifériás PACAP38 beadásra kialakuló hőszabályozási válaszok azonos kísérleti körülmények között kerültek összehasonlításra.

Megvizsgáltuk a PACAP38-ra adott termoregulatórikus válasz karakterisztikáját is, és megállapítottuk, hogy a hipertermia szinte azonnal elkezdett kialakulni: már 10 perccel az anyag beadása után kimutatható volt a termoeffektorok aktiválódása és a T_m emelkedése. Ez is a vizsgálat új eredménye, hiszen a PACAP38 termális hatását elemző valamennyi korábbi tanulmányban óránként regisztrálták a T_m-et, és az anyag beadása (akut injekció miatt) stresszel járt, így a kialakuló stressz-indukált hipertermia elfedte a vizsgálni kívánt válasz korai szakaszát. Megállapítottuk, hogy a PACAP38 a két fő autonóm hideg elleni termoeffektor egyidejű aktiválódását eredményezte. A PACAP termoregulatórikus hatásának dinamikája és termoeffektor mintázata tehát nagymértékben hasonlított a szisztémás gyulladáshoz kapcsolódó lázválasz karakterisztikájához.

Feltételezhető, hogy a PACAP38 hipertermiás hatásának támadáspontja a POA-ban található a nem-dideregéses termogenezis és a bőr vazokonstriktív termoregulatórikus idegpályáinak közös neuronjain, például az MnPO-ban. Ezt a hipotézist alátámasztja, hogy a PAC1 receptor, amelyről kimutatták, hogy részt vesz a PACAP38 hipertermiás hatásának közvetítésében, bőségesen expresszálódik a POA MnPO régiójában, ahol az autonóm hideg elleni termoeffektorokat szabályzó GABAerg neuronok is találhatóak. Figyelembe véve a PACAP termális hatásait és a lázválasz közti fentiekben említett hasonlóságokat, a feltehetően ugyanazon az agyi neuroncsoporton található támadáspont tovább valószínűsíti a PACAP részvételét a szisztémás gyulladást kísérő láz

fenntartásában. Ennek a szerepnek a közvetlen, célzott kísérletekben való bizonyítása további kutatások tárgyát képezi.

Ezek után megvizsgáltuk *Pacap*^{-/-} egerek T_m -ét és lokomotoros aktivitását, és azt találtuk, hogy ezek az egerek az egész nap során hiperaktívabbak, a világos fázisban pedig hipertermiásak is voltak a kontrollokhöz képest. Vizsgálatunk újdonsága, hogy kísérleteinkben a *Pacap*^{-/-} egerek fokozott aktivitása emelkedett T_m -et eredményezett a nap világos fázisában, amely fázisban a lokomotoros aktivitás és a T_m egymással szorosan korrelál. A szabadon mozgó egereknél kapott eredményeinkkel ellentétben mozgásukban részlegesen korlátozott *Pacap*^{-/-} egerek hipometabolikusak voltak és alacsonyabb T_m értékekkel rendelkeztek, mint a kontrollok. A PACAP hiányában tapasztalt csökkent metabolikus ráta és T_m összhangban van a PACAP38 injekció hipermetabolikus és hipertermiás hatásával patkányokban. A POA c-Fos pozitív sejteinek meghatározásakor azt találtuk, hogy a c-Fos pozitív sejtek száma az MPO-ban jelentősen magasabb volt a *Pacap*^{-/-} egerekben, mint a kontrollokban, ami arra utal, hogy a PACAP hiánya az MPO neuronjainak fokozott aktivációját eredményezi. Mivel az MPO GABAerg neuronjai tónusosan gátlás alatt tartják a termogenezist, feltételezzük, hogy a *Pacap*^{-/-} egerekben a gátló MPO neuronok aktivitása felerősödik, ami termogenezisük fokozott szuppresszióját eredményezi. Ez a hipotézis összhangban van a PACAP38 injekció GABAerg MnPO neuronokra javasolt hatásával is (lásd fent), mivel ezen neuronok aktiválása a gátló MPO neuronok fokozott gátlását eredményezi, így emelkedett hőtermeléshez és hipertermiához vezet. Feltételezhető, hogy a PACAP38 hiánya alacsonyabb nyugalmi anyagcserét (és T_m -et) eredményez, és ennek kompenzációjára a *Pacap*^{-/-} egerek hiperkinetikussá válnak a normál (vagy akár magasabb) T_m fenntartása érdekében. Hasonló termoeffektor mintázatot (hipometabolizmus és hiperkinézis) figyeltünk meg a *Trpv1* KO egerekben is (lásd 6.1.1. fejezet). A PACAP és a TRPV1 hiány hasonló termoregulatórikus következményeinek háttérben feltehetően ugyanazon idegi pályák aktivitásának megváltozása állhat, hiszen a kapszaicin-érzékeny (azaz TRPV1 csatornát expresszáló) neuronokból aktivációjuk hatására PACAP38 is felszabadulhat.

6.3.2. A testhőmérsékleti eltérések jelentősége szisztémás gyulladásban humán betegekben

Alapvető vizsgálataim mellett arra is kerestem a választ, hogy a termoreguláció eltéréseinek milyen szerepe lehet szeptikus humán páciensekben.

Klinikai vizsgálatok metaanalízisével nagyszámú (>10000) szeptikus beteg adatai alapján megállapítottuk, hogy a lázas szeptikus betegeknel a becsült halálozási arány ~22% volt, a normotermiás betegeknel magasabb (~31%), míg a hipotermiás betegeknel a legmagasabb (~47%). Amikor összehasonlítottuk az összes szeptikus beteg testhőmérsékleti adatát mortalitási kvartilisekre osztva, azt találtuk, hogy a T_m 1°C-kal magasabb volt a legkisebb (<25%) mortalitású betegcsoportban, mint a legmagasabb halálozási arányú (>75%) betegeknel. Metaanalízisünk eredményei egyértelmű negatív korrelációt mutattak a T_m és a szepszisben bekövetkező halálozás között: a láz kisebb, míg a hipotermia fokozott halálozási rátával jár együtt. Ez az összefüggés azonban nem jelenti automatikusan azt, hogy a láz mindig előnyös, a hipotermia pedig káros szepszisben. A szisztémás gyulladásban kialakuló hőszabályozási eltérések és a kimenetel között az ok-okozati összefüggést analízisünkben nem tudtuk felmérni, és ez külön megbeszélést érdemel.

A láz és a hipotermia a szervezet két különböző védekező stratégiáját jellemzi szisztémás gyulladásban. A fertőzés kezdetén megjelenő, lázzal kísért, korai fázis a korábban egészséges szervezet válaszütemét jelenti a kialakuló betegséggel szemben. Tényezői mind arra irányulnak, hogy harcra szálljanak a fertőző ágenssel szemben. Ez a fajta adaptáció energetikailag megterhelő a szervezet számára, de a fertőzést megelőzően jó állapotú, egészséges betegnel a láz előreláthatóan előnyös. Ezzel szemben a láz előnyös hatását veszélyeztetheti egy már meglévő vagy éppen kialakuló energiahány olyan betegek közepes vagy súlyos mértékű fertőzése esetén, akik különböző (például táplálkozási, kardiovaszkuláris vagy légzőszervi) társbetegségeik miatt csökkent ellenállóképességgel rendelkeznek a külső stresszorokkal szemben. Ilyen helyzetekben a láz előnyös hatása háttérbe szorul, helyette káros következményei érvényesülhetnek.

A szisztémás gyulladás késői fázisában az előbbiekkal szemben a fertőző betegség már előrehaladott. Ilyenkor a beteg szervezet a fertőző ágens legyőzésére használt energiaigényes folyamatok (például láz) helyett, sokkal inkább a meglévő energiaraktárak megőrzésére összpontosít és toleranciára törekszik a fertőző ágens jelenlétével szemben. Súlyos klinikai esetekben (például septicus sokk) a késői fázis válik kezdetektől uralkodóvá, és teljesen felváltja a korai fázisra jellemző képet. Általános szabályként azt mondhatjuk, hogy a hipotermia előnyös válasz, ha a károsodás elég súlyos ahhoz, hogy az energiaraktárak kimerülést okozza vagy elősegítse.

Direkt kísérletekben kimutatták, hogy a spontán hipotermia előnyösebb, mint a láz az aszeptikus (LPS által kiváltott) vagy septicus (*Escherichia coli* által kiváltott) szisztémás gyulladás súlyos formáiban szenvedő patkányokban. Arra is fény derült, hogy a hipotermia túlnyomórészt átmeneti, önkorlátozó és nem végzetes válasz, amely spontán is kialakul septicus betegekben. Minél súlyosabb a patogén terhelés, a fertőzés előtti kórállapot és az aktuális állapot, annál valószínűbb, hogy a hipotermia és annak energiatakarékos hatásai előnyösek a gazdaszervezet számára. Azt is meg kell jegyezni, hogy a sepszis súlyos eseteiben, különösen olyan betegekben, akiknél már korábban is fennállt az energiakészletek kimerülése vagy súlyos társbetegségek, a T_m kritikus szintre csökkenhet, és az extrém hipotermia káros következményei (például szívritmuszavarok, neurológiai zavarok) felülmúlhatják annak biológiai értékét. Perspektivikus megközelítésként a T_m farmakológiai eszközökkel történő kontrollált, célzott modulációjának felhasználását is lehetne vizsgálni szisztémás gyulladásban; például hipo- vagy hipertermizáló TRPV1 antagonistákkal.

6.3.3. A MIF diagnosztikus és prognosztikus biomarker értéke sepszisben humán adatok metaanalízise és prospektív klinikai vizsgálata alapján

A láz és a hipotermia prediktív értékének septicus betegekben való vizsgálata során nyilvánvalóvá vált, hogy a testhőmérséklet, mint élettani paraméter, biomarker szerepén kívül nagy szükség lenne olyan laboratóriumi paraméter felfedezésére is, amely elősegítheti a szisztémás gyulladás klinikai formáinak diagnózisát és kimenetelének előrejelzését. Kollaborációban végzett kutatásainkban (amelyek nem képezik értekezésem alapját) kimutattuk, hogy egy sokoldalú proinflammatorikus citokin, a MIF szerepet játszik a súlyos szisztémás gyulladás során kialakuló hipotermia kialakulásában, hiszen enzimaktivitásának gátlása különböző szerekkel egerekben a T_m csökkenés mértékének jelentős fokozódásához vezetett. Ennek ismeretében megvizsgáltuk a MIF lehetséges biomarker szerepét is sepszisben metaanalízissel, majd egy klinikai tanulmányban.

Az irodalomban rendelkezésre álló adatok metaanalízisével elsőként mutattuk be, hogy a vér MIF szintje hasznos biomarker lehet sepszisben diagnosztikai célokra. Fő új eredményünk, hogy a vér MIF szintje nagyobb mértékben emelkedik sepszisben, mint nem fertőzőes eredetű szisztémás gyulladásban, ami arra utal, hogy a MIF diagnosztikai markerként használható a sepszis és más szisztémás gyulladási betegségek megkülönböztetésére. Feltételezhető, hogy a MIF termelődése erősebben fokozódik, ha a gyulladási reakció kiváltó ágense mikrobiális patogén, mint ha az egy szövetkárosodással összefüggő molekuláris mintázat. Kimutatták ugyanis, hogy az utóbbi és a kórokozóhoz köthető molekuláris mintázat másképp aktiválja az immunrendszert. A patogének erősebb veleszületett immunreakciót váltanak ki, ami a gyulladási citokinek kifejezettebb termelődésével jár. Ezzel összhangban, multiplex traumán átesett betegekben az eleve magas MIF szintek tovább emelkedtek, ha fertőzés alakult ki, tehát a MIF a másodlagos fertőzés markere is lehet.

Metaanalízisünk eredményei alátámasztották a MIF diagnosztikus biomarker szerepét, azonban az elemzett tanulmányok többségében a vér MIF szintjét csak egyszer, egyetlen napon írták le a betegekben, ami nem tette lehetővé, hogy kiértékeljük a vér MIF szintjének időbeli kinetikáját a sepszis előrehaladása során, valamint annak a betegség kimenetelével való összefüggését. Továbbá, a MIF vizeletben mért szintjének sepszisben betöltött prediktív szerepét vizsgáló tanulmányt sem találtunk. Mindezek szükségessé tették egy új, prospektív klinikai vizsgálat elvégzését. Ennek során kimutattuk, hogy a szérumban MIF kinetikája különbözik a sepszist túlélő és a sepszisben elhunyt betegek között. Elsőként számoltunk be arról, hogy a szérumban MIF szintje az intenzív osztályra való felvétel után megemelkedett azoknál, akik sepszis során elhunytak, míg a betegséget túlélőknél a

szint csökkent. Nemek közötti különbséget is megfigyeltünk a szérumban MIF kinetikájában, hiszen a szepszist túlélőknél a csökkenő tendencia csak férfiakban volt jelen. Továbbá kimutattuk, hogy a vizelet MIF szintje értékes prognosztikai markere lehet a halálos kimenetelnek szepszisben, mivel a betegségben elhunytaknál szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a túlélőknél, ugyanakkor egyik csoportban sem mutatott szignifikáns időbeli változást. A vesefunkciók zavarának megléte vagy hiánya nem befolyásolta a vizelet MIF szintjét a szepszisben.

Az eltérő kinetikára vonatkozó új megállapításunk azt jelzi, hogy ugyanazon betegnél végzett ismételt szérumban MIF szint mérések pontosabban előre jelezhetik a kimenetelt, mint az egyszeri mérés. A MIF prognosztikai biomarker értéke ugyanis nem volt kimutatható több olyan korábbi tanulmányban, amelyben csak egyszeri szérumszint mérést végeztek. A szérumban MIF szintjének emelkedése halálos kimenetel esetén feltehetően a betegség progressziójával függ össze. A MIF egy proinflammatorikus citokin, amely alapvetően elősegíti a kórokozó legyőzésére irányuló immunválaszt. Ez magyarázatot adhat arra, hogy miért találtak magasabb szinteket a szepszisben szenvedő betegekben egészséges kontrollokhoz képest több korábbi vizsgálatban. Amikor azonban a kórokozó jelenléte túlzott vagy az antiinflammatorikus reakció kimerül, akkor a proinflammatorikus válasz túlságosan aktiválódhat, ami a gazdaszervezet számára káros lehet. A fokozatosan emelkedő szérumban MIF szint a túlságosan fokozódó proinflammatorikus aktivitás markereként szolgálhat, ami korai figyelmeztető jel lehet az egészségügyi személyzet számára, hogy agresszívabb kezelést kezdeményezzen, mielőtt végzetes következmények alakulnának ki.

A szepszisben szenvedő betegek szérumban MIF szintjének nemek közötti különbsége a nemi hormonok hatásának tudható be. Gyulladás kísérleti modelljeiben az ösztrogén csökkentette a MIF termelését, ezzel összhangban a plazma MIF szintje alacsonyabb volt női, mint férfi egészséges humán alanyokban, de csak az 55 évnél fiatalabb korcsoportban. Vizsgálatunkban a betegek átlagéletkora 66 ± 2 év volt, a legfiatalabb nő 47 éves volt. Feltételezhető, hogy a vizsgálatba bevont nők többsége már posztmenopauzában volt, ezért alacsony ösztrogén szinttel rendelkezett. Ezt alátámasztja, hogy egy korábbi vizsgálatban az ösztrodiol plazmában mért koncentrációja szignifikánsan magasabb volt férfiakban, mint posztmenopauzában lévő nőkben. A posztmenopauzában csökkenő ösztrogén szintek tehát hozzájárulhattak ahhoz, hogy vizsgálatunkban a MIF szintek miért emelkedtek nagyobb mértékben mind a túlélő, mind az elhunyt szepszisben szenvedő nőkben, mint a férfiakban.

A szepszisben elhunytak alacsonyabb vizelet MIF szintje előre nem látott új eredmény volt. A szérumban MIF szintjének emelkedése ellentmondani látszik a szepszisben elhunyt betegek alacsonyabb vizelet MIF szintjének, de ez a MIF gyulladásban betöltött komplex szerepével magyarázható. Az immunsejteken kívül a MIF a vese legtöbb sejtjében is termelődik és alacsony szinten konstitutívan jelen van a veseszövetekben, de expressziója jelentősen fokozódik vesegyulladásban. A vizelet MIF szintje egy korábbi vizsgálatban csak gyenge korrelációt mutatott a szérumban MIF szintjével, ami arra utal, hogy a vizeletben lévő koncentrációját nemcsak a szérumban MIF kiválasztása befolyásolja, hanem renális szintézise is. A MIF szérumban- és vizeletszintjei közötti korreláció hiánya azt is megmagyarázhatja, hogy a magasabb szérumszintek miért nem jártak együtt a vizeletszintek emelkedésével a szepszisben elhunytaknál saját vizsgálatunkban. A renális MIF-ről kimutatták, hogy renoprotektív funkcióval rendelkezik különböző vesebetegségekben, beleértve az akut vesekárosodást is. Mivel vizsgálatunkban a vizelet MIF szintje a szepszist túlélőknél magasabb volt, mint az elhunyt betegekben, feltételezhető, hogy az elhunytakban a renális MIF endogén renoprotektív hatása gyengült, ami a betegség fokozott súlyosságára utal. A renális MIF pontos funkciójának feltárására szepszisben jövőbeni vizsgálatok indokoltak.

7. Legfontosabb új tudományos eredmények

1.1) A *Trpv1* KO egerek egyedi hőszabályozási fenotípussal rendelkeznek, amely magában foglalja a hipometabolizmust, a bőr fokozott vazokonstrikciónak, az alacsonyabb T_k preferenciát és a fokozott lokomotoros aktivitást.

1.2) A TRPV1 agonisták csökkentik, az antagonisták pedig növelik a lokomotoros aktivitást. Az agonisták esetében a lokomócióra gyakorolt hatás az agyon kívüli támadásponton keresztül valósul meg.

1.3) Az életkor előrehaladtával a *Trpv1* KO egerek súlya mindkét nemből nagyobb volt, mint WT társaiké.

1.4) Amikor a *Trpv1* KO egerek öregednek, hipoaktívokká válnak (a WT alomtársaikhoz képest), amely magyarázhatja túlsúlyuk kialakulását.

2.1) A TRPV1 antagonisták A-1165901 *in vivo* hipotermiát okoz rágcsálókban, amely TRPV1 csatornákon keresztül jön létre, és kialakulásában a farokbőr érrendszere és a termogenezis vesz részt.

2.2) Mindkét vizsgált hipotermizáló TRPV1 antagonisták (A-1165901 és AMG7905) gátlás helyett potenciózta a TRPV1 csatorna protonok általi aktivációját *in vitro*, miközben a kapszaicin módot nagymértékben blokkolta.

2.3) Az A-1165901 által kiváltott hipotermia, valamint az AMG 517 és AMG8163 által kiváltott hipertermia nem jelentkezik abdominális TRPV1 deszenzitizációban átesett patkányokban, tehát a TRPV1 antagonisták által indukált hipo- és hipertermiás válaszok ugyanabból a lokalizációból indulnak ki: valahonnan a hasból, feltehetően a hasfali izomzatból.

2.4) A nervus vagus vagy a nervus splanchnicus major kétoldali átmetszése nem befolyásolja a TRPV1 antagonisták által indukált hipertermiát, de a laterális funiculus dorzális részének kétoldali átvágása a gerincvelő C1 szintjén csökkentette annak mértékét.

2.5) A vehikulummal előkezelt patkányokkal ellentétben a kapszaicin által kiváltott vérátáramlásbeli csökkenés a külső ferde izomban teljesen mértékben hiányzott lokalizált hasi TRPV1 deszenzitizációt követően.

2.6) A hideg elleni autonóm termoeffektorokat szabályozó idegpálya agyon belüli legelső (LPB) és legutolsó (rRPa) magjai is szükségesek a TRPV1 antagonistára adott hipertermiás válasz kialakulásához.

2.7) Gyógyszerfejlesztési szempontból a TRPV1 antagonisták mind hiper-, mind pedig hipotermizáló mellékhatása rágcsálókban csökkenthető a TRPV1 csatorna proton aktivációs módjára való hatás minimalizálásával.

2.8) Az AMG 517 képes volt visszafordítani az injekcióval vagy inhalációval kiváltott általános anesztézia során kialakuló hipotermiát rágcsálókban, még hozzá TRPV1 csatornákon keresztül elsősorban a barnazsír-szöveti termogenezis fokozása révén. Mindezt anélkül, hogy hipertermiát váltott volna ki az altatás utáni időszakban, így ez a hatás felhasználható lehet az altatás során kialakuló hipotermia kivédésére (reuposing).

2.9) A rágcsálóktól eltérően, emberekben a TRPV1 antagonisták termális hatásai valószínűleg azon anyagok esetében lesznek minimálisak, amelyek nem gátolják a humán TRPV1 csatorna sem protonok, sem hőmérséklet általi aktivációját, még akkor is, ha ezek az anyagok a csatorna kapszaicin aktivációs módjának potens gátlói.

3) A TRPM8 csatorna univerzális hidegszenzor a bőrben, mert egy szelektív és erős TRPM8 antagonisták fiziológiai hatásainak felderítésével rágcsálókban kimutattuk, hogy szabályozza az összes hideg elleni fő védekező mechanizmust: a hidegkerülő viselkedést, a farokbőr vazokonstrikciónak és a barnazsír-szöveti termogenezist.

4.1) A TRPA1 csatorna genetikai vagy farmakológiai gátlása nem befolyásolja a T_m hideggel szembeni védelmét, sem pedig az autonóm termoeffektorok (farokbőr vazokonstrikciónak és termogenezis) hideg általi aktivációját, tehát a TRPA1 csatornák nem töltenek be termoszenzor szerepet rágcsálók hőszabályozási rendszerében, még súlyos hideghatásnak való kitétel során sem.

4.2) A H₂S-t gyorsan és lassan felszabadító donorok hipotermiát idéznek elő egerekben hipometabolizmus és a bőr vazodilatációja révén, amely hatásokat az agyban – feltehetően az autonóm termoeffektor idegpályák hipotalamikus neuronjain – található TRPA1 csatornák közvetítik. Eredményeink rávilágítanak a centrális TRPA1 csatornák által közvetített H₂S jelátvitel fontosságára a hőszabályozási rendszerben.

5.1) Kimutattuk a TRPV1 csatorna limitáló szerepét savas és bázikus ingerekre adott vazomotor válaszok közvetítésében, ami centrális (karotisz) artériákban kifejezettebb, mint a perifériás (farok) artériákban, jelezvén a vaszkuláris tónus finomabb szabályozását a pH változásokra adott válaszként a létfontosságú szerveket ellátó erekben. Míg a neurális struktúrákon található TRPV1 csatornák jelentős szerepet játszanak a bázikus pH indukálta kontrakció korlátozásában, addig a savas pH indukálta relaxációt elsősorban a nem-neurális elemeken található TRPV1 csatornák szabályozzák.

5.2) 3D nyomtatással hőcserélő eszközt fejlesztettünk ki, amely a miográf készülék kiegészítő tartozékként lehetővé tette, hogy annak kamráit szobahőmérséklet alá hűtsük, és hőmérsékletfüggő különbségeket mutassunk ki patkányok farokartériáinak vazomotor válaszaiban. Bizonyítottuk a hideg gátló hatását a KCl által kiváltott vazokonstriktióban. Mindezek új, széles körben hozzáférhető és gazdaságos kísérleti módszert alkotnak a hűtés vazomotor válaszokra gyakorolt hatásának tanulmányozására emlősökben.

6.1) A TRPV1 csatorna fiatal rágszálókban többszörösen bizonyított gyulladáscsökkentő szerepe az öregedéssel ellenkezőjére fordul. Farmakológiai vagy genetikai TRPV1 csatorna gátlás csökkenti a túlélési arányt aszeptikus szisztémás gyulladásban fiatal egerekben, azonban a TRPV1 blokádnál mindkét típusa ellenkező hatást fejt ki öregedő egerekben. Eredményeink arra utalnak, hogy ez a változás a TNF- α termelésének szintjén vagy még azt megelőzően következik be.

6.2) Az NK1 receptor a COX-2 fehérje expressziójának fokozásán keresztül részt vesz a láz létrejöttében, méghozzá perifériás szervekben, mint a tüdő és a máj. Új eredményeink tovább bővítik az SP jelátvitel és a "citokin-COX-2-PGE₂" tengely közötti kölcsönhatások megértését lázban.

6.3) CCK centrális beadására kialakuló hipertermia COX-2-től függő módon az autonóm termoeffektor efferens idegpályák neuronjainak (MPO, DA és rRPa) aktivitásbeli változásával jár. Az agyi CCK₂ receptorok részt vesznek az LPS által kiváltott láz fenntartásában. Ezek az eredmények elősegítik a CCK jelátvitel és az agyi COX útvonalak közötti kölcsönhatások megértését.

6.4) A PACAP a központi idegrendszeren belüli célpontokra hatva lázszerű hipertermiát okoz a két autonóm hideg elleni effektor egyidejű aktiválásával: a nem-didergéses termogenezis és a bőr vazokonstriktió fokozásával. Az MnPO-n belüli (feltehetően GABAerg) neuronok valószínűleg részt vesznek a PACAP-ra adott hőszabályozási válasz kialakulásában.

6.5) A PACAP hiánya szabadon mozgó *Pacap*^{-/-} egerekben hiperkinézist és nappali hipertermiát eredményez. A hiperkinézis feltehetően kompenzációs mechanizmusa a PACAP hiányában nyugalmi (mozgás nélküli) körülmények között kialakuló hipometabolizmusnak és hipotermiának, amely az MPO-ban elhelyezkedő (feltehetően GABAerg) neuronjaik fokozott aktivitásának lehet az eredménye.

7.1) Humán adatok metaanalízisével kapott eredményeink egyértelmű negatív korrelációt mutattak a T_m és a szepszisben bekövetkező halálozás között: a láz kisebb, míg a hipotermia fokozott halálozási rátával jár együtt.

7.2) Metaanalízis segítségével azt is kimutattuk, hogy a vér kórházba kerüléskor mért MIF szintje hasznos biomarker lehet szepszisben diagnosztikai célokra. A vér MIF szintje magasabb szepszisben, mint nem fertőzések eredetű szisztémás gyulladásban.

7.3) Prospektív klinikai vizsgálatban kimutattuk, hogy a szérumban MIF szintje az intenzív osztályra való felvétel után tovább emelkedett a szepszisben elhunytaknál, míg a túlélőknél a szintje csökkent. Nemek közötti különbséget is megfigyeltünk a szérumban MIF kinetikájában.

7.4) A vizelet MIF szintje a betegségben elhunytaknál vizsgálatunkban szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a túlélőknél, ugyanakkor egyik csoportban sem mutatott szignifikáns időbeli változást. A vesefunkciók zavarának megléte vagy hiánya nem befolyásolta a vizelet MIF szintjét a szepsztikus betegekben.

9. Saját közlemények jegyzéke

A közleményeket minden kategóriában a megjelenési dátum sorrendjében soroltam fel, az értekezésben használt referenciaszámot a közlemény alatt jelöltem. Az impakt faktor (IF) a Clarivate Journal Citation Reports által meghatározott értéket jelenti, a kvartilis (Q) és decimális (D) besorolás a Scimago Journal Ranking szerint történt. A hivatkozások számát a Magyar Tudományos Művek Tárának (MTMT) adatai alapján tüntettem fel. Az ebben és a 10. fejezetben feltüntetett értékek a 2023. november 27-én elérhető adatoknak felelnek meg.

9.1. Az értekezés alapjául szolgáló és ahhoz szorosan kapcsolódó közlemények

9.1.1. Eredeti közlemények

1. **Garami A**, Pákai E, Oliveira DL, Steiner AA, Wanner SP, Almeida MC, Lesnikov VA, Gavva NR and Romanovsky AA (2011) Thermoregulatory phenotype of the Trpv1 knockout mouse: thermoeffector dysbalance with hyperkinesis. *J Neurosci* **31**:1721-1733.
IF: 7,115 Q: D1 Hivatkozások (ebből független): 116 (90) Referenciaszám: 69
2. Wanner SP, **Garami A** and Romanovsky AA (2011) Hyperactive when young, hypoactive and overweight when aged: connecting the dots in the story about locomotor activity, body mass, and aging in Trpv1 knockout mice. *Aging* **3**:450-454.
IF: 5,127 Q: Q1 Hivatkozások (ebből független): 34 (26) Referenciaszám: 162
3. Wanner SP, **Garami A**, Pákai E, Oliveira DL, Gavva NR, Coimbra CC and Romanovsky AA (2012) Aging reverses the role of the transient receptor potential vanilloid-1 channel in systemic inflammation from anti-inflammatory to proinflammatory. *Cell Cycle* **11**:343-349.
IF: 5,321 Q: D1 Hivatkozások (ebből független): 40 (28) Referenciaszám: 171
4. Almeida MC, Hew-Butler T, Soriano RN, Rao S, Wang W, Wang J, Tamayo N, Oliveira DL, Nucci TB, Aryal P, **Garami A**, Bautista D, Gavva NR and Romanovsky AA (2012) Pharmacological blockade of the cold receptor TRPM8 attenuates autonomic and behavioral cold defenses and decreases deep body temperature. *J Neurosci* **32**:2086-2099.
IF: 6,908 Q: D1 Hivatkozások (ebből független): 192 (158) Referenciaszám: 166
5. Bánki E, Pákai E, Gaszner B, Zsiborás C, Czett A, Bhuddi PR, Hashimoto H, Tóth G, Tamás A, Reglődi D and **Garami A** (2014) Characterization of the thermoregulatory response to pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in rodents. *J Mol Neurosci* **54**:543-554.
IF: 2,343 Q: Q1 Hivatkozások (ebből független): 22 (7) Referenciaszám: 174
6. de Oliveira C*, **Garami A***, Lehto SG, Pákai E, Tékus V, Pohóczky K, Youngblood BD, Wang W, Kort ME, Kym PR, Pintér E, Gavva NR and Romanovsky AA (2014) Transient receptor potential channel ankyrin-1 is not a cold sensor for autonomic thermoregulation in rodents. *J Neurosci* **34**:4445-4452. *osztott elsőszerzők
IF: 6,344 Q: D1 Hivatkozások (ebből független): 58 (44) Referenciaszám: 167
7. Ivic I, Solymár M, Pákai E, Rumbus Z, Pintér E, Koller A and **Garami A** (2016) Transient receptor potential vanilloid-1 channels contribute to the regulation of acid- and base-induced vasomotor responses. *J Vasc Res* **53**:279-290.
IF: 1,759 Q: Q2 Hivatkozások (ebből független): 3 (1) Referenciaszám: 169
8. **Garami A***, Ibrahim M*, Gilbraith K, Khanna R, Pákai E, Míkó A, Pintér E, Romanovsky AA, Porreca F and Patwardhan AM (2017) Transient receptor potential vanilloid 1 antagonists prevent anesthesia-induced hypothermia and decrease postincisional opioid dose requirements in rodents. *Anesthesiology* **127**:813-823. *osztott elsőszerzők
IF: 6,523 Q: D1 Hivatkozások (ebből független): 16 (10) Referenciaszám: 165
9. **Garami A**, Pákai E, McDonald HA, Reilly RM, Gomtsyan A, Corrigan JJ, Pintér E, Zhu DXD, Lehto SG, Gavva NR, Kym PR and Romanovsky AA (2018) TRPV1 antagonists that cause hypothermia, instead of hyperthermia, in rodents: compounds' pharmacological profiles, in vivo targets, thermoeffectors recruited and implications for drug development. *Acta Physiol* **223**:e13038.
IF: 5,868 Q: Q1 Hivatkozások (ebből független): 61 (47) Referenciaszám: 163
10. Pákai E, Tékus V, Zsiborás C, Rumbus Z, Oláh E, Kéring P, Khidhir N, Mátics R, Deres L, Ördög K, Szentes N, Pohóczky K, Kemény A, Hegyi P, Pintér E and **Garami A** (2018) The neurokinin-1 receptor contributes to the early phase of lipopolysaccharide-induced fever via stimulation of peripheral cyclooxygenase-2 protein expression in mice. *Front Immunol* **9**:166.
IF: 4,716 Q: Q1 Hivatkozások (ebből független): 14 (8) Referenciaszám: 172
11. Oláh E, Rumbus Z, Kormos V, Tékus V, Pákai E, Wilson HV, Fekete K, Solymár M, Kelava L, Kéring P, Gaszner B, Whiteman M, Keeble J, Pintér E and **Garami A** (2021) The hypothermic effect of hydrogen sulfide is mediated by the transient receptor potential ankyrin-1 channel in mice. *Pharmaceuticals* **14**:992.
IF: 5,215 Q: Q1 Hivatkozások (ebből független): 4 (0) Referenciaszám: 168
12. Kelava L, Ivic I, Pákai E, Fekete K, Maróti P, Told R, Ujfalusi Z and **Garami A** (2022) Stereolithography 3D printing of a heat exchanger for advanced temperature control in wire myography. *Polymers* **14**:471.

- IF: 5,000 Q: Q1 Hivatkozások (ebből független): 3 (3) Referenciaszám: 170
13. Kéring P, Füredi N, Gaszner B, Mikó A, Pákai E, Fekete K, Oláh E, Kelava L, Romanovsky AA, Rumbus Z and **Garami A** (2022) The hyperthermic effect of central cholecystokinin is mediated by the cyclooxygenase-2 pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **322**:E10-23.
IF: 5,100 Q: Q1 Hivatkozások (ebből független): 2 (2) Referenciaszám: 173
14. **Garami A**, Steiner AA, Pákai E, Wanner SP, Almeida MC, Kéring P, Oliveira DL, Nakamura K, Morrison SF and Romanovsky AA (2023) The neural pathway of the hyperthermic response to antagonists of the transient receptor potential vanilloid-1 channel. *Temperature* **10**:136-154.
IF: - Q: Q1 Hivatkozások (ebből független): 3 (1) Referenciaszám: 164
15. Toldi J, Kelava L, Márton S, Mühl D, Kustán P, Fehér Z, Maár K, Garai J, Pákai E and **Garami A** (2023) Distinct patterns of serum and urine macrophage migration inhibitory factor kinetics predict death in sepsis: a prospective, observational clinical study. *Sci Rep* **13**:588.
IF: 4,600 Q: D1 Hivatkozások (ebből független): 1 (1) Referenciaszám: 175

9.1.2. Metaanalízisek

16. Rumbus Z, Mátics R, Hegyi P, Zsiborás C, Szabó I, Illés A, Pétervári E, Balaskó M, Márta K, Mikó A, Párniczky A, Tenk J, Rostás I, Solymár M and **Garami A** (2017) Fever is associated with reduced, hypothermia with increased mortality in septic patients: a meta-analysis of clinical trials. *PLoS One* **12**:e0170152.
IF: 2,766 Q: Q1 Hivatkozások (ebből független): 94 (84) Referenciaszám: 160
17. **Garami A**, Shimansky YP, Rumbus Z, Vizin RCL, Farkas N, Hegyi J, Szakács Z, Solymár M, Csenkey A, Chiche DA, Kapil R, Kyle DJ, Van Horn WD, Hegyi P and Romanovsky AA (2020) Hyperthermia induced by transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) antagonists in human clinical trials: insights from mathematical modeling and meta-analysis. *Pharmacol Ther* **208**:107474.
IF: 12,310 Q: D1 Hivatkozások (ebből független): 69 (64) Referenciaszám: 31
18. Toldi J, Németh D, Hegyi P, Molnár Z, Solymár M, Farkas N, Alizadeh H, Rumbus Z, Pákai E and **Garami A** (2021) Macrophage migration inhibitory factor as a diagnostic and predictive biomarker in sepsis: meta-analysis of clinical trials. *Sci Rep* **11**:8051.
IF: 4,997 Q: D1 Hivatkozások (ebből független): 9 (8) Referenciaszám: 161

9.1.3. Összefoglaló közlemények

19. Garai J, Kanizsai P, Rumbus Z, Toldi J and **Garami A** (2017) Az akut szisztémás gyulladás kórélettana az alaputatásoktól a klinikai vonatkozásig. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia* **47**:5-21.
IF: - Q: - Hivatkozások (ebből független): - Referenciaszám: 121
20. **Garami A** (2018) A komplex energetikai egyensúly kísérletes vizsgálata. *Lege Artis Medicinae* **28**:541-547.
IF: - Q: Q3 Hivatkozások (ebből független): - Referenciaszám: 1

9.1.4. Szerkesztői hozzászólások és egyéb tudományos közlemények

21. Romanovsky AA and **Garami A** (2010) Prostaglandin riddles in energy metabolism: E is for excess, D is for depletion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **298**:R1509-1511.
IF: - Q: - Hivatkozások (ebből független): 6 (5) Referenciaszám: 134
22. **Garami A** and Székely M (2014) Body temperature: its regulation in framework of energy balance. *Temperature* **1**:28-29.
IF: - Q: - Hivatkozások (ebből független): 13 (8) Referenciaszám: 2
23. Armbruszt S and **Garami A** (2014) The short- and long-term effects of food intake on thermogenesis. *Temperature* **1**:96.
IF: - Q: - Hivatkozások (ebből független): 5 (3) Referenciaszám: 7
24. **Garami A** and Romanovsky AA (2015) The transient receptor potential vanilloid-4 channel: detecting body temperatures that drive defences against mild warmth. *Acta Physiol* **214**:154-156.
IF: - Q: - Hivatkozások (ebből független): 1 (1) Referenciaszám: 14
25. Székely M, Carletto L and **Garami A** (2015) The pathophysiology of heat exposure. *Temperature* **2**:452.
IF: - Q: - Hivatkozások (ebből független): 33 (30) Referenciaszám: 3
26. Rumbus Z and **Garami A** (2019) Fever, hypothermia, and mortality in sepsis. *Temperature* **6**:101-103.
IF: - Q: - Hivatkozások (ebből független): - Referenciaszám: 430
27. Pintér E, **Garami A** and Szállási Á (2023) From capsaicin to TRPV1: the “hot” legacy of János Szolcsányi. *Temperature* **10**:1-2.
IF: - Q: - Hivatkozások (ebből független): - Referenciaszám: 16

9.1.5. Könyvfejezetek

28. **Garami A**, Pákai E, Rumbus Z and Solymár M (2016) The role of PACAP in the regulation of body temperature. In *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP* (D Reglödi and A Tamás eds) 239-257, Springer International Publishing, Cham.
IF: - Q: - Hivatkozások (ebből független): 5 (4) Referenciaszám: 426

29. **Garami A**, Steiner AA and Romanovsky AA (2018) Fever and hypothermia in systemic inflammation. In *Thermoregulation: From Basic Neuroscience to Clinical Neurology, Part II* (AA Romanovsky ed) *Handb Clin Neurol* **157**:565-597, Elsevier, Amsterdam.
IF: - Q: - Hivatkozások (ebből független): 81 (72) Referenciaszám: 128

9.2. A Ph.D. fokozat megszerzését követő időszak egyéb közleményei

9.2.1. Eredeti közlemények

30. Pétervári E, Szabad AO, Soós S, **Garami A**, Székely M and Balaskó M (2011) Central alpha-MSH infusion in rats: disparate anorexic vs. metabolic changes with aging. *Regul Pept* **166**:105-111.
31. Pákai E, **Garami A**, Nucci TB, Ivanov AI and Romanovsky AA (2015) Hyperbilirubinemia exaggerates endotoxin-induced hypothermia. *Cell Cycle* **14**:1260-1267.
32. Pohóczky K, Kun J, Szalontai B, Szőke É, Sággy É, Payrits M, Kajtár B, Kovács K, Környei JL, Garai J, **Garami A**, Perkecz A, Czeglédi L and Helyes Z (2016) Estrogen-dependent up-regulation of TRPA1 and TRPV1 receptor proteins in the rat endometrium. *J Mol Endocrinol* **56**:135-149.
33. Pozsgai G, Payrits M, Sággy E, Sebestyén-Báti R, Steen E, Szőke E, Sándor Z, Solymár M, **Garami A**, Orvos P, Tálosi L, Helyes Z and Pintér E (2017) Analgesic effect of dimethyl trisulfide in mice is mediated by TRPA1 and sst4 receptors. *Nitric Oxide* **65**:10-21.
34. Józsa G, Vajda P, **Garami A**, Csenkey A and Juhász Z (2018) Treatment of partial thickness hand burn injuries in children with combination of silver foam dressing and zinc-hyaluronic gel. *Medicine* **97**:e9991.
35. Rumbus Z, Tóth E, Pótó L, Vincze A, Veres G, Czakó L, Oláh E, Márta K, Mikó A, Rakonczay Z, Balla Z, Kaszaki J, Földesi I, Maléth J, Hegyi P and **Garami A** (2018) Bidirectional relationship between reduced blood pH and acute pancreatitis: a translational study of their noxious combination. *Front Physiol* **9**:1360.
36. Garai J, Krekó M, Örfi L, Jakus PB, Rumbus Z, Kéringer P, **Garami A**, Vámos E, Kovács D, Bagóné Vántus V, Radnai B and Lóránd T (2021) Tetralone derivatives are MIF tautomerase inhibitors and attenuate macrophage activation and amplify the hypothermic response in endotoxemic mice. *J Enzyme Inhib Med Chem* **36**:1357-1369.
37. Horváth ÁI, Szentés N, Tékus V, Payrits M, Szőke É, Oláh E, **Garami A**, Fliszár-Nyúl E, Poór M, Sár C, Kálai T, Pál S, Percze K, Scholz ÉN, Mészáros T, Tóth B, Mátyus P and Helyes Z (2021) Proof-of-concept for the analgesic effect and thermoregulatory safety of orally administered multi-target compound szv 1287 in mice: a novel drug candidate for neuropathic pain. *Biomedicines* **9**:749.
38. Lőrincz A, Lamberti AG, Juhász Z, **Garami A** and Józsa G (2021) Pediatric deep burn management after split-thickness autologous skin transplantation: a comparative study. *Medicine* **100**:e27633.
39. Lőrincz A, Lamberti AG, Juhász Z, **Garami A** and Józsa G (2022) Management of pediatric facial burns with zinc-hyaluronan gel. *Children* **9**:976.
40. Csenkey A, Hargitai E, Pákai E, Kajtár B, Vida L, Lőrincz A, Gergics M, Vajda P, Józsa G and **Garami A** (2022) Effectiveness of four topical treatment methods in a rat model of superficial partial-thickness burn injury: the advantages of combining zinc-hyaluronan gel with silver foam dressing. *Injury* **53**:3912-3919.
41. Fekete K, Merkel Z, Pákai E, Vereczkei Z and **Garami A** (2022) Az újszülöttkori kihülés jelentősége és kísérletes modellezése. *Egészség-Akadémia* **13**:113-118.
42. Lőrincz A, Csákvári Zs, Máthé T, Oberitter Zs, **Garami A**, Józsa G (2022). Gyermekkori, áramégés okozta kézujszerűlések ellátásáról és késői szövődményeiről. *Orvosi Hetilap* **163**:564-568.
43. Garai J, Radnai B, Vámos E, Kovács D, Vántus VB, Rumbus Z, Pákai E, **Garami A**, Gulyás-Fekete G, Agócs A, Krekó M, Zaman K, Prókai L, Örfi L, Jakus PB and Lóránd T (2023) Synthesis and evaluation of a new class of MIF-inhibitors in activated macrophage cells and in experimental septic shock in mice. *Eur J Med Chem* **247**:115050.
44. Shin JJ, Fan W, Par-Young J, Piecychna M, Leng L, Israni-Winger K, Qing H, Gu J, Zhao H, Schulz WL, Unlu S, Kuster J, Young G, Liu J, Ko AI, Baeza Garcia A, Sauler M, Wisnewski AV, Young L, Orduña A, Wang A, Ocskay K, Garcia-Blesa A, Hegyi P, Armstrong ME, Mitchell PD, Bernardo D, **Garami A**, Kang I and Bucala R (2023) MIF is a common genetic determinant of COVID-19 symptomatic infection and severity. *QJM* **116**:205-212.
45. Válik A, Harangozó K, **Garami A**, Juhász Z, Józsa G and Lőrincz A (2023) Mid-term follow-up study of children undergoing autologous skin transplantation for burns. *Life* **13**:762.

9.2.2. Metaanalízisek

46. Tenk J, Mátrai P, Hegyi P, Rostás I, **Garami A**, Szabó I, Solymár M, Pétervári E, Czimmer J, Márta K, Mikó A, Füredi N, Párniczky A, Zsiborás C and Balaskó M (2016) In obesity, HPA axis activity does not increase with BMI, but declines with aging: a meta-analysis of clinical studies. *PLoS One* **11**:e0166842.
47. Illés A, Farkas N, Hegyi P, **Garami A**, Szabó I, Solymár M, Pétervári E, Balaskó M, Pár G, Sarlós P, Bajor J, Szűcs Á, Czimmer J, Szemes K and Vincze Á (2017) Is heller myotomy better than balloon dilation? A meta-analysis. *J Gastrointestin Liver Dis* **26**:121-127.

48. Pécsi D, Farkas N, Hegyi P, Balaskó M, Czimmer J, **Garami A**, Illés A, Mosztbacher D, Pár G, Párniczky A, Sarlós P, Szabó I, Szemes K, Szűcs Á and Vincze Á (2017) Transpancreatic sphincterotomy has a higher cannulation success rate than needle-knife precut papillotomy - A meta-analysis. *Endoscopy* **49**:874-887.
49. Rostás I, Póto L, Mátrai P, Hegyi P, Tenk J, **Garami A**, Illés A, Solymár M, Pétervári E, Szűcs Á, Párniczky A, Pécsi D, Rumbus Z, Zsiborás C, Füredi N and Balaskó M (2017) In middle-aged and old obese patients, training intervention reduces leptin level: a meta-analysis. *PLoS One* **12**:e0182801.
50. Szabó IL, Mátics R, Hegyi P, **Garami A**, Illés A, Sarlós P, Bajor J, Szűcs Á, Mosztbacher D, Márta K, Szemes K, Csekő K, Kóvári B, Rumbus Z and Vincze Á (2017) PPIs prevent aspirin-induced gastrointestinal bleeding better than H2RAs. A systematic review and meta-analysis. *J Gastrointestin Liver Dis* **26**:395-402.
51. Varjú P, Farkas N, Hegyi P, **Garami A**, Szabó I, Illés A, Solymár M, Vincze Á, Balaskó M, Pár G, Bajor J, Szűcs Á, Huszár O, Pécsi D and Czimmer J (2017) Low fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides and polyols (FODMAP) diet improves symptoms in adults suffering from irritable bowel syndrome (IBS) compared to standard IBS diet: a meta-analysis of clinical studies. *PLoS One* **12**:e0182942.
52. Cazacu IM, Farkas N, **Garami A**, Balaskó M, Mosdósi B, Alizadeh H, Gyöngyi Z, Rakonczay Z, Vigh É, Habon T, Czopf L, Lazarescu MA, Eröss B, Sahin-Tóth M and Hegyi P (2018) Pancreatitis-associated genes and pancreatic cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Pancreas* **47**:1078-1086.
53. Eröss B, Farkas N, Vincze Á, Tinusz B, Szapáry L, **Garami A**, Balaskó M, Sarlós P, Czopf L, Alizadeh H, Rakonczay Z, Habon T and Hegyi P (2018) Helicobacter pylori infection reduces the risk of Barrett's esophagus: a meta-analysis and systematic review. *Helicobacter* **23**:e12504.
54. Kiss Z, Tél B, Farkas N, **Garami A**, Vincze Á, Bajor J, Sarlós P, Márta K, Erős A, Mikó A, Szakács Z, Pécsi D, Mátrai P, Hegyi P and Veres G (2018) Eosinophil counts in the small intestine and colon of children without apparent gastrointestinal disease: a meta-analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **67**:6-12.
55. Mikó A, Farkas N, **Garami A**, Szabó I, Vincze Á, Veres G, Bajor J, Alizadeh H, Rakonczay Z, Vigh É, Márta K, Kiss Z, Hegyi P and Czákó L (2018) Preexisting diabetes elevates risk of local and systemic complications in acute pancreatitis: systematic review and meta-analysis. *Pancreas* **47**:917-923.
56. Mikó A, Póto L, Mátrai P, Hegyi P, Füredi N, **Garami A**, Illés A, Solymár M, Vincze Á, Balaskó M, Pár G, Sarlós P, Bajor J, Tenk J, Rostás I and Pétervári E (2018) Gender difference in the effects of interleukin-6 on grip strength - A systematic review and meta-analysis. *BMC Geriatrics* **18**:107.
57. Oláh E, Póto L, Hegyi P, Szabó I, Hartmann P, Solymár M, Pétervári E, Balaskó M, Habon T, Rumbus Z, Tenk J, Rostás I, Weinberg J, Romanovsky AA and **Garami A** (2018) Therapeutic whole-body hypothermia reduces death in severe traumatic brain injury if the cooling index is sufficiently high: meta-analyses of the effect of single cooling parameters and their integrated measure. *J Neurotrauma* **35**:2407-2417.
58. Sarlós P, Szemes K, Hegyi P, **Garami A**, Szabó I, Illés A, Solymár M, Pétervári E, Vincze Á, Pár G, Bajor J, Czimmer J, Huszár O, Varjú P and Farkas N (2018) Steroid but not biological therapy elevates the risk of venous thromboembolic events in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *J Crohns Colitis* **12**:489-498.
59. Solymár M, Ivic I, Póto L, Hegyi P, **Garami A**, Hartmann P, Pétervári E, Czopf L, Hussain A, Gyöngyi Z, Sarlós P, Simon M, Mátrai P, Bérczi B and Balaskó M (2018) Metformin induces significant reduction of body weight, total cholesterol and LDL levels in the elderly – A meta-analysis. *PLoS One* **13**:e0207947.
60. Szilágyi ÁL, Mátrai P, Hegyi P, Tuboly E, Pécz D, **Garami A**, Solymár M, Pétervári E, Balaskó M, Veres G, Czopf L, Wobbe B, Szabó D, Wagner J and Hartmann P (2018) Compared efficacy of preservation solutions on the outcome of liver transplantation: meta-analysis. *World J Gastroenterol* **24**:1812-1824.
61. Tenk J, Mátrai P, Hegyi P, Rostás I, **Garami A**, Szabó I, Hartmann P, Pétervári E, Czopf L, Hussain A, Simon M, Szujó S and Balaskó M (2018) Perceived stress correlates with visceral obesity and lipid parameters of the metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* **95**:63-73.
62. Zsiborás C, Mátics R, Hegyi P, Balaskó M, Pétervári E, Szabó I, Sarlós P, Mikó A, Tenk J, Rostás I, Pécsi D, **Garami A**, Rumbus Z, Huszár O and Solymár M (2018) Capsaicin and capsiate could be appropriate agents for treatment of obesity: a meta-analysis of human studies. *Crit Rev Food Sci Nutr* **58**:1419-1427.
63. Csenkey A, Józsa G, Gede N, Pákai E, Tinusz B, Rumbus Z, Lukács A, Gyöngyi Z, Hamar P, Sepp R, Romanovsky AA, Hegyi P, Vajda P and **Garami A** (2019) Systemic antibiotic prophylaxis does not affect infectious complications in pediatric burn injury: a meta-analysis. *PLoS One* **14**:e0223063.
64. Mikó A, Vigh É, Mátrai P, Soós A, **Garami A**, Balaskó M, Czákó L, Mosdósi B, Sarlós P, Eröss B, Tenk J, Rostás I and Hegyi P (2019) Computed tomography severity index vs. other indices in the prediction of severity and mortality in acute pancreatitis: a predictive accuracy meta-analysis. *Front Physiol* **10**:1002.
65. Varjú P, Gede N, Szakács Z, Hegyi P, Cazacu IM, Pécsi D, Fábíán A, Szepes Z, Vincze Á, Tenk J, Balaskó M, Rumbus Z, **Garami A**, Csopor D and Czimmer J (2019) Lactose intolerance but not lactose maldigestion is more frequent in patients with irritable bowel syndrome than in healthy controls: a meta-analysis. *Neurogastroenterol Motil* **31**:e13527.
66. Eitmann S, Németh D, Hegyi P, Szakács Z, **Garami A**, Balaskó M, Solymár M, Eröss B, Kovács E and Pétervári E (2020) Maternal overnutrition impairs offspring's insulin sensitivity: a systematic review and meta-analysis. *Matern Child Nutr* **16**:e13031.
67. Kéring P, Farkas N, Gede N, Hegyi P, Rumbus Z, Lohinai Z, Solymár M, Ruksakiet K, Varga G and **Garami A** (2020) Menthol can be safely applied to improve thermal perception during physical exercise: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Sci Rep* **10**:13636.

68. Kocsis T, Molnár B, Németh D, Hegyi P, Szakács Z, Bálint A, **Garami A**, Soós A, Márta K and Solymár M (2020) Probiotics have beneficial metabolic effects in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Sci Rep* **10**:11787.
69. Ottóffy M, Mátrai P, Farkas N, Hegyi P, Czopf L, Márta K, **Garami A**, Balaskó M, Pótóné-Oláh E, Mikó A, Rostás I, Wobbe B and Habon T (2020) Uninterrupted or minimally interrupted direct oral anticoagulant therapy is a safe alternative to vitamin k antagonists in patients undergoing catheter ablation for atrial fibrillation: an updated meta-analysis. *J Clin Med* **9**:1-13.
70. Ruksakiet K, Hanák L, Farkas N, Hegyi P, Sadaeng W, Czumbel LM, Sang-ngoen T, **Garami A**, Mikó A, Varga G and Lohinai Z (2020) Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and sodium hypochlorite in root canal disinfection: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Endod* **46**:1032-1041.e1037.
71. Szebényi J, Gede N, Hegyi P, Szakács Z, Solymár M, Eröss B, **Garami A**, Farkas K, Csupor D and Gyulai R (2020) Efficacy of biologics targeting tumour necrosis factor-alpha, interleukin-17-12/23,-23 and small molecules targeting jak and pde4 in the treatment of nail psoriasis: A network meta-analysis. *Acta Derm Venereol* **100**:1-7.
72. Tél B, Stubnya B, Gede N, Varjú P, Kiss Z, Márta K, Hegyi PJ, **Garami A**, Hegyi E, Szakács Z, Hegyi P and Veres G (2020) Inflammatory bowel diseases elevate the risk of developing acute pancreatitis: a meta-analysis. *Pancreas* **49**:1174-1181.
73. Oláh E, Pótó L, Rumbus Z, Pákai E, Romanovsky AA, Hegyi P and **Garami A** (2021) POLAR study revisited: therapeutic hypothermia in severe brain trauma should not be abandoned. *J Neurotrauma* **38**:2772-2776.
74. Pázmány P, Soós A, Hegyi P, Dohos D, Kiss S, Szakács Z, Párniczky A, **Garami A**, Péterfi Z and Molnár Z (2021) Inflammatory biomarkers are inaccurate indicators of bacterial infection on admission in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease—A systematic review and diagnostic accuracy network meta-analysis. *Front Med* **8**:639794.
75. Wobbe B, Wagner J, Szabó DK, Rostás I, Farkas N, **Garami A**, Balaskó M, Hartmann P, Solymár M, Tenk J, Ottóffy M, Nagy A, Habon T, Hegyi P and Czopf L (2021) Ultrafiltration is better than diuretic therapy for volume-overloaded acute heart failure patients: a meta-analysis. *Heart Fail Rev* **26**:577-585.
76. Kelava L, Németh D, Hegyi P, Kéringer P, Kovács DK, Balaskó M, Solymár M, Pákai E, Rumbus Z and **Garami A** (2022) Dietary supplementation of transient receptor potential vanilloid-1 channel agonists reduces serum total cholesterol level: a meta-analysis of controlled human trials. *Crit Rev Food Sci Nutr* **62**:7025-7035.
77. Kovács DK, Gede N, Szabó L, Hegyi P, Szakács Z, Faludi B, Sebők Á, **Garami A**, Solymár M, Kósa D, Hanák L, Rumbus Z and Balaskó M (2022) Weight reduction added to CPAP decreases blood pressure and triglyceride level in OSA: systematic review and meta-analysis. *Clin Transl Sci* **15**:1238-1248.
78. Lantos K, Dömötör ZR, Farkas N, Kiss S, Szakács Z, **Garami A**, Varga G, Lujber L, Kanaan R, Hegyi P, Fehér G and Gaál V (2022) Efficacy of treatments in nonarteritic ischemic optic neuropathy: a systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health* **19**:2718.
79. Lőrincz A, Váradi A, Hegyi P, Rumbus Z, Tuba M, Lamberti AG, Varjú-Solymár M, Párniczky A, Eröss B, **Garami A** and Józsa G (2022) Paediatric partial-thickness burn therapy: a meta-analysis and systematic review of randomised controlled trials. *Life* **12**:619.
80. Ruzsics I, Mátrai P, Hegyi P, Németh D, Tenk J, Csenkey A, Eröss B, Varga G, Balaskó M, Pétervári E, Veres G, Sepp R, Rakonczay Z, Vincze A, **Garami A** and Rumbus Z (2022) Noninvasive ventilation improves the outcome in patients with pneumonia-associated respiratory failure: systematic review and meta-analysis. *J Infect Public Health* **15**:349-359.
81. Bakó E, Fehérvári P, **Garami A**, Dembrovszky F, Gunther EE, Hegyi P, Csupor D and Böszörményi A (2023) Efficacy of topical essential oils in musculoskeletal disorders: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmaceuticals* **16**:144.
82. Bálint A, Hanák L, Hegyi P, Szakács Z, Eitmann S, **Garami A**, Solymár M, Márta K, Rumbus Z and Komócsi A (2023) Increased risk of adverse events in patients with low-on clopidogrel platelet reactivity after percutaneous coronary intervention: A systematic review and meta-analysis. *Cardiol J* **30**:391-400.

9.2.3. Összefoglaló közlemények

83. Hegyi P, Petersen OH, Holgate S, Eröss B, **Garami A**, Szakács Z, Dobszai D, Balaskó M, Kemény L, Peng S, Monteiro J, Varró A, Lamont T, Laurence J, Gray Z, Pickles A, Fitzgerald GA, Griffiths CEM, Jassem J, Rusakov DA, Verkhatsky A and Szentesi A (2020) Academia Europaea position paper on translational medicine: the cycle model for translating scientific results into community benefits. *J Clin Med* **9**:1532.
84. **Garami A** and Hegyi P (2023) Precision medicine in pancreatitis: the future of acute pancreatitis care. *Function* **4**:zqad015.

9.2.4. Szerkesztőségi hozzászólások és egyéb tudományos közlemények

85. Carletto L, Troncoso A, Rocha AC, Rumbus Z, Solymár M and **Garami A** (2015) “Science without Borders” program and Brazilian-Hungarian collaboration in thermoregulation. *Temperature* **2**:455-456.

86. **Garami A**, Ibrahim M, Gilbraith K, Khanna R, Pakai E, Mikó A, Pintér E, Romanovsky AA, Porreca F and Patwardhan AM (2018) In Reply. *Anesthesiology* **129**:378-379.
87. **Garami A**, Imeri L, Madden CJ, Steiner AA and Romanovsky AA (2018) Preface, in *Handb Clin Neurol* p ix.

9.2.5. Könyvfejezetek

88. **Garami A** (2018) A fájdalom és perifériás polyneuropathiák kórélettana, in *Kórélettani Alapok (3. bővített kiadás)* (M Székely ed) pp 507-512, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest.
89. **Garami A**, Hegyi E, Erdősi D, Zádori N (2019). TM TUDOMÁNY, in *Transzlációs medicina: A jövő orvostudománya* pp 23-44, Transzlációs Medicina Alapítvány.

9.3. A Ph.D. értekezésben szereplő közlemények

9.3.1. Eredeti közlemények

90. Pétervári E, **Garami A**, Pákai E and Székely M (2005) Effects of perineural capsaicin treatment of the abdominal vagus on endotoxin fever and on a non-febrile thermoregulatory event. *J Endotoxin Res* **11**:260-266.
IF: 2,791 Q: Q1 Hivatkozások (ebből független): 13 (6) Referenciaszám: -
91. Gavva NR, Treanor JJ, **Garami A**, Fang L, Surapaneni S, Akrami A, Alvarez F, Bak A, Darling M, Gore A, Jang GR, Kessler JP, Ni L, Norman MH, Palluconi G, Rose MJ, Salfi M, Tan E, Romanovsky AA, Banfield C and Davar G (2008) Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* **136**:202-210.
IF: 6,030 Q: D1 Hivatkozások (ebből független): 431 (412) Referenciaszám: 64
92. Kanizsai P, **Garami A**, Solymár M, Szolcsányi J and Szélényi Z (2009) Energetics of fasting heterothermia in TRPV1-KO and wild type mice. *Physiol Behav* **96**:149-154.
IF: 3,295 Q: D1 Hivatkozások (ebből független): 34 (23) Referenciaszám: -
93. Pétervári E, Balaskó M, **Garami A**, Soós S and Székely M (2009) Suppression of food intake by intracerebroventricular injection of alpha-MSH varies with age in rats. *Acta Physiol Hung* **96**:483-487.
IF: 0,750 Q: Q4 Hivatkozások (ebből független): 17 (8) Referenciaszám: -
94. **Garami A**, Balaskó M, Székely M, Solymár M and Pétervári E (2010) Fasting hypometabolism and refeeding hyperphagia in rats: effects of capsaicin desensitization of the abdominal vagus. *Eur J Pharmacol* **644**:61-66.
IF: 2,737 Q: Q2 Hivatkozások (ebből független): 17 (13) Referenciaszám: 352
95. **Garami A**, Shimansky YP, Pákai E, Oliveira DL, Gavva NR and Romanovsky AA (2010) Contributions of different modes of TRPV1 activation to TRPV1 antagonist-induced hyperthermia. *J Neurosci* **30**:1435-1440.
IF: 7,271 Q: D1 Hivatkozások (ebből független): 150 (136) Referenciaszám: 70

9.3.2. Összefoglaló közlemény

96. Romanovsky AA, Almeida MC, **Garami A**, Steiner AA, Norman MH, Morrison SF, Nakamura K, Burmeister JJ and Nucci TB (2009) The transient receptor potential vanilloid-1 channel in thermoregulation: a thermosensor it is not. *Pharmacol Rev* **61**:228-261.
IF: 17,000 Q: D1 Hivatkozások (ebből független): 218 (182) Referenciaszám: 6

9.3.3. Könyvfejezet

97. **Garami A**, Almeida MC, Nucci TB, Hew-Butler T, Soriano RN, Pákai E, Nakamura K, Morrison SF and Romanovsky AA (2010) The TRPV1 channel in normal thermoregulation: what have we learned from experiments using different tools? In *Vanilloid Receptor TRPV1 in Drug Discovery: Targeting Pain and Other Pathological Disorders* (A Gomtsyan, CR Faltynek eds) 349-402 Wiley, Hoboken.
IF: - Q: - Hivatkozások (ebből független): 4 (2) Referenciaszám: -

10. Scientometriai összesítő adatok

Összesített impakt faktor: 356,486

Első és utolsó szerzős közlemények impakt faktora: 125,792

Összes idézettség (ebből független): 2954 (2546)

Első és utolsó szerzős közlemények hivatkozásainak száma (ebből független): 796 (674)

Legmagasabb idézettségű közlemény hivatkozásainak száma (ebből független): 431 (412)

Hirsch index: 30

Scientometrics.org besorolás: D1 (111%)

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impakt faktora: 92,012

Ebből első és utolsó szerzős: 74,656

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények hivatkozásainak száma (ebből független): 885 (705)

Az értekezésben nem tárgyalt további közlemények impakt faktora: 264,474

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik segítséget nyújtottak abban, hogy doktori értekezésem elkészülhetett.

Mindenekelőtt szeretném megköszönni **Székely Miklós professzor úrnak**, aki már orvostanhallgató koromban bevezetett a kutatómunka rejtelmeibe, hogy elindított és mindvégig támogatott kutatói pályámon. A kutatómunkához való hozzáállása és szemlélete példaértékű volt számomra, mindvégig mentoromként tekintettem és tekintek rá, tanácsai és útmutatásai nagyban meghatározták a pályafutásomat.

Szintén, hálás köszönettel gondolok, pályafutásomat hasonlóan meghatározó **Andrej Romanovsky professzor úrra**, aki lehetővé tette számomra, hogy külföldi munkatapasztalatot szerezzek, segítette beilleszkedésemet a nemzetközi tudományos világba, nélkülözhetetlen segítséget nyújtott a kutatásaimban és hasznos szakmai és baráti tanácsokkal látott el és lát el a mai napig.

Köszönettel tartozom továbbá **Szelényi Zoltán, Koller Ákos és Hegyi Péter professzor uraknak** és **Garai János tanár úrnak** a Transzlációs Medicina Intézet (korábbi nevén Kóréletani és Gerontológiai Intézet) korábbi és jelenlegi vezetőinek, akik lehetőséget és helyet biztosítottak oktató és kutató munkám végzésére és mindenben támogattak.

Külön köszönetet szeretnék mondani kollaborátoraim közül **Pintér Erika, Helyes Zsuzsanna és Reglódi Dóra professzor asszonyoknak** a közös munkáink során nyújtott támogatásért és segítségért, valamint kutatótársaimnak, társszerzőimnek akik szintén hozzájárultak értekezésem elkészítéséhez.

Hálás vagyok a kutatási munkában aktívan résztvevő jelenlegi és végzett Ph.D. és tudományos diákkörös hallgatóimnak, továbbá, a Termofiziológia Tanszék jelenlegi és volt asszisztenseinek, akiknek segítsége nélkülözhetetlen volt munkám során.

Kiemelt köszönettel tartozom kutató feleségemnek, **Pákai Eszternek**, akivel a tudományos életben kezdettől fogva együtt dolgozhattam, csaknem minden kutatási projektben számíthattam segítségére. Higgadt, kritikus látásmódja és tanácsai sok akadály elkerülését, illetve legyőzését elősegítették. Odaadó szorgalma, türelme és szeretete a laboratóriumban és a magánéletben is lehetővé tette céljaink közös megvalósítását.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm Családomnak, Szüleimnek és Gyermekeimnek a kitartó türelmet és támogatást.