

MTA Doktori Értekezés

**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

garami.andras_142_23

Tartalomjegyzék

| | |
|--|-----------|
| 1. Rövidítések jegyzéke | 7 |
| 2. Bevezetés és irodalmi háttér | 9 |
| 2.1. A testhőmérséklet-szabályozás általános jellemzői | 9 |
| 2.2. Hőmérsékleti ingerekkel aktiválható tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatornák | 14 |
| 2.2.1. A melegérzékeny TRP vanilloid-1 (V1) ioncsatorna | 15 |
| 2.2.1.1. A TRPV1 csatorna aktivációs módjai és szöveti eloszlása | 16 |
| 2.2.1.2. A TRPV1 csatorna agonisták és antagonisták termális hatásai | 18 |
| 2.2.1.3. A TRPV1 csatorna genetikai hiányának hőszabályozási hatásai | 23 |
| 2.2.2. Hidegérzékeny receptorok: TRP melasztatin-8 (M8) és ankirin-1 (A1) csatornák | 24 |
| 2.2.2.1. TRPM8 ioncsatorna | 24 |
| 2.2.2.2. TRPA1 ioncsatorna | 25 |
| 2.3. Az akut szisztémás gyulladás általános jellemzői és hőszabályozási sajátosságai: láz és hipotermia | 27 |
| 2.3.1. Az akut szisztémás gyulladás klinikai jelentősége és manifesztációja | 28 |
| 2.3.2. A szisztémás gyulladás kísérletes vizsgálata az alap kutatásban | 29 |
| 2.3.3. Az akut szisztémás gyulladás molekuláris mechanizmusai | 30 |
| 3. Célkutatózások | 35 |
| 3.1. Thermo-TRP ioncsatornák szerepének tanulmányozása a testhőmérséklet szabályozásában | 35 |
| 3.2. Thermo-TRP ioncsatornák vaszkuláris biológiai szerepének experimentális vizsgálata | 36 |
| 3.3. Szisztémás gyulladáshoz kapcsolódó állapotok élettani és molekuláris mechanizmusainak tanulmányozása experimentális modellekben és humán adatok alapján | 36 |
| 4. Anyagok és módszerek | 37 |
| 4.1. Experimentális modellek | 37 |
| 4.1.1. Kísérleti állatok és tartásuk | 37 |
| 4.1.2. Műtéti beavatkozások | 37 |
| 4.1.3. TRPV1 ioncsatorna deszenzitizáció és bizonyítási tesztek | 40 |
| 4.1.4. Termofiziológiai kísérleti elrendezések | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1.4.1. Termoelem termometria | 41 |
| 4.1.4.2. Respirometriás termometria | 42 |
| 4.1.4.3. Telemetriás termometria | 42 |
| 4.1.4.4. Termográdiens rendszer | 42 |
| 4.1.5. Lézeres folt interferencián alapuló áramlásmérés (laser speckle contrast imaging) | 43 |
| 4.1.6. Izometriás erő mérés izolált artéria szegmentumokban <i>ex vivo</i> | 43 |
| 4.1.7. Anyagok és adásuk módjai | 44 |
| 4.1.8. Molekuláris biológiai mérések és immunhisztokémia | 44 |
| 4.1.8.1. Szövet- és vérminták gyűjtése | 44 |
| 4.1.8.2. Immunoesszé | 46 |
| 4.1.8.3. Ciklooxygenáz (COX)-2 fehérje szintjének meghatározása Western blot módszerrel | 46 |
| 4.1.8.4. COX-2 mRNS expresszió meghatározás kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR) módszerrel | 47 |
| 4.1.8.5. c-Fos immunhisztokémia | 48 |
| 4.1.8.6. TRPA1 mRNS <i>in situ</i> hibridizáció (RNAscope) | 48 |
| 4.1.9. Adatfeldolgozás és statisztikai analízis | 49 |
| 4.2. Humán adatok elemzése (metaanalízis, matematikai modellezés, klinikai vizsgálat) | 49 |
| 4.2.1. Metaanalízisek | 49 |
| 4.2.1.1. Keresési stratégiák | 49 |
| 4.2.1.2. Statisztikai analízis | 50 |
| 4.2.2. A hipertermiás index (H) és matematikai modellezése | 51 |
| 4.2.3. A makrofág migráció inhibitor faktor (MIF) kinetikájának vizsgálata septicus betegek vérében és vizeletében prospektív klinikai tanulmányban | 52 |
| 4.2.3.1. Betegek | 52 |
| 4.2.3.2. Beválogatási és kizárási kritériumok | 54 |
| 4.2.3.3. Adatgyűjtés | 54 |
| 4.2.3.4. A MIF koncentráció mérése | 54 |
| 4.2.3.5. Statisztikai analízis | 55 |
| 5. Eredmények | 56 |
| 5.1. Termo-TRP ioncsatornák szerepének tanulmányozása a testhőmérséklet szabályozásában | 56 |

| | |
|--|-----|
| 5.1.1. A TRPV1 ioncsatorna | 56 |
| 5.1.1.1. Experimentális modellek | 56 |
| 5.1.1.1.1. A TRPV1 ioncsatorna genetikai hiányában fellépő termoregulatórikus fenotípus tisztázása egerekben | 56 |
| 5.1.1.1.2. Hipotermizáló TRPV1 antagonisták hatásmechanizmusának vizsgálata rágcsálókban | 67 |
| 5.1.1.1.3. A TRPV1 antagonisták által indukált hipertermia idegi mechanizmusainak vizsgálata | 73 |
| 5.1.1.1.4. TRPV1 antagonisták által indukált hipertermia farmakológiai kihasználásának (repurposing) vizsgálata altatás során kialakuló hipotermia kivédésében rágcsálókban | 80 |
| 5.1.1.2. A TRPV1 antagonisták termoregulatórikus hatásának vizsgálata emberekben matematikai modellezéssel és metaanalízissel | 85 |
| 5.1.2. A TRPM8 ioncsatorna fájdalomtalan hidegérzékelésben betöltött szerepének experimentális vizsgálata | 89 |
| 5.1.3. A TRPA1 ioncsatorna vizsgálata állatkísérletekben | 93 |
| 5.1.3.1. A TRPA1 ioncsatorna hidegszenzor szerepének vizsgálata a hőszabályozási rendszerben | 93 |
| 5.1.3.2. A TRPA1 ioncsatorna szerepének tisztázása a H ₂ S által indukált hipotermia kialakulásában | 97 |
| 5.2. Thermo-TRP ioncsatornák vaszkuláris biológiai szerepének experimentális vizsgálata | 102 |
| 5.2.1. A TRPV1 ioncsatorna szerepének vizsgálata a pH változásai által okozott vazomotoros válaszokban | 102 |
| 5.2.2. Új kísérleti módszer kidolgozása vazomotor válaszok hőmérséklettől függő változásainak <i>ex vivo</i> tanulmányozására | 111 |
| 5.3. Szisztémás gyulladásozó állapotok élettani és molekuláris mechanizmusainak tanulmányozása | 114 |
| 5.3.1. Experimentális modellek | 114 |
| 5.3.1.1. A TRPV1 ioncsatorna szerepének vizsgálata szisztémás gyulladásban fiatal és idős állatokban | 114 |
| 5.3.1.2. A P anyag (SP) jelátviteli útvonal hozzájárulásának vizsgálata lipopoliszacharida (LPS)-indukálta láz kialakulásához neurokinin-1 receptor génkiütött és vad típusú egerekben | 116 |

| | |
|--|------------|
| 5.3.1.3. A kolecisztoxinin (CCK)-COX interakció szerepének vizsgálata LPS-indukálta láz kialakulásában patkányokban | 121 |
| 5.3.1.4. A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) termoregulatórikus szerepének karakterizálása patkány és génkiütött egér állatmodellekben | 127 |
| 5.3.2. Metaanalízisek | 132 |
| 5.3.2.1. A láz és hipotermia prediktív jelentőségének vizsgálata a szepszis súlyosságára és kimenetelére | 132 |
| 5.3.2.2. A MIF diagnosztikai biomarker értékének elemzése szepszisben | 133 |
| 5.3.3. A szérum és vizelet MIF szintek kinetikája és a szepszis kimenetele közötti összefüggés elemzése prospektív klinikai vizsgálatban | 135 |
| 6. Megbeszélés | 140 |
| 6.1. Termo-TRP ioncsatornák szerepe a testhőmérséklet szabályozásában | 140 |
| 6.1.1. A TRPV1 ioncsatorna | 140 |
| 6.1.2. A TRPM8 ioncsatorna | 155 |
| 6.1.3. A TRPA1 ioncsatorna | 156 |
| 6.2. Termo-TRP ioncsatornák szerepe vazomotor válaszok kialakulásában | 161 |
| 6.3. Szisztémás gyulladási állapotok termoregulációs, élettani és molekuláris mechanizmusai | 167 |
| 6.3.1. Új endogén mediátorok (TRPV1, SP, CCK, PACAP) a szisztémás gyulladás során kialakuló testhőmérsékleti eltérések mechanizmusában | 167 |
| 6.3.2. A testhőmérsékleti eltérések jelentősége szisztémás gyulladásban humán betegeknél | 180 |
| 6.3.3. A MIF diagnosztikus és prognosztikus biomarker értéke szepszisben humán adatok metaanalízise és prospektív klinikai vizsgálata alapján | 182 |
| 7. Legfontosabb új tudományos eredmények | 186 |
| 8. Irodalomjegyzék | 190 |
| 9. Saját közlemények jegyzéke | 208 |
| 9.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények | 208 |
| 9.2. A Ph.D. fokozat megszerzését követő időszak egyéb közleményei | 210 |
| 9.3. A Ph.D. értekezésben szereplő közlemények | 214 |
| 10. Scientometriai összesítő adatok | 215 |
| 11. Köszönetnyilvánítás | 216 |

1. Rövidítések jegyzéke

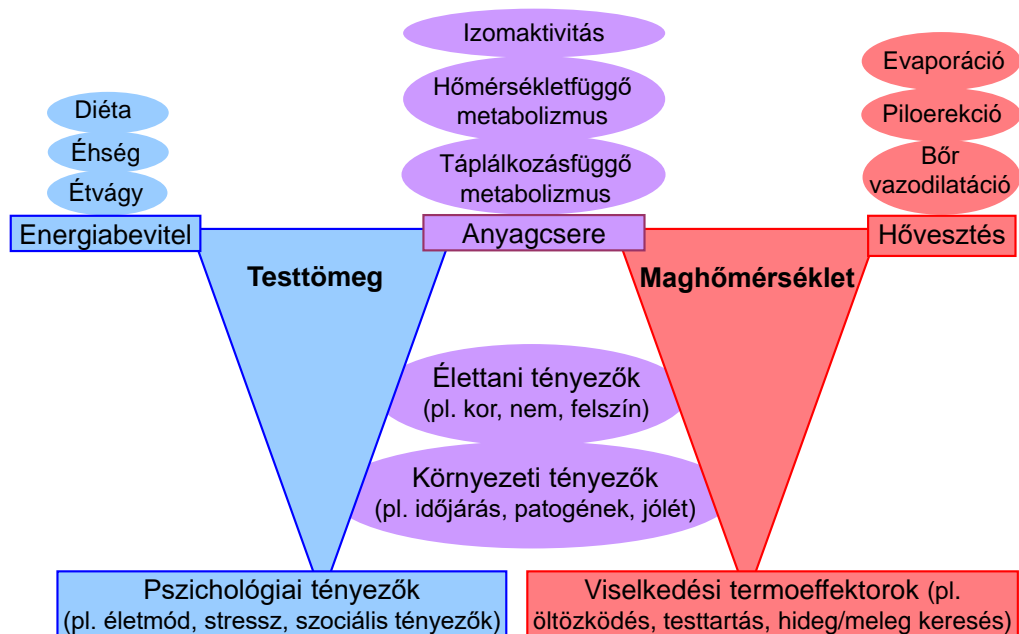
| | |
|-------------------|---|
| AEA | anandamid (N-arachidonoylethanolamine) |
| ANOVA | varianciaanalízis (analysis of variance) |
| APACHE | akut fiziológiai és krónikus állapotfelmérési pontszám (acute physiology and chronic health evaluation score) |
| C1 és C2 | első és a második cervikális csigolya |
| CCK | kolecisztokinin |
| CI | 95%-os konfidenciaintervallum |
| DA | dorzális hipotalamikus area |
| DLF | dorzolaterális funiculus |
| DMH | dorzomediális hipotalamusz |
| DMSO | dimetil-szulfoxid |
| ELISA | enzimhez kötött immunszorbens esszé (enzyme-linked immunosorbent assay) |
| GABA | gamma-amino-vajsav (gamma-aminobutyric acid) |
| GAPDH | glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz |
| <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 |
| IQR | interkvartilis tartomány (interquartile range) |
| 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 |

| | |
|---|--|
| OR | esélyhányados (odds ratio) |
| PACAP | hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) |
| PBS | foszfát puffer oldat (posphate buffer solution) |
| PG | prostaglandin |
| POA | preoptikus terület/area |
| PTE | Pécsi Tudományegyetem |
| qRT-PCR | kvantitatív valós idejű polimeráz lánreakció (quantitative real-time polymerase chain reaction) |
| rRPa | rostrális raphe pallidus |
| RTX | reziniferatoxin |
| SAPS | egyszerűsített akut fiziológiai pontszám (simplified acute physiology score) |
| s.c. | szubkután |
| SD | standrard deviáció |
| SE | standard hiba (standard error) |
| SIRS | szisztémás gyulladásos válasz szindróma (systemic inflammatory response syndrome) |
| SJHMC | St. Joseph's Hospital and Medical Center |
| SMD | standardizált átlagos különbség (standardized mean difference) |
| SOFA | szekvenciális (szepszissel kapcsolatos) szervi elégtelenség értékelési pontszám [sequential (sepsis-related) organ failure assessment score] |
| SP | P anyag (substance P) |
| T _b , T _k és T _m | bőr, környezeti és testmag hőmérséklet |
| TNF | tumor nekrozis 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 (1. ábra).



1. ábra: A komplex energetikai egyensúly szabályozó körei és legfontosabb effektorai, befolyásoló tényezői. Piros háttérrel elsődlegesen a termoregulációban, kék háttérrel a testtömeg fenntartásában szerepet játszó tényezők vannak feltüntetve. Lila háttér jelzi a mindkét szabályozó körre hatással bíró tényezőket^{1,2}.

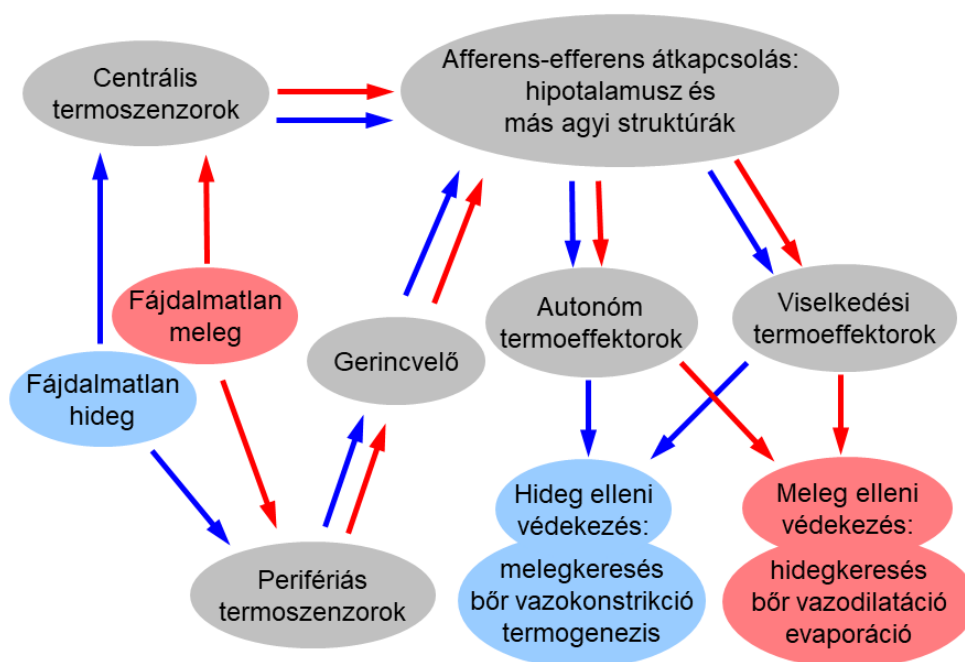
A T_m normál ($36-37^{\circ}\text{C}$) tartománytól való, mindössze néhány Celsius fokos eltérése irreverzibilis, akár halálos következményekkel járhat, például hóguta vagy nagyfokú kihülés (hipotermia) során. Ennek a finoman szabályozott rendszernek a működésében több olyan alapvető élettani mechanizmus (termoeffektor) is szerepet játszik, amelyek révén a termoreguláció más homeosztatisz szabályozó rendszerekkel is

szoros kapcsolatban áll, így például a testtömeg, vérnyomás és só-vízháztartás szabályozásával. Tágabb értelemben véve, a termoreguláció a komplex energetikai egyensúly egyik homeosztatikus szabályozó köre, amely hosszabb távon szoros összefüggésben áll a testtömeg szabályozásával². A két szabályozó kör közötti kapcsolat az anyagcsere aktivitásán keresztül valósul meg, aminek szintje rövidebb távon a T_m -re, hosszabb távon ugyanakkor a testtömegre is hatással van (1. ábra). Hasonló módon vezethető le a kapcsolat a bőr vazodilatáció vagy -konstrikció, mint hőleadó, illetve -konzerváló termoeffektor és a vérnyomás szabályozása, továbbá a verejtékezés és a só-víz készletek regulációja között.

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) (1. ábra). 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 konstrikciója (csökkent hővesztés). A meleg elleni védekezésben a hideget kereső magatartás, valamint a bőr ereinek dilatációjával, illetve verejtékezéssel kiváltott fokozott hőleadás játszanak kiemelt szerepet (2. ábra). A termoeffektorok sikeres aktivációja révén szervezetünk ellen tud állni a testünkből és/vagy környezetünkből származó hőmérsékleti hatásoknak, így például melegehatással szemben tolerancia vagy hosszabb távon akár akklimatizáció is létrejöhet, elégtelen működésük esetén azonban hőártalom következhet be, amely egyszerűbb hőségcsökéstől egészen az életveszélyes hőségig több kórképet is magában foglal³. Integratív ideg- és élettudományi szempontból jelentős kérdés, hogy mi által valósul meg a különböző termoeffektor csoportok összehangolt mozgósítása, ezáltal testhőmérsékletünk normál tartományban tartása, akár szélsőséges környezeti hatások vagy betegségek során. A klasszikus elmélet szerint (amely a legtöbb tankönyvben is megtalálható), ezt a finom vezérlést központi idegrendszerünk, azon belül elsősorban a hipotalamusz fűtő- és hűtőközpontja látja el. Napjainkban azonban a klasszikus dogma mellett egyre jobban terjed és válik elfogadottá egy modernebb szemlélet, amely a központi idegrendszer aktív, integráló szerepét megkérdőjelezi.

A klasszikus tanok az úgynevezett „set point” elméletre épülnek. Legtöbbször azt tanultuk, hogy létezik egy úgynevezett set point (beállítási pont), amely agyunk egy

specifikus régiójában „foglal helyet”, feltehetően a hipotalamusz preoptikus területén (POA), ami irányító központként, központi parancsnokként funkcionál. Továbbá, vannak centrális és perifériás hideg- és melegérzékelő receptoraink, melyek informálják az irányító központot az aktuális hőmérsékletről. Ezek az információk a hipotalamuszban integrálódnak. Ha a mért hőmérséklet megfelel a beállított értéknek, semmi sem történik, viszont abban az esetben, ha az érzékelt hőmérséklet eltér a beállítási ponttól, akkor a vezérlő központ összehangolja a megfelelő hőmérsékletet növelő vagy azt csökkentő mechanizmusokat, ezáltal a mért hőmérsékletet vissza tudja állítani a set point értékéhez.



2. ábra: A testhőmérséklet-szabályozás folyamatainak összefoglalása a szervezetet érő fájdalomtalan meleg- (piros) és hideghatások (kék) során.

A modern szemléletben a hőszabályozás „termosztát” nélkül valósul meg⁴⁻⁶. 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 található (2. ábra). 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. Azt is fontos megjegyezni, hogy egy-egy termoeffektor különböző homeosztatisz szabályozó rendszerek hurkainak is része lehet. A termogenezis (anyagcsere), amely a hőszabályozásban hideg elleni autonóm effektor szerepet játszik, a testtömegszabályozásban a táplálékfelvétellel többszörösen összetett, szoros kapcsolatban álló energetikai effektor funkciót tölt be⁷ (1. ábra). Az, hogy éppen melyik hurok (hőszabályozási vagy testtömegszabályozási) részeként funkcionál, a szervezetet érő ingerek (hőmérsékleti és/vagy táplálkozási) aktuális együtthatásának az eredménye.

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 érösszehúzó) 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. Fontos megjegyezni azonban, hogy minden termoeffektor hurok egy-egy adott hőmérsékleti tartományt véd, nem pedig egyetlen hőmérsékleti értéket. Amikor a testhőmérséklet normál tartományban van, rendszerint nincs termoeffektor hurok aktiváció. Egy ilyen rendszerben nincs szükség integrált testhőmérséklet kiszámítására, vagy annak összehasonlítására egy beállított alapértékkel (set point). A termoeffektorok közötti kommunikáció megvalósul a közös, szabályozott változójukon keresztül, amely nem más, mint a T_m . Ez a nagyon kifinomult és hatékony szabályozási rendszer tehát képes „központi irányító” nélkül működni.

A klasszikus elmélet kiválóan alkalmas volt a T_m kóros eltéréseinek magyarázatára, például gyulladással járó betegségekhez társuló láz esetén. Ezekben az esetekben a testhőmérséklet szabályozott emelkedését a set point felfelé tolódásából adódó következményként vezették le. Napjainkban is gyakran találkozhatunk ezzel a szemléletes magyarázattal. Újabb kísérleti eredmények azonban ellene szólnak a set point szükségességének a normál T_m fenntartásában, illetve kóros eltéréseinek kialakulásában. A mai napig nem sikerült azonosítani azt az agyi struktúrát, amely felelős lenne a set point

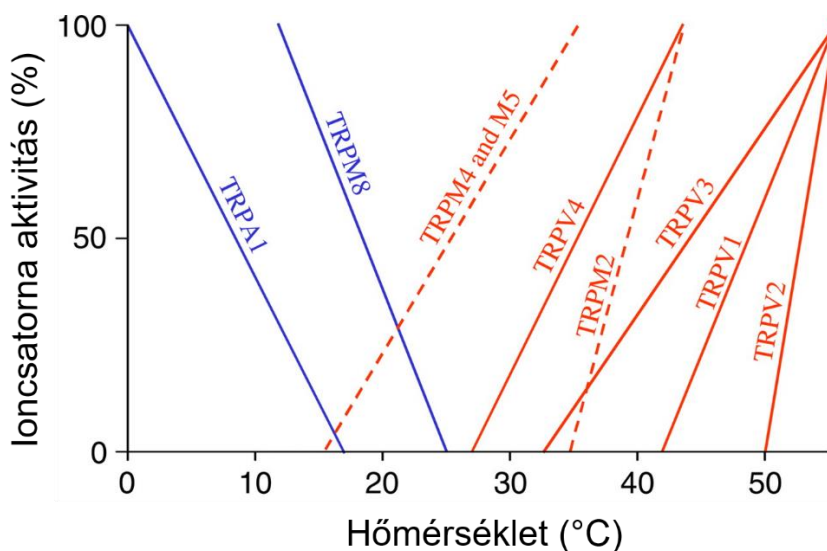
biztosításáért. Ellenkezőleg, az ebben legfontosabbnak tartott POA teljes mértékű roncsolása esetén, lázkeltők hatására patkányok szokásos lázválással képesek reagálni, igaz más termoeffektorok aktiválása révén, mint kontroll társaik⁸. Ezek az eredmények cáfolják a POA központi vezérlőként betöltött szerepét. A természetben is találhatunk példákat arra, hogy egymástól függetlenül érvényesülő tényezők (mint a termoeffektorok), hogyan nyilvánulhatnak meg látszólag központilag vezérelt jelenség létrehozásában (mint például a lázválasz). Egyszerű példa erre a madarak „V” alakú formában való vándorlása, amelyben – központi parancsnok nélkül – az egyes madarak önállóan úgy szerveződnek, hogy végül felvegyék az egész csoport számára energetikailag legkedvezőbb repülési alakzatot. Egy friss tanulmányban pedig leírták, hogy egyes kubai boa fajok falkában vadásznak, így növelve a zsákmányszerzés hatékonyságát⁹. Megfigyelték, hogy az egyes kígyók úgy helyezkednek el, hogy javítsák a falka esélyeit a vadászatra. Az egyes állatok figyelembe veszik társaik elhelyezkedését, hogy maximalizálják vadászati sikerüket. A koordinált vadászat magasabb viselkedési komplexitást igényel, mert minden állatnak figyelembe kell vennie a többiek akcióit anélkül, hogy szükséges lenne kígyók közti kommunikáció, illetve „vezérkígyó” jelenléte. Ez is bizonyítja, hogy a közös cél, mint szabályozó tényező valóban hatékonyabban elérhető több, független tényező összehangolt működésével, és ehhez nincs feltétlenül szükség egy központi iránytóra.

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 előregedése, illetve a globális klímaváltozások miatt ugyancsak egyre nagyobb jelentőséggel bírnak a külső hatások miatt kialakuló hőszabályozási rendellenességek, mint a hőséguta és kihülés. Annak ellenére, hogy az előbb említett hőszabályozási eltérések régóta ismertek és könnyen mérhetőek, 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

terofarmakológia alkalmazott felhasználása jelenleg megoldatlan. A benne rejlő lehetőségek kiaknázása az orvosi terápiában (például indukált hipotermia transzplantációs műtéteknél, stroke-ban) és egyéb téren (például hibernáció úrutazások során) is nagy előrelépést jelenthetne¹.

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 felfedezése¹⁰. Ezeknek az ioncsatornáknak a Q_{10} együtthatója (amely azt mutatja, hogy 10°C hőmérséklet-változásnál hányszorosára változik az ioncsatornán keresztüli ionáramlás) 5-nél nagyobb (melegérzékeny csatornáknál) vagy 0,2-nél kisebb (hidegérzékeny csatornáknál)¹¹. Annak ellenére, hogy az egyes termo-TRP csatornák egy viszonylag szűk hőmérsékleti tartományban aktiválódnak, közösen egy meglehetősen széles hőmérsékleti tartományt fednek le, amely a fájdalmas hidegtől a fájdalmas meleg érzékelésig terjed (3. ábra).



3. ábra: Termo-TRP ioncsatornák aktivitásának változása a hőmérséklet függvényében *in vitro*. Látható, hogy a TRP ankirin-1 (A1) és melasztatin-8 (M8) csatornák hideggel (kék), míg a vanilloid, illetve melasztatin csatornák közül a V1-V4, illetve az M2 és M4-5 meleggel (piros) aktiválhatók. A hőmérsékleti aktivációs küszöbök együtt széles (18-50°C) hőmérsékleti skálát foglalnak magukba¹⁰.

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. Egy valódi termoszenzor szervezetünk hőszabályozási rendszerében az alábbi kritériumok mindegyikének meg kell, hogy feleljen:

- hőmérsékleti ingerekkel aktiválható;
- 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 TRPM2 esetében nemrég bizonyították, hogy valódi melegszenzor szereppel bír, amelynek révén korlátozza a láz mértékét, illetve hipotermia kialakulását is elősegíti¹². A TRPV4 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 aktiválásában¹³. Megjegyzendő azonban, hogy további kísérletek szükségesek a következtetések megerősítésére, például TRPV4 ioncsatornától genetikusan megfosztott (knockout, KO) egerek felhasználásával¹⁴. Hasonlóan a TRPV4 ioncsatornához, a TRPV3 csatorna esetében is felmerült fájdalomtalan meleget érzékelő funkció a bőrben, amely hőhatásra lokális vazodilatáció kialakulását eredményezte¹⁵. A hideggel aktiválható TRPA1 és M8, valamint a meleggel aktiválható TRPV1 hőszabályozási szerepének összefoglalása az alábbi alfejezetekben található.

2.2.1. A melegérzékeny TRPV1 ioncsatorna

A TRPV1 – korábbi nevén kapszaicin vagy fájdalom receptor – már évtizedek óta a fájdalommal kapcsolatos kutatások egyik központi eleme volt¹⁶, amikor klónozására 1997-ben sorkerült¹⁷. A felfedezés jelentőségét és továbbra is érvényes aktualitását jelzi,

hogy 2021-ben fontos szerepet játszott az élettani és orvostudományi Nobel-díj odaítélésében a kutatásvezető, David Julius, számára¹⁸. Fontos azonban megjegyezni, hogy az ehhez vezető kutatások gyökerei sokkal régebbre nyúlnak vissza és jelentős magyar vonatkozásaik is vannak^{16,19}. A kapszaicin élettani, beleértve termoregulatórikus, hatásait vizsgáló kísérletek eredményeit elsőként Hőgyes Endre publikálta 1878-ban²⁰. A fájdalomkutatások terén nagy áttörést jelentett, hogy 1949-ben ifjabb Jancsó Miklós és felesége, Jancsó-Gábor Aranka beszámoltak róla, hogy kapszaicin megfelelő alkalmazásával a szenzoros idegvégződések deszenzitizációja váltható ki, így azok bizonyos fájdalmas behatásokkal szemben érzéketlenné válnak²¹, amely alapjául szolgált az ioncsatorna farmakológiai inaktivációját alkalmazó kutatásoknak^{22,23}. Munkásságukat később fiuk, Jancsó Gábor és tanítványuk Szolcsányi János folytatták, akik jelentős előrelépéseket értek el a kapszaicin-szenzitív idegvégződések és a TRPV1 ioncsatorna élettani és patofiziológiai funkcióinak megértésében^{18,19}. Külön figyelemreméltó, hogy ezen kutatások eredményei már jóval a TRPV1 ioncsatorna klónozása előtt, az 1970-es években bizonyítékot szolgáltatottak arra, hogy a kapszaicin hatásai specifikus receptoron keresztül jönnek létre^{16,24}.

2.2.1.1. A TRPV1 ioncsatorna aktivációs módjai és szöveti eloszlása

A kapszaicinen kívül 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 agonista²⁵. Az endogén TRPV1 agonisták közé tartozik az anandamid (AEA), az oleoiletanolamid és az N-arachidonoildopamin, amelyek esetében hőszabályozási hatásokat is leírtak²⁶⁻²⁸. Előbbieken kívül számos más TRPV1 agonista is létezik, és listájuk egyre bővül²⁹. Továbbá, 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)³⁰. 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^{6,31}. A különböző aktiváló tényezők együttes jelenléte csökkentheti az egyes ingerek saját aktivációs küszöbét, tehát a TRPV1 csatornát aktiváló hatások egymás szinergistájaként is funkcionálnak³². Ilyen együttes jelenlét könnyen előfordulhat szöveti gyulladás során, ami a TRPV1 csatornát expresszáló idegvégződések aktiválásával a gyulladáshoz vezető tünetek között szereplő fájdalom (dolor) kialakulását is magyarázhatja.

A TRPV1 ioncsatorna legnagyobb mértékben a hátsógyöki és trigeminális elsődleges szenzoros neuronokon expresszálódik rágsálókban^{33,34} és emberekben egyaránt³⁵. Megtalálható a vékony mielinhüvelyű A δ és a mielinhüvely nélküli C rostok perifériás és centrális végződéseiben, de ugyancsak kimutatták a nodózus ganglion bizonyos peptiderg neuronjain is³⁶. Ezek a kapszaicin-szenzitív primer afferens idegvégzések 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 jelenléte³⁷⁻³⁹. Továbbá, az afferens vagális ideg felső gasztrointesztinális rendszerhez futó rostjainak legalább 20%-a szintén expresszál TRPV1 ioncsatornát³⁹⁻⁴¹.

A felsorolt perifériás idegrendszeri struktúrákon kívül, a TRPV1 ioncsatorna expresszióját kimutatták a központi idegrendszer számos pontján^{42,43}, közülük különösen nagyszámú *Trpv1* gén transzkriptumot detektáltak a hipotalamuszban^{44,45}. A TRPV1 fehérje kismértékű jelenlétét is kimutatták az anterior hipotalamikus magokban⁴⁴. Meg kell jegyezni azonban azt is, hogy a későbbiekben a TRPV1 kiterjedt mértékű agyi jelenlétét kétségbe vonták⁴⁶. Az idegrendszeri struktúrákon kívül, TRPV1 ioncsatorna expresszió kimutatható volt számos nem-neurális sejt- és szövettípusban is⁴⁷, 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-neurális expresszálódó TRPV1 ioncsatornákon való direkt hatásának lehetőségét. Az artériák falában kimutatott TRPV1 ioncsatornák^{48,49} például szerepet játszhatnak a kapszaicin hatására bekövetkező bőr vazodilatáció, így fokozott hőleadás létrejöttében. A barnazsír-szöveti TRPV1 ioncsatornák szerepe felmerült az elhízás kialakulásának elősegítésében⁵⁰, de a teljesen ellentétes szerep (vagyis a zsírfelhalmozódás megelőzése) szintén felvetődött⁵¹. A direkt nem-neurális termoeffektor hatások lehetőségének kapcsán, ugyanakkor fontos hangsúlyozni, hogy az afferens idegrostokon kimutatott TRPV1 csatorna expresszió mértéke legalább harmincszorosa volt annak, mint amit bármely más sejt-típusban találtak³⁴, amely bizonyos értelemben megkérdőjelezi a nem-neurális TRPV1 ioncsatornák élettani jelentőségét a termoregulációban. 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,

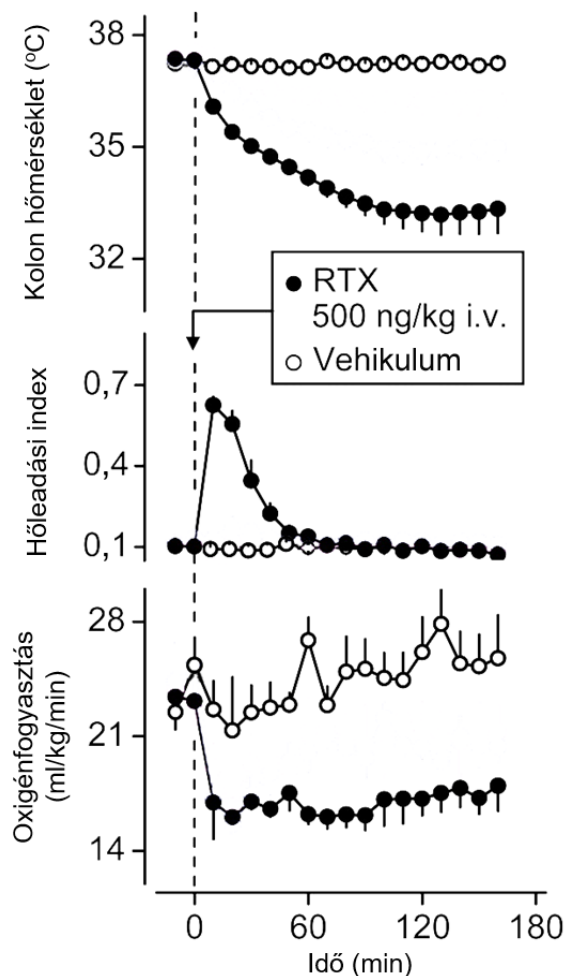
illetve, hogy a termoregulatórikus szereppel rendelkező TRPV1 ioncsatornák hol helyezkednek el a szervezetben.

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)^{6,23}. Bizonyos állatok (például a madarak) azonban érzéketlenek a kapszaicin hipotermiás (és fájdalomkeltő) hatásával szemben^{52,53}, aminek hátterében evolúciós biológiai magyarázat állhat: a madarak ezáltal képesek csípős paprikát fogyasztani és annak magjait terjeszteni⁵⁴. Evolúciós jelentősége mellett, a különböző állatfajok eltérő érzékenysége kapszaicinnal szemben felhívja a figyelmet a TRPV1 ioncsatorna termoregulatórikus szerepének fajok közötti esetleges különbözőségére is. Termoeffektorok tekintetében a TRPV1 agonisták (kapszaicin vagy RTX) hatására kialakuló hipotermiás válaszban mind autonóm mechanizmusok – bőr vazodilatáció, termoregulatórikus nyáleválasztás, hipometabolizmus^{55,56} –, mind viselkedési mechanizmusok – például hidegpreferencia⁵⁶⁻⁵⁸ – szerepet játszanak (4. ábra).

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^{6,23}. 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 agonisták akut termális hatásainak tanulmányozása mellett az idő múlásával további kísérleti módszerek is elérhetővé váltak a TRPV1 ioncsatorna hőszabályozási szerepének vizsgálatára. Megjelentek a TRPV1 ioncsatorna gátlásának farmakológiai és genetikai lehetőségei.

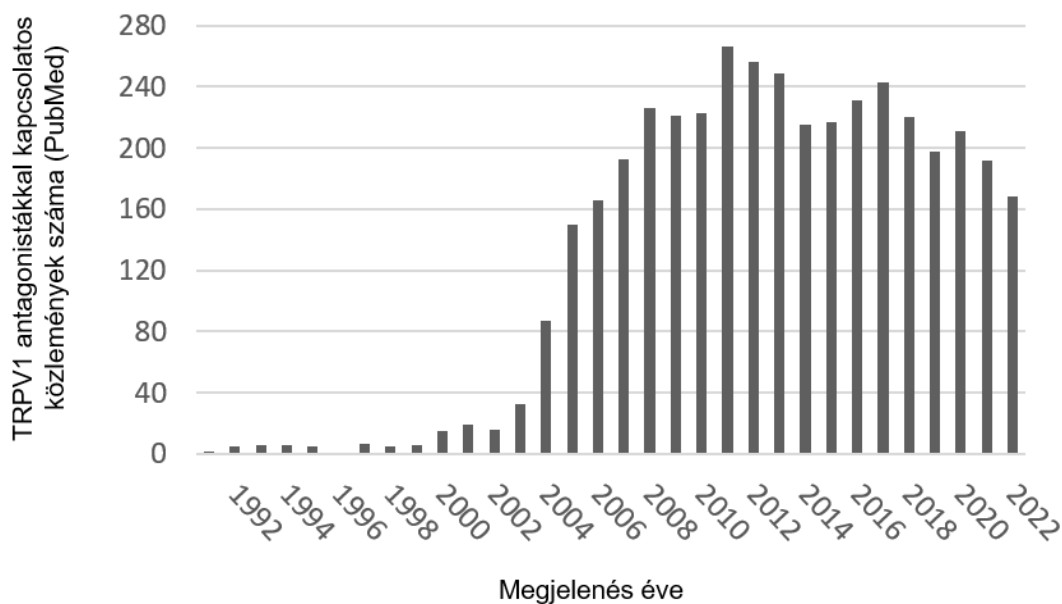


4. ábra: A meleg elleni autonóm termoeffektor mechanizmusok aktivációja RTX hatására kialakuló hipotermiában patkányokban. 500 ng/kg RTX szisztémás (i.v.) injektálása kolon hőmérséklet (T_m egyik formája) csökkenést, azaz hipotermiát vált ki, amely bőr vazodilatáció (fokozott hőleadás) és csökkent oxigénfogyasztás (alacsonyabb hőtermelés) eredményeképpen jön létre. Más kísérletekben hidegpreferencia (meleg elleni viselkedési termoeffektor) is társult a hipotermia kialakulásához (az ábrán nincs feltüntetve)⁶.

Előbbiek közé tartoznak a TRPV1 antagonisták, amelyekre sokan úgy tekintettek, mint a nem opioid típusú fájdalomcsillapítók új, mellékhatásoktól mentes generációjára. Ezeknek a reményteli elvárásoknak köszönhetően

sok gyógyszerceg számos szelektív és potens TRPV1 antagonistát fejlesztett ki, amelyek tesztelésére hamarosan klinikai vizsgálatokban is sor került a 21. század elején^{59,60}. Párhuzamosan a gyógyszerfejlesztési törekvésekkel a TRPV1 antagonistákra egyre nagyobb figyelem összpontosult alapkutatási, preklinikai kísérletekben, valamint összefoglaló közleményekben is. Előbbiek eredményeként a 2000-es évek elejétől kezdve a TRPV1 antagonistákkal kapcsolatos tudományos közlemények száma ugrásszerűen megnőtt és éves szinten magasan is maradt egészen napjainkig: 2007-től 2021-ig a megjelent cikkek száma minden évben meghaladta a 190-et, vagyis átlagban körülbelül másnaponta megjelent egy-egy új közlemény (5. ábra).

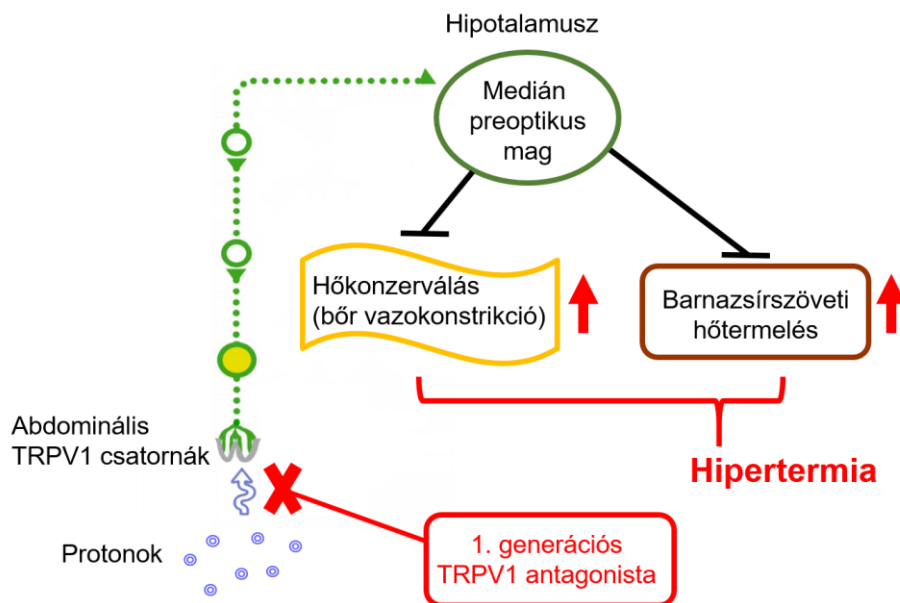
A TRPV1 antagonisták *in vivo* tesztelése során szinte azonnal fény derült arra, hogy közülük több is hipertermiát okoz laboratóriumi állatokban⁶¹⁻⁶³, később pedig kiderült, hogy emberekben is⁶⁴⁻⁶⁷. Ez a hipertermia az antagonisták célmolekuláján keresztül kiváltott (on-target) mellékhatásnak bizonyult, vagyis a TRPV1 ioncsatorna modulációja révén jött létre^{62,68-70}.



5. ábra: A TRPV1 antagonistákkal kapcsolatos publikációk száma a kezdetektől 2022-ig évenkénti bontásban. A keresést a PubMed adatbázisban végeztem 2023. nov. 9-én a következő keresőkulccsal: ("capsaicin receptor" OR "vanilloid-1 receptor" OR TRPV1) AND (antagonist OR inhibitor OR blocker). A 2023-as évben a találatok száma a keresés napján 128 volt.

Feltételezhető volt, hogy a TRPV1 antagonisták a hideg elleni autonóm termoeffektorok (barnazsírszöveti hőtermelés és bőr vazokonstriktió) tónusos gátlásának felfüggesztésével hozzájárulnak a hipertermiához^{62,64}. Ez a tónusos gátlás a TRPV1 ioncsatornák hőmérséklettől független folyamatos aktivációja révén valósul meg valahol a hasban, talán a hasfal izmaiban vagy a hasüregi szervekben⁶². 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 (6. ábra). A második generációs, vagyis módszelektív antagonisták, amelyek nem (vagy csak részlegesen) gátolták a proton aktivációs módot, nem váltottak ki hipertermiát^{70,71}.

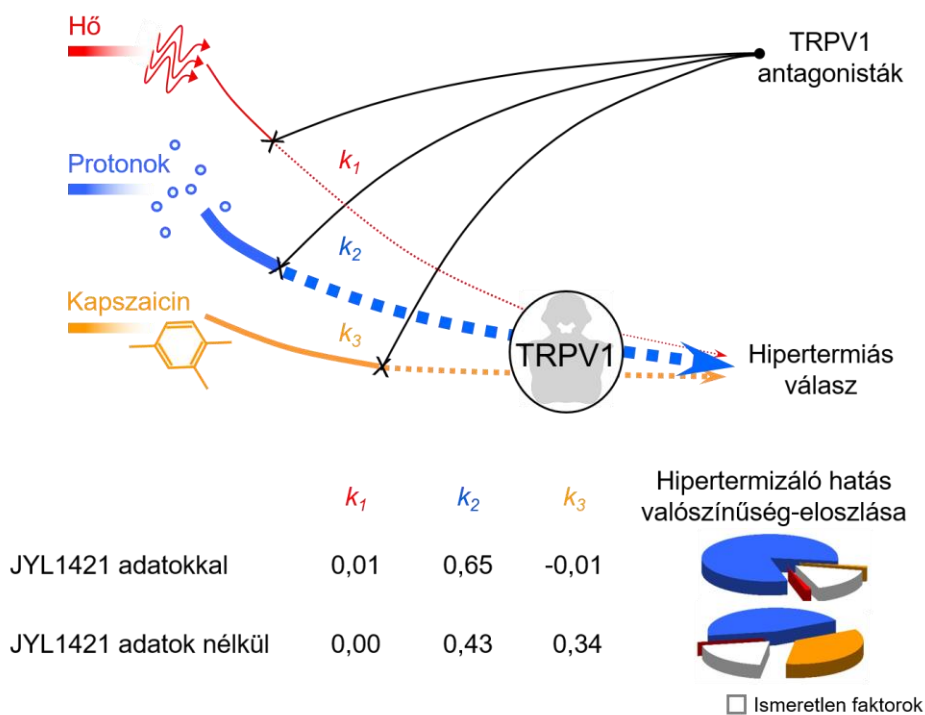
Korábbi (Ph.D. értekezésem alapjául szolgáló) kutatásaink során állatkísérletekben kimutattuk, hogy az antagonista hatáserőssége a termális (hő általi) aktivációs módban nem volt összefüggésben a hipertermia kialakulásával, míg a vanilloid (kapszaicin) aktivációs mód gátlása vagy csak kismértékben vagy egyáltalán nem járult hozzá a hipertermiás hatáshoz⁷⁰.



6. ábra: A has valamely részén elhelyezkedő TRPV1 ioncsatorna populációt savi behatások (protonok) folyamatos aktív állapotban tartanak, ennek révén ismeretlen idegpályákon (szaggatott zöld vonal) keresztül tónusosan stimulálják a hipotalamikusan MnPO-ban található gátló efferens neuronokat, amelyek a hideg elleni autonóm termoeffektorok szuppresszióját tartják fenn (fekete vonalak). A TRPV1 csatorna proton aktivációját gátló (1. generációs) TRPV1 antagonisták az abdominális TRPV1 ioncsatornák aktivált állapotát felfüggesztik, így a tónusos gátlás alól felszabadítják az autonóm hőkonzerváló és hőtermelő mechanizmusokat, amelyek következtében hipertermia jön létre (piros tartalmak).

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. A kérdést akkoriban nem tudtuk megválaszolni, mert kísérleteink során az egyik TRPV1 antagonisták, a JYL1421, hipertermia helyett hipotermiát okozott, amiről nem lehetett tudni, hogy mechanizmusa a hipertermiától teljesen különböző (akár TRPV1 ioncsatornától is független), vagy a hipertermiában résztvevő mechanizmusok ellentétes irányú modulációjával jön létre. A megválaszolatlan kérdés következtében analízisünket annak idején két különböző módon végeztük el: a hipotermiát kiváltó JYL1421 adatainak felhasználásával (feltételezve ugyanazon mechanizmusok ellentétes modulálását a hipo- és hipertermiában), illetve a JYL1421 adatok nélkül (feltételezve két egymástól teljesen különböző mechanizmust a testhőmérsékleti hatások háttérében)⁷⁰. Mindkét adathalmaz felhasználása esetén azt az eredményt kaptuk, hogy a proton aktivációs mód gátlása a legfontosabb a hipertermia kialakulásában, míg a hő általi aktivációs mód gátlása jelentéktelen ebből a szempontból.

A vanilloid aktivációs mód szerepét illetően azonban eltért egymástól a két analízis eredménye. A JYL1421 adatok nélkül, modellünk azt mutatta, hogy a proton mód gátlása mellett, a TRPV1 antagonisták hatáserőssége a vanilloid aktivációs mód gátlásában szintén szerepet játszik a hipertermia kialakulásában. A JYL1421 adatainak felhasználásával azonban analízisünk szerint a vanilloid mód gátlása jelentéktelennek bizonyult a hipertermia szempontjából (7. ábra).



7. ábra: A TRPV1 csatorna különböző aktivációs módjainak hozzájárulása a TRPV1 antagonisták által kiváltott hipertermiához. A TRPV1 csatornát aktiváló ingerek a hő (piros), proton (kék) és vanilloid (narancssárga) aktivációs módokban különböző mértékben gátoltak TRPV1 antagonisták által (fekete) a hipertermia kialakulásakor. A k_1 , k_2 , és k_3 értékek sorrendben a hő, proton és vanilloid aktivációs módok gátlásának relatív érzékenységét jelentik a hipertermia kialakulásával szemben. A tortadiagram az egyes módok (és egyéb, a modell számára ismeretlen faktorok) relatív hozzájárulását mutatja a hipertermia kialakulásához. A JYL1421 hatásmechanizmusának ismerete hiányában a modellt két különböző adatsorral (JYL1421 adatokkal együtt vagy azok nélkül) is lefuttattuk, ami két különböző k érték kombinációhoz vezetett⁷⁰.

A hipotermizáló hatást nemcsak a JYL1421 esetében, hanem más kis molekulájú TRPV1 antagonisták esetében is kimutatták, mint például 5'-jodo-RTX^{72,73}, AMG7905 és AMG8562⁷¹, A-425619⁷⁴, illetve egy polipeptid antagonista, az APHC3 esetében is⁷⁵. Összhangban azzal, hogy a TRPV1 agonisták hipotermiát okoznak^{6,23}, az 5'-jodo-RTX

esetén kiderült parciális agonista hatás^{73,76}, míg az APHC3 potenciózta kis koncentrációjú kapszaicin hatását⁷⁷. A többi hipotermizáló TRPV1 antagonistá 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 afferens neuronjain.

Fontos hangsúlyozni, hogy a modellezés alapjául szolgáló kísérleteket patkányokban végeztük, ami felveti eredményeink emberekre való transzlációjának megkérdőjelezését. Valóban, fajok közti különbségekre több esetben is fény derült a TRPV1 ioncsatorna farmakológiai tulajdonságait illetően. Ide tartozik a madarak esetében korábban már említett érzéketlenség kapszaicin fájdalomkeltő hatásával szemben⁵², de a csupasz vakondpatkányoknál is beszámoltak hasonlókról⁷⁸. Hőszabályozási szempontból megemlíthető, hogy a TRPV1 antagonistá kapszazepin tengerimalacokban hipertermiát okozott, azonban patkányokban nem volt hatása a T_m -re⁷⁰. A fentiekben ismertetett JYL1421 pedig amellett, hogy patkányokban hipotermiát hozott létre, kutyákban és majmokban hipertermiát váltott ki⁶¹. A fajok közötti különbségek miatt, a TRPV1 antagonisták hipertermiás hatásának háttérben 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^{6,31}. A farmakológiai módszerekkel szemben, a genetikailag módosított állatokkal végzett tanulmányokban nem sikerült egyértelműen tisztázni olyan hőszabályozási fenotípust, amely jellemezné a *Trpv1* KO állatokat^{50,79-81}. Szelényi és mtsai.⁸¹ azt találták, hogy a *Trpv1* KO egerekben felerősödik a sötét és világos napszakok közötti T_m

ingadozás mértéke, ezzel szemben Iida és mtsai.⁸⁰ nem figyeltek meg ilyen jellegű felerősödést. Motter és Ahern⁵⁰ arról számoltak be, hogy a *Trpv1* KO egereknek fokozott mértékű a hideg által indukált hőtermelési kapacitásuk, de Iida és mtsai.⁸⁰ nem találtak ilyen jellegű fokozódást. Annak tudatában, hogy egerekben különösen bonyolult a hőszabályozási válaszok szakszerű tanulmányozása⁸², 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^{5,83,84} (szintén lásd 2.1. fejezet), a különböző autonóm és viselkedési effektor mechanizmusok vizsgálatára is szükség lenne. Annak érdekében, hogy az erre irányuló kísérletek eredményesek legyenek, szigorúan szabályozott hőmérsékleti körülmények között kell elvégezni a vizsgálatokat, hiszen az aktuális környezeti hőmérséklet (T_k) több hőszabályozási válaszra is hatással van, illetve gyakran meghatározza a T_m szabályozásában résztvevő termoeffektorok mintázatát⁸⁵. A *Trpv1* KO egerek termoregulatórikus fenotípusának tanulmányozása részeként, az állatok lokomotoros aktivitásának alapos vizsgálata is szükségszerű, hiszen rágcsálókban ezt is termoeffektor mechanizmusként tartják számon⁸⁶⁻⁸⁸.

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 BCTC⁸⁹. *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^{90,91}. 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 perifériásan a bőr és a szájüreg elsődleges szenzoros idegrostjaiban^{91,92}. A TRPM8 megtalálható az A δ - és C-idegroston, nociceptorokon és nem fájdalomérzékelő neuronokban egyaránt. Fontos megjegyezni, hogy a nociceptorok

esetében a TRPM8 ioncsatornát expresszáló rostok élesen elkülönültek a TRPA1 ioncsatornát kifejező idegektől, utóbbiak esetében azonban gyakran volt megfigyelhető átfedés a TRPV1 ioncsatorna expressziójával⁹³. A TRPA1 és TRPV1 ioncsatornák gyakori együttes expressziója ugyanazon szenzoros idegrost felszínén lehetővé teszi a nociceptor polimodális funkcióját, amely biztosítja különböző típusú fájdalmas ingerek (termális, mechanikai és kémiai) detektálását. A nociceptor aktivációjával pedig megtörténik a fájdalomérzékelés első részfolyamata, a transzdukció⁹⁴. Ellentétben a fájdalomérzékelésben szerepet játszó TRPA1 és TRPV1 ioncsatornákat kifejező idegrostokkal, a TRPM8 ioncsatorna expressziós mintázata alapján kiválóan alkalmas jelölt lehet valódi (fájdalmatlan) hideget érzékelő szenzor szerep betöltésére a termoreguláció szempontjából.

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^{57,95}. A TRPM8 ioncsatornát aktiváló ligandok között többnél (például icilin) leírták, hogy jellegzetes didergést vagy „ázott kutya” rázására emlékeztető mozdulatokat vált ki^{96,97}. *Trpm8* KO egerekkel végzett kísérletek minden kétséget kizáróan bizonyították, hogy a TRPM8 ioncsatornák hozzájárulnak a fájdalomtalanul hideg környezet elkerüléséhez^{96,98,99}, de tisztázatlan maradt, hogy ez a hozzájárulás elegendő mértékű-e ahhoz, hogy az állatok T_m -ére is hatással bírjon. Erre a kérdésre leginkább a TRPM8 ioncsatorna genetikai vagy farmakológiai gátlásával lehetne megadni a választ. Bautista és mtsai.⁹⁸ tanulmányában a *Trpm8* KO egerek nyugalmi T_m -e nem különbözött vad típusú (wild type, WT) alomtársaikétól, azonban nem került sor az egerek T_m -ének vizsgálatára különböző T_k körülmények között.

2.2.2.2. TRPA1 ioncsatorna

A TRPA1 ioncsatornát egy csaknem univerzális kemoszenzornak és polimodális receptornak tekintik¹⁰⁰. Aktivátorai között található növényi eredetű anyagok, például tioszulfínatok (hagyma), Δ^9 -tertrahidrokanabinol (kannabisz), allil-isotiocianát (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). Polimodális szerepét bizonyítja, hogy az egyre bővülő kémiai ingerek listája mellett, hőmérsékleti és pH szignálokkal, valamint fény- és mechanikai ingerekkel is aktiválható^{100,101}.

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. Fontos azonban megjegyezni, hogy a perifériás idegrendszeren kívül a TRPA1 kimutatható volt epitél sejtekben, melanocitákban, pankreaszban, valamint a központi idegrendszer asztrocitáiban és idegsejtjeiben is^{101,102}.

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. Elsőként 2003-ban derült fény a TRPA1 hideggel való aktivációjára⁹³, később számos további kísérletben megerősítették *in vitro* és *in vivo*, hogy a TRPA1 részt vesz a fájdalmas hideg érzékelésében¹⁰³⁻¹⁰⁵. Előbbiekkel ellentétben, sok másik tanulmányban cáfolták a TRPA1 ilyen jellegű szerepét ugyancsak *in vitro* és *in vivo* kísérletek alapján^{98,103,106-109}. A TRPA1 hőmérséklet általi aktivációjának megértését tovább bonyolítja, hogy bizonyos TRPA1 variánsok (például kígyókban és rovarokban) hideg helyett meleggel aktiválhatók^{105,110}. 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 $<17^{\circ}\text{C}$ ⁹³, amely közel van a fájdalmas hőküszöbhez emberekben¹¹¹.

Két további tanulmányban azt vizsgálták, hogy perifériás TRPA1 csatornák szerepelhetnek-e a termoregulációs rendszer valódi hidegszenzoraként^{98,106}, de nem derült fény egyértelműen a válaszra. Az egyik 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 szabályozásában⁹⁸. 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. A második tanulmányban azt mutatták ki, hogy egy potens és szelektív TRPA1 antagonist, 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

van¹⁰⁶. 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 Blackstone és mtsai.¹¹² írták le elsőként. A hipotermizáló hatást H_2S donorokkal később több különböző kutatócsoport is reprodukálni tudta¹¹³⁻¹¹⁵, azonban más tanulmányokban a H_2S T_m -et csökkentő hatását nem sikerült kimutatni^{116,117}. A H_2S által indukált hipotermia megerősítéséhez vagy elvetéséhez további, gondosan kivitelezett termofiziológiai vizsgálatok szükségesek. 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. Pozsgai és mtsai.¹¹⁸ nemrég összegyűjtötték a H_2S TRPA1 csatorna által mediált hatásainak terjedelmes listáját, azonban termoregulatórikus hatásról nem számoltak be a szerzők. 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 gyulladáshoz válasz szindróma” (systemic inflammatory response syndrome, SIRS), „szepszis szindróma” (septic syndrome), szepszis, súlyos szepszis, szeptikus sokk és „több szervi működészavar szindróma” (multiple organ dysfunction syndrome).

A szepszis, mint fogalom már az ókori görögök körében ismert volt, akkoriban elsősorban a rothadásra, hanyatlásra, mint életet veszélyeztető, fertőzéssel kapcsolatos, magas mortalitású állapot leírására használták. Az orvostudomány fejlődésével

párhuzamosan a szepszis definíciója is folyamatosan változott, míg 2014-2015-ben harmadszor is újra felülvizsgálták az addig használatos definíciókat, változtattak a szepszis és a szeptikus sokk diagnózisának kritériumain, a SIRS pedig törlésre került a fogalmak közül¹¹⁹. A szepszist újabban a szervezet olyan fertőzésre adott kontrollálatlan válaszreakciójaként említik, ami már károsítja a szervezet saját szöveteit és szerveit is. Kórélettani szempontból a betegség viselkedés/szindróma, SIRS és szepszis kategóriákat egyaránt – etiológiától függetlenül – akut szisztémás gyulladással állapotoknak tekintjük.

2.3.1. Az akut szisztémás gyulladás klinikai jelentősége és manifesztációja

A szeptikus betegségek megjelenése egyidős az emberrel. Az orvostudomány egészéhez hasonlóan, a szeptikus betegek ellátása is óriási fejlődésen ment keresztül az évszázadok folyamán. A szepszis 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. Magyarországon a szepszis az intenzív osztályokon történő mortalitás és morbiditás legfőbb oka. Incidenciája évről évre növekszik, a betegek 30-60%-át elveszítjük. Országunkban évente kb. 9000 szepszisben szenvedő beteget kezelnek intenzív osztályokon¹²⁰. Az Országos Egészségbiztosítási Pénztár egy régebbi adata szerint a többszervi elégtelenséggel intenzív osztályra kerülők halálozási aránya 80%; amit erősen indokolt lenne 50-60%-ra csökkenteni¹²¹.

Gyors, hatékony és pontos diagnózist kell felállítani az aktuális irányelvek követésével klinikai jelek és labor paraméterek alapján, meg kell előzni a súlyos oxigénadósság kialakulását, azaz el kell kerülni a célszervek hipoperfúzióját időben történő észleléssel és az oxigénszállítás javításával. A SIRS felismerése nem szokott nehézségekbe ütközni egyértelmű kritérium rendszere miatt, ami 2 vagy több tünet fennállását jelenti a következők közül: testhőmérséklet $<36^{\circ}\text{C}$ vagy $>38^{\circ}\text{C}$; szívfrekvencia $>90/\text{perc}$; légzésszám $>20/\text{perc}$ vagy CO_2 tenzió <32 Hgmm; fehérvérsejtszám $<4000/\text{mm}^3$ vagy $>12000/\text{mm}^3$ vagy $>10\%$ éretlen alak¹²². A szepszis igazolása viszont csak infekció bizonyításával lehetséges. Hangsúlyozni kell azonban azt is, hogy a fertőzőes (szeptikus) formán kívül, akut szisztémás gyulladás más kórképek kapcsán is kialakulhat, mint például traumás agysérülésben, politraumában, vagy akut pankreatitiszben. Évek óta folyamatosan kutatások tárgyát képezi olyan biomarker azonosítása, ami diagnosztikai szempontból biztonsággal alkalmazható lenne¹²¹, de ilyen

rutinszerűen mérhető, nagy szenzitivitású és specificitású marker még nem áll rendelkezésre. Alkalmos jelölt lehet a makrofág migrációs inhibitor faktor (MIF)¹²¹, amely szisztémás gyulladás során korán felszabaduló proinflammatorikus citokin¹²³, és hőszabályozási szerepét is bizonyítottuk^{124,125}, azonban diagnosztikai és prognosztikai szerepe szepszisben 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 szepszis 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^{126,127}. 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 függ¹²⁸.

Mind a láz, mind a hipotermia része az akut szisztémás gyulladás tünetének. Az utóbbi évtizedekben a láz biológiai jelentőségét illetően megállapításra került, hogy a láz a szervezet szempontjából előnyös, mert kísérletesen kimutatták, hogy például a gyíkok melegkereső viselkedéssel fokozzák T_m -üket, amikor patogén baktériumokkal fertőzöttek, így képesek túlélni az egyébként halálos betegségeket. Továbbá, evolúciós szempontból, ha a láz nem rendelkezne adaptív, előnyös funkciókkal, akkor ez az energetikailag költséges mechanizmus nem maradt volna meg az élőlények nagy részében az évmilliók során. A láz szervezetre kifejtett jótékony biológiai hatásával szemben a szisztémás gyulladás során időnként kialakuló hipotermia szerepe szinte teljesen elhanyagolt maradt. Ennek oka egyrészt, hogy a hipotermia megjelenése sokkal kevésbé gyakori, másrészt, hogy annak diagnózisára (részben a klinikai gyakorlatban használt hőmérők kialakítása miatt) ritkábban kerül sor, harmadrészt pedig, hogy magának a hipotermiának a megléte kevésbé jelentős a gyakorló orvos számára, hiszen olyankor

általában a beteg állapota nagyon súlyos, gyakran preterminális. A hipotermia megléte azonban korántsem feltétlenül káros, amelyet több kísérleti eredmény is alátámaszt (összefoglalásért, lásd Romanovsky és Székely¹²⁹). Ezt bizonyítja például, hogy amikor altatott kutyákban szeptikus sokkot hoztak létre fekália i.p. adásával és a kutyák egyik csoportjában külső hűtést alkalmaztak, hat órával később a kontroll csoportban 100% volt a mortalitás, míg a hűtésnek kitett kutyák esetén csak 36%. Egerekben endotoxin sokk kiváltása után öreg egerek lázzal, míg fiatalok hipotermiával reagáltak. Az utóbbiak túlélési aránya lényegesen jobb volt. Meg kell azonban azt is jegyezni, hogy a kísérleti modellekkkel 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 betegekknél, akiknél a megfelelő intenzív terápia mellett hűtést is alkalmaztak a hipotermia életmentőnek bizonyult^{130,131}. Ezzel ellentétben más tanulmányokban a hipotermia kialakulása pozitív korrelációt mutatott a halálozási aránnyal^{127,132}. A szeptikus láz és hipotermia mortalitással való összefüggésének megállapítása nagy elemszámú betegpopulációból származó adatok átfogó analízisével lenne lehetséges.

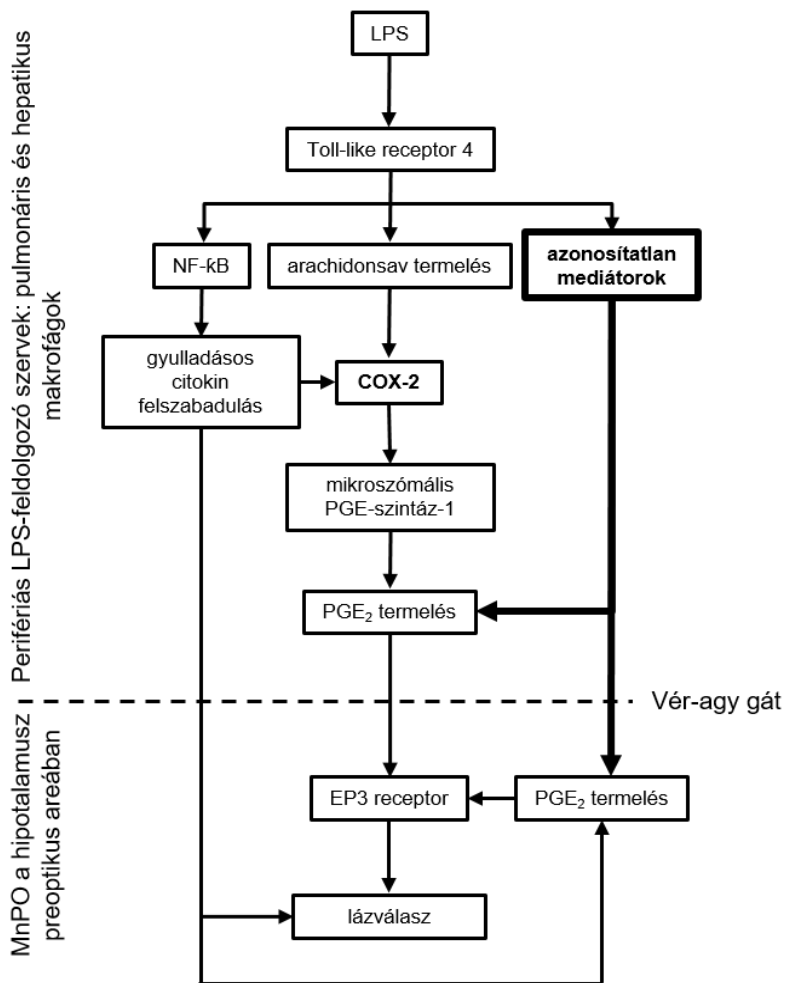
2.3.3. Az akut szisztémás gyulladás molekuláris mechanizmusai

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 gyulladásos mediátorainak felszabadulását idézik elő. Utóbbiak közé tartoznak a prosztaglandinok (PG) is. A PG-k 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 sejtjeiben indukálható. Ezek a venulák legsűrűbben a POA-ban, a ventrolaterális medullában és a 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 DP2 receptor kismértékben található csak meg az agyban, szerepe egyelőre kérdéses¹³³. 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 létrejöttéért¹³⁴.

Sokáig kérdéses volt, hogy az endogén pirogéneknek is nevezett gyulladásos citokinek (IL-1, IL-6, TNF- α) közvetlenül az agyba jutva fejtik ki hatásukat, vagy köztes mediátorokon keresztül, mint például a PG-k. Ezek a molekulák ugyanis túl nagyok ahhoz, hogy a vér-agy gáton nagy mennyiségben átjussanak. Igaz, hogy centrális injektálásuk esetén lázválasz kiváltható, de ez sokkal inkább encefalitiszre jellemző tünetekkel jár, mintsem szisztémás gyulladással. Kisebb mennyiségben azonban a gyulladásos citokinek átjuthatnak a vér-agy gáton, különösen a cirkumventrikuláris régiókban. Emellett, a citokinek aktív transzporttal is képesek bejutni a központi idegrendszerbe, hogy aztán kiváltsák a szisztémás gyulladásra jellemző tüneteket¹²⁸.

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 termelődő 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 termelődésének fokozódását váltja ki, ami az artériás és vénás vér PGE₂ szintjének emelkedéséhez vezet¹³⁵. 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 (8. ábra).



8. ábra: A lázválaszban résztvevő molekuláris mechanizmusok összefoglalása (részleteket lásd a szövegben).

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 kivédi¹³⁶. A preoptikus EP3 receptort expresszáló neuronok gamma-amino-vajsavat (GABA) termelnek, így gátolják azokat az idegi elemeket, amelyek a T_m emelkedését hozzák 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 konstriktiója, amelyért az MnPO-ból a rostrális raphe pallidus magokba (rRPa), majd onnan a szimpatikus preganglionaris neuronokba futó idegpálya aktiválása felelős. Másrészt, az MnPO-ban található neuronok másik csoportja a dorsomediális hipotalamusszal (DMH) áll összeköttetésben szintén az rRPa magokon keresztül és a barnazsír-szöveti hőtermelés szabályozásáért felelős. Előbbiek alapján tehát PGE₂ hatására rágszálókban 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^{128,133}. Természetesen a láz kialakulásában az előbbieken ismertetett autonóm mechanizmusok mellett viselkedési hőszabályozási mechanizmusok is szerepelnek (például meleg környezet keresése, betakarozás), de az ezekben szereplő központi idegrendszeri elemek még nagyrészt tisztázatlanok.

A TRPV1 csatornák aktivációja az idegvégződéseken (úgynevezett kapszaicin-szenzitív afferens idegrostokon) gyulladáshoz vezető mediátorok markáns felszabadulását is eredményezi. A felszabaduló anyagok közé tartozik, többek között, a P anyag (SP), a kolecisztokinin (CCK) és a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)^{137,138}. Figyelembe véve, hogy a neurokinin-1 (NK1) receptor, korábbi nevén SP receptor, szintén szerepet játszik lokális és szisztémás gyulladáshoz vezető folyamatokban, az SP jelátviteli útvonal szerepe is felmerül a láz mediálásában^{139,140}. Rágcsálók kezelése antagonistákkal, az LPS-re adott lázválasz gátlását okozta^{141,142}, illetve az LPS-indukálta láz csökkenése patkányokban megfigyelhető volt NK1 receptor blokkoló adása esetén is¹⁴³. Ezek a tanulmányok erősen alátámasztják, 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. Alternatív lehetőségek, például KO egerek használata segíthet annak jobb megítélésében, hogy a láz klasszikus molekuláris mechanizmusai közül, melyiket befolyásolhatja az NK1 receptor.

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 fel¹⁴⁴. A CCK energetikai szabályozásban betöltött szerepét már korábban leírták: patkányokon, majmokon és embereken végzett vizsgálatokban a CCK táplálékfelvétel-csökkentő (anorexigén) hatását figyelték meg¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. A CCK termoregulációban játszott szerepét, amely szintén az energiaegyensúly szabályozásának része (lásd 2.1. fejezet), a korai 1980-as években mutatták ki¹⁴⁸, majd később megfigyelték, hogy a kétféle CCK receptoron keresztül különböző hatással van a testhőmérsékletre¹⁴⁹. A CCK perifériásan adva a CCK₁ receptoron keresztül hipotermiát idéz elő^{150,151}, míg a központi idegrendszerbe juttatva a CCK₂ receptoron hatva lázszerű hipertermiás választ hoz létre^{151,152}. Ezek alapján a centrális CCK által indukált

hipertermia szerepet játszhat a szisztémás gyulladásban megjelenő láz kialakulásában. Hasonlóan a PGE által indukált testhőmérséklet emelkedéshez, az i.c.v. adott CCK-oktapeptid is bőr vazokonstriktó és barnazsír-szöveti termogenezis aktivációja által hoz létre hipertermiát¹⁵¹⁻¹⁵³. Továbbá, a CCK₂ receptor farmakológiai blokádjával az LPS láz első fázisa gátolható¹⁵³, míg a CCK₂ receptor génjének delécioja az LPS láz korai és késői fázisait is attenuálja¹⁵⁴, mely alapján elsősorban a centrális CCK jelátviteli utak játszanak szerepet a láz kialakulásában. Azonban az indometacin általi COX gátlás nem volt hatással a CCK által indukált hipertermiára^{153,155} és CCK receptor inhibitorok sem gátolták a PGE-indukálta hipertermiát¹⁵¹. Utóbbi eredmények megkérdőjelezik a CCK jelátviteli út termális hatásai 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 gyulladásos folyamatokban^{156,157}. 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^{158,159}, 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.

A szisztémás gyulladást kísérő T_m változások meghatározóak lehetnek a betegség kimenetelének szempontjából. A láz kialakulásának mechanizmusa ugyan több szempontból tisztázott, mégis folyamatosan derül fény új mediátorok szerepére, amelyek bizonyítják tudásunk hiányosságait, ugyanakkor jövőbeni gyógyszerek támadáspontjául szolgálhatnak (8. ábra). Fontos lenne olyan mediátorok azonosítása, amelyek szerepet játszanak a szisztémás gyulladás során kialakuló láz létrejöttében, annak érdekében, hogy a későbbiekben aktivitásuk stimulációjával, illetve gátlásával célzottan, termofarmakológiai módszerekkel, képesek legyünk a T_m -et, azon keresztül pedig a betegség kimenetelét és a halálozást is változtatni. Az endogén mediátorok által aktivált receptorális és intracelluláris jelátviteli útvonalak összetettek és magukba foglalnak lipid, peptid, gázszerű és egyéb – máig ismeretlen – jelátviteli molekulákat.

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, gyógyszerátadáspontok felfedezésére és kísérleti-, valamint 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. Értekezésemben ezt a három tanulmányt^{31,160,161} mind a célkitűzések felsorolásánál, mind pedig az eredmények ismertetésénél egyértelműen jelöltem és elkülönítettem az alapkutatói kísérletektől. Fontosnak tartom kiemelni, hogy a metaanalízis közlemények közül a TRPV1 antagonisták termális hatásait vizsgáló tanulmányunkban nemcsak korábban mások által már közölt humán T_m adatokat, hanem új, addig még nem publikált adatokat is elemeztünk, továbbá, hogy a metaanalízisen kívül az adatokat egy általunk korábban kifejlesztett, de az új vizsgálathoz átalakított, matematikai modellbe is betápláltuk és elemeztük³¹. Részletezett célkitűzéseink az alábbiak szerint csoportosíthatók.

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^{69,162}
- hipotermizáló TRPV1 antagonisták hatásmechanizmusának vizsgálata¹⁶³
- a TRPV1 antagonisták által indukált hipertermia idegi mechanizmusainak vizsgálata¹⁶⁴
- TRPV1 antagonisták által indukált hipertermia farmakológiai kihasználásának (repurposing) vizsgálata altatás során kialakuló hipotermia kivédésében¹⁶⁵

II. Humán adatok matematikai modellezése és metaanalízise:

- TRPV1 antagonisták termoregulatórikus hatásának vizsgálata³¹

3.1.2. A TRPM8 ioncsatorna fájdalomtalan hidegérzékelésben betöltött szerepének vizsgálata rágcsálókban¹⁶⁶

3.1.3. A TRPA1 ioncsatorna hőszabályozási szerepének vizsgálata állatkísérletekben

- a TRPA1 ioncsatorna hidegszenzor szerepének vizsgálata a hőszabályozási rendszerben¹⁶⁷

- a TRPA1 ioncsatorna szerepének tisztázása a H₂S által indukált hipotermia kialakulásában¹⁶⁸

3.2. Termo-TRP ioncsatornák vaszkuláris biológiai szerepének experimentális vizsgálata

3.2.1. A TRPV1 ioncsatorna szerepének vizsgálata a pH változásai által okozott vazomotoros válaszokban¹⁶⁹

3.2.2. Új kísérleti módszer kidolgozása vazomotor válaszok hőmérséklettől függő változásainak ex vivo tanulmányozására¹⁷⁰

3.3. Szisztémás gyulladós 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 állatokban¹⁷¹

- az SP jelátviteli útvonal hozzájárulásának vizsgálata LPS-indukálta láz kialakulásához NK1 receptor KO egerekben¹⁷²

- a CCK-COX interakció szerepének vizsgálata LPS-indukálta láz kialakulásában patkányokban¹⁷³

- a PACAP termoregulatórikus szerepének karakterizálása patkány és KO egér állatmodellekben¹⁷⁴

II. Metaanalízisek:

- a T_m eltéréseinek (láz és hipotermia) és a halálozás összefüggésének elemzése szeptikus betegekben¹⁶⁰

- a MIF diagnosztikai biomarker értékének elemzése szepszisben¹⁶¹

III. Prospektív klinikai vizsgálat:

- a szérum és vizelet MIF szintek kinetikája és a szepszis kimenetele közötti összefüggés vizsgálata¹⁷⁵

4. Anyagok és módszerek

Ebben a fejezetben a tanulmányaim során használt legfontosabb módszerek összefoglalását mutatom be, a vizsgálatokhoz kapcsolódó további részletes információ a megfelelő közleményekben található meg, amelyek hivatkozásait feltüntettem.

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). A kísérletek elvégzésére a Pécsi Tudományegyetem (PTE) Általános Orvostudományi Kar Transzlációs Medicina Intézetében (korábban Kórélettani és Gerontológiai Intézet) vagy kollaborátoraink intézményében [St. Joseph's Hospital and Medical Center (SJHMC), Phoenix, Arizona, USA] került sor. Az állatokat kevés faforgáccsal bélelt műanyag ketrecekben tartottuk, ahol standard rágcslótáp és csapvíz *ad libitum* rendelkezésükre állt. Az állatszobákban a sötét-világos ciklusok 12 óránként váltották egymást, a világos ciklus reggel 5:00-kor vagy 6:00-kor kezdődött intézménytől függően. A környezeti hőmérsékletet 21-28°C között tartottuk. Rendszeres súlyméréssel és a kísérleti ketrecekhez való alapos szoktatással az állatokat a kísérleti körülményekhez adaptáltuk. A kísérletek elvégzése során az alapvető állatkísérletes etikai normák betartásán túl, a PTE és az SJHMC állatkísérleti Etikai Bizottságainak engedélyeire támaszkodtunk.

4.1.2. *Műtéti beavatkozások*

A műtéteket ketamin + xilazin i.p. adásával indukált narkózisban végeztük (általános dózisok patkányoknál 55,6 + 5,5 mg/kg, egereknél 81,7 + 9,3 mg/kg). Az SJHMC-ben végzett műtéteknél izomlazításra acepromazint is kaptak az állatok (1,2 mg/kg i.p.). Fertőzések megelőzésére i.p. 6 mg/kg gentamycint vagy s.c. 1,1 mg/kg enrofloxacint adtunk. A narkózis a műtét típusától (i.p. vagy i.v. katéter beültetés, i.c.v. kanül implantáció, i.p. transzmitter implantáció) függetlenül azonos volt. Az implantált, lezárt végű kanüloket a tarkótájon vezettük ki (későbbi toldalék-csatlakoztatás céljából) – így hosszabb időn keresztül is kisebb volt a kanülok sérülésének veszélye. A műtéti

hipotermia mérséklésére egerekben a beavatkozásokat melegítő padon (Braintree Scientific vagy Supertech Instruments UK Ltd.) végeztük, a műtét után pedig az állatokat relatíve meleg (25-31°C) inkubátor kamrában tartottuk 6-10 órán át, majd az eredeti állatházi környezetbe helyeztük vissza őket. A katéterek (i.p., i.v. vagy i.c.v.) implantációja után általában 2-8 nap múlva került sor a kísérletekre, míg a transzmitter implantációt követően esetenként 10-14 napot is vártunk az állatok spontán cirkadián ritmusának visszatérése érdekében. Az idegi léziót célzó beavatkozásokra (teljes szubdiafragmatikus vagotomia, bilaterális splanchnicotomia, bilaterális cervikális funiculotomia) 7-23 nappal a kísérlet előtt került sor.

I.p. katéter implantáció: kisméretű metszést ejtettünk a hasfal középvonalában, majd egy pirogénmentes fiziológiás sóoldattal töltött polietilén (PE-50) katétert helyeztünk a hasüregbe. A katéter hasüreg felőli végét a hasfal bal oldalához öltöttük; a kanül külső végét a bőr alatt a tarkónál vezettük ki, majd egy öltéssel a bőrhöz rögzítettük, végül a kanül végének megolvasztásával légmentesen zártuk. A műtési sebet rétegesen összevarrtuk. A kanült a műtétet követő napon és azt követő minden második napon 0,1 ml fiziológiás sóoldattal öblítettük át^{69,163,165,166,168,172,173}.

I.v. katéter implantáció: kis longitudinális metszést ejtettünk a nyak ventrális részén, a trachea bal oldalán. A bal juguláris vénát izoláltuk, megtisztítottuk a környező szövetektől és disztálisan lekötöttük. Ezután az érfalat mikrosebészeti metszéssel megnyitottuk és egy heparinos (10 U/ml) fiziológiás sóoldattal töltött szilikon katétert vezettünk a juguláris vénán keresztül a superior véna kávába, amelyet behelyezése után kötésekkel az érfalhoz rögzítettünk. A katéter szabad végét csomóval légmentesen zártuk, majd a bőr alatt átjuttatva a tarkónál kiveztük. A nyak bőrén ejtett sebet öltésekkel zártuk. Az i.v. katétert a műtétet követő napon és utána minden második napon heparinos (10 U/ml) fiziológiás sóoldattal rendszeresen átmostuk a bealvadás és vérrögképződés elkerülése érdekében^{164-166,174}.

I.c.v. kanül implantáció: az i.c.v. anyagadáshoz egy 22 Ga méretű acél vezetőkanült ültettünk be az állatok jobb oldalsó agykamrájába sztereotaxiás műszer (Narishige Scientific Instruments Laboratory, David Kopf Instruments, vagy Lesnikov és Tsvetkova¹⁷⁶ saját prototípus) segítségével. Az állat fejét a műszerben rögzítettük, a fejtetőn a szőrt leborotváltuk, majd a bőrt felnyitottuk, a perioszteumot eltávolítottuk és a koponyacsontot megtisztítottuk. A koponyába két mikrocavart (Fine Science Tools) vezettünk be, majd egy apró lyukat fúrtunk egerekben a Bregmától 0,5 mm-re posterior és a középvonaltól 1,0 mm-re laterális irányba, amelyen keresztül a kanül végét a durától

2,0 mm mélyre vezettük be. Patkányokban a koordináták a következők voltak: Bregmától 1,0 mm poszterior, középvonaltól 1,5 mm laterális irányban, majd durától 3,8 mm mélységig bevezetve. A bevezetett kanült fogászati cementtel rögzítettük a mikrocsavarak segítségével, és egy lumen nélküli „ál” injektorral zártuk le^{69,168,172-174}.

Hőmérő eszköz implantáció: szabadon mozgó egerekben az abdominális hőmérséklet (a T_m egyik formája) méréséhez az állatokba egy miniatűr telemetria transzmittert (Mini Mitter) vagy adatgyűjtőt (Subcue Dataloggers) implantáltunk. A transzmitter az állatok lokomotoros aktivitását is folyamatosan regisztrálta. A mérőeszközöket középvonali laparotómia után az állatok peritoneális üregébe helyeztük és egy öltéssel a jobb oldalsó hasizomhoz rögzítettük. A műtét után az egerek visszakerültek saját ketrecükbe, amelyet transzmitter beültetés esetén a telemetria rendszer jelfogó tálcáira helyeztünk^{69,162,163,166,171,174}.

Teljes szubdiafragmatikus vagotomia: egy éjszakán át tartó táplálékmegevonást követően a patkányokat elaltattuk, majd a gyomrot középvonali felső laparotómián keresztül feltártuk és óvatosan kifelé húztuk, hogy a nyelőcső láthatóvá váljon. Megkerestük a nyelőcső mentén futó ventrális és dorzális vagális idegtörzseket és a rekeszizom alatt átvágtuk; a biztonság kedvéért a hepaticus vagális ágat külön átvágtuk. A kontroll állatokban a viscerát ugyanúgy megmozgattuk, de az idegeket nem vágtuk át¹⁶⁴. A vagotomia gasztrointesztinális szövődményeinek enyhítésére a vagotomizált patkányoknak a műtétet követő 9 napon keresztül ízesített, folyékony tápot (PMI Micro-stabilized Rodent Liquid Diet LD101; TestDiet) adtunk¹⁷⁷. A vagotomizált állatokban a gyomor mérete nagymértékben megnő a táplálék stagnálása miatt, a csökkent gasztrointesztinális tónus és motilitás következtében^{178,179}. A vagotomia teljességének sikerességét ezért a kísérletek végén a patkányok gyomorsúlyának megméréssel igazoltuk, hasonlóan korábbi vizsgálatokhoz^{177,180}.

Bilaterális splanchnicotomia: középvonali laparotómiát követően a gyomrot és a májat sóoldattal nedvesített gézzel elmozdítottuk a szubdiafragmatikus területről, hogy a hátsó hasfalat feltárjuk. Mindkét oldalon megnyitottuk a retroperitoneális teret, majd izoláltuk a nervus splanchnicus majort és átvágtuk – vagy egyetlen törzsként, vagy két vagy több osztódásként – közvetlenül a rekeszizom alatt, ahogyan korábbi tanulmányokban¹⁸¹. A kontroll állatokban az ideget mindkét oldalon feltártuk, de nem vágtuk át. A nervus splanchnicus major épsége szükséges a mellékvesekéreg válaszkészségének modulálásához¹⁸²: az adrenokortikotrop hormontól függetlenül szabályozza a kortikoszteron termelését, és splanchnicotomizált patkányoknál

kimutatták, hogy a vízmegvonási stresszre adott kortikoszteron válasz csökkent mértékű¹⁸³. A splanchnicotomia teljességének sikerességét ezért a kísérletek végén a patkányok 48 órás vízmegvonásra adott plazma kortikoszteron koncentrációjának mérésével ellenőriztük enzimhez kötött immunszorbens esszé (ELISA) segítségével (Assay Designs)¹⁶⁴.

Bilaterális cervikális funiculotomia: a hát felső részén, a nyakon és a fejen a bőrt leborotváltuk, majd a gerincoszlop felett az első és a második nyakcsigolya (C1 és C2) magasságában bemetsztük, és az alatta lévő izmokat széthúztuk. A C1 szintjén részleges laminectomiát végeztünk a gerincvelő dorzális megközelítésből való feltárásához. Szemészeti ollóval megnyitottuk a szubdurális teret, ezután mikroszikkével egy sekély vízszintes bemetszést hoztunk létre, amelynek célja a laterális funiculus dorzális aspektusának (dorzolaterális funiculus, DLF) átvágása volt C1 szinten. Az eljárást mindkét oldalon elvégeztük. A laminectomia által okozott defektusba zsírszövetet helyeztünk, majd felette az izmokat és a bőrt rétegesen összevarrtuk. A termofiziológiai kísérletek elvégzése után a felszálló nociceptív pályák sikeres megszakítását minden patkánynál megerősítettük úgy, hogy az állatok farkát 75% alkoholtartalmú hideg (−18°C) vízdalomba merítettük és megmértük a fark kirántásáig eltelt időt. A DLF kétoldali lézióját minden patkánynál szövettanilag is ellenőriztük. Csak azoknál a patkányoknál tekintettük „teljes” mértékűnek a léziót, amelyeknél a C1 szintjén a gerincvelő mindkét oldalán a célzott terület több mint 50%-át lefedő sérülés volt látható¹⁶⁴.

4.1.3. TRPV1 ioncsatorna deszenzitizáció és bizonyítási tesztsjei

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 érzéketlenségi állapot leírására használjuk³².

Egerekben, a teljes szervezetre kiterjedő (szisztémás) TRPV1 ioncsatorna deszenzitizáció eléréséhez három egymást követő napon, altatásban, egyre emelkedő dózisú RTX kezelést (10, 30, majd 100 µg/kg s.c.) végeztünk. A kontroll állatok RTX helyett vehikulumot kaptak. Az RTX kezelés kardiovaszkuláris komplikációinak kivédésére közvetlenül az RTX adása előtt az egerek aminofillin-terbutalin-atropin koktélt (1,92–0,02–0,02 mg/kg) kaptak i.p. Két héttel az RTX utolsó dózisának beadását követően, a TRPV1 ioncsatorna funkciójának hiányát szemtörlési teszttel erősítettük

meg. Ennek során 20 μ l 0,1%-os kapszaicin oldatot vagy vivőanyagát cseppentettük az egerek szemébe, majd egy percen keresztül regisztráltuk a szentörlések számát¹⁶⁹.

Lokális, hasüregre korlátozódó TRPV1 ioncsatorna deszenzitizáció elérésére patkányokban i.p. RTX (Sigma-Aldrich) kezelést alkalmaztunk 20 μ g/kg dózisban. A kontroll állatok vehikulumot (20%-os etanol) kaptak. Az RTX diszkomfortot és fájdalmat keltő hatására tekintettel az i.p. injekció beadására altatásban került sor. Ez a kezelés csak és kizárólag az abdominális afferenseket károsította^{62,72}, és a hatás néhány (2-3) hétig megbízhatóan kitartott. Az abdominális TRPV1 deszenzitizáció sikerességének és lokalizáltságának megítélésére két tesztet használtunk: a vonaglási (writhing) és a szentörlési tesztet. Előbbi az abdominális TRPV1 ioncsatornák funkciójának megítélésére szolgál, melynek során a patkányoknak 10%-os etanolban oldott RTX-t adtunk be i.p. (0,2 μ g/kg), majd 10 percen keresztül regisztráltuk jellegzetes vonaglási mozdulataik számát. A szentörlési teszt a kornea TRPV1 ioncsatornáinak funkcióját vizsgálja, amelyet patkányok esetében 2 μ g/ml koncentrációjú RTX oldat 20 μ l-ének a szembe csöppentésével végeztünk, majd a szentörlések számát 5 percen keresztül figyeltük. Minden bizonyítási tesztet a deszenzitizáló RTX (vagy vehikulum) oldat adását követő 6. és 16. nap között végeztünk el^{163,164}.

4.1.4. Termofiziológiai kísérleti elrendezések

A termoregulációs állatkísérleteket termoelem termometria, respirometriás termometria, telemetriás termometria vagy termográdiens kísérleti berendezésekben végeztük.

4.1.4.1. Termoelem termometria

Termoelem termometriai kísérleteinkben az állatokat egy henger alakú szűkítőketrecbe helyeztük és réz-konstantán termoelemekkel (Omega Engineering) szereltük fel a farkon a T_b , a kolonban pedig a T_m mérése céljából. A szűkítőketreczekhez az állatokat a kísérletet megelőző 8 napon keresztül minden nap több órán át szoktattuk a stresszmentes habituáció céljából. A T_m esetében a termoelemet a kolonba egereknél 3 cm, patkányoknál 10 cm mélyre helyeztük az anális szfinktertől, ragasztószalaggal a farkhoz rögzítettük és egy számítógéppel összekötött adatgyűjtő készülékhez (Cole-Palmer) csatlakoztattuk. A szűkítőketrecbe helyezett állatokat az adott kísérlethez meghatározott állandó T_k -t biztosító inkubátor kamrában (Forma Scientific, Biobase vagy PL Maschine Kft.) helyeztük el. 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, amelyet előzetesen feltöltöttünk a kísérlet során beadni szánt anyaggal vagy annak vivőanyagával. A PE-50 toldalék másik végét az inkubátor kamra falának nyílásán keresztül kiveztük és ahhoz i.c.v. injekciónál 10 µl-es (Hamilton), i.p. és i.v. anyagadásnál 1 ml-es fecskendőt (Becton Dickinson) csatlakoztattunk, amelyet egy infúziós pumpába helyeztünk (KD Scientific vagy Harvard Apparatus Inc.)^{69,163-168,172,173}.

4.1.4.2. *Respiometriás termometria*

A szűkítőketrebe helyezett állatokat termoelemekkel és PE-50 toldalékkal szereltük fel, ugyanúgy, mint a termoelem termometriás elrendezésben végzett kísérleteknél. Ezután az állatokat a ketreccel együtt indirekt kalorimetria elvén alapuló anyagcsere meghatározásra szolgáló berendezés egyik plexikamrájába helyeztük: PTE-n Oxymax (Columbus Inc.), SJHMC-ben Small Animal System (Sable Systems). A kamrákat lezártuk, szabályozható hőmérsékletű környezetbe tettük, és szobalevegővel folyamatosan átaramoltattuk. 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 elsősorban a nem-didergés barnazsír-szöveti termogenezis aktivitásának az indikátora^{69,163,165-168,172,174}.

4.1.4.3. *Telemetriás termometria*

Szabadon mozgó állatokon végzett kísérleteinkben az egerek T_m -ét és általános lokomotoros aktivitását telemetriás módszerrel folyamatosan monitoroztuk. Ez a módszer nem tette lehetővé a VO_2 és a T_b mérését, viszont saját ketrecükben élő állatokon hetekig lehetett megfigyeléseket végezni. A műtétilag i.p. implantált rádiótelemetriás transzmitter (Minimitter) jelei számára az állat műanyag doboza alatti fém lap szolgált antennaként. A jelek konvertálása után [hőmérséklet °C-ban, aktivitás mesterséges egységben („arbitrary unit”) kifejezve] az adatokat a gyártó szoftverének (Vitalview) segítségével komputeren tároltuk. Ez a módszer tette lehetővé a cirkadián hőmérsékleti változások analízisét^{69,162,163,166,171,174}.

4.1.4.4. *Termográdiens rendszer*

A termográdiens berendezés hat, egymással párhuzamos, 200 cm hosszú alumínium csatornából állt. Mindegyik csatorna alján egy második, belső, rozsdamentes acélból készült rácshálós padló volt található, a tetején pedig egy duplafalú műanyag fedő. Az összes csatornát mindkét végükön egy közös alumínium fal határolta, amely elválasztotta őket egy nagy, közös víztartálytól. A „meleg” oldali tartály vizét két elektromos fűtőegység (PolyScience) folyamatosan melegítette, ezáltal a csatornában a

T_k -t ezen az oldalon $30,0^\circ\text{C}$ -on tartotta. A „hideg” oldali tartályban egy nyíltkeringésű hűtő-fűtő pumpa folyamatosan 10% etilén-glikolt tartalmazó vizet áramoltatott annak érdekében, hogy a csatornában a T_k ezen az oldalon $20,0^\circ\text{C}$ legyen. 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. Ez a rendszer lehetővé tette a csatorna hosszanti irányában végzett lokomotoros aktivitás, valamint az adott időegység alatt megtett távolság (mozgási sebesség) meghatározását is⁶⁹.

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

Bizonyos kísérletekben testhőmérsékleti mérések helyett a bőr vérátáramlását vizsgáltuk egerekben¹⁶⁸ vagy a külső ferde hasizom vérátáramlását patkányokban¹⁶⁴. Az állatokat elaltattuk, majd egerek esetében deréktájékon a hát szőrét leborotváltuk és a hasonfekvő állatokat melegítő padra helyeztük (Supertech Instruments UK Ltd.), annak érdekében, hogy T_m -ük a kísérlet során végig 36°C maradjon. A korábban implantált i.c.v. kanülbe egy PE-50 toldalékhoz csatlakoztatott injektort helyeztünk, amely előre fel volt töltve nátrium-szulfid (Na_2S) oldattal vagy fiziológiás sóoldattal. Patkányok esetében a has bőrét középvonali metszésből felnyitottuk és a hasizomzatot a metaszternumtól a hasfal aljáig szabaddá tettük. A hasfal légzési kitéréseinek csökkentése érdekében a hasüreget $400\text{ ml}/\text{kg}$ levegővel egy fecskendő segítségével a jobb iliacalis régióban ejtett tűszúrásból felfújtuk. A bal oldali külső és belső ferde hasizom közé apró tűhegyet (304H28RW; MicroGroup) illesztettünk, amely kapszaicin (vagy vehikulum) oldattal feltöltött PE-50 toldalékhoz csatlakozott.

A vérátáramlás mértékét az egerek lumbális bőrében és a patkányok hasizmában PeriCam PSI rendszerrel mértük (Perimed AB), amely lézer folt interferencián alapuló képalkotást alkalmaz. A vérátáramlás változását (amely mesterséges egységekben került meghatározásra), az anyagadás előtti alapvonalhoz viszonyított változás értékében fejeztük ki^{164,168}.

4.1.6. Izometriás erő mérés izolált artéria szegmentumokban ex vivo

Az állatokat elaltattuk, majd a karotisz kommunisz artériát vagy a farok bőr artériájának középső részét mikrosebészeti eszközökkel operációs mikroszkóp (Olympus SZX7) alatt izoláltuk. Az izolált artéria proximális és disztális végét lekötöttük, majd a

kötések közötti szakaszt kimetszettük, és hűtött Krebs oldatba helyeztük (NaCl: 119,0 mM, KCl: 4,7 mM, KH₂PO₄: 1,2 mM, NaHCO₃: 25,0 mM, Mg₂SO₄: 1,2 mM, CaCl₂ × 2 H₂O: 1,6 mM, EDTA: 0,026 mM, glükóz: 11,1 mM). A használt anyagokat a VWR International-tól és a Sigma-Aldrich-tól rendeltük. Az érszakaszokat ezután 2 mm hosszú gyűrűkre daraboltuk. Kísérletenként 4 érgyűrűt használtunk fel, így ezekben a kísérletekben a jelzett elemszám (n) 4 mérést jelent ugyanabból az állatból. Az artériák eltávolítása után az állatokat 100 mg/kg pentobarbitál (Ceva Sante Animale) i.p. adásával túlaltattuk.

Az érgyűrűkben az izometriás erő változásainak mérését négy, 5 ml-es szervfürdőt tartalmazó DMT 610M miográf rendszerrel (Danish Myo Technology A/S) végeztük. Ehhez az érgyűrűket két volfrám drótra fűztük fel, amelyeket a miográf transzdúcereihez rögzítettünk. A drótok átmérője karotisz artéria esetében 0,04 mm, farokbőr artéria esetén 0,02 mm volt. Az 5 ml oldatot benne a rögzített érgyűrűvel a kísérlet során 95% oxigént és 5% szén-dioxidot tartalmazó gázkeverékkel (Linde) folyamatosan átáramoltattuk. 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 változtattuk¹⁶⁹, 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 állítottuk¹⁷⁰. A kísérlet kezdetén a gyártó javaslatainak megfelelően normalizálást hajtottunk végre, és az ereket 60 percig inkubáltuk stabilizálódásuk érdekében. Az erek életképességét minden kísérlet kezdetén és végén megerősítettük.

4.1.7. Anyagok és adásuk módjai

A kísérleteinkben használt legfontosabb anyagok nevét, forrását, alkalmazott dózisait, az anyagadás módjait és a kapcsolódó közleményt az 1. táblázat tartalmazza.

4.1.8. Molekuláris biológiai mérések és immunhisztokémia

4.1.8.1. Szövet- és vérminták gyűjtése

Vérminták gyűjtéséhez az LPS beadását követően az adott kísérletben meghatározott időpontnál – 40 perc¹⁷² vagy 12 óra¹⁷¹ – 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 végeztével az állatokat túlaltattuk.

1. táblázat: A kísérleteink során vizsgált anyagok legfontosabb tulajdonságai

| Anyag neve | Rövidítés | Gyártó vagy forgalmazó | Anyagadás módja | Dózis (mg/kg <i>in vivo</i> vagy mol/l <i>ex vivo</i>) | Referencia száma |
|---|---|-------------------------|------------------------|--|---------------------|
| A-1165901 | — | Abbvie | i.p. | 3 vagy 10 | 163 |
| A967079 | — | Abbvie | i.g.* | 30 | 167 |
| AMG 517 | — | Amgen | s.c. | 0,21 | 171 |
| | | | i.p. vagy i.v. | 1 | 165 |
| | | | i.v. | 0,1 | 164 |
| AMG0347 | — | Amgen | i.p. vagy i.v. | 0,05 | 69,164 |
| AMG2850 | — | Amgen | i.g. | 30 | 167 |
| AMG7905 | — | Amgen | i.p. | 10 | 163 |
| AMG8163 | — | Amgen | i.v. | 0,07 | 164 |
| Anandamid | AEA | Tocris | i.p. | 15 | 69 |
| BCTC | — | Tocris | <i>ex vivo</i> | 10 ⁻⁶ | 169 |
| CL316243 | — | Tocris | i.v. | 1 | 164 |
| Compound 43 | — | Amgen | i.g. | 30 | 167 |
| Etoricoxib | — | Merck & Co. | i.p. | 10 | 173 |
| Fenilefrin | — | Sigma-Aldrich | <i>ex vivo</i> | 10 ⁻¹⁰ –10 ⁻⁵ 10 ⁻⁸ –10 ⁻⁴ | 169 170 |
| GY4137 | — | University of Exeter | i.c.v. | 3 | 168 |
| Hidrogén-klorid | HCl | VWR | <i>ex vivo</i> | 10 ⁻⁶ –10 ⁻² | 169 |
| Hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid | PACAP | Szegedi Tudományegyetem | i.c.v. i.v. | 0,01 vagy 0,1 0,1 | 174 174 |
| Kapszaicin | — | Reanal | <i>ex vivo</i> i.m. | 10 ⁻¹⁰ –10 ⁻⁵ 1 | 169 164 |
| Kálium-klorid | KCl | VWR | <i>ex vivo</i> | 10 ⁻¹⁰ –10 ⁻⁵ 0,06 vagy 0,09 | 169 170 |
| Ketamin** | | Richter | i.p. | 50 vagy 100 | 165 |
| Kolecisztokinin | CCK | Bachem | i.c.v. | 1,7×10 ⁻³ | 173 |
| Lipopoliszacharida | LPS | Sigma-Aldrich | i.v. i.p. | 0,01 0,12 40 | 173 172 171 |
| M8-B | M8-B | Amgen | i.p. | 6 | 166 |
| Meloxicam | — | Boehringer Ingelheim | i.p. | 10 | 173 |
| Metamizol | — | Sanofi | i.p. | 120 | 173 |
| Nátrium-hidroxid | NaOH | VWR | <i>ex vivo</i> | 10 ⁻⁶ –10 ⁻² | 169 |
| Nátrium-szulfid | Na ₂ S × 9 H ₂ O | Sigma-Aldrich | i.c.v. i.p. | 0,5 vagy 1 5 | 168 168 |
| P anyag | SP | Tocris | i.c.v. | 0,1 | 172 |
| Prostaglandin E ₂ | PGE ₂ | Tocris | i.c.v. | 3,3×10 ⁻³ | 172 |
| Reziniferatoxin*** | RTX | Sigma-Aldrich | i.c.v. i.p. | 2×10 ⁻⁵ 2×10 ⁻⁵ vagy 2×10 ⁻³ 1,5×10 ⁻³ | 69 69,164 166 |
| YM022 | — | Tocris | i.c.v. | 0,01 | 173 |

*i.g., intragasztrikusan; **Ketamin felhasználását műtéti beavatkozásokhoz lásd 4.1.2. fejezetben; ***RTX felhasználását TRPV1 deszenzitizációra lásd 4.1.3. fejezetben.

Tüdő-, máj- és agyszövet gyűjtésekor – immunoesszé, Western blot és kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR) mérésekhez – az LPS beadása után 40 perccel elaltatott egereket a bal kamrán keresztül 0,1 mol/l koncentrációjú foszfáttal pufferolt fiziológias sóoldattal (PBS) perfundáltuk¹⁷². 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^{173,174} és TRPA1 mRNS *in situ* hibridizáció¹⁶⁸ vizsgálatához az állatokat elaltattuk, a mellkast feltártuk, majd a bal kamrán keresztül 0,1 mol/l 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.

4.1.8.2. Immunoesszé

ELISA módszert használtunk a TNF- α szérumszintjének meghatározásához, kereskedelmi forgalomban elérhető csomagok (MEM-004A; SABiosciences vagy BD OptEIA; BD Biosciences) segítségével a gyártó előírásainak megfelelően^{171,172}. A PGE₂ szöveti koncentrációit a tüdőben, májban és agyban szintén kereskedelmi forgalomban lévő ELISA csomag segítségével mértük meg (katalógusszám: 514010; Cayman Chemical)¹⁷². A mérésekhez LabSystem Multiskan RC spektrofotométert (Thermo Scientific) használtunk.

Az IL-6 szérumszintjét Luminex xMAP technikával határoztuk meg egy immunoesszé csomag segítségével (katalógusszám: LMC0003; Invitrogen)¹⁷². Luminex 100 készüléket (Luminex Corporation) és a gyártó által ajánlott szoftvert használtuk a gyöngyök medián fluoreszcens intenzitásának analízisére. A méréseket minden esetben két technikai ismétlésben végeztük el. Az adatokat a Masterplex 2.0 szoftverrel elemeztük.

4.1.8.3. COX-2 fehérje szintjének meghatározása Western blot módszerrel

A tüdő, máj és agyi szövetmintákat 50 mmol/l, jéghideg Tris-pufferben (pH = 8,0) homogenizáltuk, ami tartalmazott 1:100 arányban proteáz gátló koktélt és 50 mmol/l nátrium-vanadátot (Sigma-Aldrich). Az agyi szövetminták speciális előkészítése után (részletekért, lásd Pákai és mtsai.¹⁷²), a tüdő, máj és agyi minták feldolgozása hasonló módon történt. A mintákhoz kétszeresen koncentrált nátrium-dodecil-szulfát-

poliakrilamid gél elektroforézis mintapuffert adtunk, majd a fehérjéket 10%-os gélen szétválasztottuk és nitrocellulóz membránra vittük át. Egy óra blokkolás után (2%-os nem zsíros tejjel Tris-pufferelt sóoldatban), a membránokat 4°C-on egy éjszakán át reagáltattuk a primér antitesttel, amely a COX-2 fehérjéhez kötött (katalógusszám: ab15191; Abcam Plc.). Referencia fehérjének gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenázt (GAPDH) használtunk. A membránokat 6-szor 5 percig 0,1% Tween-t tartalmazó Tris-pufferelt sóoldattal mostuk, mielőtt a kecskében termeltetett nyúlelleses másodlagos antitestet hozzáadtuk (Bio-Rad). Ezután a membránokat az előbbiekhöz hasonlóan ismét lemostuk, majd az antigén-antitest komplexumokat kemilumineszcencia segítségével vizualizáltuk. Szkennelés után az eredményeket ImageJ szoftverrel (NIH) számszerűsítettük.

4.1.8.4. COX-2 mRNA expresszió meghatározás qRT-PCR módszerrel

Az RNS izolálást TRI reagens (Molecular Research Center Inc.) és Direct-Zol RNS izoláló készlet (Zymo Research) segítségével végeztük a gyártó utasításainak megfelelően¹⁷². A genomiális DNS eltávolításához Dnase I-t (Zymo Research) használtunk, majd az RNS mennyiségét Nanodrop ND-2000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies Inc.) határoztuk meg. Ezt követően, 1 µg tisztított RNS-ből cDNS-t szintetizáltunk reverz-transzkripció PCR segítségével, amihez Maxima First Strand cDNA Synthesis csomagot (Thermo Scientific) használtunk. A cDNS mintákból a célgén relatív expresszióját Stratagene Mx3000P qPCR készülékkel (Agilent Technologies) határoztuk meg, háztartási génként GAPDH-t használtunk. A mérést minden esetben 2 µl cDNS, 10 µl Luminaris Color HiGreen Low ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific), 0,3 µmol/l primer és 6,8 µl víz alkalmazásával hajtottuk végre. A minták mérése minden esetben három technikai ismétlésben történt. A mérés során végrehajtott disszociációs görbe analízis az amplifikációs reakció specifikusságát igazolta. A génexpresszió mértékét a választott referenciagénekhez viszonyítva a $\Delta\Delta C_t$ módszerrel megfelelően számítottuk¹⁸⁴. A következő primereket használtuk:

GAPDH forward: 5'-TTCACCACCATGGAGAAG-3'

GAPDH reverse: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'

COX-2 forward: 5'-GGGTTGCTGGGGGAAGAAA-3'

COX-2 reverse: 5'-CTCTGCTCTGGTCAATGGAGG-3'

Az amplifikálást a következők szerint végeztük: 95°C 10 min, majd 40 ciklus 95°C-on 30 s, 60°C-on 45 s, 72°C-on 45 s.

4.1.8.5. *c-Fos immunhisztokémia*

A *c-Fos* fehérje a sejtmagban felhalmozódva akut neuronális aktivációs markerként szolgál¹⁸⁵. Expressziójának immunhisztokémiai vizsgálatához az agyakat koronális síkban vibratómmal (Lancer, Ted Pella Inc.) 30 µm vastagságú szeletekre metszettük, majd fagyálló oldatban –20°C-on tároltuk^{173,174}. A metszeteket 6-szor 10 percen át 0,1 mol/l koncentrációjú PBS-ben mostuk, ezt követően előbb 0,5%-os Triton X-100 detergensben (Sigma Chemical), majd 2% normál kecske szérumot (Jackson Immunoresearch Europe Ltd) tartalmazó PBS-ben inkubáltuk 30 percig. A mintákat ezután szobahőmérsékleten egy éjszakán át inkubáltuk *c-Fos* ellen nyúlban termeltetett poliklonális antiszérum (sc-52, Santa Cruz Biotechnology Inc.) 1:500 arányban hígított oldatában. Másnap, 3-szor 10 percig PBS-sel mostuk a metszeteket, ezt követően a blokkoló szérum és a biotinilált kecske anti-nyúl IgG 1:200 arányú oldatában inkubáltuk őket 2 órán át 20°C-on. Ezután a mintákat hideg PBS-sel leöblítettük, 1 órán keresztül avidin-biotin-komplex oldatában (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories) 20°C-on inkubáltuk, majd 3-szor 10 percig mostuk PBS-sel. Az előhívást Tris pufferben oldott 0,02% diaminobenzidinnel (D5637, Sigma Chemical) végeztük 0,03% H₂O₂ (Sigma Chemical) jelenlétében. A színreakciót sztereomikroszkóp segítségével követtük az optimális kontrasztháttér megjelenéséig (10 percen keresztül), majd PBS segítségével állítottuk le. Az agyszeleteket zselatinos tárgylemezre húztuk, szárítottuk, 2-szer 10 percig xilollal tisztítottuk, majd DePex rögzítőoldattal (Fluka) lefedtük.

Metszeteinkről Nikon Microphot FXA mikroszkóp és Spot RT color digitális kamera (Nikon) segítségével digitális fotókat készítettünk. 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 MnPO¹⁷⁴, patkányoknál az MPO, dorzális hipotalamikus area (DA), rRPa és a ventromediális hipotalamusz (VMH) voltak¹⁷³. Az objektivitás érdekében a számlálást végző kutató rágcsálók neuroanatómiájában szakértő volt, de nem ismerte az adott állat, illetve szövettani preparátum csoportbeli hovatartozását.

4.1.8.6. *TRPA1 mRNS in situ hibridizáció (RNAscope)*

Az agyakat posztfixálás után PBS-ben öblítettük, dehidratáltuk és paraffinba ágyasztuk¹⁶⁸. Mikrotómmal (HM 430; Thermo Fisher Scientific) 5 µm-es metszeteket készítettünk. A vizsgálatához az RNAscope Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2-t

használtuk a gyártó előírásai szerint. Paxinos és Franklin¹⁸⁶ atlaszának koordinátái alapján az MPO, a DMH, a laterális parabrachialis mag (LPB) és az rRPa régiókról fluoreszcens képeket készítettünk Olympus Fluoview FV-1000 konfokális mikroszkóp és Fluoview FV-1000S-IX81 képgyűjtő szoftverrendszer segítségével.

4.1.9. Adatfeldolgozás és statisztikai analízis

A hőleadási állapot jelzésére a hőleadási indexet (HLI) használtuk, amely index akár gyorsan változó T_k mellett is jól alkalmazható:

$$HLI = (T_b - T_k) / (T_m - T_k)$$

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 (a független változók számának megfelelően egy-, két-, vagy háromutas). Független változónak általában a kezelési csoportot, genotípust, illetve az időt tekintettük. Az ANOVA után 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. A statisztikai tesztek elvégzéséhez Statistica AX'99 (Statsoft), Sigmaplot 11.0 (Systat Software) és Excel (Microsoft) szoftvereket használtunk. A különbséget szignifikánsnak tekintettük ha $p < 0,05$. Az ábrákon és a szövegben legtöbbször átlag \pm standard hiba (SE) van feltüntetve, ahol mégsem ott az adatok formátumát az eredmények ismertetésekor külön feltüntettem.

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

4.2.1. Metaanalízisek

4.2.1.1. Keresési stratégiák

Metaanalíziseinkben a PubMed, EMBASE és Cochrane Library (CENTRAL) adatbázisokban végeztünk keresést. Az egyes analízisekben használt keresési kulcsszavak a tanulmányra specifikusak, azokat a 2. táblázat tartalmazza. Mindegyik tanulmányt a PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis Protocols) iránymutatásai szerint végeztük el¹⁸⁷. Kérdéseink szakszerű megformáláshoz a „Participants (= vizsgált populáció), Intervention (= vizsgált marker vagy beavatkozás), Comparison (= kontroll marker vagy beavatkozás), Outcome (=

kimeneteli indikátor)”, röviden PICO, modellt vettük alapul. Metaanalíziseinket a vizsgálat megkezdése előtt a PROSPERO (International Prospective Register of Systematic Reviews) rendszerében regisztráltuk az ajánlásoknak megfelelően. A keresést két szerző külön-külön végezte, akik egyben kiértékeltek a tanulmányok bevonhatóságát az analízisbe az előre meghatározott kritériumok alapján. Az eltérő véleményezés megoldására konszenzussal, szükség esetén harmadik fél bevonásának segítségével került sor. A kereséseket szűrők beállításával emberekben végzett tanulmányokra korlátoztuk.

2. táblázat: Metaanalíziseinkben használt keresési kulcsszavak és találati eredmények (a tanulmányok célkitűzésekben jelölt sorrendje szerint)

| Vizsgálat rövid összefoglalása | Keresési kifejezés | Keresési időtartam vége | Összes / beválogatott találatok száma | Kvantitatív analízisbe bevont alanyok száma | Referencia száma |
|---|---|-------------------------|---------------------------------------|---|------------------|
| TRPV1 antagonisták termális hatása | (TRPV1 OR TRPV-1 OR VR1 OR VR-1 OR vanilloid OR capsaicin) AND (antagonist OR blocker OR inhibitor) AND (temperature OR hyperthermia OR fever OR hypothermia) | 2019. február | 1059 / 5 | 180* | 31 |
| T _m eltéréseinek összefüggése szepszis kimenetelével | sepsis OR bacteremia OR "septic syndrome" AND ("body temperature" OR fever OR hypothermia OR normothermia OR hyperthermia) AND (mortality OR survival) | 2016. február | 6083 / 42 | 10834 | 160 |
| MIF biomarker szerepe szepszisben | ("macrophage migration inhibitory factor" OR MIF) AND (sepsis OR septic) | 2019. december | 621 / 21 | 1876 | 161 |

*20 alany korábban még nem publikált adatait a Purdue Pharma bocsátotta rendelkezésünkre a metaanalízis és a matematikai modellezés (részletekért, lásd 4.2.3. fejezet) elvégzése céljából.

4.2.1.2. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzést a metaanalízisek standard módszereinek megfelelően végeztük biostatistikus kollégák segítségével. Az eredményeket legtöbbször erdőgrafikonok („forest plot”) formájában összegeztük. A publikációs torzítást tölcsergrafikonokban („funnel plot”) fellelhető asszimmetria vizuális ellenőrzésével, a Duval és Tweedie „trim and fill” módszerrel és az Egger-tesztel értékeltük ($p < 0,1$ jelentett publikációs torzítást). A tanulmányok közötti heterogenitást Q homogenitási teszttel és I^2 statisztikai teszttel vizsgáltuk ($I^2 > 50\%$ jelentett szignifikáns heterogenitást). Az elemzéseket a Stata (StatCorp LLC) és a Comprehensive Meta-Analysis (Biostat) szoftverekkel végeztük.

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. Fontosnak tartom kiemelni, hogy az elemzésbe a korábban már publikált adatokon kívül, új addig még nem közzétett humán adatokat is bevontunk³¹.

A matematikai modell alapjául a Ph.D. munkám során állatokban kifejlesztett és alkalmazott módszernek⁷⁰ a humán adatokhoz való módosítása szolgált. Röviden, a hipertermiás indexet (H) egy TRPV1 antagonistá esetében a szer beadása előtti (0. órai) és a beadást követő 3. óránál mért T_m különbségeként határoztuk meg³¹. Feltételeztük, hogy a hipertermizáló hatás a három, egymástól függetlennek tekintett TRPV1 csatorna aktivációs mód gátlásaként jön létre, amelyek a hő (M_1), protonok (M_2) és kapszaicin (M_3) általi aktivációs módok. Ezek alapján:

$$H = H(\Delta M_1, \Delta M_2, \Delta M_3),$$

amely képletben ΔM_i annak az értéke, hogy a TRPV1 antagonistá milyen mértékben gátolja az i -edik aktivációs módot (i lehet 1, 2 vagy 3). A j -edik antagonistá esetén (j értékei 1 és 4 között változhattak), a gátlás mértékét minden aktivációs módban az alkalmazott dózis (D) függvényének tekintettük:

$$\Delta M_i = \Delta M_i(D_j).$$

Előbbieket alapján, a hipertermizáló hatás, vagyis a H szintén dóziszfüggő:

$$H = H(D_j) = H(\Delta M_1(D_j), \Delta M_2(D_j), \Delta M_3(D_j)).$$

A $H(D)$ összefüggést minden antagonistá 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. A k_i megállapításához minden analizált antagonistá $H(D)$ adataira egy szigmoid görbét illesztettünk, amelyet gyakran használnak a farmakológiában a dóziszfüggő hatások vizsgálatához^{188,189}:

$$H(D) = v_0 + \frac{v_1}{e^{-(w_0 + w_1 D)} + 1}.$$

A fenti egyenletben, v_0 , v_1 és w_0 konstans, míg a w_1 koefficiens a következőképpen definiáltuk:

$$w_1 = \frac{k_1}{d_1} + \frac{k_2}{d_2} + \frac{k_3}{d_3},$$

ahol d_i az antagonista 50%-os inhibitor koncentrációja (IC_{50}) a TRPV1 csatorna i -edik aktivációs módjában.

A fentiekben leírtakból következően, a $H(D)$ függvény hat ismeretlen paramétert tartalmazott: a szenzitivitási koefficienseket (k_1 , k_2 és k_3) és a konstansokat (v_0 , v_1 és w_0), amelyeket mind meg tudunk határozni a bemutatott matematikai modellnek a 3. táblázatban összefoglalt adatokhoz való lehető legjobb illesztésével. Ennek a táblázatnak mindegyik sora megfelelt 1-1 egyenletnek, így összesen 15 egyenletet kaptunk.

Annak érdekében, hogy nemlineáris modellünkben a közelítési hibát minimalizáljuk, illetve, hogy a modell illesztési eredményeinek statisztikai szignifikanciáját megbecsüljük, figyelembe vettük a H statisztikai varianciáját. Monte Carlo szimulációs módszerrel¹⁹⁰ tíz, véletlenszerűen generált adatsort hoztunk létre, amelyek Gauss-eloszlást követtek, és kiindulási alapjukként a 3. táblázatban található átlag és standard deviáció (SD) értékek szolgáltak. Az így generált adatsorokat használtuk az ismeretlen paraméterek (k_1 , k_2 , k_3 , v_0 , v_1 és w_0) meghatározására a legkisebb négyzetek módszerével¹⁹¹. A tíz adatsor alapján előzetes közelítést végeztünk, majd további adatsorokat generáltunk, úgy, hogy mind a hat ismeretlen paraméter esetében hús különböző adatsor álljon rendelkezésünkre, amelyekből kiszámoltuk az egyes aktivációs módok szenzitivitásának átlagértékeit és eloszlási valószínűségét. Feltételeztük, hogy a 0. és 3. órában mért T_m értékek egymástól függetlenek. Mindezek alapján, a H statisztikai eloszlása (a 0. és 3. órai T_m különbség) meg kell egyezzen a 3. táblázat megfelelő SD értékeinek négyzetösszegével, amelyek a mért eloszlások valószínűségét adják meg.

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

4.2.3.1. Betegek

2012. január és 2015. május között 51 szeptikus beteget vontunk be prospektív, megfigyeléses vizsgálatunkba a PTE Klinikai Központ Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Osztályán¹⁷⁵. Vizsgálati protokollunkat a PTE Regionális Kutatási Etikai Bizottsága hagyta jóvá (regisztrációs szám: 2406/2005), és a vizsgálatot a 2008-as Helsinki Nyilatkozatban foglalt etikai normáknak megfelelően végeztük. Minden módszert a vonatkozó irányelveknek és előírásoknak megfelelően alkalmaztunk.

3. táblázat: A TRPV1 antagonisták T_m és IC_{50} adatai, amelyek bekerültek matematikai elemzéseinkbe³¹

| TRPV1 antagonista | Dózis (μ mol) | T_m 0. óra ($^{\circ}$ C) | | T_m 3. óra ($^{\circ}$ C) | | 3. – 0. órai T_m különbség ($^{\circ}$ C)* | | Alanyok száma | Referencia száma | IC_{50} értékek a humán TRPV1 csatorna különböző aktivációs módjaiban (nM) | | | |
|----------------------|-----------------------|------------------------------|-----|------------------------------|-----|--|-----|------------------|-------------------------------------|---|-----------------|---------------------------|------------------|
| | | Átlag | SD | Átlag | SD | Átlag | SD | | | Hő | pH (5,0-5,5) | Kapszaicin (50-100 nM) | Referencia száma |
| ABT-102 | 2,9 | 37,0 | 0,3 | 37,3 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 8 | 66,67 | 100 | 79 | 7,9 | 192 |
| | 5,7 | 36,5 | 0,3 | 37,2 | 0,3 | 0,7 | 0,4 | 20 | | | | | |
| | 11 | 36,7 | 0,3 | 37,4 | 0,3 | 0,7 | 0,5 | 14 | | | | | |
| | 17 | 36,3 | 0,2 | 37,4 | 0,3 | 1,1 | 0,4 | 6 | | | | | |
| | 23 | 36,5 | 0,3 | 37,2 | 0,2 | 0,7 | 0,4 | 6 | | | | | |
| | 52 | 36,3 | 0,2 | 37,6 | 0,3 | 1,3 | 0,4 | 6 | | | | | |
| | 86 | 36,2 | 0,2 | 37,5 | 0,2 | 1,3 | 0,3 | 6 | | | | | |
| | 115 | 36,5 | 0,3 | 37,6 | 0,2 | 1,1 | 0,4 | 6 | | | | | |
| AZD1386 | 225 | 36,8 | 0,3 | 37,2 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 40 | 193 | 100 | 79 | 7,9 | 194** |
| NEO6860 | 1149 | 36,6 | 0,3 | 36,4 | 0,3 | -0,2 | 0,4 | 52 | 195 | >10000 | >10000 | 31,62 | 194** |
| V116517 | 68 | 37,0 | 0,2 | 37,1 | 0,3 | 0,1 | 0,3 | 4 | Korábban nem publikált adatok*** | 40 | 35 | 196 | |
| | 226 | 36,9 | 0,3 | 37,1 | 0,3 | 0,2 | 0,4 | 4 | | | | | |
| | 678 | 36,8 | 0,1 | 37,0 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 4 | | | | | |
| | 1357 | 36,8 | 0,2 | 37,2 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 4 | | | | | |
| | 2261 | 36,9 | 0,2 | 37,4 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | 4 | | | | | |

*Ezeket az adatokat használtuk a hipertermiás index H értékeiként (részleteket lásd a szövegben). **A TRPV1 csatorna aktiválásához alkalmazott hőmérséklet, pH és kapszaicin koncentráció nem derült ki a közleményből. ***A vizsgálatban résztvevők egyéni adatait a Purdue Pharma bocsátotta rendelkezésünkre.

4.2.3.2. Beválogatási és kizárási kritériumok

A vizsgálatba olyan szeptikus betegeket vontunk be, akiknél az intenzív osztályra való felvételkor a szérumban procalcitonin szintje emelkedett volt. Kizártuk azokat a betegeket, akik 18 év alattiak vagy 85 éven felüliek voltak, illetve akik megtagadták a vizsgálatban való részvételt. A betegeknél a MIF szérumban és vizeletben szintjeinek mérésén kívül a diagnosztikai és kezelési eljárások mindenben megegyeztek a sepszisre vonatkozó irányelvekkel.

4.2.3.3. Adatgyűjtés

A demográfiai adatokat minden bevont betegről begyűjtöttük. A halálozást az intenzív osztályra való felvételtől számított 90 napig követtük nyomon. A laboratóriumi paramétereket, beleértve a C-reaktív fehérjét, a procalcitonin, a laktát, a karbamid és a kreatinin szérumban koncentrációját, valamint a sejtszámokat, az intenzív osztályra való felvételtől számított 0., 2. és 4. napon mértük. Ugyanezeket a napokon meghatároztuk a kreatinin és az összfehérje vizeletkoncentrációját, valamint a becsült glomeruláris filtrációs rátát is. Az intenzív osztályra való felvételkor kiszámítottuk a SOFA (Sequential Organ Failure Assessment)¹⁹⁷, a SAPS II (Simplified Acute Physiology Score)¹⁹⁸ és az APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation)¹⁹⁹ pontszámokat. A veseműködési zavart a szérumban kreatininszintjének a kiindulási szinthez viszonyított több mint 50%-os emelkedéseként határoztuk meg a RIFLE (Risk of renal dysfunction; Injury to the kidney; Failure of kidney function, Loss of kidney function, and End-stage kidney disease) kritériumoknak megfelelően²⁰⁰.

4.2.3.4. A MIF koncentráció mérése

A MIF szintjének méréséhez vizelet- és vénás vérmintákat gyűjtöttünk az intenzív osztályra való felvételtől számított 0., 2. és 4. napon. A vért Vacutainer szérumsövekbe gyűjtöttük, amelyek szilikonbevonatot tartalmaztak a véralvadás gyorsítására (Becton, Dickinson and Company), majd a csöveket legalább 60 percig szobahőmérsékleten tartottuk, hogy a vér megalvadjon. Szobahőmérsékleten végzett centrifugálás (1300 g 10 percig) után a szérumban összegyűjtöttük, majd feldolgozásig -70°C -on tároltuk. A MIF szintjét a vizeletben és a szérumban standard ELISA módszerekkel (katalógusszám: DY289; R&D Systems) határoztuk meg a gyártó ajánlásainak megfelelően. A leolvasást 450 nm-en iEMS MF mikrofotométerrel (Thermo Labsystem) végeztük.

4.2.3.5. Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai elemzését az R szoftverrel végeztük (3.6.1 verzió; R Development Core Team). A Mann-Whitney-tesztet használtuk a túlélők és a nem túlélők közötti szignifikáns különbségek kimutatására a vizelet és szérum MIF szintek tekintetében. Az alcsoportok elemzése ANOVA segítségével történt, amelyben a szérum MIF vagy a vizelet MIF volt a függő változó, míg az idő és a nem vagy az életkor volt a független változó. Annak elemzésére, hogy a MIF szintjeinek időbeli változásai a szepszis során jelentős prediktív értékkel bír-e, kiszámítottuk a szérum MIF változását a 0. naptól a 4. napig, majd a változást Mann-Whitney-teszttel hasonlítottuk össze a túlélők és a nem túlélők között. A MIF kinetikájának különböző mintázatait mutató csoportokban gyakorisági táblázatokat készítettünk a halálozásra vonatkozóan, majd a halálesetek számát Fisher-teszttel hasonlítottuk össze a csoportok között.

5. Eredmények

5.1. *Thermo-TRP* ioncsatornák szerepének tanulmányozása a testhőmérséklet szabályozásában

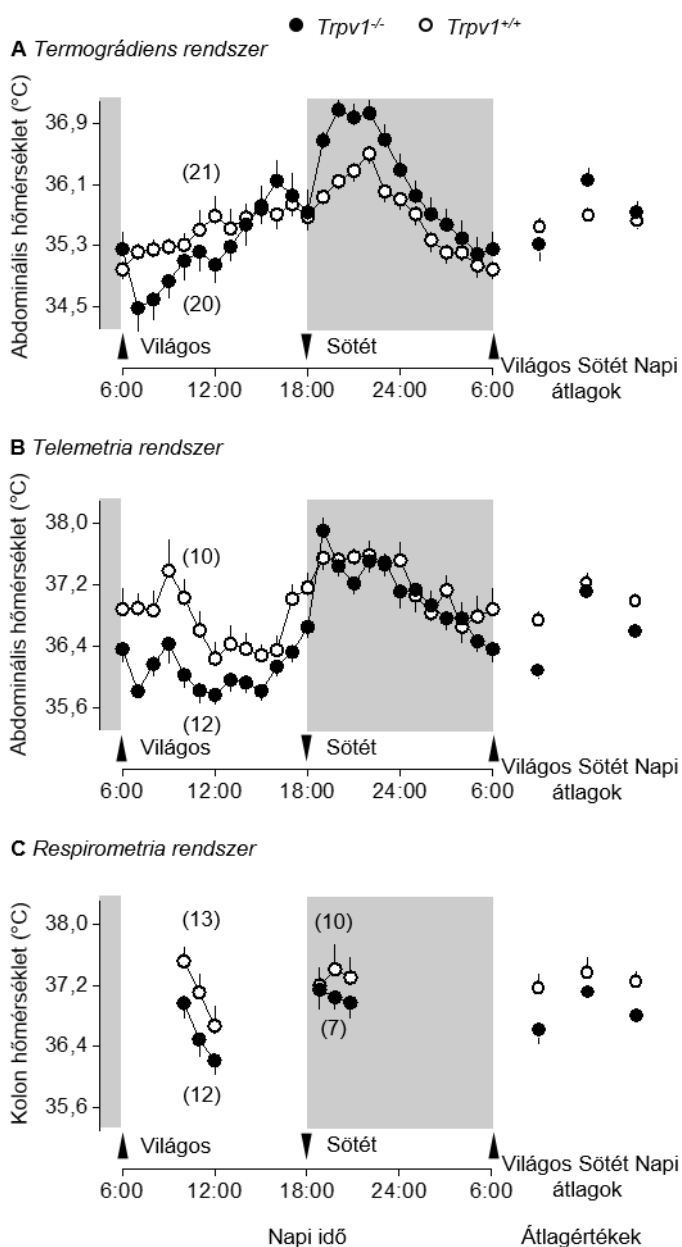
5.1.1. A TRPV1 ioncsatorna

5.1.1.1. Experimentális modellek

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

A TRPV1 ioncsatorna hőszabályozási szerepét bizonyító egyre több adat ellenére, elmaradt a csatornától genetikusan megfosztott *Trpv1* KO egerek termoregulatórikus fenotípusának olyan részletes felderítése, amely kiterjed különböző autonóm és viselkedési effektor mechanizmusok vizsgálatára szigorúan szabályozott hőmérsékleti körülmények között. A hiány pótlására nagyszámú *Trpv1*^{+/+} és *Trpv1*^{-/-} egérben tanulmányoztuk a T_m és a termoeffektorok aktivitásának cirkadián változásait termográdiens, telemetria és respirometria rendszereinkben⁶⁹. A *Trpv1*^{-/-} egerek T_m -e mindhárom rendszerben kismértékben ugyan, de szignifikánsan ($p < 0,05$) alacsonyabb volt a kontrollokénál a világos fázisban (9. ábra). A sötét (aktív) fázisban azonban a genotípusok közti különbség csökkent mértékű volt a respirometria rendszerben (9.C ábra) és teljesen eltűnt telemetriában (9.B ábra). A termográdiens rendszerben pedig ellentétjére változott a különbség (9.A ábra), vagyis a KO egerek T_m -e a sötét fázisban 0,5°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 (9.A-C ábra). A világos-sötét fázis közti változás amplitúdója azonban szignifikánsan kifejezettebb volt KO egerekben kontrollokhoz képest a termográdiens 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, korábbi tanulmányokban leírtaknak megfelelően^{80,81}, 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.

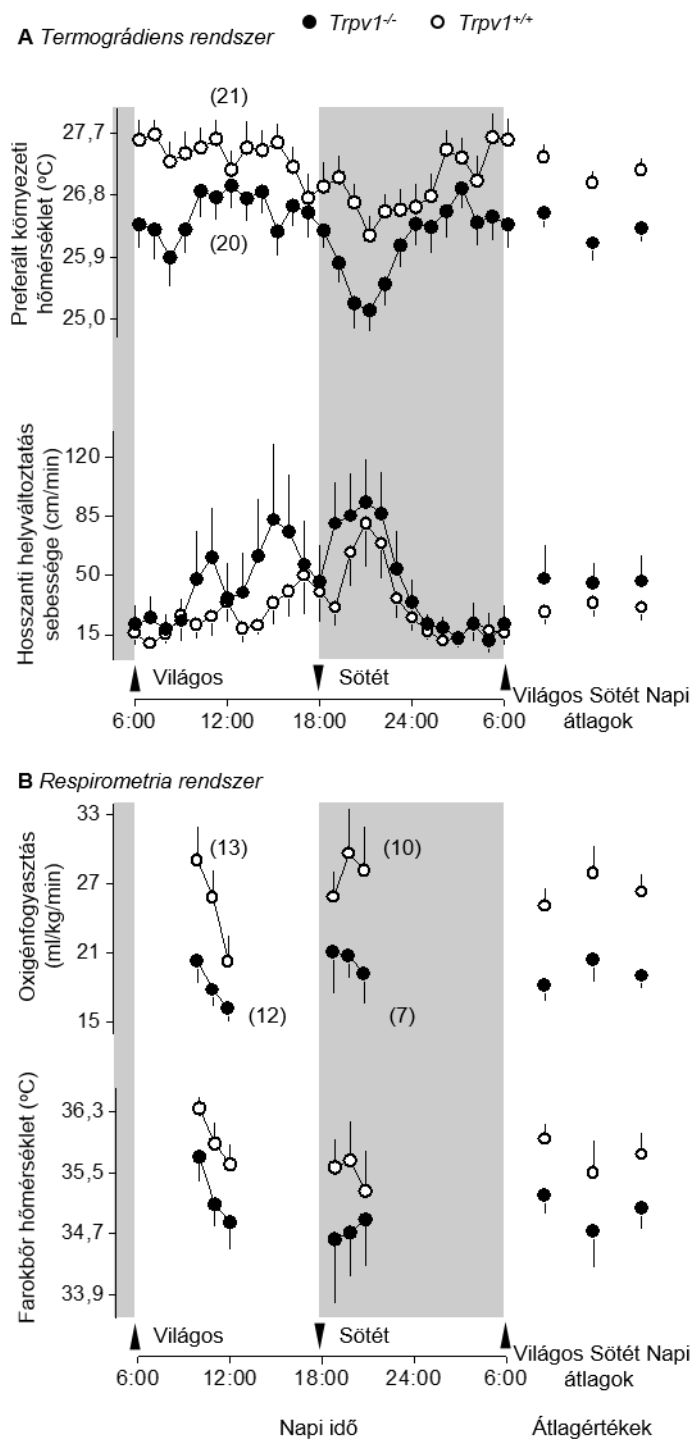
A T_m eltéréseknél sokkal nagyobb különbséget találtunk a genotípusok között a T_m szabályozásához használt viselkedési és autonóm termoeffektorok mintázatában. Két viselkedési és két autonóm termoeffektort vizsgáltunk.



9. ábra: Az inaktív (világos) napszakban a *Trpv1* KO (^{-/-}) egerek T_m -e alacsonyabb, mint genetikailag nem módosított (*Trpv1^{+/+}*) társaiké mindhárom általunk használt kísérleti rendszerben: (A) termográdiens, (B) telemetria, (C) respirometria. A *Trpv1* KO egereket fekete, a kontrollokat fehér szimbólumok jelölik. A világos és sötét napszakok kezdetét a napi idő tengelyen nyilak jelzik, előbbit fehér, utóbbit szürke háttérrel jelöltem. Az ábra jobb oldalán mindhárom panelben sorrendben a világos és sötét napszakra vonatkozó, illetve a teljes napi átlagok (és SE-k) láthatók. A zárójelben feltüntetett számok az adott csoportban felhasznált egerek számát jelentik⁶⁹.

Előbbiek közé tartozott a klasszikus T_k preferencia és az általános lokomotoros aktivitás (10.A ábra), míg utóbbiak közé a termogenezis (VO_2 révén meghatározva) és a fark bőrének vazomotor tónusa (T_b révén meghatározva) (10.B ábra). Mind a négy effektor aktivitása reprodukálhatóan megváltozott a vizsgálati rendszerekben. 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. Annak ellenére, hogy az átlagos mozgási sebesség a genotípusok között statisztikailag nem volt különböző a világos és sötét napszakokban, illetve a teljes napra vonatkozóan (Student *t* teszt), a 24 órás aktivitási görbék között szignifikáns különbség mutatkozott (ANOVA, $p < 0,01$). Biológiai szempontból a különbség mértéke figyelemre méltó: az inaktív (világos) fázis

egyik időpontjában (15:00-kor), a *Trpv1* KO egerek a termográdiens rendszerben átlagosan 85 cm/min lineáris sebességgel mozogtak, ami kb. 3-szor gyorsabb volt, mint a WT egerek sebessége ugyanebben az időpontban. Ez a csúcssebesség magasabb volt, mint a WT egerek sebessége a nap bármely időpontjában, beleértve az aktív (éjszakai) fázisban mért csúcssebességüket is.

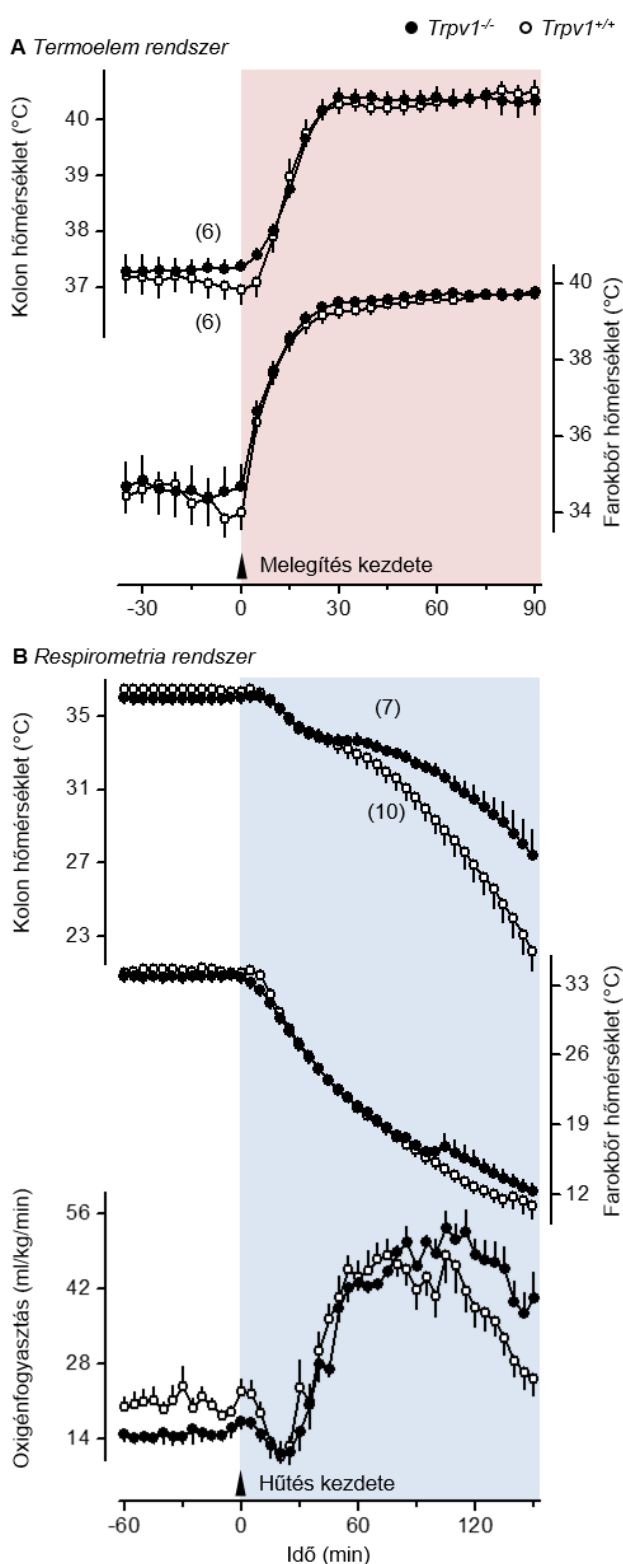


10. ábra: Genetikailag nem módosított kontroll (*Trpv1*^{+/+}) társaikhoz képest a *Trpv1* KO (^{-/-}) egerek eltérő termoeffektor mintázatot használnak T_m -ük szabályozásához. Termográdiens rendszerben (A) alacsonyabb T_k -t preferálnak és hiperaktívak. Respirometria rendszerben (B) hipometabolikusak (azaz a VO_2 esetükben alacsonyabb) és bőrükben kifejezettebb a vazokonstriktió (azaz a fark T_b alacsonyabb). A *Trpv1* KO egereket fekete, a kontrollokat fehér szimbólumok jelölik. A világos és sötét napszakok kezdetét a napi idő tengelyen nyilak jelzik, előbbit fehér, utóbbit szürke háttérrel jelöltem. Az ábra jobb oldalán mindhárom panelben sorrendben a világos és sötét napszakra vonatkozó, illetve a teljes napi átlagok (és SE-k) láthatók. A zárójelben feltüntetett számok az adott csoportban felhasznált egerek számát jelentik⁶⁹.

Az autonóm termoeffektorok aktivitásának vizsgálata során a respirometria rendszerben azt találtuk, hogy a *Trpv1* KO egerekre alacsonyabb metabolikus ráta és fokozottabb bőr vazokonstriktió 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, nyugalmi körülmények között, a *Trpv1* KO egerek hőszabályozási fenotípusában egy egyedi termoeffektor mintázatot találtunk. Ezek az egerek hűvösebb környezetet kedvelnek, emellett hiperaktívak, hipometabolikusak és bőrükben fokozottabb a vazokonstriktió.

A nyugalmi állapotban meghatározott eltérő termoeffektor mintázat leírása után, tanulmányoztuk a *Trpv1* KO egerek hőszabályozási válaszát hőterhelés és hidegterhelés során. Annak érdekében, hogy a meleg elleni védekezés lehető legkisebb hiányosságaira is fényt derítsünk, nagyfokú hőterhelést alkalmaztunk ($T_k = 39,0^\circ\text{C}$), amely a T_m kb. 3°C -os emelkedését eredményezte. A környezeti hőhatásnak való kitételkor mindkét genotípus (*Trpv1*^{-/-} és *Trpv1*^{+/+}) hirtelen, csaknem maximális mértékű farokbőr vazodilatációval reagált, a T_b elérte a 40°C -ot (11.A ábra). Sem a T_b , sem pedig a T_m válaszban nem volt különbség a genotípusok között. Mindezek alapján kijelenthető, hogy a *Trpv1* KO egerek teljes mértékben képesek hőleadásuk fokozására farokbőrükön keresztül, ezáltal pedig T_m -ük védelmére meleghatással szemben.

Annak érdekében, hogy a hideg elleni védekezés lehető legkisebb hiányosságaira is fényt derítsünk, nagyfokú hidegterhelést alkalmaztunk ($T_k = 5,0^\circ\text{C}$), amely jelentős T_m csökkenéssel járt. Ebben a hidegexpozíciós modellben, mindkét genotípushoz tartozó egerek bőrér vazokonstriktióval (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 (11.B ábra). 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 ($p < 0,0001$).



11. ábra: *Trpv1* KO (^{-/-}) és genetikailag nem módosított kontroll (*Trpv1*^{+/+}) egerek termoeffektor és T_m válaszai súlyos környezeti hőterhelésben (A) és hideg-expozícióban (B). A hőterhelés során a T_k -t előbb 31,0°C-ról 39,0°C-ra emeltük 0,3°C/min rátával, majd utóbbit a kísérlet végéig fenntartottuk. A T_m (kolon) és a bőr vazodilatációs (T_b) válaszok egymással azonosak voltak a két genotípusban. Hidegterhelésnél, a T_k -t 33,0°C-ról 5,0°C-ra csökkentettük 0,2°C/min rátával. A hidegexpozíció során a *Trpv1* KO egerek hosszabb ideig tudtak magasabb termogenezist (VO_2) fenntartani, így jobban meg tudták védeni T_m -üket a nagyfokú hideggel szemben. A *Trpv1* KO egereket fekete, a kontrollokat fehér szimbólumok jelölik. A melegítés és a hűtés kezdetét az idő tengelyen nyilak jelzik, előbbit piros, utóbbit kék háttérrel jelöltem. A zárójelben feltüntetett számok az adott csoportban felhasznált egerek számát jelentik⁶⁹.

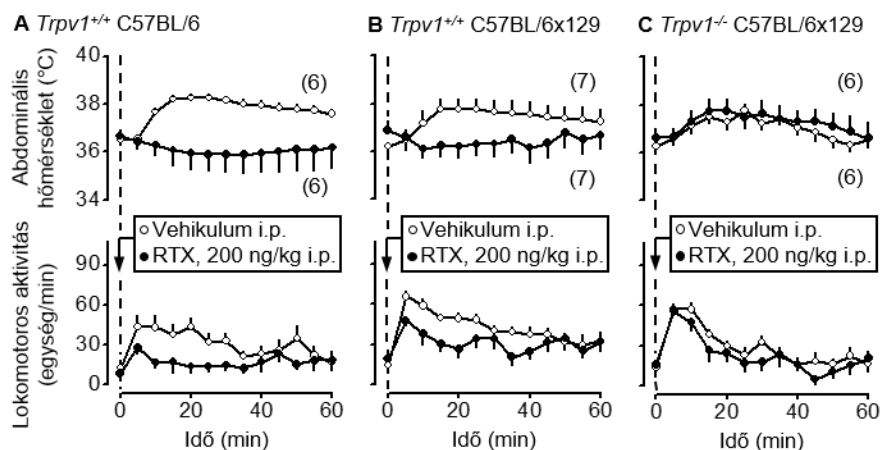
Eredményeink arra utalnak, hogy a *Trpv1* KO egerek nyugalmi anyagcseréje alacsonyabb ugyan,

de a hideg-indukálta termogenezist mégis valamelyest hosszabb ideig tudják fenntartani, mint genetikailag nem módosított kontroll társaik. Egy korábbi tanulmányban⁸⁰, a szerzők nem találtak különbséget a *Trpv1* KO egerek termoregulatórikus válaszában hideggel szemben, de a hidegterhelés mértéke ott sokkal kisebb volt. A különböző környezeti

faktorok (T_k , páratartalom, légmozgás), illetve az általunk használt mozgásában korlátozott állatmodell együttesen sokkal nagyobb T_m eséshez vezettek a WT egerekben a mi kísérleteink során, mint Iida és mtsai.⁸⁰ tanulmányában: $14,2 \pm 1,1$ vs. $1,2 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Ugyanakkor, ezen eredményeink összhangban vannak egy másik korábbi tanulmány eredményeivel⁵⁰, amelyben kifejezettebb hűtésnek voltak kitéve az egerek ($2,0-3,4^\circ\text{C}$ T_m csökkenés a kontrollokban), mint Iida és mtsai.⁸⁰ tanulmányában, és ebben az esetben a *Trpv1* KO egerek valamivel jobban meg tudták védeni T_m -üket hideggel szemben, mint WT társaik.

A *Trpv1* KO egerek hiperaktivitásának felismerése után (10. ábra), megvizsgáltuk, hogy RTX, egy ultrapotens exogén TRPV1 agonista, csökkenti-e a lokomotoros aktivitást. Ennek érdekében, i.p. RTX-et adtunk *Trpv1*^{-/-} egereknek, amelyek genetikai háttere C57BL/6x129 volt, illetve két *Trpv1*^{+/+} törzshöz tartozó egereknek, C57BL/6x129 és C57BL/6 háttérrel. Ezeket a kísérleteket a telemetria rendszerben hajtottuk végre. Tekintvén, hogy a vizsgálni kívánt hatás lokomotoros aktivitásbeli csökkenés volt, az RTX-et vagy vivőanyagát 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. Kísérleteink során vizsgáltuk az RTX jól ismert hipotermizáló hatását is (lásd 4. ábra), aminek érdekében a kísérleteket enyhén szubtermoneutrális T_k -n, $26,0^\circ\text{C}$ -on hajtottuk végre. A vehikulum beadása mérsékelt hiperaktivitást és tipikus stressz-indukálta hipertermiát váltott ki mindegyik vizsgált genotípusban (12. ábra). Az RTX (200 ng/kg, i.p.) azonban meggátolta mind a hiperaktivitást, mind a hipertermia kialakulását a *Trpv1*^{+/+} törzsű egerek mindkét (C57BL/6x129 és C57BL/6) csoportjában ($p < 0,0001$ mindkét törzs esetén) (12.A és B ábra), annak ellenére, hogy a beadott alacsony RTX dózis tényleges hipotermiát nem váltott ki. Ezek az eredmények összhangban vannak korábbi tanulmányokkal, amelyekben kapszaicin, ami szintén exogén TRPV1 agonista, csökkentette egerek és patkányok lokomotoros aktivitását^{27,201}, és amelyekben RTX (az általunk beadottnál magasabb dózisban) és kapszaicin hipotermiát okozott különböző emlősökben (részletekért, lásd Romanovsky és mtsai.⁶). A mi 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 (12.C ábra). Eredményeink arra utalnak, hogy perifériásan adott RTX csökkenti a stressz-indukálta

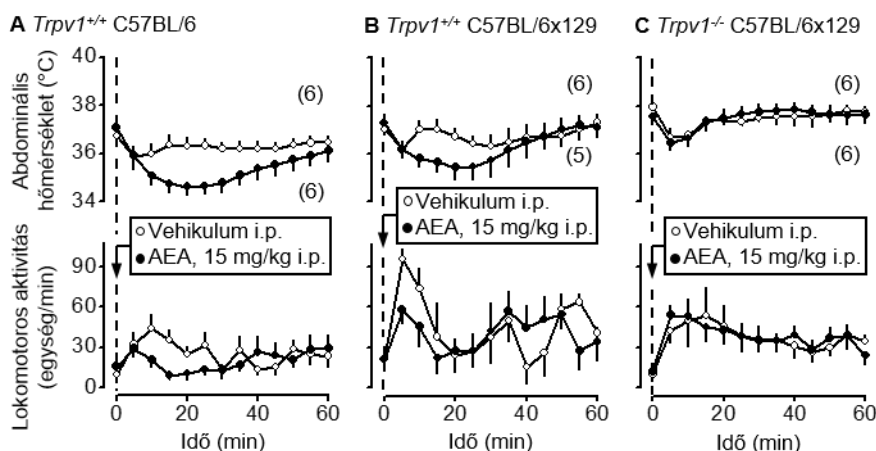
lokomotoros aktivitást és hipertermiát a TRPV1 ioncsatornán keresztül. A TRPV1 ioncsatornák részvételét lényeges volt bizonyítani, mert exogén TRPV1 agonisták bizonyos hatásai²⁰², beleértve termoregulatórikus hatásokat is^{72,203}, a TRPV1 ioncsatornától függetlenül alakulnak ki.



12. ábra: I.p. RTX (200 ng/kg) kezelés csökkenti a tűszúrással kiváltott hipertermia és hiperkinézis mértékét *Trpv1*^{+/+} egerek C57BL/6 (A) és C57BL/6x129 (B) törzseiben, de nincs hatása *Trpv1*^{-/-} C57BL/6x129 genetikai háttérű egerekben (C). Az RTX-szel kezelt egereket fekete, a vehikulummal kezelteteket fehér szimbólumok jelölik. A zárójelben feltüntetett számok az adott csoportban felhasznált egerek számát jelentik⁶⁹.

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 aktivitás emelkedését váltotta ki, hasonlóan mint ahogy a 12. ábrán is látható volt, de stressz-indukálta hipertermia nem alakult ki ebben az esetben. A testhőmérsékleti hatás hiánya valószínűleg azzal magyarázható, hogy az AEA magas dózisának beviteléhez ezekben a kísérletekben (13. ábra), nagy volumenű, szobahőmérsékletű oldatot kellett beadnunk: 30 ml/kg-ot, vagyis kb. 0,9 ml-t egerenként, amely lényegesen (közel tízszer) nagyobb az RTX kísérletekben használt 3,3 ml/kg (kb. 0,1 ml egerenként) volumennél (12. ábra). 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: C57BL/6 ($p < 0,0001$ a T_m ; $p < 0,05$ a lokomotoros aktivitás esetén) (13.A ábra) és C57BL/6x129 ($p < 0,05$ a T_m ; $p < 0,01$ a lokomotoros aktivitás esetén) (13.B ábra). Ezek az eredmények összhangban vannak az AEA korábban leírt hipotermizáló és

hipokinetikus hatásával egerekben és patkányokban nagy dózisok beadása esetén²⁰⁴⁻²⁰⁷. A *Trpv1*^{-/-} C57BL/6x129 genetikai háttérű egerekben azonban ezek közül a hatások közül egyik sem alakult ki AEA injekció hatására (13.C ábra).

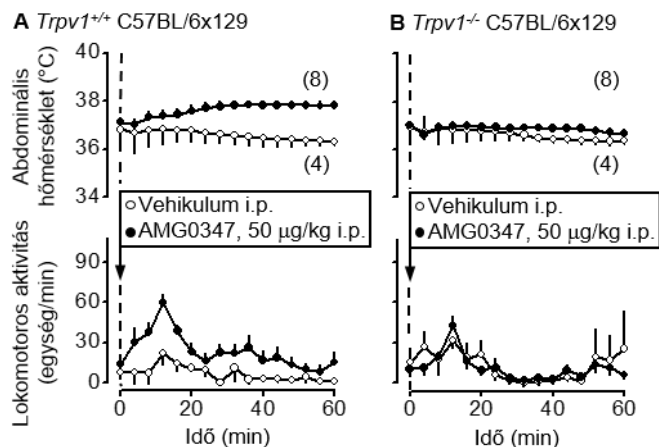


13. ábra: I.p. AEA (15 mg/kg) kezelés hipotermiát okoz és csökkenti a tűszúrással kiváltott hiperkinézis mértékét *Trpv1*^{+/+} egerek C57BL/6 (A) és C57BL/6x129 (B) törzseiben, de nincs hatása *Trpv1*^{-/-} C57BL/6x129 genetikai háttérű egerekben (C). Az AEA-val kezelt egereket fekete, a vehikulummal kezeltet fehér szimbólumok jelölik. A zárójelben feltüntetett számok az adott csoportban felhasznált egerek számát jelentik⁶⁹.

Annak ellenére, hogy az AEA a kannabinoid-1 receptor teljes értékű²⁰⁸ és a kannabinoid-2 receptor parciális agonistája²⁰⁹, 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 fejt ki a T_m -et és a lokomotoros aktivitást csökkentő hatását.

Következő lépésként azt vizsgáltuk, hogy az AMG0347, egy potens és szelektív TRPV1 antagonistája, milyen hatásokkal bír a *Trpv1*^{-/-} és *Trpv1*^{+/+} C57BL/6x129 genetikai háttérű egerek T_m -ére és lokomotoros aktivitására. A TRPV1 agonistákkal kapott eredményeink alapján (12. és 13. ábra), arra számítottunk, hogy az antagonisták 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. Tekintvén, hogy a várt testhőmérsékleti hatás hipertermia volt^{62,70}, a kísérleteket mindkét egértörzs számára termoneutrális ($T_k = 31,0^\circ\text{C}$) körülmények között hajtottuk végre. A vehikulumhoz képest az AMG0347 (50

$\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) hipertermiát és hiperkinézist váltott ki a *Trpv1*^{+/+} egerekben ($p < 0,0001$ mindkét paraméter esetén) (14.A ábra).

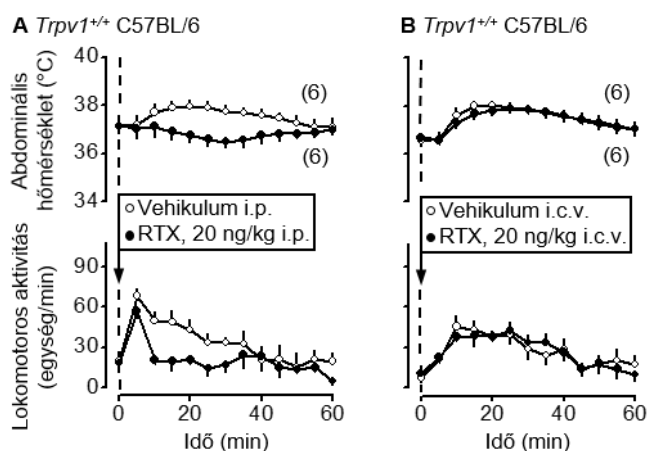


14. ábra: I.p. AMG0347 (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) kezelés hipertermiát és lokomotoros hiperaktivitást okoz *Trpv1*^{+/+} egerekben (A), de nincs hatása *Trpv1*^{-/-} egerekben (B). Az AMG0347-tel kezelt egereket fekete, a vehikulummal kezeltet fehér szimbólumok jelölik. A zárójelben feltüntetett számok az adott csoportban felhasznált egerek számát jelentik⁶⁹.

Amíg a TRPV1 antagonistá által indukált hipertermia kialakulása várható volt korábbi adatok alapján (részletekért, lásd 2.2.1.2. fejezet), 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^{74,210,211}. 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 (14.B ábra). Korábban arra már fény derült, hogy a TRPV1 antagonisták hipertermizáló hatásukat a TRPV1 csatornán keresztül váltják ki^{62,70}, ezzel szemben a fentiekben ismertett kísérleteink során először mutattuk ki az AMG0347 hiperkinetikus hatását és azt, hogy ez a hatás célspecifikusan a TRPV1 csatornán keresztül jön létre.

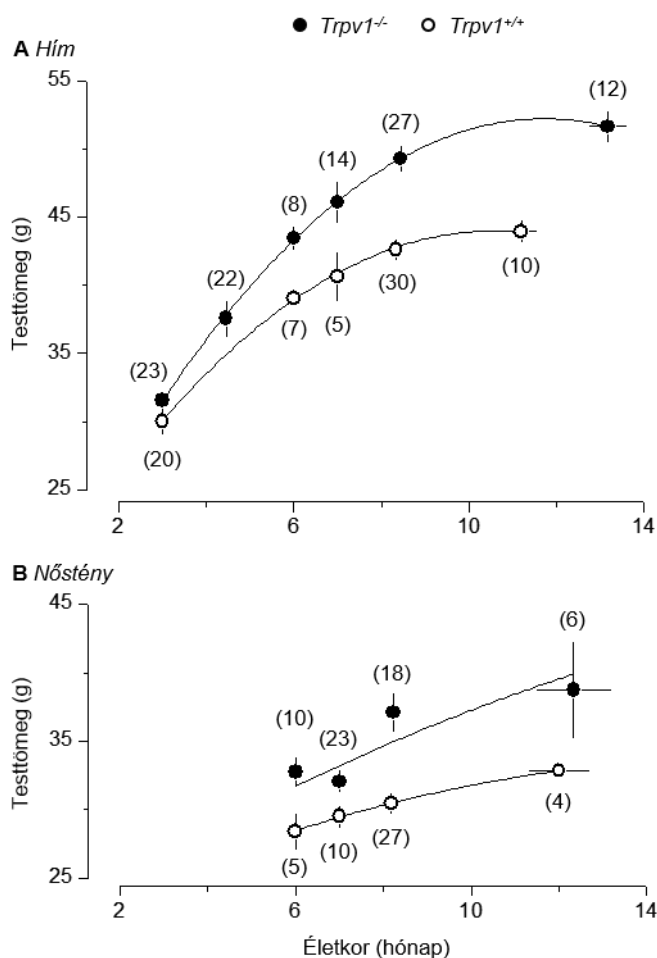
Arra is kerestük a választ, hogy RTX i.p. beadása az agyban vagy azon kívül hatva fejti ki anti-hiperkinetikus hatását. Ennek érdekében RTX nagyon alacsony dózist, 20 ng/kg -ot adtuk be az egereknek vagy i.p. vagy a laterális agykamrába (i.c.v.). I.p. anyagadás során ez a dózis csökkentette a injekciós stressz által indukált hipertermiát és

lokomotoros aktivitás fokozódást ($p < 0,0001$ mindkét paraméter esetén) (15.A ábra). Ezzel szemben, ugyanekkora dózisu RTX i.c.v. beadása egyik vizsgált paraméterre sem volt hatással (15.B ábra).



15. ábra: RTX 20 ng/kg-os dózisa *Trpv1*^{+/+} C57BL/6 egerekben csökkenti az injektálási stressz által indukált hipertermia és hiperkinézis mértékét i.p. beadásnál (A), de nincs hatása i.c.v. anyagadás esetén (B). Az RTX-szel kezelt egereket fekete, a vehikulummal kezelteteket fehér szimbólumok jelölik. A zárójelben feltüntetett számok az adott csoportban felhasznált egerek számát jelentik⁶⁹.

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 (16. ábra). 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 ($p < 0,0001$). Annak ellenére, hogy testösszetétel és zsírtartalom elemzést tanulmányunkban nem végeztünk (annak célkitűzései másra irányultak), a *Trpv1* KO egerek inkább elhízottnak tűntek, mintsem arányosan, mégis túlzottan megnövekedettek. Elsősorban haskörfogatuk volt nagyobb, illetve viscerális és szubkután zsírszövetük is vastagabbnak látszott a műtéti beavatkozások során. A korábban ismertetett hiperaktivitás (amelyet fiatalokú 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 fiatalokúban fizikailag aktívabbak voltak, testtömegük az életkor előrehaladtával jobban nőtt²¹². Megfigyeléseink alapján feltételezhető volt, hogy a TRPV1 csatorna védő szereppel rendelkezik a korfüggő elhízás kialakulásával szemben.

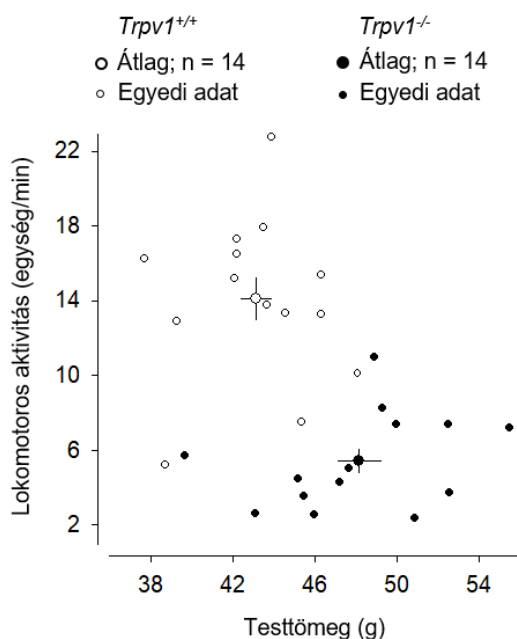


16. ábra: Az életkor előrehaladtával mind a hím (A), mind pedig a nőstény (B) *Trpv1* KO egerek testtömege egyre inkább meghaladta azonos korcsoportú kontroll társaikét. A *Trpv1* KO egereket fekete, a kontrollokat fehér szimbólumok jelölik. A zárójelben feltüntetett számok az adott csoportban felhasznált egerek számát jelentik⁶⁹.

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 testtömegüket¹⁶². Ezekben a kísérletekben 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 kontrollokhöz képest¹⁶². Az idősebb (42 ± 1 hét) korú hímeket 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 volt az az eredmény, 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 (teljes napi átlagok: 9 ± 1 vs. 14 ± 1 egység/min; $p = 0,001$). A legnagyobb aktivitásbeli különbséget reggel 6 és 9 óra között tapasztaltuk a genotípusok között. Ezalatt az időszak alatt a *Trpv1*^{-/-} egerek lokomotoros aktivitása lényegesen alacsonyabb

volt mint a *Trpv1*^{+/+} egereké (5 ± 1 vs. 14 ± 1 egység/min; $p < 0,0001$), míg a testtömegük szignifikánsan nagyobb volt (17. ábra).



17. ábra: Idősebb életkorú (42 ± 1 hetes) *Trpv1* KO egerek testtömege nagyobb ($p = 0,001$), míg lokomotoros aktivitása alacsonyabb ($p < 0,0001$), mint azonos korcsoportú genetikailag nem módosított kontroll társaiké. A lokomotoros aktivitást telemetriával mértük és átlagoltuk a világos fázis első 3 órájában (6:00-9:00 óra között). A *Trpv1* KO egereket fekete, a kontrollokat fehér szimbólumok jelölik¹⁶².

Az egymásnak ellentmondó lokomotoros aktivitásbeli és testtömegbeli eltérések közti paradoxon tehát megoldódott.

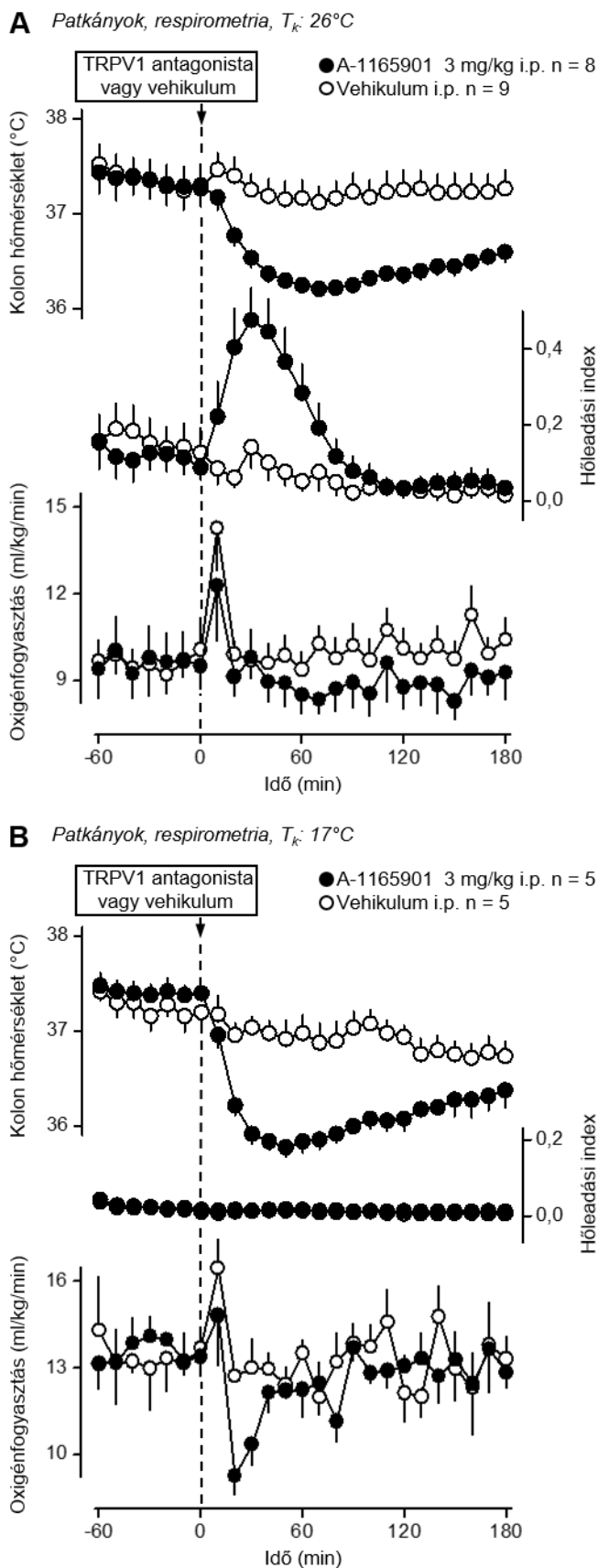
Fiatalon a *Trpv1* KO egerek aktivitása magasabb, ebben az életkorban nem mutatják az elhízás jeleit. Az életkor előrehaladtával azonban a *Trpv1* KO egerek hipokinetikussá és túlsúlyossá válnak azonos korcsoportú kontroll társaikhoz képest. Az aktivitás korfüggő megváltozásának mechanizmusa tisztázatlan, annak ellenére, hogy egészséges emberekben is leírtak hasonló jelenséget²¹². Eredményeink alapján azonban kijelenthető, hogy a TRPV1 csatorna lényeges szerepet tölt be mind a lokomotoros aktivitás mind pedig a testtömeg szabályozásában, és szabályozó funkciója az életkor függvényében változik.

5.1.1.1.2. Hipotermizáló TRPV1 antagonisták hatásmechanizmusának vizsgálata rágcsőknél

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 karbamid típusú, szelektív és potens, kollaborátoraink által újonnan szintetizált TRPV1 antagonista, az A-1165901 termoregulatórikus hatásait tanulmányoztuk egerekben és patkányokban, illetve összehasonlítottuk egy korábbról már ismert hipotermizáló TRPV1 antagonista, az AMG7905 hatásaival¹⁶³.

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. A stresszmentes anyagadás biztosítása érdekében az A-1165901-et (vagy vivőanyagát) egy korábban implantált i.p. kanulón keresztül infundáltuk a patkányoknak a respirometriás termometria rendszer inkubátor kamráján kívülről (részletekért, lásd 4.1.4.2. fejezet). A kísérleteket vagy 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. $1,0^\circ\text{C}$ -kal, amelynek nadírja 50-70 perccel anyagadás után alakult ki (18. ábra). A kezelés \times idő interakció szignifikánsan különbözött az A-1165901-gyel és a vehikulummal kezelt állatok között ($p < 0,001$ 26°C -on és 17°C -on egyaránt). A 26°C -os környezetben mindegyik patkány esetében enyhe farokbőr vazodilatáció és relatíve alacsony termogenezis volt jellemző az anyagadást megelőzően (18.A ábra). 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 kontrolloknál, a különbség nem mutatkozott statisztikailag szignifikánsak 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 (18.B ábra). Az A-1165901 nem okozott vazodilatációt a farokbőrben ezen a T_k -n, de nagymértékben csökkentette a termogenezist a kontrollokhöz képest ($p < 0,05$). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az A-1165901 stresszmentes beadása patkányoknak hipotermia kialakulását idézi elő, amely a T_k -tól függően a farokbőr vazodilatációja (termoneutrális zónában) vagy a hőtermelés gátlása (hidegben) révén jön létre.

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 kisdózisú RTX (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) i.p. adásával, majd 10-13 nappal később termoelem termometriával vizsgáltuk a deszenzitizált patkányok termoregulációs reakcióját A-1165901 (vagy vehikulum) adására enyhén szubneutrális környezetben ($T_k = 27^\circ\text{C}$).

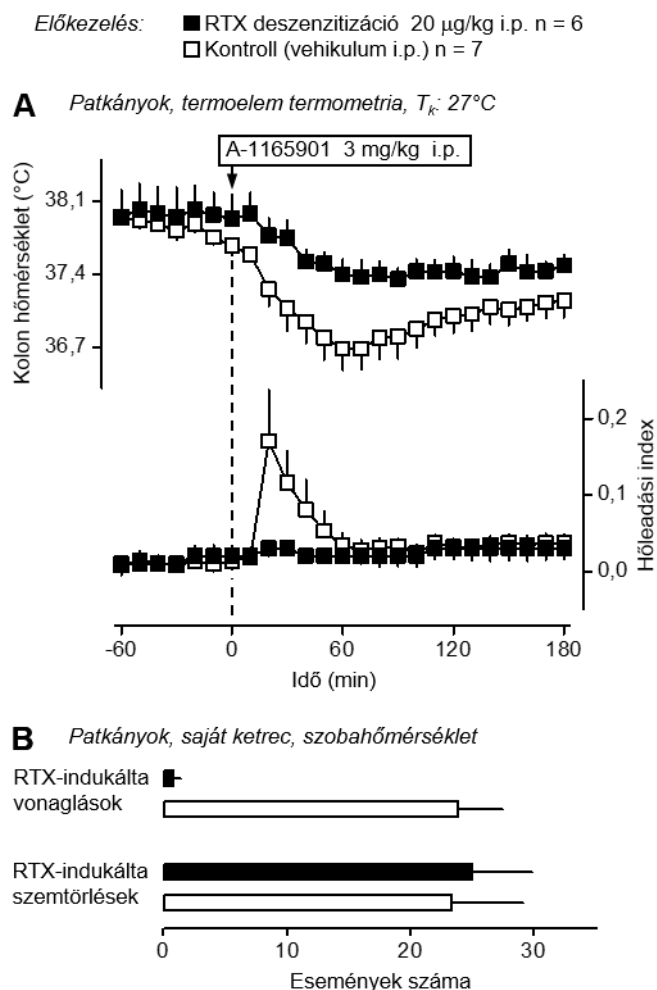


18. ábra: Az A-1165901 által indukált hipotermia a farokbőr vazodilatációja vagy a hőtermelés gátlása révén jön létre. (A) 26°C-os környezetben (a termoneutrális zóna alsó határán), az A-1165901 hipotermiát vált ki, amelyet a HLI nagyfokú emelkedése kísér (a farokbőr vazodilatációjának indikátora), míg csak minimálisan vagy egyáltalán nem változik a VO_2 (a nem-didergéses termogenezis indikátora). (B) Hidegben (17°C-on), az A-1165901 a VO_2 csökkentése révén vált ki hipotermiát, anélkül, hogy lényeges hatással lenne a hideg által indukált farokbőr vazokonstrikcóra. A TRPV1 antagonistával kezelt patkányokat fekete, a kontrollokat fehér szimbólumok jelölik¹⁶³.

Az A-1165901 adása (3 mg/kg, i.p.) a vivőanyaggal előkezelte (kontroll) patkányokban a T_m nagyfokú csökkenését és a HLI emelkedését váltotta ki, ahogy az várható volt az előbbiekből ismertetett eredményeink alapján. A testhőmérsékleti válasz azonban sokkal kisebb mértékű volt a deszenzitizált patkányokban, és a HLI változása teljes

mértékben elmaradt (19.A ábra). 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 RTX előkezelésben részesült patkányokban a T_m csökkenésének elmaradása a 20. és 120. perc között volt szignifikáns a vehikulummal előkezelt (kontroll) állatokhoz képest, míg a HLI esetükben a 20-40. percnél volt szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,05$). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TRPV1 antagonistákra adott hipotermiás válasz kialakulásában szerepet játszanak az abdominális szenzoros idegek. Az abdominális TRPV1 csatornák deszenzitizációjának igazolására megvizsgáltuk az RTX kis dózisének ($0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$) i.p. adásával kiváltott, úgynevezett vonaglási reakciót. Ez a válaszreakció csaknem teljes mértékben hiányzott a deszenzitizált patkányokban a kontroll előkezelésben részesült csoporthoz képest ($p < 0,001$; 19.B ábra).

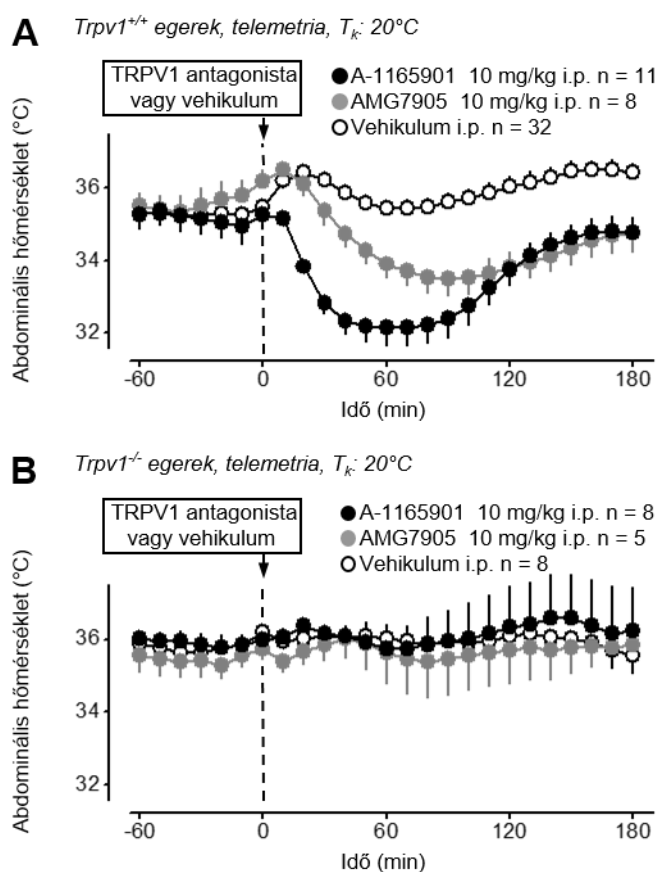


19. ábra: Az A-1165901 által indukált hipotermia teljesen hiányzik előzőleg RTX i.p. adásával deszenzitizált patkányokban. (A) Az A-1165901 hipotermizáló hatása kialakul vehikulummal előkezelt (kontroll) patkányokban, de hiányzik RTX előkezelésben részesült, így lokalizáltan, abdominálisan TRPV1 deszenzitizált patkányokban. (B) A kontroll állatokban, a TRPV1 csatornák a hasban és a hason kívül is aktiválhatók RTX adásával (vonaglási és szemtörlési tesztek). RTX adással deszenzitizált patkányokban kizárólag a hason kívüli TRPV1 csatornák funkciója megtartott, míg a hasi TRPV1 csatornák funkciója kiesett. A TRPV1 deszenzitizált patkányokat fekete, a kontrollokat fehér szimbólumok jelölik¹⁶³.

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 (19.B ábra). Az RTX vivőanyagára adott válaszok egyik testben sem

különböztek egymástól a deszenzitizált és kontroll csoportok között. Korábbi adatokkal összhangban^{62,72}, ezek az eredmények arra utaltak, hogy a TRPV1 csatornák funkciója kizárólag a hasban károsodott a deszenzitizált patkányokban.

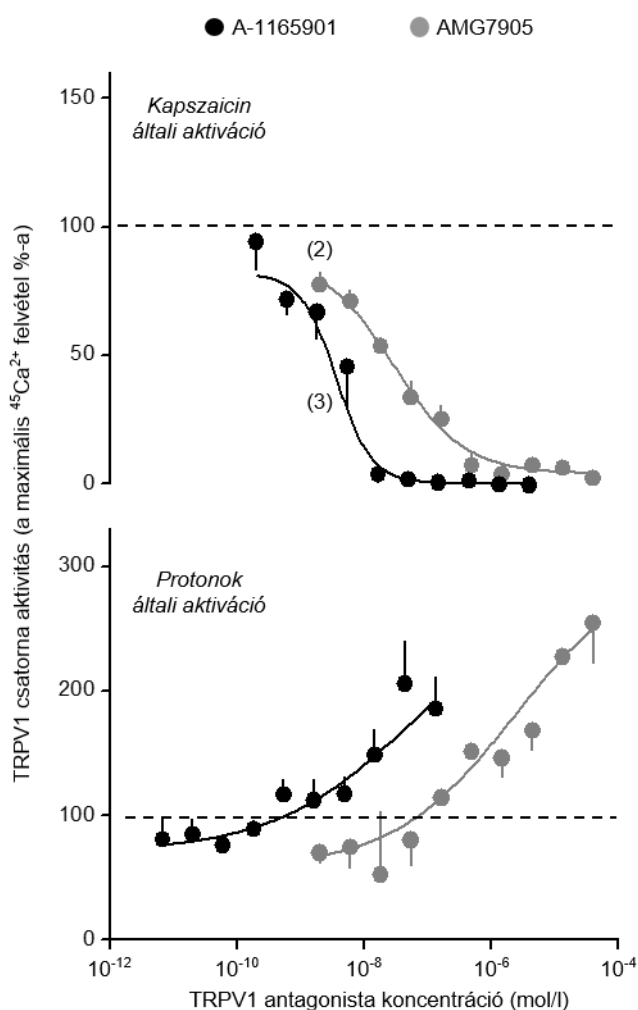
Ezek után *Trpv1*^{-/-} és *Trpv1*^{+/+} egerek felhasználásával arra kerestük a választ, hogy a TRPV1 antagonisták által kiváltott hipotermia valóban a célmolekulán, tehát a TRPV1 csatornán keresztül kiváltott (on-target) hatás-e. Ennek érdekében preimplantált i.p. katéteren keresztül A-1165901-et vagy AMG7905-öt adagoltunk stresszmentes módon az állatoknak. A *Trpv1*^{+/+} egerekben mindkét anyag nagyfokú T_m csökkenést ($>2,0^\circ\text{C}$) okozott a vivőanyaggal kezelt csoporthoz képest ($p < 0,001$; 20.A ábra). A WT egerekkel ellentétben, sem az A-1165901, sem pedig az AMG7905 nem volt hatással a *Trpv1*^{-/-} egerek T_m -ére (20.B ábra). Ezek az adatok arra utalnak, hogy mindkét általunk használt TRPV1 antagonisták közvetlenül a TRPV1 csatornán keresztül váltja ki hipotermizáló hatását.



20. ábra: A TRPV1 antagonisták által indukált hipotermia a TRPV1 csatornán keresztül jön létre. (A) Az A-1165901 vagy AMG7905 i.p. adása hipotermia kialakulásához vezet *Trpv1*^{+/+} egerekben, míg a vehikulumnak nincs testhőmérsékleti hatása. (B) A hipotermiás válasz mind az A-1165901, mind az AMG7905 esetében teljesen hiányzik *Trpv1*^{-/-} egerekben. A TRPV1 antagonistával kezelt egereket fekete (A-1165901) vagy szürke (AMG7905), a kontrollokat fehér szimbólumok jelölik¹⁶³.

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. Emellett, a vanilloidok

(kapszaicin) általi aktivációs módban kifejtett hatásukat is vizsgáltuk, hiszen ezt az aktivációs módot mindenképpen gátolniuk kell ahhoz, hogy valódi TRPV1 antagonistának nevezhessük ezeket az anyagokat. Az A-1165901 és AMG7905 hatásának meghatározására patkány TRPV1 csatornát expresszáló kínai hörcsög ovárium sejt vonal $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételének szcintillométeres mérésével került sor¹⁶³. Fontos megjegyezni, hogy a fluorometriás módszerekkel ellentétben (amelyek a teljes intracelluláris kalcium szintet mérik, így az intracelluláris raktárakból felszabaduló kalcium elfedheti a kalcium beáramlásának felismerését, ezáltal potencírozó hatás kimutatását), a szcintillometriás módszert korábbi tanulmányokban sikeresen alkalmazták TRPV1 antagonisták aktivációt potencírozó hatásának kimutatására is^{61,71}. A kísérletek során az A-1165901 és az AMG7905 egyaránt potensen gátolta a TRPV1 csatorna kapszaicin általi aktivációját (21. ábra), az IC_{50} értékeik sorrendben $3,7 \pm 1,4 \text{ nmol/l}$ és $29,3 \pm 12,4 \text{ nmol/l}$ voltak.



21. ábra: A $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel szcintillometriás módszerrel történő meghatározása során, az A-1165901 és az AMG7905 a TRPV1 csatorna kapszaicin általi aktivációjának koncentráció-dependens gátlását okozta, azonban gátlás helyett mindkét anyag erősen potencírozta a csatorna protonok általi aktivációját patkány TRPV1 csatornát expresszáló sejt vonalon. A TRPV1 antagonistákkal végzett méréseket fekete (A-1165901) vagy szürke (AMG7905) szimbólumok jelölik. A zárójelben feltüntetett számok az adott kísérletben elvégzett replikációk számát jelentik¹⁶³.

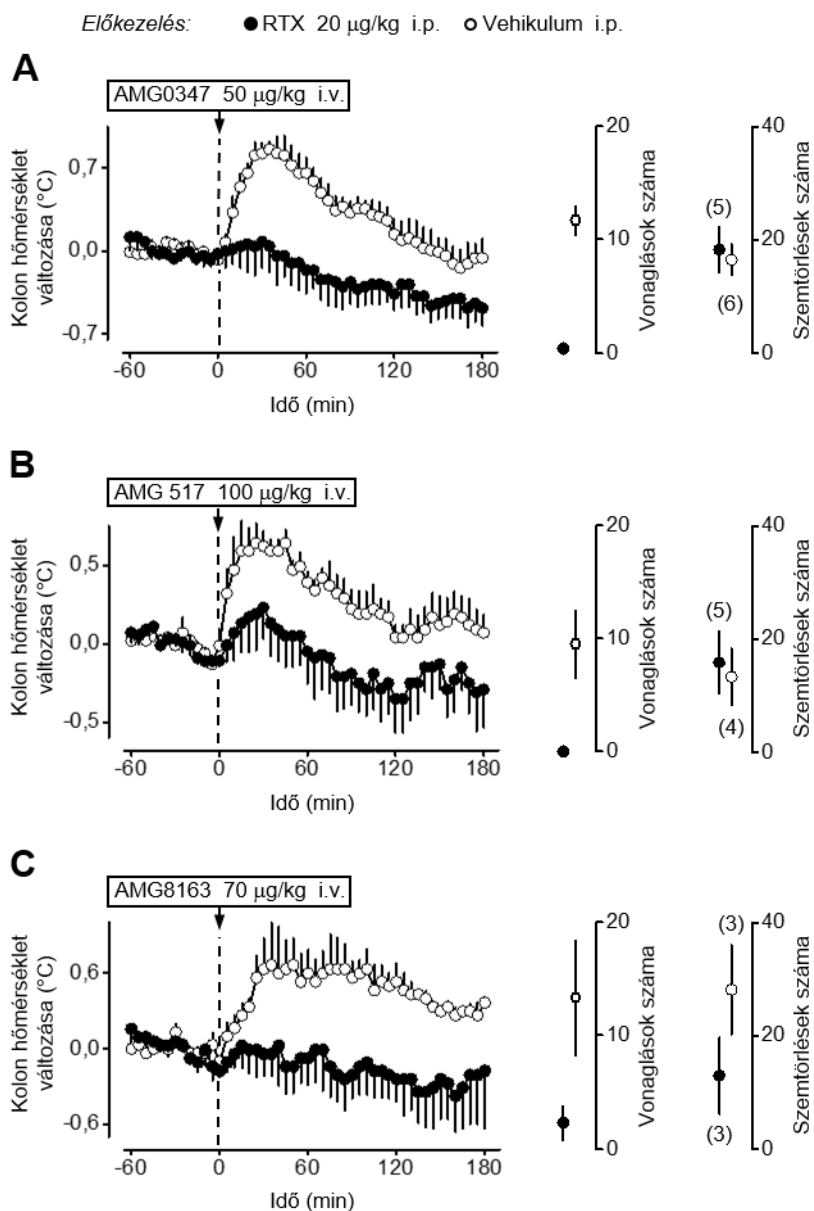
Ellentétben a vanilloid aktivációs módban találtakkal, mindkét anyag koncentrációfüggő módon potencírozta a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételt a protonok általi aktiváció során (21. ábra). Az A-1165901 esetében ez a hatás

már nagyon alacsony, 1 nmol/l alatti koncentrációk alkalmazása esetén is kimutatható volt. Kijelenthetjük tehát, hogy mindkét általunk vizsgált TRPV1 antagonistá, vagyis az A-1165901 és az AMG7905, erős gátlószerei a TRPV1 csatorna kapszaicin aktivációs módjának, ugyanakkor erős fokozószerei a proton aktivációs módnak.

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 efferens neuronjaihoz az információ¹⁶⁴.

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 eredményekkel⁶², az AMG0347 (50 µg/kg) i.v. beadása kontroll patkányokban a T_m kifejezett emelkedését okozta, míg RTX előkezelésen átesett (abdominálisan deszenzitizált) patkányokban ugyanilyen dózisu AMG0347 nem befolyásolta a T_m -et ($p < 0,001$) (22.A ábra). 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 (22.B ábra). Az AMG 517 hatása szignifikánsan különbözött a kontroll és deszenzitizált előkezelési csoportok között ($p < 0,001$). A vehikulummal előkezelt patkányok T_m -e magasabb volt, mint a deszenzitizáltaké az AMG 517 beadása után 15-110 perccel ($p < 0,05$). 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 ($p < 0,001$) (22.C ábra). A vehikulummal előkezelt patkányokban nem figyeltünk meg érdemi különbséget a hipertermiás válaszok dinamikájában a három TRPV1 antagonistá között, ezért vizsgálatunk további részében az AMG0347-et használtuk.

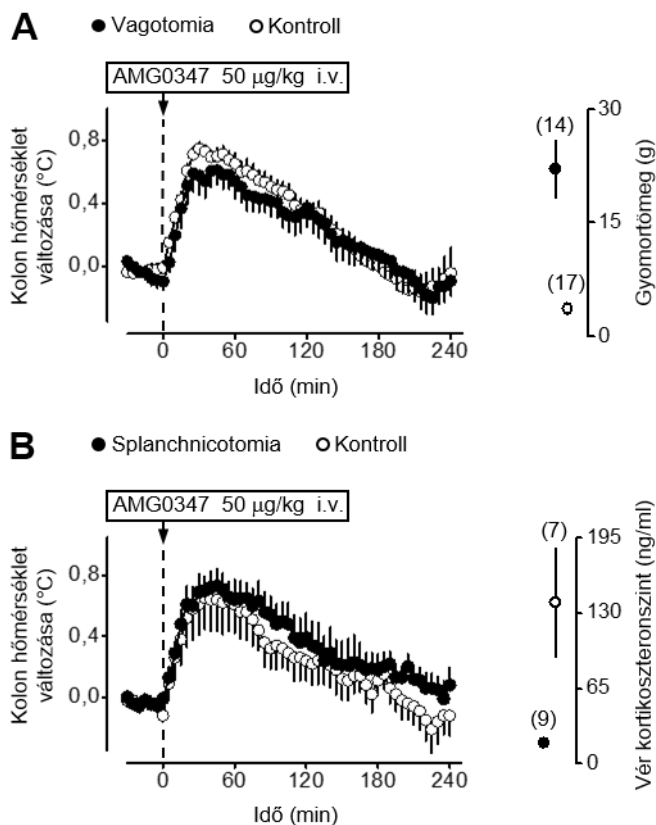


22. ábra: A TRPV1 antagonisták által indukált hipertermia teljesen hiányzik az előzőleg RTX i.p. adásával abnormálisan deszenzitizált patkányokban. A vehikulummal előkezelt (kontroll) patkányok az AMG0347 (A), AMG 517 (B) vagy AMG8163 (C) i.v. beadására kifejezett T_m emelkedéssel reagáltak, míg RTX előkezeléssel deszenzitizált patkányokban nem alakult ki hipertermiás válasz. A beadott dózisok fel vannak tüntetve az ábrán. Minden panelben a hőmérsékleti görbétől jobbra ábrázolt adatok ugyanazon kontroll és deszenzitizált patkányok RTX-indukálta vonaglászainak és szemtörléseinek számát mutatják. Minden panelben (A-C) a vivőanyaggal előkezelt patkányoknál erős vonaglási reflex látható, míg RTX előkezelés után ez a reflex hiányzik, ami megerősíti a TRPV1 csatornák sikeres deszenzitizációját a hasban. Ezzel szemben a szemtörlési tesztben nem volt különbség a deszenzitizált és kontroll állatok között, ami azt jelzi, hogy az i.p. RTX előkezelés nem befolyásolta az extraabdominális TRPV1 csatornákat. A deszenzitizált patkányokat fekete, a vehikulummal előkezelteket fehér szimbólumok jelölik. A zárójelben feltüntetett számok az adott csoportban felhasznált patkányok számát jelentik¹⁶⁴.

Az intraabdominális TRPV1 csatornák deszenzitizációjának megerősítésére ebben a kísérletsorozatban is megvizsgáltuk a kisdózisú (0,1 µg/kg) RTX i.p. adására kialakuló vonaglási reakciót. Ez a válasz szinte teljesen megszűnt RTX előkezeléssel deszenzitizált patkányokban a vehikulummal előkezelt kontrollokhoz képest mindhárom TRPV1 antagonistával kezelt csoportban: AMG0347 ($p = 0,006$), AMG 517 ($p = 0,001$) és AMG8163 ($p = 0,049$) (22. ábra). A vonaglási válasszal ellentétben, a szemtörlési teszben a három TRPV1 antagonistá kezelési csoport egyikében sem volt különbség a deszenzitizált és kontroll állatok között. Ezek az eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy a TRPV1 antagonisták által kiváltott hipertermia kialakulásához a hasban lévő RTX-érzékeny idegek funkcionális integritása szükséges.

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 (23.A ábra). A kísérletek végén a patkányokat nátrium-pentobarbitállal (100 mg/kg, i.v.) elaltattuk, majd a gyomrukat eltávolítottuk és megmértük (a gyomortartalommal együtt). Korábbi tanulmányoknak megfelelően^{177,180}, a vagotomia sikerességét megerősítve a gyomortömeg szignifikánsan ($p < 0,001$) nagyobb volt a vagotomizált patkányokban, mint a kontrollokban (23.A ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TRPV1 antagonisták által indukált hipertermia kialakulásához nincs szükség az abdominális vagus integritására.

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 (23.B ábra). A splanchnicotomia sikerességének megerősítésére a patkányok stresszválaszát vizsgáltuk vérük kortikoszteronszintjének vízmegvonást követő megméréseivel¹⁸³. Azt találtuk, hogy a splanchnicotomizált patkányokban a vér kortikoszteronszintjének stresszre adott emelkedése szignifikánsan elmaradt a kontroll állatokétól (19 ± 4 vs 139 ± 46 ng/ml; $p = 0,01$) (23.B ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a nervus splanchnicus major nem vesz részt a TRPV1 antagonisták által kiváltott hipertermia kialakulásában.

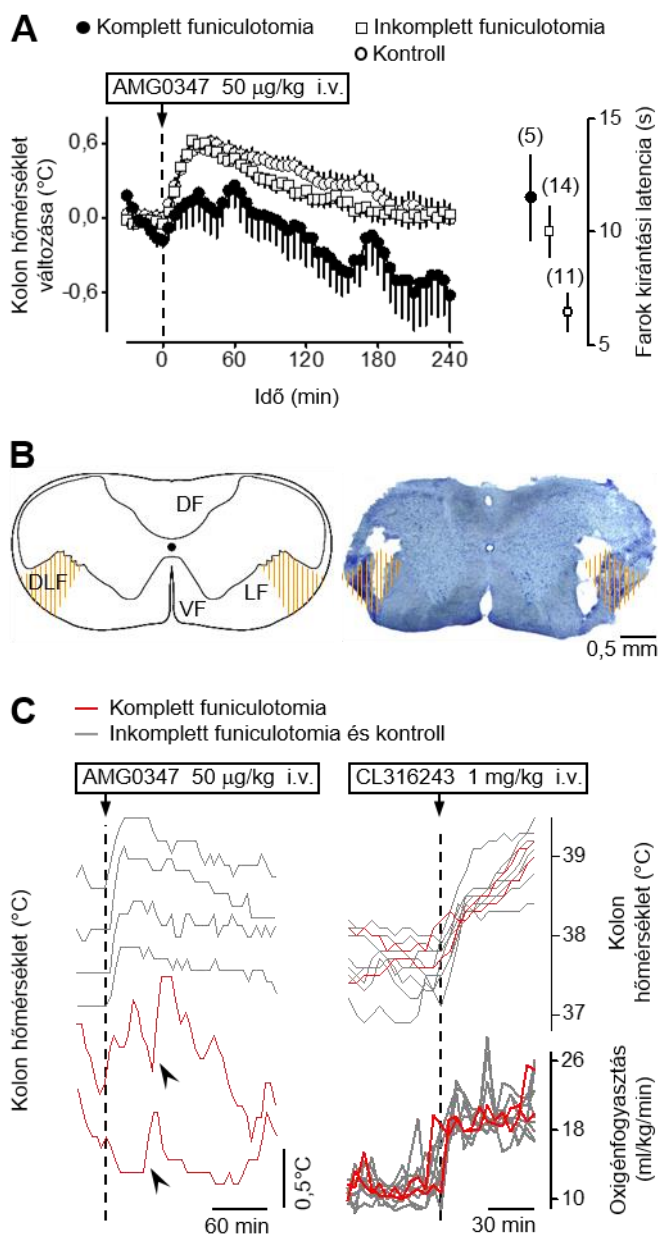


23. ábra: A TRPV1 antagonisták által indukált hipertermia kialakulását nem befolyásolja a teljes szubdiafragmatikus vagotomia vagy a bilaterális splanchnicotomia. **(A)** A T_m emelkedése csaknem azonos a teljes szubdiafragmatikus vagotomián átesett és kontroll állatokban AMG0347 (dózis feltüntetve) i.v. beadását követően. A vagotomia sikerességét igazolja, hogy a vagotomizált patkányok gyomrának tömege drasztikusan megnőtt a kontrollokéhoz képest (**A** panel jobb oldala). **(B)** A T_m emelkedése hasonló a bilaterális splanchnicotomián átesett és

kontroll állatokban AMG0347 (dózis feltüntetve) i.v. beadását követően. A splanchnicotomia sikerességét igazolja, hogy 48 órás vízmegvonást követően a vér kortikoszteronszintjének emelkedése a splanchnicotomizált patkányokban elmaradt a kontroll állatokétól (**B** panel jobb oldala). Az idegi lézió átesett patkányokat fekete, a kontrollokat fehér szimbólumok jelölik. A zárójelben feltüntetett számok az adott csoportban felhasznált patkányok számát jelentik¹⁶⁴.

Ezután megvizsgáltuk, hogy a DLF-ben 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 (24.A ábra). 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 farok kirántási teszttel (24.A ábra) és morfológiailag szövettannal (24.B ábra) igazoltuk. A komplett (12 ± 2 s; $p = 0,013$) és inkomplett (10 ± 1 s; $p = 0,019$) dorzolaterális funiculotomia csoportban a farok kirántásának latenciája szignifikánsan meghosszabbodott a kontroll patkányokhoz képest (6 ± 1 s).

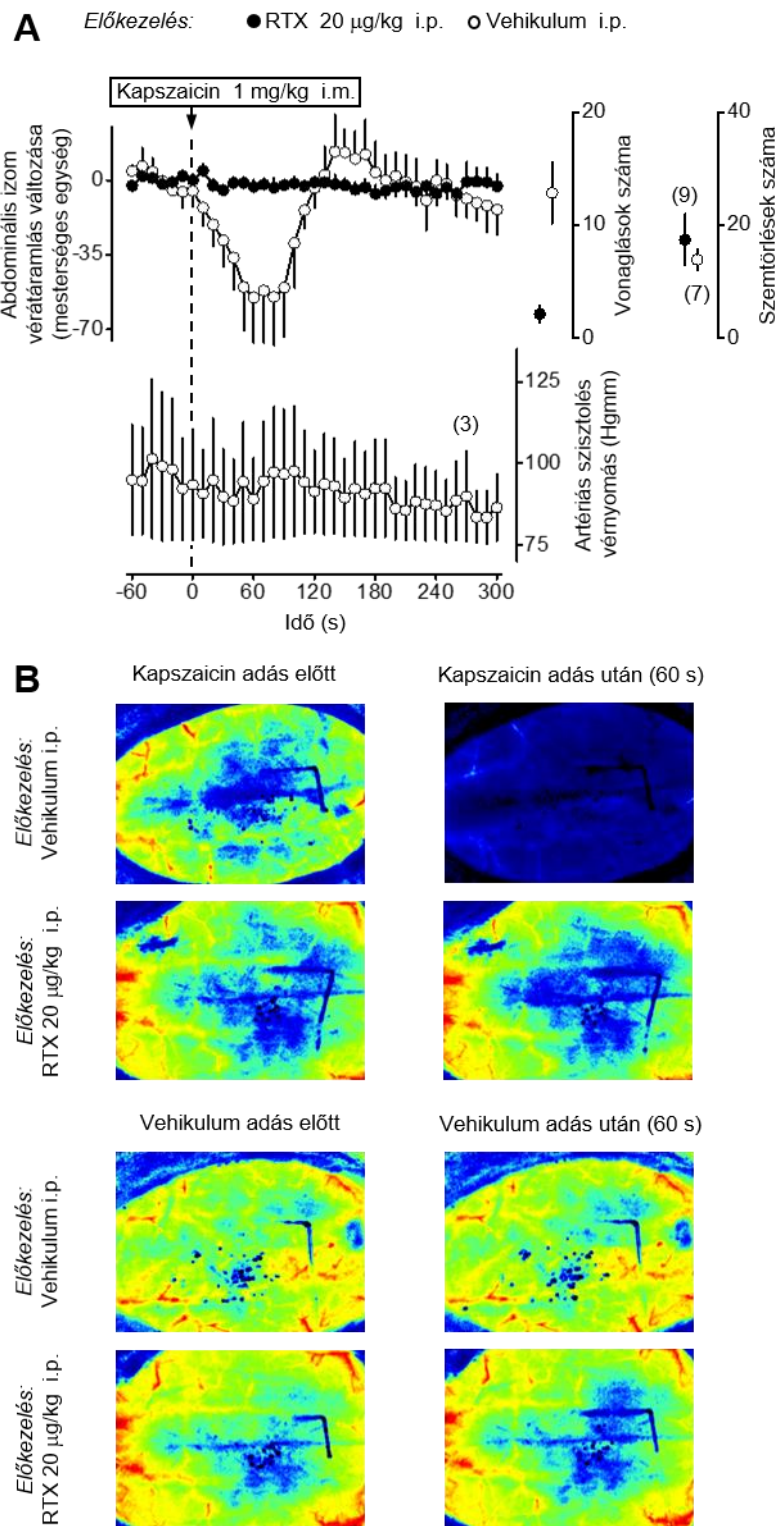


24. ábra: A TRPV1 antagonisták által indukált hipertermia mértéke csökken a DLF bilaterális cervikális átvágása után. (A) A komplett bilaterális cervikális dorzolaterális funiculotomián átesett patkányok sokkal kisebb mértékű T_m emelkedéssel reagáltak i.v. AMG0347 (dózis feltüntetve) beadására, mint az inkomplett cervikális dorzolaterális funiculotomián átesett patkányok vagy a kontroll állatok. Az A panel jobb oldalán látható adatok mutatják, hogy a fájdalmas hidegre (-18°C) adott fark kirántási válasz késleltetett volt a komplett és az inkomplett dorzolaterális funiculotomián átesett patkányokban a kontrollokhoz képest. (B) A C1 spinális szegmens horizontális metszetének sematikus ábrája Paxinos és Watson²¹³ atlasza alapján, valamint reprezentatív fotó a C1 metszetről egy komplett bilaterális DLF lézió átesett patkányból. A lézió célterületét (DLF) a gerincvelő mindkét oldalán narancssárga sávózással jelöltük; kizárólag azoknál a patkányoknál tekintettük „komplettnek” a funiculotomiát, amelyeknél a lézió

mindkét oldalon meghaladta a célterület 50%-át. DF, LF, VF – dorzális, laterális és ventrális funiculus. (C) Komplett dorzolaterális funiculotomián átesett patkányok nem reagáltak hipertermiával TRPV1 antagonistára, de erőteljes termogenezissel és hipertermiával válaszoltak β_3 agonistára. Bal oldalon egyedi T_m görbéken látszik, hogy AMG0347 (dózis feltüntetve) i.v. adására a sértetlen vagy részlegesen sérült DLF-fel rendelkező patkányok hipertermiával reagáltak, míg a komplett dorzolaterális funiculotomián átesett állatok nem. Ugyanakkor, még a komplett funiculotomián átesett patkányok is képesek voltak sporadikusan kialakuló éles T_m emelkedésekre létrehozására (nyilakkal jelölve). Jobb oldalon egyedi T_m és VO_2 görbéken látszik, hogy az i.v. beadott CL316243 (β_3 agonista; dózis feltüntetve) által kiváltott hipertermiás és hőtermelési válasz nem különbözik egymástól a kontroll, inkomplett és komplett dorzolaterális funiculotomián átesett patkányok között. A komplett idegi lézió átesett patkányokat fekete szimbólumok és piros vonalak, az inkomplett lézió átesett és a kontroll állatokat fehér szimbólumok és szürke vonalak jelölik. A zárójelben feltüntetett számok az adott csoportban felhasznált patkányok számát jelentik¹⁶⁴.

Fontos megemlíteni, hogy néhány komplett dorzolaterális funiculotomián átesett patkányban szórványos, éles T_m emelkedések voltak megfigyelhetők az AMG0347-re adott válasz során (24.C ábra), ezzel bizonyítva a hideg elleni termoeffektoraik teljesmértékű használhatóságát. Továbbá, a vizsgált populációból kiválasztottunk egy patkánycsoportot, amelyben a β_3 -adrenerg receptor agonista CL316243-mal teszteltük, hogy a komplett dorzolaterális funiculotomián átesett patkányok ugyanolyan mértékben képesek-e megemelni a T_m -üket, mint az inkomplett DLF-lézióval rendelkező és a kontroll csoportokban lévő patkányok. Ezek közül a véletlenszerűen kiválasztott patkányok közül két állatban szövettanilag megerősítettük, hogy komplett lézióval rendelkezett, és mindkettő a VO_2 és a T_m kifejezett emelkedésével reagált a CL316243-ra, ami nem különbözött az inkomplett lézióval rendelkező és a kontroll patkányok metabolikus és termális válaszaitól (24.C ábra). Ezek az adatok azt mutatják, hogy a DLF integritása szükséges a TRPV1 antagonisták által kiváltott hipertermia kialakulásához. Mivel a DLF komplettnek számító kétoldali átmetszésén átesett patkányok teljes mértékben képesek voltak a hőtermelésük növelésére, a TRPV1 antagonisták által kiváltott hipertermia mértékének csökkenése valószínűleg nem termoeffektor elégtelenség miatt következett be.

A fentiekben ismertetett kísérletek arra utalnak, hogy a TRPV1 antagonisták által kiváltott hipertermia mechanizmusában szerepet játszanak a hasi régióban található TRPV1 csatornát 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 érintenie 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 (25.A és B ábra). A kapszaicin vérátáramlásra gyakorolt hatása szignifikánsan különbözött az RTX és a vivőanyag előkezelésben részesült csoportok között ($p < 0,001$).



25. ábra: A külső ferde hasizomban a TRPV1 agonista lokális injektálására adott hipoperfúziós válasz megszűnik a kisdózisú i.p. RTX előkezeléssel deszenzitizált patkányokban. (A) A bal oldali rész felső görbéi mutatják, hogy a külső ferde hasizomban a vértáramlás gyors és nagyfokú csökkenése alakul ki kapszaicin (dózis feltüntetve) lokális beadását követően a vivóanyaggal előkezelt (kontroll) patkányokban, de nem jön létre az i.p. RTX (dózis feltüntetve) előkezelésen átesett (abdominálisan deszenzitizált) patkányokban (folytatást lásd következő oldalon).

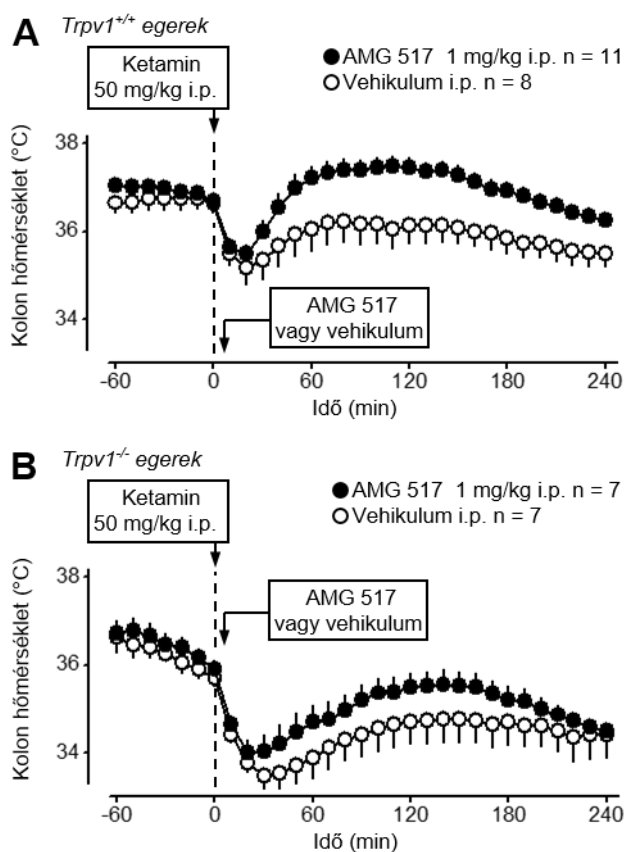
25. ábra (folytatás): Az alsó görbe azt mutatja, hogy három véletlenszerűen kiválasztott, vehikulummal előkezelt patkányban az i.m. kapszaicin nem okozott változást a nyaki verőérben mért vérnyomásban. Az A panel jobb oldalán látszik, hogy a vehikulummal előkezelt patkányok erős RTX által indukált vonaglási reflexet mutattak, míg ez a reflex hiányzott az RTX előkezeléssel átesett patkányoknál, ami megerősíti a TRPV1 csatornák sikeres deszenzitizációját a peritoneális üregben az utóbbi előkezeléssel. Ezzel szemben a szemtörlési tesztben nem volt különbség a kontroll és az RTX deszenzitizált patkányok között, ami azt jelzi, hogy az i.p. RTX előkezelés nem befolyásolta az extraabdominális (legalábbis a szaruhártyában található) TRPV1 csatornákat. (B) A hasfalról készült egyedi speckle fotók a kapszaicinre és a vivőanyagra adott vérátáramlási válaszokat ábrázolják a kontroll és az i.p. RTX deszenzitizált patkányokban. Minden patkány és minden kezelés esetében egy reprezentatív kiindulási kép (kezelés előtt) látható a bal oldalon, és egy reprezentatív kezelés utáni kép (60 másodperccel i.m. anyagadás után) a jobb oldalon. A deszenzitizált patkányokat fekete, a kontrollokat fehér szimbólumok jelölik. A zárójelben feltüntetett számok az adott csoportban felhasznált patkányok számát jelentik¹⁶⁴.

A vérátáramlás a vehikulummal előkezelt patkányokban alacsonyabb volt, mint az RTX előkezelést követően a kapszaicin beadása után 30-100 másodperccel ($p < 0,05$). Az alkalmazott dózisban a kapszaicin i.m. injekciója nem befolyásolta a nyaki verőérben mért szisztolés vérnyomást (25.A ábra). A termofiziológiai kísérletekhez hasonlóan, az RTX által indukált vonaglási válasz szinte teljesen hiányzott az RTX deszenzitizált patkányokban a kontrollokhoz képest ($p < 0,001$) (25.A ábra), míg a szemtörlési tesztben nem volt különbség a két előkezelési csoport között. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a korábbi kísérleteinkben megfigyelt TRPV1 antagonistákra adott csökkent mértékű hipertermiás válasz (lásd 22. ábra) a hasizmokból kiinduló, TRPV1 csatornákat expresszáló afferens idegek deszenzitizációjával magyarázható.

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

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 indukációjakor felhasználható lehetne az általános anesztézia által indukált hipotermia megelőzésére¹⁶⁵.

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, nem altatott állatokban igazoltan hipertermiát kiváltó TRPV1 antagonistista (lásd például 22.B ábra), 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 (26.A ábra).

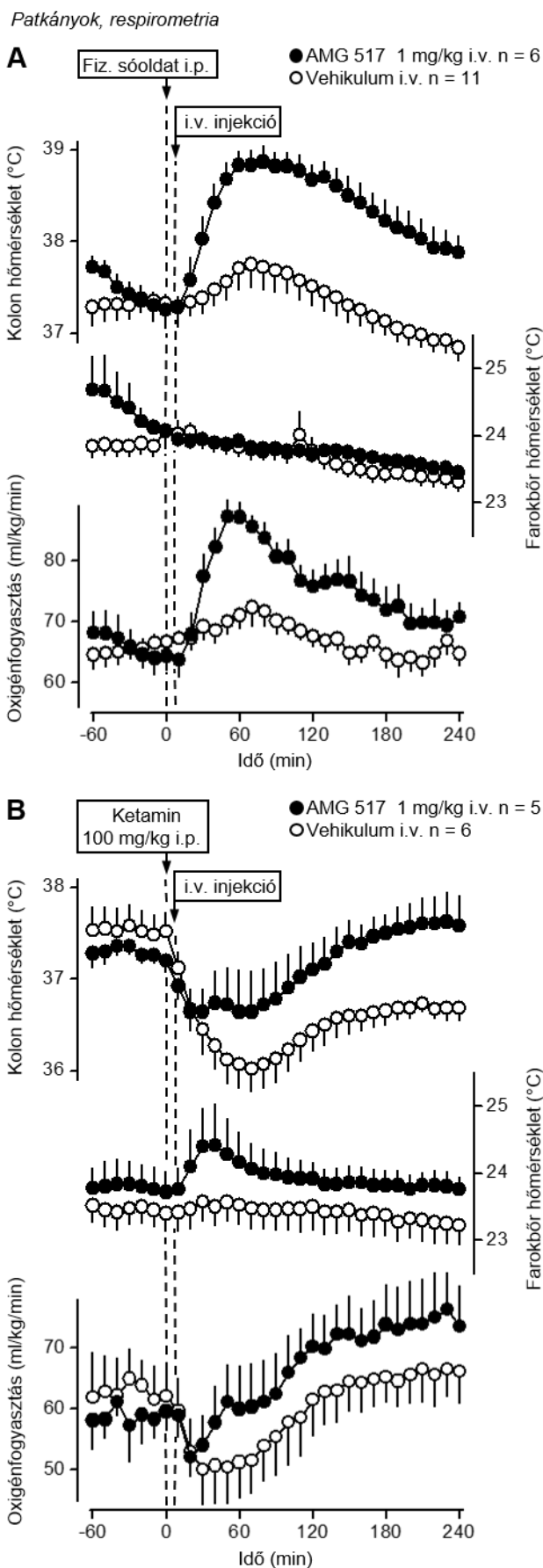


26. ábra: Az AMG 517 kivédte az anesztézia által indukált hipotermiát, de kizárólag a TRPV1 csatorna jelenlétében. (A) *Trpv1^{+/+}* egerekben a ketamin hipotermiát váltott ki, amely az anyagadás utáni 20. perctől a kísérlet végéig (240. percig) jelen volt. Amikor azonban az egereket AMG 517-tel kezeltük, a ketamin által indukált hipotermia mértéke szignifikánsan csökkent az anyagadást követő 40. perctől kezdve a 240. perces utolsó mérési pontig ($p < 0,05$). (B) *Trpv1^{-/-}* egerekben a ketamin szintén hipotermiát okozott, azonban az AMG 517 nem védte ki ezt a hipotermiát egyik mérési pontnál sem (nem volt szignifikáns különbség a csoportok között). A TRPV1 antagonistával kezelt egereket fekete, a kontrollokat fehér szimbólumok jelölik¹⁶⁵.

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

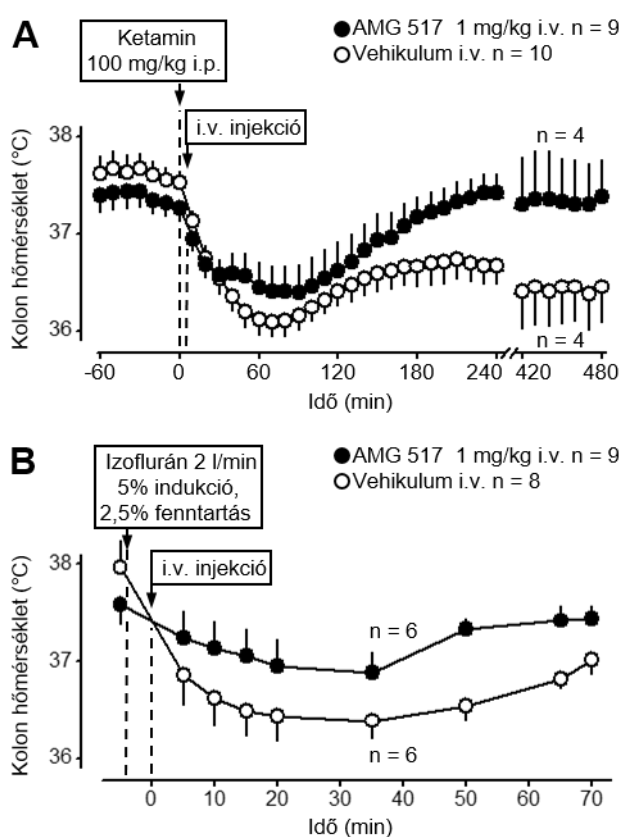
hozott létre 10-240 perccel az injekció beadása után, amelynek dinamikája hasonló volt a *Trpv1^{+/+}* egerek esetében látottakhoz. Ellentétben azonban a *Trpv1^{+/+}* egerekkel, az AMG 517 adása a *Trpv1^{-/-}* egerekben nem védte ki a ketamin által indukált hipotermiát (26.B ábra). Nem találtunk szignifikáns különbséget az AMG 517-tel és vivőanyaggal kezelt *Trpv1^{-/-}* egerek T_m -e között a kísérlet teljes időtartama alatt. A ketaminra adott T_m válaszok dinamikája kissé különbözött a *Trpv1^{+/+}* és a *Trpv1^{-/-}* egerek között, amelynek hátterében feltehetően a *Trpv1^{-/-}* egerekre jellemző karakterisztikus termoeffektor mintázat (úgy mint fokozott vazokonstriktió, hipometabolizmus és hiperaktivitás) állhat, amelyet T_m -ük szabályozásában felhasználnak (lásd 5.1.1.1.1. fejezet), és amelyet a ketamin eltérő módon befolyásolhat.

Ezek után megvizsgáltuk, hogy melyik autonóm termoeffektor járul hozzá az AMG 517 ketamin által indukált hipotermiára kifejtett hatásához. Elsőként, az AMG 517-et vagy vivőanyagát i.v. infundáltuk fiziológias sóoldat i.p. injekcióját követően, annak érdekében, hogy igazoljuk az AMG 517 hipertermizáló hatását patkányokban (27.A ábra). Az AMG 517 a T_m kifejezett mértékű emelkedését váltotta ki, amelynek csúcspontja $38,9 \pm 0,2^\circ\text{C}$ volt a beadást követő 80. percnél ($p < 0,001$). Az AMG 517-tel kezelt patkányokban a T_m szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollokban az anyagadást követő 30. és 240. perc között. A T_m emelkedésével együtt az AMG 517-tel kezelt állatok VO_2 -je is megnövekedett, amely a kontrollokhoz képest szignifikánsan magasabb volt 30-190 perccel az injekciót követően. Annak ellenére, hogy a VO_2 -t a didergéses és nem-didergéses (barnazsírsvöveti) hőtermelés egyaránt fokozhatja, patkányokban a nem-didergéses termogenezisnek van nagyobb jelentősége²¹⁴. Ezeket a kísérleteket alacsony, 23°C -os T_k -n hajtottuk végre, amelyre az anesztézia által indukált hipotermia kialakulásának biztosítása céljából volt szükség. Ebben a szubneutrális környezetben a patkányok farkán a T_b folyamatosan alacsony volt a hideg által indukált vazokonstriktió miatt mindkét kezelési csoportban. Az AMG 517 T_m -re és autonóm termoeffektorokra kifejtett hatásával kapcsolatos eredményeink (27.A ábra) összhangban állnak a TRPV1 antagonisták által indukált hipertermia mechanizmusaival kapcsolatos korábbi eredményekkel^{62,70}. A ketaminnal kezelt patkányokban, az AMG 517 i.v. beadása kivédte az altatás által indukált hipotermia kialakulását (27.B ábra). 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 ($p < 0,05$). Érdekes módon, egy átmeneti, de szignifikáns mértékű emelkedést regisztráltunk az AMG 517-tel kezelt patkányoknál a T_b -ben a vehikulum kezeléshez képest.



27. ábra: Az AMG 517 a termogenezis fokozása révén védi ki az anesztézia által indukált hipotermiát. (A) Éber (fiziológiás sóoldattal i.p. előkezelt) patkányokban az AMG 517 i.v. injekcióját követően mértük az állatok T_m , T_b és VO_2 változásait. Az AMG 517 a T_m szignifikáns emelkedését váltotta ki azonnal a beadás után, amely a 240. percig fennállt (felső panel). Az AMG 517 adása nem eredményezett szignifikáns változást a T_b -ben (középső panel), viszont jelentősen megemelte a VO_2 -t (alsó panel), amely statisztikailag szignifikáns volt a 30-190. percig ($p < 0,05$). (B) Elaltatott (100 mg/kg ketaminnal i.p. előkezelt) patkányokban az AMG 517 visszafordította a ketamin által indukált hipotermiát (felső panel) és átmenetileg (mindössze a 40. percig) megemelte a T_b -t (középső panel). A ketamin kezdetben (20-100. percig) csökkentette a VO_2 -t, amely AMG 517-tel kezelt állatokban csak kismértékű volt (alsó panel). Az AMG 517-tel kezelt állatok VO_2 -je a vehikulummal kezelt állatokéhoz képest szignifikánsan magasabb maradt a kísérlet nagyrésztében (40. perctől végig; $p < 0,05$). A TRPV1 antagonistával kezelt patkányokat fekete, a vehikulummal kezelteteket fehér szimbólumok jelölik¹⁶⁵.

Tekintettel arra, hogy bizonyos TRPV1 antagonisták éber (nem anesztetizált) rágcsálókban és emberekben hipertermiát okozhatnak (részletekért, lásd 2.2.1.2. fejezet), fontosnak tartottuk annak vizsgálatát is, hogy az altatott patkányoknak adott TRPV1 antagonisták 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 (28.A ábra).



28. ábra: Az AMG 517 kivédi a ketaminnal és izofluránnal indukált T_m csökkenést hipertermia létrehozása nélkül. **(A)** A T_m ketamin adást követő 480 perces regisztrálása során az anesztéziából való felépülés (kb. 60 perc beadás után) után sem alakult ki hipertermia AMG 517 hatására. **(B)** A T_m 20 perces izoflurán adagolást követő 50 perces regisztrálása során, az anesztéziából való felépülés (kb. 15 perc a gáz kikapcsolásától) után sem alakult ki hipertermia AMG 517 hatására. A TRPV1 antagonistával kezelt patkányokat fekete, a vehikulummal kezelteteket fehér szimbólumok jelölik¹⁶⁵.

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 ismertett eredményeink alapján várható is volt (26.A és 27.B ábra). 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 (28.A ábra). 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 (28.B ábra). Hangsúlyozni kell, hogy az AMG 517 az izoflurán által indukált hipotermiát is kivédte, azonban a ketaminhoz hasonlóan a

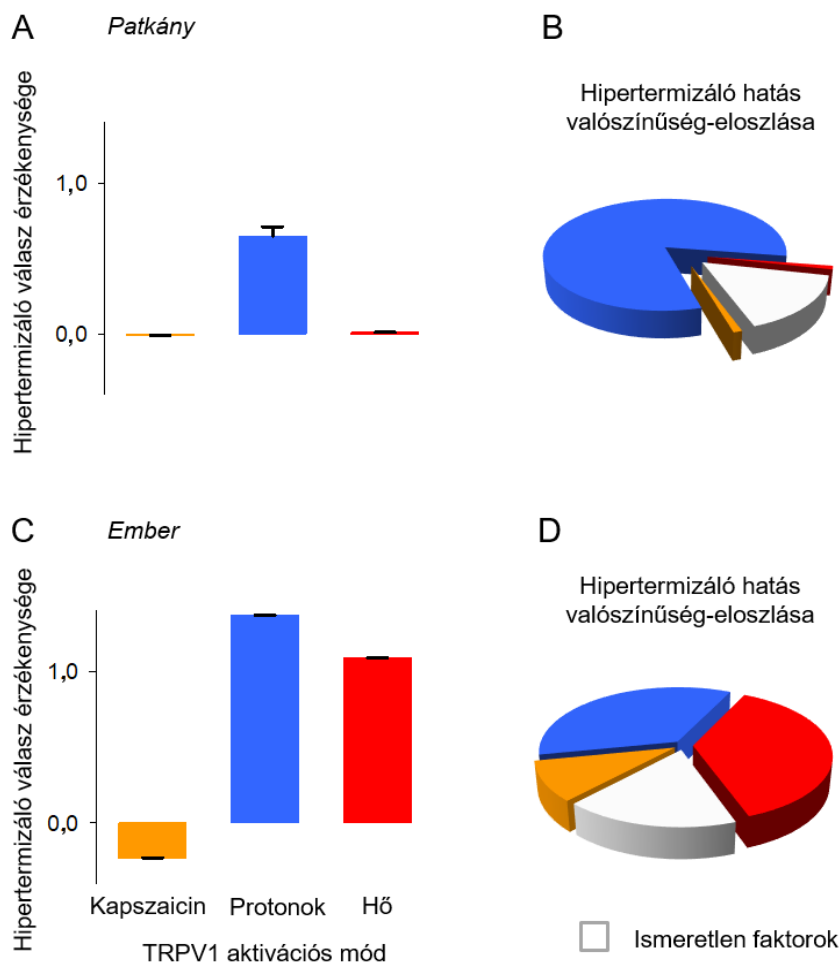
kiindulási értékhez képest nem okozott hipertermiát az anesztézia felfüggesztése után 20-70 perccel sem (28.B ábra).

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 vonatkozásait is tudni szerettem volna. A TRPV1 antagonisták termoregulatórikus hatásával kapcsolatban megvizsgáltuk, 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 tanulmányunk⁷⁰ 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, a 2. táblázatban (lásd 4.2.1.1. fejezet) található keresőkulcs segítségével 87 humán vizsgálatot azonosítottunk, amelyek közül 18 tanulmányban mértek valamilyen módon T_m -et³¹. A matematikai elemzéshez és a metaanalízishez *a priori* meghatározott beválogatási és kizárási kritériumok ellenőrzése után végül 4 tanulmány adatait tudtuk felhasználni^{66,67,193,195}, egy további TRPV1 antagonistával (V116517) szerzett humán adatokat pedig szerzőtársaink a fejlesztő gyógyszercégtől (Purdue Pharma) bocsátották rendelkezésünkre. Az analíziseinkben felhasznált teljes adathalmazt a 3. táblázat tartalmazza (lásd 4.2.2. fejezet).

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 (29. ábra).



29. ábra: A TRPV1 csatorna különböző aktivációs módjainak hozzájárulása a TRPV1 antagonisták által kiváltott hipertermiához patkányokban (**A**, **B**) és embereknél (**C**, **D**). A TRPV1 antagonisták különbözőképpen hatnak a kapszaicin, protonok és hő általi TRPV1 csatorna aktivációra; több TRPV1 antagonisták okoz hipertermiát. Az oszlopok (átlag \pm SE) jelölik a hipertermiás válasz érzékenységét az egyes módokat gátló hatáserősséggel szemben patkányokban (**A**) és embereknél (**C**). Amíg patkányokban a TRPV1 antagonistákra adott hipertermiás válasz kizárólag az antagonisták által TRPV1 aktivációt gátló hatáserősségtől függ, addig embereknél a hipertermiás válasz egyaránt függ az antagonisták protonok és hő általi aktivációs módokat gátló hatáserősségtől. A tortagrafikonok ábrázolják az egyes aktivációs módok (és a modell számára ismeretlen faktorok) relatív hozzájárulását a hipertermiás válasz kialakulásához patkányokban (**B**) és embereknél (**D**)³¹.

Analízisünk során, továbbá, azt is megállapítottuk, hogy a patkányokban kialakuló hipertermiás válasszal szemben (amely nem mutat érzékenységet a hő általi aktivációs mód megváltozásával), embereknél ez a válasz magasfokú érzékenységet mutat az antagonisták hő általi aktivációját gátló hatáserősségével. Az embereknél kialakuló válasz esetén, a hő általi aktivációs módban a hipertermizáló hatás érzékenységi

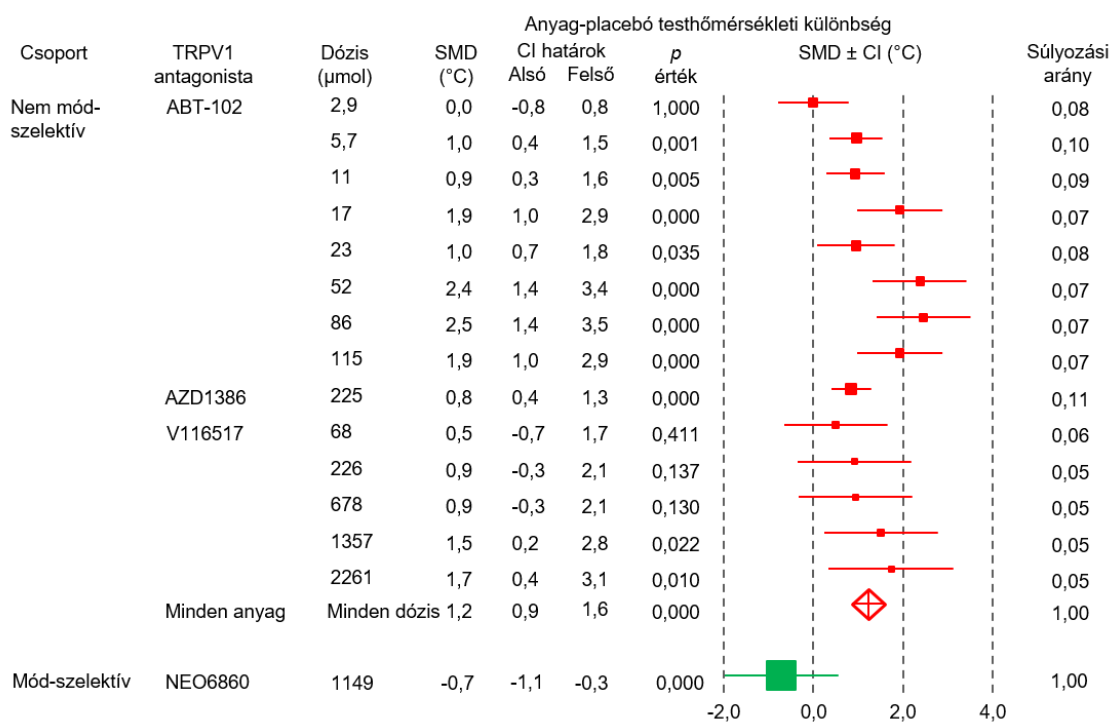
együtthatója $1,09 \pm 0,00$ volt ($p < 0,001$). A kapszaicin aktivációs módot illetően, annak gátlása sem patkányokban (a JYL1421 adatainak felhasználásával, lásd 7. ábra), sem pedig embereken nem volt lényeges a hipertermizáló hatás kifejtése szempontjából. Emberekben, a hipertermiás válasz érzékenysége 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 és a 29. ábrán bemutatott 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 (lásd 4.2.2. fejezet). 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 embereken a patkányokhoz képest (vagyis nem egy, hanem két aktivációs módtól való függése), abból is nyilvánvaló, hogy mennyire változó a különböző módokban az antagonistá hatáserősség hozzájárulása a hipertermiás válaszhoz (29. ábra). 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%. Embereken, 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 az anyag (vagy placebo) adása 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 placebo 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 konfidenciaintervallumot (CI) tekintettük az elsődleges hatáserősségnek, amelyeket forest plot formájában ábrázoltunk (30. ábra). Az anyagokat két csoportba osztottuk: nem mód-szelektív (ABT-102, AZD1386 és V116517) vagy mód-szelektív (NEO6860). A nem mód-szelektív csoport karakterizálásához az ide tartozó antagonisták SMD értékeit az elemszám és az inverz variancia alapján súlyoztuk.



30. ábra: Forest plot a TRPV1 antagonisták termális hatásáról. Minden antagonistá dózishoz kiszámítottunk egy SMD értéket (a T_m válasz mértékét) és a hozzá tartozó CI-t (részleteket lásd a szövegben). Előbbit az ábrán négyzetek, utóbbit a négyzetek vízszintes karjai ábrázolják. A négyzetek területe arányos az elemszámmal és az inverz varianciával. A rombusz a nem mód-szelektív csoportban a súlyozott, átlagos SMD-t jelenti; függőleges átlója az SMD-re mutat, míg vízszintes átlaga a CI-t reprezentálja. A piros szimbólumok a nem mód-szelektív TRPV1 antagonistákat jelölik, a zöld négyzet pedig a mód-szelektív NEO6860 antagonistát³¹.

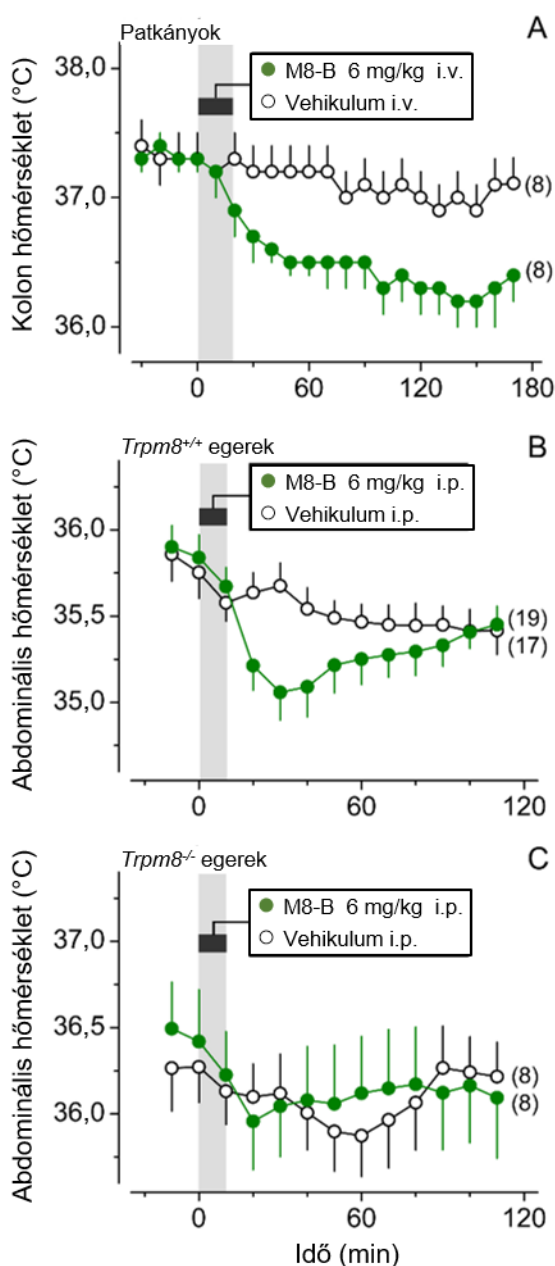
A nem mód-szelektív csoportban mindhárom antagonistá hipertermiát okozott, amely dóziszfüggőnek látszott azoknál az anyagoknál, ahol különböző dózisokat is alkalmaztak, vagyis az ABT-102 és a V116517 esetében (30. ábra). A legkifejezettebb hipertermiás hatás (SMD: 2,5; CI: 1,4, 3,5) az ABT-102 anyag 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 csatornának 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 hatásával¹⁹⁵. 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^{72,73,76}, vagy az Abbvie Compound 3 nevű anyaga²¹⁵, szintén leírtak hipotermizáló hatást. Metaanalízisünk limitációjaként azonban meg kell említeni, hogy csak egy mód-szelektív antagonistá egyetlen dóziséval tudtuk elemezni, így az analízist további adatok elérhetővé válásakor feltétlenül érdemes lenne kiegészíteni.

5.1.2. A TRPM8 ioncsatorna fájdalomtalan hidegérzékelésben betöltött szerepének experimentális vizsgálata

A hidegre érzékeny receptorok közül először a TRPM8 csatorna termoregulatórikus szerepét tanulmányoztuk¹⁶⁶. 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 dóziséval (6 mg/kg) 20 percig tartó i.v. infúziója jelentős (~0,9°C-os) T_m csökkenést okozott a vehikulumhoz képest ($p = 0,031$) (31.A ábra). Ezek után telemetriás

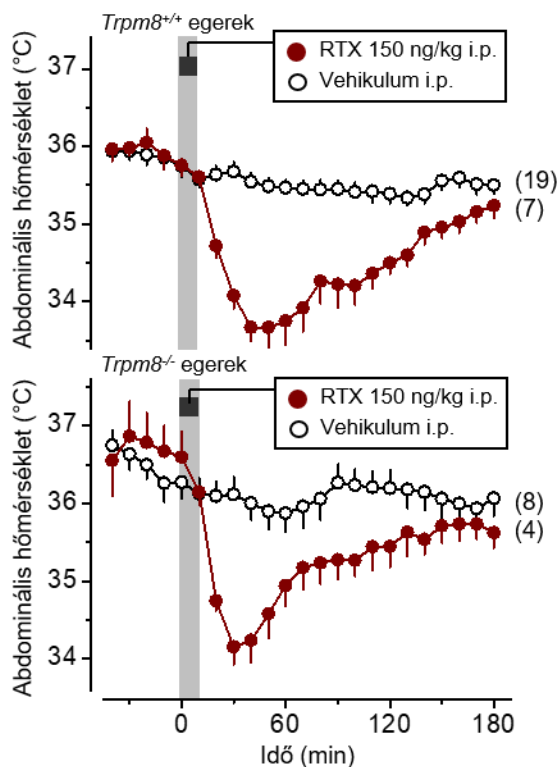
termometriával megvizsgáltuk, hogy az M8-B T_m hatásai jelen vannak-e $Trpm8^{-/-}$ és $Trpm8^{+/+}$ egerekben. Ezeket a kísérleteket szintén szubneutrális körülmények között végeztük ($T_k = 26^\circ\text{C}$). A patkányokhoz hasonlóan, az egereknek is stresszmentes módon, korábban (pre)implantált katéteren keresztül adtuk be az M8-B-t (6 mg/kg) vagy vivóanyagát. Mindazonáltal, azért, hogy a kis, sérülékeny egér vénák krónikus katéterezésével járó technikai problémákat elkerüljük, a katétert az egerek hasüregébe (i.p.) implantáltuk. 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 ($p < 0,001$) (31.B ábra). Ellentétben a WT egerekkel, a $Trpm8^{-/-}$ egerek abdominális T_m -ére az M8-B nem volt hatással (31.C ábra).



31. ábra: Az M8-B csökkenti a T_m -et patkányokban és $Trpm8^{+/+}$ egerekben, de $Trpm8^{-/-}$ egerekben nincs termoregulatorikus hatása. Az ábrán látható az M8-B (dózis feltüntetve) vagy vehikuluma i.v. infúziójának hatása patkányok kolonban mért T_m -ére (A), valamint az M8-B vagy vehikuluma i.p. infúziójának hatása az abdominális T_m -re $Trpm8^{+/+}$ egerekben (B), illetve $Trpm8^{-/-}$ egerekben (C). A kísérleteket mindkét faj esetében szubneutrális T_k -n végeztük: patkányoknál 19°C -on, egereknél 26°C -on. Ezen, valamint a 32. és a 33. ábrán az infúzió időtartamát fekete sáv jelzi. Az M8-B-vel kezelt állatokat zöld, a kontrollokat fehér szimbólumok jelölik. A zárójelben feltüntetett számok az adott csoportban felhasznált állatok számát jelentik¹⁶⁶.

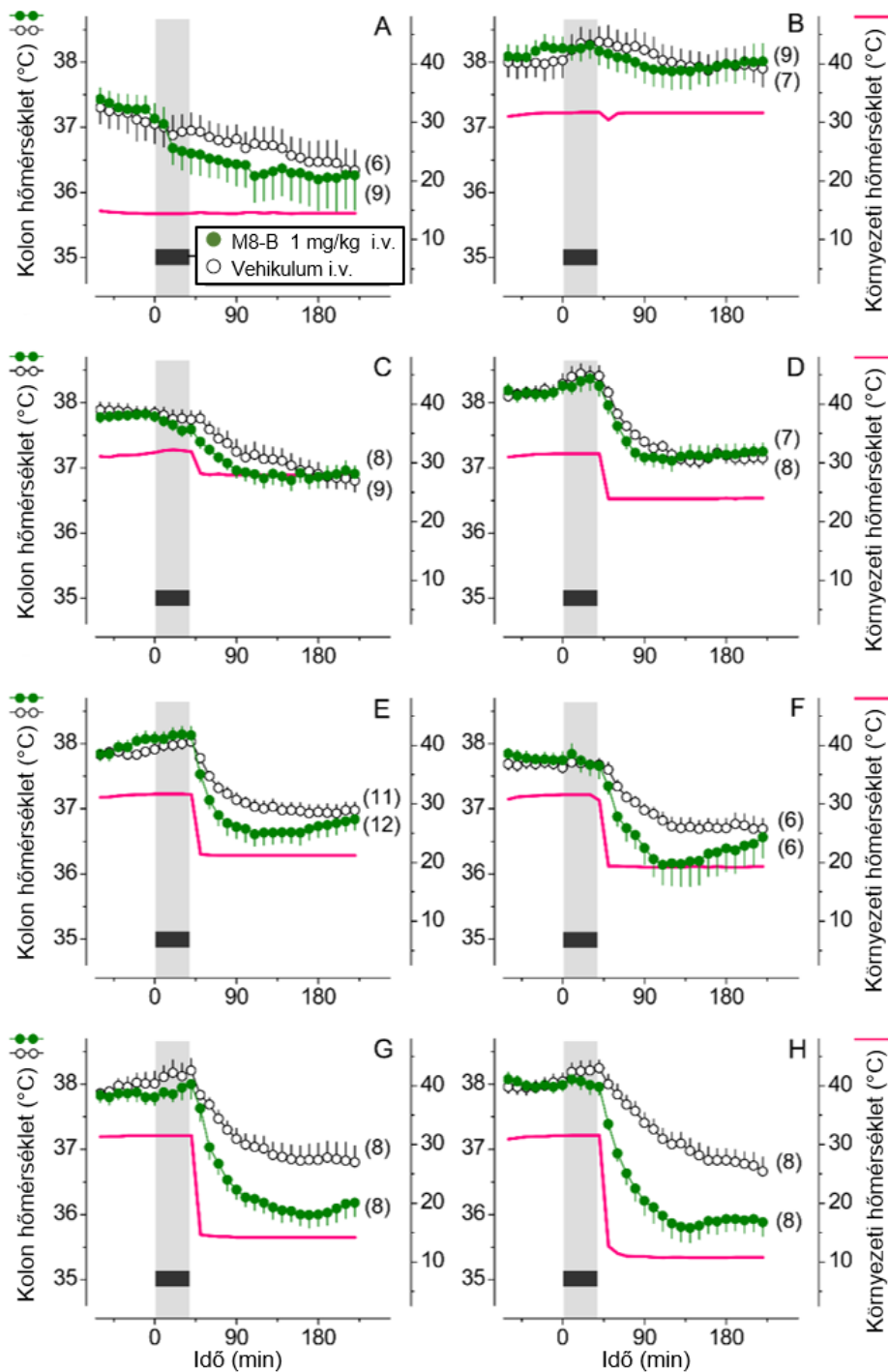
Fontos volt azt is megállapítani, hogy a $Trpm8^{-/-}$ egerekben az M8-B nem azért volt hatástalan, mert azok egyáltalán nem képesek hipotermiássá válni. Ennek tisztázása érdekében további kísérleteket végeztünk. Amikor a KO egereket a

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°C-os) T_m csökkenéssel reagáltak a vehikulumhoz képest ($p < 0,001$), amely válasz nagyban hasonlított a *Trpm8*^{+/+} egerek RTX-re adott hipotermiás válaszához (32. ábra).



32. ábra: RTX hatására hipotermia alakult ki a *Trpm8*^{+/+} és a *Trpm8*^{-/-} egerekben egyaránt. Az ábrán látható az RTX (dózis feltüntetve) vagy vehikuluma i.p. infúziójának hatása az abdominális T_m -re *Trpm8*^{+/+} egerekben (felső panel), illetve *Trpm8*^{-/-} egerekben (alsó panel). A kísérleteket szubneutrális, 26°C-os T_k -n végeztük. A RTX-szel kezelt egereket bordó, a kontrollokat fehér szimbólumok jelölik. A zárójelben feltüntetett számok az adott csoportban felhasznált állatok számát jelentik¹⁶⁶.

Eredményeink alapján feltételezhető volt, hogy az M8-B a periférián, szenzoros idegvégződéseken hatva fejt ki hipotermizáló hatását¹⁶⁶, 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 (33. ábra). Az első két kísérletben a T_k -t állandó szinten tartottuk: vagy 15°C-on, ami a termoneutrális zóna alatt van (33.A ábra) vagy 32°C-on, ami a termoneutrális zóna felső határát jelenti (33.B ábra). Ezekon 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 berendezésben⁸⁵, így az antagonistát 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 vérrel volt átáramoltatva, hiszen a TRPM8 csatorna *in vitro* aktivációs küszöbe 22-27°C alatt van^{90,91}.



33. ábra: Az M8-B termoregulatórikus hatása erősen függ a T_k -tól. Az ábrán látható az M8-B (dózis feltüntetve) vagy vehikuluma i.v. infúziójának hatása a kolonban mért T_m -re patkányokban. A kísérletek során az első kamra vagy szubneutrális 15°C-ra (A) vagy szupraneutrális 32°C-ra (B-H) volt beállítva. A második kamrában a T_k -t a következő értékekre állítottuk: 15°C (A), 32°C (B), 28°C (C), 24°C (D), 21°C (E), 19°C (F), 14°C (G), vagy 11°C (H). Az átlagos T_k -t, amelynek az állatok ki voltak téve a kísérlet során, rózsaszín vonal jelöli. Az M8-B-vel kezelt patkányokat zöld, a kontrollokat fehér szimbólumok jelölik. A zárójelben feltüntetett számok az adott csoportban felhasznált állatok számát jelentik¹⁶⁶.

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 vazokonstriktió már sokkal magasabb, 27°C-os, T_k -n bekövetkezik⁸⁵. Következésképpen, ezekben a kísérletekben az M8-B valószínűleg nem jutott el megfelelő mértékben a bőr szenzoros idegvégződéseinek 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 dózisát (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 elsőől eltérő T_k -t állítottunk be: 28, 24, 21, 19, 14, vagy 11°C-ot (33.C-H ábra). A második kamrában beállított T_k csökkenésével párhuzamosan, az M8-B-vel kezelt patkányokban a T_m esése volt megfigyelhető a vehikulummal kezelt kontrollokhöz képest. Amikor a T_k 14°C (33.G ábra) vagy 11°C (33.H ábra) 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 kis dózisú M8-B i.v. infúziója esetén.

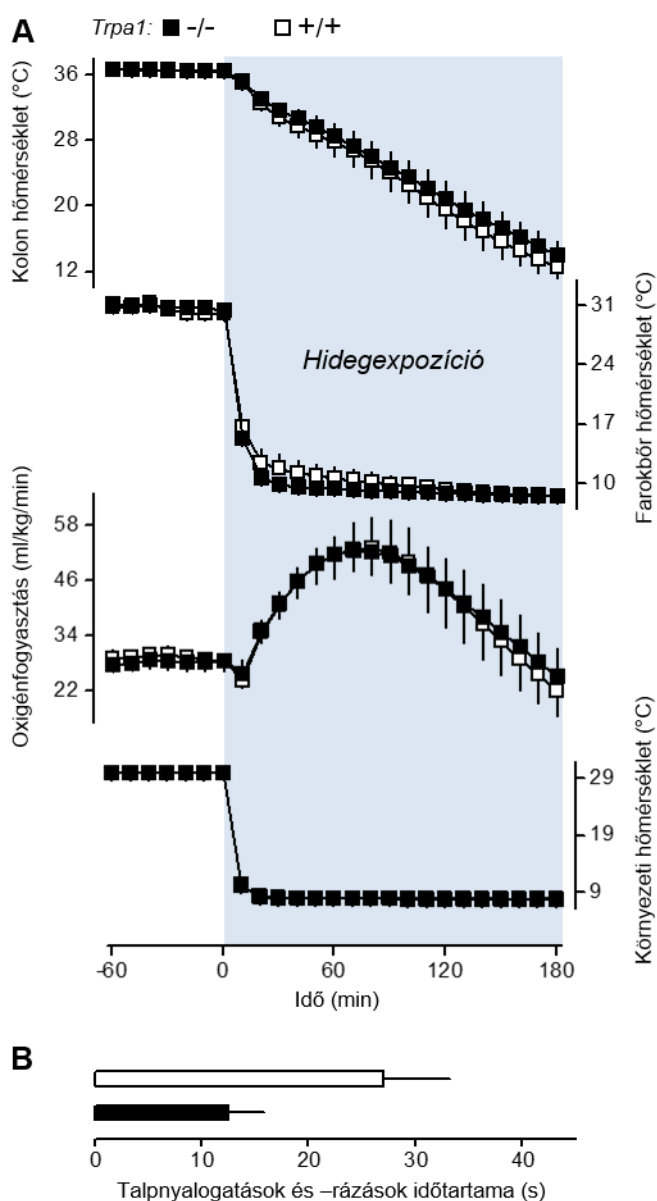
További kísérletek során arra is fény derült, hogy a hipotermia kialakulása során az M8-B minden vizsgált hideg elleni védekezőmechanizmust (melegkereső magatartás, bőr vazokonstriktió, barnazsír-szöveti termogenezis) gátolt, amely eredmények összességében arra utalnak, hogy a TRPM8 csatorna a termoregulációs rendszer univerzális hidegszenzoraként funkcionál (részletekért, lásd Almeida és mtsai.¹⁶⁶).

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 küszöbét⁹³, az egerekben súlyos hidegexpozíciós kísérleti modellt ($T_k = 8^\circ\text{C}$ 180 percig) alkalmaztunk respirometriás termometriában¹⁶⁷. Ebben a modellben, a *Trpa1*^{+/+} és a *Trpa1*^{-/-} egerekben egyaránt kialakult bőr vazokonstriktió (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 (34.A ábra).



34. ábra: Súlyos hidegexpozíció nem tárt fel termoregulatórikus elégtelenséget a *Trpa1* KO egerekben. (A) 8°C-os T_k -nak való expozíció során, a *Trpa1* KO egereknél ($n = 8$) nem mutatkozott hiányosság T_m -ük védelme tekintetében WT társaikhoz ($n = 6$) képest. A T_m dinamikája nem különbözött a genotípusok között. Mind a farokbőr vazokonstriktív válasz (farok T_b csökkenés), mind a hőtermelési válasz (VO_2 emelkedés) mértéke legalább annyira robusztus volt a *Trpa1* KO egerekben, mint WT társaikban. (B) A TRPA1 csatorna funkcionális károsodása megerősíthető volt mustárolaj (0,75%, 20 μ l) intraplantáris injektálására bekövetkező csökkent nocifenzív reakció kialakulásával a TRPA1 KO egerekben ($n = 6$) WT társaikhoz képest ($n = 5$). A *Trpa1* KO egereket fekete, a kontrollokat fehér szimbólumok jelölik. A hűtés időtartamát kék háttérrel jelöltem¹⁶⁷.

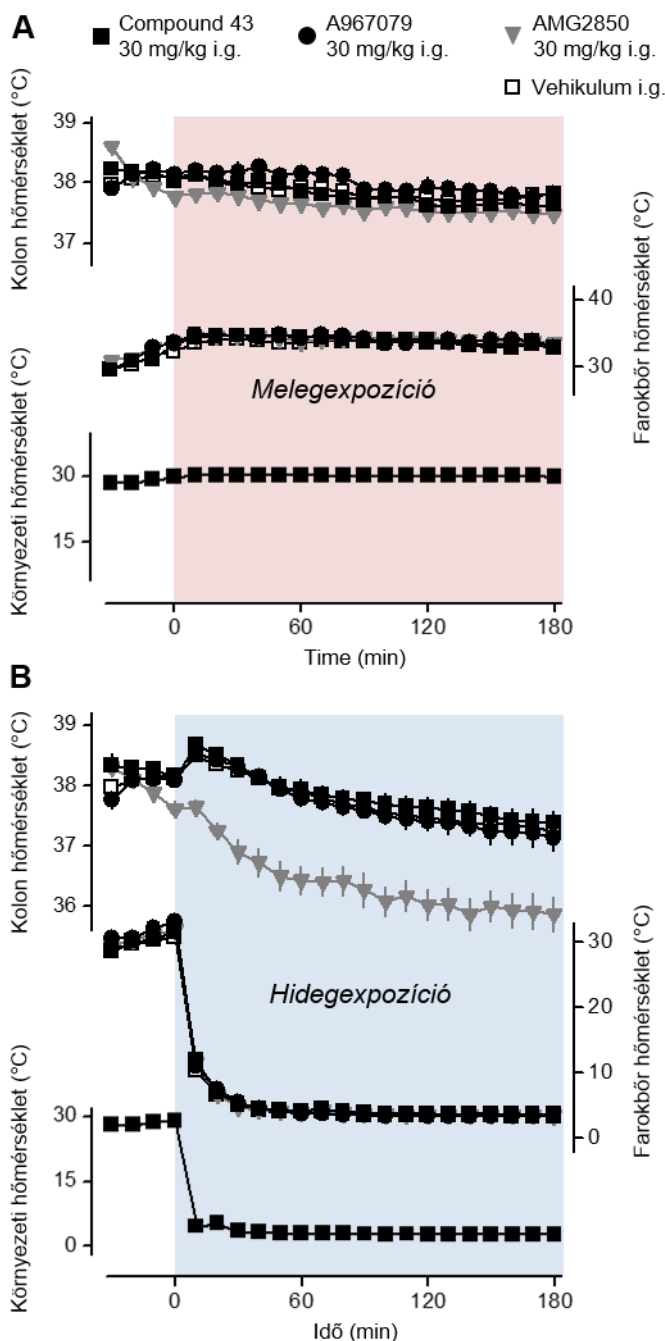
Sem a T_m válaszban, sem a termoeffektor válaszokban nem volt különbség a genotípusok között. Figyelemre méltó, hogy a farok T_b mindkét genotípusban 17°C alá esett már a hidegexpozíció kezdetén (~10. percnél). A kísérlet végére, már a kolon T_m is 13°C körüli volt (vagyis 4°C-kal alacsonyabb a TRPA1 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; $p = 0,036$) (34.B ábra). Összefoglalva, a *Trpa1* genetikai deléciója egerekben nem befolyásolta a súlyos

hidegexpozíció során kialakuló T_m választ és az autonóm hideg elleni effektorokat sem, annak ellenére, hogy mind a T_b , mind a T_m meghaladták a TRPA1 csatorna hőmérsékleti aktivációs küszöbértékét. Ez az eredmény összhangban van azokkal a korábbi tanulmányokkal, amelyekben a *Trpa1*^{-/-} egerek fájdalmas hidegérzékelése zavartalan volt^{108,109}. A TRPA1 csatornák tehát vagy nem aktiválódnak hidegre az egerekben, vagy nem továbbítanak hőmérsékleti szignálokat az autonóm termoeffektorok felé, vagy mindkettő. Ennek a következtetésnek egyik lehetséges veszélye azonban az, hogy a *Trpa1*^{-/-} egerekben potenciálisan kialakulhatott más hidegszenzorok krónikus kompenzatórikus túlműködése, amelyek ily módon funkcionálisan fontossá válhattak a TRPA1 csatorna hiányában. Annak érdekében, hogy az esetleges krónikus kompenzációs mechanizmusokból eredő téves következtetéseket elkerüljük, genetikailag nem módosított állatokat is felhasználtunk, amelyekben a TRPA1 csatornát akutan, farmakológiailag gátoltuk az A967079¹⁰⁶ vagy a Compound 43²¹⁶ 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 termometriával¹⁶⁷. Az alkalmazott dózisban mindkét TRPA1 antagonistának analgetikus hatása igazolható volt^{106,167}. Annak ismeretében, hogy a TRPM8 csatorna farmakológiai blokádjá gátolni tudja a hideg elleni védekezést (lásd 5.1.2. fejezet), az AMG 2850-et (30 mg/kg, i.g.), egy szelektív és potens TRPM8 antagonistát²¹⁷, használtuk pozitív kontrollként. Hideghatásra a patkányok bőrérzékenysége konstrikcióval, így a bőr vérátáramlásának drasztikus csökkenésével reagálnak, ami megakadályozhatja, hogy egy szisztémásan beadott anyag elérhesse célpontjait, hogyha azok a bőrben találhatóak. Annak érdekében, hogy ezt áthidaljuk – hasonlóan a TRPM8 csatorna kapcsán leírt kísérletekhez (lásd 5.1.2. fejezet) – két inkubátor kamrát használtunk. Az anyagokat az első (meleg) kamrában adtuk be az állatoknak 30°C-os T_k -n, amelynél a bőr erei dilatáltak⁸⁵. 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 30°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 (35.A ábra). Ezek az eredmények megerősítik, hogy termoneutrális környezetben sem a TRPM8 antagonisták¹⁶⁶, sem a TRPA1 antagonisták¹⁰⁶ nincsenek hatással a termoregulációra.

Amikor a patkányokat 30°C-ról 3°C-ra helyeztük át, különböző termoregulátorikus válaszok alakultak ki a különböző kezelési csoportokban. A vehikulummal kezelt patkányokban egy kismértékű, átmeneti T_m emelkedést követően, fokozatos, mérsékelt (~0,9°C) csökkenés alakult ki (35.B ábra).



35. ábra: A TRPA1 csatorna farmakológiai gátlása nem befolyásolja a hideg elleni védekezést patkányokban. (A) A vehikulumhoz (n = 13) képest, sem a TRPA1 antagonistá Compound 43 (n = 13) vagy A967079 (n = 5), sem a TRPM8 antagonistá AMG2850 (n = 13) nem volt hatással a patkányok T_m és T_b dinamikájára melegben. A 0. percben a patkányok egy 30°C-ra állított inkubátor kamrából egy másik, szintén 30°C-ra állított, inkubátor kamrába kerültek. Az áthelyezés előtt 30 perccel mindegyik anyagból azonos dózis (30 mg/kg, i.g.) került beadásra. (B) A vehikulumhoz (n = 11) képest, a TRPA1 antagonistá Compound 43 (n = 6) vagy A967079 (n = 8) nem volt hatással a patkányok hideg által kiváltott T_m és T_b válaszaikra, míg a TRPM8 antagonistá AMG2850 (n = 6) nagymértékű T_m csökkenést okozott. A 0. percben a patkányok

30°C-ról 3°C-ra kerültek. Az áthelyezés előtt 30 perccel mindegyik anyagból azonos dózis (30 mg/kg, i.g.) került beadásra. A TRPA1 antagonistával kezelt patkányokat fekete, a TRPM8 antagonistával kezeltet szürke, a kontrollokat fehér szimbólumok jelölik. A melegexpozíció időtartamát piros, a hidegexpozíciót kék háttérrel jelöltem¹⁶⁷.

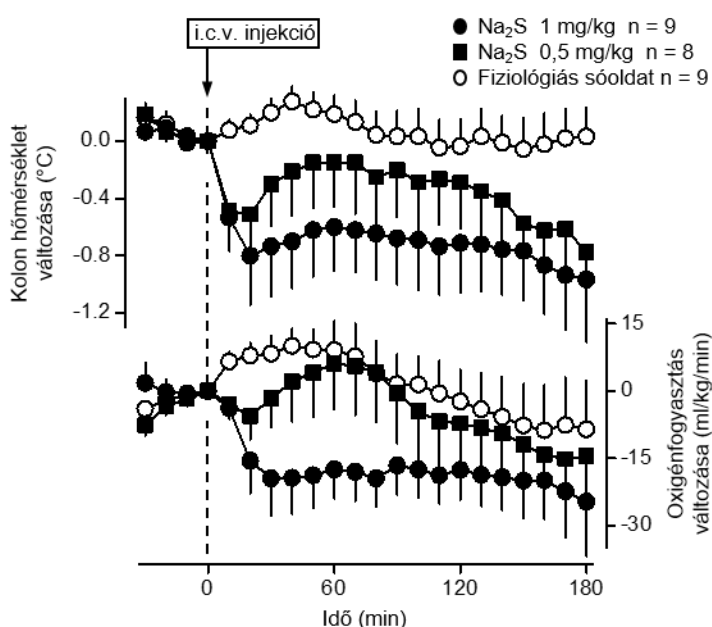
Ez nem volt meglepő, hiszen a patkányok a hideggel szemben sokkal jobban ellen tudnak állni, mint az egerek (34.A ábra), és hidegexpozícióra gyakran reagálnak kezdeti T_m emelkedéssel²¹⁸. Kísérleteinkben a hidegnek kitett patkányokban hirtelen bőr vazokonstriktió alakult ki, farkukon a T_b percek alatt 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 (35.B ábra). Velük ellentétben, az AMG2850-nel kezelt patkányok T_m -e jelentős mértékben lecsökkent (nadír: -1,8°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 (35.B ábra). 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 rágcsálókban (lásd 5.1.2. fejezet). Tekintettel az általunk vizsgált mindkét TRPA1 antagonistá kapcsán kapott negatív eredményre (35.A és B ábra), fontos volt meghatározni, hogy megfelelő mennyiségben voltak-e jelen a szisztémás keringésben ahhoz, hogy a TRPA1 csatornát gátló hatásukat megfelelően kifejtsék 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 $468 \pm 86 \text{ nmol/l}$, míg a vehikulummal kezelt állatok plazmájában egyik anyagot sem lehetett kimutatni ($p < 0,001$ mindkét anyag esetén) (részletéért, lásd de Oliveria és mtsai.¹⁶⁷). Az A967079 plazmaszintje tehát 7-szer, a Compound 43-é 24-szer magasabb volt, mint IC_{50} értékeik, amely megerősíti az alkalmazott dózisok TRPA1 csatornát gátló hatásosságát kísérleteinkben. Összefoglalva, a két felhasznált, potens és szelektív TRPA1 antagonistá közül egyik sem befolyásolta a patkányok termoregulatórikus válaszkésztségét nagyfokú hidegexpozíció során.

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 ismertett 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

rágcsálókban 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 H_2S termoregulatórikus hatásait tanulmányoztuk¹⁶⁸.

Először, respirometriás termometria segítségével megvizsgáltuk a centrálisan beadott Na_2S , egy H_2S -t gyorsan felszabadító donor²¹⁹, hőszabályozási hatását C57BL/6 egerekben. Azt találtuk, hogy i.c.v. injektált Na_2S hatására az egereknél a T_m csökkenése alakult ki, amely a nagyobb dózissal kifejezettebb volt, míg a fiziológiás sóoldat nem okozott hőmérsékleti hatást (36. ábra).

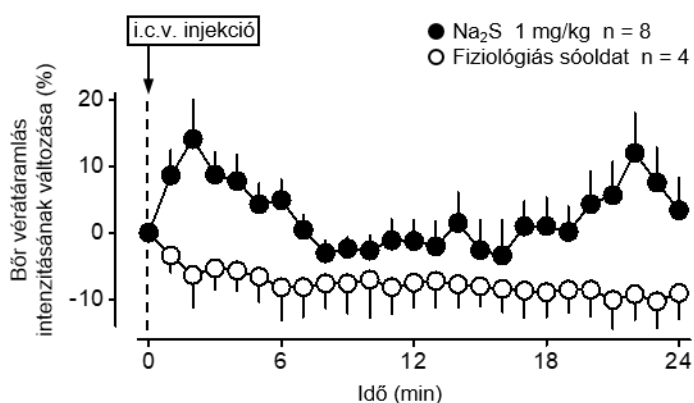


36. ábra: C57BL/6 egerek T_m és VO_2 változásai i.c.v. injektált Na_2S (dózisok feltüntetve) vagy sóoldat hatására. A kolon hőmérséklet (T_m egyik formája) változása a felső panelben, míg a VO_2 változása (a termogenezis indikátora) az alsó panelben látható. Az Na_2S -sel kezelt egereket fekete, a kontrollokat fehér szimbólumok jelölik¹⁶⁸.

Az Na_2S -re adott hipotermiás válasz mindkét alkalmazott dózissal gyorsan kialakult, és 20 perc alatt érte el a legnagyobb átlagos csökkenést: 0,5 mg/kg-nál $-0,5 \pm 0,3^\circ C$ -ot, 1 mg/kg-nál pedig $-0,8 \pm 0,3^\circ C$ -ot ($p = 0,045$ és $0,005$). A hatás mind az alacsonyabb, mind pedig a magasabb Na_2S dózisok esetében szignifikáns volt a sóoldathoz képest ($p < 0,001$ mindkét esetben). A Na_2S 0,5 mg/kg-os dózisánál a T_m a 20., 170. és 180. percben szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a sóoldattal kezelt egereké, míg az 1 mg/kg-os dózissal a T_m csökkenése a 20-180. percig volt szignifikáns a sóoldathoz képest. Ugyanezekben a kísérletekben mértük a VO_2 -t is, amelyet a nem-didergés termogenezis (azaz az egyik fő autonóm termoeffektor) indikátorának tekintettünk, ahogyan azt más egereken végzett vizsgálatokban is tettük^{69,174}. Azt találtuk, hogy az Na_2S által kiváltott hipotermia kialakulásában szerepet játszott a VO_2 csökkenése, amely a T_m -hez hasonló dinamikával

változott (36. ábra). A VO_2 csökkenése mind az alacsonyabb, mind a magasabb Na_2S dózis esetében szignifikáns volt a sóoldathoz képest ($p = 0,024$, illetve $p < 0,001$). Az 1 mg/kg-os dózis esetén a VO_2 szignifikánsan alacsonyabb volt a sóoldattal kezelt egerekénél a 20-110. percig. Mivel a várt hatás hipotermia volt, ezeket a kísérleteket $22^\circ C$ -os szubtermoneutrális T_k -n végeztük. Egerekben és patkányokban szubneutrális környezetben bőr vazokonstrikció jön létre, amit az alacsony farokbőr hőmérséklet is jelez^{69,85,167}. Mindez nem tette lehetővé, hogy ebben a kísérleti elrendezésben vizsgáljuk a bőr vazodilatációjának lehetséges hozzájárulását a Na_2S által kiváltott hipotermiához.

Annak megállapítása érdekében, hogy a bőr vérátáramlását befolyásolja-e az Na_2S centrális adása, következő lépésként lézer speckle kontrasztos képalkotással mértük a bőr vérátáramlás intenzitásának változásait altatott egerek hátának lumbális régiójában. Az Na_2S (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 ($p < 0,001$) (37. ábra). A vérátáramlás intenzitása szignifikánsan magasabb volt Na_2S kezelés hatására a sóoldathoz képest az 1-4., 6. és 20-24. percben.

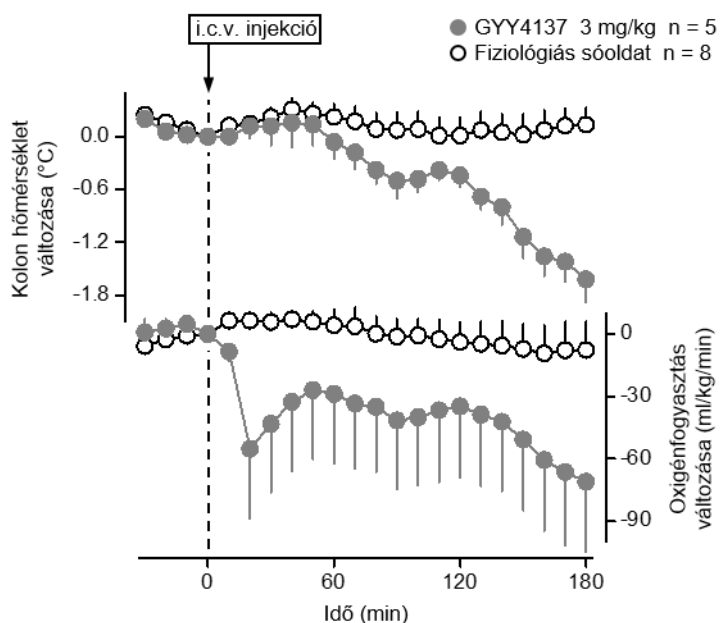


37. ábra: Altatott C57BL/6 egerek bőr vérátáramlás intenzitásának változásai a lumbális háti régióban i.c.v. injektált Na_2S (dózis feltüntetve) vagy sóoldat hatására. Az Na_2S -sel kezelt egereket fekete, a kontrollokat fehér szimbólumok jelölik¹⁶⁸.

A centrálisan injektált Na_2S -re adott hipotermiás és hipometabolikus válaszreakció gyors, dóziszfüggő kialakulása arra utal, hogy a felszabaduló H_2S támadáspontja a központi idegrendszerben található. Annak tesztelésére, hogy az Na_2S hipotermiás hatása kiváltható-e perifériás lokalizációból, megvizsgáltuk a nagy dózisu (5 mg/kg) Na_2S i.p. beadására kialakuló hőszabályozási választ. A várakozásoknak megfelelően, az i.c.v. adással ellentétben, amikor az egerek i.p. infúzióban kaptak Na_2S -t, T_m -ük nem különbözött szignifikánsan a sóoldattal kezelt egerektől 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 (részletekért, lásd Oláh és mtsai.¹⁶⁸).

Arra is kíváncsiak voltunk, hogy az Na₂S esetében megfigyelt hőszabályozási hatásokat kiválthatja-e GYY4137, amely egy H₂S-t lassan felszabadító donor²¹⁹. A GYY4137 (3 mg/kg) i.c.v. injekciója a respirometriás termometria rendszerben a sóoldatos kezeléshez képest kifejezett hipotermiát és hipometabolizmust okozott (38. ábra). A kezelés hatása statisztikailag szignifikáns volt mind a kolon hőmérsékletre ($p < 0,001$), mind pedig a VO₂-re ($p < 0,001$). A GYY4137-tel kezelt és a kontroll (sóoldattal kezelt) egerek között a T_m szignifikánsan különbözött a 80-100. perc ($p < 0,05$) és a 130-180. perc ($p \leq 0,001$) között, a VO₂-ben pedig a 20-30. perc és a 160-180. perc között volt szignifikáns különbség ($p < 0,05$).



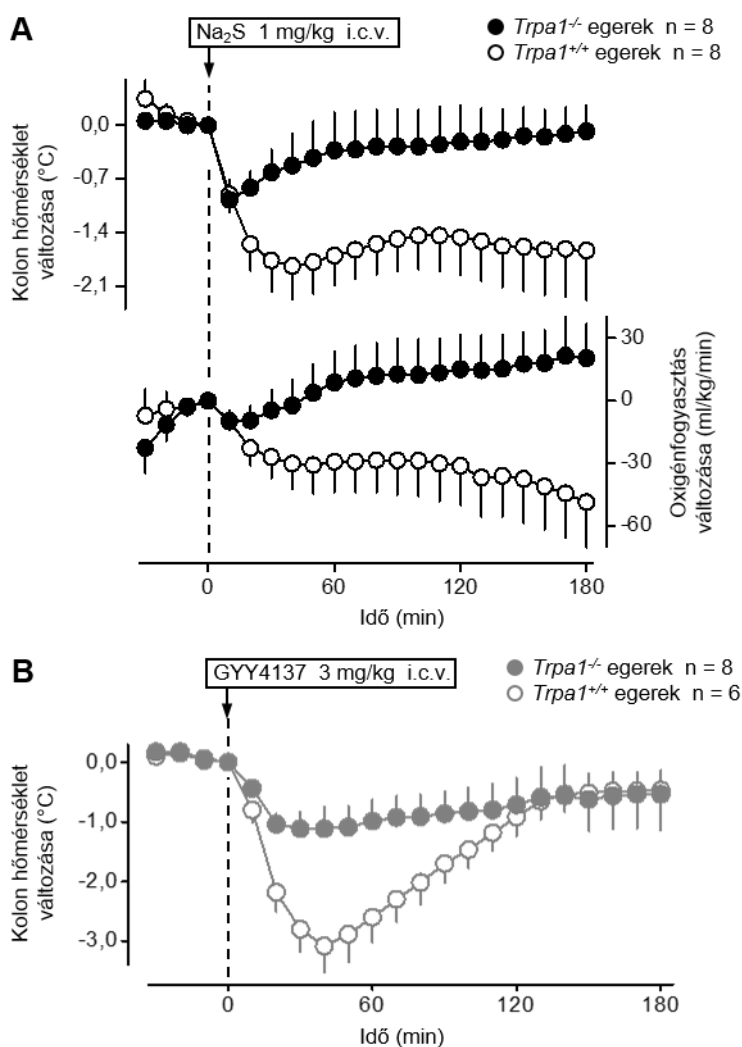
38. ábra: C57BL/6 egerek T_m (felső panel) és VO₂ (alsó panel) változásai i.c.v. injektált GYY4137 (dózis feltüntetve) vagy sóoldat hatására. A GYY4137-tel kezelt egereket szürke, a kontrollokat fehér szimbólumok jelölik¹⁶⁸.

Korábban kimutatták, hogy a TRPA1 csatorna közvetíti a H₂S különböző

hatásait, beleértve a nociceptív, gyulladáscsökkentő, vazomotoros és neurofiziológiai hatásokat (áttekintésért, lásd Pozsgai és mtsai.¹¹⁸), 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 (36. ábra), Na₂S (1 mg/kg) i.c.v. beadása a *Trpa1*^{+/+} egerekben is hirtelen megjelenő, kifejezett mértékű csökkenést okozott a T_m-ben (>1,5°C) és a VO₂-ben (>40 ml/kg/min) (39.A ábra). A *Trpa1*^{-/-} egerekben azonban az Na₂S ugyanazon dózisára adott hipotermiás és hipometabolikus hatás jelentősen mérséklődött ($p < 0,001$ mindkét paraméter esetén a

genotípusok között). Na₂S beadása után a *Trpa1*^{+/+} egerekben szignifikánsan alacsonyabb volt a T_m a 30. és 180. perc között, a VO₂ pedig a 60. és 180. perc között, mint a *Trpa1*^{-/-} egerekben.

A GYY4137 termoregulációs hatását is megvizsgáltuk *Trpa1*^{-/-} és *Trpa1*^{+/+} egerekben termoelem termometriával (39.B. ábra). 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 ($p < 0,001$). A *Trpa1*^{-/-} egerek kolon hőmérséklete szignifikánsan magasabb maradt, mint a *Trpa1*^{+/+} egereké a GYY4137 beadását követő 20. és 80. perc között.



39. ábra: A T_m (felső panel) és a VO₂ (alsó panel) változásai i.c.v. injektált Na₂S (dózis feltüntetve) vagy sóoldat hatására (A), illetve a T_m változásai i.c.v. injektált GYY4137 (dózis feltüntetve) vagy sóoldat hatására (B), *Trpa1*^{+/+} és *Trpa1*^{-/-} egerekben. A kezelt egereket fekete vagy szürke, a kontroll állatokat fehér szimbólumok jelölik¹⁶⁸.

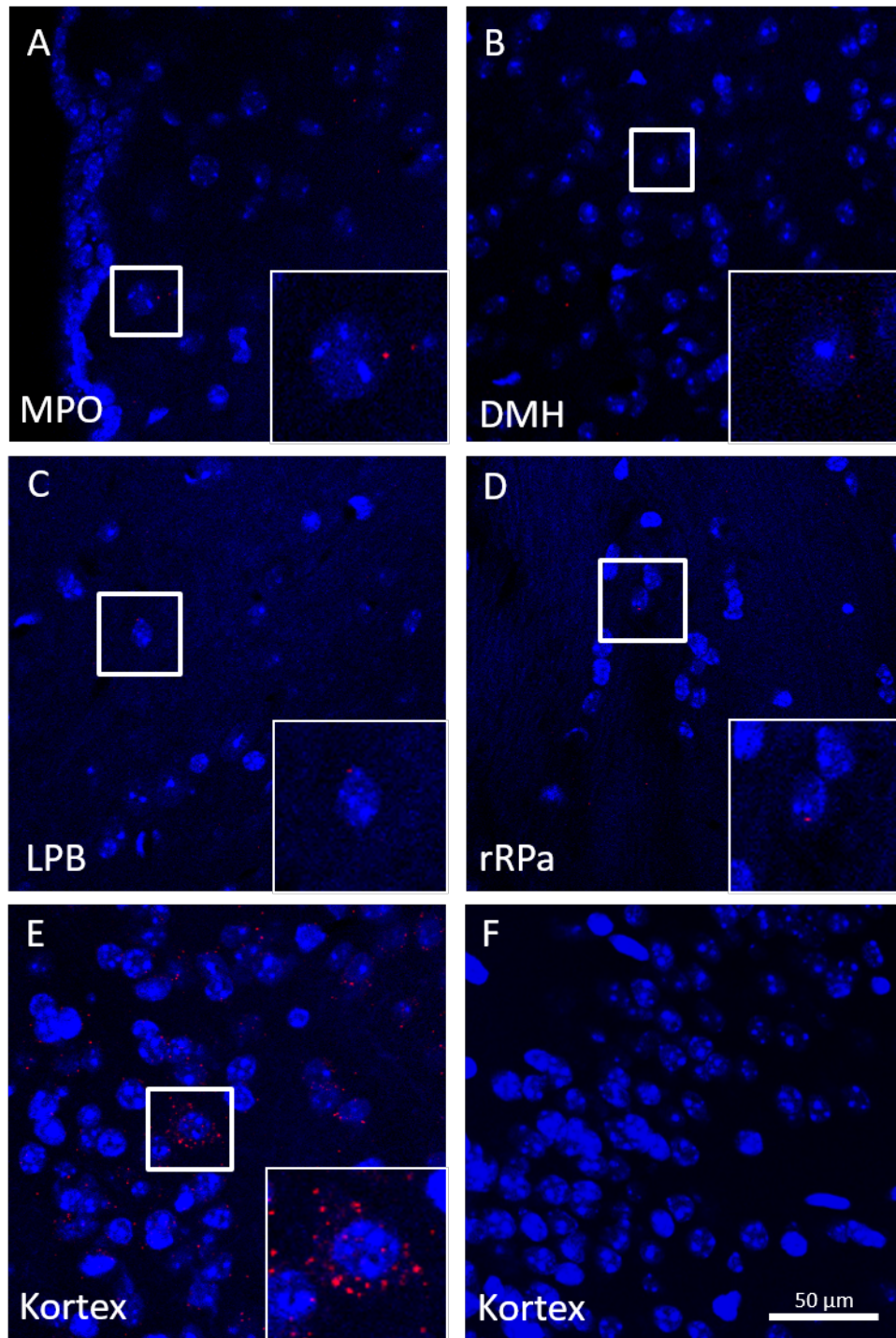
Termofiziológiai eredményeink arra utaltak, hogy a különböző H₂S donorokra adott termális válaszok a központi idegrendszerből indulnak ki, ezért megvizsgáltuk a TRPA1 csatorna expresszióját a hőszabályozásban ismert szerepet játszó agyi struktúrákban. Tekintvén, hogy a TRPA1 fehérje kimutatására szolgáló kereskedelmi forgalomban elérhető antitestek specificitása vitatott^{220,221}, a csatorna expresszióját mRNS átíródás

szintjén mértük. Az egereket gondosan perfundáltuk az agyszöveti mintavétel előtt, hogy a mintákból kimossuk a vért, amelyről többször is leírták, hogy kimutatható mennyiségű TRPA1 csatornát tartalmaz^{222,223}. Először qRT-PCR-t használtunk a *Trpa1* mRNS vizsgálatára az egerek hipotalamuszában, de nem találtunk kimutatható mennyiséget, bár a *Trpa1* mRNS expressziója egyértelműen jelen volt a pozitív kontrollként használt trigeminális ganglionban. Tekintettel arra, hogy a TRPA1 fehérje kopási rátája a neuronokban nem feltétlenül teszi szükségessé a nagymértékű mRNS átírást, ezután RNAscope *in situ* hibridizációt alkalmaztunk (40. ábra), azaz egy rendkívül érzékeny módszert, amely képes a transzkriptumokat egyetlen molekulaként kimutatni²²⁴. Ezzel a módszerrel kimutatható *Trpa1* mRNS transzkriptumokat találtunk mindegyik vizsgált, hőszabályozással kapcsolatos magban, vagyis az MPO (40.A ábra), a DMH (40.B ábra), az LPB (40.C ábra) és az rRPa (40.D ábra) 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

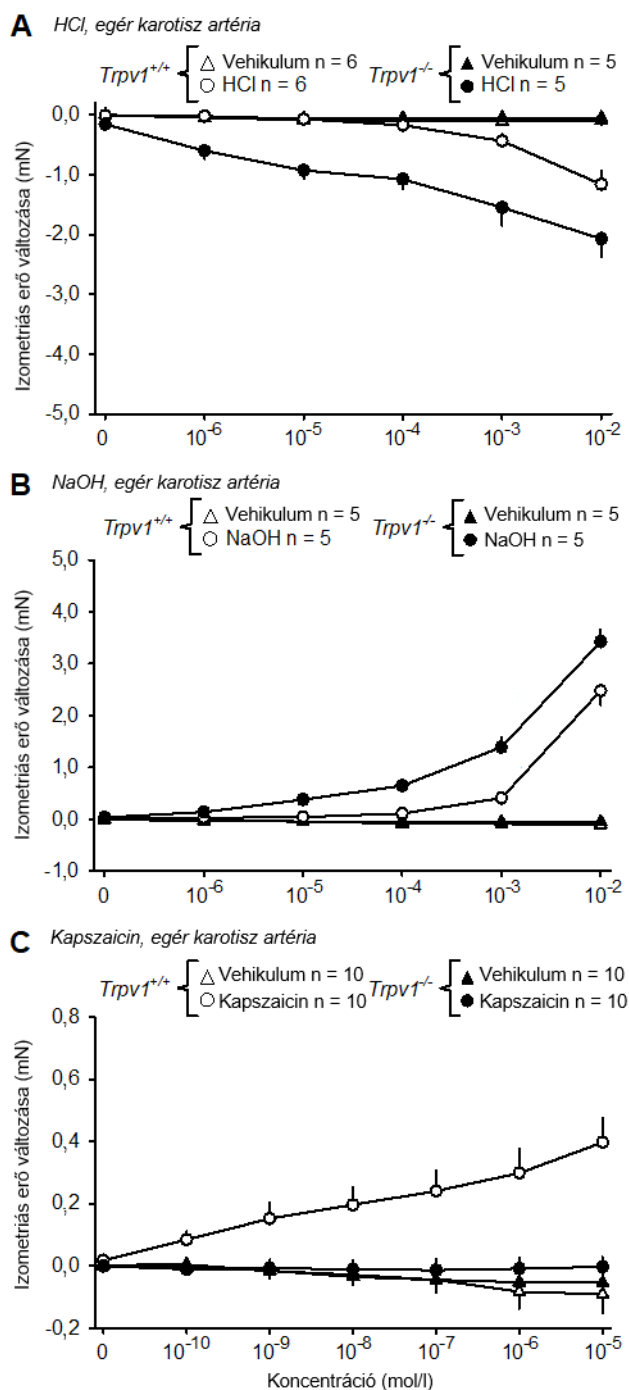
A korábbiakban bemutattam, hogy a TRPV1 ioncsatorna protonok általi aktivációs módja fontos szerepet játszik a termoregulációs homeosztázis fenntartásában, részben a bőrben futó erek tónusának szabályozásán keresztül (részletekért, lásd 5.1.1.1.1. és 5.1.1.1.2. fejezeteket). Annak ismeretében, hogy a TRPV1 csatorna a perivaszkuláris szenzoros idegvégződéseken és az érfal nem-neuronális elemein is expresszálódik⁴⁹, valamint, hogy ligandok (például kapszaicin) általi aktivációja szövetspecifikus érválaszhoz vezet (bőrben dilatáció, izomban konstriktó)^{46,48}, arra is kíváncsi voltam, hogy a TRPV1 csatorna szerepet játszik-e a lokális pH változásai által indukált vazomotor 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 vazomotor válaszokat egerekből izolált karotisz és farokbőr artériákon¹⁶⁹.



40. ábra: *Trp1* mRNA RNAscope *in situ* hibridizáció egér agyban. Reprezentatív konfokális képek a következő hőszabályozási területekről: (A) MPO, (B) DMH, (C) LPB és (D) rRPa. Megfigyelhető a *Trp1* mRNA transzkriptumok alacsony száma (piros) minden területen, amit a kinagyított ábrarészek is mutatnak (A-D). Pozitív kontroll festés a *Ppib* mRNA-re (piros) a kéregben (E) és negatív kontroll festés a bakteriális *dabP* mRNA-re (piros) ugyanezen a kérgi területen (F). A sejtmagokat DAPI-val (kék) festettük. Aránymérték: 50 µm minden kép esetében¹⁶⁸.

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 ($-1,16 \pm 0,23$ mN; $p < 0,001$ vehikulumhoz képest) (41.A ábra). 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 vehikulum nem fejtett ki lényeges hatást az erek izometriás erejére egyik genotípus esetében sem (41. ábra). A HCl-lel ellentétben NaOH hozzáadása a *Trpv1^{+/+}* egerek karotisz artériáihoz az izometriás erő növekedését eredményezte 10^{-3} mol/l ($0,41 \pm 0,10$ mN, $p < 0,001$) és 10^{-2} mol/l koncentrációknál ($2,48 \pm 0,28$ mN, $p < 0,001$) a vehikulumhoz képest (41.B ábra). 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 (41.C ábra). 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 (41.C ábra), megerősítve a funkcionális TRPV1 csatornák hiányát.

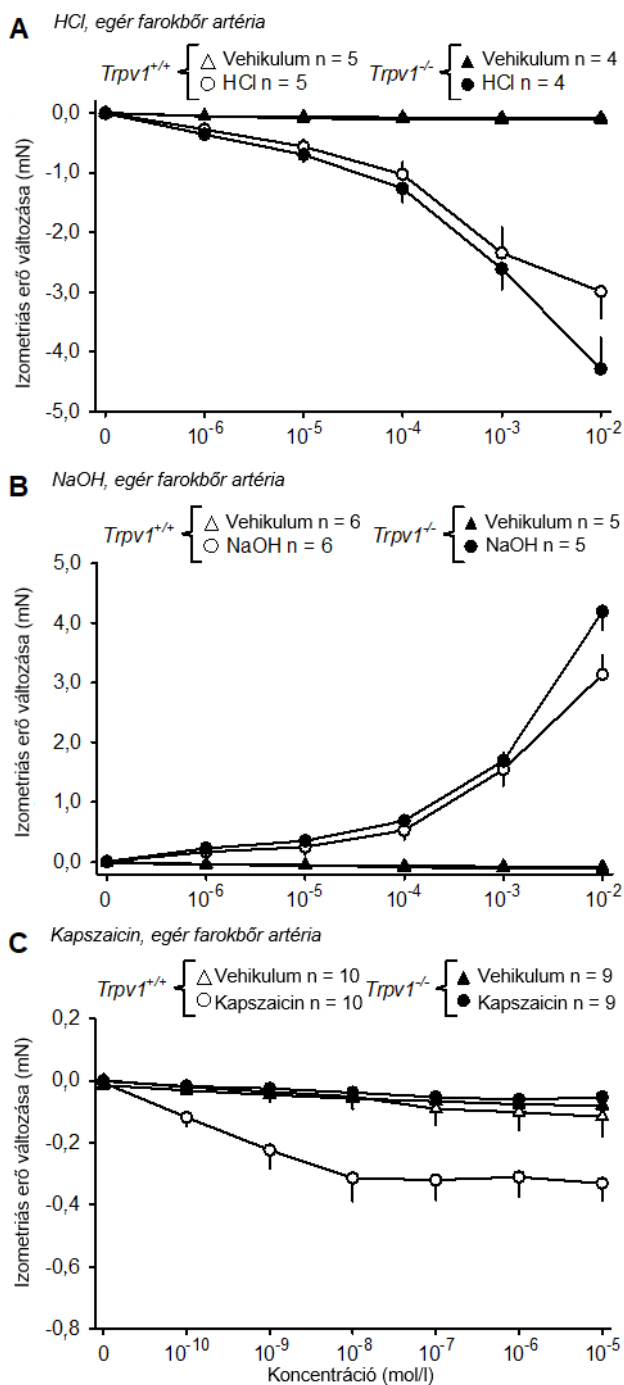
Ezután a perifériásan elhelyezkedő farokbőr artériákban is tanulmányoztuk a savbázis hatások által kiváltott vazomotoros válaszokat. A vehikulumnak ebben az értípusban sem volt semmilyen hatása (42. ábra). A karotisz artériákhoz hasonlóan, a vehikulumhoz képest HCl hozzáadása a farokbőr artéria esetében 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) (42.A ábra). 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 ($p < 0,05$) (42.B ábra).



41. ábra: A savra és bázisra adott vazomotoros válaszok fokozott mértékűek a *Trpv1*^{-/-} egerekből izolált karotis artériákban a *Trpv1*^{+/+} társaikból származó artériákhoz képest. (A) A HCl által kiváltott izometriás erő csökkenése kifejezettebb a *Trpv1*^{-/-} egerekből izolált karotis artériákban, mint a *Trpv1*^{+/+} kontrollokból származó erekben. (B) Az izometriás erő NaOH által kiváltott emelkedése kifejezettebb a *Trpv1*^{-/-} egerekből izolált karotis artériákban, mint a *Trpv1*^{+/+} kontrollokból származó erekben. (C) Kapszaicin adása a *Trpv1*^{+/+} egerekből származó karotis artériák izometriás erejének növekedését okozza, de nincs hatása a *Trpv1*^{-/-} egerekből származó erekre. A *Trpv1*^{-/-} egereket fekete, a *Trpv1*^{+/+} egereket fehér szimbólumok ábrázolják; az anyaggal kezelt csoportokat kör, a vehikulummal kezeltet háromszög jelöli¹⁶⁹.

Trpv1^{-/-} egerekben az NaOH által kiváltott kontrakció ugyancsak kialakult 10⁻⁵ – 10⁻² mol/l között, azonban a WT kontrollokhöz képest

10⁻² mol/l koncentrációnál szignifikánsan kifejezettebb volt (4,65 ± 0,31 vs. 3,44 ± 0,38 mN, *p* < 0,001). A karotis artériákban megfigyelt kontrakcióval ellentétben, a kapszaicin fokozatosan csökkentette az izometriás erőt a *Trpv1*^{+/+} egerek farokbőr artériáiban (42.C ábra), amely 10⁻⁹ – 10⁻⁵ mol/l esetén statisztikailag szignifikáns volt a vehikulumhoz képest (*p* < 0,001). *Trpv1*^{-/-} egerek ereiben a kapszaicinnek nem volt szignifikáns hatása az izometriás erőre, ezzel megerősítve a TRPV1 csatornák hiányát.

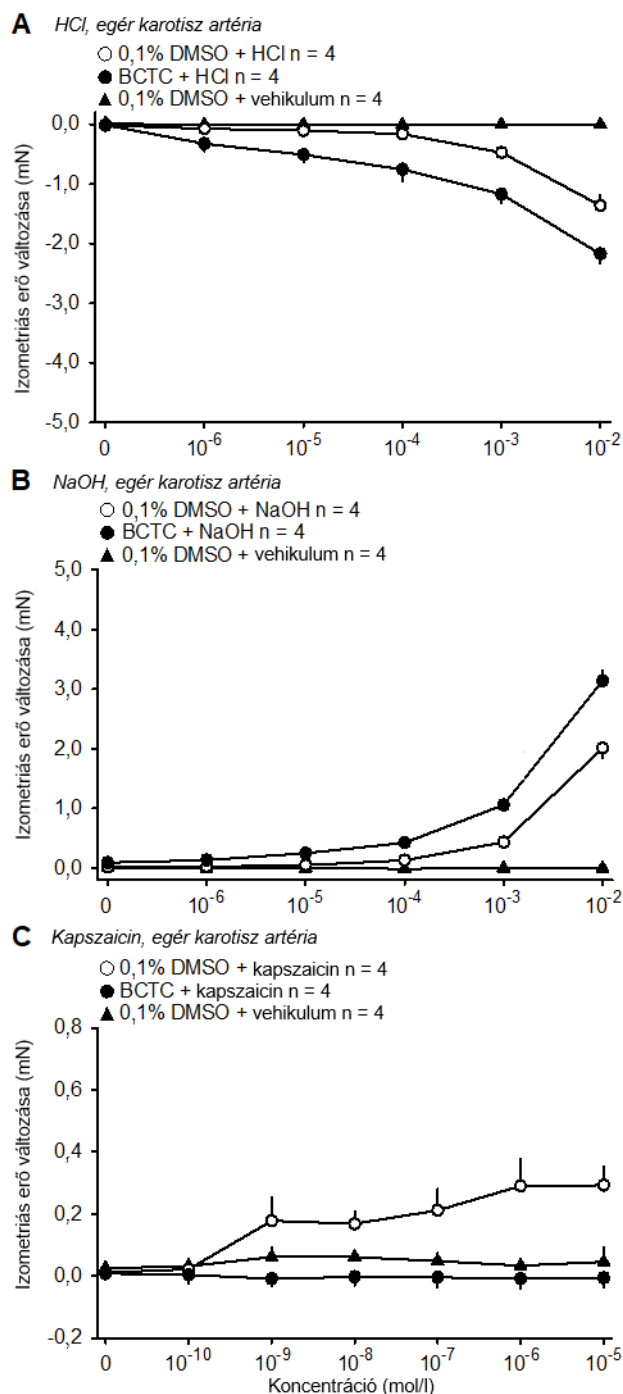


42. ábra: A savra és bázisra adott vazomotoros válaszok fokozott mértékűek *Trpv1*^{-/-} egerekből izolált farokbőr artériákban *Trpv1*^{+/+} társaikból származó artériákhoz képest. (A) A HCl által kiváltott izometriás erő csökkenése kifejezettebb *Trpv1*^{-/-} egerekből izolált farokbőr artériákban, mint *Trpv1*^{+/+} kontrollokból származó erekben. (B) Az izometriás erő NaOH által kiváltott emelkedése kifejezettebb *Trpv1*^{-/-} egerekből izolált farokbőr artériákban, mint *Trpv1*^{+/+} kontrollokból származó erekben. (C) Kapszaicin adása *Trpv1*^{+/+} egerekből származó farokbőr artériák izometriás erejének csökkenését okozza, de nincs hatása *Trpv1*^{-/-} egerekből származó erekre. A *Trpv1*^{-/-} egereket fekete, a *Trpv1*^{+/+} egereket fehér szimbólumok ábrázolják; az anyaggal kezelt csoportokat kör, a vehikulummal kezeltet háromszög jelöli¹⁶⁹.

Második megközelítésünkben a TRPV1 antagonistá BCTC hatását vizsgáltuk a savra és bázisra adott vazomotoros válaszokra C57BL/6 egerekből izolált artériákban.

Amikor a karotis artériákat a BCTC vivőanyagával (0,1% dimetil-szulfoxid, DMSO sóoldatban) kezeltük elő, a HCl 10⁻³ és 10⁻² mol/l koncentrációban relaxációt váltott ki ($p < 0,01$ és $p < 0,001$ a vehikulumhoz képest) (43.A ábra), míg az NaOH 10⁻³ és 10⁻² mol/l koncentrációban az izometriás erő növekedését okozta ($p < 0,001$ mindkét koncentrációnál a vehikulumhoz képest) (43.B ábra). Az erek BCTC-vel történő előkezelése azonban szignifikáns mértékben fokozta mind a HCl által kiváltott relaxációt 10⁻⁵ – 10⁻² mol/l-nél ($p < 0,05$) (43.A ábra), mind pedig az NaOH által kiváltott

kontrakciót 10^{-4} – 10^{-2} mol/l-nél ($p < 0,01$) (43.B ábra), ami összhangban van a *Trpv1*^{-/-} egerekben kapott eredményeinkkel.



43. ábra: A savra és bázisra adott vazomotoros válaszok fokozott mértékűek a TRPV1 antagonistá BCTC-vel történt előkezelést követően a BCTC vehikulumával (0,1% DMSO) történt előkezeléshez hasonlítva C57BL/6 egerekből izolált karotisz artériákban (A) A HCl által kiváltott izometriás erő csökkenése kifejezettebb a BCTC-vel előkezelte izolált karotisz artériákban, mint a vehikulummal előkezelte kontroll erekben. (B) Az izometriás erő NaOH által kiváltott emelkedése kifejezettebb a BCTC-vel előkezelte izolált karotisz artériákban, mint a vehikulummal előkezelte kontroll erekben. (C) Kapszaicin adása a vehikulummal előkezelte karotisz artériák izometriás erejének növekedését okozza, de nincs hatása a BCTC-vel előkezelte erekre. Az anyaggal kezelt csoportokat kör, a vehikulummal kezeltet háromszög jelöli; a BCTC előkezelést fekete körrel, a vehikulum előkezelést fehér körrel vagy fekete háromszöggel jelöltük¹⁶⁹.

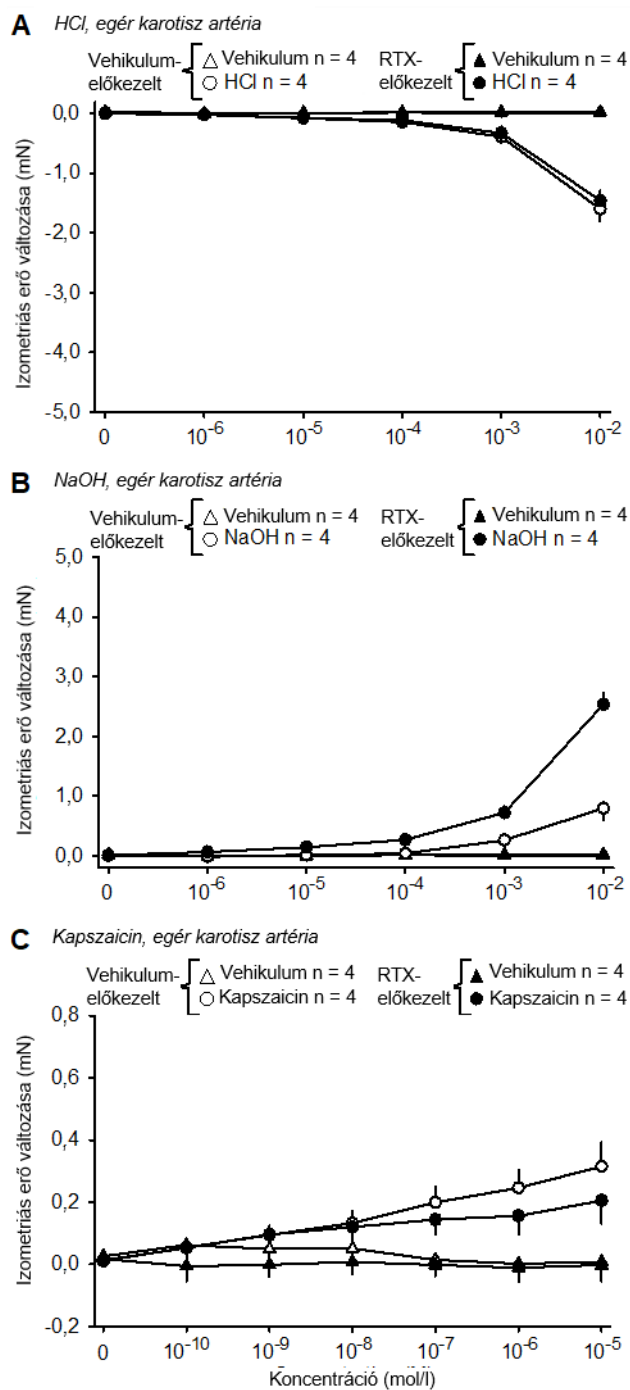
Azt is megvizsgáltuk, hogy a BCTC általunk alkalmazott koncentrációja

elegendő-e a nyaki artériák kapszaicin által kiváltott kontrakciójának gátlásához. Az erek vehikulummal (0,1% DMSO) történő előkezelése után alkalmazott kapszaicin szignifikáns kontrakciót okozott 10^{-9} – 10^{-5} mol/l koncentrációban ($p < 0,05$), de a BCTC-vel előkezelte karotisz artériákban a kapszaicin egyik alkalmazott dózisban sem okozott szignifikáns vazomotoros hatást (43.C ábra), ezzel igazolva a TRPV1 antagonistá kísérleteinkben alkalmazott dózisának hatékonyságát.

Farokbőr artériák esetén a BCTC vivőanyagával előkezelt erekben a HCl 10^{-5} – 10^{-2} mol/l koncentrációkban relaxációt váltott ki ($p < 0,001$), míg az NaOH 10^{-3} és 10^{-2} mol/l koncentrációkban kontrakciót okozott ($p < 0,001$). BCTC előkezelés után, a legmagasabb alkalmazott koncentrációknál (10^{-2} mol/l) mind a HCl által kiváltott izometriás erő csökkenés, mind az NaOH által kiváltott növekedés jelentősen fokozódott a farokbőr artériákban is a vehikulum előkezeléshez képest ($p < 0,001$). Kapszaicin hozzáadása fokozatosan csökkentette az izometriás erőt vehikulummal előkezelt farokbőr artériákban 10^{-8} – 10^{-5} mol/l koncentrációkban ($p < 0,05$). Amikor azonban az ereket BCTC-vel kezeltük, a kapszaicin egyik alkalmazott koncentrációban sem okozott vazomotoros hatást (részletekért lásd Ivic és mtsai.¹⁶⁹). Összességében, a karotisz és farokbőr artériák BCTC kezelésével elért eredményeink megfeleltek a *Trpv1*^{-/-} egerekben látottaknak.

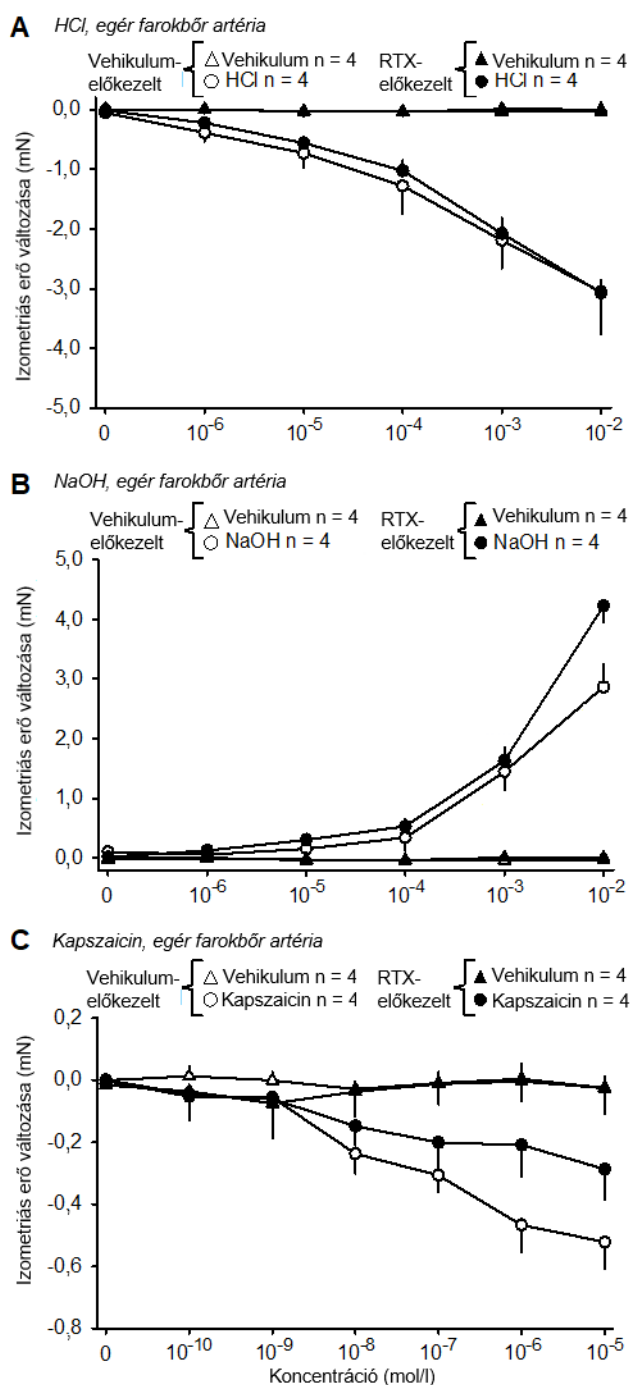
Ezután megvizsgáltuk, hogy azok a TRPV1 csatornák, amelyek az érfal neurális elemeiben expresszálódnak, hozzájárulnak-e a sav vagy bázis által kiváltott vazomotoros válaszok közvetítéséhez. Ehhez C57BL/6 egereknek nagy dózisu exogén vanilloidot (RTX) adtunk (részletekért, lásd 4.1.3. fejezet), amelyről már többször kimutatták, hogy főként a neurális struktúrákon lévő TRPV1 csatornákat károsítja, anélkül, hogy a TRPV1 csatornákat expresszáló nem-neurális sejtekre jelentős hatást gyakorolna^{225,226}. Ennek megfelelően, a szisztémásan TRPV1 deszenzitizált egereknél a kapszaicin által kiváltott szentörlések 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 (44.A. ábra). 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) (44.B ábra). 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 (44.C ábra). Ezek az eredmények

a neurális TRPV1 csatornák szerepére utalnak a karotisz artériák pH emelkedés által indukált kontrakciójában.



44. ábra: A sav által indukált relaxáció változatlan, ellenben a lúg által indukált kontrakció fokozott mértékű a neurális TRPV1 csatornák RTX általi deszenzitizációja után a vehikulum előkezeléshez képest C57BL/6 egerekből izolált karotisz artériákban (A) A HCl által kiváltott izometriás erő csökkenése azonos mértékű RTX és vehikulum előkezelésben részesült egerek izolált karotisz artériáiban. (B) Az izometriás erő NaOH által kiváltott emelkedése fokozott mértékű RTX-szel előkezelte egerek izolált karotisz artériáiban a vehikulummal előkezelte kontrollokhoz képest. (C) Kapszaicin hatására az izometriás erő növekedése alakul ki mind RTX, mind vehikulum előkezelésben részesült egerek izolált karotisz artériáiban. Az anyaggal kezelt csoportokat kör, a vehikulummal kezeltet háromszög jelöli; az RTX előkezelést fekete, a vehikulum előkezelést fehér szimbólumokkal jelöltük¹⁶⁹.

A farokbőr artériákban HCl adása mind a vivőanyaggal, mind az RTX-szel előkezelte egerekben az izometriás erő csökkenését váltotta ki, anélkül, hogy az előkezelési csoportok között szignifikáns különbség lett volna (45.A ábra). Az NaOH által kiváltott összehúzóds szintén jelen volt mindkét előkezelési csoportban (45.B ábra), de fontos kiemelni, hogy a legnagyobb (10⁻² mol/l) NaOH koncentrációnál az RTX-szel előkezelte egerekben jelentősen fokozott mértékű volt a vehikulum előkezeléshez képest ($p < 0,001$).



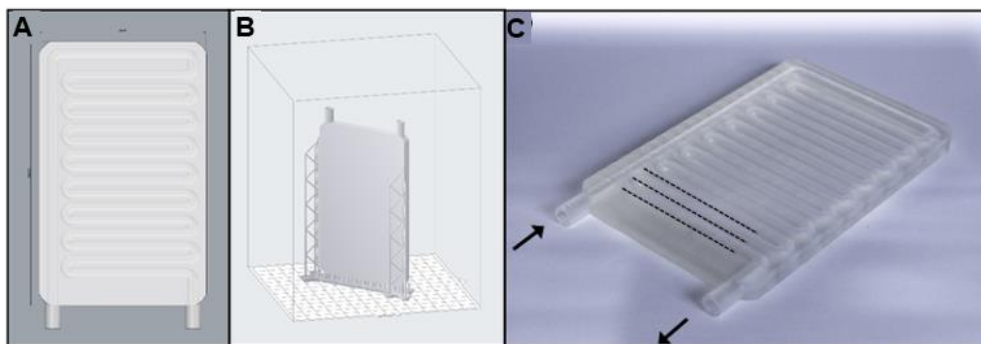
45. ábra: A sav által indukált relaxáció változatlan, ellenben a lúg által indukált kontrakció fokozott mértékű a neurális TRPV1 csatornák RTX általi deszenzitizációja után a vehikulum előkezeléshez képest C57BL/6 egerekből izolált farokbőr artériákban (A) A HCl által kiváltott izometriás erő csökkenése azonos mértékű RTX és vehikulum előkezelésben részesült egerek izolált farokbőr artériáiban. (B) Az izometriás erő NaOH által kiváltott emelkedése fokozott mértékű RTX-szel előkezelt egerek izolált farokbőr artériáiban a vehikulummal előkezelt kontrollokhoz képest. (C) Kapszaicin hatására az izometriás erő csökkenése alakul ki RTX és vehikulum előkezelésben részesült egerek izolált farokbőr artériáiban, de a csökkenés mértéke jelentősen kisebb RTX előkezelés után. Az anyaggal kezelt csoportokat kör, a vehikulummal kezeltet háromszög jelöli; az RTX előkezelést fekete, a vehikulum előkezelést fehér szimbólumokkal jelöltük¹⁶⁹.

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 ($p < 0,05$) (45.C ábra). Ezek az eredmények összhangban vannak a neurális TRPV1 csatornák károsodott működésével a deszenzitizált egerekben^{225,226}. 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 Nyomatási és Vizualizációs Központtal együttműködve, egy új, aktív hőcserét biztosító kiegészítő alkatrészt fejlesztettünk ki a miográf rendszerünkhöz¹⁷⁰.

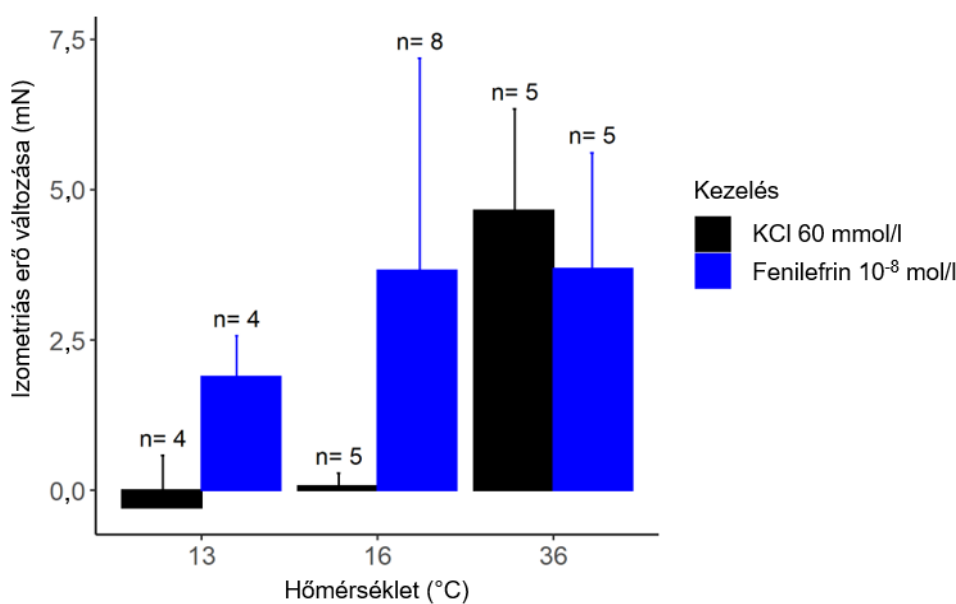
A hőcserélő alkatrész megtervezése a Rhinoceros 6 CAD (számítógép-asszisztált tervezés) szoftverrel (Robert McNeel & Associates) történt. A miográf készülék mind a négy szervfürdőjéhez egy vízzel átáramoltatható alátétet terveztünk rezinből, amelynek mérete 75 mm x 120 mm x 7 mm volt, benne a hűtő-fűtő csövek 10,5 mm hosszúak voltak, 5 mm belső és 7 mm külső átmérővel, és 1 mm távolságban helyezkedtek el egymástól (46. ábra). A szeletelési folyamat a PreForm szeletelő szoftverrel (Formlabs Inc.) zajlott. A teljes nyomtatási idő 13 óra 15 perc volt, és összesen 46 ml gyantát igényelt. Az utófeldolgozás magában foglalta a 10 perces izopropil-alkoholban való fürdetést és a 15 perces 60°C-os UV-keményítést. A lemez anyagának mechanikai, strukturális és termális tesztelésének részleteiért, lásd Kelava és mtsai.¹⁷⁰



46. ábra: A vízzel átáramoltatható hűtő-fűtő lemez számítógép-asszisztált tervezési modellje (A), a szeletelőszoftverbe feltöltött .stl modell (B) és a 3D nyomtatóval legyártott lemez prototípusa (C). A nyilak jelzik a lemezben futó csövek be- és kiáramlási irányait, a szaggatott vonalak pedig az egymással párhuzamos csöveket a lemezben¹⁷⁰.

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. A kamrák vízfürdőjének hőmérséklete között nem volt jelentős különbség, amit a négy kamra átlaghőmérsékletének viszonylag kis szórása jelez: 13°C-on és 16°C-on 0,7°C, míg 36°C-on 0,4°C.

Ahogy az a korábbi vizsgálataink¹⁶⁹ alapján várható volt, 60 mmol/l KCl hozzáadására szignifikáns izometriás erő növekedést regisztráltunk, amikor patkányokból izolált farokbőr artériák vízfürdőjét 36°C-on tartottuk (47. ábra). 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.

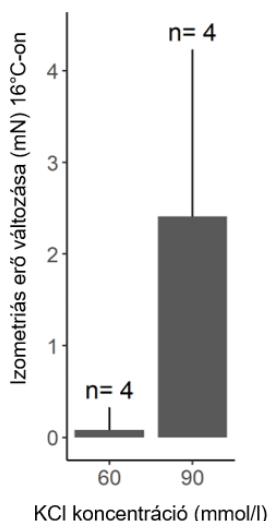


47. ábra: Patkányokból izolált farokbőr artériák izometriás erejének változása miután KCl-t (fekete oszlopok) vagy fenilefrint (kék oszlopok) adtunk az erek fürdőoldatához az ábrán feltüntetett dózisokban. A fürdőoldat hőmérsékletét az újonnan kifejlesztett hőcserélő lemezekkel 13, 16 vagy 36°C-on tartottuk. Az adatok az átlag ± SD értékeket jelentik¹⁷⁰.

Annak kizárására, hogy a miográf rendszer vagy az artériák egyáltalán nem használhatók ilyen mérésekre 13°C vagy 16°C-on, következő lépésként fenilefrint használtunk, amely a KCl-től eltérő mechanizmusokon keresztül okoz kontrakciót. Fenilefrin hozzáadása (10⁻⁸ mol/l) az előbbiekkal megegyező kísérleti körülmények

között, az izometriás erő emelkedéséhez vezetett mindhárom vizsgált hőmérséklet esetén (47. ábra), ami arra utal, hogy a KCl által kiváltott kontrakció csökkent mértéke hidegben nem módszertani okokra vezethető vissza, hanem specifikusan a KCl-re adott vazomotoros válasz hideg általi szuppressziója miatt alakul ki. A fenilefrin mindhárom vizsgált hőmérsékleten (13, 16 és 36°C) hasonló dinamikájú növekedést okozott az izometriás erőben. A maximális kontrakció ugyan csökkent mértékűnek tűnt hidegben (13°C-on) a 36°C-hoz képest, de ez a különbség nem érte el a szignifikancia szintjét ($p = 0,11$).

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 (47. ábra). 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 (48. ábra). Ez utóbbi eredmény tovább erősíti a kifejlesztett kísérleti elrendezés alkalmasságát a hidegben történő vazomotoros válaszok tanulmányozására, továbbá, alátámasztja a vaszkuláris válaszok hőmérsékletfüggő különbségeinek meglétét.



48. ábra: Patkányokból izolált farokbőr artériák izometriás erejének változása azután, hogy KCl különböző (60 vagy 90 mmol/l) koncentrációit adtuk az erek fürdőoldatához, amelynek hőmérsékletét az újonnan kifejlesztett hőcserélő lemezekkel 16°C-on tartottuk. Megjegyzendő, hogy míg az alacsonyabb (60 mmol/l) KCl koncentrációnak nem volt kimutatható hatása, addig a magasabb (90 mmol/l) koncentrációval hidegben is szignifikáns kontrakciót tudtunk kiváltani. Az adatok az átlag \pm SD értékeket jelentik¹⁷⁰.

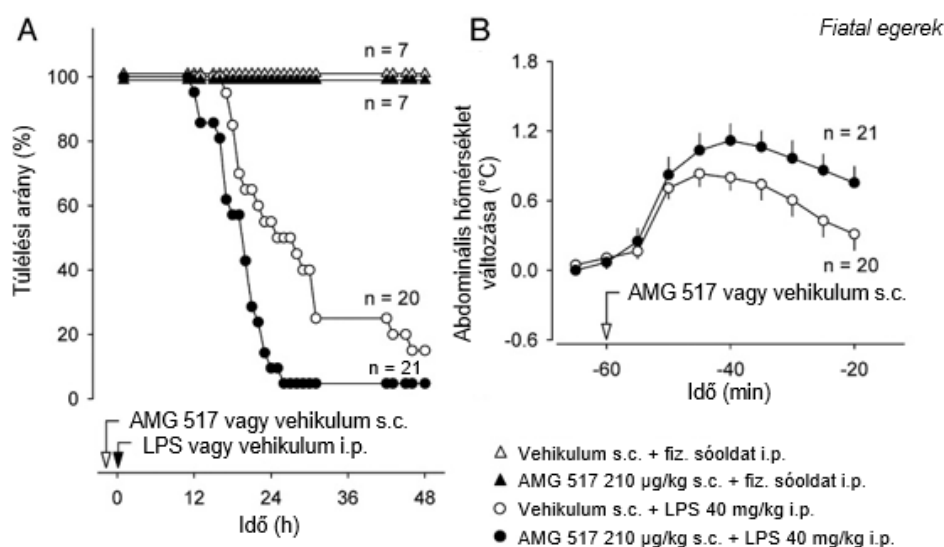
5.3. Szisztémás gyulladós állapotok élettani és molekuláris mechanizmusainak tanulmányozása

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.

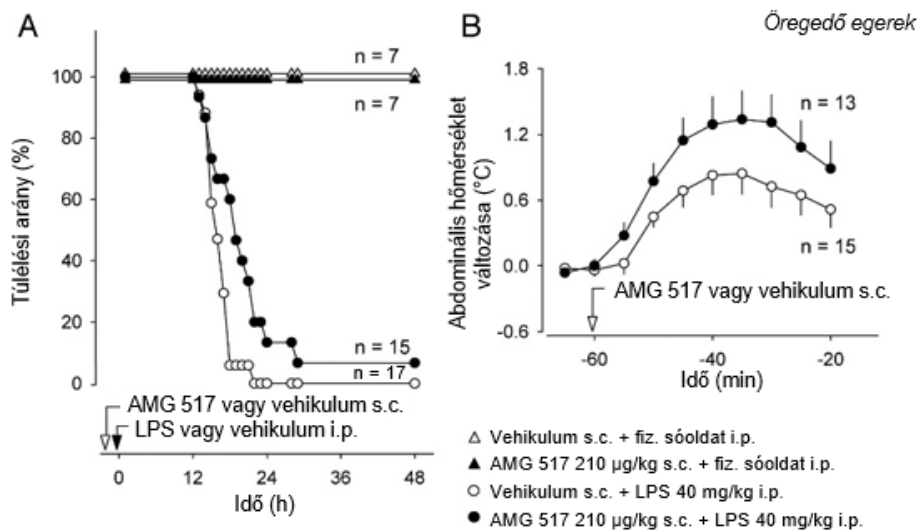
Először is megvizsgáltuk, hogy az AMG 517-tel történő előkezelés csökkenti-e fiatal felnőtt (12 hetes) C57BL/6 egerek mortalitását nagy dózisú LPS által indukált SIRS-ben¹⁷¹. Az egerek LPS-re (40 mg/kg, i.p.) kifejezett, gyorsan progrediáló SIRS kialakulásával reagáltak (49.A ábra). Az AMG 517 előkezelés (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 ($p < 0,01$).



49. ábra: Szisztémás AMG 517 előkezelés (dózis feltüntetve) csökkenti fiatal egerek túlélését LPS által indukált súlyos szisztémás gyulladásban (A). A TRPV1 csatornák effektív gátlását igazolja, hogy AMG 517 előkezelés hatására a T_m megemelkedett a fiatal egerekben (B). Az AMG 517-tel előkezelt egereket fekete, a vehikulummal előkezelteteket fehér szimbólumok jelölik; az LPS-sel kezelt csoportokat körrel, a kontrollokat háromszöggel jelöltük¹⁷¹.

Kísérleteink során minden LPS-sel kezelt egégnél nagyfokú hipotermia alakult ki: a (hasi) $T_m \sim 36^\circ\text{C}$ -ról $\sim 33^\circ\text{C}$ -ra csökkent 10 órán belül, amelynek mértékét az AMG 517 előkezelés nem befolyásolta szignifikánsan. Fontos kiemelni azonban, hogy korábbi vizsgálatainkhoz hasonlóan^{64,70}, az AMG 517 rövid ideig tartó T_m növekedést okozott a vivőanyaghoz képest ($p < 0,01$) (49.B ábra), amely megerősíti a TRPV1 csatornák effektív szisztémás blokkolását. Összességében, kísérletünk eredményei azt mutatják, hogy a TRPV1 farmakológiai blokkolása növeli a fiatal egerek mortalitását LPS által indukált súlyos SIRS során.

Annak vizsgálatára, hogy a TRPV1 antiinflammatorikus szerepe a SIRS során megmarad-e az életkor előrehaladtával, kísérleteket végeztünk öregedő (44 hetes) C57BL/6 egerekkel is (50.A ábra). 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 ($210 \mu\text{g}/\text{kg}$, 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.



50. ábra: Szisztémás AMG 517 előkezelés (dózis feltüntetve) fokozza az öregedő egerek túlélését LPS által indukált súlyos szisztémás gyulladásban (A). A TRPV1 csatornák effektív gátlását igazolja, hogy AMG 517 előkezelés hatására a T_m megemelkedett az öregedő egerekben (B). Az AMG 517-tel előkezelte egereket fekete, a vehikulummal előkezelteket fehér szimbólumok jelölik; az LPS-sel kezelt csoportokat körrel, a kontrollokat háromszöggel jelöltük¹⁷¹.

Az AMG517-tel előkezelt öregedő egerek túlélési aránya 18 óra után 10-szer nagyobb volt, mint a vehikulummal előkezelt 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 ($p < 0,05$, 50.B ábra). Tehát, míg az AMG 517 hatása LPS által kiváltott súlyos szisztémás gyulladásra idős egerekben ellentétes volt a fiatal egerekben tapasztaltakkal (49.A. és 50.A. ábra), a T_m -re gyakorolt hatás lényegében ugyanaz volt (49.B és 50.B. ábra). Lehetséges, hogy a TRPV1 csatorna különböző élettani funkciókban betöltött szerepe az életkorral eltérő módon változik. Eredményeink alapján a lokomotoros aktivitás (lásd 5.1.1.1.1. fejezet) és a szisztémás gyulladás szabályozásában a TRPV1 csatorna szerepe az életkorral megfordul.

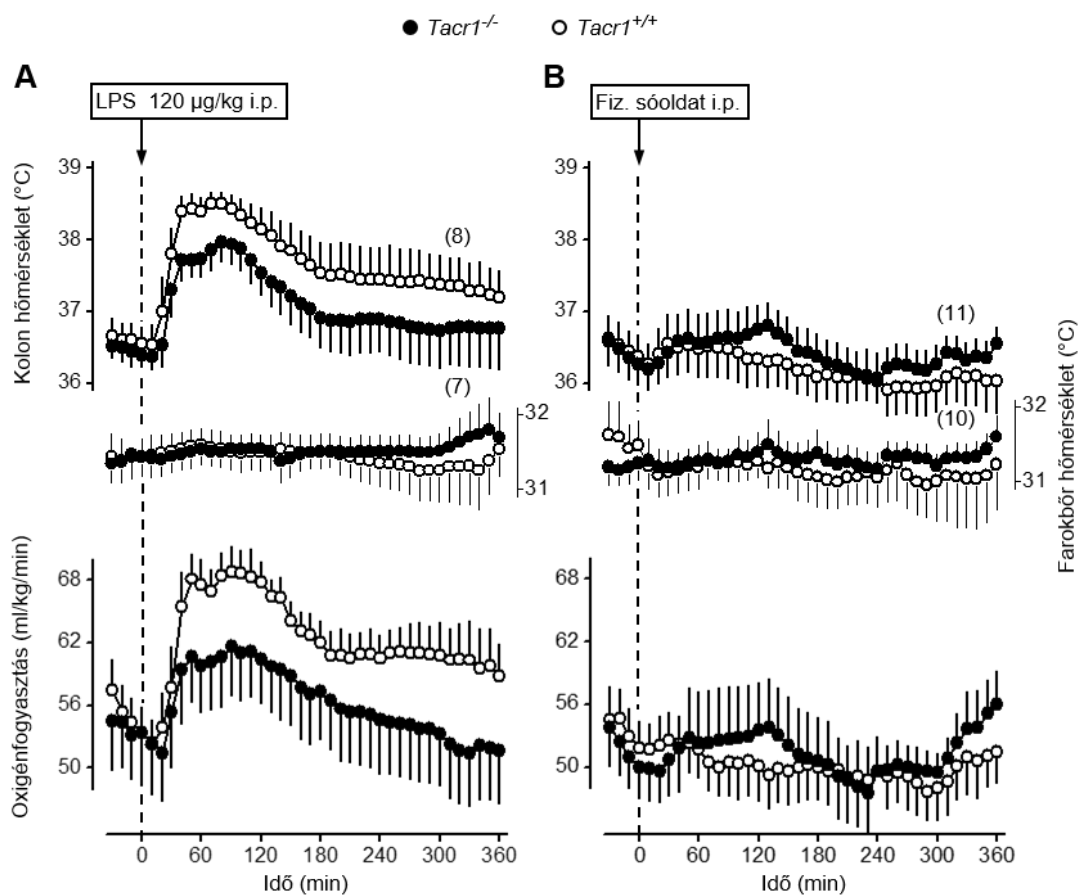
Megvizsgáltuk azt is, hogy a TRPV1 genetikai deléciója ugyanolyan hatással van-e a SIRS kialakulására öregedő egerekben, mint a farmakológiai gátlás¹⁷¹. A kísérleteket 43-44 hetes, *Trpv1*^{-/-} és *Trpv1*^{+/+} egerekkel végeztük. Nagydózisú (40 mg/kg i.p.) LPS beadása mindegyik *Trpv1*^{+/+} egéernél 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 ($p < 0,05$) (részletekért lásd Wanner és mtsai.¹⁷¹). Meg kell jegyezni, hogy – a korábban leírtakkal összhangban (lásd 5.1.1.1.1. fejezet) – az idősebb *Trpv1*^{-/-} egerek ebben a vizsgálatban is túlsúlyosak voltak WT társaikhoz képest. Az öregedő egerekben génkiütéssel és farmakológiai TRPV1 gátlással elért eredményeink tehát egymást megerősítik, és a TRPV1 csatorna proinflammatorikus szerepére utalnak idősebb életkorban.

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 szerepét is fel szerettem volna deríteni. Elsőként, a TRPV1 csatornát expresszáló idegvégződésekből is felszabaduló SP jelátviteli útvonalának szerepével kapcsolatos eredményeinket ismertetem.

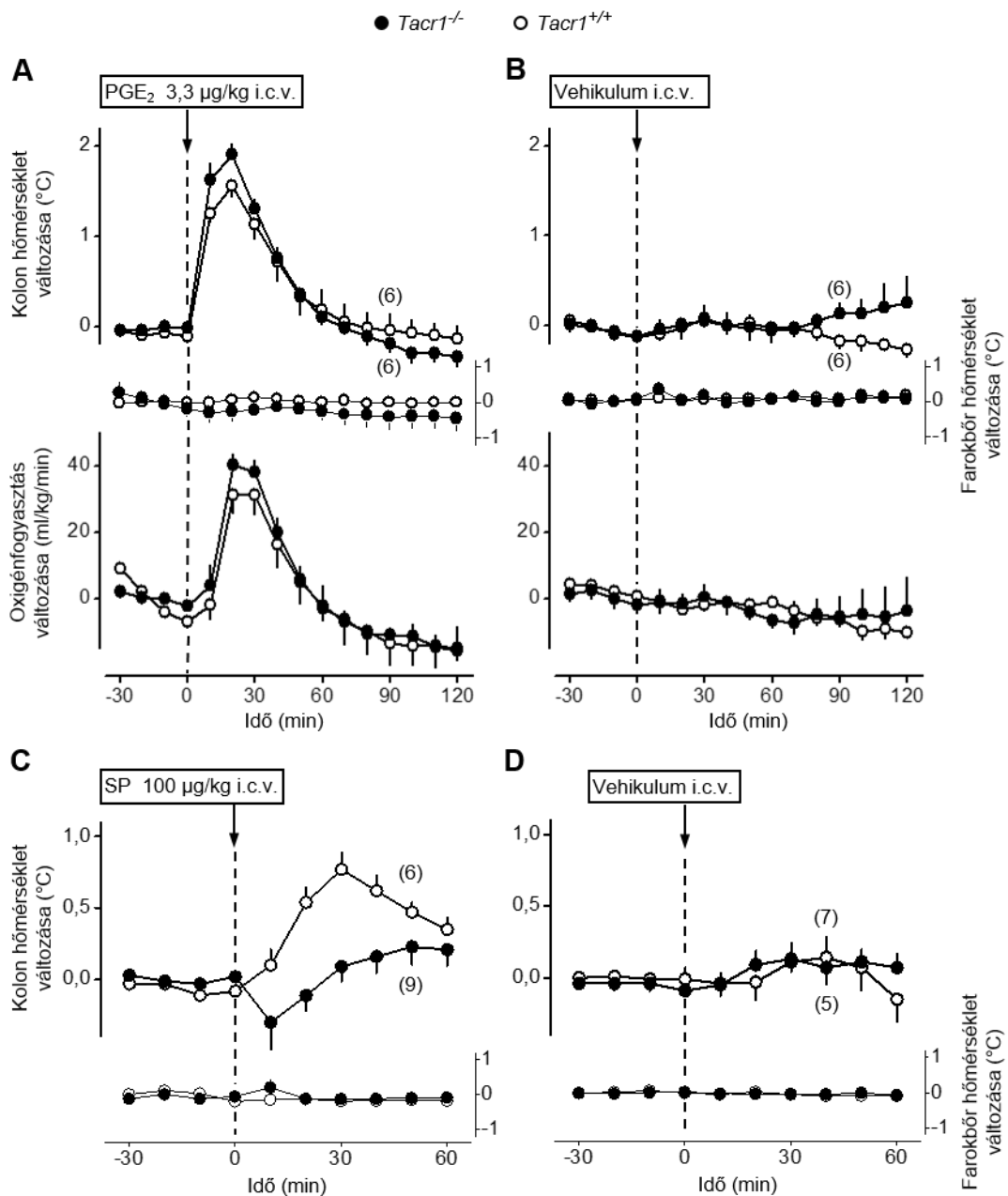
Az SP jelátviteli út pirogenézisben betöltött szerepének tanulmányozásához termofiziológiai kísérletekben összehasonlítottuk a *Tacr1*^{+/+} és a *Tacr1*^{-/-} egerek

lázválaszát¹⁷². Amikor LPS-sel (120 µg/kg, i.p.) kezeltük az állatokat, mindkét genotípusban láz alakult ki a fiziológias sóoldat kezeléshez képest (51.A és B ábra). A *Tacr1*^{+/+} egerek LPS hatására tipikus lázvással reagáltak: T_m -ük a 20. perctől kezdett emelkedni, a 40. és 100. perc között tetőzött (~38,5°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 lázvásáról⁸². A *Tacr1*^{-/-} egerekben az LPS hatására kialakuló lázvász kevésbé volt kifejezett, mint a *Tacr1*^{+/+} egerekben: T_m -ük emelkedése mindössze a 40-110. percig volt szignifikáns a sóoldat kezeléshez képest ($p < 0,05$) (51.A ábra). 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 (51.A ábra).



51. ábra: *Tacr1*^{-/-} és *Tacr1*^{+/+} egerek termoeffektor és T_m válasza i.p. beadott LPS (dózis feltüntetve) (A) és fiziológias sóoldat hatására (B). A kolonban mért T_m változása a felső panelben látható; a két fő autonóm termoeffektor aktivitását jelző T_b és VO_2 változásai a középső és az alsó panelben található. Ezeket a kísérleteket a respirometria rendszerben 31°C-os T_k -n végeztük. A *Tacr1*^{-/-} egereket fekete, a *Tacr1*^{+/+} egereket fehér körök jelölik. A zárójelben feltüntetett számok az adott csoportban felhasznált egerek számát jelentik¹⁷².

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 ($p < 0,05$). Tekintvén, hogy a kísérleteket a termoneutrális zóna alsó határán végeztük, az egereknél a bőrben vazokonstrikció alakult ki (amit az alacsony farok T_b jelzett), így a farok T_b további csökkenése LPS hatására nem volt megfigyelhető. Fontos, hogy az LPS-sel kezelt $Tacr1^{-/-}$ egerek T_m -e jelentősen (0,5-0,7°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 (51.A. ábra). Mindkét paraméter LPS által kiváltott emelkedése szignifikánsan csökkent mértékű volt a $Tacr1^{-/-}$ egerekben a $Tacr1^{+/+}$ egerekhez képest a 40-120. percig ($p < 0,05$) (51.A ábra). A fiziológiás sóoldat infúziója nem váltott ki lényeges hatást a T_m -re, a farok T_b -re és a VO_2 -re egyik genotípusban sem (51.B ábra). 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 szuppressziója 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 (52.A ábra), ellenben a vivőanyag beadása egyik genotípusnál sem okozott semmilyen hatást (52.B ábra). 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. Ezeket a kísérleteket az LPS-sel végzett kísérletekkel megegyező körülmények között végeztük, beleértve a termoneutrális zóna alsó határához közeli T_k -t (31°C), ami megmagyarázhatja, hogy miért nem tapasztaltunk változást a farok T_b -ben egyik genotípusnál sem. 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.



52. ábra: *Tacr1*^{-/-} és *Tacr1*^{+/+} egerek termoregulatorikus válasza i.c.v. beadott PGE₂ és SP hatására. A kolonban mért T_m (felső panel), a fark T_b (középső panel) és a VO₂ (alsó panel) változása PGE₂ (dózis feltüntetve) (A) és vehikulumának (B) i.c.v. beadása után *Tacr1*^{-/-} és *Tacr1*^{+/+} egerekben. A kísérleti körülmények az 51. ábránál leírtakkal azonosak voltak (respirometria rendszer, T_k = 31°C). A kolonban mért T_m (felső panel) és a fark T_b (alsó panel) változása SP (dózis feltüntetve) (C) és vehikulumának (D) i.c.v. beadása után *Tacr1*^{-/-} és *Tacr1*^{+/+} egerekben. Ezeket a kísérleteket a termoelem termometria rendszerben végeztük, 33°C-os T_k-n. A *Tacr1*^{-/-} egereket fekete, a *Tacr1*^{+/+} egereket fehér körök jelölik. A zárójelben feltüntetett számok az adott csoportban felhasznált egerek számát jelentik¹⁷².

Külön kísérletsorozatban igazoltuk a funkcionális NK1 receptorok hiányát a *Tacr1*^{-/-} egerekben, illetve azok jelenlétét *Tacr1*^{+/+} társaikban. Korábban többször kimutatták, hogy az SP az NK1 receptoron keresztül hatva idézi elő a T_m növekedését^{141,142}, ezért SP (100 µg/kg) vagy vivőanyagának i.c.v. injektálása után összehasonlítottuk a *Tacr1*^{+/+} és *Tacr1*^{-/-} egerek termoregulatórikus válaszát (52.C és D ábra). Azt találtuk, hogy az SP által kiváltott T_m növekedés a *Tacr1*^{+/+} egerekben a 20-60. percre szignifikáns volt a vehikulum kezeléshez képest ($p < 0,05$), viszont gyakorlatilag teljesen hiányzott a *Tacr1*^{-/-} egerekben (52.C és D ábra). Az SP-vel kezelt egereknél szignifikáns különbség volt a *Tacr1*^{+/+} és *Tacr1*^{-/-} egerek T_m értékei között a 10-40. percre ($p < 0,05$). Ezek az eredmények megerősítik az általunk használt egérmodell alkalmazhatóságát az NK1 receptor termofiziológiai szerepének tanulmányozására.

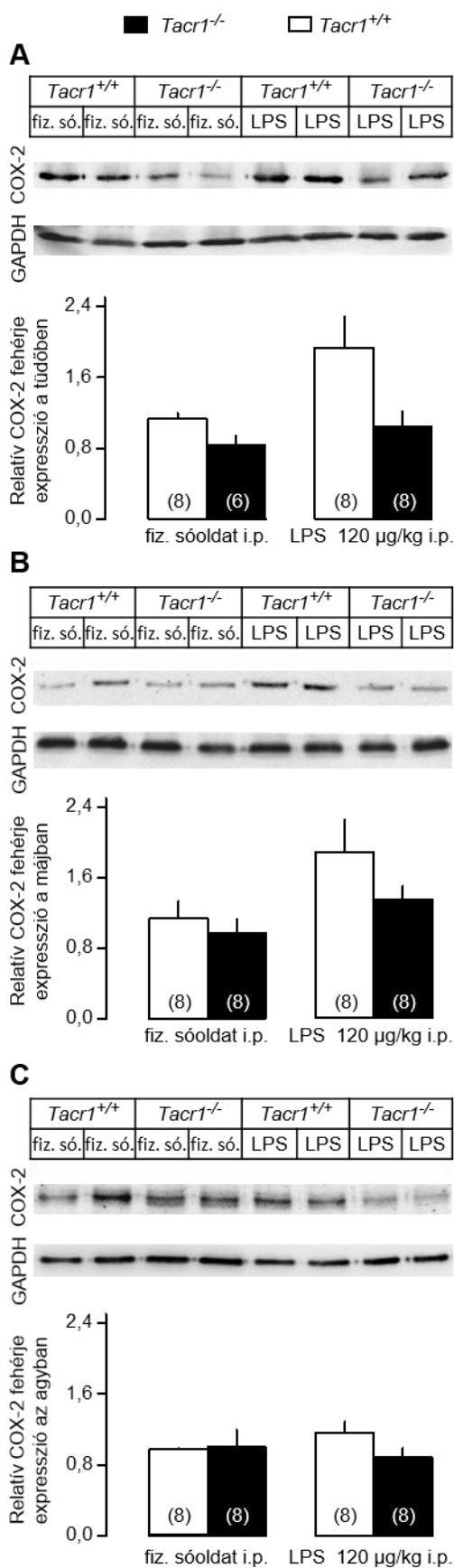
Az LPS által kiváltott láz kialakulásának egyik korai lépése az immunsejtek, köztük a makrofágok, leukociták és dendritikus sejtek aktiválása, ami gyulladáscitokinek, köztük a pirogén TNF- α és az IL-6 fokozott termeléséhez vezet¹²⁸. Ezért kísérleteinkben a TNF- α és az IL-6 szérumkoncentrációját is megmértük a *Tacr1*^{+/+} és *Tacr1*^{-/-} egerekben LPS és fiziológiás sóoldat kezelés után 40 perccel, de egyik esetben sem észleltünk szignifikáns különbséget a genotípusok között (részletekért, lásd Pákai és mtsai.¹⁷²). 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 is²²⁷. Saját kísérleteinkben az LPS-sel kiváltott láz a *Tacr1*^{-/-} egerekben már ~40 perccel LPS adást követően csillapodott (51.A ábra), 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 szövetmintában 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 (részletekért, lásd Pákai és mtsai.¹⁷²). Ezek az eredmények összhangban vannak az LPS által kiváltott COX-2 mRNA expresszió dinamikájára vonatkozó korábbi eredményekkel²²⁷, de nem magyarázzák a lázválasz mértékének elmaradását a *Tacr1*^{-/-} egerekben.

A COX-2 mRNS 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 szakaszában¹³⁵. Vizsgálatunkban ezért a COX-2 fehérje expresszióját is összehasonlítottuk LPS-sel kezelt *Tacr1*^{+/+} és *Tacr1*^{-/-} egerek között. A *Tacr1*^{+/+} egerekben LPS beadása a fiziológias sóoldathoz képest a COX-2 fehérje expressziójának jelentős növekedését eredményezte a tüdőben ($p < 0,01$) (53.A ábra) és a májban ($p < 0,05$) (53.B ábra), de az agyban nem volt hatása ($p = 0,264$) (53.C ábra). 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 ($p = 0,101$). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az NK1 receptor hiánya a COX-2 fehérje expressziójának emelkedését gátolja.

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 ($p = 0,275$). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *Tacr1*^{-/-} egerek tüdejében csökken az LPS által kiváltott PGE₂ koncentráció emelkedés (részletekért, lásd Pákai és mtsai.¹⁷²).

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 lázválaszban¹⁷³. Első lépésként, megvizsgáltuk az i.c.v. beadott CCK termoregulatórikus hatását patkányokban. Amint az korábbi vizsgálatok alapján várható volt¹⁵¹⁻¹⁵³, CCK hatására a patkányokban kifejezett T_m emelkedés alakult ki, míg a kontrollként használt fiziológias sóoldat beadása nem okozott semmilyen hatást.



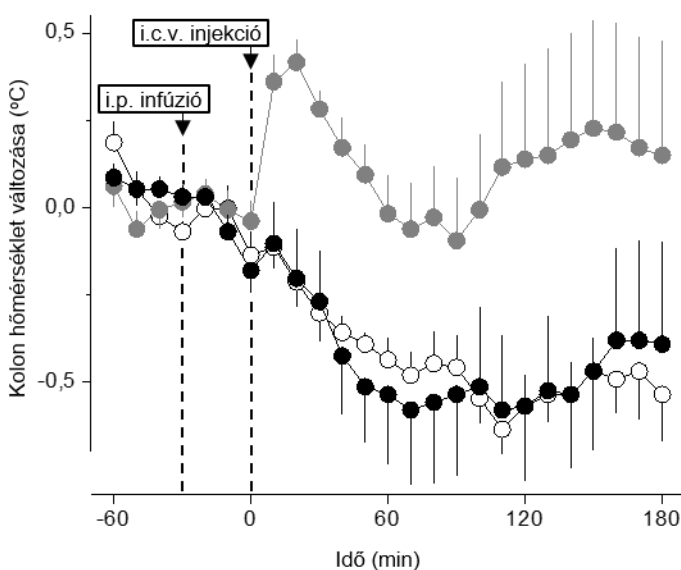
53. ábra: Relatív COX-2 fehérje expresszió a *Tacr1*^{-/-} és *Tacr1*^{+/+} egerek tüdejében (A), májában (B) és agyában (C) i.p. beadott LPS (dózis feltüntetve) és fiziológiás sóoldat hatására. A mintagyűjtésre az infúzió után 40 perccel került sor. Minden panel felső részén reprezentatív gélfotó látható az egyes kezelési csoportokba tartozó 2-2 mintából a COX-2 fehérje (felül) és a kontrollnak választott GAPDH fehérje (alul) expressziójáról. A panelek alsó részén a *Tacr1*^{-/-} egereket fekete, a *Tacr1*^{+/+} egereket fehér oszlopok jelölik. A zárójelben feltüntetett számok az adott csoportban felhasznált egerek számát jelentik¹⁷².

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 ± 0,1°C emelkedést ($p = 0,007$), majd fokozatosan csökkent, de a kísérlet során végig magasabb maradt a sóoldatos kezeléshez képest (54. ábra). 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. A CCK-val i.c.v. kezelt patkányok

esetében, a metamizol és sóoldat i.p. előkezelési csoportok között szignifikáns különbség

mutatkozott a 10-40. és 110-160. percig ($p < 0,05$) (54. ábra). A metamizollal előkezelt patkányok T_m -e a kísérlet során az i.c.v. CCK injekciót követően inkább csökkent, de nem különbözött a kontroll (i.p. sóoldat + i.c.v. sóoldat) csoport értékeitől (54. ábra). Mindkét utóbbi csoportban a T_m fokozatos csökkenése alakult ki a $\sim 30^\circ\text{C}$ -os T_k -n, ami feltehetően a patkányok ultradián testhőmérsékleti ritmusát tükrözhetette a termoneutrális zóna alsó határán.

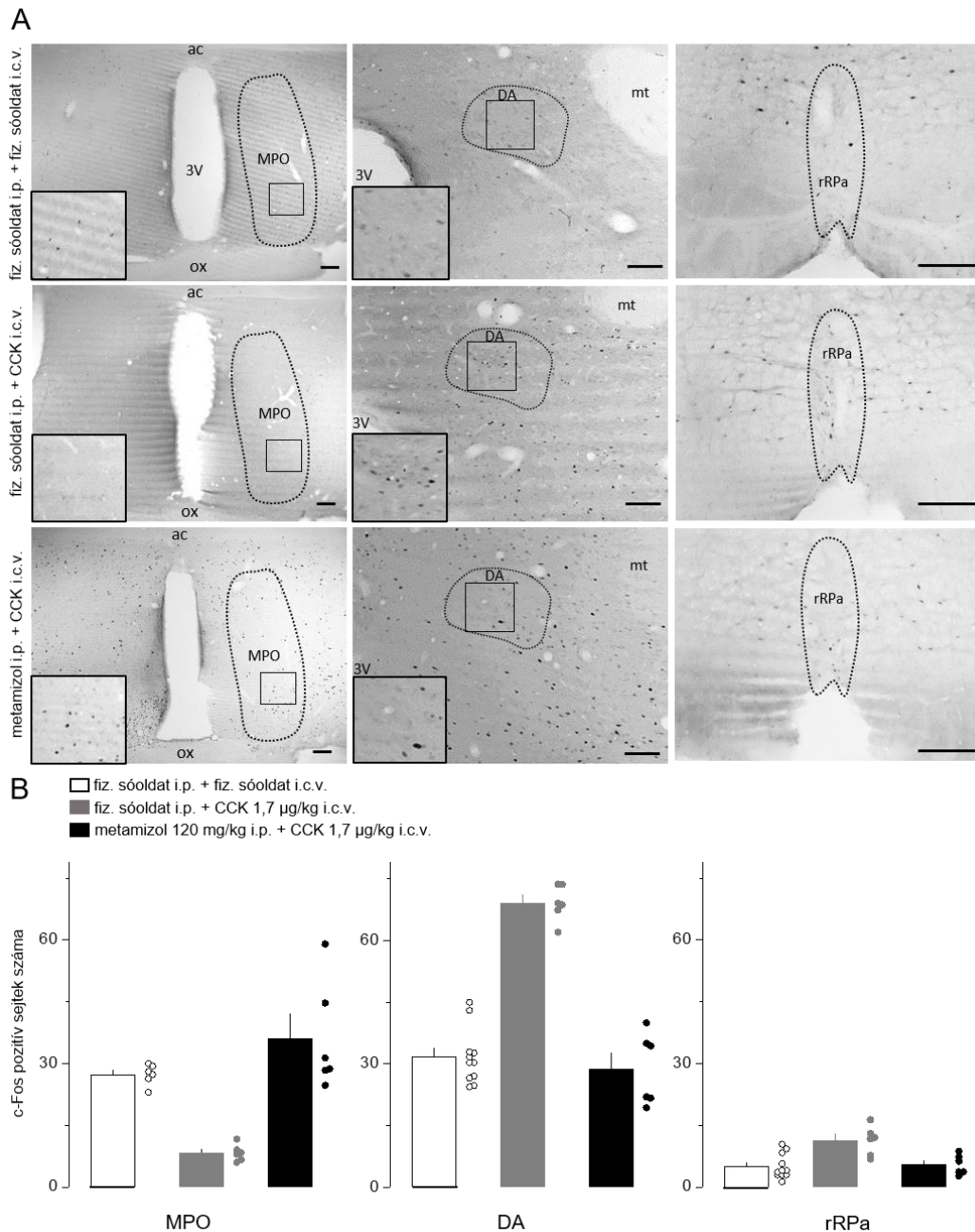
○ fiz. sóoldat i.p. + fiz. sóoldat i.c.v.
 ● fiz. sóoldat i.p. + CCK 1,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.c.v.
 ● metamizol 120 mg/kg i.p. + CCK 1,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.c.v.



54. ábra: Patkányok kolonban mért T_m válaszai CCK (dózis feltüntetve) vagy fiziológiás sóoldat i.c.v. beadására, 30 perccel i.p. metamizol (dózis feltüntetve) vagy fiziológiás sóoldat előkezeltetve követően. Minden csoportban $n = 9$. A negatív kontroll csoportot (i.p. sóoldat + i.c.v. sóoldat) fehér, a pozitív kontrollt (i.p. sóoldat + i.c.v. CCK) szürke, a metamizollal i.p. előkezelt, majd CCK-val i.c.v. injektált csoportot fekete szimbólumok jelölik¹⁷³.

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 ($p = 0,474$) (részletekért, lásd Kéringér és mtsai.¹⁷³). Annak ismeretében, hogy a CCK által indukált hipertermia során aktiválódnak az autonóm termoeffektor válaszok, azaz a barnaszírszöveti hőtermelés és a bőr vazokonstriktió^{151,153}, feltételeztük, hogy a CCK hatására kialakuló hipertermia blokkolása COX gátlóval megváltoztatja az ezeket a válaszokat befolyásoló hipotalamikus efferens neuronok aktivitását. Hipotézisünk tesztelésére megmértük az indukálható c-Fos transzkripció faktor expresszióját, amely a

neuronális aktiváció markere²²⁸, az MPO-ban, a DA-ban és az rRPa-ban (55. ábra), vagyis azokon az agyterületeken, amelyek ismert szerepet játszanak a hűtésre^{229,230} és a PGE₂-re¹³³ adott autonóm termoregulatórikus válaszok kialakulásában.



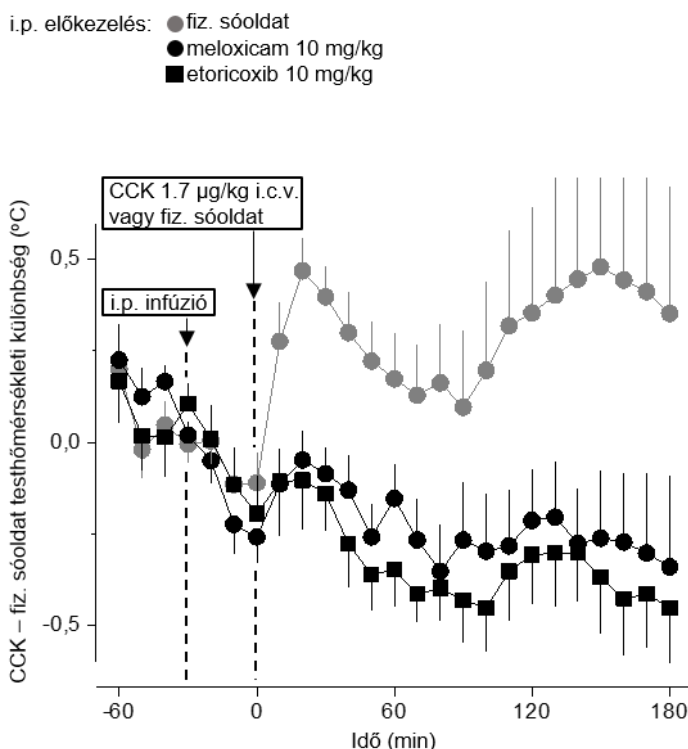
55. ábra: A c-Fos expressziója patkányok termoregulatórikus magjaiban 120 perccel CCK (dózis feltüntetve) vagy fiziológiás sóoldat i.c.v. beadása után, amelyre 30 perccel i.p. metamizol (dózis feltüntetve) vagy fiziológiás sóoldat előkezelést követően került sor. (A) Reprezentatív felvételek az MPO, DA és rRPa koronális metszeteiről -0,48, -2,76 és -10,68 mm-re a Bregmától. Az anterior commissure (ac), a harmadik kamra (3V), a chiasma opticum (ox) és a mamillothalamicus tractus (mt) tájékozódási pontokként láthatóak. Aránymérték: 100 µm minden kép esetében. (B) A c-Fos immunreaktív sejtek kvantitatív analízise az MPO-ban, DA-ban és rRPa-ban. Az MPO-ban minden csoport esetében n = 6. A DA és rRPa kezelési csoportjai esetében n = 11 a sóoldat + sóoldat és n = 6 a sóoldat + CCK és a metamizol + CCK esetében. Az oszlopok az átlagokat (\pm SE), a körök az egyéni adatokat jelölik¹⁷³.

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 előkezelése 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 előkezeléshez képest (55. ábra).

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 szerepet²³¹, továbbá, azt is megvizsgáltuk, hogy az ott megfigyelt változások befolyásolható-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. előkezelés nem volt hatással a CCK által kiváltott neuronális aktivációra a VMH-ban ($98,7 \pm 13,3$; $p = 0,505$) a sóoldatos előkezeléshez képest (részletekért, lásd Kéringér és mtsai.¹⁷³).

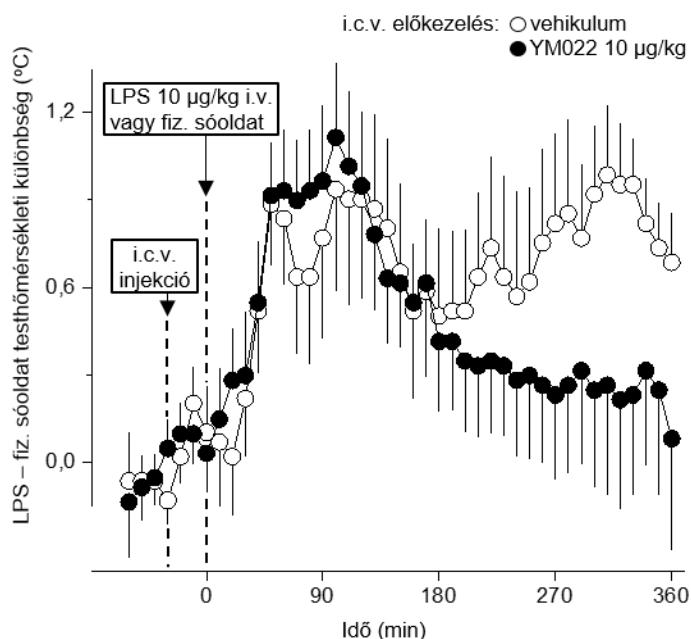
Kimutattuk tehát, hogy a metamizol csökkenti a CCK hatását, azonban ez a gyógyszer a COX mindkét izoformáját gátolja. A szisztémás gyulladással járó hőszabályozási rendellenességekben a két COX izoforma különböző szerepet játszik: a COX-2 nélkülözhetetlen a láz kialakulásában, míg a COX-1 (és nem a COX-2) az az izoforma, amely a hipotermiás választ közvetíti²³². 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 (56. ábra). Várakozásainknak megfelelően az i.c.v. beadott CCK szignifikáns hipertermiát váltott ki a sóoldathoz képest ($p < 0,001$) az i.p. sóoldattal előkezelt patkányokban. Amikor azonban 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. Az i.p. sóoldatos előkezeléshez képest a hatás szignifikáns volt mind a meloxicam, mind az etoricoxib esetében ($p < 0,001$ mindkettőnél). A CCK által kiváltott hipertermiát a kísérletek során a meloxicam a 20-30., 50., 80. és 100-180. percben ($p < 0,05$), az etoricoxib pedig a 20-50., 70-80. és 100-180. percben ($p < 0,05$) mérsékelte szignifikánsan (56. ábra). A COX-2-gátlókkal előkezelt patkányok T_m -e a CCK i.c.v. injekcióját követően inkább csökkent, de

statisztikailag nem különbözött a kontroll (i.p. sóoldat + i.c.v. sóoldat) patkányoktól. Az 56. ábrához hasonlóan, a mindegyik csoportban tapasztalt fokozatos T_m csökkenés a termoneutrális zóna alsó határához közeli T_k -en tartott patkányok testhőmérsékletének ultradian ritmusát tükrözhetette.



56. ábra: Patkányok kolonban mért T_m válasza CCK (dózis feltüntetve) vagy fiziológiás sóoldat i.c.v. beadására, 30 perccel i.p. meloxicam ($n = 7$ és 8) vagy etoricoxib ($n = 6$ és 8) (dózisok feltüntetve) vagy fiziológiás sóoldat ($n = 9$ és 8) előkezelést követően. Az i.p. sóoldattal előkezelt csoportot szürke kör, a meloxicammal előkezeltet fekete kör, az etoricoxibbal előkezeltet fekete négyzet szimbólumok jelölik¹⁷³.

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 ismertén a COX-2 közvetít¹²⁸. Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a CCK által kiváltott hipertermia elsősorban a CCK₂ receptorokon keresztül alakul ki^{151,154}, ezért kísérleteinkben a CCK₂ receptor LPS által kiváltott lázban betöltött szerepére fókuszáltunk. Ahogy vártuk, kisdózisú LPS i.v. infúziója termoneutrális környezetben polifázisos lázválaszt váltott ki az LPS adás előtt i.c.v. vivőanyaggal kezelt (kontroll) patkányokban; a három fázis az 50-60., a 100-120. és a 300-330. percknél tetőzött (57. ábra). 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 megfigyeltektől, azonban a harmadik fázis jelentősen csillapodott, elérve a szignifikancia szintjét ($p < 0,05$) a 280. és a 300-360. percben (57. ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a CCK₂ receptor szerepet játszik a láz késői fázisának létrejöttében.

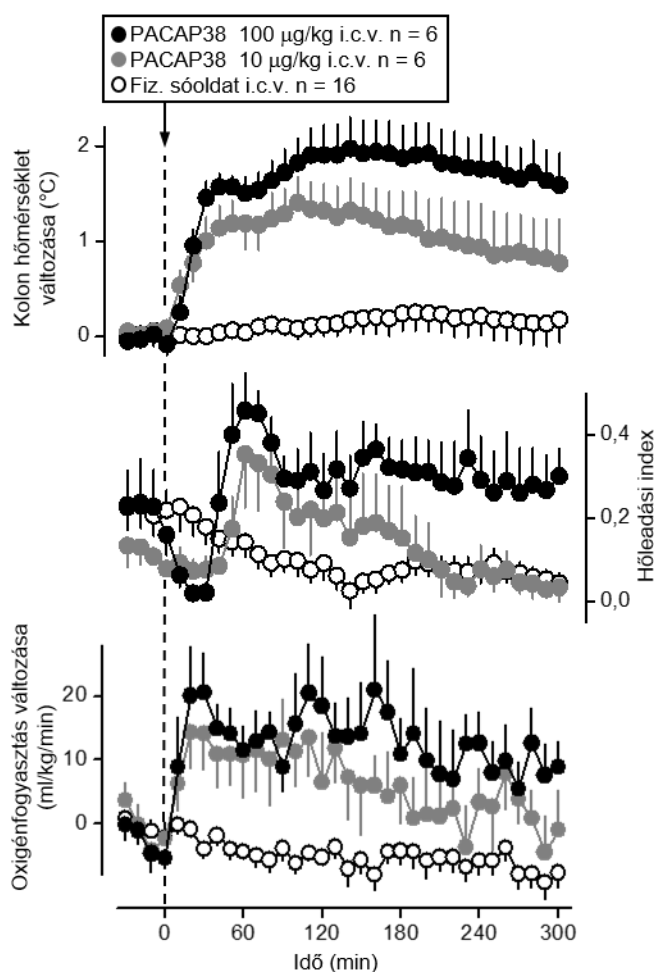


57. ábra: Patkányok kolonban mért T_m válasza LPS (dózis feltüntetve) vagy fiziológiás sóoldat i.v. beadására, 30 perccel i.c.v. YM022 (dózis feltüntetve) vagy annak vivőanyagával történt előkezelést követően. Minden csoportban $n = 6$. Az i.c.v. vehikulummal előkezelt csoportot fehér, az YM022-vel előkezeltet fekete kör szimbólumok jelölik¹⁷³.

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

A CCK-n kívül egy másik, TRPV1 csatornát expresszáló idegvégződésekből is felszabaduló neuroendokrin mediátor, a PACAP termoregulatorikus hatásainak karakterizálását is elvégeztük¹⁷⁴. Tudni szeretnénk volna, hogy a PACAP domináns, 38 aminosavból álló formájának, a PACAP38-nak testhőmérsékleti hatásai hasonlíthatók-e lázszerű hatáshoz.

Ennek érdekében, 10 vagy 100 µg/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. Ahogy vártuk, a sóoldat infúziója nem volt hatással egyik vizsgált paraméterre sem kísérleteinkben (58. ábra). Ezzel szemben, a PACAP38 mindkét alkalmazott dózisa már az injekciót követő 10 perctől kezdődően a T_m jelentős emelkedését váltotta ki ($p < 0,001$ mindkét dózisonál) (58. ábra). A PACAP38 által kiváltott hipertermia nagysága dóziszfüggő volt, a T_m maximális változása 100 µg/kg esetén $2,0 \pm 0,3^\circ\text{C}$, míg 10 µg/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 µg/kg dózisaik T_m -re gyakorolt hatásai között is. A centrálisan beadott PACAP38 hatására kialakult hipertermiás válasz összhangban van más kutatócsoportok patkányokban talált korábbi eredményeivel^{158,159,233,234}.



58. ábra: Patkányok kolonban mért T_m és termoeffektor válaszai PACAP38 (dózisok feltüntetve) vagy fiziológiás sóoldat i.c.v. beadására. A kolon hőmérséklet változásai a felső panelben, a két fő autonóm termoeffektor – a bőrön keresztüli hőleadás és a VO_2 – aktivitásának változásai, sorrendben, a középső és alsó panelekben láthatók. A sóoldattal kezelt csoportot fehér, a PACAP38 kisebb dóziséval kezeltet szürke, a nagyobb dózissal kezeltet fekete körökkel jelöltük¹⁷⁴.

A 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -os dózis esetében a hipertermia kialakulását jelentős farokbőr vazokonstriktió előzte meg (amit a csökkent HLI jelzett) ($p < 0,05$) (58. ábra), amely

eredmény tudomásom szerint elsőként mutatta be az i.c.v. PACAP38-ra adott bőr vazomotoros reakciót éber (nem anesztetizált) patkányokban. A PACAP38 termoregulátorikus (érszűkítő) hatása eltér a bőr ereire gyakorolt közvetlen (tágító) hatásától, amelyet korábban mutattak ki rágszálókban^{235,236}. 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^{235,236}. A 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dózisé 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.

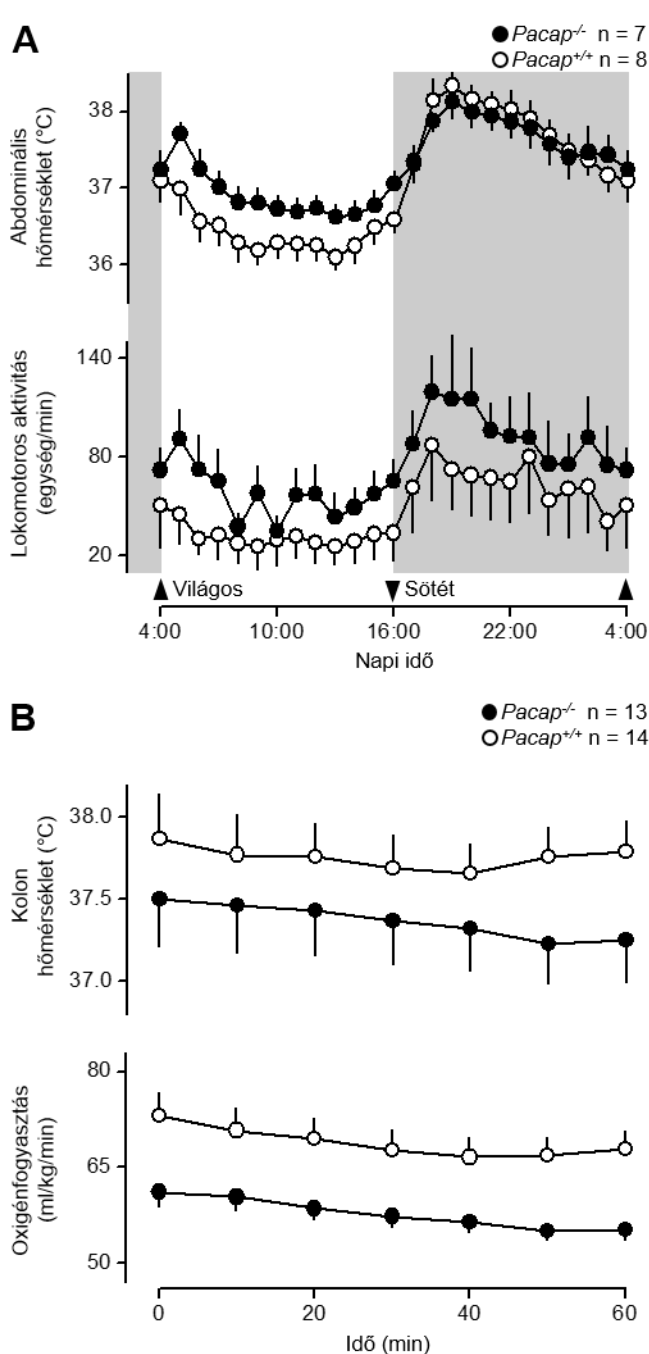
A T_m -hez hasonlóan a VO_2 is dóziszfüggő módon emelkedett már 10 perccel a PACAP38 i.c.v. beadása után a sóoldattal kezelt állatokhoz képest (58. ábra). A maximális emelkedés 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ esetén 21 ± 6 ml/kg/min, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dózisonál 14 ± 6

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^{158,237}. Ezenkívül eredményeink azt mutatják, hogy a két autonóm hideg elleni termoeffektor (a bőr vazokonstriktó és a barnazsír-szöveti 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 ($\sim 0,3^\circ\text{C}$), mind a hipertermiás válasz időtartama (60 perc) jelentősen kisebb volt, mint amit ugyanezen dózis i.c.v. beadása váltott ki ($p < 0,05$) (részletekért, lásd Bánki és mtsai.¹⁷⁴). 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 rágszálókra jellemző cirkadián ritmusnak megfelelően, mindkét genotípusba tartozó egerek T_m és aktivitás szintjei alacsonyabbak voltak a világos (inaktív) fázisban, mint a sötét (aktív) fázisban (59. ábra). Hashimoto és mtsai.²³⁸ tanulmányával összhangban 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 kontrollokhöz 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 (59.A ábra). Hasonló eredményeket kimutattak korábban is a hiperaktivitás T_m -re gyakorolt hatásáról csirkékben²³⁹ és egerekben⁸⁸, 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 származhat⁸⁸.

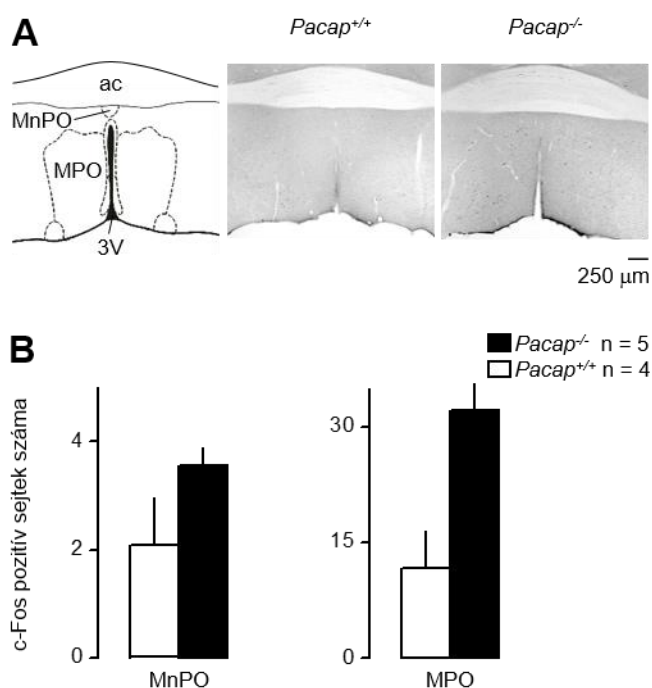


59. ábra: A *Pacap*^{-/-} és *Pacap*^{+/+} egerek hőszabályozási fenotípusa. (A) A T_m (hasüregben mért) és a lokomotoros aktivitás cirkadián változásai szabadon mozgó *Pacap*^{-/-} és *Pacap*^{+/+} egerekben. A kísérleteket a telemetria rendszerben végeztük 27°C-os T_k -n. (B) Mozgásukban részlegesen korlátozott *Pacap*^{-/-} és *Pacap*^{+/+} egerek nyugalmi T_m (kolonban mért) és VO_2 értékei. A nyugalmi T_m és a VO_2 méréseket délelőtt 11 és 12 óra között végeztük a respirometria rendszerben 31°C-os T_k -n. A *Pacap*^{-/-} egereket fekete, a *Pacap*^{+/+} egereket fehér körök jelölik¹⁷⁴.

Következő lépésként, mozgásukban részlegesen korlátozott *Pacap*^{-/-} és *Pacap*^{+/+} egerekben megmértük a nyugalmi T_m és VO_2 értékeit (59.B ábra). 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 (59.A ábra). Amint az 59.B ábra mutatja, 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 (60.A ábra), hiszen jól ismert, hogy ezeknek az agyi területeknek a neuronjai részt vesznek a hőtermelés szabályozásában^{6,240}. 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 ($p < 0,05$) (60.B ábra).



60. ábra: A c-Fos expressziója $Pacap^{-/-}$ és $Pacap^{+/+}$ egerek MnPO és MPO régióiban. (A) Sematikus rajz Paxinos és Franklin¹⁸⁶ atlasza alapján, illetve reprezentatív fotók az MnPO és MPO koronális metszeteiről a Bregmától 0,14 mm-re poszterior. Az anterior commissure (ac) és a harmadik kamra (3V) tájékozódási pontokként láthatóak. (B) A c-Fos immunreaktív sejtek kvantitatív analízise az MnPO-ban és az MPO-ban. A $Pacap^{-/-}$ egereket fekete, a $Pacap^{+/+}$ egereket fehér oszlopok jelölik¹⁷⁴.

Figyelembe véve, hogy az MPO GABAerg neuronjai tónusosan gátolják a barnazsír-szöveti termogenezist²⁴¹, valamint, hogy ezek a sejtek az autonóm termo-effektorok aktivitását szabályozó hurkok elsőszámú effektor neuronjainak

tekinthetők⁵, 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 sepszis súlyosságára és kimenetelére

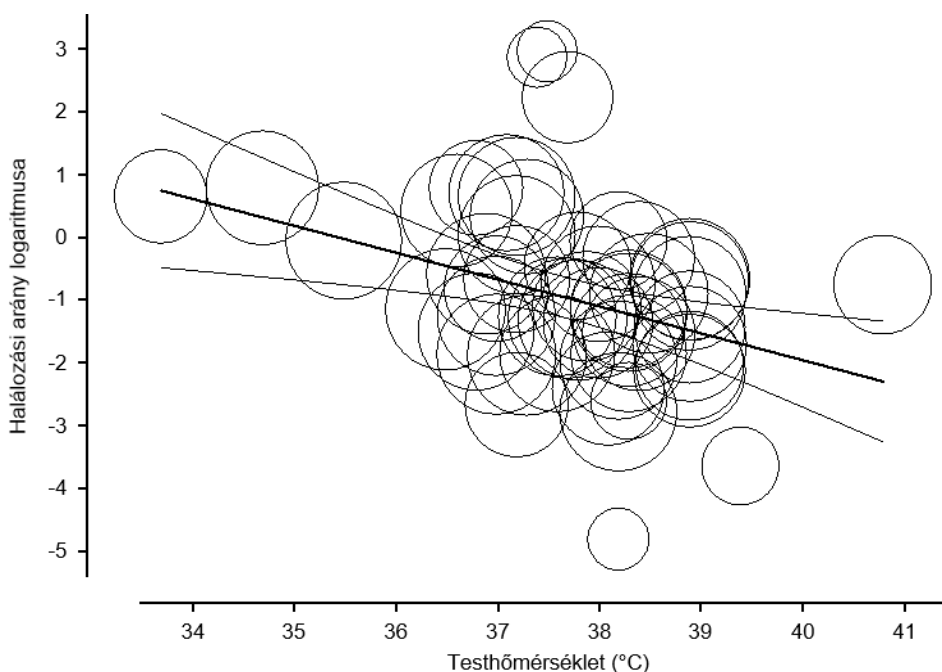
A szisztémás gyulladás során fellépő testhőmérsékleti elváltozások jelentőségének és mechanizmusainak kísérleti modellekben való tanulmányozása mellett, arra is kerestem a választ, hogy a T_m eltérései milyen összefüggésben állnak a betegség kimenetelével septicus humán betegekben. Ennek áttekintő vizsgálatához metaanalízist használtam¹⁶⁰. A 2. táblázatban (lásd 4.2.1.1. fejezet) található keresőkulcs segítségével a kizárások után 42 olyan tanulmányt azonosítottunk, amelyeket be tudtunk vonni analízisünkbe (a tanulmányok teljes listája az eredeti közleményben¹⁶⁰ található). Ezek összesen 10834 septicus beteg adatait tartalmazták.

Először megvizsgáltuk a sepszishez társuló láz esetén a mortalitási rátát: 29 tanulmányt találtunk (lásd Rumbus és mtsai.¹⁶⁰), amelyekben a szerzők beszámoltak sepszisben 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, ami szignifikánsan ($p < 0,001$) alacsonyabb volt, mint a halálozás véletlenszerű (azaz 50%-os) esélye. Elemeztük azon betegek halálozási arányát is, akiknél sem láz, sem hipotermia nem alakult ki a sepszis során, ezért ez a populáció normotermiásnak tekinthető ($T_m = 36,1-38,0^\circ\text{C}$). A 25 beválogatott tanulmányból (lásd Rumbus és mtsai.¹⁶⁰) 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. A halálozási arány ebben a populációban is szignifikánsan ($p < 0,001$) alacsonyabb volt, mint 50%. Ezután megvizsgáltuk a mortalitás előfordulását a hipotermiás ($T_m \leq 36,0^\circ\text{C}$) septicus betegek körében. A 11 azonosított tanulmány (lásd Rumbus és mtsai.¹⁶⁰), 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), ami nem különbözött szignifikánsan az 50%-os véletlenszerű esélytől ($p = 0,603$).

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 halálózási arány között (regressziós együttható: -0,4318; CI: -0,6699, -0,1938) (61. ábra).

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



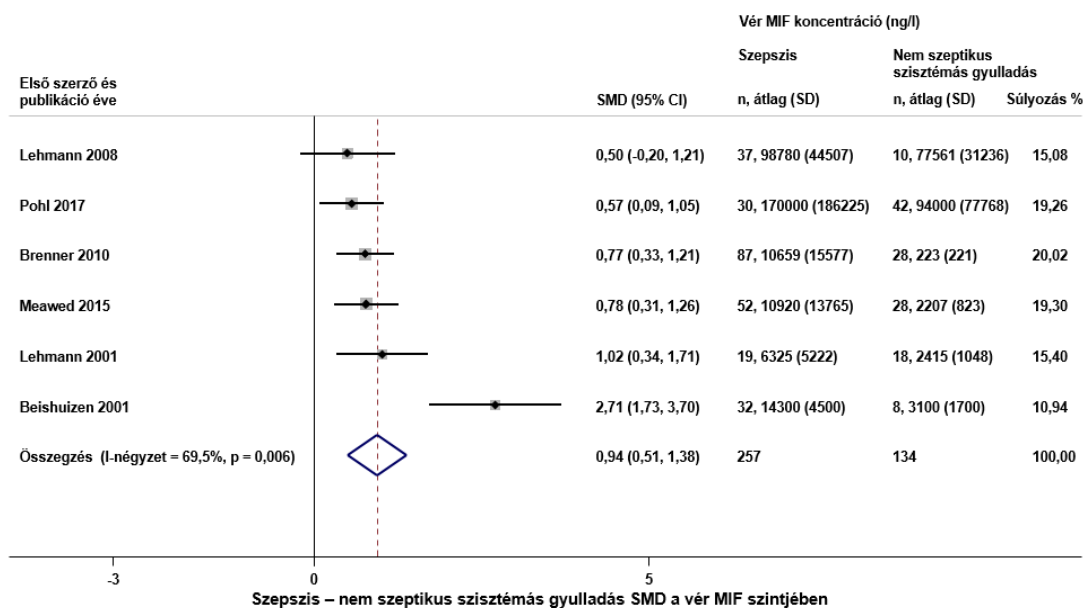
61. ábra: A testhőmérséklet és a halálózási arány közötti összefüggés meta-regressziós analízise szepszisben szenvedő betegeknél ($n = 10834$). A körök a beválogatott 42 cikkben szereplő szepszis betegcsoportokhoz tartozó testhőmérsékleti és mortalitási adatokból származnak. Minden kör területe arányos az adott tanulmány súlyozásával az analízisben. A körökre illesztett fekete egyenes vonal jól mutatja a fellelt szignifikáns negatív korrelációt a két vizsgált paraméter között; a felette és alatta látható görbék a hozzá tartozó 95%-os CI-t jelentik¹⁶⁰.

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 egérmódelben kollaboratív kutatás keretében kimutattuk^{124,125}, használható-e diagnosztikus és prognosztikus biomarkerként szepszisben szenvedő betegeknél. Ennek érdekében,

előbb elvégeztük az irodalomban már fellelhető humán adatok összegyűjtését és metaanalízisét¹⁶¹, majd pedig kiértékeljük saját prospektív klinikai vizsgálatunk során gyűjtött eredményeinket (lásd alább az 5.3.3. fejezetben).

A metaanalízisünk elvégzéséhez használt irodalomkutatásunk során összesen 21 publikációt találtunk alkalmasnak a kvantitatív analízishez (a tanulmányok teljes listája az eredeti közleményben¹⁶¹ található). A keresés dátumát és a felhasznált kulcsszavakat a 2. táblázat tartalmazza (lásd 4.2.1.1. fejezet). Az azonosított cikkek összesen 1876 beteg adatait tartalmazták, akik között 1206 szeptikus, 134 fertőzéstől független szisztémás gyulladásban szenvedő és 536 kontroll (azaz szisztémás gyulladás nélküli) alany volt. Először megerősítettük, hogy szeptisben a MIF szintje a vérben megemelkedik egészséges kontrollokhoz képest (részletekért, lásd Toldi és mtsai.¹⁶¹). Ezután megvizsgáltuk, hogy a vérben a MIF szintje hasonló vagy különböző mértékben emelkedik-e szeptisben és nem fertőzéses eredetű szisztémás gyulladásban. Ennek kvantitatív elemzésébe 6 tanulmányt tudtunk bevonni, amelyek 257 szeptikus és 134 nem szeptikus szisztémás gyulladásban szenvedő beteg adatait közölték (62. ábra).



62. ábra: Forest plot a vér MIF szintjeinek különbségéről (SMD) szeptikus betegek és nem szeptikus eredetű szisztémás gyulladásban szenvedő betegek között. Az átlagok különbségeit minden esetben standardizáltuk (a variancia alapján), hogy megkapjuk az SMD értékét, amelyet az ábrán minden tanulmány esetében fekete kör jelöl. A körök horizontális karjai a CI-t jelölik. A szürke négyzet mérete arányos az adott tanulmány esetszámának és inverz varianciájának értékével. A rombusz mutatja az egyedi tanulmányok SMD értékeiből számolt összesített SMD-t. A rombusz vízszintes átlója a CI-t, a függőleges átlója pedig az SMD-t jelöli minden tanulmányban együtt. A szaggatott függőleges vonal helyzetét a rombusz függőleges átlója határozza meg és az összes tanulmány felhasználásából számított SMD-t jelöli¹⁶¹.

Nem szeptikus eredetű betegek csoportjában a szisztémás gyulladás oka sebészeti beavatkozás²⁴²⁻²⁴⁴, multitrauma²⁴⁵ és szepszistől független láz²⁴⁶ vagy kritikus betegség²⁴⁷ voltak. A vérben a MIF szintje minden elemzett tanulmányban magasabb volt szeptikus betegcsoportokban, mint nem szeptikus eredetű szisztémás gyulladásban. Az összegzett SMD 0,94 (CI: 0,51, 1,38) volt a csoportok között ($p < 0,001$) (62. ábra), 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 időszaka alatt 59 beteg lett volna alkalmas beválogatási kritériumaink szerint a vizsgálatban való részvételre, de közülük csak 51 beteget tudtunk bevonni, mert 8 beteg visszautasította a részvételt miután részletes tájékoztatást kapott a vizsgálatról, egy beteget pedig ki kellett zárni, mert a 90 napos utánkövetés végén nem lehetett megállapítani a kimenetelt. A végső elemzésünkbe így 50 beteg adatai kerültek be¹⁷⁵, akiknek kiindulási paramétereit a 4. táblázat foglalja össze.

4. táblázat: Prospektív klinikai vizsgálatunkba bevont túlélő és elhunyt szeptikus betegek demográfiai adatai és laboratóriumi / klinikai paramétereit az intenzív osztályos felvételük napján¹⁷⁵

| Paraméter (egység) | Túlélte (n = 21) | Elhunyt (n = 29) | Minden beteg (n = 50) | p érték |
|--|------------------|------------------|-----------------------|---------|
| Demográfiai jellemzők | | | | |
| Életkor (év) | 67 ± 3 | 66 ± 3 | 66 ± 2 | 0,78 |
| 65 éves vagy idősebb, n (%) | 12 (57) | 17 (59) | 29 (58) | 1,00 |
| Nő, n (%) | 12 (57) | 11 (38) | 23 (46) | 0,57 |
| Vérteszt eredmények | | | | |
| Vörösvértestszám ($10^{12}/l$) | 3,7 ± 0,1 | 3,5 ± 0,1 | 3,5 ± 0,1 | 0,17 |
| Fehérvérsejtszám ($10^9/l$) | 13,6 ± 0,2 | 15,1 ± 2,1 | 14,5 ± 1,5 | 0,63 |
| Neutrofilek aránya (%) | 12 ± 2 | 14 ± 2 | 13 ± 1 | 0,68 |
| C-reaktív protein (mg/l) | 232,4 ± 28,1 | 253,5 ± 21,8 | 244,7 ± 17,2 | 0,56 |
| Procalcitonin (ng/ml) | 23,62 ± 10,99 | 40,22 ± 10,19 | 33,86 ± 7,60 | 0,27 |
| Laktát (mmol/l) | 4,4 ± 1,3 | 4,0 ± 1,3 | 4,2 ± 0,9 | 0,81 |
| Kreatinin ($\mu\text{mol}/l$) | 180,2 ± 31,0 | 173,8 ± 23,1 | 176,5 ± 18,5 | 0,87 |
| Urea (mmol/l) | 13,7 ± 1,8 | 15,6 ± 1,7 | 14,8 ± 1,2 | 0,47 |
| Becsült glomeruláris filtrációs ráta (ml/min/1,73 m ²) | 37,6 ± 5,1 | 39,6 ± 4,4 | 38,8 ± 3,3 | 0,78 |
| Vizeleteszt eredmények* | | | | |
| Ósszfehérje (mg/l) | 1193 ± 642 | 713 ± 213 | 856 ± 240 | 0,49 |
| Kreatinin (mmol/l) | 4,5 ± 1,0 | 5,2 ± 0,8 | 5,0 ± 0,6 | 0,61 |

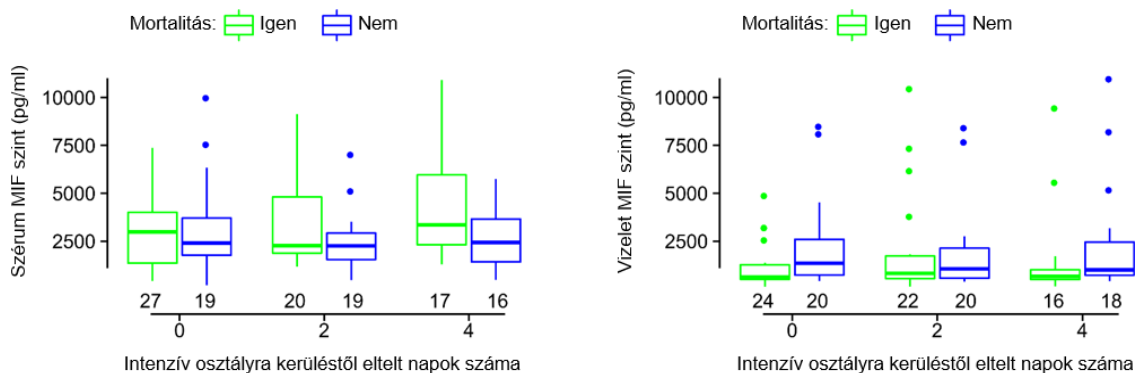
| Paraméter (egység) | Túlélte (n = 21) | Elhunyt (n = 29) | Minden beteg (n = 50) | p érték |
|-------------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|------------|
| Klinikai állapot paraméterek | | | | |
| APACHE II (pont) | 17 ± 2 | 19 ± 2 | 18 ± 1 | 0,39 |
| SAPS II (pont) | 40 ± 4 | 49 ± 4 | 46 ± 3 | 0,15 |
| SOFA (pont) | 8 ± 1 | 10 ± 1 | 10 ± 1 | 0,16 |
| Vese diszfunkció, n (%) | 13 (62) | 16 (55) | 29 (58) | 0,77 |

*vizsgálatunkhoz 6 betegből (1 túlélő és 5 elhunyt) nem lehetett vizeletmintát venni a felvétel napján. Az adatokat átlag ± SE formájában tüntettem fel, kivéve a nem, az idők és a veseelégtelenségben szenvedők arányát, ahol a betegek száma (és százalékos aránya) szerepel.

A túlélők (n = 21) és elhunytak (n = 29) csoportjai közötti statisztikai összehasonlítás szintén szerepel a táblázatban. A 90 napos halálozási arány 58% volt ebben a vizsgálati populációban, ami megfelel a szakirodalomban a közelmúltban közölt adatoknak²⁴⁸. 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 SAPS II és a SOFA pontszámok a nem túlélőknél tendenciózusan magasabbak voltak, mint a túlélőknél ($p = 0,15$, illetve $0,16$), ahogy az várható volt.

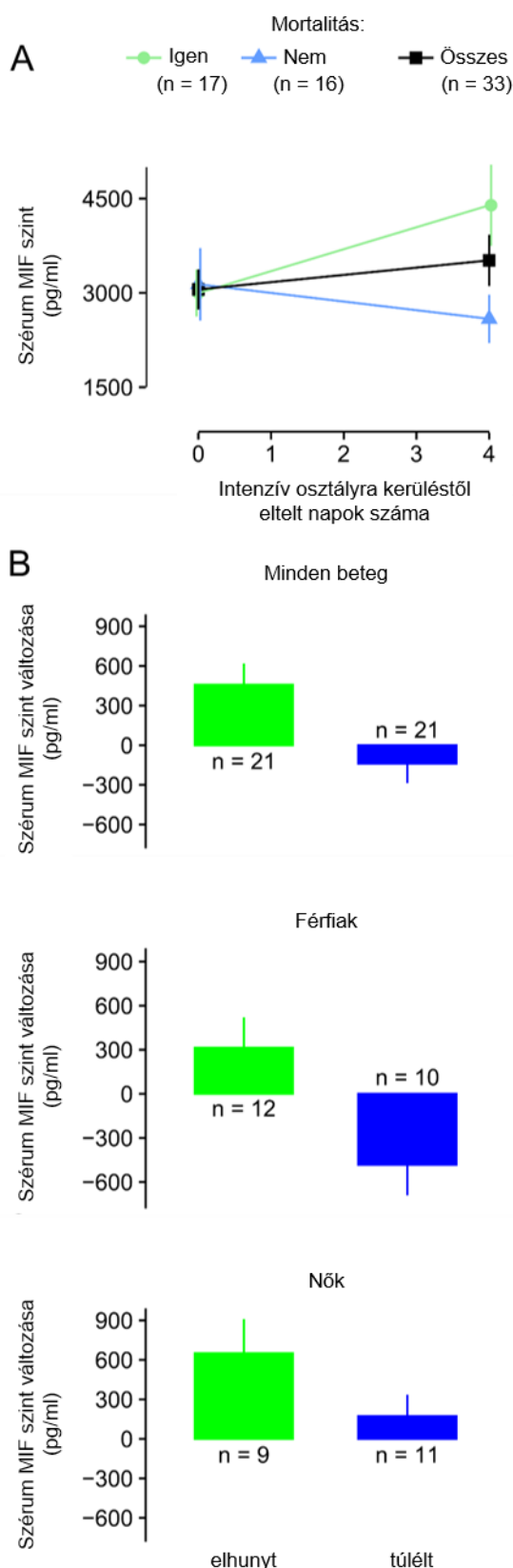
A szérumban MIF szintek mediánja nem különbözött statisztikailag a túlélő és elhunyt szepszis betegek között a 0. és a 2. napon, azonban a 4. napon szignifikánsan ($p = 0,039$) magasabb volt az elhunyt betegeknél, mint a túlélőknél, a medián [interkvartilis tartomány (IQR)] értékei 3348 (2313-5961), illetve 2430 (1284-3691) pg/ml voltak (63. ábra). Ezek az eredmények a szérumban 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; $p = 0,032$) (63. ábra). 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 (0,24 vs. 0,50 pg/μmol; $p = 0,022$) és a 4. napon (0,24 vs. 0,80 pg/μmol; $p = 0,003$), 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 vesefunkcióban mutatkozó különbségek.



63. ábra: A szérum és vizelet MIF szintjei septicus betegekben az intenzív osztályra való felvételtől számított 0., 2. és 4. napon. A téglalapokon belüli vízszintes vonal a mediánt, a téglalap alsó és felső oldala pedig az alsó, illetve felső kvartilis értékeit jelöli, amelyek az IQR-t fogják közre. A téglalaptól alul és felül kiinduló függőleges vonal a minimum, illetve a maximum MIF szintet mutatja. A kiugró értékeket pontok jelzik. A téglalapok alatti számok az egyes csoportokba tartozó betegek számát jelzik. Az elhunyt betegcsoportot zöld, a túlélőt kék szimbólumok jelölik¹⁷⁵. Megjegyzendő, hogy a 0. napon a szérum MIF szintet 4 betegnél, a vizelet MIF szintet pedig 6 betegnél nem lehetett meghatározni technikai problémák miatt.

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 (64. ábra). 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 szépszist túlélőknél a szérum MIF szintje 3137 ± 576 pg/ml-ről 2587 ± 384 pg/ml-re csökkent ugyanezen időintervallum alatt (64.A ábra). A szérum 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 ($p = 0,230$) (64.B ábra). 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.

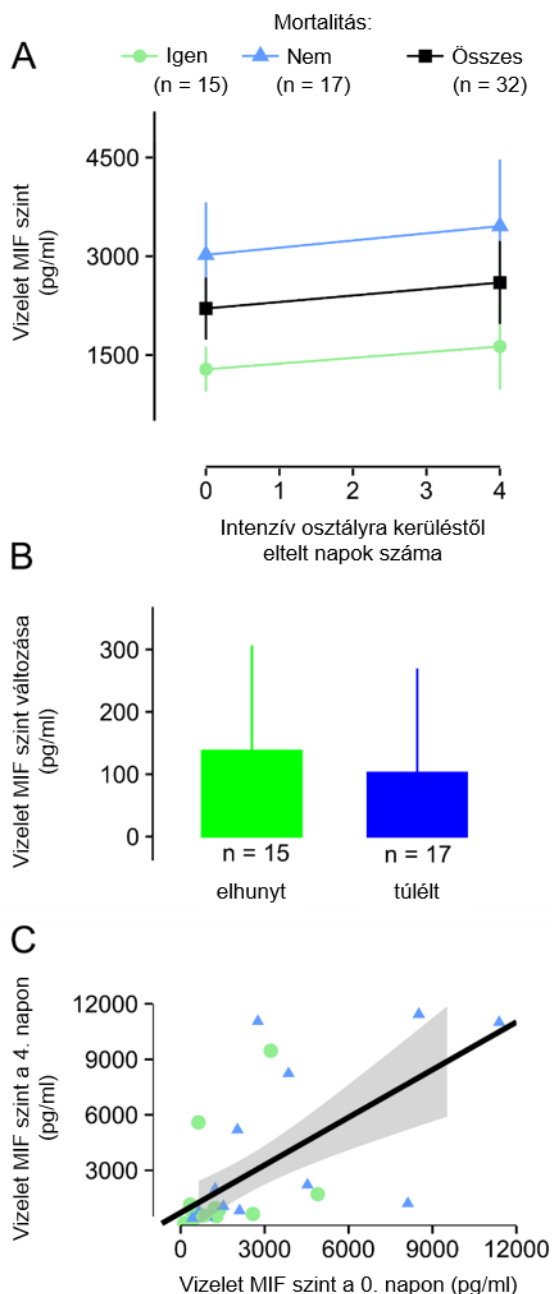


64. ábra: A szérums MIF szint kinetikája intenzív osztályra került szeptikus betegekben. **(A)** A szérums MIF szint átlag (és SE) értékei minden vizsgálatba bevont elhunyt és túlélő szeptikus beteg adatai alapján az intenzív osztályra való felvételtől számított 0. és 4. napon. **(B)** A szérums MIF szintjének átlagos napi változása elhunyt és túlélő betegeknel mindkét nem (fent), férfiak (középen) és nők (lent) adatai alapján. Az elhunyt betegcsoportot zöld, a túlélőt kék szimbólumok jelölik¹⁷⁵.

A szérums MIF szintjének kinetikája mellett azt is megvizsgáltuk, hogyan változik a MIF szintje a vizeletben a szeptikus betegek intenzív osztályra való felvételét követően. Ahogy korábban bemutattam, a vizelet MIF szintje a 0. és a 4. napon szignifikánsan alacsonyabb volt az elhunyt betegeknel, mint a túlélőknél (63. ábra). 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 (65.A. ábra). Fontos, hogy a vizelet MIF szintjének napi változása sem különbözött szignifikánsan a túlélők és az elhunytak között (109 ± 192 vs. 87 ± 152 pg/ml; $p = 0,940$) (65.B. ábra).

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 (65.C. ábra), ami arra utal, hogy a 0. napon meghatározott szint előre jelzi a 4. napon mért értéket.



65. ábra: A vizelet MIF szint kinetikája intenzív osztályra került sepsiszes betegeknél. **(A)** A vizelet MIF szint átlag (és SE) értékei minden vizsgálatba bevont elhunyt és túlélő sepsiszes beteg adatai alapján az intenzív osztályra való felvételtől számított 0. és 4. napon. **(B)** A vizelet MIF szintjének átlagos napi változása az elhunyt és túlélő betegeknél mindkét nem adatai alapján. **(C)** Korreláció az intenzív osztályra való felvételtől számított 0. napon és 4. napon mért vizelet MIF szintek között. Az elhunyt betegcsoportot zöld, a túlélőt kék színnel jelöltük¹⁷⁵.

6. Megbeszélés

6.1. *Thermo-TRP ioncsatornák szerepe a testhőmérséklet szabályozásában*

6.1.1. A TRPV1 ioncsatorna

Első lépésként, a TRPV1 csatornától genetikusan megfosztott egerek termoregulatórikus fenotípusát tanulmányoztuk⁶⁹. Korábbi vizsgálatokkal összhangban^{80,81}, 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 vazokonstriktója, és ezzel összhangban magasabb volt a termoneutrális zónájuk. Másodsor, 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 mozgásintenzitásban²⁴⁹⁻²⁵¹. 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. Davis és mtsai.²⁵⁰ 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 ($p = 0,12$). A *Trpv1* KO egerek megnövekedett aktivitását Marsch és mtsai.²⁵¹ is megfigyelték több szorongással kapcsolatos viselkedési tesztben. Ezekben a tesztekben a *Trpv1* KO egerek gyorsabban alkalmazkodtak a kísérleti körülményekhez, és magasabb lokomotoros aktivitással járó felfedező viselkedést mutattak. Más vizsgálatokban azonban nem igazolódott a TRPV1 csatornák szerepe a szorongásos viselkedésben^{252,253}. A saját kísérleteinkben megfigyelt fokozott spontán lokomotoros aktivitás nem valószínű, hogy a szorongás vagy a felfedező viselkedés

változásaiból ered, mivel az egereket alaposan hozzászoktattuk a kísérleti körülményekhez és a kísérletek során hosszú időn át tanulmányoztuk őket.

Tekintettel arra, hogy a *Trpv1* KO egerek autonóm termoregulatórikus válaszaiban nem volt lényeges eltérés sem a mi kísérleteinkben, sem korábbi vizsgálatokban^{50,80,81}, 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 termográdiens 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 patkányok²⁵⁴ és egerek (10. ábra) 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 törzű *Trpv1*^{+/+} egérben. Ez a hatás összhangban áll az általunk is vizsgált és más TRPV1 agonisták több különböző tesztben leírt hipokinetikus tulajdonságával^{27,201,206,207}. 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 blokkolják²⁵⁵. A következő kísérletben az AMG0347-et, egy rendkívül potens és szelektív TRPV1 antagonistát használtunk. A korábbi kísérletek alapján elvárt hipertermiás hatás^{62,70} 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 dózsisú RTX-et (20 ng/kg) 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^{17,256}. Ezeket a neuronokat számos inger aktiválhatja, és vélhetően autonóm és viselkedési funkciók széles skáláját befolyásolhatják^{6,257,258}. A perifériás TRPV1 csatornák tónusos aktiválása Steiner és mtsai.⁶² tanulmányában gátolta a termogenezist és a hőkonzerválást, Mandadi és mtsai.²⁵⁹ vizsgálatában 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^{51,250}, amelyekben nem találtak eltérést a *Trpv1* KO egerek testtömegében a kontrollokhöz képest, ha normál vagy magas zsírtartalmú étrenden tartották őket. Továbbá, ellentmondott Motter és Ahern⁵⁰ vizsgálatának is, 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 vizsgálathoz 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 (16. ábra). Érdekes módon a TRPV1 csatornák elhízás elleni védő szerepét korábban már felvetették^{51,260}, amit kétféle bizonyíték támaszthat alá. Először is, Zhang és mtsai.⁵¹ 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 kapszainoidok (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^{51,261,262}.

A *Trpv1* KO egerekben fiatal korokban talált hiperaktivitás és idősebb korokban kialakuló túlsúly közötti paradoxon feloldására további vizsgálatokat folytattunk¹⁶², 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 is²¹². Ebben a csoportban azok, akik fiatal korban fizikailag aktívabbak voltak, 11 évvel később nagyobb testtömeg-gyarapodást mutattak.

Összefoglalva, vizsgálatunk első része azt mutatja, hogy a *Trpv1* KO egerek egyedi hőszabályozási fenotípussal rendelkeznek, amely magában foglalja a hipometabolizmust, a bőr fokozott vazokonstriktóját, az alacsonyabb T_k preferálását és a fokozott lokomotoros aktivitást. Vizsgálatunk második része azt mutatja, hogy a TRPV1 agonisták csökkentik, az antagonisták pedig növelik a lokomotoros aktivitást. Az agonisták esetében a lokomócióra gyakorolt hatás agyon kívüli támadásponton keresztül valósul meg. Feltételezzük, hogy bizonyos perifériáról érkező TRPV1 csatornák által közvetített szignálok tónusosan gátolják az általános lokomotoros aktivitást. Az, hogy ez a gátlás a lokomotoros aktivitásra gyakorolt közvetlen hatás vagy közvetett módon (például a motiváció vagy az éberségi állapot befolyásolásával) következik-e be, jövőbeli vizsgálatok témáját képezheti, mint ahogy a TRPV1 által közvetített, lokomóciót elnyomó jelek természetének tisztázása is. Egyre világosabb azonban, 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 rágcsálókban¹⁶³. Az A-1165901 *in vivo* tesztelése során kimutattuk, hogy az nem hipertermiát okoz, ahogy a legtöbb korábban vizsgált TRPV1 antagonistá, 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 farokbőr érrendszere és a termogenezis is részt vehet. Termoneutrális környezetben a farokbőr vazodilatációja a domináns effektor, míg

hidegben a termogenezis gátlása az egyetlen autonóm effektor az A-1165901 által indukált hipotermiában. Ebben a tekintetben az erre az anyagra adott hipotermiás válasz hasonló a hipertermizáló TRPV1 antagonistákra, azaz az AMG0347-re⁶² és az AMG 517-re adott válaszokhoz^{64,165}. Az AMG0347 és az AMG 517 ugyanis ugyanezekre a termoeffektorokra (de ellentétes irányban) hatva növeli a T_m -et patkányokban: farokbőr vazokonstrikció 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^{62,64,165}. A TRPV1 antagonistákra adott hipo- és hipertermiás válaszok tehát ugyanazokon az autonóm termoeffektorokon keresztül valósulnak meg, és ezen effektorok 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 dózisu (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) i.p. RTX kezeléssel átesett patkányokban. Ez az RTX kezelés deszenzitizálja az abdominális régió érzőidegeit, de a hason kívül, így a mellkasi viscerában, az agyban, a szaruhártyában vagy a bőrben nincs ilyen hatása^{62,72}. Ugyanez az abdominális RTX deszenzitizáció megakadályozza a hipertermia kialakulását az AMG0347⁶² vagy az A-889425²⁶³ valamint az AMG 517 vagy az AMG8163 hatására (lásd 5.1.1.1.3. fejezet). Másképp fogalmazva, a TRPV1 antagonisták által indukált hipo- és hipertermiás válaszok ugyanabból a lokalizációból indulnak ki.

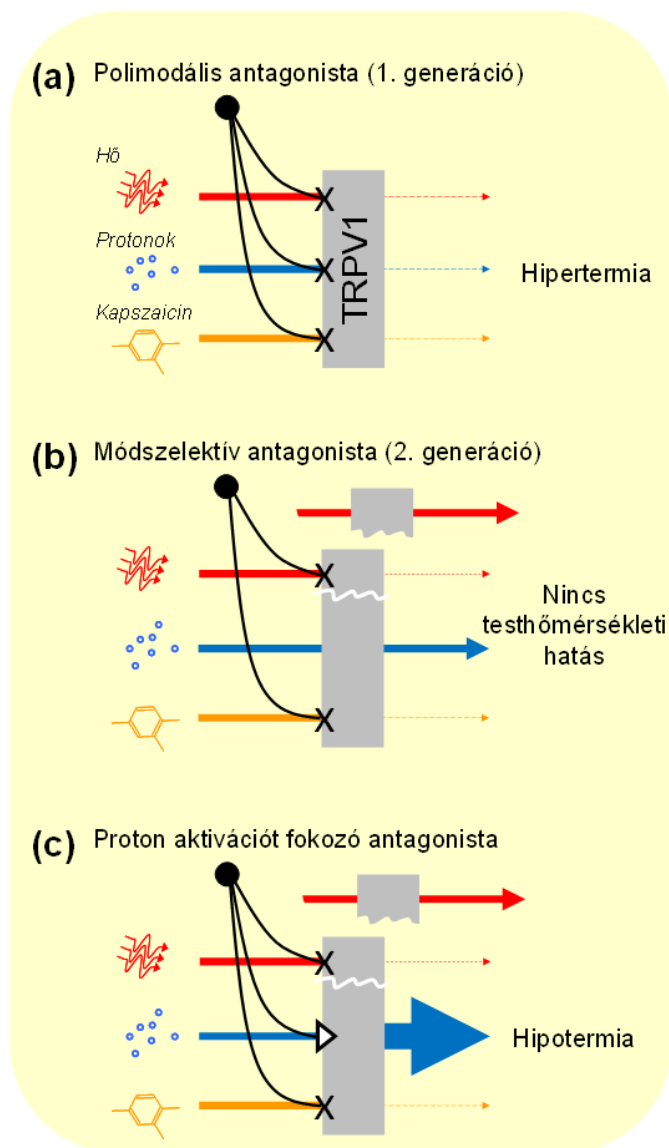
Fontos volt azt is tisztázni, hogy a TRPV1 antagonisták hipotermiás hatása célirányos hatás-e (azaz ténylegesen a TRPV1 csatornákon keresztül jelentkezik-e). Korábban többen is feltételezték, hogy a hipotermia nem TRPV1 csatornán keresztül megvalósuló „on-target” hatás^{70,74}. Ugyanakkor olyan eredmények is születtek, amelyek szerint a különböző kemotípusú szelektív TRPV1 antagonisták hipotermiát okoznak^{70-75,215}, 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 antagonistát 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 antagonistát, így az AMG0347, AMG 517 és AMG9810 esetében is, *Trpv1*^{-/-} egerek alkalmazásával^{62,68,70}.

Azt találtuk továbbá, hogy mindkét vizsgált hipotermizáló TRPV1 antagonistát (A-1165901 és AMG7905) gátlás helyett potenciózta a TRPV1 csatorna protonok általi

aktivációját *in vitro*, miközben a kapszaicin módot nagymértékben blokkolta. Tekintettel a TRPV1 farmakológiai komplexitására^{29,32,76}, 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 Lehto és mtsai.⁷¹ adataival, akik először figyelték meg, hogy az AMG7905 és az AMG8562 potenciózza a TRPV1 protonok általi aktivációját *in vitro*, és feltételezték, hogy ez a potenciózó hatás korrelál a TRPV1 antagonisták hipotermizáló hatásával. Következésképpen, míg a TRPV1 csatorna protonok általi aktivációs módját gátló TRPV1 antagonistákról egyértelműen bizonyítottnak látszik, hogy hipertermiát okoznak^{70,71,264}, 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. Általában, ha egy anyag hipo- vagy hipertermiát okozhat, akkor két különböző mechanizmusra hatva váltja ki a két hatást. Egy olyan mechanizmus, amely hipertermiát okoz, nem okozhat hipotermiát: vagy növeli a T_m -et (amikor aktív), vagy nem fejt ki testhőmérsékleti hatást (amikor inaktív). Ennek az ellenkezője is igaz: egy hipotermiát okozó mechanizmus nem növelheti a T_m -et. Az általunk talált eredmények azt mutatják, hogy 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 (66.A ábra). 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 (rágcsálóknál a termogenezis és a farokbőr vazokonstrikció) 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 (66.B ábra), így nem befolyásolják a hasi TRPV1 csatornák hőszabályozási reflexíveit. A hipotermiát kiváltó TRPV1 antagonisták potenciózzák – nem pedig gátlják – a proton aktivációs módot (66.C ábra). 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.



66. ábra: A különböző farmakológiai profilú TRPV1 antagonisták termális hatásának összefoglalása. **(a)** A proton aktivációt gátló TRPV1 antagonisták hipertermiát okoznak, például az AMG0347. **(b)** Azok a TRPV1 antagonisták, amelyek nem hatnak a proton aktivációra nem befolyásolják a testhőmérsékletet, például a kapszazepin. **(c)** A proton aktivációt fokozó TRPV1 antagonisták hipotermiát váltanak ki, például az A-1165901¹⁶³.

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? Korábban egy matematikai modell segítségével hét hipertermizáló és egy hipotermizáló (JYL1421) TRPV1 antagonistá profilját elemezve megpróbáltunk választ adni erre a kérdésre (lásd 2.2.1.2. fejezet, 7. ábra). Akkor még nem tudtuk, hogy a TRPV1 antagonisták hipo- és hipotermiás hatásai különböző mechanizmusokon keresztül jönnek létre, vagy pedig ugyanazon mechanizmus ellentétes modulációjából erednek. Ezért a modellünket két különböző adatsoron futtattuk le: a hipotermizáló JYL1421 antagonistával kapott eredmények bevonásával és azok kizárásával. Mindkét adatsor elemzése azt mutatta, hogy a TRPV1 csatorna proton aktivációs módjára kifejtett gátlás erőssége a legfontosabb egy antagonistá hipertermiát kiváltó képessége szempontjából,

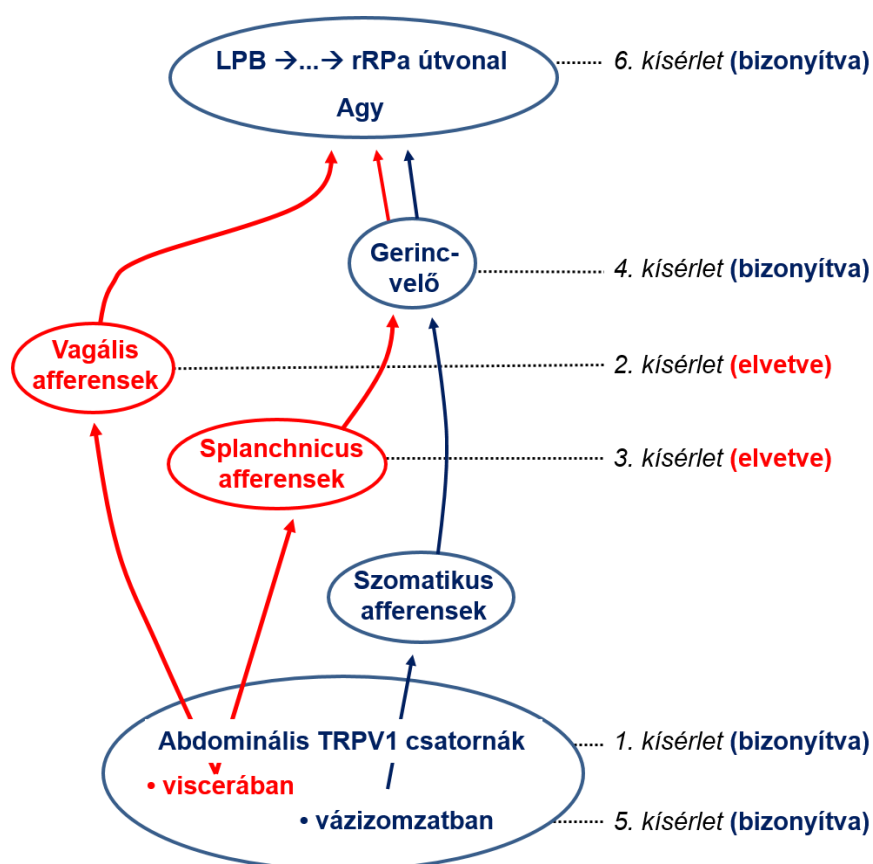
és hogy a TRPV1 csatorna hő általi módjának gátlása a testhőmérsékleti hatás szempontjából irreleváns volt. A kapszaicin aktivációs módot illetően azonban a két elemzés eltérő eredményeket hozott. A JYL1421 adatok kizárása esetén a modell azt mutatta, hogy az antagonistának a kapszaicin aktivációs módot gátló potenciálja is (a proton mód blokkolásán kívül) hozzájárult a hipertermiát kiváltó képességéhez. A JYL1421 adatok bevonásával az elemzés azt mutatta, hogy a kapszaicin aktivációs mód blokkolásának hatékonysága irreleváns. 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 a JYL1421 adatait be kell vonni a matematikai modellbe. A hipertermizáló TRPV1 antagonisták farmakológiai profiljában tehát 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 mechanizmusa¹⁶⁴. Ezirányú vizsgálataink során kimutattuk, hogy három TRPV1 antagonistára (AMG0347, AMG 517 és AMG8163) adott hipertermiás válasz nem alakult ki lokalizált hasi TRPV1 deszenzitizációt okozó, alacsony dózisu (20 µg/kg) i.p. RTX előkezelésen átesett patkányokban (67. ábra, 1. kísérlet). A lokalizált hasi TRPV1 deszenzitizációról korábban kimutatták, hogy csillapítja az AMG0347⁶² és az A889425 által indukált hipertermiát²⁶³. 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. Nemrég, a TRPV1 expressziójának szenzoros idegekre szelektív eliminálásával is igazolták, hogy a TRPV1 antagonisták idegi afferensek TRPV1 csatornáin keresztül váltanak ki hipertermiát²⁶⁵.

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^{39,266,267}. Tanulmányunk 2. kísérletében (67. ábra) 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 pelvicus ágai is ellátják^{268,269}. A splanchnicus idegek szintén expresszálnak TRPV1 csatornákat^{270,271}, amelynek expressziós szintje általában magasabb a splanchnicus afferenseken, mint a vagus afferenseken^{267,271}. A 3. kísérletünkben (67. ábra) azonban a nervus splanchnicus major kétoldali átmetszése sem befolyásolta az AMG0347 által kiváltott hipertermiát, annak ellenére, hogy a splanchnicotomia eredményességét funkcionálisan igazoltuk a mellékvesék stressz által indukált kortikoszteron termelésének blokkolásával splanchnicotomiát követően.



67. ábra: Patkányokban a TRPV1 antagonisták által kiváltott hipertermia feltételezett idegi útvonala a törzs vázizomzatának TRPV1 csatornáival kezdődik, áthalad a gerincvelő DLF-en, és egy ismeretlen gerincvelői vagy agytörzsi helyen csatlakozik a termogenezist szabályozó, már ismert LPB-rRPa útvonalhoz. A saját kísérleteink által elvetett alternatív útvonalakat piros színnel jelöltük. Minden kísérletnél feltüntettük a tanulmányunkban vizsgált útvonalat vagy útvonalrészletet¹⁶⁴.

A vagotomiával és a splanchnicotomiával ellentétben a laterális funiculus dorzális részének kétoldali átvágása a gerincvelő C1 szintjén csökkentette az i.v. AMG0347-re adott hipertermiás válasz mértékét (67. ábra, 4. kísérlet), 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 hatására²⁶⁵. Számos állatfajban mind a zsigeri, mind pedig a szomatikus fájdalmas és fájdalomtalan szignálok a spinothalamicus és spinoparabrachialis idegpályák laterális funiculusában haladnak^{240,272,273}. Ezek közé tartoznak a törzsből és a végtagokból érkező hőmérsékleti jelek is^{240,274-276}. A nyaki gerincvelő DLF sérüléseiről kimutatták, hogy macskákban termoszenzoros hiányosságokat eredményez^{277,278}, patkányokban pedig károsítja a hidegkerülő viselkedési válaszokat²⁷⁹. Tekintvén, hogy a major splanchnicus ideg kétoldali átmetszése nem befolyásolta az AMG0347-re adott hipertermiás választ (3. kísérlet), 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^{280,281}. 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 haladva²⁸².

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-rostok²⁸³, amelyek felszálló pályái a gerincvelői DLF-ben futnak²⁸⁴. Megerőltető testmozgás során az összehúzódó vázizmok metabolikus acidózist és hipertermiát okoznak, amelyek aktiválják a TRPV1 csatornákat²⁸⁵. Ha a hasfal izmai valóban a TRPV1 antagonisták hipertermiás hatásának támadáspontját képezik, akkor vizsgálatunk 1. kísérletében és korábbi vizsgálatokban^{62,263} az RTX alacsony dózisának 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 (67. ábra, 5. kísérlet). 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 vazokonstriktóját váltotta ki. Az érfali simaizomsejtekben expresszáldó TRPV1 csatornák fontos szerepet játszanak a rezisztenciaerek konstriktójának létrejöttében⁴⁸, de az érválaszban a perivascularis idegeken, köztük a C-rostokon jelenlévő TRPV1 csatornák is részt vesznek^{286,287}. 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 vázizomokban lévő TRPV1 csatornákra is. Vizsgálatunk többi eredményével együtt (67. ábra), mindez ahhoz a következtetéshez vezet, hogy a TRPV1 antagonisták valószínűleg a törzs izomzatának TRPV1 csatornáin hatva váltják ki a hipertermiás hatásukat.

Vizsgálatunk további részében (67. ábra, 6. kísérlet) azt is igazoltuk, hogy a muscimol LPB-be való beadása (a helyi neuronális aktivitás gátlására) blokkolta az i.v. AMG0347 hatására kialakuló barnazsír-szöveti termogenezist és hipertermiát (részletekért, lásd Garami és mtsai.¹⁶⁴). Továbbá, kimutattuk, hogy az AMG0347 i.v. beadása a c-Fos-pozitív sejtek számának jelentős növekedését váltotta ki az rRPa-ban, míg glicin (gátló aminosav neurotranszmitter) rRPa-ba történő beadása blokkolta az AMG0347 hatására kialakuló barnazsír-szöveti termogenezist és T_m emelkedést. Ezek az eredmények arra utalnak, 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 expresszáldó abdominális afferensek az autonóm hideg elleni védekezést szabályozó agyi idegpályákhoz csatlakoznak (67. ábra). Legvalószínűbbnek az tűnik, hogy a gerincvelő hátsó szarva vagy az LPB az a hely vagy helyek, ahol a TRPV1 csatornát expresszáldó 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 teljesítményt²⁸⁸ és halálos lehet³. A megerőltető fizikai aktivitás metabolikus acidózist is okoz, beleértve a kifejezett acidémiát²⁸⁹, ezáltal fokozza a TRPV1 csatorna protonok általi aktivációját a nagytömegű törzsizmokban, amelyekben sok a lassú, 1-es típusú izomrost, és amelyek részt vesznek a légzésben is³¹. 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 rágcsálókban (repurposing)¹⁶⁵. 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. Ezt a paradox megfigyelést több lehetőség is magyarázhatja. Először is, az AMG 517 termoregulatórikus hatásának időtartama eltérő lehet a plazmában mért felezési idejétől, ahogyan az más anyagok esetében is előfordult^{290,291}. Másodszor, az általános anesztetikumokról kimutatták, hogy gátolják az autonóm hideg elleni effektorokat

(barnazsír szöveti hőtermelés és bőr vazokonstrikció)^{292,293}, amely hatást ellensúlyozhat a gátlás alóli felszabadulásuk TRPV1 antagonisták által. Végül, bizonyos általános érzéstelenítők, mint például az izoflurán, bizonyítottan aktiválják a TRPV1 csatornát, ami deszenzitizációhoz vezethet²⁹⁴, így az AMG 517 nem képes kifejteni TRPV1 csatornát gátló hatását. Amennyiben a hipertermiás hatás hiánya az altatás utáni fázisban emberekben 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 emberekben is jelentkeznek-e. Figyelemre méltó azonban, hogy az AMG 517 mind rágcsálókban, mind pedig emberekben hipertermiát okoz (lásd fent és alább), ami arra utal, hogy a rágcsálókban megfigyelt, az altatás okozta hipotermiára gyakorolt hőszabályozási hatása nagy valószínűséggel érvényesül klinikai környezetben is.

Az anesztézia által indukált hipotermia TRPV1 antagonistával való kivédésének mechanizmusát felderítő kísérletek során mind a vazomotoros tónust, mind pedig a VO_2 -t vizsgáltuk. Éber állatokban a barnazsír szöveti termogenezis és a bőr vazokonstrikció voltak azok a mechanizmusok, amelyekkel a TRPV1 antagonisták hipertermiát váltottak ki⁶². Altatott állatokban az altatás okozta hipotermia TRPV1 antagonista általi kivédése szintén a termogenezis fokozódásával járt együtt. Megfigyeltük a fark T_b átmeneti emelkedését is, ami a vazomotoros tónus változására utal. Ez a hatás azonban kismértékű és rövid időtartamú volt, és valószínűleg a vazodilatáció T_m küszöbértékének ketamin általi lefelé tolódása okozhatta, ami önmagában nem volt elegendő az alkalmazott alacsony T_k vazokonstriktor hatásának leküzdéséhez. Az AMG 517 azonban fokozza a termogenezist^{64,70}, így a ketaminnal altatott patkányok T_m -e felfelé mozdult az AMG 517 kezelésben nem részesült, ketaminnal altatott kontrollokhöz képest, ezáltal átlépte a vazodilatáció kiváltásához szükséges T_m küszöbértékét.

Jövőbeli vizsgálatok segíthetnek annak megválaszolásában, hogy lehetséges-e a TRPV1 antagonisták klinikai gyakorlatba történő bevezetése. 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 egérmodelljeiben befolyásolják a mortalitást is életkortól függő módon (lásd 5.3.1.1. fejezet), amely arra utal, hogy alkalmazásuk műtétek során további előnyökkel járhat.

Összefoglalva, ezen vizsgálataink a TRPV1 antagonisták új alkalmazási lehetőségét mutatják be az altatás okozta hipotermia kezelésére. 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 embereken.

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 antagonistista megtervezése lenne, amely fájdalomcsillapítóként (vagy bármely más kívánt hatás tekintetében) megfelelő hatékonysággal rendelkezik, de nem okoz semmilyen nem kívánt testhőmérsékleti hatást, azaz hipo- vagy különösen hipertermiát. Tanulmányunk alapján a termális hatások valószínűleg minimálisak lesznek embereken 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 gátlói³¹. 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. Az ilyen aktivációs mód profilú terápiás szerek megtervezése egyértelműen a molekuláris farmakológia jelenlegi határait feszegeti. Mindazonáltal a TRPV1 csatornát érintő mutációk adatai alapján vannak arra utaló jelek, hogy ez lehetséges. A TRPV1 ortológokon végzett előzetes vizsgálatok azt mutatták, hogy a vanilloidokat kötő zsebben lévő részek mutációja (Tyr511Ala és Ser512Tyr) szelektíven megszünteti a kapszaicin iránti érzékenységet, miközben a hő és protonok iránt megmarad a nagy érzékenység⁵⁴. Hasonlóképpen, az egér TRPV1 pórusában lévő mutációk szelektíven megszüntetik a hő

általi aktivációt anélkül, hogy befolyásolná a kapszaicin általi aktivációt²⁹⁵, míg különböző, proximális mutációkról kimutatták, hogy szelektíven károsítják a protonok általi aktivációt³⁰. Nemrég a patkány TRPV1 csatorna véletlenszerű pásztázó mutagenézise több száz specifikus mutációt azonosított a TRPV1 fehérjében, amelyek vagy a kapszaicin vagy a hő általi szelektív aktiváció fenntartásáért felelősek, habár az nem világos, hogy ezek a mutációk hogyan befolyásolják a protonok általi aktivációt²⁹⁶. Összességében ezek az adatok azt bizonyítják, hogy a TRPV1 csatorna aktivációja legalább néhány inger-specifikus mechanizmusbeli különbséget mutat. Ezeknek a különbségeknek a kihasználása potenciálisan hasznos lehet a gyógyszerfejlesztés szempontjából. Valóban, több TRPV1 antagonistát szintetizáltak már különböző fokú aktivációs mód-szelektivitással (második generációs antagonisták), és néhányat már embereken is teszteltek (lásd 5.1.1.2.2. fejezet).

Ennek a megközelítésnek létezik azonban két fő akadálya. Először is, a jelenlegi ismereteink hiányosságai miatt a mód-szelektív TRPV1 antagonisták racionális megtervezése még mindig korai stádiumban van. Másodsor, lehet egy belső korlátja annak, hogy mennyire lehet blokkolni a TRPV1 csatorna általános aktivációját (terápiás célokra) anélkül, hogy a csatorna protonok és hőmérséklet általi aktiválását blokkolnánk (a hőszabályozási mellékhatások elkerülése érdekében). Ennek az alapvető korlátnak megfelelően a TRPV1 antagonistákkal végzett klinikai vizsgálatok sikertelenségének okai ma már mások, mint egy évtizeddel ezelőtt. A korai vizsgálatokat első generációs (nem mód-szelektív) antagonistákkal végezték, és ezek jellemzően a káros hipertermiás hatás miatt voltak sikertelenek; az AMG 517-tel végzett vizsgálat jól ismert példa erre⁶⁴. Ezzel szemben számos újabb vizsgálatot végeztek második generációs (mód-szelektív) TRPV1 antagonistákkal, és ezek közül néhány nem mutatta ki az elvárt szintű fájdalomcsillapító hatást; erre egy példa a NEO6860-nal végzett vizsgálat¹⁹⁵.

Míg a kívánt profillal rendelkező TRPV1 antagonisták racionális megtervezése továbbfejlődik, kevésbé hatékony eszközökkel is elérhetők ugyanazok az eredmények, mint például „véletlenszerű” szintézist követő *in vitro* farmakológiai szűréssel. A publikált adatok alapján több termálisan semleges, mód-szelektív TRPV1 antagonista esetén is fontolóra vették a gyógyszergyártó cégek a további fejlesztést, köztük az A-1165442 és az A-1115760 az Abbott Laboratories, illetve AbbVie által^{264,297}, az AS1928370 (ASP8370) az Astellas Pharma által^{298,299} és a NEO6860 a NEOMED Institute által^{195,300}.

6.1.2. A TRPM8 ioncsatorna

A TRPM8 csatorna hidegszenzor szerepének vizsgálata során egy szelektív és erős TRPM8 antagonistá fiziológiai hatásainak felderítésével (és a támadásponton kívüli hatás kizárásával *Trpm8*^{-/-} egereken végzett kísérletekkel) kimutattuk, hogy a T_m függ a bőr TRPM8 csatornáiról érkező hideg szignáloktól¹⁶⁶. Eredményeink azt sugallják, hogy a TRPM8 csatorna univerzális hidegszenzorként funkcionál a bőrben, olyan értelemben, hogy szabályozza az összes fő hideg elleni védekező mechanizmust (legalábbis rágsálókban): a hidegkerülő viselkedést, a farokbőr vazokonstriktóját és a barnaszírszöveti 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^{301,302}, és hogy a T_b -i szignálok jelentősen hozzájárulnak a legtöbb termoeffektor szabályozásához³⁰³⁻³⁰⁵. Mindezek alapján egy olyan kép körvonalazódik, amely szerint az idegek végződéseinek és axonjain található TRPM8 csatornák a bőrben sűrű hálózatot alkotnak, amely fájdalomtalan hidegingerekre aktiválódik, így szabályozza több autonóm és viselkedési termoeffektor aktivitását. Tajino és mtsai.³⁰⁶ által a *Trpm8*^{-/-} egerekben leírt megváltozott termoeffektor válaszok is alátámasztják azt a következtetésünket, hogy a TRPM8 csatorna részt vesz mind a viselkedési, mind pedig az autonóm termoeffektorok szabályozásában.

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. Knowlton és mtsai.³⁰⁷ is 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 -tól, 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 6.1.1. fejezet). 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^{308,309}. 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 vizsgáltuk¹⁶⁷.

Kísérleteinkben KO egerek alkalmazásával kimutattuk, hogy a *Trpa1* deléciója nem befolyásolja sem a T_m hideggel szembeni védelmét, sem pedig az autonóm termoeffektorok (farokbőr vazokonstrikció és termogenezis) 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), még akkor is, ha az *in vivo* küszöb néhány fokkal eltér az *in vitro* meghatározott 17°C-os küszöbértéktől⁹³. Ez arra utal, hogy egerekben a TRPA1 csatornák nem kontrollálják a hideg elleni védekezés autonóm termoeffektorait. A KO egerekben végzett vizsgálatunk azonban nem tért ki a TRPA1 csatorna krónikus hiányának lehetséges strukturális vagy funkcionális kompenzációra, amely kialakulhat genetikailag módosított állatokban. Az ilyen jellegű lehetséges kompenzáció 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, amelyekben a krónikus kompenzáció lehetősége nem merülhetett fel, 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. Először is, két, kémiaiilag eltérő TRPA1 antagonistát használtunk. Másodszor, az egyik antagonistá esetében alkalmazott dózis (30 mg/kg, i.g.) bizonyítottan hatékony volt a TRPA1 csatorna által mediált fájdalomválaszok blokkolásában ugyanebben a fajban¹⁰⁶. Harmadszor, a hidegben fellépő bőr vazokonstrikció miatt előfordulhat, hogy a normál esetben hatásos anyagok nem érik el a bőrben lévő célpontjaikat hidegexpozíció során¹⁶⁶. Ennek elkerülése érdekében a TRPA1 antagonistákat meleg környezetben adtuk be, amikor a bőrben vazodilatáció állt fenn, amit a regisztrált magas T_b jelzett. Az állatokat csak akkor tettük ki a hideghatásnak, amikor a beadott anyagok már 30 percig keringhettek a bőrben. Negyedszer, közvetlenül is megmértük mindkét anyag szintjét a vérplazmában, és azt találtuk, hogy még a kísérlet

végén is mindkét TRPA1 antagonistá olyan koncentrációban volt jelen, amely nagyságrenddel meghaladta az IC₅₀ értékét. Ötödször, folyamatosan regisztráltuk a T_b-t, ezzel megerősítettük, hogy a kísérlet során a hőmérséklet jelentősen (~13°C-kal) a TRPA1 csatorna 17°C-os aktivációs küszöbe alatt volt (legalábbis a farokban). Végül, azt is igazoltuk, hogy az általunk használt kísérleti elrendezés megfelelő volt ahhoz, hogy a hőszabályozási rendszer által használt T_b-i szignálok érzékelésének hiányát kimutassuk. Amikor a TRPA1 csatorna helyett a TRPM8 csatornát (a bőr igazolt hidegszenzorát) gátoltuk AMG2850-nel, egy hatékony TRPM8 antagonistával^{217,310}, a patkányok nem tudták fenntartani normál T_m-üket a hideghatás során ugyanebben a kísérleti elrendezésben. Előbbiek alapján megalapozottnak látszik az a következtetésünk, hogy rágcsálókban a TRPA1 csatorna nem tartozik a termoregulációs rendszer testfelszíni hidegszenzorai közé.

Az azonban egyértelműnek látszik, hogy a TRPA1 csatornák részt vesznek a kémiai irritánsokra adott nocifenzív válaszokban³¹¹, amit saját kísérleteink is alátámasztanak azzal, hogy a *Trpa1* gén deléciója egerekben mérsékelte a mustárolajra adott fájdalomválaszt. Nincs azonban konszenzus abban a tekintetben, hogy rágcsálókban a TRPA1 csatorna a nocifenzív válaszok hidegszenzoraként funkcionál-e, illetve, hogy egyáltalán aktiválható-e hideggel ahogy többen feltételezik^{93,103-105,109} vagy nem aktiválható, ahogy sokan mások vélik^{98,103,106-108}. Doerner és mtsai.³¹² kimutatták, hogy a kalcium közvetlenül megnyithatja a TRPA1 csatornát, Zurborg és mtsai.³¹³ pedig azt találták, hogy a TRPA1 csatorna hideg általi aktivációja közvetett módon jön létre és nem fiziológias, hanem megnövekedett kalcium beáramlásán keresztül történik. A hideg általi direkt aktiváció lehetőségét azonban alátámasztották Sawada és mtsai.³¹⁴, valamint legalább két másik csoport is, akik beszámoltak a TRPA1 csatorna hideg általi aktivációjáról kalciummentes közegben^{103,104}. Továbbá, legalábbis rovarokban, a TRPA1 csatornának több izoformája létezik, amelyek közül néhány termoszenzitív (melegérzékeny), míg mások nem^{315,316}. Például a muslicák antennáinak TRPA1 csatornáinak nem játszanak jelentős szerepet a meleg érzékelésében³¹⁷. A zebrahalak TRPA1 csatornáinak szintén nem rendelkeznek termoszenzor funkcióval³¹⁸. Még az emlősök TRPA1 fehérjéi között is faji különbségek bonyolíthatják tovább a kérdést³¹⁹. Például a heterológ módon expresszált egér TRPA1 csatorna aktiválható fájdalommal hideghatással^{93,104,314}, ellenben a humán TRPA1 csatorna nem¹⁰⁷. 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 (lásd 6.1.1. fejezet). A TRPV1 és a TRPA1 koexpresszálódik a polimodális nociceptorokon³²⁰, 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. Bármelyik forráskönyv is az igazság, a TRPA1 csatornákat rágcsálókban a hőszabályozási rendszer nem használja termoszenzorként, még súlyos hideghatásnak való kitétel 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 bír¹⁶⁸.

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^{112,321} és $NaHS$ beadása¹¹³ esetén kialakuló hipotermiát leíró korábbi közleményekkel, ugyanakkor ellentmondanak más szerzők eredményeinek, amelyek szerint a centrálisan beadott Na_2S -nek nincs jelentős hőszabályozási hatása^{322,323}. Az Na_2S -sel kapott eredmények közötti ellentmondás magyarázata lehet, hogy a korábbi kísérletekben az Na_2S -t alacsony dózisban adták be i.c.v. (870-1000 nmol/kg)³²² vagy a medulláris raphe-ba (0,7-0,8 nmol/kg)³²³, míg a mi vizsgálatunkban a dózisok 6,4 és 12,8 $\mu\text{mol/kg}$ voltak, és ezek közül az alacsonyabb dózisnak csak mérsékelt hőszabályozási hatása volt. Valószínűsíthető, hogy a korábbi vizsgálatokban az Na_2S -t a termoregulatórikus hatások kiváltásához szükséges küszöbérték alatti koncentrációban adták be. Ezzel összhangban az $NaHS$ szintén hipotermiát okozott, amikor 18-72 $\mu\text{mol/kg/h}$ sebességgel infundálták 4 órán keresztül¹¹³. Az eltérő eredmények másik lehetséges oka lehet, hogy míg saját kísérleteinkben egereket használtunk, az említett korábbi vizsgálatokat patkányokban végezték^{322,323}, ami felveti annak lehetőségét, hogy a centrális H_2S termoregulatórikus

hatása egerek és patkányok esetében eltérő. Ezt alátámasztani látszik, hogy a hipotermizáló hatás hiányáról nagyobb (nem rágcsló) állatfajok esetében is beszámoltak különböző kutatócsoportok^{116,117}.

Ezután kimutattuk, hogy a hipotermiás kísérletekhez hasonló módon (1 mg/kg i.c.v.) beadott Na₂S növelte a vér perfúzióját is a törzs bőrében (lumbális háti régióban). A bőr vazodilatációja autonóm hőszabályozási válasz, amely a környezet felé történő fokozott hőleadás révén a T_m csökkentését (vagy emelkedésének megakadályozását) vonja maga után⁵. Kistestű rágcslókban a szőr nélküli testrészek (például a fark és a mancsok) a test és a környezet közötti hőcsere legfontosabb régiói⁴. Kísérleteinket altatott egerekben végeztük, amelyeket olyan melegítőpárnára helyeztünk, amely érintkezett az állatok hasi felszínével, beleértve farkukat és végtagjaikat, ezért a melegítés befolyásolhatta a H₂S által indukált véráramlási válaszokat ezekben a testrészekben. Ezzel szemben az alkalmazott melegítésnek minimális helyi hatása volt a bőr érrendszerére a hát alsó részében, ezért vizsgáltuk a H₂S vérátáramlásra gyakorolt hatását ebben a régióban. A törzs vérperfúziójának meghatározását indokolja az is, hogy egereknél a törzs nagyobb mértékben járul hozzá a teljes test hőleadásához, mint patkányoknál, és valószínű, hogy egereknél a teljes hőveszteség legnagyobb hányada a test törzséből származik³²⁴. A bőr vazodilatációjának bizonyítása – a csökkent termogenezis mellett – a H₂S által kiváltott hipotermiában arra utal, hogy a H₂S két különböző efferens termoeffektor idegpályára hat, vagy olyan neuronokra, amelyek ezeknek a termoeffektor pályáknak a közös afferens vagy efferens részében helyezkednek el. Elméletileg szóba jöhet a H₂S közvetlen hatása az erekre és a barnazsír szövetre is, de ez a lehetőség kevésbé valószínű, mivel kísérleteinkben az Na₂S nagy dózissal (az i.c.v. hatásos dózissal tízszer nagyobb) szisztémás (i.p.) beadása nem volt hatással a T_m-re, ami a termoregulatórikus hatások centrális (agyban található) kiváltási helyére utal.

Annak ellenére, hogy az Na₂S-t tisztább H₂S donornak tekintik, mint az NaHS-t, mindkét anyag azonnali, nagymértékű H₂S felszabadulást okoz, ami megkérdőjelezheti hatásuk élettani jelentőségét³²⁵. Ezért megvizsgáltuk a GYY4137, egy nagyon lassú H₂S felszabaduláshoz vezető donor³²⁶, hőszabályozási hatását is. Ezt az anyagot többször használták már korábban a H₂S valódi fiziológiai funkcióinak tanulmányozására különböző kísérleti modellekben³²⁵. A GYY4137 i.c.v. beadása az Na₂S-hez hasonlóan hipotermiát és hipometabolizmust okozott az egerekben. A válasz dinamikája azonban eltérő volt, mivel mind a VO₂, mind pedig a T_m csökkenése lassabban, de kifejezettebb

mértékben alakult ki, mint Na₂S esetében. A hipotermia dinamikájának különbsége GYY4137 és Na₂S között összhangban van a H₂S felszabadulás különböző mértékével.

Végül a H₂S által indukált hipotermia molekuláris célpontját is vizsgáltuk. A H₂S TRPA1 csatornára gyakorolt hatását számos kísérleti modellben igazolták¹¹⁸, de eddig ismeretlen volt, hogy a TRPA1 csatorna szerepet játszik-e a H₂S hipotermizáló hatásának kialakulásában. Ennek felderítésére, megvizsgáltuk a H₂S donorokra (Na₂S 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. Mivel a TRPA1 fehérje elleni kereskedelmi forgalomban kapható különböző antitestek esetében nem specifikus kötődést is kimutattak^{221,327}, ezért a csatorna mRNS szintű transzkripcióját vizsgáltuk az egerek hipotalamuszában, vagyis abban az agyi régióban, ahol az autonóm termoeffektor idegpályák neuronjai nagyszámban megtalálhatók²⁴⁰. RNAscope segítségével kimutattunk néhány *Trpa1* mRNS transzkriptumot az autonóm termoeffektor pályákban valamennyi vizsgált agyi magban. A *Trpa1* mRNS alacsony mértékű expressziója a vizsgált termoregulatórikus agyi struktúrákban arra is utalhatna, hogy ezek a neuronok elhanyagolható szerepet játszanak a H₂S hatásában, de meg kell jegyeznünk, hogy az mRNS expresszió nem feltétlenül korrelál a fehérje translációs rátával, hiszen az alacsony mRNS expresszió magas fehérjeszinthez is társulhat, amint azt különböző vizsgálatokban kimutatták^{328,329}. Fontos, hogy alacsony mRNS expressziója ellenére a TRPA1 csatornáról úgy gondolják, hogy kritikus élettani funkciókat tölt be különböző szövetekben³²⁸⁻³³¹. A TRPA1 csatornához hasonlóan egy másik termo-TRP csatornáról, a TRPV3-ról is kimutatták, hogy a vagális afferens neuronokban hozzájárul bizonyos neurofiziológiai funkciókhoz annak ellenére, hogy mRNS szinten mennyisége alacsony³³². Azt is meg kell említeni, hogy a TRPA1 fehérje szintje a fehérje élettartamának szabályozásán keresztül befolyásolható az ubikvitinációs státuszának modulálásával³²⁹. Ez azt eredményezheti, hogy a *Trpa1* mRNS alacsony mennyisége ellenére is funkcionális TRPA1 fehérjék lehetnek jelen a neuronokban. A TRPA1 csatornának az ubikvitin-hidroláz fehérje CYLD általi de-ubikvitinációja növeli a TRPA1 fehérjék celluláris poolját³²⁹, és a CYLD

expressziója kimutatható egerek különböző agyi régióiban, beleértve a hipotalamuszt is³³³. 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 termoregulatórikus pályák neuronjaihoz futó összeköttetéseiken keresztül modulálják a termoeffektorok aktivitását. E forgatókönyv alátámasztására a TRPA1 csatorna fiziológiai funkcióját kimutatták a szomatoszenzoros kéregben³³⁴, a hippocampusban^{331,334}, valamint a szupraoptikus magban és a nukleusz szolitariuszban^{335,336}, amely agyi régiók részt vesznek a T_m szabályozásában is^{240,305,337}.

Összefoglalva tehát kimutattuk, hogy a H₂S-t gyorsan és lassan felszabadító donorok hipotermiát okoznak, amelyet csökkent hőtermelés és fokozott bőr vazodilatáció hoz létre. A hipotermiás és hipometabolikus hatások a központi idegrendszerből válhatnak ki, és mindkettő jelentősen csökkent mértékű a TRPA1 csatorna hiányában. A H₂S által kiváltott hipotermia molekuláris támadáspontjai feltehetően az autonóm termoeffektor idegpályák hipotalamikus neuronjain található TRPA1 csatornák. Eredményeink rávilágítanak a centrális TRPA1 csatornák által közvetített H₂S jelátvitel fontosságára a termoregulációban. A szisztémás gyulladás súlyos formáiban (például szeptikus sokk), amelyek gyakran járnak hipotermiával¹²⁸ és fokozott H₂S termeléssel^{325,338}, a TRPA1 és a H₂S közötti interakció döntő szerepet játszhat a termoregulatórikus válasz kialakulásában, perspektívaként pedig terápiás célpontként szolgálhat. Továbbá, a centrális TRPA1 csatornák H₂S általi aktivációja új utakat nyithat a hipotermia kontrollált indukciójának és fenntartásának kifejtéséhez, de jövőbeli kutatásokra van szükség ahhoz, hogy feltárjuk a központi TRPA1-H₂S interakció valódi termofarmakológiai jelentőségét egészségben és betegségben.

6.2. Termo-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 szabályozzák¹⁶⁹.

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. A *Trpv1*^{-/-} egerekben végzett kísérleteink azonban felvetik a TRPV1 csatorna krónikus hiányának lehetséges strukturális vagy funkcionális kompenzációs lehetőségét. Ennek kizárása érdekében, második megközelítésünkben, farmakológiai gátlást alkalmaztunk a TRPV1 antagonistá, BCTC akut adásával genetikailag nem módosított egerekben. A BCTC olyan dózist alkalmaztunk (10^{-6} M), amely magasabb, mint az *in vitro* megállapított IC₅₀ értéke⁶, és amely hatásosnak bizonyult a kapszaicin által kiváltott vazomotoros válaszok *ex vivo* blokkolásában. A karotisz és farokbőr artériák BCTC-vel történő előkezelése a savas és bázikus hatásokra adott vazomotoros válaszok fokozódását eredményezte. A TRPV1 antagonistá által kiváltott savas és bázikus érhatások augmentációja a karotiszokban kifejezettebb volt, mint a farokbőr artériákban, ami szintén összhangban van a *Trpv1*^{-/-} egerekben talált eredményeinkkel. A TRPV1 csatorna farmakológiai blokkolásával kapott eredményeink megerősítik a TRPV1 csatorna limitáló szerepét a pH változások által indukált vazomotoros válaszokban, valamint a válaszok TRPV1 csatorna által közvetített kifejezettebb gátlását a centrális (karotisz) erekben a perifériás (farokbőr) artériákhoz képest.

Bár a sav-bázis változások érrendszeri hatásait már korábban is vizsgálták³³⁹⁻³⁴¹, és más tanulmányokban a TRPV1 csatorna savas és bázikus ingerek általi aktivációját is kimutatták^{17,342}, tudomásom szerint előttünk még nem végeztek olyan vizsgálatokat, amelyekben a TRPV1 csatorna szerepét vizsgálták volna a savi és bázikus ingerek különböző értípusokra gyakorolt hatásaiban. Komplex működési sajátosságai polimodális receptorként³⁴³, valamint diverz expressziója különböző érrendszeri struktúrákban, például az endotéliumban³⁴⁴, a simaizomzatban⁴⁶ és a perivaszkuláris neurális elemekben^{43,345}, a TRPV1 csatornát ideális jelöltté teszik az érrendszeri válaszok szabályozására fiziológias és patológias körülmények között. Ennek megfelelően, a TRPV1 csatorna ismert szerepet játszik exogén és endogén ligand agonistákra adott vazomotoros válaszok közvetítésében. Kapszaicinre adott válaszul például vazodilatációt

mutattak ki patkányok bőrében⁴⁸ és mezenterialis artériáiban³⁴⁶, míg más ereken, így patkányok vázizomzatában^{48,225} vagy kutyák mezenterialis és vese artériáiban³⁴⁷ vazokonstriktiót észleltek. Hasonló vazomotoros hatásokat találtak endogén TRPV1 agonistákkal is, mint például az AEA és a 20-hidroxi-eikozatetraénsav esetében^{348,349}. A ligand agonisták mellett a TRPV1 csatorna szerepét kimutatták a hő által kiváltott érrendszeri válaszok közvetítésében is³⁵⁰. Előbbieket kiegészítve, mi elsőként bizonyítottuk, hogy a TRPV1 csatorna limitáló szerepet játszik a sav általi vazorelaxáció és a bázis általi vazokonstriktió létrejöttében.

A *Trpv1*^{-/-} egerekkel és a BCTC-vel kapott eredmények szoros összhangban vannak egymással, de mivel mind a genetikai deléción, mind a farmakológiai gátlás a TRPV1 csatornák nem szelektív blokkolását eredményezi minden szövettípusban, ezek a megközelítések nem tették lehetővé, hogy különbséget tegyünk a neurális és nem-neurális TRPV1 csatorna populációk hozzájárulása között a pH változásai által indukált vazomotoros válaszok közvetítésében. Harmadik megközelítésünkben ezért 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^{225,226}. Ennek megfelelően a TRPV1 deszenzitizációt széles körben használták a neurális TRPV1 csatornák funkcionális károsodásának tanulmányozására kardiovaszkuláris mechanizmusokban^{48,225,226}, gyulladásos folyamatokban³⁵¹, hőszabályozásban (lásd 6.1.1. fejezet) és a testtömeg fenntartásában³⁵². 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 ingerlékenységet³⁵³, 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 expresszáldó TRPV1 csatornák kapszaicin általi aktivációja vazokonstriktióhoz vezetett, míg a neurális TRPV1 csatornáké vazodilatációt okozott egerekben⁴⁶ és patkányokban⁴⁸. Attól függően, hogy egy adott értípusban melyik TRPV1

csatorna populáció a domináns (neuronális vagy simaizomzati), a ligand általi aktiváció fiziológias hatása lehet vazodilatáció (például bőr artériákban) vagy vazokonstrikció (például vázizom artériákban)⁴⁸. Hasonló szövetspecifikus különbségeket figyeltünk meg a kapszaicinre adott válaszban a saját vizsgálatunkban is. Karotisz artériákban kapszaicin adása funkcionális TRPV1 csatornák jelenlétében konstrikciót okozott, amelyet nem befolyásolt a neurális TRPV1 RTX általi deszenzitizációja. Ezek az adatok összhangban vannak korábbi, vázizom artériákban végzett kísérletek eredményeivel^{48,225}. A karotisz artériákkal ellentétben a farokbőr artériák relaxációval reagáltak kapszaicinre, ami a neurális TRPV1 csatornák RTX előkezeléssel történő károsítása után jelentősen csökkent, összhangban a ligandok által kiváltott vazodilatáció neuronális TRPV1 csatornák általi közvetítésével^{48,354}. 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^{48,354}. Meg kell jegyezni, hogy a TRPV1 csatorna az endotélsejteken is kifejeződik, ahol kapszaicin általi direkt aktivációja vazodilatációt okozhat³⁴⁴. A kapszaicin ilyen közvetlen hatása az endoteliális TRPV1 csatornákra lehet az oka annak, hogy kísérleteinkben az RTX előkezelésen átesett egerek farokbőr artériáiban némi dilatáció megfigyelhető volt, bár ez jelentősen kisebb mértékű volt, mint vivóanyag 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, feltehetően a fiziológias pH tartományon belül, például a megváltozott szöveti anyagcsere miatt. 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. E hipotézist támaszthatja alá, hogy a hőszabályozó szövetek ereiben a TRPV1 csatorna expressziós mintázata eltér más szervekétől egerekben⁴⁶ és patkányokban⁴⁸.

Összefoglalva, tanulmányunkban 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 pH változásokra adott válaszként a létfontosságú szerveket ellátó erekben. Feltételezzük, hogy a neurális struktúrákon expresszáldó TRPV1 csatornák kulcsszerepet játszanak a bázisok által indukált vazokonstriktio szabályozásában, míg az érfal nem-neurális elemein található TRPV1 csatornák elsősorban a savak által indukált relaxációt szabályozzák. A TRPV1 csatorna ilyen korlátozó funkciója nagy jelentőségű lehet a szöveti perfúzió szabályozásában, amikor a szisztémás (vér) vagy lokális (szöveti) pH megváltozik, például fizikai terhelés, gyulladás, légzési elégtelenség, veseelégtelenség vagy anyagcserezavarok esetén.

A fentiekben ismertetett kísérletek elvégzése során azzal a módszertani akadállyal szembesültünk, hogy az általunk használt miográf rendszer (részletekért lásd 4.1.6. fejezet) 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, amelyek segítségével a miográf rendszer alkalmas lehet hidegben (akár 13°C-os hőmérsékleten) is a vazomotor válaszok mérésére¹⁷⁰.

A testhőmérséklet változásai minden biológiai folyamatot befolyásolnak. A test köpenyének (bőr) hőmérséklete az aktuális T_k függvényében nagymértékben változik⁴. Külső hideghatásban a bőrszövet hőmérséklete a bőr artériáinak szűkülete miatt közel lehet az alacsony T_k -hoz. Ha a hideghatás extrém, akkor a hőmérséklet nemcsak a felszínen, hanem a test magjában is csökkenhet. A hideghez hasonlóan a súlyos szisztémás gyulladás (például súlyos szepszis) is járhat a T_m csökkenésével (hipotermiával), ami humán betegeknél magasabb halálozással jár (lásd 5.3.2.1. fejezet). Etiológiától függetlenül a csökkent szöveti hőmérséklet nagymértékben befolyásolja a biokémiai folyamatokat, ezáltal az érrendszeri reakciókat is. A van't Hoff-törvény szerint minden biokémiai folyamat minden 10°C-os emelkedéssel 2-3-szorosára gyorsul, bár ez csak leegyszerűsítése a jelenségnek³⁵⁵. A molekuláris funkciók hőmérséklet-érzékenysége a Q_{10} hőmérsékleti együtthatóval fejezhető ki (lásd 2.2. fejezet). A hőmérséklet változása minden ioncsatorna működését befolyásolja, általában ~2-3 Q_{10} értékkel; vannak azonban olyan csatornák, amelyeket a hőmérséklet direktben megnyithat, ezért kivételesen magas Q_{10} értékkel jellemezhetők³⁵⁶. A hőérzékeny TRPV1 csatorna esetében a Q_{10} értéke 40 a 41-50°C közötti hőmérsékleti tartományban³⁵⁶, míg a

hidegérzékeny TRPM8 csatorna esetében a számított Q_{10} érték 24 volt 18-25°C között³⁵⁷. Fontos, hogy mind a TRPV1 (lásd fent), mind a TRPM8 csatorna³⁵⁸ igazoltan szerepet játszik a bőr vaszkuláris válaszainak közvetítésében.

Az újonnan kifejlesztett hőcserélő eszközünk alkalmazását ezután teszteltük termofiziológiai kísérletekben is. Ennek érdekében kísérletsorozatot végeztünk patkányok izolált farokbőrének artériáin különböző hőmérsékleten. Kísérleteink során bizonyítottuk, hogy a kifejlesztett hőcserélő eszköz sikeresen használható a miográfiás rendszer tartozékeként a vízfürdő hűtésére és hőmérsékletének állandó szinten tartására, akár 13°C-on. Hidegben is ki tudtuk váltani az artériák konstrikióját, ezzel megerősítve az erek életképességét, valamint a rendszer alkalmasságát a vazomotor válaszok tanulmányozására 13-16°C-on. Fenilefrin, egy szimpatomimetikus gyógyszer, minden vizsgált hőmérsékleten (azaz 13, 16 és 36°C-on) vazokonstrikiót okozott. Vizsgáltuk a KCl-ra adott vazomotor választ is, amely közvetlenül depolarizálja a simaizomsejteket, ezáltal vezet vazokonstrikióhoz. A KCl 60 mmol/l koncentrációban 36°C-on érzékküvetet idézett elő, míg 13 és 16°C-on nem volt hatása. A KCl által kiváltott vazokonstrikió hiányát korábban is kimutatták hidegben, de nagyobb emlősökből, például kutyákból és sertésekből izolált arteriolákban. Feltételezték, hogy ez a kalcium- vagy kálium-homeosztázis hőmérsékletfüggésével áll kapcsolatban³⁵⁹⁻³⁶¹, de a pontos mechanizmus ismeretlen maradt. Alternatív magyarázatként említhető, hogy bizonyos fajoknál kimutatták a Na^+/K^+ ATP pumpa ATP-hez való csökkent affinitását 20°C alatt³⁶², 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. A Na^+/K^+ ATP pumpa hidegben való csökkent aktivitását alátámasztja, hogy amikor az elektrolit szinteket 2 órás hidegexpozíció után mérték kutyák artérioláiban, a nátrium intracelluláris koncentrációja szignifikánsan emelkedett, míg a káliumé csökkent³⁶³. Ezekben az esetekben 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 mmol/l-ről 90 mmol/l-re emeltük, hidegben is létrejött a KCl által kiváltott vazokonstrikió. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az újonnan kifejlesztett eszközünk alkalmas lehet a hideg által kiváltott vaszkuláris fiziológiai hatások mechanizmusainak vizsgálatára. A termo-TRP csatornák lehetséges részvétele ezekben a folyamatokban jövőbeni vizsgálatok tárgyát képezheti.

Összefoglalva, a 3D nyomtatással kifejlesztett hőcserélő eszköz, mint a miográf készülék tartozéka, lehetővé tette, hogy a kamrákat a szobahőmérséklet alá hűtsük és, hogy kimutassunk hőmérsékletfüggő különbségeket patkányok farokartériáinak különböző anyagok által kiváltott konstriktójában. Tudomásunk szerint mi vagyunk az elsők, akik beszámoltunk a hideg gátló hatásáról a KCl által kiváltott vazokonstriktóra izolált patkány farokartériákban. Az ismertetett kísérleti elrendezés új, széles körben hozzáférhető és gazdaságos kísérleti módszert jelenthet a hűtés vazomotor válaszokra gyakorolt hatásának tanulmányozására emlősökben.

6.3. Szisztémás gyulladásoz 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 gyulladásban játszott szerepét is vizsgáltuk¹⁷¹. Kimutattuk, hogy a TRPV1 csatorna fiatal rágcsálókban többszörösen bizonyított gyulladáscsökkentő szerepe^{364,365} az öregedéssel ellenkezőjére fordul. Míg a farmakológiai vagy genetikai TRPV1 csatorna gátlás csökkenti a túlélési arányt aszeptikus (LPS-indukálta) SIRS-ben fiatal egerekben, a TRPV1 blokádn mindkét típusa ellenkező hatást fejt ki öregedő egerekben. A TRPV1 csatorna gyulladásban 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 áll³⁶⁶. A TNF- α termelés TRPV1 csatornák általi szuppressziójának elvesztése idősebb állatokban a TRPV1 fehérje csökkent transzlációját és a perifériára történő kisebb mértékű transzportját tükrözheti³⁶⁷, valószínűleg a ganglionokat érő csökkenő neurotrófikus hatások miatt³⁶⁸. 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 szeptikus sokkot is³⁶⁹, továbbá intenzív osztályon ápoltn szeptikus betegek gyulladásoz citokinjeinek termelését befolyásolja a TNF- α genetikai polimorfizmusa³⁷⁰. A TRPV1 csatorna gyulladáscsökkentő szerepének életkorfüggő proinflammatórikusra változása tehát

valószínűleg – legalábbis részben – a TRPV1 csatorna TNF- α termelésre gyakorolt gátló hatásának ellenkezőjére fordulásával magyarázható. A TRPV1 csatorna gyulladáscsökkentő szerepének kísérleteinkben talált ellentétes (proinflammatorikus) szerepre változása egy újabb példa az öregedésnek a szisztémás gyulladás patobiológiájára gyakorolt sokrétű hatásaira^{371,372}.

A TRPV1 csatorna szisztémás gyulladásban 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 kapcsolatos 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 eredményezi¹⁷². 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 nem találtunk különbséget a PGE₂ által kiváltott lázválaszban a *Tacr1*^{+/+} és a *Tacr1*^{-/-} egerek között. Az LPS által kiváltott szérumszintek, illetve az egerek tüdő-, máj- és agyszövetében mért COX-2 mRNA expresszió szintén nem különbözött statisztikailag a genotípusok között. Az mRNA eredményekkel ellentétben, 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 lázban¹³⁹⁻¹⁴². Az SP antagonistái csökkentették az LPS-re adott lázválaszt patkányokban és tengerimalacokban, amely 45-90 perccel az LPS infúzió után volt kimutatható^{139,140}. 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

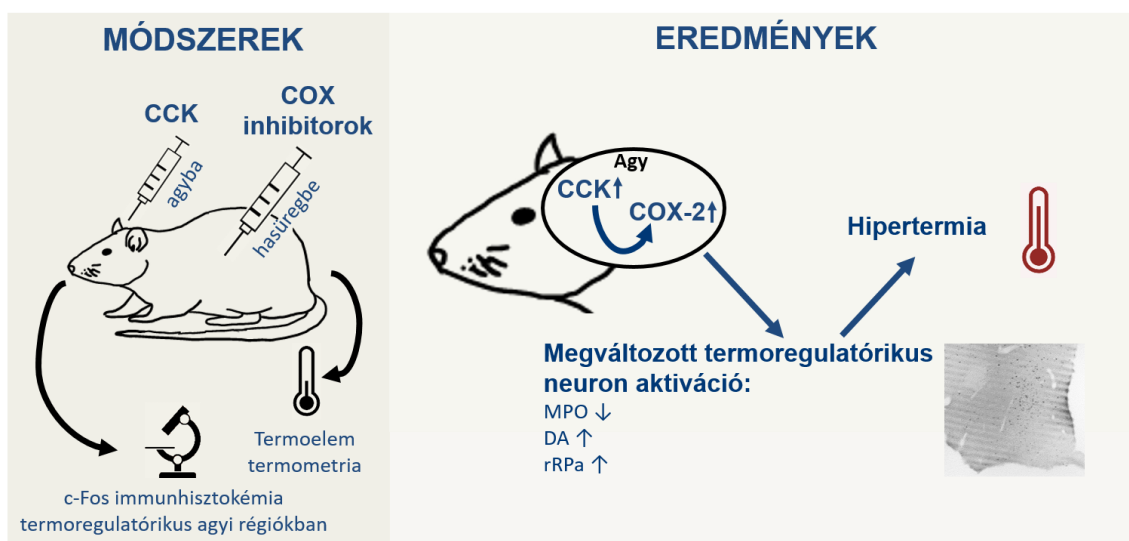
hipertermia miatt, hiányzott kísérleteikben¹⁴². Jelen vizsgálatban a kísérleteket olyan körülmények között végeztük (alapos habituáció, mérsékelt LPS dózis, stresszmentes anyagadás és közel termoneutrális T_k), amelyek lehetővé tették, hogy az LPS által kiváltott lázas állapotot az infúzió után a 40.-tól 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^{373,374}. A láz korai (kialakulási) fázisa azonban perifériás szervekből indul ki, például a tüdőből és a májból^{135,227}. 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. A perifériás SP jelátvitelről korábban kimutatták, hogy szerepet játszik a makrofágok pirogén citokintermelésének indukációjában³⁷⁵ és a pulmonális makrofágok aktivációjában³⁷⁶. Továbbá, égést követő akut tüdőszérülésben az SP fokozta a COX-2 aktivitást³⁷⁷. Az NK1 receptor makrofágok általi expressziója jól dokumentált^{378,379}, ugyanakkor számos más immunsejtben is kimutatták¹⁴³. Tehát, a lázválasz számos perifériás folyamatát befolyásolhatja az SP jelátvitel. Saját vizsgálatunkban nem találtunk különbséget a gyulladáshoz vezető citokinek (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. A harmadik fő proinflammatorikus citokin, az IL-1 β szintjét nem mértük, mivel kimutatták, hogy az NK1 receptortól függetlenül fejt ki pirogén hatását¹⁴². Az LPS a gyulladáshoz vezető citokinektől függetlenül is képes a COX-2 transzkripció és poszt-transzkripció modulációjára a makrofágokban³⁸⁰. 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 eredményekkel²²⁷. 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 gyenge³⁸¹, ráadásul a COX-2 expressziója nemcsak a transzkripció, hanem a poszt-transzkripció és a transláció szintjén is szabályozott^{380,382}. Ezért a COX-2 fehérje expresszióját is meghatároztuk az egerek tüdő-, máj- és agyszövetében. A COX-2 fehérje fokozott perifériás expresszióját bizonyító korábbi eredményekkel összhangban¹³⁵, 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 PGE₂ koncentráció emelkedést is okozott, ami a *Tacr1*^{-/-} egereknél hiányzott. A PGE származékok lázat kiváltó hatáspontja az organum vasculosum laminae terminalis és az annak környezetében lévő POA a hipotalamuszban³⁸³. A periférián termelődött PGE₂ 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 kialakulását³⁸⁴. Meg kell azonban azt is jegyezni, hogy a lázválasz jelátviteli mechanizmusait későbbi időpontokban tanulmányunkban nem vizsgáltuk, ezért nem zárható ki, hogy az NK1 receptor gátlása az agyban történő COX-2 expressziót és PGE₂ termelést is befolyásolhatja, különösen a láz későbbi (fenntartási) fázisában. Az NK1 receptor hiányában a PGE₂ LPS által kiváltott térbeli és időbeli eloszlásának kísérletes vizsgálata a plazmában, a liquorban és specifikus agyi régiókban jövőbeni vizsgálatok témája marad.

Eredményeink révén első alkalommal mutattuk ki, hogy a lázválasz kezdetén az NK1 receptor hozzájárul a COX-2 fehérje expressziójának fokozódásához a perifériás szervekben. Ezekkel összhangban a COX-2 fehérje expressziójának SP jelátvitel általi modulációját számos humán sejtvonalon kimutatták, beleértve polimorfonukleáris leukocitákat³⁸⁵, vastagbél epitélsejteket³⁸⁶ és endotélsejteket³⁸⁷. Annak pontos mechanizmusát, hogy az SP jelátvitel hogyan lép kölcsönhatásba a COX-2 expresszióval jövőbeni vizsgálatokban kell majd felderíteni. Új eredményeink tovább bővítik az SP jelátvitel és a „citokin–COX-2–PGE₂” 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 lázvásban¹⁷³, 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 (68. ábra).



68. ábra: A CCK–COX útvonalak termoregulatórikus interakciójára irányuló tanulmányunk vizsgálati módszereinek és legfontosabb eredményeinek sematikus összefoglalása¹⁷³.

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 függ³⁸⁸.

A centrális CCK hipertermizáló hatása már régóta ismert^{151,153}. Az is ismert, hogy a két fő autonóm hideg elleni effektort érinti: a bőr vazokonstriktóját és a nem-didergéses termogenezist¹⁵¹⁻¹⁵³. A CCK centrálisan indukált hipertermiás hatását a CCK₂ receptor közvetíti, ami ellentétben áll a CCK perifériás beadásakor CCK₁ receptorok által mediált

hipotermiás válasszal¹⁵¹. Egy nemrégiben végzett vizsgálatban kimutatták a CCK-t expresszálo neuronok jelentőségét az LPB-ben, ami arra utal, hogy ezek a neuronok részt vesznek a perifériáról a központi idegrendszerbe érkező afferens meleg szignálok továbbításában, és következésképpen a T_m emelkedését ellensúlyozó autonóm meleg elleni mechanizmusok aktiválásában³⁸⁹. Ezek az eredmények összhangban vannak a perifériásan beadott CCK testhőmérsékletet csökkentő hatásával, de nem magyarázzák a centrálisan beadott CCK hatására kialakuló hipertermia kialakulását. 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^{5,230,305}. 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 projekcióikon keresztül^{240,241}, amelyek a barnazsír szövet, illetve a bőr ereinek szimpatoadrenergikus szabályozását befolyásolják^{305,390}. Eredményeink arra utalnak, hogy a CCK csökkenti a GABAerg neuronok aktivitását az MPO-ban, és 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 közvetlen hatása magukon a neuronokon expresszált CCK_2 receptorokra. Ezt alátámasztani látszik, hogy CCK_2 receptorok megtalálhatók felnőtt patkányok hipotalamuszában is^{391,392}. A CCK receptorok szintje azonban alacsonyabb a preoptikus területen, mint más hipotalamusz régiókban³⁹³, és a CCK-immunreaktív neuronok jelenléte a periventrikuláris és paraventrikuláris hipotalamikus magokra korlátozódik, míg a különböző preoptikus struktúrákban csak kevés CCK-immunreaktív sejt található³⁹⁴. Továbbá, egy vizsgálatban nem sikerült kimutatni CCK_2 receptort az MPO-ban és a DMH-ban sem³⁹⁵. Ezért sokkal valószínűbb, hogy a CCK indirekt módon hat az efferens termoeffektor pályák hipotalamikus neuronjaira.

Korábban megfigyelték, hogy a PGE_1 és a CCK által indukált hipertermia fiziológiai mechanizmusai hasonlóak, mivel a termoeffektor mintázat mindkettőnél ugyanúgy függ a kezdeti testhőmérséklettől, és mindkét anyag a dózistól függő, de a kezdeti testhőmérséklettől független mértékben növeli a T_m -et¹⁵¹. Amikor ezeket a fenomenológiai megfigyeléseket tették, nem állt rendelkezésre információ arról, hogy a CCK részt vesz-e a láz mediálásában. Később a CCK jelátvitel és az arachidonsav

kaszkád között több kölcsönhatást is felfedeztek. A CCK₂ receptor CCK általi aktiválása különböző sejtkultúrákban arachidonsav termeléshez vezet^{396,397}, és több sejtvonalban kimutatták a COX-2 mRNS és fehérje expressziójának CCK₂ receptor által közvetített növekedését, majd PGE₂ szekrécióját^{398,399}. Ennek megfelelően a CCK jelátvitel hozzájárulását felvetették a láz kialakulásában (áttekintésért lásd Szelényi és mtsai.¹⁴⁹). A fentiekben ismertetett tanulmányunkban termofiziológiai és immunhisztokémiai bizonyítékot szolgáltatunk a CCK jelátvitel és a COX útvonal szoros kölcsönhatására. Először is kimutattuk, hogy a centrálisan (i.c.v.) beadott CCK hipertermiás hatása teljesen megszüntethető a COX enzimek nem-szelektív gátlása révén metamizollal (másik nevén dypironnal). Ezután kimutattuk, hogy ugyanez a gátlás megakadályozta a c-Fos expresszió CCK által kiváltott változásait is, amelyeket az efferens termoeffektor pályákon belüli neuronokban (azaz az MPO-ban, a DA-ban és az rRPa-ban) figyeltünk meg. Azt is megállapítottuk, hogy a COX-2 szelektív gátlása két különböző inhibitorral (meloxicammal és etoricoxibbal) gyakorlatilag 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 csaknem teljes (94-97%-os) COX gátlást vált ki⁴⁰⁰. Azt is fontos megjegyezni, hogy 120 mg/kg dózisban a metamizol blokkolta az LPS által kiváltott lázat, de önmagában nem volt hatással a testhőmérsékletre láztalan patkányokban, ellentétben a magasabb dózisokban (240-360 mg/kg) kifejtett hatásával, amelyeknél önmagában is hipotermiát okozott⁴⁰¹. Eredményeink ellentmondani látszanak Székely és mtsai.¹⁵³ korábbi adatainak, amelyek szerint 10 mg/kg indometacin, egy nem-szelektív COX inhibitor, szubkután előkezelésnek nem volt hatása az i.c.v. CCK-ra adott hipertermiás válaszra. Gamache és Ellis⁴⁰² azonban kimutatta, hogy amikor az indometacint 10 mg/kg-os dózisban i.p. adták be egereknek, az agyban nagyon alacsony volt a koncentrációja, és nem csökkentette az agyi gyulladást, bár a perifériás gyulladást hatékonyan elnyomta. Az indometacin (10 mg/kg; i.m.) nem befolyásolta az arachidonsav által kiváltott agyödémát egy másik, patkányokon végzett vizsgálatban sem⁴⁰³. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az indometacin Székely és mtsai.¹⁵³ vizsgálatában alkalmazott dózisa nem volt elegendően magas ahhoz, hogy hatékonyan blokkolja a COX enzimeket az agyban. Az indometacinnal ellentétben a metamizol metabolitjai az emberek cerebrospinális folyadékában megfelelő koncentrációban voltak jelen metamizol 14 mg/kg-os szájon át történő beadása után⁴⁰⁴. Metamizol metabolitok kimutatható szintjeit találtak egerek

agyában és gerincvelőjében is 2 nappal a metamizol ivóvízzel történő beadása után⁴⁰⁵, valamint patkányok hipotalamuszában és cerebrospinális folyadékában 0,25-8,5 órával metamizol 120 mg/kg-os i.p. beadása után⁴⁰⁶. A metamizolhoz hasonlóan a meloxicam⁴⁰⁷ és az etoricoxib⁴⁰⁸ esetében is kimutatták a vér-agy gáton való átjutást. Mindkét gyógyszer hatékonyabban 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 esetében⁴⁰⁹. Az a megállapításunk, hogy ez a két szelektív COX-2 inhibitor a metamizollal gyakorlatilag azonos módon kivédte a CCK által kiváltott hipertermia kialakulását, kizárja annak lehetőségét, hogy a metamizol általunk megfigyelt hatásai a COX útvonaltól függetlenek. Ezen túlmenően ezek az eredmények arra utalnak, 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, ami összhangban van korábbi eredményekkel, amelyeket egy másik CCK₂ antagonist¹⁵¹, valamint CCK₂ receptor KO egerek felhasználásával értek el¹⁵⁴. Adataink alátámasztják és ki is terjesztik a korábbi kutatások következtetéseit. Vizsgálatunkban az YM022-t használtuk, egy rendkívül szelektív és erős CCK₂ antagonistát (inhibitor konstansa 0,26 nM a CCK₂ receptorra és 270 nM a CCK₁ receptorra; IC₅₀ értéke 4 nM; patkány adatok alapján⁴¹⁰). Az YM022 a CCK₂ receptorok rendkívül hosszan tartó blokkolását okozza; egyszeri adag beadását követően napokig vagy akár hetekig biológiailag hatékony marad⁴¹¹. Amikor az YM022-t (0,01 mg/kg) patkányok agyába infundáltuk, a polifázisos LPS láz késői fázisát csillapította, de a korai fázist nem. Az LPS láz rövid ideig tartó korai (első) fázisa percekben belül kezdődik, és a perifériáról indul ki (lásd 2.3.3. fejezet). Mivel kísérletünkben az YM022 agyon belüli beadását alkalmaztuk, az antagonist valószínűleg nem érte el a perifériás célpontokat az első fázis kialakulásáig. Eredményeink kiegészítik Székely és mtsai.¹⁵³ munkáját, akik egy másik CCK₂ antagonistát, az L-365,260-at (inhibitor konstansa 40 nM a CCK₂ receptorra és 14 000 nM a CCK₁ receptorra⁴¹⁰) 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 kutyákban, majmokban és patkányokban csak néhány perc⁴¹². 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 választ¹⁵¹, a CCK valószínűleg a PGE termelését modulálja, nem pedig a PGE-nek a receptoraira gyakorolt hatását.

Gyulladásos stimuláció hatására PGE₂-t az agyban különböző sejttípusok termelhetnek, beleértve az endotélsejteket⁴¹³, a perivaszkuláris makrofágokat és mikrogliaikat⁴¹⁴, az asztrocitákat⁴¹⁵ és a neuronokat⁴¹⁶. E sejttípusok közül a CCK₂ receptor nagy mértékben expresszálódik az asztrocitákban^{417,418}, amelyek CCK-val történő stimulációja diacilglicerín-lipáz és foszfolipáz A₂ aktiválásán keresztül arachidonsav felszabadulásához vezet³⁹⁷. Ez a két enzim a COX-2-mediált PGE₂ szintézisben is részt vesz a szisztémás gyulladásra adott lázas válasz során¹³⁵. Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a COX-2–PGE₂ útvonal a CCK₂ receptor aktivációt követő mediátoraként működik, valószínűleg az asztrocitákban, de talán más sejttípusokban is. Ezzel a feltételezéssel összhangban, a COX-2-t a CCK₂ receptor aktivációját közvetítő későbbi mediátornak vélik epiteliális, fibroblaszt és adenokarcinóma sejtvonalakban⁴¹⁹.

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. A CCK centrális beadását követően az éhezés által kiváltott táplálékfelvétel csökkenését figyeltük meg korábbi eredményeknek megfelelően⁴²⁰. A VMH-ban, amely egy táplálkozással kapcsolatos, CCK₂ receptorokat expresszáló agyi régió¹⁴⁴, a CCK a c-Fos expresszió növekedését okozta, ami összhangban van korábbi eredményekkel, amelyek a VMH-ban megnövekedett neuronális aktivitást mutattak ki CCK *in vivo* i.c.v.⁴²⁰ vagy *in vitro* alkalmazását követően⁴²¹. Az, hogy a COX enzimek gátlása a jelen vizsgálatban nem befolyásolta a CCK által kiváltott jóllakottságot és c-Fos expressziót a VMH-ban azt jelzi, hogy a hipertermiás hatással ellentétben a CCK jóllakottsági hatása független a COX útvonaltól. A termális és jóllakottsági hatás COX-tól való eltérő függősége megkülönbözteti a CCK-ra adott válaszokat az LPS által kiváltott láztól és étvágytalanságtól, mivel mindkét utóbbi válasz a COX-2-től függ, még ha eltérő sejttípusokon keresztül is jönnek létre³⁸⁸. A CCK-hoz hasonlóan más anyagok esetében is leírtak egymástól eltérő hatásmechanizmusokat láz és anorexia hátterében, például Fortier és mtsai.⁴²² kimutatták, hogy 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.

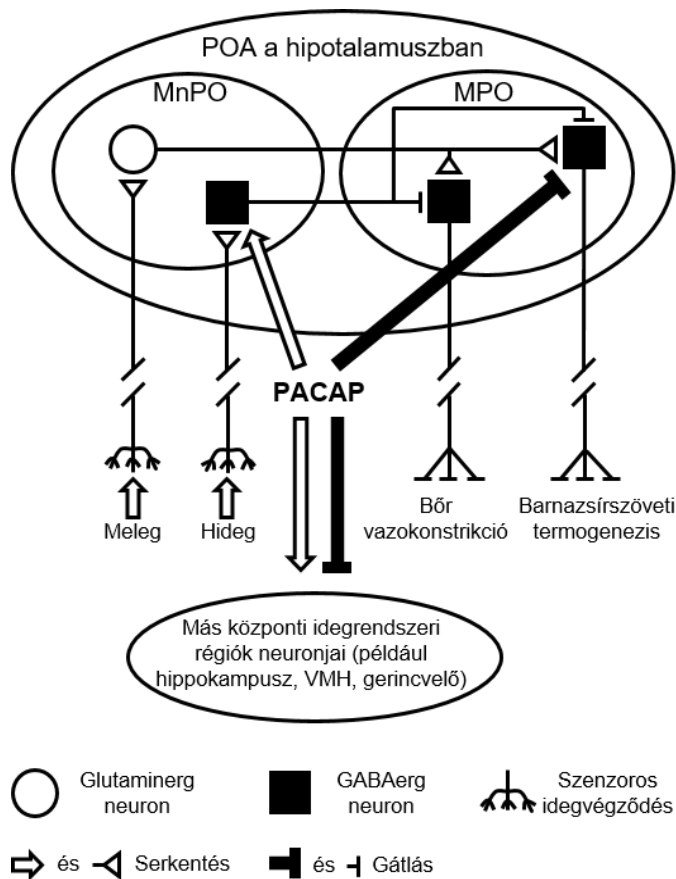
Összefoglalva, fentiekben ismertetett tanulmányunkban kimutattuk, hogy a centrális CCK-ra adott hipertermiás válasz a COX-2 útvonaltól függ, és hogy a központi CCK₂ receptorok részt vesznek az LPS által kiváltott láz fenntartásában. Ezek az eredmények elősegítik a CCK jelátvitel és az agyi COX útvonalak közötti kölcsönhatások megértését, 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 karakterizálni¹⁷⁴. Eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy a PACAP38 hipertermiás hatásában centrális (és nem perifériás) mechanizmusok játszanak szerepet. A PACAP38 által kiváltott hipertermiát korábban már vizsgálták rágszálókban, azonban az ezekből a kísérletekből rendelkezésre álló adatok alapján nem lehetett határozott következtetést levonni a PACAP38 hőszabályozási hatásának támadáspontjáról. A korábbi vizsgálatokban a PACAP38-at csak az agyba adták be^{158,159,233,234,237}, és ezzel kifejezett termoregulatórikus válaszokat váltottak ki, ami alapján centrális támadáspontra következtettek. Figyelembe véve azonban a hőszabályozó rendszer szerveződését, amely egymástól függetlenül működő termoeffektor hurkokból áll (lásd 2.1. fejezet), 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. Inglott és mtsai.²³⁷ például azt találták, hogy az intratekálisan beadott PACAP38 szimpatocitotórikus hatással bír még a gerincvelő átvágása után is, így a szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a hatás magából a gerincvelőből ered. A hőszabályozási rendszer funkcionális felépítése alapján azonban ezek az eredmények azzal is magyarázhatók, hogy a PACAP38 közvetlenül hat ugyanezen termoeffektor hurok efferens gerincvelői struktúráira (valószínűleg az intermediolaterális oszlopra), amelyek feljebb, az agyból is aktiválódhatnak i.c.v.^{233,234} vagy intrahipotalamikus infúzió hatására^{158,159}, és amelyek aktiválása az érintett neuronoknak a hurokban való elhelyezkedésétől függetlenül azonos hatásokat eredményez. A perifériás támadáspontot alátámaszthatja, hogy a PACAP38 és receptora széles körben expresszálódik a perifériás szenzoros neuronokon (áttekintésért lásd Vaudry és mtsai.⁴²³) és az enterális idegrendszerben⁴²⁴. 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 tulajdonítható⁴²⁵. 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, amely a vivőanyaggal kezelt állatokban is jelen volt, elfedte a vizsgálni kívánt válasz korai szakaszát. Megállapítottuk, hogy a PACAP38 adagolása a két fő autonóm hideg elleni termoeffektor, vagyis a nem-dideregéses termogenezis és a bőr vazokonstrikciónak 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 vazokonstrikción termoregulatórikus idegpályáinak közös neuronjain, például az MnPO-ban⁴²⁶ (69. ábra). Ezt a hipotézist alátámasztja, hogy a PAC1 receptor, amelyről kimutatták, hogy részt vesz a PACAP38 hipertermiás hatásának közvetítésében¹⁵⁹, bőségesen expresszálódik a POA MnPO régiójában⁴²⁷, ahol az autonóm hideg elleni termoeffektorokat szabályzó GABAerg neuronok is találhatóak²⁴⁰. Resch és mtsai.^{158,159} feltételezték, hogy a PACAP38 hipertermiás és hipermetabolikus hatásait a VMH és esetleg az LPB neuronjai közvetítik. Hipotézisünk ezekkel az elképzelésekkel is összhangban van, mivel a hideg által aktivált idegpályában az LPB-ből származó glutaminerg neuronok az MnPO-ban lévő GABAerg neuronokhoz projektálnak²⁴⁰, amelyek viszont a VMH neuronjaihoz is kapcsolódnak⁴²⁸.



69. ábra: A PACAP hőszabályozási rendszerre gyakorolt feltételezett hatásainak sematikus ábrázolása. Az exogén PACAP beadása a hipotalamuszban a POA MnPO GABAerg neuronjait aktiválja, ami bőr vazokonstriktióhoz és barnazsírszöveti termogenezishez vezet, ezáltal (lázhoz hasonló) hipertermiát hoz létre. Az endogén PACAP folyamatosan szuppresszálja az MPO GABAerg neuronjainak aktivációs szintjét, amelyek gátolják a barnazsírszöveti termogenezist. Ha az endogén PACAP hiányzik, az eredmény hipometabolizmus. A központi idegrendszer más területei, például a hippokampusz, a VMH és a gerincvelő neuronjai szintén befolyásolhatják a PACAP termoregulatórikus hatásait⁴²⁶.

Figyelembe véve a PACAP termális hatásai 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, de a PACAP által indukált hipertermia COX enzimektől való függése²³³ és a PACAP hiányban megváltozott mértékű proinflammatórikus citokin (IL-6) termelés⁴²⁹ alátámasztja a PACAP, mint pirogén mediátor azonosítását.

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 kontrollokhoz képest. Míg a *Pacap*^{-/-} egerek hiperaktivitását

egy korábbi vizsgálatban is megfigyelték²³⁸, 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 korrelál⁸⁸. 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 termogenezist²⁴¹, feltételezzük, hogy a *Pacap*^{-/-} egerekben a gátló MPO neuronok aktivitása jobban felerősödik, ez pedig a termogenezis fokozott szuppresszióját eredményezi⁴²⁶ (69. ábra). 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, ami emelkedett hőtermeléshez és hipertermia kialakulásához vezet. Feltételezhető, hogy a PACAP38 hiánya alacsonyabb nyugalmi anyagcserét (és T_m -et) eredményez, és a hipometabolizmus kompenzációs mechanizmusaként a *Pacap*^{-/-} egerek hiperkinetikussá válnak a normál (vagy akár magasabb) T_m fenntartása érdekében. Érdekes módon hasonlóan megváltozott termoeffektor mintázatot (hipometabolizmus és hiperkinézis) figyeltünk meg a *Trpv1* KO egerekkel végzett vizsgálatunkban is (lásd 6.1.1. fejezet). A PACAP és a TRPV1 hiány hasonló termoregulatórikus következményeinek hátterében feltehetően ugyanazon idegi pályák aktivitásának megváltozása állhat, hiszen a kapszaicin-érzékeny (azaz TRPV1 csatornát expresszáló) neuronokból aktivációjuk hatására PACAP38 is felszabadulhat¹⁵⁷.

Összefoglalva, egy célirányos, összehasonlító vizsgálatban kimutattuk, hogy a PACAP38 a központi idegrendszeren belüli támadáspontokon hatva okoz hipertermiát. A PACAP38 által kiváltott hipertermia a két autonóm hideg elleni effektor egyidejű aktiválásával jön létre: a nem-didergéses termogenezis és a bőr vazokonstriktio fokozásával. Feltételezzük, hogy az MnPO-n belüli GABAerg neuronok részt vesznek a PACAP38-ra adott hőszabályozási válasz közvetítésében. A PACAP hiánya szabadon mozgó *Pacap*^{-/-} egerekben hiperkinézist és nappali hipertermiát eredményez egyelőre tisztázatlan mechanizmusok révén, de a TRPV1 csatorna részvétele gyanítható. A

fokozott lokomotoros aktivitás feltehetően kompenzációs mechanizmusa annak a hipometabolizmusnak és hipotermiának, amely nyugalmi körülmények között PACAP hiányában kialakul.

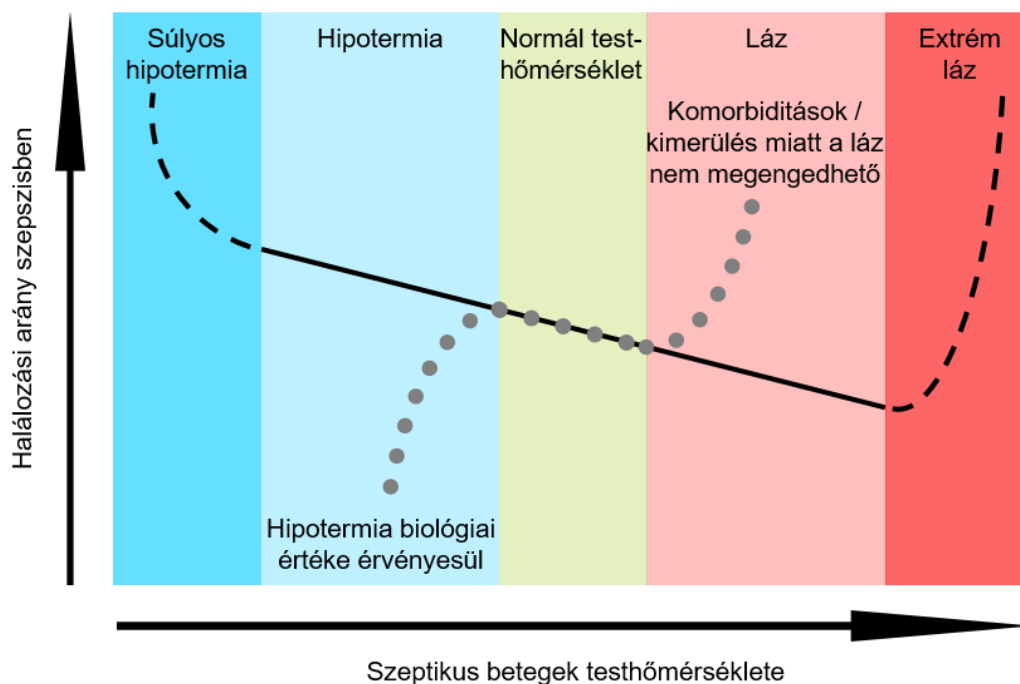
6.3.2. *A testhőmérsékleti eltérések jelentősége szisztémás gyulladásban humán betegeknél*

Alapkutatási 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 vizsgáltuk a T_m eltérései és a halálozás közötti összefüggést¹⁶⁰. Megállapítottuk, hogy a lázas szeptikus betegeknél a becsült halálozási arány ~22% volt, a normotermiás betegeknél magasabb (~31%), míg a hipotermiás betegeknél 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%) betegeknél. Metaanalízisünk eredményei egyértelműen 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 (70. ábra). 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 válaszreakcióját jelenti a kialakuló betegséggel szemben^{128,430}. Tényezői mind arra irányulnak, hogy harcba szálljanak a fertőző ágenssel szemben. Klinikailag az ebben a fázisban lévő betegek lázasak, nyugtalanok, túlérzékenyek fényel, zajokkal szemben. Ez a fajta adaptáció energetikailag megterhelő a szervezet számára. Egy rövid ideig tartó, enyhe fertőzést (például megfázás) gyakran csak a betegség szindróma ezen korai fázisa jellemzi. A fertőzést megelőzően jó állapotú, egészséges betegnél a láz ilyenkor előreláthatóan előnyös (70. ábra). Ezzel szemben a láz előnyös hatását veszélyeztetheti egy már meglévő vagy éppen kialakuló energiahiány olyan betegek közepes vagy súlyos mértékű fertőzései esetén, akik különböző (például táplálkozási, kardiovaszkuláris vagy légzőszervi) társbetegségeik miatt csökkent ellenállóképességgel rendelkeznek a külső stresszorokkal szemben. Az energiaforrások

gyorsabban kimerülnek extrém magas lázak esetén is, ami a betegség kimenetelének romlását eredményezi. Ilyen helyzetekben a láz előnyös hatása háttérbe szorul, helyette káros következményei érvényesülhetnek (70. ábra). Meg kell jegyezni, hogy az adatok hiánya miatt metaanalízisünkbe nem kerültek be ilyen extrém magas ($39,9^{\circ}\text{C}$ feletti) lázzal jellemezhető betegek.



70. ábra: A testhőmérséklet és a sepszisben bekövetkező halálzási arány közötti összefüggés sematikus ábrázolása. A folyamatos vonal a testhőmérséklet és a sepszisben bekövetkező halálzás közötti negatív korrelációt jelzi, amit tanulmányunkban is igazoltunk¹⁶⁰. A szaggatott vonalak a betegség szélsőséges formáiban megfigyelt lineáris összefüggéstől való valószínűsíthető eltéréseket jelzik, amelyeket publikált adatok hiánya miatt nem tudtunk bevonni az eredeti metaanalízisünkbe. A szürke pontozott vonal a megfigyelt összefüggéstől való lehetséges eltéréseket jelzi, amelyek a betegek egyedi jellemzőiből adódhatnak az elemzett testhőmérséklet-tartományon belül. További magyarázatot lásd a szövegben.

A szisztémás gyulladás késői fázisa az előbbiekkal szemben azt az állapotot jellemzi, amikor a fertőző betegség már előrehaladott. Ilyenkor a beteg szervezet a fertőző ágens legyőzésére használt energiaigényes folyamatok (például láz, hipermetabolizmus) helyett, sokkal inkább a meglévő energiaraktárak megőrzésére összpontosít és toleranciára törekszik a fertőző ágens jelenlétével szemben. Ilyenkor a fájdalom elveszti figyelmeztető funkcióját, ami hipoalgéziát eredményez. A nagy energiaigényű válaszreakciók nem kivitelezhetőek; következésképpen szomnolencia, motoros

depresszió és normo- vagy hipotenzio jellemző. Súlyos klinikai esetekben (például szeptikus 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 (70. ábra).

Direkt kísérletekben kimutatták, hogy a spontán hipotermia előnyösebb, mint a láz az aszeptikus (LPS által kiváltott) vagy szeptikus (*Escherichia coli* által kiváltott) szisztémás gyulladás súlyos formáiban szenvedő patkányokban (áttekintésért, lásd Garami és mtsai.¹²⁸). Ezekben a vizsgálatokban a hipotermiás patkányok túlélési aránya jelentősen magasabb volt, mint a lázas patkányoké a súlyos szisztémás gyulladás aszeptikus és szeptikus modelljeiben egyaránt. Arra is fény derült, hogy a hipotermia túlnyomórészt átmeneti, önkorlátozó és nem végzetes válasz, amely spontán is kialakul szeptikus betegekben⁴³¹. Minél súlyosabb a patogén terhelés, a fertőzés előtti kór állapot és az aktuális állapot, annál valószínűbb, hogy a hipotermia és annak energiatakarékos hatásai előnyösek a gazdaszervezet számára (70. ábra). Azt is meg kell jegyezni, hogy a szépszis súlyos eseteiben, különösen olyan betegeknel, akiknel 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 (70. ábra). Perspektivikus megközelítésként a T_m farmakológiai eszközökkel történő kontrollált, célzott modulációjának felhasználását is lehetne vizsgálni szisztémás gyulladásban; talán új hipo- vagy hipertermiát indukáló anyagok is alkalmazhatók lennének, mint a TRPV1 csatorna különböző antagonistái (lásd 6.1.1. fejezet).

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

A láz és a hipotermia prediktív értékének szeptikus betegekben való vizsgálata során nyilvánvalóvá vált, hogy a testhőmérséklet, mint élettani 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^{124,125}. Ennek ismeretében megvizsgáltuk a MIF lehetséges biomarker szerepét is szepszisben metaanalízissel¹⁶¹, majd egy általunk indított prospektív klinikai tanulmánnyal¹⁷⁵.

Az irodalomban rendelkezésre álló adatok metaanalízisével elsőként mutattuk be, hogy a vér MIF szintje hasznos biomarker lehet szepszisben diagnosztikai célokra¹⁶¹. Metaanalízisünk fő új eredménye, hogy a vér MIF szintje nagyobb mértékben emelkedik szepszisben, mint nem fertőzőes eredetű szisztémás gyulladásban. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a MIF diagnosztikai markerként használható a szepszis és más szisztémás gyulladásos betegségek megkülönböztetésére. Feltételezhető, hogy a MIF termelődése erősebben fokozódik, ha a gyulladásos reakció kiváltó ágense mikrobiális patogén, mint ha az egy szövetkárosodással összefüggő molekuláris mintázat („damage-associated molecular pattern”). Kimutatták ugyanis, hogy az utóbbi és a kórokozóhoz köthető molekuláris mintázat („pathogen-associated molecular pattern”) másképp aktiválja az immunrendszert. Előbbiek gyengébb veleszületett immunreakciót váltanak ki, mint az utóbbiak, ami a patogének esetében a gyulladásos citokinek kifejezettebb termelődésével is jár⁴³². Ezekkel a kísérleti modellekben kapott eredményekkel összhangban multiplex traumán átesett betegeknél az eleve magas MIF szintek tovább emelkedtek, amikor a betegekben fertőzés alakult ki, ami arra utal, hogy a MIF a másodlagos fertőzés indikátora is lehet⁴³³.

Fentiekben ismertetett metaanalízisünk eredményei alátámasztották a MIF diagnosztikus biomarker szerepét, azonban az elemzett tanulmányok többségében a vér MIF szintjét csak egyszer, egyetlen napon írták le a betegeknél, ami nem tette lehetővé, hogy kiértékeljük a vér MIF szintjének időbeli kinetikáját a szepszis előrehaladása során, valamint annak a betegség kimenetelével való összefüggését. Továbbá, a MIF vizeletben mért szintjének szepszisben betöltött prediktív szerepét vizsgáló tanulmányt sem találtunk. Mindezek szükségessé tették egy új, prospektív klinikai vizsgálat elvégzését¹⁷⁵. Ennek során kimutattuk, hogy a szérum MIF kinetikája különbözik a szepszist túlélő és a szepszisben elhunyt betegek között. Elsőként számoltunk be arról, hogy a szérum MIF szintje az intenzív osztályra való felvétel után megemelkedett azoknál a betegeknél, akik szepszis során elhunytak, míg a betegséget túlélőknél a szint csökkent. Nemek közötti különbséget is megfigyeltünk a szérum MIF kinetikájában, hiszen a szepszist túlélőknél a csökkenő tendencia csak férfiakban volt jelen, a nőkben azonban nem. 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 szeptikus betegekben.

Az eltérő kinetikára vonatkozó új megállapításunk azt jelzi, hogy ugyanazon betegnél végzett ismételt szérumszint mérések pontosabban előre jelezhetik a kimenetelt, mint az intenzív osztályon végzett egyszeri mérés. A MIF prognosztikai biomarker értéke ugyanis nem volt kimutatható több olyan korábbi tanulmányban, amelyben a szerzők csak egyszeri szérumszint mérést végeztek^{244,434,435}. A szérumszint emelkedése halálos kimenetel esetén feltehetően a betegség progressziójával függ össze. A MIF egy proinflammatorikus citokin, amely alapvetően elősegíti a kórokozó legyőzésére irányuló immunválaszt¹²³. Ez magyarázatot adhat arra, hogy miért találtak magasabb szinteket a szisztémás gyulladásban szenvedő betegekben egészséges kontrollokhoz képest több korábbi vizsgálatban (áttekintésért, lásd Toldi és mtsai.¹⁶¹). 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 szérumszint 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. Azt is meg kell jegyezni, hogy a MIF különböző sejttípusokban intracitoplazmatikus raktárakban is megtalálható²⁴⁴, így növekvő szintje tükrözheti az egyre fokozódó szöveti károsodást és nekrozist is végzetes kimenetel esetén.

A szeptikus betegek szérumszintjének nemek közötti különbsége a nemi hormonok hatásának tudható be. Gyulladás kísérleti modelljeiben az ösztrogén csökkentette a MIF termelését^{436,437}, ezzel összhangban a plazma MIF szintje alacsonyabb volt női, mint férfi egészséges humán alanyokban⁴³⁸. Meg kell azonban jegyezni, hogy a férfiak és nők közötti MIF szint különbség csak az 55 évnél fiatalabb korcsoportban volt jelen⁴³⁸. Ami az életkort illeti, 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 ösztradiol plazmában mért koncentrációja szignifikánsan magasabb volt férfiakban, mint posztmenopauzában lévő nőkben⁴³⁹. A posztmenopauzában csökkenő ösztrogén szintek tehát hozzájárulhattak ahhoz, hogy vizsgálatunkban a MIF szintek miért emelkedtek nagyobb mértékben mind a túlélő, mind

az elhunyt szeptikus nőkben, mint a férfiakban. A szérumban MIF szintek nemek közötti különbségei hozzájárulhatnak a szeptikus férfiak és nők prognózisának korábban közölt különbözőségéhez is⁴⁴⁰.

A szepszisben elhunytak alacsonyabb vizelet MIF szintje előre nem látott új eredmény volt, amely magyarázatra szorul. 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, például a tubulussejteken, a podocitákon, a mezangiális és az endotélsejteken (friss áttekintésért, lásd Kong és mtsai.⁴⁴¹). A MIF alacsony szinten, konstitutívan jelen van a veseszövetekben, de expressziója jelentősen fokozódik vesegyulladásban⁴⁴². A vizelet MIF szintje egy korábbi vizsgálatban csak gyenge korrelációt mutatott a szérumban MIF szintjével⁴⁴³, ami arra utal, hogy a vizeletben lévő koncentrációját nemcsak a szérumban MIF kiválasztása befolyásolja, hanem renális szintézise is. Továbbá meg kell említeni, hogy a glomeruláris bazál membránon keresztül történő fehérje permeabilitás és a tubuláris epitélisek általi fehérje reabszorpció különbségei szintén befolyásolhatják a MIF vizeletbe történő kiválasztását nefropátia esetén⁴⁴⁴. A MIF szérumban- és vizeletszintjei közötti korreláció hiánya azt is megmagyarázhatja, hogy a magasabb szérumszintek miatt nem jártak együtt a vizeletszintek emelkedésével a szepszisben elhunytaknál saját vizsgálatunkban. A renális MIF-ről kimutatták, hogy renoprotektív funkcióval rendelkezik különböző vesebetegségeken, beleértve az akut vesekárosodást is^{445,446}. Mivel vizsgálatunkban a vizelet MIF szintje a szepszist túlélőknél magasabb volt, mint az elhunyt betegeknél, feltételezhető, hogy az elhunytakban a renális MIF endogén renoprotektív hatása gyengült, ami a betegség fokozott súlyosságára utal. Bár a fentiekben leírtak magyarázathatják eredményeinket, meg kell említeni, hogy a MIF-nek a vesekárosodás kialakulásában betöltött okozati szerepét is felvetették⁴⁴⁷. A különböző vizsgálatokban talált ellentmondó (azaz renoprotektív vs. vesekárosító) szerepek magyarázatoként az adott betegség sajátosságait és a MIF-nek a betegség patogenezisében betöltött eltérő szerepét feltételezik⁴⁴⁵. 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 vazokonstrikióját, az alacsonyabb T_k preferenciát és a fokozott lokomotoros aktivitást⁶⁹.

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 meg⁶⁹.

1.3) Az életkor előrehaladtával a *Trpv1* KO egerek súlya mindkét nemből nagyobb volt, mint WT társaiké⁶⁹.

1.4) Amikor a *Trpv1* KO egerek öregednek, hipoaktívvá válnak (a WT alomtársaikhoz képest), amely magyarázhatja túlsúlyuk kialakulását¹⁶².

2.1) A TRPV1 antagonistá A-1165901 *in vivo* hipotermiát okoz rágcsálókban, amely TRPV1 csatornákon keresztül jön létre, és kialakulásában a farokbőr érrendszere és a termogenezis vesz részt¹⁶³.

2.2) 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 blokkolta¹⁶³.

2.3) Az A-1165901 által kiváltott hipotermia, valamint az AMG 517 és AMG8163 által kiváltott hipertermia nem jelentkezik abdominális TRPV1 deszenzitizáción átesett patkányokban, tehát a TRPV1 antagonisták által indukált hipo- és hipertermiás válaszok ugyanabból a lokalizációból indulnak ki: valahonnan a hasból, feltehetően a hasfali izomzatból^{163,164}.

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 mértékét¹⁶⁴.

2.5) A vehikulummal előkezelt patkányokkal ellentétben a kapszaicin által kiváltott vérátáramlásbeli csökkenés a külső ferde izomban teljesen mértékben hiányzott lokalizált hasi TRPV1 deszenzitizációt követően¹⁶⁴.

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 kialakulásához¹⁶⁴.

2.7) Gyógyszerfejlesztési szempontból a TRPV1 antagonisták mind hiper-, mind pedig hipotermizáló mellékhatása rágsálókban csökkenthető a TRPV1 csatorna proton aktivációs módjára való hatás minimalizálásával¹⁶³.

2.8) Az AMG 517 képes volt visszafordítani az injekcióval vagy inhalációval kiváltott általános anesztézia során kialakuló hipotermiát rágsálókban, 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 (repurposing)¹⁶⁵.

2.9) A rágsálóktól 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 gátlói³¹.

3) A TRPM8 csatorna univerzális hidegszenzor a bőrben, mert egy szelektív és erős TRPM8 antagonista fiziológiai hatásainak felderítésével rágsálókban kimutattuk, hogy szabályozza az összes hideg elleni fő védekező mechanizmust: a hidegkerülő viselkedést, a farokbőr vazokonstrikióját és a barnazsír szöveti termogenezist¹⁶⁶.

4.1) A TRPA1 csatorna genetikai vagy farmakológiai gátlása nem befolyásolja a T_m hideggel szembeni védelmét, sem pedig az autonóm termoeffektorok (farokbőr vazokonstriktio és termogenezis) hideg általi aktivációját, tehát a TRPA1 csatornák nem töltenek be termoszenzor szerepet rágsálók hőszabályozási rendszerében, még súlyos hideghatásnak való kitétel során sem¹⁶⁷.

4.2) A H₂S-t gyorsan és lassan felszabadító donorok hipotermiát idéznek elő egerekben hipometabolizmus és a bőr vazodilatációjára révén, amely hatásokat az agyban – feltehetően az autonóm termoeffektor idegpályák hipotalamikusan neuronjain – található TRPA1 csatornák közvetítik. Eredményeink rávilágítanak a centrális TRPA1 csatornák által közvetített H₂S jelátvitel fontosságára a hőszabályozási rendszerben¹⁶⁸.

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 szabályozzák¹⁶⁹.

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 emlősökben¹⁷⁰.

6.1) A TRPV1 csatorna fiatal rágsálókban 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 blokádnak 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 be¹⁷¹.

6.2) Az NK1 receptor a COX-2 fehérje expressziójának fokozásán keresztül részt vesz a láz létrejöttében, még hozzá 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 lázban¹⁷².

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 megértését¹⁷³.

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^{174,426}.

6.5) A PACAP hiánya szabadon mozgó *Pacp*^{-/-} 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 eredménye¹⁷⁴.

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 együtt¹⁶⁰.

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 fertőzőes eredetű szisztémás gyulladásban¹⁶¹.

7.3) Prospektív klinikai vizsgálatban kimutattuk, hogy a szérumban mért 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 mért MIF kinetikájában¹⁷⁵.

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 szepszisben szenvedő betegekben¹⁷⁵.

8. Irodalomjegyzék

1. Garami, A. A komplex energetikai egyensúly kísérletes vizsgálata. *Lege Artis Medicinae* **28**, 541-547 (2018).
2. Garami, A. & Székely, M. Body temperature: its regulation in framework of energy balance. *Temperature* **1**, 28-29 (2014).
3. Székely, M., Carletto, L. & Garami, A. The pathophysiology of heat exposure. *Temperature* **2**, 452 (2015).
4. Romanovsky, A. A. Skin temperature: its role in thermoregulation. *Acta Physiol* **210**, 498-507 (2014).
5. Romanovsky, A. A. The thermoregulation system and how it works. *Handb Clin Neurol* **156**, 3-43 (2018).
6. Romanovsky, A. A. *et al.* The transient receptor potential vanilloid-1 channel in thermoregulation: a thermosensor it is not. *Pharmacol Rev* **61**, 228-261 (2009).
7. Armbruszt, S. & Garami, A. The short- and long-term effects of food intake on thermogenesis. *Temperature* **1**, 96 (2014).
8. Almeida, M. C., Steiner, A. A., Branco, L. G. & Romanovsky, A. A. Neural substrate of cold-seeking behavior in endotoxin shock. *PLoS One* **1**, e1 (2006).
9. Dinets, V. Coordinated hunting by Cuban boas *ABC* **4**, 24-29 (2017).
10. Romanovsky, A. A. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R37-46 (2007).
11. Carrasquel-Ursulaez, W., Moldenhauer, H., Castillo, J. P., Latorre, R. & Alvarez, O. Biophysical analysis of thermosensitive TRP channels with a special focus on the cold receptor TRPM8. *Temperature* **2**, 188-200 (2015).
12. Song, K. *et al.* The TRPM2 channel is a hypothalamic heat sensor that limits fever and can drive hypothermia. *Science* **353**, 1393-1398 (2016).
13. Vizin, R. C. *et al.* TRPV4 activates autonomic and behavioural warmth-defence responses in Wistar rats. *Acta Physiol* **214**, 275-289 (2015).
14. Garami, A. & Romanovsky, A. A. The transient receptor potential vanilloid-4 channel: detecting body temperatures that drive defences against mild warmth. *Acta Physiol* **214**, 154-156 (2015).
15. Fromy, B. *et al.* Disruption of TRPV3 impairs heat-evoked vasodilation and thermoregulation: a critical role of CGRP. *J Invest Dermatol* **138**, 688-696 (2018).
16. Pintér, E., Garami, A. & Szállási, Á. From capsaicin to TRPV1: the “hot” legacy of János Szolcsányi. *Temperature* **10**, 1-2 (2023).
17. Caterina, M. J. *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816-824 (1997).
18. Latorre, R. & Diaz-Franulic, I. Profile of David Julius and Ardem Patapoutian: 2021 Nobel Laureates in Physiology or Medicine. *Proc Natl Acad Sci USA* **119**, e2121015119 (2022).
19. Helyes, Z. *et al.* A 2021. évi orvosi-élettani Nobel-díjjal elismert kutatások és azok magyar előzményei. *Magyar Tudomány* **183**, 738-751 (2022).
20. Hőgyes, E. Beiträge zur physiologischen wirkung der estandteile des Capsicum annum. *Arch Exp Pathol Pharmacol* **9**, 117-130 (1878).
21. Jancsó, N. & Jancsó, A. Desensitization of sensory nerve endings. *Kísérl Orvostud* **2** (Suppl.), 15 (1949).
22. Jancsó, G. & Sántha, P. The foundation of sensory pharmacology: Nicholas (Miklós) Jancsó and the Szeged contribution. *Temperature* **2**, 152-157 (2015).
23. Szolcsányi, J. Effect of capsaicin on thermoregulation: an update with new aspects. *Temperature* **2**, 277-296 (2015).
24. Szolcsányi, J. & Jancsó-Gábor, A. Sensory effects of capsaicin congeners. Part II: importance of chemical structure and pungency in desensitizing activity of capsaicin-type compounds. *Arzneimittelforschung* **26**, 33-37 (1976).
25. Szállási, Á. & Blumberg, P. M. Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience* **30**, 515-520 (1989).
26. Bisogno, T. *et al.* N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J* **351 Pt 3**, 817-824 (2000).
27. Proulx, K. *et al.* Mechanisms of oleoylethanolamide-induced changes in feeding behavior and motor activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R729-737 (2005).

28. Watanabe, K. *et al.* Pharmacological effects in mice of anandamide and its related fatty acid ethanolamides, and enhancement of cataleptogenic effect of anandamide by phenylmethylsulfonyl fluoride. *Biol Pharm Bull* **22**, 366-370 (1999).
29. Benitez-Angeles, M., Morales-Lazaro, S. L., Juarez-Gonzalez, E. & Rosenbaum, T. TRPV1: structure, endogenous agonists, and mechanisms. *Int J Mol Sci* **21**, 3421 (2020).
30. Jordt, S. E., Tominaga, M. & Julius, D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 8134-8139 (2000).
31. Garami, A. *et al.* 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 (2020).
32. Szállási, Á. & Blumberg, P. M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* **51**, 159-212 (1999).
33. Jang, Y. *et al.* Quantitative analysis of TRP channel genes in mouse organs. *Arch Pharm Res* **35**, 1823-1830 (2012).
34. Sanchez, J. F., Krause, J. E. & Cortright, D. N. The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. *Neuroscience* **107**, 373-381 (2001).
35. Cortright, D. N. *et al.* The tissue distribution and functional characterization of human VR1. *Biochem Biophys Res Commun* **281**, 1183-1189 (2001).
36. Fischer, M. J. M., Ciotu, C. I. & Szállási, Á. The mysteries of capsaicin-sensitive afferents. *Front Physiol* **11**, 554195 (2020).
37. Christianson, J. A., McIlwrath, S. L., Koerber, H. R. & Davis, B. M. Transient receptor potential vanilloid 1-immunopositive neurons in the mouse are more prevalent within colon afferents compared to skin and muscle afferents. *Neuroscience* **140**, 247-257 (2006).
38. Hwang, S. J., Oh, J. M. & Valtschanoff, J. G. Expression of the vanilloid receptor TRPV1 in rat dorsal root ganglion neurons supports different roles of the receptor in visceral and cutaneous afferents. *Brain Res* **1047**, 261-266 (2005).
39. Schicho, R., Florian, W., Liebmann, I., Holzer, P. & Lippe, I. T. Increased expression of TRPV1 receptor in dorsal root ganglia by acid insult of the rat gastric mucosa. *Eur J Neurosci* **19**, 1811-1818 (2004).
40. Bielefeldt, K., Zhong, F., Koerber, H. R. & Davis, B. M. Phenotypic characterization of gastric sensory neurons in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**, G987-997 (2006).
41. Zhang, L., Jones, S., Brody, K., Costa, M. & Brookes, S. J. Thermosensitive transient receptor potential channels in vagal afferent neurons of the mouse. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**, G983-991 (2004).
42. Starowicz, K., Cristino, L. & Di Marzo, V. TRPV1 receptors in the central nervous system: potential for previously unforeseen therapeutic applications. *Curr Pharm Des* **14**, 42-54 (2008).
43. Tóth, A. *et al.* Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* **135**, 162-168 (2005).
44. Mezey, É. *et al.* Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 3655-3660 (2000).
45. Sasamura, T., Sasaki, M., Tohda, C. & Kuraishi, Y. Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. *Neuroreport* **9**, 2045-2048 (1998).
46. Cavanaugh, D. J. *et al.* Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *J Neurosci* **31**, 5067-5077 (2011).
47. Szállási, Á., Cruz, F. & Geppetti, P. TRPV1: a therapeutic target for novel analgesic drugs? *Trends Mol Med* **12**, 545-554 (2006).
48. Kark, T. *et al.* Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. *Mol Pharmacol* **73**, 1405-1412 (2008).
49. Tóth, A. *et al.* Vanilloid receptor-1 (TRPV1) expression and function in the vasculature of the rat. *J Histochem Cytochem* **62**, 129-144 (2014).
50. Motter, A. L. & Ahern, G. P. TRPV1-null mice are protected from diet-induced obesity. *FEBS Lett* **582**, 2257-2262 (2008).
51. Zhang, L. L. *et al.* Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity. *Circ Res* **100**, 1063-1070 (2007).
52. Pierau, F. K., Szolcsányi, J. & Sann, H. The effect of capsaicin on afferent nerves and temperature regulation of mammals and birds. *J Therm Biol* **11**, 95-100 (1986).
53. Szolcsányi, J., Sann, H. & Pierau, F. K. Nociception in pigeons is not impaired by capsaicin. *Pain* **27**, 247-260 (1986).

54. Jordt, S. E. & Julius, D. Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* **108**, 421-430 (2002).
55. Szolcsányi, J. & Jancsó-Gábor, A. Capsaicin and other pungent agents as pharmacological tools in studies on thermoregulation. in *The Pharmacology of Thermoregulation* (eds E. Schönbaum & P. Lomax) 395-409 (Karger, 1973).
56. Woods, A. J., Stock, M. J., Gupta, A. N., Wong, T. T. & Andrews, P. L. Thermoregulatory effects of resiniferatoxin in the rat. *Eur J Pharmacol* **264**, 125-133 (1994).
57. Almeida, M. C., Steiner, A. A., Branco, L. G. & Romanovsky, A. A. Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation. *Eur J Neurosci* **23**, 3359-3367 (2006).
58. Székely, M. Capsaicin-induced changes in behavioral thermoregulation of newborn rabbits (*Lepus Cuniculus*). *J Therm Biol* **11**, 101-104 (1986).
59. Brøderson, J. D., Kym, P. R. & Szállási, Á. Targeting TRP channels for pain relief. *Eur J Pharmacol* **716**, 61-76 (2013).
60. De Petrocellis, L. & Moriello, A. S. Modulation of the TRPV1 channel: current clinical trials and recent patents with focus on neurological conditions. *Recent Pat CNS Drug Discov* **8**, 180-204 (2013).
61. Gavva, N. R. *et al.* The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J Neurosci* **27**, 3366-3374 (2007).
62. Steiner, A. A. *et al.* Nonthermal activation of transient receptor potential vanilloid-1 channels in abdominal viscera tonically inhibits autonomic cold-defense effectors. *J Neurosci* **27**, 7459-7468 (2007).
63. Swanson, D. M. *et al.* Identification and biological evaluation of 4-(3-trifluoromethylpyridin-2-yl)piperazine-1-carboxylic acid (5-trifluoromethylpyridin-2-yl)amide, a high affinity TRPV1 (VR1) vanilloid receptor antagonist. *J Med Chem* **48**, 1857-1872 (2005).
64. Gavva, N. R. *et al.* Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* **136**, 202-210 (2008).
65. Manitpisitkul, P. *et al.* TRPV1 antagonist JNJ-39439335 (mavatriptan) demonstrates proof of pharmacology in healthy men: a first-in-human, double-blind, placebo-controlled, randomized, sequential group study. *Pain Rep* **1**, e576 (2016).
66. Othman, A. A., Nothaft, W., Awni, W. M. & Dutta, S. Effects of the TRPV1 antagonist ABT-102 on body temperature in healthy volunteers: pharmacokinetic/ pharmacodynamic analysis of three phase 1 trials. *Br J Clin Pharmacol* **75**, 1029-1040 (2013).
67. Rowbotham, M. C. *et al.* Oral and cutaneous thermosensory profile of selective TRPV1 inhibition by ABT-102 in a randomized healthy volunteer trial. *Pain* **152**, 1192-1200 (2011).
68. Alawi, K. M. *et al.* The sympathetic nervous system is controlled by transient receptor potential vanilloid 1 in the regulation of body temperature. *FASEB J* **29**, 4285-4298 (2015).
69. Garami, A. *et al.* Thermoregulatory phenotype of the *Trpv1* knockout mouse: thermoeffector dysbalance with hyperkinesia. *J Neurosci* **31**, 1721-1733 (2011).
70. Garami, A. *et al.* Contributions of different modes of TRPV1 activation to TRPV1 antagonist-induced hyperthermia. *J Neurosci* **30**, 1435-1440 (2010).
71. Lehto, S. G. *et al.* Antihyperalgesic effects of (*R,E*)-*N*-(2-hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-4-yl)-3-(2-(piperidin-1-yl)-4-(trifluoromethyl)phenyl)-acrylamide (AMG8562), a novel transient receptor potential vanilloid type 1 modulator that does not cause hyperthermia in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **326**, 218-229 (2008).
72. Dogan, M. D. *et al.* Lipopolysaccharide fever is initiated via a capsaicin-sensitive mechanism independent of the subtype-1 vanilloid receptor. *Br J Pharmacol* **143**, 1023-1032 (2004).
73. Shimizu, I., Iida, T., Horiuchi, N. & Caterina, M. J. 5-Iodoresiniferatoxin evokes hypothermia in mice and is a partial transient receptor potential vanilloid 1 agonist in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* **314**, 1378-1385 (2005).
74. Mills, C. *et al.* Effects of the transient receptor potential vanilloid 1 antagonist A-425619 on body temperature and thermoregulation in the rat. *Neuroscience* **156**, 165-174 (2008).
75. Andreev, Y. A. *et al.* Polypeptide modulators of TRPV1 produce analgesia without hyperthermia. *Mar Drugs* **11**, 5100-5115 (2013).
76. Blumberg, P. M., Pearce, L. V. & Lee, J. TRPV1 activation is not an all-or-none event: TRPV1 partial agonism/antagonism and its regulatory modulation. *Curr Top Med Chem* **11**, 2151-2158 (2011).
77. Nikolaev, M. V. *et al.* TRPV1 activation power can switch an action mode for its polypeptide ligands. *PLoS One* **12**, e0177077 (2017).
78. Park, T. J. *et al.* Selective inflammatory pain insensitivity in the African naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). *PLoS Biol* **6**, e13 (2008).

79. Christoph, T. *et al.* Investigation of TRPV1 loss-of-function phenotypes in transgenic shRNA expressing and knockout mice. *Mol Cell Neurosci* **37**, 579-589 (2008).
80. Iida, T., Shimizu, I., Nealen, M. L., Campbell, A. & Caterina, M. Attenuated fever response in mice lacking TRPV1. *Neurosci Lett* **378**, 28-33 (2005).
81. Szelényi, Z., Hummel, Z., Szolcsányi, J. & Davis, J. B. Daily body temperature rhythm and heat tolerance in TRPV1 knockout and capsaicin pretreated mice. *Eur J Neurosci* **19**, 1421-1424 (2004).
82. Rudaya, A. Y., Steiner, A. A., Robbins, J. R., Dragic, A. S. & Romanovsky, A. A. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R1244-1252 (2005).
83. McAllen, R. M., Tanaka, M., Ootsuka, Y. & McKinley, M. J. Multiple thermoregulatory effectors with independent central controls. *Eur J Appl Physiol* **109**, 27-33 (2010).
84. Morrison, S. F., Nakamura, K. & Madden, C. J. Central control of thermogenesis in mammals. *Exp Physiol* **93**, 773-797 (2008).
85. Romanovsky, A. A., Ivanov, A. I. & Shimansky, Y. P. Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. *J Appl Physiol* **92**, 2667-2679 (2002).
86. Brown, D., Livesey, G. & Dauncey, M. J. Influence of mild cold on the components of 24 hour thermogenesis in rats. *J Physiol* **441**, 137-154 (1991).
87. Mount, L. E. & Willmott, J. V. The relation between spontaneous activity, metabolic rate and the 24 hour cycle in mice at different environmental temperatures. *J Physiol* **190**, 371-380 (1967).
88. Weinert, D. & Waterhouse, J. Diurnally changing effects of locomotor activity on body temperature in laboratory mice. *Physiol Behav* **63**, 837-843 (1998).
89. McKemy, D. D. Molecular basis of peripheral innocuous cold sensitivity. *Handb Clin Neurol* **156**, 57-67 (2018).
90. McKemy, D. D., Neuhauser, W. M. & Julius, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* **416**, 52-58 (2002).
91. Peier, A. M. *et al.* A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* **108**, 705-715 (2002).
92. Takashima, Y. *et al.* Diversity in the neural circuitry of cold sensing revealed by genetic axonal labeling of transient receptor potential melastatin 8 neurons. *J Neurosci* **27**, 14147-14157 (2007).
93. Story, G. M. *et al.* ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**, 819-829 (2003).
94. Garami, A. A fájdalom és perifériás polyneuropathiák kórélettana. in *Kórélettani Alapok (3. bővített kiadás)* (ed M. Székely) 507-512 (Medicina Könyvkiadó Zrt., 2018).
95. Tajino, K. *et al.* Application of menthol to the skin of whole trunk in mice induces autonomic and behavioral heat-gain responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**, R2128-2135 (2007).
96. Dhaka, A. *et al.* TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* **54**, 371-378 (2007).
97. Knowlton, W. M. *et al.* A sensory-labeled line for cold: TRPM8-expressing sensory neurons define the cellular basis for cold, cold pain, and cooling-mediated analgesia. *J Neurosci* **33**, 2837-2848 (2013).
98. Bautista, D. M. *et al.* The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* **448**, 204-208 (2007).
99. Colburn, R. W. *et al.* Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* **54**, 379-386 (2007).
100. Reeh, P. W. & Fischer, M. J. M. Nobel somatosensations and pain. *Pflügers Arch* **474**, 405-420 (2022).
101. Laursen, W. J., Anderson, E. O., Hoffstaetter, L. J., Bagriantsev, S. N. & Gracheva, E. O. Species-specific temperature sensitivity of TRPA1. *Temperature* **2**, 214-226 (2015).
102. Fernandes, E. S., Fernandes, M. A. & Keeble, J. E. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol* **166**, 510-521 (2012).
103. del Camino, D. *et al.* TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. *J Neurosci* **30**, 15165-15174 (2010).
104. Karashima, Y. *et al.* TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 1273-1278 (2009).
105. Viswanath, V. *et al.* Opposite thermosensor in fruitfly and mouse. *Nature* **423**, 822-823 (2003).
106. Chen, J. *et al.* Selective blockade of TRPA1 channel attenuates pathological pain without altering noxious cold sensation or body temperature regulation. *Pain* **152**, 1165-1172 (2011).

107. Jordt, S. E. *et al.* Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **427**, 260-265 (2004).
108. Knowlton, W. M., Bifolck-Fisher, A., Bautista, D. M. & McKemy, D. D. TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain* **150**, 340-350 (2010).
109. Kwan, K. Y., Glazer, J. M., Corey, D. P., Rice, F. L. & Stucky, C. L. TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *J Neurosci* **29**, 4808-4819 (2009).
110. Gracheva, E. O. *et al.* Molecular basis of infrared detection by snakes. *Nature* **464**, 1006-1011 (2010).
111. Davis, K. D. & Pope, G. E. Noxious cold evokes multiple sensations with distinct time courses. *Pain* **98**, 179-185 (2002).
112. Blackstone, E., Morrison, M. & Roth, M. B. H₂S induces a suspended animation-like state in mice. *Science* **308**, 518 (2005).
113. Aslami, H. *et al.* Suspended animation inducer hydrogen sulfide is protective in an in vivo model of ventilator-induced lung injury. *Intensive Care Med* **36**, 1946-1952 (2010).
114. Bracht, H. *et al.* Effects of intravenous sulfide during resuscitated porcine hemorrhagic shock. *Crit Care Med* **40**, 2157-2167 (2012).
115. Pozsgai, G. *et al.* Analgesic effect of dimethyl trisulfide in mice is mediated by TRPA1 and sst4 receptors. *Nitric Oxide* **65**, 10-21 (2017).
116. Dirkes, M. C., Milstein, D. M., Heger, M. & van Gulik, T. M. Absence of hydrogen sulfide-induced hypometabolism in pigs: a mechanistic explanation in relation to small nonhibernating mammals. *Eur Surg Res* **54**, 178-191 (2015).
117. Drabek, T. *et al.* Intravenous hydrogen sulfide does not induce hypothermia or improve survival from hemorrhagic shock in pigs. *Shock* **35**, 67-73 (2011).
118. Pozsgai, G., Bártai, I. Z. & Pintér, E. Effects of sulfide and polysulfides transmitted by direct or signal transduction-mediated activation of TRPA1 channels. *Br J Pharmacol* **176**, 628-645 (2019).
119. Singer, M. *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801-810 (2016).
120. Bogár, L. *et al.* Szakfelügyelői felmérés a hazai aneszteziológiai és intenzív terápiás betegellátás egyes minőségi elemeiről. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia* **41**, 69-76 (2012).
121. Garai, J., Kanizsai, P., Rumbus, Z., Toldi, J. & Garami, A. Az akut szisztémás gyulladás kórélettana az alapkutatótasoktól a klinikai vonatkozásig. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia* **47**, 5-21 (2017).
122. Bone, R. C. *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* **101**, 1644-1655 (1992).
123. Calandra, T. & Roger, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **3**, 791-800 (2003).
124. Garai, J. *et al.* 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 (2021).
125. Garai, J. *et al.* 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 (2023).
126. Arons, M. M. *et al.* Effects of ibuprofen on the physiology and survival of hypothermic sepsis. Ibuprofen in Sepsis Study Group. *Crit Care Med* **27**, 699-707 (1999).
127. Clemmer, T. P. *et al.* Hypothermia in the sepsis syndrome and clinical outcome. The Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med* **20**, 1395-1401 (1992).
128. Garami, A., Steiner, A. A. & Romanovsky, A. A. Fever and hypothermia in systemic inflammation. *Handb Clin Neurol* **157**, 565-597 (2018).
129. Romanovsky, A. A. & Székely, M. Fever and hypothermia: two adaptive thermoregulatory responses to systemic inflammation. *Med Hypotheses* **50**, 219-226 (1998).
130. Blair, E., Henning, G., Hornick, R. & Cowley, R. A. Hypothermia in bacteremic shock. *Arch Surg* **89**, 619-629 (1964).
131. Villar, J. & Slutsky, A. S. Effects of induced hypothermia in patients with septic adult respiratory distress syndrome. *Resuscitation* **26**, 183-192 (1993).
132. Drewry, A. M., Fuller, B. M., Skrupky, L. P. & Hotchkiss, R. S. The presence of hypothermia within 24 hours of sepsis diagnosis predicts persistent lymphopenia. *Crit Care Med* **43**, 1165-1169 (2015).

133. Saper, C. B., Romanovsky, A. A. & Scammell, T. E. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. *Nat Neurosci* **15**, 1088-1095 (2012).
134. Romanovsky, A. A. & Garami, A. Prostaglandin riddles in energy metabolism: E is for excess, D is for depletion. Focus on "Food deprivation alters thermoregulatory responses to lipopolysaccharide by enhancing cryogenic inflammatory signaling via prostaglandin D2". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **298**, R1509-1511 (2010).
135. Steiner, A. A. *et al.* Cellular and molecular bases of the initiation of fever. *PLoS Biol* **4**, e284 (2006).
136. Lazarus, M. *et al.* EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. *Nat Neurosci* **10**, 1131-1133 (2007).
137. Rózsa, Z., Varró, A. & Jancsó, G. Use of immunoblockade to study the involvement of peptidergic afferent nerves in the intestinal vasodilatory response to capsaicin in the dog. *Eur J Pharmacol* **115**, 59-64 (1985).
138. Szabados, T. *et al.* Capsaicin-sensitive sensory nerves and the TRPV1 ion channel in cardiac physiology and pathologies. *Int J Mol Sci* **21**, 4472 (2020).
139. Blatteis, C. M., Xin, L. & Quan, N. Neuromodulation of fever. A possible role for substance P. *Ann N Y Acad Sci* **741**, 162-173 (1994).
140. Szelényi, Z., Székely, M. & Balaskó, M. Role of substance P (SP) in the mediation of endotoxin (LPS) fever in rats. *Ann N Y Acad Sci* **813**, 316-323 (1997).
141. Balaskó, M., Székely, M. & Szelényi, Z. The effect of CP-96,345, a non-peptide substance-P antagonist, on thermoregulation and the development of endotoxin-fever in rats. *J Therm Biol* **25**, 1-4 (2000).
142. Reis, R. C., Brito, H. O., Fraga, D., Cabrini, D. A. & Zamprônio, A. R. Central substance P NK(1) receptors are involved in fever induced by LPS but not by IL-1beta and CCL3/MIP-1alpha in rats. *Brain Res* **1384**, 161-169 (2011).
143. Steinhoff, M. S., von Mentzer, B., Geppetti, P., Pothoulakis, C. & Bunnett, N. W. Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. *Physiol Rev* **94**, 265-301 (2014).
144. Noble, F. *et al.* International union of pharmacology. XXI. structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors. *Pharmacol Rev* **51**, 745-781 (1999).
145. Gibbs, J. & Smith, G. P. Cholecystokinin and satiety in rats and rhesus monkeys. *Am J Clin Nutr* **30**, 758-761 (1977).
146. Gibbs, J., Young, R. C. & Smith, G. P. Cholecystokinin elicits satiety in rats with open gastric fistulas. *Nature* **245**, 323-325 (1973).
147. Kissileff, H. R., Pi-Sunyer, F. X., Thornton, J. & Smith, G. P. C-terminal octapeptide of cholecystokinin decreases food intake in man. *Am J Clin Nutr* **34**, 154-160 (1981).
148. Clark, W. G. & Lipton, J. M. Changes in body temperature after administration of amino acids, peptides, dopamine, neuroleptics and related agents: II. *Neurosci Biobehav Rev* **9**, 299-371 (1985).
149. Szelényi, Z. *et al.* Cholecystokinin: possible mediator of fever and hypothermia. *Front Biosci* **9**, 301-308 (2004).
150. Rezayat, M., Ravandeh, N. & Zarrindast, M. R. Cholecystokinin and morphine-induced hypothermia. *Eur Neuropsychopharmacol* **9**, 219-225 (1999).
151. Szelényi, Z., Barthó, L., Székely, M. & Romanovsky, A. A. Cholecystokinin octapeptide (CCK-8) injected into a cerebral ventricle induces a fever-like thermoregulatory response mediated by type B CCK-receptors in the rat. *Brain Res* **638**, 69-77 (1994).
152. Sugimoto, N., Simons, C. T. & Romanovsky, A. A. Vagotomy does not affect thermal responsiveness to intrabrain prostaglandin E2 and cholecystokinin octapeptide. *Brain Res* **844**, 157-163 (1999).
153. Székely, M., Szelényi, Z. & Balaskó, M. Cholecystokinin participates in the mediation of fever. *Pflügers Arch* **428**, 671-673 (1994).
154. Weiland, T. J., Voudouris, N. J. & Kent, S. CCK(2) receptor nullification attenuates lipopolysaccharide-induced sickness behavior. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R112-123 (2007).
155. Kandasamy, S. B. & Williams, B. A. Cholecystokinin-octapeptide-induced hyperthermia in guinea-pigs. *Experientia* **39**, 1282-1284 (1983).
156. Helyes, Z. *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is upregulated in murine skin inflammation and mediates transient receptor potential vanilloid-1-induced neurogenic edema. *J Invest Dermatol* **135**, 2209-2218 (2015).

157. Helyes, Z. *et al.* Inhibitory effect of PACAP-38 on acute neurogenic and non-neurogenic inflammatory processes in the rat. *Peptides* **28**, 1847-1855 (2007).
158. Resch, J. M. *et al.* Stimulation of the hypothalamic ventromedial nuclei by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces hypophagia and thermogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **301**, R1625-1634 (2011).
159. Resch, J. M. *et al.* Intrahypothalamic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulates energy balance via site-specific actions on feeding and metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **305**, E1452-1463 (2013).
160. Rumbus, Z. *et al.* Fever is associated with reduced, hypothermia with increased mortality in septic patients: a meta-analysis of clinical trials. *PLoS One* **12**, e0170152 (2017).
161. Toldi, J. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor as a diagnostic and predictive biomarker in sepsis: meta-analysis of clinical trials. *Sci Rep* **11**, 8051 (2021).
162. Wanner, S. P., Garami, A. & Romanovsky, A. A. 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 (2011).
163. Garami, A. *et al.* 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 (2018).
164. Garami, A. *et al.* The neural pathway of the hyperthermic response to antagonists of the transient receptor potential vanilloid-1 channel. *Temperature* **10**, 136-154 (2023).
165. Garami, A. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 1 antagonists prevent anesthesia-induced hypothermia and decrease postincisional opioid dose requirements in rodents. *Anesthesiology* **127**, 813-823 (2017).
166. Almeida, M. C. *et al.* Pharmacological blockade of the cold receptor TRPM8 attenuates autonomic and behavioral cold defenses and decreases deep body temperature. *J Neurosci* **32**, 2086-2099 (2012).
167. de Oliveira, C. *et al.* Transient receptor potential channel ankyrin-1 is not a cold sensor for autonomic thermoregulation in rodents. *J Neurosci* **34**, 4445-4452 (2014).
168. Oláh, E. *et al.* The hypothermic effect of hydrogen sulfide is mediated by the transient receptor potential ankyrin-1 channel in mice. *Pharmaceuticals* **14**, 992 (2021).
169. Ivic, I. *et al.* Transient receptor potential vanilloid-1 channels contribute to the regulation of acid- and base-induced vasomotor responses. *J Vasc Res* **53**, 279-290 (2016).
170. Kelava, L. *et al.* Stereolithography 3D printing of a heat exchanger for advanced temperature control in wire myography. *Polymers* **14**, 471 (2022).
171. Wanner, S. P. *et al.* 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 (2012).
172. Pákai, E. *et al.* 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 (2018).
173. Kéringér, P. *et al.* The hyperthermic effect of central cholecystinin is mediated by the cyclooxygenase-2 pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **322**, E10-23 (2022).
174. Bánki, E. *et al.* Characterization of the thermoregulatory response to pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in rodents. *J Mol Neurosci* **54**, 543-554 (2014).
175. Toldi, J. *et al.* Distinct patterns of serum and urine macrophage migration inhibitory factor kinetics predict death in sepsis: a prospective, observational clinical study. *Sci Rep* **13**, 588 (2023).
176. Lesnikov, V. A. & Tsvetkova, I. P. Stereotaxic coordinates of the mouse hypothalamus (in Russian). *Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova* **71**, 798-804 (1985).
177. Romanovsky, A. A., Kulchitsky, V. A., Simons, C. T., Sugimoto, N. & Székely, M. Febrile responsiveness of vagotomized rats is suppressed even in the absence of malnutrition. *Am J Physiol* **273**, R777-783 (1997).
178. Ellis, H. & Pryse-Davies, J. Vagotomy in the rat. A study of its effects on stomach and small intestine. *Br J Exp Pathol* **48**, 135-141 (1967).
179. Sawchenko, P. E. & Gold, R. M. Effects of gastric vs complete subdiaphragmatic vagotomy on hypothalamic hyperphagia and obesity. *Physiol Behav* **26**, 281-292 (1981).
180. Romanovsky, A. A. *et al.* Lipopolysaccharide transport from the peritoneal cavity to the blood: is it controlled by the vagus nerve? *Auton Neurosci* **85**, 133-140 (2000).
181. Dogan, M. D. *et al.* Bilateral splanchnicotomy does not affect lipopolysaccharide-induced fever in rats. *Brain Res* **993**, 227-229 (2003).

182. Dijkstra, I., Binnekade, R. & Tilders, F. J. Diurnal variation in resting levels of corticosterone is not mediated by variation in adrenal responsiveness to adrenocorticotropin but involves splanchnic nerve integrity. *Endocrinology* **137**, 540-547 (1996).
183. Ulrich-Lai, Y. M. & Engeland, W. C. Adrenal splanchnic innervation modulates adrenal cortical responses to dehydration stress in rats. *Neuroendocrinology* **76**, 79-92 (2002).
184. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45 (2001).
185. Kovács, K. J. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int* **33**, 287-297 (1998).
186. Paxinos, G. & Franklin, K. B. J. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. (Academic Press, 2001).
187. Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D. G. & Group, P. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med* **6**, e1000097 (2009).
188. Di Veroli, G. Y. *et al.* An automated fitting procedure and software for dose-response curves with multiphasic features. *Sci Rep* **5**, 14701 (2015).
189. Meddings, J. B., Scott, R. B. & Fick, G. H. Analysis and comparison of sigmoidal curves: application to dose-response data. *Am J Physiol* **257**, G982-989 (1989).
190. Metropolis, N. & Ulam, S. The Monte Carlo method. *J Am Stat Assoc* **44**, 335-341 (1949).
191. Wolberg, J. *Data Analysis Using the Method of Least Squares: Extracting the Most Information from Experiments*. (Springer, 2006).
192. Surowy, C. S. *et al.* (R)-(5-tert-butyl-2,3-dihydro-1H-inden-1-yl)-3-(1H-indazol-4-yl)-urea (ABT-102) blocks polymodal activation of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in vitro and heat-evoked firing of spinal dorsal horn neurons in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **326**, 879-888 (2008).
193. Quiding, H. *et al.* TRPV1 antagonistic analgesic effect: a randomized study of AZD1386 in pain after third molar extraction. *Pain* **154**, 808-812 (2013).
194. Chiche, D., Brown, W. & Walker, P. NEO6860, a novel modality selective TRPV1 antagonist: results from phase I, double-blind, placebo-controlled study in healthy subjects. *J Pain* **17**, S79 (conference poster) (2016).
195. Arsenault, P. *et al.* NEO6860, modality-selective TRPV1 antagonist: a randomized, controlled, proof-of-concept trial in patients with osteoarthritis knee pain. *Pain Rep* **3**, e696 (2018).
196. Tafesse, L. *et al.* Structure-activity relationship studies and discovery of a potent transient receptor potential vanilloid (TRPV1) antagonist 4-[3-chloro-5-[(1S)-1,2-dihydroxyethyl]-2-pyridyl]-N-[5-(trifluoromethyl)-2-pyridyl]-3,6-dihydro-2H-pyridine-1-carboxamide (V116517) as a clinical candidate for pain management. *J Med Chem* **57**, 6781-6794 (2014).
197. Jones, A. E., Trzeciak, S. & Kline, J. A. The Sequential Organ Failure Assessment score for predicting outcome in patients with severe sepsis and evidence of hypoperfusion at the time of emergency department presentation. *Crit Care Med* **37**, 1649-1654 (2009).
198. Le Gall, J. R., Lemeshow, S. & Saulnier, F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* **270**, 2957-2963 (1993).
199. Knaus, W. A., Draper, E. A., Wagner, D. P. & Zimmerman, J. E. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* **13**, 818-829 (1985).
200. Bellomo, R. *et al.* Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* **8**, R204-212 (2004).
201. Di Marzo, V. *et al.* Hypolocomotor effects in rats of capsaicin and two long chain capsaicin homologues. *Eur J Pharmacol* **420**, 123-131 (2001).
202. Lundbaek, J. A. *et al.* Capsaicin regulates voltage-dependent sodium channels by altering lipid bilayer elasticity. *Mol Pharmacol* **68**, 680-689 (2005).
203. Nikami, H. *et al.* Capsaicin pretreatment attenuates LPS-induced hypothermia through TRPV1-independent mechanisms in chicken. *Life Sci* **82**, 1191-1195 (2008).
204. Adams, I. B., Compton, D. R. & Martin, B. R. Assessment of anandamide interaction with the cannabinoid brain receptor: SR 141716A antagonism studies in mice and autoradiographic analysis of receptor binding in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* **284**, 1209-1217 (1998).
205. Crawley, J. N. *et al.* Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia in vivo in rodents. *Pharmacol Biochem Behav* **46**, 967-972 (1993).
206. Wiley, J. L., Razdan, R. K. & Martin, B. R. Evaluation of the role of the arachidonic acid cascade in anandamide's in vivo effects in mice. *Life Sci* **80**, 24-35 (2006).

207. Wise, L. E., Shelton, C. C., Cravatt, B. F., Martin, B. R. & Lichtman, A. H. Assessment of anandamide's pharmacological effects in mice deficient of both fatty acid amide hydrolase and cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* **557**, 44-48 (2007).
208. Vogel, Z. *et al.* Anandamide, a brain endogenous compound, interacts specifically with cannabinoid receptors and inhibits adenylate cyclase. *J Neurochem* **61**, 352-355 (1993).
209. Gonsiorek, W. *et al.* Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol* **57**, 1045-1050 (2000).
210. Cui, M. *et al.* TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *J Neurosci* **26**, 9385-9393 (2006).
211. Gavva, N. R. *et al.* AMG 9810 [(E)-3-(4-t-butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4] dioxin-6-yl)acrylamide], a novel vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic properties. *J Pharmacol Exp Ther* **313**, 474-484 (2005).
212. Westerterp, K. R. & Plasqui, G. Physically active lifestyle does not decrease the risk of fattening. *PLoS One* **4**, e4745 (2009).
213. Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. (Elsevier Academic Press, 2007).
214. Nedergaard, J. & Cannon, B. Brown adipose tissue as a heat-producing thermoeffector. *Handb Clin Neurol* **156**, 137-152 (2018).
215. Gomtsyan, A. *et al.* TRPV1 ligands with hyperthermic, hypothermic and no temperature effects in rats. *Temperature* **2**, 297-301 (2015).
216. Gijssen, H. J. *et al.* Tricyclic 3,4-dihydropyrimidine-2-thione derivatives as potent TRPA1 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* **22**, 797-800 (2012).
217. Gavva, N. R. *et al.* Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels are involved in body temperature regulation. *Mol Pain* **8**, 36 (2012).
218. Székely, M., Szelényi, Z., Pétervári, E. & Balaskó, M. Thermoregulatory "overshoot" reactions in cold-adapted rats. *J Therm Biol* **26**, 491-497 (2001).
219. Papapetropoulos, A., Whiteman, M. & Cirino, G. Pharmacological tools for hydrogen sulphide research: a brief, introductory guide for beginners. *Br J Pharmacol* **172**, 1633-1637 (2015).
220. Guinamard, R. & Hof, T. TRPA1 and TRPV1, do we hold you in our heart? *Acta Physiol* **232**, e13695 (2021).
221. Virk, H. S. *et al.* Validation of antibodies for the specific detection of human TRPA1. *Sci Rep* **9**, 18500 (2019).
222. Bell, J. T. *et al.* Differential methylation of the TRPA1 promoter in pain sensitivity. *Nat Commun* **5**, 2978 (2014).
223. Sukenaga, N. *et al.* Correlation between DNA methylation of TRPA1 and chronic pain states in human whole blood cells. *Pain Med* **17**, 1906-1910 (2016).
224. Femino, A. M., Fay, F. S., Fogarty, K. & Singer, R. H. Visualization of single RNA transcripts in situ. *Science* **280**, 585-590 (1998).
225. Czikora, A. *et al.* Different desensitization patterns for sensory and vascular TRPV1 populations in the rat: expression, localization and functional consequences. *PLoS One* **8**, e78184 (2013).
226. Kun, J. *et al.* Effect of surgical and chemical sensory denervation on non-neural expression of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptors in the rat. *J Mol Neurosci* **48**, 795-803 (2012).
227. Ivanov, A. I., Pero, R. S., Scheck, A. C. & Romanovsky, A. A. Prostaglandin E(2)-synthesizing enzymes in fever: differential transcriptional regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **283**, R1104-1117 (2002).
228. Sagar, S. M., Sharp, F. R. & Curran, T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* **240**, 1328-1331 (1988).
229. Nakamura, K. & Morrison, S. F. Preoptic mechanism for cold-defensive responses to skin cooling. *J Physiol* **586**, 2611-2620 (2008).
230. Wanner, S. P. *et al.* Cold-induced thermogenesis and inflammation-associated cold-seeking behavior are represented by different dorsomedial hypothalamic sites: a three-dimensional functional topography study in conscious rats. *J Neurosci* **37**, 6956-6971 (2017).
231. Wen, S., Wang, C., Gong, M. & Zhou, L. An overview of energy and metabolic regulation. *Sci China Life Sci* **62**, 771-790 (2019).
232. Steiner, A. A. *et al.* Cyclooxygenase-1 or -2--which one mediates lipopolysaccharide-induced hypothermia? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **297**, R485-494 (2009).
233. Pataki, I., Adamik, A., Jászberényi, M., Mácsai, M. & Telegdy, G. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces hyperthermia in the rat. *Neuropharmacology* **39**, 1303-1308 (2000).

234. Pataki, I., Adamik, A., Jászberényi, M., Mácsai, M. & Telegdy, G. Involvement of transmitters in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-induced hyperthermia. *Regul Pept* **115**, 187-193 (2003).
235. Absood, A., Chen, D., Wang, Z. Y. & Hakanson, R. Vascular effects of pituitary adenylate cyclase activating peptide: a comparison with vasoactive intestinal peptide. *Regul Pept* **40**, 323-329 (1992).
236. Tsueshita, T., Gandhi, S., Onyuksel, H. & Rubinstein, I. Phospholipids modulate the biophysical properties and vasoactivity of PACAP-(1-38). *J Appl Physiol* **93**, 1377-1383 (2002).
237. Inglott, M. A., Farnham, M. M. & Pilowsky, P. M. Intrathecal PACAP-38 causes prolonged widespread sympathoexcitation via a spinally mediated mechanism and increases in basal metabolic rate in anesthetized rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**, H2300-2307 (2011).
238. Hashimoto, H. *et al.* Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 13355-13360 (2001).
239. Aschoff, J. & von Saint-Paul, U. Brain temperature as related to gross motor activity in the unanesthetized chicken. *Physiol Behav* **10**, 529-533 (1973).
240. Nakamura, K. & Morrison, S. F. A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nat Neurosci* **11**, 62-71 (2008).
241. Osaka, T. Cold-induced thermogenesis mediated by GABA in the preoptic area of anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R306-313 (2004).
242. Brenner, T. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF) and manganese superoxide dismutase (MnSOD) as early predictors for survival in patients with severe sepsis or septic shock. *J Surg Res* **164**, e163-171 (2010).
243. Lehmann, L. E. *et al.* Plasma levels of macrophage migration inhibitory factor are elevated in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* **27**, 1412-1415 (2001).
244. Lehmann, L. E. *et al.* Oxidoreductase Macrophage Migration Inhibitory Factor is simultaneously increased in leukocyte subsets of patients with severe sepsis. *Biofactors* **33**, 281-291 (2008).
245. Beishuizen, A., Thijs, L. G., Haanen, C. & Vermes, I. Macrophage migration inhibitory factor and hypothalamo-pituitary-adrenal function during critical illness. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 2811-2816 (2001).
246. Meawed, T. E. *et al.* Functional and prognostic relevance of -173 G/C gene polymorphism of macrophage migration inhibitory factor in sepsis patients in Egyptian intensive care units. *East Mediterr Health J* **21**, 762-769 (2015).
247. Pohl, J., Hendgen-Cotta, U. B., Stock, P., Luedike, P. & Rassaf, T. Elevated MIF-2 levels predict mortality in critically ill patients. *J Crit Care* **40**, 52-57 (2017).
248. Bauer, M. *et al.* Mortality in sepsis and septic shock in Europe, North America and Australia between 2009 and 2019- results from a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* **24**, 239 (2020).
249. Caterina, M. J. *et al.* Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **288**, 306-313 (2000).
250. Davis, J. B. *et al.* Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* **405**, 183-187 (2000).
251. Marsch, R. *et al.* Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. *J Neurosci* **27**, 832-839 (2007).
252. Bitencourt, R. M., Pamplona, F. A. & Takahashi, R. N. Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats. *Eur Neuropsychopharmacol* **18**, 849-859 (2008).
253. Panlilio, L. V. *et al.* Anandamide-induced behavioral disruption through a vanilloid-dependent mechanism in rats. *Psychopharmacology* **203**, 529-538 (2009).
254. Gordon, C. J. 24-hour control of body temperature in the rat: II. Diisopropyl fluorophosphate-induced hypothermia and hyperthermia. *Pharmacol Biochem Behav* **49**, 747-754 (1994).
255. Tzavara, E. T. *et al.* Endocannabinoids activate transient receptor potential vanilloid 1 receptors to reduce hyperdopaminergia-related hyperactivity: therapeutic implications. *Biol Psychiatry* **59**, 508-515 (2006).
256. Szállási, Á. *et al.* Vanilloid (capsaicin) receptors in the rat: distribution in the brain, regional differences in the spinal cord, axonal transport to the periphery, and depletion by systemic vanilloid treatment. *Brain Res* **703**, 175-183 (1995).
257. Caterina, M. J. & Julius, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* **24**, 487-517 (2001).

258. Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T. & Peters, J. A. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* **87**, 165-217 (2007).
259. Mandadi, S. *et al.* Locomotor networks are targets of modulation by sensory transient receptor potential vanilloid 1 and transient receptor potential melastatin 8 channels. *Neuroscience* **162**, 1377-1397 (2009).
260. Suri, A. & Szállási, Á. The emerging role of TRPV1 in diabetes and obesity. *Trends Pharmacol Sci* **29**, 29-36 (2008).
261. Kelava, L. *et al.* 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 (2022).
262. Zsiborás, C. *et al.* 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 (2018).
263. McGaraughty, S. *et al.* Antagonism of TRPV1 receptors indirectly modulates activity of thermoregulatory neurons in the medial preoptic area of rats. *Brain Res* **1268**, 58-67 (2009).
264. Reilly, R. M. *et al.* Pharmacology of modality-specific transient receptor potential vanilloid-1 antagonists that do not alter body temperature. *J Pharmacol Exp Ther* **342**, 416-428 (2012).
265. Yue, W. W. S., Yuan, L., Braz, J. M., Basbaum, A. I. & Julius, D. TRPV1 drugs alter core body temperature via central projections of primary afferent sensory neurons. *eLife* **11**, e80139 (2022).
266. Hermes, S. M., Andresen, M. C. & Aicher, S. A. Localization of TRPV1 and P2X3 in unmyelinated and myelinated vagal afferents in the rat. *J Chem Neuroanat* **72**, 1-7 (2016).
267. Patterson, L. M., Zheng, H., Ward, S. M. & Berthoud, H. R. Vanilloid receptor (VR1) expression in vagal afferent neurons innervating the gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* **311**, 277-287 (2003).
268. Berthoud, H. R., Blackshaw, L. A., Brookes, S. J. & Grundy, D. Neuroanatomy of extrinsic afferents supplying the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* **16 Suppl 1**, 28-33 (2004).
269. Janig, W. Neurobiology of visceral afferent neurons: neuroanatomy, functions, organ regulations and sensations. *Biol Psychol* **42**, 29-51 (1996).
270. Holzer, P. TRPV1 and the gut: from a tasty receptor for a painful vanilloid to a key player in hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* **500**, 231-241 (2004).
271. Ward, S. M., Bayguinov, J., Won, K. J., Grundy, D. & Berthoud, H. R. Distribution of the vanilloid receptor (VR1) in the gastrointestinal tract. *J Comp Neurol* **465**, 121-135 (2003).
272. Jones, M. W., Apkarian, A. V., Stevens, R. T. & Hodge, C. J., Jr. The spinothalamic tract: an examination of the cells of origin of the dorsolateral and ventral spinothalamic pathways in cats. *J Comp Neurol* **260**, 349-361 (1987).
273. Spencer, N. J., Zagorodnyuk, V., Brookes, S. J. & Hibberd, T. Spinal afferent nerve endings in visceral organs: recent advances. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **311**, G1056-1063 (2016).
274. Craig, A. D. & Kniffki, K. D. Spinothalamic lumbosacral lamina I cells responsive to skin and muscle stimulation in the cat. *J Physiol* **365**, 197-221 (1985).
275. Norrsell, U. Thermosensory defects after cervical spinal cord lesions in the cat. *Exp Brain Res* **35**, 479-494 (1979).
276. Stroman, P. W., Bosma, R. L. & Tsyben, A. Somatotopic arrangement of thermal sensory regions in the healthy human spinal cord determined by means of spinal cord functional MRI. *Magn Reson Med* **68**, 923-931 (2012).
277. Norrsell, U. Behavioural thermosensitivity after bilateral lesions of the lateral funiculi in the cervical spinal cord of the cat. *Exp Brain Res* **78**, 374-379 (1989).
278. Norrsell, U. Behavioural thermosensitivity after unilateral, partial lesions of the lateral funiculus in the cervical spinal cord of the cat. *Exp Brain Res* **78**, 369-373 (1989).
279. Vizin, R. C. L., Almeida, M. C., Soriano, R. N. & Romanovsky, A. A. Selection of preferred thermal environment and cold-avoidance responses in rats rely on signals transduced by the dorsal portion of the lateral funiculus of the spinal cord. *Temperature* **10**, 121-135 (2023).
280. Alkatout, I., Wedel, T., Pape, J., Possover, M. & Dhanawat, J. Review: pelvic nerves - from anatomy and physiology to clinical applications. *Transl Neurosci* **12**, 362-378 (2021).
281. Loukas, M. *et al.* A review of the thoracic splanchnic nerves and celiac ganglia. *Clin Anat* **23**, 512-522 (2010).
282. Brierley, S. M. *et al.* Differential chemosensory function and receptor expression of splanchnic and pelvic colonic afferents in mice. *J Physiol* **567**, 267-281 (2005).

283. Laurin, J., Pertici, V., Dousset, E., Marqueste, T. & Decherchi, P. Group III and IV muscle afferents: role on central motor drive and clinical implications. *Neuroscience* **290**, 543-551 (2015).
284. Ling, L. J. *et al.* Central projection of unmyelinated (C) primary afferent fibers from gastrocnemius muscle in the guinea pig. *J Comp Neurol* **461**, 140-150 (2003).
285. Light, A. R. *et al.* Dorsal root ganglion neurons innervating skeletal muscle respond to physiological combinations of protons, ATP, and lactate mediated by ASIC, P2X, and TRPV1. *J Neurophysiol* **100**, 1184-1201 (2008).
286. Jin, H. *et al.* Involvement of perivascular nerves and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in vascular responses to histamine in rat mesenteric resistance arteries. *Eur J Pharmacol* **680**, 73-80 (2012).
287. Scotland, R. S. *et al.* Vanilloid receptor TRPV1, sensory C-fibers, and vascular autoregulation: a novel mechanism involved in myogenic constriction. *Circ Res* **95**, 1027-1034 (2004).
288. Nybo, L., Rasmussen, P. & Sawka, M. N. Performance in the heat-physiological factors of importance for hyperthermia-induced fatigue. *Compr Physiol* **4**, 657-689 (2014).
289. Robergs, R. A., Ghiasvand, F. & Parker, D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R502-516 (2004).
290. Ali-Melkkila, T., Kanto, J. & Iisalo, E. Pharmacokinetics and related pharmacodynamics of anticholinergic drugs. *Acta Anaesthesiol Scand* **37**, 633-642 (1993).
291. Herbette, L. G., Vecchiarelli, M., Sartani, A. & Leonardi, A. Lercanidipine: short plasma half-life, long duration of action and high cholesterol tolerance. Updated molecular model to rationalize its pharmacokinetic properties. *Blood Press Suppl* **2**, 10-17 (1998).
292. Ohlson, K. B., Lindahl, S. G., Cannon, B. & Nedergaard, J. Thermogenesis inhibition in brown adipocytes is a specific property of volatile anesthetics. *Anesthesiology* **98**, 437-448 (2003).
293. Sessler, D. I., McGuire, J., Moayeri, A. & Hynson, J. Isoflurane-induced vasodilation minimally increases cutaneous heat loss. *Anesthesiology* **74**, 226-232 (1991).
294. Kimball, C., Luo, J., Yin, S., Hu, H. & Dhaka, A. The pore loop domain of TRPV1 is required for its activation by the volatile anesthetics chloroform and isoflurane. *Mol Pharmacol* **88**, 131-138 (2015).
295. Cui, Y. *et al.* Selective disruption of high sensitivity heat activation but not capsaicin activation of TRPV1 channels by pore turret mutations. *J Gen Physiol* **139**, 273-283 (2012).
296. Sosa-Pagan, J. O., Iversen, E. S. & Grandl, J. TRPV1 temperature activation is specifically sensitive to strong decreases in amino acid hydrophobicity. *Sci Rep* **7**, 549 (2017).
297. Voight, E. A. *et al.* Discovery of (R)-1-(7-chloro-2,2-bis(fluoromethyl)chroman-4-yl)-3-(3-methylisoquinolin-5-yl)urea (A-1165442): a temperature-neutral transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) antagonist with analgesic efficacy. *J Med Chem* **57**, 7412-7424 (2014).
298. Oka, H. *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of novel biphenyl-4-carboxamide derivatives as orally available TRPV1 antagonists. *Bioorg Med Chem* **26**, 3716-3726 (2018).
299. Watabiki, T. *et al.* Amelioration of neuropathic pain by novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist AS1928370 in rats without hyperthermic effect. *J Pharmacol Exp Ther* **336**, 743-750 (2011).
300. Brown, W. *et al.* Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics study in healthy subjects of oral NEO6860, a modality selective transient receptor potential vanilloid subtype 1 antagonist. *J Pain* **18**, 726-738 (2017).
301. Jessen, C. Thermal afferents in the control of body temperature. *Pharmacol Ther* **28**, 107-134 (1985).
302. Nomoto, S., Shibata, M., Iriki, M. & Riedel, W. Role of afferent pathways of heat and cold in body temperature regulation. *Int J Biometeorol* **49**, 67-85 (2004).
303. Bratincsák, A. & Palkovits, M. Evidence that peripheral rather than intracranial thermal signals induce thermoregulation. *Neuroscience* **135**, 525-532 (2005).
304. Jessen, C. Independent clamps of peripheral and central temperatures and their effects on heat production in the goat. *J Physiol* **311**, 11-22 (1981).
305. Nakamura, K. & Morrison, S. F. Central efferent pathways mediating skin cooling-evoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R127-136 (2007).
306. Tajino, K. *et al.* Cooling-sensitive TRPM8 is thermostat of skin temperature against cooling. *PLoS One* **6**, e17504 (2011).
307. Knowlton, W. M., Daniels, R. L., Palkar, R., McCoy, D. D. & McKemy, D. D. Pharmacological blockade of TRPM8 ion channels alters cold and cold pain responses in mice. *PLoS One* **6**, e25894 (2011).

308. Oláh, E. *et al.* 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 (2018).
309. Oláh, E. *et al.* POLAR study revisited: therapeutic hypothermia in severe brain trauma should not be abandoned. *J Neurotrauma* **38**, 2772-2776 (2021).
310. Liu, B. *et al.* TRPM8 is the principal mediator of menthol-induced analgesia of acute and inflammatory pain. *Pain* **154**, 2169-2177 (2013).
311. Nilius, B., Appendino, G. & Owsianik, G. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. *Pflügers Arch* **464**, 425-458 (2012).
312. Doerner, J. F., Gisselmann, G., Hatt, H. & Wetzel, C. H. Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. *J Biol Chem* **282**, 13180-13189 (2007).
313. Zurborg, S., Yurgionas, B., Jira, J. A., Caspani, O. & Heppenstall, P. A. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. *Nat Neurosci* **10**, 277-279 (2007).
314. Sawada, Y., Hosokawa, H., Hori, A., Matsumura, K. & Kobayashi, S. Cold sensitivity of recombinant TRPA1 channels. *Brain Res* **1160**, 39-46 (2007).
315. Kang, K. *et al.* Modulation of TRPA1 thermal sensitivity enables sensory discrimination in *Drosophila*. *Nature* **481**, 76-80 (2011).
316. Zhong, L. *et al.* Thermosensory and nonthermosensory isoforms of *Drosophila melanogaster* TRPA1 reveal heat-sensor domains of a thermoTRP Channel. *Cell Rep* **1**, 43-55 (2012).
317. Gallio, M., Ofstad, T. A., Macpherson, L. J., Wang, J. W. & Zuker, C. S. The coding of temperature in the *Drosophila* brain. *Cell* **144**, 614-624 (2011).
318. Prober, D. A. *et al.* Zebrafish TRPA1 channels are required for chemosensation but not for thermosensation or mechanosensory hair cell function. *J Neurosci* **28**, 10102-10110 (2008).
319. Chen, J. & Kym, P. R. TRPA1: the species difference. *J Gen Physiol* **133**, 623-625 (2009).
320. Julius, D. TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol* **29**, 355-384 (2013).
321. Volpato, G. P. *et al.* Inhaled hydrogen sulfide: a rapidly reversible inhibitor of cardiac and metabolic function in the mouse. *Anesthesiology* **108**, 659-668 (2008).
322. Kwiatkoski, M. *et al.* Hydrogen sulfide inhibits preoptic prostaglandin E2 production during endotoxemia. *Exp Neurol* **240**, 88-95 (2013).
323. Sabino, J. P. J. *et al.* Role of hydrogen sulfide in ventilatory responses to hypercapnia in the medullary raphe of adult rats. *Exp Physiol*, 1992-2001 (2021).
324. Skop, V., Liu, N., Guo, J., Gavrilova, O. & Reitman, M. L. The contribution of the mouse tail to thermoregulation is modest. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **319**, E438-446 (2020).
325. Whiteman, M. & Winyard, P. G. Hydrogen sulfide and inflammation: the good, the bad, the ugly and the promising. *Expert Rev Clin Pharmacol* **4**, 13-32 (2011).
326. Li, L. *et al.* Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation* **117**, 2351-2360 (2008).
327. Poole, D. P. *et al.* Transient receptor potential ankyrin 1 is expressed by inhibitory motoneurons of the mouse intestine. *Gastroenterology* **141**, 565-575 (2011).
328. Osterloh, M., Bohm, M., Kalbe, B., Osterloh, S. & Hatt, H. Identification and functional characterization of TRPA1 in human myoblasts. *Pflügers Arch* **468**, 321-333 (2016).
329. Stokes, A. *et al.* TRPA1 is a substrate for de-ubiquitination by the tumor suppressor CYLD. *Cell Signal* **18**, 1584-1594 (2006).
330. Chung, S. *et al.* Electronic cigarette vapor with nicotine causes airway mucociliary dysfunction preferentially via TRPA1 receptors. *Am J Respir Crit Care Med* **200**, 1134-1145 (2019).
331. Shigetomi, E., Tong, X., Kwan, K. Y., Corey, D. P. & Khakh, B. S. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat Neurosci* **15**, 70-80 (2011).
332. Wu, S. W., Lindberg, J. E. & Peters, J. H. Genetic and pharmacological evidence for low-abundance TRPV3 expression in primary vagal afferent neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **310**, R794-805 (2016).
333. Jin, C. *et al.* Shank3 regulates striatal synaptic abundance of Cyld, a deubiquitinase specific for Lys63-linked polyubiquitin chains. *J Neurochem* **150**, 776-786 (2019).
334. Kheradpezhoh, E., Choy, J. M. C., Daria, V. R. & Arabzadeh, E. TRPA1 expression and its functional activation in rodent cortex. *Open Biol* **7**, 160314 (2017).
335. Sun, B., Bang, S. I. & Jin, Y. H. Transient receptor potential A1 increase glutamate release on brain stem neurons. *Neuroreport* **20**, 1002-1006 (2009).
336. Yokoyama, T. *et al.* Allyl isothiocyanates and cinnamaldehyde potentiate miniature excitatory postsynaptic inputs in the supraoptic nucleus in rats. *Eur J Pharmacol* **655**, 31-37 (2011).

337. Bud Craig, A. D. Central neural substrates involved in temperature discrimination, thermal pain, thermal comfort, and thermoregulatory behavior. *Handb Clin Neurol* **156**, 317-338 (2018).
338. Bhatia, M. & Gaddam, R. R. Hydrogen sulfide in inflammation: a novel mediator and therapeutic target. *Antioxid Redox Signal* **34**, 1368-1377 (2021).
339. Ali, T. Y., Broughton Pipkin, F. & Khan, R. N. The effect of pH and ion channel modulators on human placental arteries. *PLoS One* **9**, e114405 (2014).
340. Balasubramanyan, N., Halla, T. R., Ghanayem, N. S. & Gordon, J. B. Endothelium-independent and -dependent vasodilation in alkalotic and acidotic piglet lungs. *Pediatr Pulmonol* **30**, 241-248 (2000).
341. Baretella, O., Xu, A. & Vanhoutte, P. M. Acidosis prevents and alkalosis augments endothelium-dependent contractions in mouse arteries. *Pflügers Arch* **466**, 295-305 (2014).
342. Dhaka, A. *et al.* TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. *J Neurosci* **29**, 153-158 (2009).
343. Szolcsányi, J. & Sándor, Z. Multimeric TRPV1 nociceptor: a target for analgesics. *Trends Pharmacol Sci* **33**, 646-655 (2012).
344. Yang, D. *et al.* Activation of TRPV1 by dietary capsaicin improves endothelium-dependent vasorelaxation and prevents hypertension. *Cell Metab* **12**, 130-141 (2010).
345. Wang, L.-H., Luo, M., Wang, Y., Galligan, J. J. & Wang, D. H. Impaired vasodilation in response to perivascular nerve stimulation in mesenteric arteries of TRPV1-null mutant mice. *J Hypertens* **24**, 2399-2408 (2006).
346. Ralevic, V. *et al.* Vanilloid receptors on capsaicin-sensitive sensory nerves mediate relaxation to methanandamide in the rat isolated mesenteric arterial bed and small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* **130**, 1483-1488 (2000).
347. Toda, N., Usui, H., Nishino, N. & Fujiwara, M. Cardiovascular effects of capsaicin in dogs and rabbits. *J Pharmacol Exp Ther* **181**, 512-521 (1972).
348. Bubb, K. J. *et al.* Activation of neuronal transient receptor potential vanilloid 1 channel underlies 20-hydroxyeicosatetraenoic acid-induced vasoactivity role for protein kinase A. *Hypertension* **62**, 426-433 (2013).
349. Tóth, A., Blumberg, P. M. & Boczán, J. Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1). *Vitam Horm* **81**, 389-419 (2009).
350. Wong, B. J. & Fieger, S. M. Transient receptor potential vanilloid type-1 (TRPV-1) channels contribute to cutaneous thermal hyperaemia in humans. *J Physiol* **588**, 4317-4326 (2010).
351. Pozsgai, G. *et al.* Topical acetone treatment induces neurogenic oedema on the sensitized mouse ear: an in vivo study using transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor knockout mice. *Inflamm Res* **56**, 459-467 (2007).
352. Garami, A., Balaskó, M., Székely, M., Solymár, M. & Pétervári, E. Fasting hypometabolism and refeeding hyperphagia in rats: effects of capsaicin desensitization of the abdominal vagus. *Eur J Pharmacol* **644**, 61-66 (2010).
353. Somjen, G. G. & Tombaugh, G. C. pH modulation of neuronal excitability and central nervous system functions. in *pH and brain function* (eds K. Kaila & B. R. Ransom) 373-393 (New York: Wiley-Liss, 1998).
354. Zygmunt, P. M. *et al.* Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**, 452-457 (1999).
355. Weihe, W. H. The effect of temperature on the action of drugs. *Annu Rev Pharmacol* **13**, 409-425 (1973).
356. Liu, B., Hui, K. & Qin, F. Thermodynamics of heat activation of single capsaicin ion channels VR1. *Biophys J* **85**, 2988-3006 (2003).
357. Brauchi, S., Orio, P. & Latorre, R. Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 15494-15499 (2004).
358. Thapa, D. *et al.* Dysfunctional TRPM8 signalling in the vascular response to environmental cold in ageing. *eLife* **10**, e70153 (2021).
359. Bruttig, S. P. & Roberts, D. E. Cold-induced changes in arterial sensitivity <https://apps.dtic.mil/sti/citations/ADA239493> (1991).
360. Qin, G., Chen, L., Sjöberg, T. & Steen, S. How to avoid severe coronary vasoconstriction in potassium induced cardioplegia. *Scand Cardiovasc J* **52**, 344-347 (2018).
361. Shepherd, J. T., Rusch, N. J. & Vanhoutte, P. M. Effect of cold on the blood vessel wall. *Gen Pharmacol* **14**, 61-64 (1983).
362. Marjanovic, M. & Willis, J. S. ATP dependence of Na(+)-K+ pump of cold-sensitive and cold-tolerant mammalian red blood cells. *J Physiol* **456**, 575-590 (1992).

363. Murphy, J. C., Carrier, O., Jr. & Sahadi, J. Effects of temperature on responses of fresh and refrigerated perfused blood vessels. *Am J Physiol* **225**, 1187-1191 (1973).
364. Clark, N. *et al.* The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor protects against the onset of sepsis after endotoxin. *FASEB J* **21**, 3747-3755 (2007).
365. Wang, Y., Novotny, M., Quaiserova-Mocko, V., Swain, G. M. & Wang, D. H. TRPV1-mediated protection against endotoxin-induced hypotension and mortality in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**, R1517-1523 (2008).
366. Murai, M. *et al.* SA13353 (1-[2-(1-Adamanty)ethyl]-1-pentyl-3-[3-(4-pyridyl)propyl]urea) inhibits TNF-alpha production through the activation of capsaicin-sensitive afferent neurons mediated via transient receptor potential vanilloid 1 in vivo. *Eur J Pharmacol* **588**, 309-315 (2008).
367. Wang, S., Davis, B. M., Zwick, M., Waxman, S. G. & Albers, K. M. Reduced thermal sensitivity and Nav1.8 and TRPV1 channel expression in sensory neurons of aged mice. *Neurobiol Aging* **27**, 895-903 (2006).
368. Bergman, E., Fundin, B. T. & Ulfhake, B. Effects of aging and axotomy on the expression of neurotrophin receptors in primary sensory neurons. *J Comp Neurol* **410**, 368-386 (1999).
369. Stewart, L., Grifiss, J. M., Jarvis, G. A. & Way, L. W. Elderly patients have more severe biliary infections: influence of complement-killing and induction of TNFalpha production. *Surgery* **143**, 103-112 (2008).
370. Watanabe, E. *et al.* Extremely high interleukin-6 blood levels and outcome in the critically ill are associated with tumor necrosis factor- and interleukin-1-related gene polymorphisms. *Crit Care Med* **33**, 89-97 (2005).
371. McConnell, K. W. *et al.* The role of heat shock protein 70 in mediating age-dependent mortality in sepsis. *J Immunol* **186**, 3718-3725 (2011).
372. Turnbull, I. R. *et al.* Effects of aging on the immunopathologic response to sepsis. *Crit Care Med* **37**, 1018-1023 (2009).
373. Eskilsson, A. *et al.* Immune-induced fever is mediated by IL-6 receptors on brain endothelial cells coupled to STAT3-dependent induction of brain endothelial prostaglandin synthesis. *J Neurosci* **34**, 15957-15961 (2014).
374. Rummel, C., Matsumura, K. & Luheshi, G. N. Circulating IL-6 contributes to peripheral LPS-induced mPGES-1 expression in the rat brain. *Brain Res Bull* **86**, 319-325 (2011).
375. Lotz, M., Vaughan, J. H. & Carson, D. A. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* **241**, 1218-1221 (1988).
376. Boichot, E., Germain, N., Emonds-Alt, X., Advenier, C. & Lagente, V. Effects of SR 140333 and SR 48968 on antigen and substance P-induced activation of guinea-pig alveolar macrophages. *Clin Exp Allergy* **28**, 1299-1305 (1998).
377. Sio, S. W., Ang, S. F., Lu, J., Moochhala, S. & Bhatia, M. Substance P upregulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E metabolite by activating ERK1/2 and NF-kappaB in a mouse model of burn-induced remote acute lung injury. *J Immunol* **185**, 6265-6276 (2010).
378. Bost, K. L., Breeding, S. A. & Pascual, D. W. Modulation of the mRNAs encoding substance P and its receptor in rat macrophages by LPS. *Reg Immunol* **4**, 105-112 (1992).
379. Ho, W. Z., Lai, J. P., Zhu, X. H., Uvaydova, M. & Douglas, S. D. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J Immunol* **159**, 5654-5660 (1997).
380. Barrios-Rodiles, M., Tiraloche, G. & Chadee, K. Lipopolysaccharide modulates cyclooxygenase-2 transcriptionally and posttranscriptionally in human macrophages independently from endogenous IL-1 beta and TNF-alpha. *J Immunol* **163**, 963-969 (1999).
381. Maier, T., Guell, M. & Serrano, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett* **583**, 3966-3973 (2009).
382. Park, Y. K., Hong, H. & Jang, B. C. Transcriptional and translational regulation of COX-2 expression by cadmium in C6 glioma cells. *Int J Mol Med* **30**, 960-966 (2012).
383. Oka, T. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: the role of prostaglandin E (EP) receptors. *Front Biosci* **9**, 3046-3057 (2004).
384. Romanovsky, A. A., Ivanov, A. I. & Karman, E. K. Blood-borne, albumin-bound prostaglandin E2 may be involved in fever. *Am J Physiol* **276**, R1840-1844 (1999).
385. Gallicchio, M., Benetti, E., Rosa, A. C. & Fantozzi, R. Tachykinin receptor modulation of cyclooxygenase-2 expression in human polymorphonuclear leucocytes. *Br J Pharmacol* **156**, 486-496 (2009).
386. Koon, H. W. *et al.* Substance P stimulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 expression through JAK-STAT activation in human colonic epithelial cells. *J Immunol* **176**, 5050-5059 (2006).

387. Gallicchio, M. *et al.* Substance P-induced cyclooxygenase-2 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Br J Pharmacol* **147**, 681-689 (2006).
388. Nilsson, A. *et al.* Inflammation-induced anorexia and fever are elicited by distinct prostaglandin dependent mechanisms, whereas conditioned taste aversion is prostaglandin independent. *Brain Behav Immun* **61**, 236-243 (2017).
389. Yang, W. Z. *et al.* Parabrachial neuron types categorically encode thermoregulation variables during heat defense. *Sci Adv* **6**, eabb9414 (2020).
390. Rathner, J. A., Madden, C. J. & Morrison, S. F. Central pathway for spontaneous and prostaglandin E2-evoked cutaneous vasoconstriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**, R343-354 (2008).
391. Mercer, L. D., Le, V. Q., Nunan, J., Jones, N. M. & Beart, P. M. Direct visualization of cholecystokinin subtype2 receptors in rat central nervous system using anti-peptide antibodies. *Neurosci Lett* **293**, 167-170 (2000).
392. Micevych, P. E., Park, S. S., Akesson, T. R. & Elde, R. q. Distribution of cholecystokinin-immunoreactive cell bodies in the male and female rat: I. Hypothalamus. *J Comp Neurol* **255**, 124-136 (1987).
393. Gaudreau, P., Quirion, R., St-Pierre, S. & Pert, C. B. Characterization and visualization of cholecystokinin receptors in rat brain using [3H]pentagastrin. *Peptides* **4**, 755-762 (1983).
394. Tsukahara, S. & Yamanouchi, K. Distribution of glutamic acid decarboxylase, neurotensin, enkephalin, neuropeptide Y, and cholecystokinin neurons in the septo-preoptic region of male rats. *J Reprod Dev* **49**, 67-77 (2003).
395. Honda, T., Wada, E., Battey, J. F. & Wank, S. A. Differential Gene Expression of CCK(A) and CCK(B) Receptors in the Rat Brain. *Mol Cell Neurosci* **4**, 143-154 (1993).
396. Akagi, K., Nagao, T. & Urushidani, T. Calcium oscillations in single cultured Chinese hamster ovary cells stably transfected with a cloned human cholecystokinin (CCK)B receptor. *Jpn J Pharmacol* **75**, 33-42 (1997).
397. Pommier, B. *et al.* Further evidence that the CCK2 receptor is coupled to two transduction pathways using site-directed mutagenesis. *J Neurochem* **85**, 454-461 (2003).
398. Colucci, R. *et al.* Gastrin promotes human colon cancer cell growth via CCK-2 receptor-mediated cyclooxygenase-2 induction and prostaglandin E2 production. *Br J Pharmacol* **144**, 338-348 (2005).
399. Slice, L. W., Hodikian, R. & Zhukova, E. Gastrin and EGF synergistically induce cyclooxygenase-2 expression in Swiss 3T3 fibroblasts that express the CCK2 receptor. *J Cell Physiol* **196**, 454-463 (2003).
400. Hinz, B. *et al.* Dipyron elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. *FASEB J* **21**, 2343-2351 (2007).
401. Malvar Ddo, C. *et al.* Dipyron metabolite 4-MAA induces hypothermia and inhibits PGE2 -dependent and -independent fever while 4-AA only blocks PGE2 -dependent fever. *Br J Pharmacol* **171**, 3666-3679 (2014).
402. Gamache, D. A. & Ellis, E. F. Effect of dexamethasone, indomethacin, ibuprofen, and probenecid on carrageenan-induced brain inflammation. *J Neurosurg* **65**, 686-692 (1986).
403. Chan, P. H. *et al.* Induction of brain edema following intracerebral injection of arachidonic acid. *Ann Neurol* **13**, 625-632 (1983).
404. Cohen, O., Zylber-Katz, E., Caraco, Y., Granit, L. & Levy, M. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of dipyron metabolites after a single oral dose of dipyron. *Eur J Clin Pharmacol* **54**, 549-553 (1998).
405. Rogosch, T. *et al.* Novel bioactive metabolites of dipyron (metamizol). *Bioorg Med Chem* **20**, 101-107 (2012).
406. Aguiar, F. A. *et al.* Simultaneous determination of dipyron metabolites in rat hypothalamus, cerebrospinal fluid and plasma samples by LC-MS/MS. *Bioanalysis* **5**, 2631-2645 (2013).
407. Jolliet, P. *et al.* Blood-to-brain transfer of various oxicams: effects of plasma binding on their brain delivery. *Pharm Res* **14**, 650-656 (1997).
408. Renner, B. *et al.* Absorption and distribution of etoricoxib in plasma, CSF, and wound tissue in patients following hip surgery—a pilot study. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **381**, 127-136 (2010).
409. Riendeau, D. *et al.* Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther* **296**, 558-566 (2001).
410. Saita, Y. *et al.* Characterization of YM022: its CCKB/gastrin receptor binding profile and antagonism to CCK-8-induced Ca²⁺ mobilization. *Eur J Pharmacol* **269**, 249-254 (1994).

411. Kitano, M., Norlen, P., Ding, X. Q., Nakamura, S. & Hakanson, R. Long-lasting cholecystokinin(2) receptor blockade after a single subcutaneous injection of YF476 or YM022. *Br J Pharmacol* **130**, 699-705 (2000).
412. McCleane, G. *Cholecystokinin and Its Antagonists in Pain Management*. (The Haworth Press, 2006).
413. Matsumura, K. *et al.* Brain endothelial cells express cyclooxygenase-2 during lipopolysaccharide-induced fever: light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J Neurosci* **18**, 6279-6289 (1998).
414. Elmquist, J. K. *et al.* Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *J Comp Neurol* **381**, 119-129 (1997).
415. Molina-Holgado, E., Ortiz, S., Molina-Holgado, F. & Guaza, C. Induction of COX-2 and PGE(2) biosynthesis by IL-1beta is mediated by PKC and mitogen-activated protein kinases in murine astrocytes. *Br J Pharmacol* **131**, 152-159 (2000).
416. Lacroix, S. & Rivest, S. Effect of acute systemic inflammatory response and cytokines on the transcription of the genes encoding cyclooxygenase enzymes (COX-1 and COX-2) in the rat brain. *J Neurochem* **70**, 452-466 (1998).
417. Crosby, K. M. *et al.* Cholecystokinin switches the plasticity of GABA synapses in the dorsomedial hypothalamus via astrocytic ATP release. *J Neurosci* **38**, 8515-8525 (2018).
418. Hösli, E. & Hösli, L. Binding of cholecystokinin, bombesin and muscarine to neurons and astrocytes in explant cultures of rat central nervous system: autoradiographic and immunohistochemical studies. *Neuroscience* **61**, 63-72 (1994).
419. Zeng, Q., Ou, L., Wang, W. & Guo, D.-Y. Gastrin, cholecystokinin, signaling, and biological activities in cellular processes. *Front Endocrinol* **11**, 112 (2020).
420. Shiraishi, T. CCK as a central satiety factor: behavioral and electrophysiological evidence. *Physiol Behav* **48**, 879-885 (1990).
421. Kow, L. M. & Pfaff, D. W. CCK-8 stimulation of ventromedial hypothalamic neurons in vitro: a feeding-relevant event? *Peptides* **7**, 473-479 (1986).
422. Fortier, M. E. *et al.* The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R759-766 (2004).
423. Vaudry, D. *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* **52**, 269-324 (2000).
424. Miampamba, M. *et al.* Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and PACAP type 1 receptor in the rat gastric and colonic myenteric neurons. *Regul Pept* **105**, 145-154 (2002).
425. Banks, W. A., Kastin, A. J., Komaki, G. & Arimura, A. Passage of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide1-27 and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide1-38 across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* **267**, 690-696 (1993).
426. Garami, A., Pákai, E., Rumbus, Z. & Solymár, M. The role of PACAP in the regulation of body temperature. in *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP* (eds D. Reglődi & A. Tamás) 239-257 (Springer International Publishing, 2016).
427. Joo, K. M. *et al.* Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *J Comp Neurol* **476**, 388-413 (2004).
428. Thornhill, J., Jugnauth, A. & Halvorson, I. Brown adipose tissue thermogenesis evoked by medial preoptic stimulation is mediated via the ventromedial hypothalamic nucleus. *Can J Physiol Pharmacol* **72**, 1042-1048 (1994).
429. Martinez, C. *et al.* Anti-inflammatory role in septic shock of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 1053-1058 (2002).
430. Rumbus, Z. & Garami, A. Fever, hypothermia, and mortality in sepsis. *Temperature* **6**, 101-103 (2019).
431. Fonseca, M. T. *et al.* Spontaneous hypothermia in human sepsis is a transient, self-limiting, and nonterminal response. *J Appl Physiol* **120**, 1394-1401 (2016).
432. Eppensteiner, J. *et al.* Damage- and pathogen-associated molecular patterns play differential roles in late mortality after critical illness. *JCI Insight* **4** (2019).
433. Joshi, P. C., Poole, G. V., Sachdev, V., Zhou, X. & Jones, Q. Trauma patients with positive cultures have higher levels of circulating macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **107**, 13-20 (2000).

434. Calandra, T. *et al.* Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med* **6**, 164-170 (2000).
435. Gao, L. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor in acute lung injury: expression, biomarker, and associations. *Transl Res* **150**, 18-29 (2007).
436. Ashcroft, G. S. *et al.* Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *J Clin Invest* **111**, 1309-1318 (2003).
437. Hsieh, Y. C. *et al.* Downregulation of migration inhibitory factor is critical for estrogen-mediated attenuation of lung tissue damage following trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**, L1227-1232 (2007).
438. Aloisi, A. M. *et al.* Gender-related effects of chronic non-malignant pain and opioid therapy on plasma levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Pain* **115**, 142-151 (2005).
439. Vermeulen, A., Kaufman, J. M., Goemaere, S. & van Pottelberg, I. Estradiol in elderly men. *Aging Male* **5**, 98-102 (2002).
440. Schroder, J., Kahlke, V., Staubach, K. H., Zabel, P. & Stuber, F. Gender differences in human sepsis. *Arch Surg* **133**, 1200-1205 (1998).
441. Kong, Y. Z., Chen, Q. & Lan, H. Y. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) as a stress molecule in renal inflammation. *Int J Mol Sci* **23**, 4908 (2022).
442. Lan, H. Y. Role of macrophage migration inhibition factor in kidney disease. *Nephron Exp Nephrol* **109**, e79-83 (2008).
443. Xing, Y. *et al.* MIF/CD74 axis is a target for metformin therapy in diabetic podocytopathy - real world evidence. *Endokrynol Pol* **69**, 264-268 (2018).
444. Matsumoto, K. & Kanmatsuse, K. Urinary levels of macrophage migration inhibitory factor in patients with IgA nephropathy. *Nephron* **92**, 309-315 (2002).
445. Djudjaj, S. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor limits renal inflammation and fibrosis by counteracting tubular cell cycle arrest. *J Am Soc Nephrol* **28**, 3590-3604 (2017).
446. Stoppe, C. *et al.* The protective role of macrophage migration inhibitory factor in acute kidney injury after cardiac surgery. *Sci Transl Med* **10**, eaan4886 (2018).
447. Leng, L. *et al.* A small-molecule macrophage migration inhibitory factor antagonist protects against glomerulonephritis in lupus-prone NZB/NZW F1 and MRL/lpr mice. *J Immunol* **186**, 527-538 (2011).

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 hyperkinesia. *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.
IF: 6,344 Q: D1 Hivatkozások (ebből független): 58 (44) Referenciaszám: 167
*osztott elsőszervezők
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, Mikó 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.
IF: 6,523 Q: D1 Hivatkozások (ebből független): 16 (10) Referenciaszám: 165
*osztott elsőszervezők
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, Szentés 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, Pármiczky 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
 *eredeti adatokat is tartalmaz; #osztott levelezőszerzők
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 alapkutatóstól 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. Szerkesztőségi 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.

- *MTMT rövid közleményként tünteti fel
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 Reglódi 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
- *MTMT összefoglaló közleményként tünteti fel

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, Szöke 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-Bátai R, Steen E, Szöke E, Sándor Z, Solymár M, **Garami A**, Orvos P, Tálósi 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, Kéring 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 AI, Szentes N, Tékus V, Payrits M, Szöke 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 kihűlés jelentősége és kísérletes modellezése. *Egészség-Akadémia* **13**:113-118.
42. Lőrincz A, Csákvári Zs, Máthé T, Oberritter Zs, **Garami A**, Józsa G (2022). Gyermekkori, áramégés okozta kézujjsérülések ellátásáról és késői szövödményeiről. *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, Órfi 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, Pármiczky 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, Pármiczky 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, Pótó L, Mátrai P, Hegyi P, Tenk J, **Garami A**, Illés A, Solymár M, Pétervári E, Szűcs Á, Pármiczky 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, Kővári 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 Czako 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, Pótó 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, Pótó 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, Pótó 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, Czako 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, Fábián A, Szepes Z, Vincze Á, Tenk J, Balaskó M, Rumbus Z, **Garami A**, Csupor 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. Szabéni 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, Kéring 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, Sebök 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 É, Fehérvári P, **Garami A**, Dembrowszky 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.
*MTMT szakkékként tünteti fel
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 Szelényi 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

| Garami András tudományos és oktatási közleményeinek összefoglalása MTA V. Orvostudományi Osztály (2023.11.27) | | | | |
|---|-----------|-------------|---------------------------|----------|
| Tudományos és oktatási közlemények | Szám | | Hivatkozások ¹ | |
| | Összesen | Részletezve | Független | Összesen |
| I. Folyóiratcikk ² | 87 | --- | --- | --- |
| szakcikk, nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű | --- | 59 | 1670 | 1971 |
| szakcikk, hazai idegen nyelvű | --- | 2 | 9 | 18 |
| szakcikk, magyar nyelvű | --- | 1 | 0 | 0 |
| szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³ | --- | 0 | 0 | 0 |
| összefoglaló közlemény | --- | 20 | 666 | 732 |
| rövid közlemény | --- | 5 | 151 | 170 |
| II. Könyv | 0 | --- | --- | --- |
| a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként | 0 | --- | --- | --- |
| idegen nyelvű | --- | 0 | 0 | 0 |
| magyar nyelvű | --- | 0 | 0 | 0 |
| aa) Felsőoktatási tankönyv | --- | 0 | 0 | 0 |
| b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként | 0 | --- | --- | --- |
| idegen nyelvű | --- | 0 | --- | --- |
| magyar nyelvű | --- | 0 | --- | --- |
| bb) Felsőoktatási tankönyv | --- | 0 | --- | --- |
| III. Könyvrészlet | 5 | --- | --- | --- |
| idegen nyelvű | --- | 2 | 6 | 9 |
| magyar nyelvű | --- | 0 | 0 | 0 |
| cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet | --- | 3 | 0 | 0 |
| IV. Konferenciaközlemény ⁴ | 0 | --- | 0 | 0 |
| Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc) | --- | 3 | 0 | 0 |
| Tudományos közlemények összesen (I.-IV) | --- | 89 | 2502 | 2900 |
| Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.) | 92 | --- | 2502 | 2900 |

| V. További tudományos művek | 18 | --- | --- | --- |
|---|-----------|-----|-----|-----|
| További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkek és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkek is | --- | 16 | 44 | 54 |
| Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok | --- | 2 | 0 | 0 |
| Oltalmak (szabadalmak) | --- | 0 | 0 | 0 |

| VI. Hivatkozott absztraktok ⁵ | 0 | --- | 0 | 0 |
|---|-----------|-----|------|------|
| Összes hivatkozás ¹ | --- | --- | 2546 | 2954 |
| Hirsch index ⁶ | 30 | --- | --- | --- |
| g index ⁶ | 53 | --- | --- | --- |

| Speciális tudományometriai adatok | Száma | Összes hivatkozás |
|---|--------------|--------------------------|
| Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ² | 11 | 567 |
| Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ² | 18 | 229 |
| A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2010) teljes tudományos folyóiratcikkek száma | 75 | 1968 |
| Az utolsó 10 év (2013 - 2023) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma | 70 | 1562 |
| A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában) | 431 | 14,59% |
| Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben | --- | 141 |
| Jelentés, guideline | 0 | 0 |
| Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷ | 0 | 0 |

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 Kórélettani 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 segítségével 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.