

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie živočichů

Akademie věd České republiky

Fyziologický ústav, v.v.i.

Oddělení funkční morfologie

**Modulace synaptického přenosu nociceptivní
signalizace
v zadním rohu míšním**

Mgr. Diana Špicarová

Dizertační práce

2010

Školitel: MUDr. Jiří Paleček, CSc.
Akademie věd České republiky
Fyziologický ústav, v.v.i.
Oddělení funkční morfologie

Je mou milou povinností poděkovat MUDr. Jiřímu Palečkovi, CSc. za odborné vedení dizertační práce, kterou mi umožnil vypracovat na Oddělení funkční morfologie. Vážím si nejen jeho odborných kvalit, ale rovněž jeho vstřícnosti a trpělivého přístupu po celou dobu naší spolupráce. Můj další dík patří Ing. Ivanu Dittertovi, CSc. za technickou pomoc při experimentech.

Rovněž děkuji nadacím Český literární fond a „Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových“ za poskytnutí nadačních příspěvků, díky kterým jsem mohla část výsledků zahrnutých do dizertace osobně prezentovat na XXXVI. mezinárodní konferenci fyziologických společností IUPS (International Union of Physiological Sciences).

Velmi ráda bych také poděkovala svému partnerovi Jiřímu za pochopení, které měl v období, kdy tato práce vznikala.

Seznam zkratk:

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol propionová kyselina
ATP	adenozintrifosfát
BCTC	N-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl) tetrahydro-pyrazine-1(2H)-carbox-amide
BDNF	mozkový neurotrofní faktor
BK	bradykinin
BSA	hovězí sérový albumin
CaMKII	proteinkináza závislá na Ca^{2+} a kalmodulinu
CB	kanabinoidní
CGRP	peptid odvozený od genu pro kalcitonin
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxalin
CNS	centrální nervová soustava
COX	cyklooxygenáza
DMSO	dimethylsulfoxid
EPSC	excitační postsynaptický proud
ERK	extracelulárním signálem aktivovaná kináza
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GDNF	gliální nervový růstový faktor
GFAP	kyselý gliální fibrilární protein
IASP	Mezinárodní organizace pro výzkum bolesti
IGF	inzulinu podobný růstový faktor
IL	interleukin
IPSC	inhibiční postsynaptický proud
IR	inzulinový receptor
IRS	substrát inzulínového receptoru
LTD	dlouhodobá deprese
LTP	dlouhodobá potenciace
mEPSC	miniaturní excitační postsynaptický proud
NGF	nervový růstový faktor
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
OLDA	<i>N</i> -oleoyldopamin
PG	prostaglandin
PI3K	fosfatidylinositol 3-kináza
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PMA	forbol-12-myristát-13-acetát
PTK	protein-tyrozinkináza
PWL	paw withdrawal latency
SEM	standardní odchylka aritmetického průměru
sEPSC	spontánní excitační postsynaptický proud
SP	substance P
TNF α	tumor nekrotizující faktor α
TRPV1	transient receptor potential vanilloid 1
VR1	vaniloidní receptor 1

OBSAH

ÚVOD	8
LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
1. Anatomické a fyziologické mechanismy nocicepce	10
1.1. Detekce nociceptivního podnětu a signalizace do míchy	10
1.1.1. Nociceptivní neurony spinálních ganglií	10
1.1.2. Molekulární markery neuronů spinálních ganglií s malým průměrem	11
1.2. Nociceptivní signalizace na míšní úrovni	13
1.2.1. Rexedovo laminární členění šedé hmoty míšní	13
1.2.2. Neurony zadního rohu míšního	15
1.2.3. Ascendentní dráhy	16
1.2.4. Synaptický přenos v zadním rohu míšním	17
1.2.4.1. AMPA receptory	18
1.2.4.2. Distribuce AMPA receptorů v zadním rohu míšním	19
1.2.4.3. Modulace AMPA receptorů inzulinem	20
2. Patologické bolestivé stavy	21
2.1. Periferní senzitivace a zánětlivá bolest	22
2.1.1. TRPV1 receptor jako integrátor procesů periferního zánětu	24
2.1.2. Úloha prozánětlivých cytokinů v periferní senzitivaci	25
2.2. Centrální senzitivace	26
2.2.1. Modulace synaptického přenosu na míšní úrovni	27
2.2.2. Mechanizmy centrální senzitivace	28
2.2.3. Změny inhibičního systému a reorganizace synaptických kontaktů	31
2.2.4. Účinky prozánětlivých cytokinů na míšní úrovni	32
3. Úloha míšních TRPV1 receptorů v modulaci bolesti	33
3.1. Vaniloidní TRPV1 receptor	35
3.2. Endogenní agonisté TRPV1 receptorů	37
3.3. Distribuce TRPV1 receptorů v míše	39
3.4. Kolokalizace TRPV1 pozitivních primárních aferentních vláken s peptidy	40
3.5. Modulace synaptického přenosu TRPV1 receptory v zadním rohu míšním	41
3.6. Úloha míšních TRPV1 receptorů v patologických stavech	44
CÍLE PRÁCE	47

METODY	48
1. Elektrofyzilogické metody	48
1.1. Příprava akutních míšních řezů	48
1.2. Metoda terčíkového zámku (patch clamp)	49
1.2.1. Specifika snímání mEPSC modulovaných pomocí OLDA a TNF α	50
1.2.2. Specifika snímání eEPSC modulovaných inzulinem	50
1.3. Složení použitých roztoků a rozpouštění látek	51
1.4. Analýza dat	52
2. Periferní neurogenní zánět jako model patologického stavu	53
3. Behaviorální metody	53
3.1. Implantace intratekálního katetru	53
3.2. Testování citlivosti zvířat k tepelným podnětům	54
VÝSLEDKY	55
1. Úloha endogenního agonisty TRPV1 receptorů <i>N</i> -oleoyldopaminu (OLDA) v modulaci nociceptivní signalizace na míšní úrovni	55
1.1. Frekvence mEPSC za kontrolních a experimentálních podmínek	55
1.2. Aplikace OLDA zvýšila frekvenci mEPSC na neuronech zadního rohu míšního	56
1.3. Odpověď vyvolaná aplikací OLDA byla zablokována antagonisty TRPV1 receptorů	57
1.4. Aplikace nízké koncentrace OLDA zvýšila po aktivaci PKC frekvenci mEPSC	59
1.5. Aplikace nízké koncentrace OLDA zvýšila po působení bradykininu frekvenci mEPSC	62
1.6. Během periferního zánětu evokovala aplikace nízké koncentrace OLDA zvýšení frekvence mEPSC na neuronech zadního rohu míšního	64
1.7. Intratekální aplikace OLDA vyvolala tepelnou hyperalgezi	66
2. Úloha cytokinu TNF α v regulaci nociceptivních synapsí	67
2.1. Aplikace nízké koncentrace OLDA zvýšila po působení TNF α frekvenci mEPSC	67
2.2. Inkubace neuronů v TNF α zvýšila základní frekvenci mEPSC	69
3. Modulace evokovaných AMPA proudů inzulinem v zadním rohu míšním	71
3.1. Izolace AMPA EPSC na neuronech v superficiální oblasti zadního rohu míšního	71

3.2. Aplikace inzulínu snížila velikost AMPA EPSC	72
3.3. Aplikace lavendustinu A zamezila vzniku inzulínem stimulovaného snížení velikosti AMPA EPSC	75
DISKUZE	77
1. Regulace synaptického přenosu nociceptivní signalizace aplikací OLDA	77
1.1. Účinek a specifická aktivace TRPV1 receptorů pomocí OLDA	78
1.2. Účinek aplikace forbolesteru a bradykininu	79
1.3. Ovlivnění mEPSC teplotou lázně	81
1.4. Úloha míšních TRPV1 receptorů při periferním zánětu	82
2. Úloha cytokinu TNF α v nociceptivním synaptickém přenosu v míše	83
3. Modulace excitačních postsynaptických AMPA proudů inzulínem v zadním rohu míšním	87
3.1. Vývojové změny periferních aferentních vláken a AMPA receptorů	88
3.2. Exprese AMPA receptorů a inzulínem navozené snížení AMPA proudů	89
3.3. Molekulární podstata inzulínem stimulované deprese AMPA proudů	91
3.4. Úloha PTK v inzulínem stimulované depresi AMPA EPSC v míše	92
3.5. Modulace synaptického přenosu inzulínem na míšní úrovni a jeho úloha v nocicepci	93
ZÁVĚR	94
SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORKY	96
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	97
PŘÍLOHA: Autorské publikace v celém rozsahu	115

ÚVOD

Schopnost vnímat bolest se vyvinula za účelem ochrany tkání před závažným poraněním a narušením celistvosti organismu. Bolest je vždy nepříjemná nejenom sensorická, ale i emocionální zkušenost, která upozorňuje na možné nebo skutečné porušení tkáně. Naučí jedince vyvarovat se podnětům, které pro něj mohou být nebezpečné. Stejný podnět však může v odlišných podmínkách vyvolat různě intenzivní bolest. Navíc každý jednotlivec může při působení stejného podnětu vnímat bolest odlišně. Poměrování velikosti bolesti je komplikováno jejím subjektivním charakterem. Každý člověk se naučí označovat bolestivé vjemy většinou na základě zkušeností s poraněním tkání v raném stádiu života. Zatímco vnímání bolesti umožňují různá centra v mozku, veškeré procesy od detekce podnětu v periferních tkáních až po přivedení informace o jeho přítomnosti do mozku shrnuje pojem nocicepce. Nociceptivní signalizace přítom nemusí nezbytně vyústit ve vjem bolesti.

Bolest je také jedním z příznaků mnoha onemocnění, která organismus varuje před ohrožením. V klinické praxi se lokalizace a charakteru bolesti využívá ke stanovení diagnózy a její odeznění poukazuje na úspěšnost léčby. Bolest ovšem může přestat plnit ochrannou funkci, nemusí být pouhým symptomem onemocnění, ale může se stát nemocí samotnou. K dysfunkci nociceptivní signalizace může dojít na jakékoliv úrovni přenosu a jejím výsledkem je patologická bolest. Na rozdíl od původní funkce bolesti má velmi nepříznivý vliv na organismus, obtížně se tlumí a dlouhodobě snižuje kvalitu života. Za účelem zavedení účinnějších metod léčby patologické bolesti je výzkum nocicepce a bolesti směřován k detailnímu poznání mechanismů fyziologické nociceptivní signalizace a hlavně jejich změn za patologických podmínek. Byla vyvinuta řada zvířecích modelů patologických stavů bolesti, jejichž využívání je nezbytné k pochopení procesů probíhajících u člověka.

Jako u ostatních sensorických modalit jsou potenciálně poškozující podněty detekovány pomocí specifických receptorů, v tomto případě nociceptorů, které převádějí energii podnětu na akční potenciály. Nociceptory na rozdíl od většiny receptorů jiných modalit často reagují až na velmi intenzivní podnět a nedochází u nich k adaptaci na přetrvávající podnět, naopak se k němu stávají citlivějšími.

Informace se od periferního nociceptoru šíří do zadního rohu míšního akčním potenciálem. V míše pak dochází k synaptickému přenosu nociceptivní signalizace na postsynaptické neurony. Informace o přítomnosti podnětu je zde předána z primárního na sekundární neuron a následně šířena po axonech projekčních neuronů opět v podobě akčních potenciálů do vyšších etází centrální nervové soustavy. K předání informace z primárního aferentního neuronu na sekundární míšní neuron zajišťuje nejrozšířenější excitační neuropřenašeč glutamát uvolňovaný z presynaptické části v závislosti na vtoku Ca^{2+} iontů do cytoplazmy při depolarizaci membrány. „Rychlý“ excitační přenos zprostředkovávají v postsynaptické membráně umístěné ionotropní AMPA a NMDA receptory, „pomalý“ přenos zajišťují metabotropní receptory. Synaptické spoje sice mírně zpomalují rychlost toku informace z periferie do mozku, ale umožňují uplatnění celé plejády významných regulačních vlivů na nociceptivní signalizaci. Modulace je umožněna uvolňováním dalších přenašečů a neuromodulátorů a přítomností mnoha různých receptorů a kanálů umístěných v synapsích, jejichž účinnost je závislá na aktivaci proteinkináz a dalších enzymů. Důležité jsou fosforylace receptorů, které regulují jejich biofyzikální vlastnosti a lokalizaci v buňkách. Možnosti modulace míšního synaptického přenosu zprostředkovaného postsynaptickými AMPA receptory byly předmětem našich pokusů shrnutých v této dizertační práci.

V posledních letech upoutal pozornost mnoha výzkumných týmů TRPV1 receptor, který byl především na základě studií zabývajících se jeho funkcí v periferních tkáních označen za molekulární integrátor nociceptivních podnětů. Mimo jiné oblasti se TRPV1 receptory hojně vyskytují v presynaptických zakončeních primárních aferentních vláken v zadním rohu míšním. Mohou zde regulovat účinnost synapsí, ale není zcela znám způsob a okolnosti jejich aktivace, k jejímuž objasnění směřovaly také naše pokusy. Pro modulaci nociceptivního synaptického přenosu je rovněž důležité dříve opomíjené vzájemné působení mezi gliovými buňkami a neurony. Gliové buňky uvolňují řadu látek včetně cytokinů, které mají velký potenciál regulovat funkci synapsí zvláště při patologických stavech bolesti. Regulaci synaptického přenosu cytokinem $TNF\alpha$ v souvislosti s funkcí TRPV1 receptorů byla věnována další z našich studií.

Detailní poznání mechanismů modulace synaptického přenosu nociceptivní signalizace na míšní úrovni může přispět k vývoji účinnějších analgetik nebo zavedení nových přístupů při léčbě různých druhů bolesti.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

1. Anatomické a fyziologické mechanismy nocicepce

1.1. Detekce nociceptivního podnětu a signalizace do míchy

Před více jak sto lety předpokládal Sherrington (1906) existenci somatosenzorických neuronů, které jsou excitovány pouze v případě vystavení tkáně možnému poškození nebo při poranění samotném. Mnohem pozdější elektrofyzilogické studie potvrdily tuto hypotézu identifikací primárních senzorkých neuronů, které bylo možné excitovat podněty vyvolávajícími bolest, jako jsou vysoká teplota, nadměrný tlak nebo chemické iritanty, ale dráždění běžnými nebo bolestivými podněty excitaci nezpůsobilo (Burgess a Perl, 1967). Tyto primární nociceptivní neurony od ostatních senzorkých neuronů odlišuje charakteristický, zpravidla vyšší práh excitace nebo specifická citlivost. Akutní bolest je tedy senzorká modalita založená na podobném principu jako zrak nebo čich, kde se v mechanismech přenosu informace uplatňují neurony se specifickými receptivními vlastnostmi, které detekují podněty adekvátní kvality nebo intenzity (Julius a Basbaum, 2001).

1.1.1. Nociceptivní neurony spinálních ganglií

Podněty z vnějšího a vnitřního prostředí jsou detekovány periferními výběžky primárních senzorkých neuronů, jejichž těla jsou uložena ve spinálních gangliích. Druhý výběžek těchto pseudounipolárních buněk vede zadními kořeny do zadního rohu míšního. Neurony reagují na jeden, nebo více druhů podnětů, a podle toho se dělí na unimodální, nebo polymodální. Podle anatomických a funkčních kritérií se nociceptivní neurony spinálních ganglií rozdělují do tří základních kategorií. Podle velikosti průměru vlákna, která úzce souvisí s rychlostí vedení vzruchu, se rozlišují na neurony s vlákny typu A β , A δ a C. Nové poznatky o vybavení a funkci nociceptivních neuronů je umožňují dále dělit do menších populací. Julius a Basbaum (2001) shrnují jejich vlastnosti do základního rámce vhodného pro účely této dizertační práce:

Neuronální těla s největším průměrem dávají vznik myelinizovaným vláknům typu A β , myelin jim zajišťuje vysokou rychlost vedení vzruchu ($\sim 100 \text{ m}\cdot\text{sec}^{-1}$). Většina A β vláken detekuje nebolestivé podněty z kůže, svalů a kloubů, za normálních podmínek se tedy primárně nespojují s nociceptivním přenosem. Jejich dráždění může ve výsledku bolest naopak zmírnit. Naprostou většinu primárních nociceptivních neuronů představují malé a středně velké neurony spinálních ganglií.

Středně velká těla neuronů mají slabě myelinizovaná A δ vlákna, která díky své vodivosti $6\text{-}30 \text{ m}\cdot\text{sec}^{-1}$ zprostředkovávají tzv. „první“, rychlou, akutní, ostrou bolest. A δ nociceptory mohou být rozděleny na dvě hlavní skupiny I a II. Nociceptorem se rozumí volné nervové zakončení v periferii, které plní funkci sensorického receptoru a umožňuje transdukcii a kódování nociceptivního podnětu. Zatímco nociceptory typu I odpovídají na vysokou teplotu $\sim 53^\circ\text{C}$, tak neurony typu II jsou excitovány již při teplotě $\sim 43^\circ\text{C}$. Jejich odpověď na silné taktilní podněty je však shodná. V případě poranění tkáně na nich ale probíhají odlišné procesy.

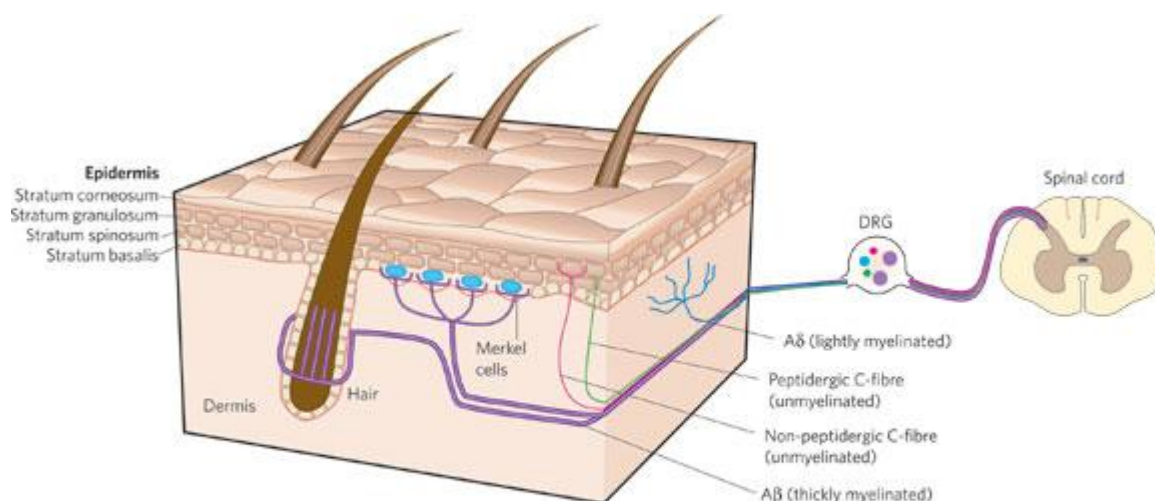
„Druhou“, pomalou, opožděnou, tupou bolest zprostředkovávají nemyelinizovaná C vlákna malých neuronů spinálních ganglií, jejichž nízká rychlost vedení akčního potenciálu nepřesahuje $2 \text{ m}\cdot\text{sec}^{-1}$. Většina C nociceptorů je také polymodální, mohou se podílet na přenosu bolestivých podnětů tepelných, mechanických i chemických. Je ale také známa populace spinálních neuronů, která odpovídá pouze na bolestivé teplo. Důležité je, že drtivá většina nociceptorů s C vlákny může být excitována bolestivými chemickými podněty, jako jsou kyseliny nebo pálivá složka paprik - kapsaicin. Z toho vyplývá, že exprimují funkční vaniloidní TRPV1 receptory (transient receptor potential vanilloid 1, viz kapitola 3.1.), které jsou aktivovány právě zvýšenou koncentrací H^+ , kapsaicinem nebo teplotou $\geq 43^\circ\text{C}$.

1.1.2. Molekulární markery neuronů spinálních ganglií s malým průměrem

Pro detailnější rozlišení primárních sensorických neuronů se využívá mnoha molekulárních markerů. Malé buňky spinálních ganglií s C vlákny se tak rozdělují do dvou základních kategorií, jejichž charakteristiku shrnují Snider a McMahon (1998). Peptidergní buňky byly pojmenovány podle exprese neuropeptidů CGRP (peptid odvozený od genu pro kalcitonin) a SP (substance P), kromě těchto peptidů exprimují receptor TrkA pro nervový růstový faktor (NGF). Pro takzvané „non-peptidergní“

buňky je typickým znakem vazebné místo pro rostlinný lektin IB₄ izolovaný z keře *Griffonia simplicifolia*, navíc exprimují receptory pro gliální nervový růstový faktor (GDNF) a purinergní P2X₃ receptory pro ATP. Nociceptivní neurony těchto dvou kategorií se odlišují i morfologicky (Obr. 1). Periferní výběžky peptidergických neuronů inervují nejtlustší vrstvu pokožky *stratum spinosum*, jejich centrální výběžky jsou lokalizovány v lamině I a vnější části laminy II (II_o; viz kapitola 1.2.1.). Non-peptidergické neurony inervují superficiálnější vrstvu pokožky *stratum granulosum* a jejich centrální výběžky končí přednostně ve vnitřní části laminy II (II_i) v zadním rohu míšním (Snider a McMahon, 1998; Zylka et al., 2005).

Možnost detekce různých kvalit podnětů je dána vybavením nociceptoru odlišnými receptory a iontovými kanály, které charakterizují jednotlivé populace neuronů. Různé typy bolesti jsou tak zprostředkovány signalizací na rozdílných typech primárních nociceptivních neuronů.



Obr. 1 Neurony spinálních ganglií inervující kůži. Kůže je inervována somatosenzorickými neurony, které projikují do zadního rohu míšního. A β vlákna inervují Merkelovy buňky a buňky střední části chlupového nebo vlasového váčku, vedou tedy informace zejména o lehkých taktilních podnětech. A δ a C vlákna zahrnují termoreceptory a nociceptory. A δ vlákna inervují dermis. Periferní výběžky peptidergických a non-peptidergických buněk spinálních ganglií s C vlákny jsou zakončeny v odlišných vrstvách epidermis a rovněž jejich centrální výběžky projikují do odlišných vrstev zadního rohu míšního. (Lumpkin a Caterina, 2007)

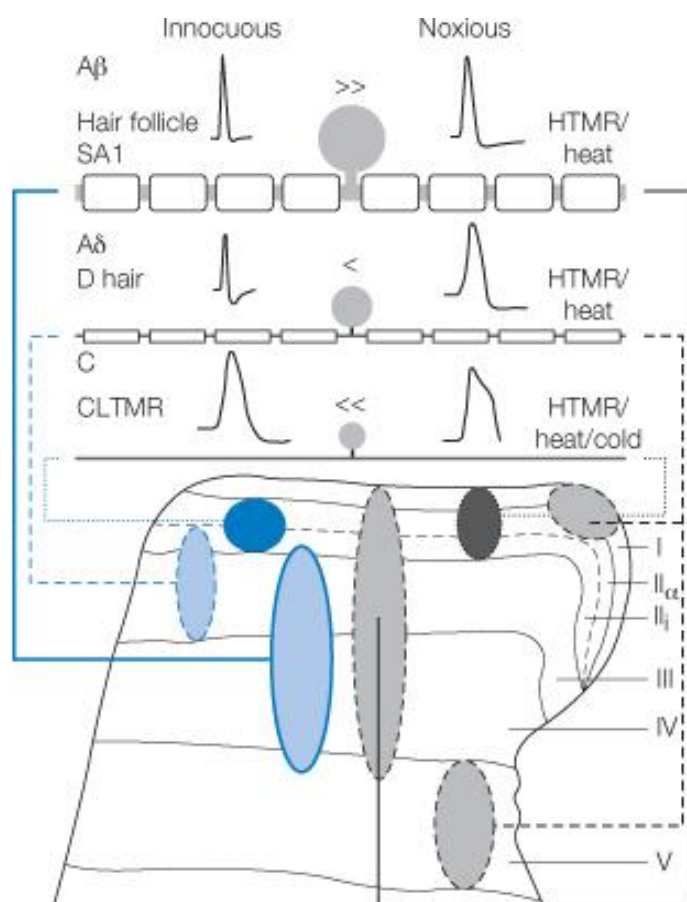
1.2. Nociceptivní signalizace na míšní úrovni

Senzorické informace o periferním podnětu jsou zakódované v akčních potenciálech šířících se po specifických vláknech neuronů spinálních gangliích, která vstupují do CNS projekcí do zadního rohu míšního. V této oblasti jsou lokalizovány první synaptické spoje nociceptivních drah. Z primárních aferentních vláken se jako hlavní neuromediátor vylévá glutamát anebo další excitační aminokyseliny, které se váží na ionotropní a metabotropní glutamátové receptory v postsynaptické části na neuronech zadního rohu míšního. Primární nociceptivní neurony navíc syntetizují celou řadu molekul, které mohou působit jako neuromodulátory. Jedná se o neuropeptidy SP a CGRP; adenzinotriposfát (ATP); difundující plyn NO; metabolity fosfolipidů prostaglandiny (PG); neurotrofiny jako je NGF nebo GDNF a z dalších peptidů to jsou např. galanin, cholecystokinin (CCK) nebo neuropeptid Y (NPY; Millan, 1999). Synapse umožňují stěžejní modulaci intenzity signálu přicházejícího z periferie, může dojít k jeho zániku nebo zesílení a generování dalších akčních potenciálů na sekundárních projekčních neuronech. Pomocí těchto elektrických impulzů se informace o nociceptivním podnětu šíří z míchy až do mozku.

1.2.1. Rexedovo laminární členění šedé hmoty míšní

Zadní roh míšní se podle Rexeda (1952) rozděluje na základě rozdílů ve velikosti a denzitě neuronů (cytoarchitektonicky) do šesti paralelních vrstev (lamin) I – VI. Do laminy I (též marginální zóna) hojně projekují A δ vlákna a je v ní lokalizováno nejvíce projekčních neuronů, jejich těla jsou zpravidla větší než těla interneuronů. Lamině II (též substantia gelatinosa) dominují interneurony. Postupem času přibývaly detailnější studie sledující centrální zakončení primárních aferentních vláken a expresi různých receptorů, proto bylo vhodné rozdělit laminu II na vnější a vnitřní část II_i (inner) / II_o (outer). Laminy I a II jsou často označovány jako superficiální zadní roh míšní, který je hlavní projekční oblastí primárních nociceptivních neuronů (Obr. 2). Laminy III – IV se sdružují pod názvem nukleus proprius. Do nociceptivní signalizace jsou také zapojeny neurony v laminách V – VI, které představují hluboké vrstvy zadního rohu míšního. Lamina VI je zřetelně definovatelná pouze v intumescencích - zduřeních na

úrovni segmentů odstupů končetin. Přední roh míšni je rozdělen do lamin VII – IX a umožňuje převážně funkce motorické, jsou v něm totiž mimo jiné uloženy motoneurony inervující svalstvo. Lamina X obklopuje centrální kanál.



Obr. 2 Schéma projekce sensorických neuronů inervujících kůži do zadního rohu míšního. Různé proporce symbolů značí relativní počet aferentních vláken s danou rychlostí vedení vzruchu, která odpovídají na nebolestivé (modrá) nebo bolestivé (šedá) podněty. Hustota jednotlivých typů nervových zakončení je znázorněna odpovídající velikostí oválné plochy v projekčních oblastech. Pověšimněte si, že ne všechna C vlákna jsou nociceptory a ne všechna Aβ vlákna jsou nízkoprahové mechanoreceptory. LTMR – nízkoprahové mechanoreceptory, HTMR - vysokoprahové mechanoreceptory (McMahon a Koltzenburg, 2005)

1.2.2. Neurony zadního rohu míšního

Centrální neurony v zadním rohu míšním se rozlišují podle cílové oblasti projekce na 3 typy. 1) Projekční neurony umožňují přenos nociceptivní informace do vyšších etáží CNS. 2) Propriospinální neurony lokalizované tělem i všemi výběžky v míše integrují signalizaci mezi míšními segmenty a jejich stranami. 3) Interneurony vytvářejí lokální neuronální obvody na úrovni jediné laminy a nebo v oblasti několika lamin.

Projekční neurony zapojené do nociceptivní signalizace jsou hojně lokalizovány v laminách I, V a VI. V superficiální oblasti zadního rohu míšního jsou často přímo synapticky spojeny s primárními nociceptivními neurony. Projekční neurony hlubokých vrstev disponují dendrity, které pronikají až do superficiální oblasti, mohou tak být přímo aktivovány primárními nociceptivními neurony anebo polysynapticky přes interneurony (Coggeshall a Carlton, 1997). Podle odpovědi na aktivitu primárních aferentních neuronů vyvolanou různými podněty se projekční neurony rozlišují na nízkoprahové (low-threshold, LT), vysokoprahové (high-threshold, HT) a „s širokým dynamickým rozsahem“ (wide dynamic range, WDR). Nízkoprahové projekční neurony odpovídají přednostně na nebolestivou stimulaci, jako je např. lehký taktilní podnět vedený primárními A β vlákny. Vysokoprahové neurony odpovídají na bolestivé podněty, jsou to tedy specifické nociceptivní neurony aktivované nociceptivní signalizací, která je do míchy přiváděna C a A δ vlákny. Jsou koncentrovány v lamině I (II_o) a zřídka se vyskytují i v hlubokých vrstvách IV - VI. Důležité pro registraci intenzity podnětu jsou neurony s širokým dynamickým rozsahem, protože reagují na podněty od nebolestivých až po bolestivé. Jsou excitovány signalizací o mechanických, tepelných a chemických podnětech z C, A δ i A β vláken. Na těchto projekčních neuronech dochází k významné konvergenci vstupů z nízkoprahových a vysokoprahových aferentních neuronů inervujících kůži, svaly a viscerální orgány. Jsou lokalizovány především v laminách IV-VI a zřídka v laminách I, II_o a X (Willis, 1985; Price, 1988; Millan, 1999).

Interneurony se podle hlavního účinku neuropřenašeče, který uvolňují, tradičně rozdělují na excitační a inhibiční. Jejich nejpočetnější populace v zadním rohu míšním je lokalizována v lamině II. Excitační interneurony umožňují především nepřímou polysynaptickou aktivaci projekčních neuronů. Stejně jako centrální zakončení primárních nociceptivních vláken uvolňují excitační aminokyseliny a řadu

neuropeptidů. Inhibiční interneurony jsou v přímém kontaktu s projekčními neurony i primárními aferentními vlákny, což umožňuje uplatnění presynaptických i postsynaptických mechanismů inhibice nociceptivní signalizace přicházející z primárních sensorických neuronů. Podle neuropřenašeče se rozlišují na GABAergní a glycinergní, přičemž některé z nich mohou uvolňovat GABA i glycin. Podle exprese neuropeptidů, proteinů vázajících Ca^{2+} , enzymů nebo receptorů lze inhibiční interneurony dále dělit na menší subpopulace (Todd a Spike, 1993). Regulační význam interneuronů v nociceptivní signalizaci je nepopiratelný.

1.2.3. Ascendentní dráhy

Ascendentní dráhy vedou nociceptivní informace z míšní úrovně do vyšších oblastí CNS. Těla projekčních neuronů jsou nejčastěji lokalizována v laminách I a V, v menším počtu v laminách IV a VI v zadním rohu míšním, ale také v laminách VII a VIII v rohu ventrálním a v lamině X (Dostrovsky a Craig, 2005). Axony projekčních neuronů často přecházejí do kontralaterální oblasti míchy již na úrovni míšního segmentu, kde je uloženo tělo neuronu anebo v sousedním segmentu míchy. Sdružují se do provazců vzestupných drah, které jsou zakončeny v různých mozkových centrech. Pro vnímání bolesti jsou zvláště důležité projekce z míchy do mozkového kmene a thalamu. Z neuroanatomického hlediska rozlišujeme dva hlavní typy ascendentních drah, a to dráhy přímé a nepřímé.

Významná přímá dráha bolesti je spinothalamická (tractus spinothalamicus), která projikuje do ventroposterolaterálního (VPL) a ventroposteromediálního (VPM) jádra thalamu. Další přímou projekci zajišťují dráhy spinomesencephalická (tractus spinomesencephalicus), zakončená v periakveduktální šedi a v jádrech retikulární formace mesencephala; spinoretikulární (tractus spinoreticularis), zakončená v jádrech retikulární formace prodloužené míchy a mostu; spinoparabrachiální a spinohypothalamická (STH).

V nepřímých ascendentních dráhách dochází během projekce do supraspinálních center k synaptickému přepojení na další neurony „druhého řádu“. Hlavní nepřímé dráhy jsou dvě: spinocervikothalamická dráha (tractus spinocervicalis) a zadní provazce míšní, které jsou součástí lemniskového systému a obsahují též primární aferentní vlákna aktivovaná nebolestivými podněty. Axony míšních

nociceptivních neuronů se přidružují k těmto primárním aferentními vláknům a tvoří zadní provazce míšní, projikují společně do nucleus cuneatus (z cervikálních a hrudních segmentů) a do nucleus gracilis (z lumbosakrálních segmentů). Z těchto jader pokračují zadní provazce do thalamu, k přechodu na kontralaterální stranu dochází až v této části dráhy v tzv. mediálním lemnisku. Podobné dráhy vycházejí i z trigeminálních jader, kam je přiváděna senzorká informace z oblasti obličeje.

1.2.4. Synaptický přenos v zadním rohu míšním

Synaptický přenos a jeho modulační v zadním rohu míšním jsou charakterizovány množstvím uvolněného přenašeče nebo neuromodulátoru, hustotou a typem presynaptických i postsynaptických receptorů, jejich kinetickými vlastnostmi, otevíráním a zavíráním iontových kanálů a způsobem odstraňování přenašeče ze synaptické štěrby. Každý z těchto faktorů může podléhat řadě regulačních vlivů.

Rychlý excitační synaptický přenos je zajištěn výlevem glutamátu z centrálních výběžků primárních senzorkých neuronů a jeho vazbou na postsynaptické ionotropní glutamátové receptory. Akční potenciál přicházející z periferie tak může vyvolat excitační postsynaptické proudy (EPSC) vedené primárně AMPA receptory. Na rychlém přenosu se podílí také v postsynaptické části exprimované NMDA receptory, které jsou ovšem tonicky inhibovány ionty Mg^{2+} . K jejich aktivaci může dojít až po odstranění navázaných Mg^{2+} z kanálu receptoru, a to v závislosti na depolarizaci plazmatické membrány. Pomalý excitační synaptický přenos je zprostředkován metabotropními receptory, které jsou v zadním rohu míšním aktivovány např. glutamátem nebo uvolněnými neuropeptidy jako je substance P a CGRP. Aktivace příslušných receptorů spřažených s G-proteiny vede k aktivaci tzv. „druhých posluš“ a pomalé postsynaptické depolarizaci plazmatické membrány, která přetrvává desítky sekund (Woolf a Salter, 2000).

Rychlé inhibiční postsynaptické proudy (IPSCs) jsou vyvolány mediátory inhibičního přenosu. GABA a glycin se váží na své ionotropní receptory, které zprostředkovávají hyperpolarizační proud pomocí Cl^- iontů proudících kanálem receptorů. Pomalou a déle trvající inhibici zajišťují metabotropní $GABA_B$ receptory lokalizované převážně presynapticky (Towers et al., 2000).

Protože jeden z cílů této práce je zaměřen na modulaci excitačního synaptického přenosu zprostředkovaného AMPA receptory v zadním rohu míšním, budou tyto v následujících kapitolách detailněji popsány.

1.2.4.1. AMPA receptory

Funkční vlastnosti AMPA receptorů závisí na jejich podjednotkovém složení, stavu fosforylace a na interakci s dalšími cytozolickými nebo membránovými proteiny (Hollmann a Heinemann, 1994; Chen et al., 2000). Čtyři podjednotky GluR1-GluR4 dříve označované také jako GluR-A/B/C/D tvoří v různých poměrech heteromerní tetramery, odlišné kombinace podjednotek tak představují odlišné podtypy receptoru. Pro selektivitu kanálu AMPA receptoru je stěžejní podjednotka GluR2, pokud je zabudována ve struktuře receptoru alespoň jedna tato podjednotka, tak kanálem prochází pouze monovalentní kationty. Jestliže však GluR2 podjednotka ve struktuře receptoru není, stává se kanál propustný i pro Ca^{2+} ionty. Průnik Ca^{2+} iontů do buňky a jejich zvyšující se koncentrace v cytozolu je významným intracelulárním spouštěčem mnoha signálních kaskád, kde Ca^{2+} ionty plní úlohu „druhého posla“.

Pro specifickou regulaci funkce AMPA receptorů je významný intracelulární C-konec podjednotek. Nacházejí se na něm domény podmiňující interakce receptoru s dalšími regulačními proteiny a všechna známá fosforylační místa (Song a Huganir, 2002; Wang et al., 2005b). AMPA receptor fosforyluje celá řada proteinkináz: PKA, PKC, PKM, CaMKII nebo protein-tyrozin kináza (PTK). Fosforylace reguluje nejen biofyzikální vlastnosti AMPA receptoru, ale také interakce s mnoha proteiny, které se podílejí na změně lokalizace AMPA receptorů v buňce (Song a Huganir, 2002).

Charakteristické pro AMPA receptory jsou dynamické změny jejich umístění v buňce, podléhají konstitutivní endocytóze z plazmatické membrány do cytozolu, která je kompenzována jejich adekvátní exocytózou do membrány. Tento mechanismus může zajišťovat stálý počet receptorů exponovaných na povrchu buňky. Kromě konstitutivní cirkulace může být membránová endocytóza i exocytóza AMPA receptorů indukována a ve výsledku vést k dlouhodobé depresi (LTD) nebo dlouhodobé potenciaci (LTP) EPSC (Malenka a Nicoll, 1999; Kessels a Malinow, 2009). Regulace počtu AMPA receptorů a jejich podjednotkového složení v postsynaptické membráně podmiňuje krátkodobé i dlouhodobé změny v účinnosti synapse. Projevem

této synaptické plasticity v zadním rohu míšním je centrální senzitivace a s ní spojený rozvoj nociceptivní hypersenzitivity, přičemž se uplatňuje inserce GluR1 do plazmatické membrány a internalizace GluR2 podjednotek (Galan et al., 2004; Katano et al., 2008; Larsson a Broman, 2008; Park et al., 2008, 2009).

1.2.4.2. Distribuce AMPA receptorů v zadním rohu míšním

Metodou *in situ* hybridizace za použití oligonukleotidových sond byla v lumbální míše potkana detekována mRNA pro všechny podjednotky AMPA receptoru. Dominantní podjednotkou zadního rohu míšního je GluR2. V superficiální oblasti jsou hojně lokalizovány transkripty GluR1 a GluR2, přičemž se oblasti jejich nejvyšší denzity liší. Zatímco gen pro GluR1 podjednotku je nejvíce exprimován v neuronech laminy I a II_o, tak mRNA pro GluR2 je nejhojněji distribuována v lamině II_i a dorzální části laminy III. GluR2 je přitom v lamině III jedinou dominující podjednotkou (Furuyama et al., 1993; Tolle et al., 1993; Pellegrini-Giampietro et al., 1994). Podjednotka GluR3 je exprimována v zadním rohu míšním pouze v malém počtu neuronů hlavně v laminách IV a V. Gen pro podjednotku GluR4 je přepisován pouze v nepatrném počtu neuronů superficiálního rohu míšního. Velké neurony v laminách IV a V, které mohou být součástí spinothalamické nebo spinoretikulární dráhy bolesti, převážně exprimují GluR3/GluR4 heteromery (Tolle et al., 1993).

Neurony s funkčními AMPA receptory propustnými pro Ca²⁺ ionty (bez GluR2 podjednotky) byly metodou agonistou aktivovaného průniku kobaltu do buňky hojně detekovány v laminách I a II_o. V lamině II_i byly na rozdíl od toho identifikovány pouze zřídka. Kobalt pozitivní neurony v superficiální oblasti zadního rohu míšního byly inervovány primárními aferentními vlákny citlivými ke kapsaicinu (Engelman et al., 1999). Nízký počet neuronů exprimujících AMPA receptory propustné pro Ca²⁺ v lamině II_i je v souladu s vysokou hustotou GluR2 podjednotky v této oblasti.

1.2.4.3. Modulace AMPA receptorů inzulinem

Inzulin a jeho receptory byly v CNS savců poprvé popsány v publikaci Havránkové et al. (1978a, b). Inzulin syntetizovaný v organismu β -buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu může procházet hematoencefalickou bariérou skrze saturovatelný transportní mechanismus (Banks, 2004). Jeho syntéza neprobíhá pouze v periferních tkáních, ale také přímo v CNS (Havrankova et al., 1978b). Rovněž na neuronech v kultuře byla prokázána sekrece inzulinu do extracelulárního prostoru (Devaskar et al., 1994). Dosavadní poznatky o fyziologické funkci inzulinu v mozku poukazují na regulaci kognitivních funkcí a paměti, příjmu potravy a tělesné hmotnosti nebo plodnosti a reprodukce (Wozniak et al., 1993; Zhao a Alkon, 2001; Stockhorst et al., 2004; Chiu et al., 2008).

V poslední době se ukazuje, že inzulin se může podílet také na modulaci synaptického přenosu v CNS. Studie vykonané na hipokampálních neuronech prokázaly inzulinem stimulovanou internalizaci AMPA receptorů, která vedla k významnému snížení jejich počtu v postsynaptické membráně a ve výsledku k dlouhodobé depresi synaptického přenosu (Beattie et al., 2000; Lin et al., 2000; Man et al., 2000). Tento proces byl závislý na fosforylaci tyrozinu na intracelulárním C-konci GluR2 podjednotky (Ahmadian et al., 2004). Inzulinem stimulovaná, na klatrinu závislá internalizace AMPA receptorů se odlišuje od konstitutivní internalizace rychlou redukcí počtu receptorů exponovaných na povrchu buňky. Internalizovány jsou zřejmě AMPA receptory lokalizované v postsynaptické membráně. Inzulin tak může selektivně zvyšovat internalizaci AMPA receptorů, aniž by ovlivnil jejich inzerci, která by znovu zabezpečila rovnováhu mezi endocytosou a exocytosou AMPA receptorů (Man et al., 2000).

Je pravděpodobné, že důsledkem inzulinem stimulované internalizace AMPA receptorů není pouze snížení jejich počtu na synapsích, ale změní se i jejich podjednotkové složení. Internalizaci zahajuje fosforylace GluR2, poměr této podjednotky k ostatním podjednotkám AMPA receptoru se na synapsích sníží, což může mít svůj funkční význam. V membráně pak mohou převažovat AMPA receptory propustné pro Ca^{2+} ionty, protože AMPA receptory nepropustné pro Ca^{2+} byly delokalizovány do cytoplazmy.

2. Patologické bolestivé stavy

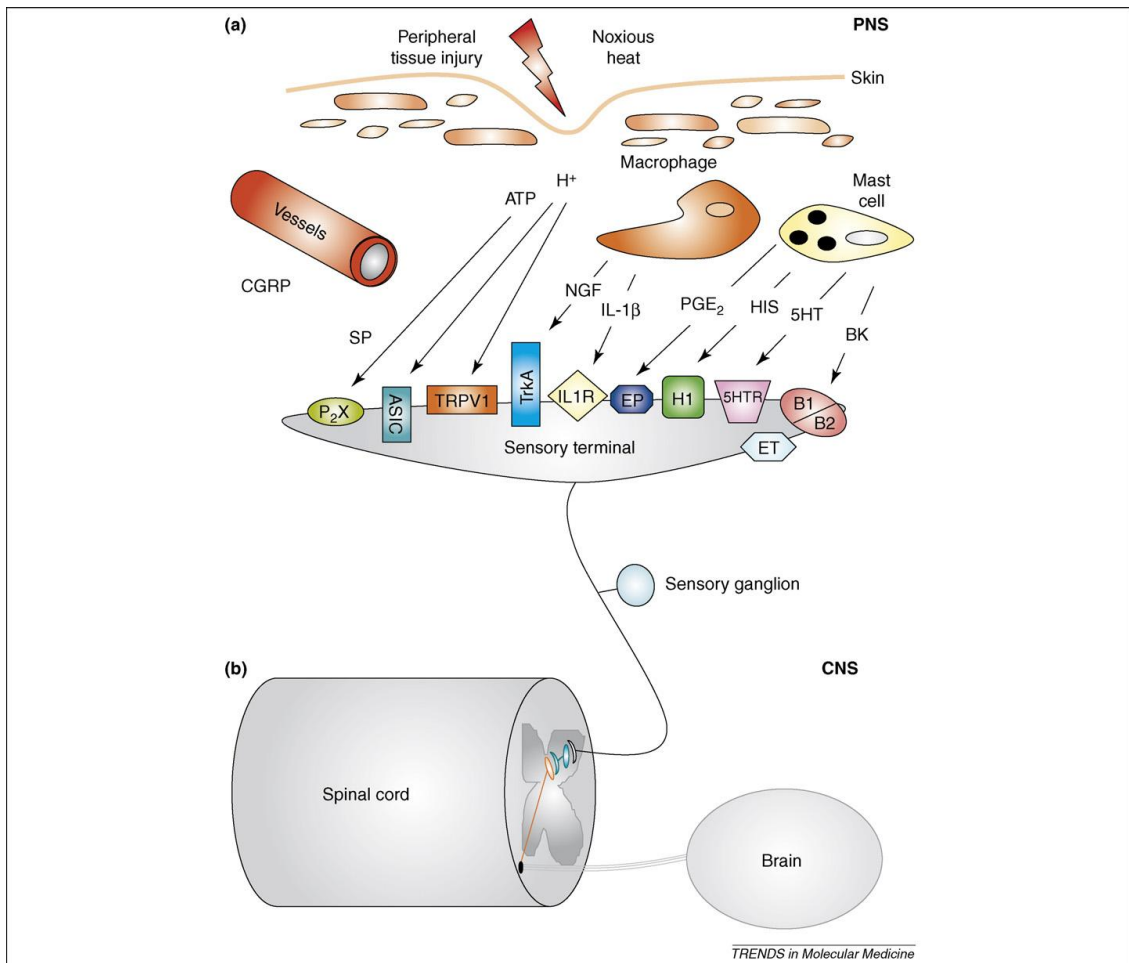
V případě poranění nebo zánětu dochází k lokálnímu zvýšení citlivosti nociceptivního systému, tak aby bylo zabráněno rozsáhlejšímu poškození tkáně. V místě poškození a jeho okolí je snížen práh pro nocicepci s následkem zvýšeného vnímání bolesti. Vzniká tzv. hyperalgezie a allodynie, které jsou typické pro somatické a viscerální poranění i zánět. Hyperalgezie je zesílené vnímání bolesti, klinicky byla vymezena jako zvýšená bolest na bolestivé podněty. Allodynie je bolest způsobená nebolestivými podněty. Podle aktualizované definice Mezinárodní společnosti pro studium bolesti IASP z roku 2008, by měl být termín allodynie používán pouze v případě, když je známo, že podnět neaktivuje primární nociceptivní vlákna, ale pouze nízkoprahová primární sensorická vlákna. Pokud není zřejmé, které typy primárních aferentních neuronů jsou zapojeny do nociceptivní signalizace, tak IASP doporučuje upřednostňovat zaštiťující termín hyperalgezie pro všechny stavy zvýšené citlivosti.

Hyperalgesie a allodynie jsou bolestivé syndromy spojované s mnoha onemocněními a intenzita bolesti je často součástí hodnocení průběhu nemoci. Intenzita, délka a lokalizace bolesti nemusí vždy odpovídat danému stavu organismu, hypersenzitivita může přetrvávat i po odeznění nemoci, úplném zhojení poranění anebo mohou být zapříčiněny dysfunkcí periferního či centrálního nervového systému. V tomto případě již neplní hyperalgezie ani allodynie obrannou funkci, přestávají být symptomem, ale stávají se spíše samotným onemocněním (Sandkuhler, 2009).

Zóna zvýšené citlivosti se objevuje nejen v místě poranění, ale i v okolní oblasti. V místě zranění se jedná o primární hyperalgezi a v nepoškozené tkáni obklopující poranění se objevuje oblast sekundární hyperalgezie, přičemž mechanismy jejich vzniku jsou odlišné. Primární hyperalgezie je charakteristická zvýšeným vnímáním bolestivých tepelných a mechanických podnětů. Je způsobena především senzitivací volných nervových zakončení, ale mohou se na ní podílet i změny v CNS. Sekundární hyperalgezie se vyznačuje zvýšeným vnímáním bolesti pouze na mechanickou stimulaci (Ali et al., 1996). Není podmíněna periferní senzitivací volných nervových zakončení, ale výhradně změnami signalizace na úrovni CNS. Na vzniku sekundární hyperalgezie se podílí aktivovaná primární nociceptivní vlákna, ale její přetrvání je na aktivitě primárních vláken nezávislé. Lokální anestetika totiž zabraňují vzniku sekundární hyperalgezie, ale pokud je již rozvinuta, jsou neúčinná (Sandkuhler, 2009).

2.1. Periferní senzitivace a zánětlivá bolest

Při poranění tkáně dochází k lokálnímu uvolnění řady chemických látek, které se uplatňují v procesech probíhajících při zánětu. Jedná se např. o adenosin, ATP, bradykinin, histamin, leukotrieny, prostaglandiny, protony, serotonin, substanci P, thromboxany a volné radikály. Dále jsou během zánětu produkovány neurotrofní faktory, především NGF, a látky z řady cytokinů, jako jsou interleukiny (IL) a tumor nekrotizující faktor α (TNF α). Volná nervová zakončení jsou některými z výše uvedených látek přímo excitována nebo senzitivována díky jejich vazbě na receptory exprimované nociceptorem. Senzitivací se rozumí zvýšení citlivosti a snížení prahu nociceptoru pro vyvolání odpovědi na adekvátní podnět v jejich receptivním poli. Aktivované primární aferentní neurony předávají nociceptivní informaci do zadního rohu míšního, ale navíc mohou spouštět procesy neurogenního zánětu, který je vlastně eferentní funkcí nemyelinizovaných primárních nociceptivních neuronů. Z volných nervových zakončení se pak uvolňují neuromodulátory, především SP a CGRP, které způsobují vazodilataci a extravazaci plazmy, stejně tak jako aktivaci buněk imunitního systému a hematopoetických buněk, jako jsou makrofágy, mastocyty nebo neutrofilů (Julius a Basbaum, 2001). Tyto buňky mohou uvolňovat další algogenní látky. Účinky mediátorů zánětu mohou být synergistické a zesilovat tak odpovědi nociceptivních neuronů (Vyklícky et al., 1998).



Obr. 3 Lokalizace TRPV1 receptorů na periferních (a) i centrálních (b) výběžcích neuronů sensorických ganglií (spinální a trigeminální). TRPV1 receptory jsou na nociceptorech exprimovány s mnoha dalšími receptory jako jsou purinergní receptor (P₂X), iontový kanál aktivovaný kyselinami (ASIC) receptor pro nervový růstový faktor (TrkA), receptor pro interleukin 1 (IL1R), receptor pro prostaglandin E₂ (EP), histaminový receptor 1 (H1), serotoninový receptor (5HTR), bradykininové receptory (B1 a B2), receptor pro endothelin (ET).
 Zkratky: BK – bradykinin, HIS – histamin, 5HT - serotonin, IL-1β – interleukin 1β, PGE₂ – prostaglandin E₂, PNS – periferní nervový systém. (Szallasi et al., 2006)

2.1.1. TRPV1 receptor jako integrátor procesů periferního zánětu

Nociceptory exprimují a na plazmatické membráně exponují řadu receptorů a iontových kanálů, které se podílí na aktivaci nervového zakončení (Obr. 3). V posledních letech se mnoho laboratoří zaměřilo na výzkum struktury a funkce TRPV1 receptorů, které byly nedávno označeny za molekulární integrátory procesů zánětlivé bolesti (Cortright a Szallasi, 2004). TRPV1 receptory jsou lokalizovány i na centrálních zakončeních primárních nociceptivních neuronů, jejich úloze je věnována kapitola 3. Periferní TRPV1 receptory jsou často aktivovány tepelnými podněty a vazbou protonů. Mnoho algogenních látek však zvyšuje citlivost TRPV1 receptorů i jejich expresi. Mediátory zánětu, jako je např. bradykinin, mohou snížit práh pro jejich aktivaci teplotou až k fyziologickým hodnotám (Sugiura et al., 2002). NGF také ovlivňuje citlivost TRPV1 receptorů, přičemž tepelná hyperalgezie navozená pomocí NGF se nerozvíjí u TRPV1^{-/-} knock out myši. Toto pozorování s dalšími studii provedenými na zvířatech bez exprese TRPV1 receptorů poukazují na stěžejní úlohu těchto receptorů v zánětem indukované tepelné hyperalgezii (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000). Počet TRPV1 receptorů může být zvýšen transportem do periferních zakončení malých neuronů spinálních ganglií působením NGF při zánětu (Ji et al., 2002). Po experimentálně navozeném zánětu bylo navíc pozorováno zvýšení počtu nemyelinizovaných periferních vláken s imunopozitivně označenými TRPV1 receptory (Carlton a Coggeshall, 2001). To je v souladu se zvýšeným axonálním transport mRNA kódující TRPV1 receptory spojeným se zvýšenou citlivostí primárních aferentních vláken ke kapsaicinu (Tohda et al., 2001) a zjištěním, že aktivovaná PKC vyvolává rychlou inzerci TRPV1 receptorů do plazmatické membrány (Morenilla-Palao et al., 2004).

Mediátory zánětu aktivují nebo senzitivizují TRPV1 receptory řadou signálních drah s využitím mnoha druhých posílů. Na tepelné hyperalgezii indukované BK a NGF se alespoň z části podílí na fosfolipáze C (PLC) závislá fosforylace TRPV1 receptoru proteinkinázou C. Aktivace PLC vede k hydrolýze membránového fosfolipidu fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfátu (PIP₂) a uvolňuje TRPV1 receptor z konstitutivní inhibice tímto lipidem, čímž je receptor senzitivován (Chuang et al., 2001). Senzitivace TRPV1 receptoru aktivovanou PKA může mít také významnou úlohu v zánětem indukované hyperalgezii. PKA je totiž součástí signální kaskády vedoucí od aktivace metabotropních receptorů pro prostaglandiny (Rathee et al., 2002). Některé mediátory

zánětu mohou aktivovat TRPV1 receptory nepřímou cestou přes produkty lipoxygenázy. Např. bradykinin váže se na své B2 receptory excituje kožní nociceptory přes produkci metabolitů kyseliny arachidonové (12-HPETE), které pak aktivují TRPV1 receptory (Hwang et al., 2000; Shin et al., 2002).

Kanál TRPV1 receptoru je propustný kromě monovalentních kationtů také pro Ca^{2+} . Jejich průnik do cytozolu aktivuje proteinkinázu závislou na Ca^{2+} a kalmodulinu (CaMKII), která stejně jako PKA a PKC fosforylací senzitivizuje TRPV1 receptor. Ca^{2+} ionty ale navíc mění poměr rozložení kladného a záporného náboje na vnitřní a vnější straně plazmatické membrány a dochází k její depolarizaci, což může vést až ke vzniku akčního potenciálu. TRPV1 receptory se významně podílí na senzitivizaci volných nervových zakončení a výrazně tak usnadňují přenos nociceptivního signálu do CNS.

Nejen pro fyziologickou úlohu, ale i pro vývoj nových analgetik je významná také fáze desenzitivace TRPV1 receptorů, ke které může docházet po jejich aktivaci (Vyklícky et al., 2008). Tato ztráta citlivosti k aktivátorům TRPV1 receptorů je většinou závislá na intracelulární koncentraci Ca^{2+} iontů (Koplas et al., 1997). Podstatnou roli v procesu desenzitivace TRPV1 receptorů mají jeho fosforylace a defosforylace, v tomto smyslu nelze opomenout regulaci kalcineurinem (Docherty et al., 1996; Novakova-Tousova et al., 2007). Dále byla prokázána desenzitivace interakcí s Ca^{2+} vázajícím proteinem kalmodulinem (Numazaki et al., 2003) nebo regulace pomocí PIP_2 (Liu et al., 2005). Aktivace TRPV1 receptorů na periferních nociceptorech kapsaicinem vede k jejich desenzitivaci, v závislosti na koncentraci agonisty však může dojít až k degeneraci senzorického zakončení a vyvolání dlouhodobé lokální anestezie (Simone et al., 1998).

2.1.2. Úloha prozánětlivých cytokinů v periferní senzitivizaci

Při zánětu jsou z imunitních buněk, jako jsou makrofágy a mastocyty, uvolňovány cytokiny TNF α , IL-1 β a IL-6, které regulují procesy s ním spojené (Cunha a Ferreira, 2003). Klinické studie poukazují na zvýšenou hladinu TNF α v synoviální tekutině při bolesti v kloubech (Shafer et al., 1994). To je v souladu s potlačením symptomů revmatoidní artritidy včetně bolesti léčbou pacientů pomocí protilátek proti TNF α (Elliott et al., 1994). Studie provedené na zvířatech ukázaly, že po systémovém podání nebo lokální injekci TNF α , IL-1 β a IL-6 vzniká mechanická a tepelná

hyperalgezie. Přitom ošetření antisérem proti TNF α inhibuje nebo zpozdí vznik hyperalgezie u experimentálního modelu zánětlivé bolesti (Woolf et al., 1997). Pokud je TNF α aplikováno podél periferního nervu, tak vyvolá ektopickou aktivitu v nociceptivních aferentních vláknech (Sorkin et al., 1997). Cytokiny excitují nociceptory přímo vazbou na své receptory nebo nepřímo tím, že stimulují výlev dalších mediátorů zánětu, např. prostaglandinů. Bylo prokázáno, že cytokiny TNF α a IL-1 β způsobují přechodnou senzitivizaci teplotou evokovaného výlevu CGRP z kožních nociceptorů potkana stejně tak jako IL-6 v kombinaci s jeho solubilním receptorem (Opree a Kress, 2000; Obreja et al., 2002). Význam IL-6 podporuje studie demonstrující redukci s periferním zánětem spojené mechanické a termální hyperalgezie u IL-6^{-/-} knock out myši (Xu et al., 1997).

2.2. Centrální senzitivizace

Při zkoumání procesů podmiňujících sekundární hyperalgezi bylo zjištěno, že není závislá na senzitivizaci periferních nociceptorů, ale na změnách synaptické účinnosti na míšní úrovni. Simone et al. (1991) demonstrovali zvýšenou citlivost spinothalamických neuronů na nebolestivé podněty po intradermální injekci kapsaicinu, jako modelu kožního poranění. Kapsaicin se hojně využíval ke studiu sekundární hyperalgezie, protože selektivně aktivuje nociceptory (Szolcsanyi et al., 1990), po intradermální aplikaci způsobuje bolest bez zjevného poškození tkáně, vzniká velká oblast sekundární hyperalgezie (Simone et al., 1989a) a probíhající procesy jsou podobné, jako při řezných ranách a popálení kůže (Ali et al., 1996).

Charakteristický pro centrální senzitivizaci je stav, kdy nocicepce nemusí být za každých okolností zprostředkována primárními nociceptivními neurony. Za patologických podmínek získají schopnost nociceptivní signalizace i jiná primární sensorická vlákna, která běžně detekují pouze lehké taktilní podněty. Fenomén centrální senzitivizace, kdy jsou centrální nociceptivní neurony citlivější ke svým vstupům, je platný nejenom pro sekundární hyperalgezi, ale i obecně pro neuropatickou bolest. Podle revidované definice z roku 2008 je neuropatická bolest přímým důsledkem poškození nebo onemocnění somatosenzorického systému

2.2.1. Modulace synaptického přenosu na míšní úrovni

Zásadní význam pro synaptický přenos v zadním rohu míšním má modulace synaptické účinnosti. Účinnost synaptického spojení se může pohybovat mezi extrémními stavy, a to od absence odpovědi v podobě akčního potenciálu, kdy je depolarizace membrány nedostatečná k aktivaci napětově závislých Ca^{2+} kanálů až po případy, kdy jediný EPSC umožní překročení prahu a generování akčního potenciálu. Za normálních podmínek jsou na většině synapsí generovány podprahové odpovědi o různé amplitudě v závislosti na množství vylitého přenašeče a počtu receptorů v postsynaptické membráně. Akční potenciál vznikne na postsynaptickém neuronu pouze tehdy, když dojde k časové anebo prostorové sumaci mnoha vstupů. Zvýšení nebo snížení synaptické účinnosti regulací výlevu přenašeče nebo jeho účinku pak vede k zásadnímu ovlivnění nociceptivní signalizace na míšní úrovni.

Neurony zadního rohu míšního mohou i po krátké aktivitě tzv. salvách akčních potenciálů šířících se po primárních nociceptivních vláknech senzitivovat, stávají se citlivější k přicházejícím vstupům a synaptický přenos je potenciován. Takovéto zvýšení účinnosti centrálních synapsí je projevem synaptické plasticity, která může mít mnoho forem souhrnně označovaných jako fenomén centrální senzitivace. Modulace synaptického přenosu je závislá na vstupní aktivitě z primárních aferentních vláken anebo na genové transkripci, ke které může docházet v presynaptické i postsynaptické části a gliových buňkách. Na regulaci synaptického přenosu se mohou podílet také látky uvolňované gliovými buňkami. Změny v presynaptické části se mohou projevovat ovlivňováním množství uvolněného přenašeče nebo neuromodulátoru a postsynaptické změny zase mění citlivost míšních neuronů. Pokud je synaptický přenos ovlivněn změnami v přepisování genů, tak se modulace projeví až za několik hodin, ale přetrvává dlouhodobě řádově dny (Samad et al., 2001; Ji et al., 2002). Deprese inhibičních mechanismů v míše je stejně důležitá jako posílení excitačního přenosu. Jsou známy případy selektivního odumírání inhibičních interneuronů (Moore et al., 2002). Narušení inhibičního synaptického přenosu ve výsledku usnadní přenos nociceptivní informace do vyšších mozkových center.

2.2.2. Mechanizmy centrální senzitivace

Mechanizmy centrální senzitivace vycházejí z různých forem modulaace synaptického přenosu na míšní úrovni. Podstatnou úlohu ve zvýšení synaptické účinnosti mají mechanizmy zajišťující zvýšený výlev glutamátu a neuropeptidů z centrálních zakončení neuronů spinálních ganglií a zvýšení citlivosti míšních neuronů k excitačním aminokyselinám nebo snížení jejich citlivosti k aminokyselinám inhibičním. Dochází k zesílení excitačního a depresi inhibičního synaptického přenosu, přitom ke změnám dochází na obou stranách synapsí (Woolf a Salter, 2000; Ji et al., 2003; Willis, 2009). Apoptózu inhibičních interneuronů může doprovázet reorganizace synaptických kontaktů.

Centrální senzitivace je důsledkem aktivace mnoha intracelulárních signálních kaskád, které zahrnují aktivaci celé škály proteinkináz a jiných enzymů jako je např. NO syntáza (Wu et al., 2001). Mechanizmy zvýšené citlivosti sekundárních nociceptivních neuronů k uvolněnému neuropřenašeči zahrnují mimo jiné fosforylaci NR1 podjednotky NMDA receptoru (Zou et al., 2000) a GluR1 podjednotky AMPA receptoru (Fang et al., 2003). Výstupní nociceptivní signalizace z míchy je při centrální senzitivaci výrazně zesílena.

Neurony zadního rohu míšního včetně spinothalamických mohou být i po krátkém zvýšení aktivity na primárních nociceptivních neuronech senzitivovány, stávají se citlivějšími k přicházející vstupní aktivitě a dochází k potenciaci synaptického přenosu. Takovéto zvýšení účinnosti centrálních synapsí může mít více odlišných forem, které jsou přiblíženy v následujícím textu. Všechny níže uvedené formy synaptické plasticity jsou v současné době považovány za možný mechanismus podílející se na centrální senzitivace (Woolf a Salter, 2000; Ji et al., 2003).

Jeden z krátkodobých mechanismů posílení synaptického přenosu je tak zvaný wind-up. Wind-up je na homosynaptické aktivitě závislé progresivní zvýšení odpovědi neuronu na vstupní aktivitu. Při opakované nízkofrekvenční stimulaci C vláken dochází na neuronech zadního rohu míšního ke zvyšování počtu generovaných akčních potenciálů, přičemž pouze aktivované synapse podstupují těmto změnám (Mendell a Wall, 1965; Mendell, 1984). Z excitovaných centrálních zakončení primárních aferentních vláken se kromě glutamátu uvolňují také substance P a CGRP. Tyto neuropeptidy aktivují své metabotropní receptory, což vede k pomalé postsynaptické depolarizaci, která umožňuje časovou sumaci vstupů přicházejících z primárních

nociceptivních neuronů. Časová sumace vstupní aktivity je velmi důležitá pro zvýšení pravděpodobnosti vzniku akčního potenciálu.

Klasická centrální senzitivace vychází z původní představy, že se jedná o plasticitu závislou na heterosynaptické aktivitě, která přetrvává po krátkém počátečním stimulu desítky minut (Woolf, 1983; Thompson et al., 1990, 1993). Spouštěcím podnětem je masivní aktivace nociceptorů což může být elektrická stimulace C vláken, intenzivní tepelný podnět, periferní aplikace iritantu jako je kapsaicin, nebo poranění tkáně. Několikasekundová intenzivní stimulace nociceptorů tak může zefektivnit synaptickou účinnost na neuronech zadního rohu míšního na mnoho hodin. Pokud původní podnět přetrvává, byť jen s nízkou intenzitou, tak mohou být míšní neurony senzitivovány i po dobu dní. Příkladem je ektopická aktivita na primárních aferentních vláknech při poranění periferního nervu, která výrazně prodlužuje dobu senzitivace centrálních neuronů (Koltzenburg et al., 1992). Zajímavé je, že ke zvýšení synaptické účinnosti nedochází pouze na synapsích tvořených z primárních nociceptivních vláken, která byla aktivována původním stimulem (homosynaptická facilitace), ale také na synapsích, které nebyly aktivovány původním stimulem (heterosynaptická facilitace), kde presynaptickou část tvoří nízkoprahová mechanosenzitivní A β vlákna (Simone et al., 1989b). Kromě zesílení odpovědi míšních neuronů dochází také ke zvýšení celkového počtu aktivovaných neuronů zapojených při daném podnětu do nociceptivní signalizace.

Na zvýšení synaptické účinnosti se podílí především dva hlavní mechanismy: 1) posttranslační modifikace iontových kanálů a receptorů anebo jejich regulačních proteinů, což ovlivňuje jejich funkční vlastnosti a 2) změny exprese iontových kanálů a receptorů na buněčném povrchu neuronů zadního rohu míšního a primárních aferentních vláknech a jejich regulovaná internalizace a reinzerce do plazmatické membrány (Ji et al., 2003). V mnoha případech je pro vznik heterosynaptické potenciace v zadním rohu míšním důležitý vtok Ca²⁺ iontů do buňky kanálem NMDA receptorů nebo přes napětím aktivované Ca²⁺ kanály. Nesporný význam mají fosforylace NMDA a AMPA receptorů zvyšující synaptickou účinnost regulací jejich biofyzikálních vlastností nebo jejich inzercí do membrány (Woolf a Salter, 2000). Vyšší heterosynaptická účinnost může zvyšovat účinek neuropřenašeče a modulátorů uvolněných nejenom z primárních aferentních vláken, ale také z glií. Zvýšený výlev glutamátu může být důsledkem produkce prostaglandinů cyklooxygenázou, aktivace TRPV1 receptorů na primárních aferentních vláknech, P2X₃ receptorů anebo presynaptických NMDA autoreceptorů.

Dlouhodobá potenciace (LTP) je převážně homosynaptické zvýšení synaptické účinnosti vyvolané krátkodobým vstupem o vysoké frekvenci (Randic et al., 1993; Ikeda et al., 2003). Stimulace nociceptivních aferentních neuronů vyvolá potenciaci rychlého synaptického přenosu zprostředkovaného AMPA receptory, která je závislá na aktivaci NMDA receptorů. Experimentálně navozená LTP v zadním rohu míšním je podmíněna aktivací podobných signálních kaskád jako LTP závislá na NMDA receptorech v jiných oblastech CNS (Ji et al., 2003). Na jejím vzniku se podílí např. fosforylace GluR1 podjednotky AMPA receptoru pomocí CaMKII (Fang et al., 2002), PKA a PKC (Fang et al., 2003). LTP byla hojně studována především v hipokampu v souvislosti s výzkumem mechanismů paměti (Malenka a Nicoll, 1999). Centrální senzitivace míšních neuronů/LTP může být považována za určitou formu paměti bolestivých podnětů (Fang et al., 2002).

Akutní poranění tkáně přímo nebo nepřímo vede k aktivaci nociceptorů, které mohou iniciovat periferní a centrální senzitivaci. Neurogenní zánět spojený s poraněním tkáně nejenom senzitivuje periferní zakončení, jejichž excitace vede k senzitivaci centrálních neuronů, ale vede také ke změnám transkripce v primárních sensorických a míšních neuronech, což umožňuje dlouhodobou modulaci jejich funkce (Woolf a Costigan, 1999). Periferní zánět a poranění jsou spojovány se zvýšenou expresí a výlevem neuropeptidů jako je SP nebo mozkový neurotrofín faktor BDNF a změnami ve stovkách genů, které mohou regulovat vzrušivost centrálních zakončení sensorických neuronů. Ke změnám v transkripci často dochází pod vlivem neurotrofinů. Dokonce může dojít až ke změně fenotypu primárního sensorického neuronu (Woolf a Salter, 2000).

Intenzivní aktivita přicházející do zadního rohu míšního způsobuje výlev glutamátu a neuropeptidů z centrálních zakončení primárních nociceptivních neuronů, které mimo jiné aktivují kinázy, z nichž např. ERK může vstupovat do jádra buňky, kde fosforyluje protein CREB. Tento protein se váže na promotory genů, čímž spustí jejich přepis. Mohou být přepisovány geny tzv. „časné“ nebo „pozdní odpovědi“, mezi geny časné odpovědi patří FOS nebo gen pro enzym COX-2. Detekce transkripčního faktoru c-Fos v neuronech zadního rohu míšního se hojně využívá jako markeru nociceptivní signalizace. Mezi geny pozdní odpovědi patří např. geny pro prodynorphin, NK1 receptor pro SP nebo TrkB receptor pro BDNF (Dubner a Ruda, 1992; Ji et al., 2002).

Kromě indukce na aktivitě závislých transkripčních změnách v neuronech zadního rohu míšního dochází při periferním zánětu k rozsáhlé indukci transkripce

genů pro cyklooxygenázu 2 (COX-2) v mnoha oblastech CNS včetně míchy na základě humorálního cytokinového signálu. Na masivní aktivaci COX-2 je založena difúzní bolest svalů, kloubů a šlach spojená se zvýšenou tělesnou teplotou, změnami nálady a narušení cyklu spánku a bdění, které doprovázejí zánětlivá onemocnění (Samad et al., 2002).

2.2.3. Změny inhibičního systému a reorganizace synaptických kontaktů

Inhibiční synaptický přenos nocicepce v zadním rohu míšním může být narušen na aktivitě závislou depresí synaptických vstupů na inhibiční interneurony. Uvažuje se také o možnosti apoptózy inhibičních neuronů za určitých patologických podmínek. Stimulace primárních aferentních A δ vláken způsobuje dlouhodobou depresi (LTD) synaptického přenosu mezi primárními aferentními vlákny a inhibičními neurony zadního rohu míšního (Song a Huganir, 2002). Dlouhodobá deprese synaptického přenosu v hipokampu a mozečku je založená na internalizaci AMPA receptorů ze synapsí. Je pravděpodobné, že v míše funguje podobný mechanismus LTD.

Asi týden po poranění periferního nervu podléhají některé GABAergní interneurony v zadním rohu míšním apoptóze. Toto selektivní odumírání neuronů může být způsobeno nadměrným výlevem glutamátu, který má ve vysoké koncentraci excitotoxické účinky, narušením jeho zpětného transportu do buněk nebo řízenou buněčnou smrtí po uvolnění cytokinu TNF α z mikroglíí (Moore et al., 2002; Scholz et al., 2005).

Centrální senzitivace může být založena také na reorganizaci synaptických spojů. Je možné, že A β primární aferentní vlákna vytvoří synapse se specifickými nociceptivními neurony zadního rohu míšního, přitom za normálních podmínek mezi nimi ke kontaktu nedochází (Woolf a King, 1990). Při strukturální reorganizaci míšních spojů se mohou zakončení primárních A β vláken objevovat v laminách I a II, kde vytvářejí nové synaptické spoje (Bester et al., 2000; Kohno et al., 2003).

2.2.4. Účinky prozánětlivých cytokinů na míšní úrovni

Gliové a imunitní buňky lokalizované v míše mohou za určitých patologických stavů uvolňovat prozánětlivé cytokiny a zapojit se tak do modulace nociceptivní signalizace. Některé chronické stavy bolesti při poranění centrálního a periferního nervového systému vedou k hypertrofii mikroglíí a astrocytů, které hojně produkují cytokiny, chemokiny a další algogenní látky. Navíc dochází k významnému nárůstu počtu gliových buněk, které další produkcí cytokinů zvyšují jejich koncentraci. Např. u chronické konstriktce sedacího nervu, jako modelu neuropatické bolesti, bylo pozorováno zmnožení astrocytů v míšním segmentu L4 (Garrison et al., 1994). Ústřední úloha mikroglíí v patologické nociceptivní signalizaci byla demonstrována implantací mikroglíí aktivovaných *in vitro* do míchy, což simulovalo projevy neuropatické bolesti jako je mechanická allodynie (Tsuda et al., 2003). Aktivace a zmnožení mikroglíí a astrocytů v míše bylo patrné po subkutánní injekci kompletního Freundova adjuvans, které se běžně používá k experimentálnímu navození periferního zánětu. Přitom pro vznik hyperalgie byla podstatná aktivace mikroglíí a pro její přetrvání zase astrocytů (Raghavendra et al., 2004). Aktivace astrocytů na modelu zánětlivé bolesti ovšem nebyla pozorována ve studii prokazující robustní aktivaci astrocytů v míše spojenou se zhoubným nádorem (Honore et al., 2000). Disproporce mezi těmito studii může být způsobena různou citlivostí použitých detekčních metod nebo využitím odlišných druhů experimentálních zvířat.

Při experimentálním podání cytokinů TNF α nebo IL-6 intracerebroventrikulární injekcí byl prokázán vznik tepelné hyperalgie (Oka et al., 1995, 1996). Látky produkované aktivovanými gliemi zvyšují vzrušivost míšních neuronů a výlev excitačních aminokyselin a SP z presynaptických zakončení (Watkins et al., 2001). Kromě glií mohou být endogenním zdrojem cytokinů v míše také neurony (Yang et al., 2004). Receptory, které TNF α v míše aktivuje jsou exprimovány na primárních sensorických vláknech i míšních neuronech a jejich počet může být za patologických podmínek rovněž zvýšen (Ohtori et al., 2004). Aktivace těchto receptorů může vést k rychlým změnám vzrušivosti neuronů nebo změnám exprese jejich genů. Cytokiny tak mohou modulovat synaptický přenos v míše nebo dokonce iniciovat buněčnou apoptózu (Watkins a Maier, 2003).

Je zajímavé, že při periferním zánětu dochází kromě lokální produkce algogenních látek také k významnému zvýšení koncentrace IL-1 β v mozkomíšním

moku. Receptory pro IL-1 β jsou mimo jiné exprimovány mnoha míšními neurony a jejich aktivace vede k rozsáhlé indukci transkripce genů pro COX-2 v míše a dalších oblastech CNS (Samad et al., 2001). COX-2 zvyšuje koncentraci prostaglandinů v mozkomíšním moku, které moduluji synaptický přenos v somatosenzorických drahách. Není však zcela zřejmé, jakým způsobem je při periferním zánětu veden signál k produkci IL-1 β v CNS. Je pravděpodobné, že se jedná o humorální signalizaci, kdy se lokálně, zánětem produkované cytokiny šíří krevním řečištěm a váží se na své receptory na buňkách hematoencefalické bariéry, které mají schopnost spustit signalizační kaskádu vedoucí až ke zvýšení koncentrace cytokinu v CNS (Bartfai, 2001).

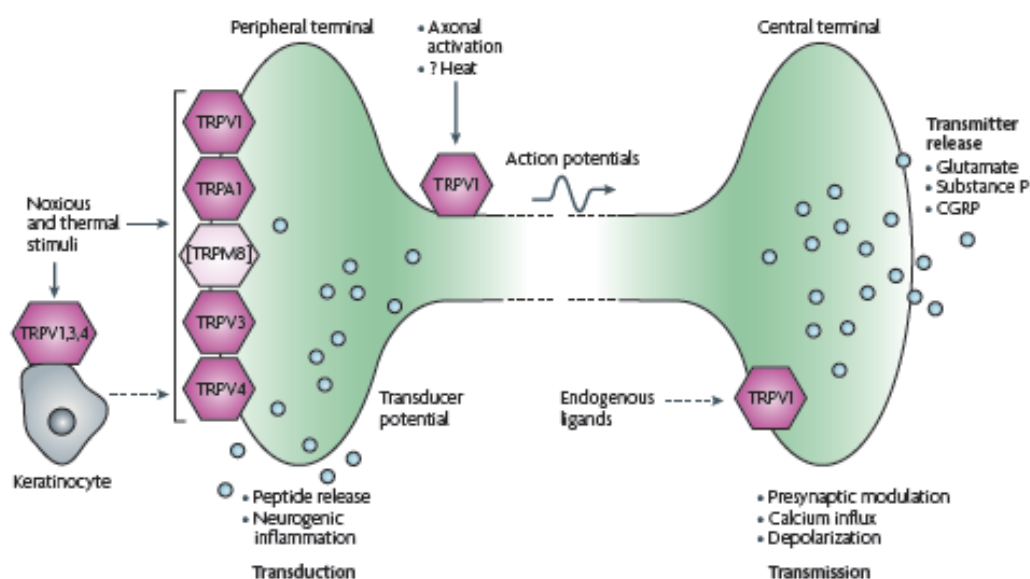
3. Úloha míšních TRPV1 receptorů v modulaci bolesti

Ve výzkumu bolesti byl k aktivaci nociceptorů dlouhá léta používán kapsaicin, aniž by byl znám mechanismus jeho působení. V závislosti na koncentraci kapsaicinu a jeho způsobu aplikace může vyvolat hyperalgezií anebo naopak analgesii (Jancso et al., 1987; Knotkova et al., 2008). Intradermální injekce kapsaicinu navozuje primární tepelnou a mechanickou hyperalgezií a sekundární mechanickou allodynii a hyperalgezií. V oblasti sekundární mechanické allodynii a hyperalgesie nejsou volná nervová zakončení senzitivována, nociceptivní signalizace z této oblasti je založena na centrálních změnách vyvolaných intenzivní aktivitou nociceptorů po injekci kapsaicinu (Simone et al., 1989b; Willis, 2001). Analgezie může být navozena např. systémovým podáním vysoce koncentrovaného kapsaicinu novorozeným potkanům, které vede k selektivní degeneraci kapsaicin senzitivních neuronů sensorických ganglií (Jancso et al., 1977, 1987; Nagy et al., 1983). Intradermální aplikace vysoce koncentrovaného kapsaicinu vede k selektivní degeneraci lidských epidermálních nociceptivních zakončení (Simone et al., 1998), což je možné využít například pro omezení pooperační bolesti (Pospisilova a Palecek, 2006).

Specifický receptor pro kapsaicin, který se v přírodě vyskytuje jako pálivá složka paprik, byl molekulárně identifikován a klonován až v roce 1997 (Caterina et al., 1997). V té době byl nazván podle vaniloidních látek, které jej aktivují, vaniloidním receptorem 1 (VR1). Později byl zařazen do rozsáhlé rodiny „transient receptor potential“ (TRP) receptorů a v literatuře se nyní označuje jako vaniloidní TRPV1

receptor. Izolace genu pro TRPV1 receptor umožnila podrobnější studium molekulární struktury, biofyzikálních vlastností a fyziologické úlohy tohoto receptoru u savců.

Podstatná část výzkumu byla zaměřena na definování biofyzikálních vlastností TRPV1 receptorů v různých expresních systémech s využitím buněčných kultur a na jejich funkci v periferním nervovém systému (Cortright a Szallasi, 2004; Szallasi et al., 2007; Vennekens et al., 2008). Existuje rozsáhlá dokumentace o možnosti senzitivace nebo aktivace periferních TRPV1 receptorů, integrátorů nociceptivních podnětů, pomocí mediátorů zánětu jako jsou bradykinin, prostaglandiny nebo protony (Cortright a Szallasi, 2004). Bylo již publikováno mnoho prací zdůrazňujících stěžejní úlohu TRPV1 receptorů v transdukcii a modulaci akutní i chronické bolesti. Těmito studii byl dán solidní základ využitelný při léčbě poruch nociceptivní signalizace a s nimi souvisejícími onemocněními (Szallasi et al., 2007). Funkce TRPV1 receptorů na centrálních zakončeních neuronů spinálních ganglií v zadním rohu míšním (Obr. 4) však dosud nebyla detailně prostudována a jejich úloha v nociceptivní signalizaci a její modulaci není zcela objasněna (Spicarova a Palecek, 2008).



Obr. 4 Úloha periferních a centrálních TRPV1 receptorů v transdukcii a synaptickém přenosu v zadním rohu míšním. Detekce potenciálně bolestivého nebo tepelného podnětu nociceptivním neuronem na periférii vede k aktivaci senzoričkových vláken. V zadním rohu míšním se následně z presynaptického zakončení uvolňují glutamát a neuropeptidy SP a CGRP, jejichž výlev je regulován TRPV1 receptory.

(Patapoutian et al., 2009)

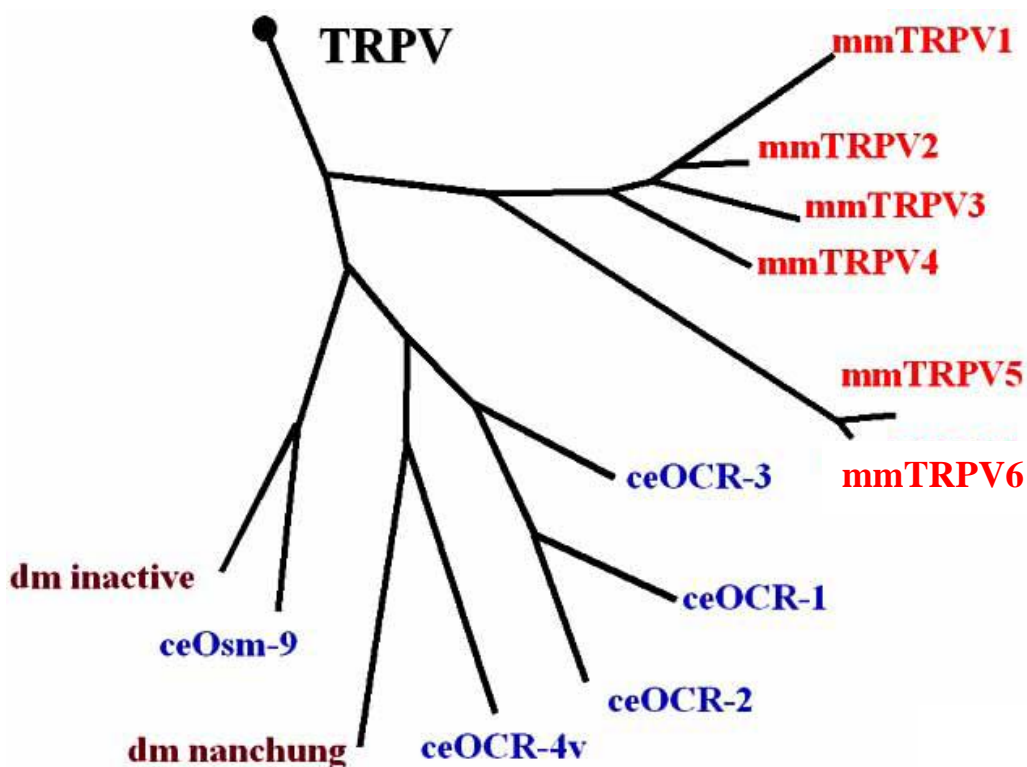
3.1. Vaniloidní TRPV1 receptor

Detailnější pochopení mechanismů působení kapsaicinu, hojně využívaného při studiu bolesti, umožnila lokalizace jeho receptoru pomocí specifické vazby velmi účinného analogu kapsaicinu radioaktivně značeného resiniferatoxinu ^3H -RTX. Resiniferatoxin izolovaný ze sukulentu Pryšce pryskyřičného (*Euphorbia resinifera*) má s kapsaicinem shodný strukturní motiv kyseliny homovanilovou (Szallasi, 1994), proto byl jejich receptor označen jako vaniloidní - podtyp 1 (VR1).

Novou etapu ve výzkumu mechanismů bolesti odstartovala v roce 1997 molekulární identifikace a naklonování cDNA kódující VR1 receptor (Caterina et al., 1997). O tři roky později se genetickou manipulací podařilo vyřadit gen kódující tento receptor a vytvořit VR1^(-/-) knock out zvířata. Na zvířatech bez VR1 receptorů se pak zkoumala eventuelní dysfunkce nocicepce a vnímání bolesti. Geneticky manipulované myši normálně reagovaly na bolestivé mechanické podněty, ale detekce bolestivých tepelných podnětů byla narušena, přitom kapsaicin u nich žádné bolestivé reakce nevyvolal (Caterina et al., 2000). Termální hyperalgezie spojená s karrageenanem indukovaným zánětem se u knock out myši dokonce vůbec nerozvinula (Davis et al., 2000).

VR1 byl na základě primární struktury zařazen do rozsáhlé rodiny transdukčních proteinů tzv. „transient receptor potential“ (TRP) receptorů a označuje se nyní jako TRPV1 receptor. Rodina TRP receptorů se podle homologie aminokyselin rozděluje do sedmi základních podrodin: „ankyrinové“ TRPA, „kanonické“ TRPC, „melastationové“ TRPM, „mukolipinové“ TRPML, „polycystinové“ TRPP, „vaniloidní“ TRPV (Vennekens et al., 2008) a podle proteinu „NOMPC“ z octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) TRPN, které na rozdíl od všech předchozích nejsou exprimovány v savčích buňkách (Venkatachalam a Monttel, 2007).

TRPV1 receptor je zakládajícím členem podrodiny savčích TRPV receptorů, která zahrnuje šest typů TRPV1-6, přičemž TRPV1-4 mají stěžejní úlohu v nocicepci a jsou teplotními senzory (Vennekens et al., 2008; Obr. 5). Dalších sedm typů receptorů bylo identifikováno u bezobratlých, prvním charakterizovaným byl receptor citlivý ke změnám osmolarity u háďátka obecného (*Caenorhabditis elegans*), který byl nazván Osm-9. U hmyzu byl popsán např. v hypoosmotickém prostředí aktivní receptor Nanchung, nazvaný podle Nan proteinu izolovaného z octomilky obecné (Kim et al., 2003).



Obr. 5 Fylogenetický strom příbuznosti receptorů TRPV podrodiny.

mm (*Mus musculus*), ce (*Caenorhabditis elegans*), dm (*Drosophila melanogaster*)

(Vennekens et al., 2008)

TRPV1 receptor je považován za integrátor různých fyzikálních a chemických nociceptivních podnětů, protože může být aktivován vysokou teplotou ($\geq 43^\circ\text{C}$), vazbou protonů při jejich zvýšené koncentraci v extracelulárním prostředí ($\text{pH} \leq 5,9$), též pozitivně nabitým gadoliniem Gd^{3+} (Tousova et al., 2005), depolarizací plazmatické membrány (Voets et al., 2004; Nilius et al., 2005; Matta a Ahern, 2007), ethanolém (Trevisani et al., 2002) a řadou dalších exogenních a endogenních ligandů označovaných jako vaniloidy (Tominaga et al., 1998; Numazaki et al., 2004; Vennekens et al., 2008). Kromě nejznámějšího TRPV1 agonisty kapsaicinu, který se vyskytuje v několika druzích paprik jako jejich pálivá složka, jsou rostlinného původu ještě další agonisté: resiniferatoxin z pryšce pryskyřičného (*Euphorbia resinifera*), allicin obsažený v čerstvém česneku (*Allium sativum*), kafr z kastrovníku lékařského

(*Cinnamomum camphora*), piperine z černého pepře (*Piper nigrum*). Některé z těchto látek ovšem působí i na jiných TRP receptorech, allicin aktivuje TRPA1 receptory (Bautista et al., 2005) nebo kafr aktivuje TRPV3 a inhibuje TRPA1 receptory (Xu et al., 2005). Z pavoučího jedu sklípkana *Psalmopoeus cambridgei* byly izolovány tzv. vanilotoxiny, které mimo účinky na jiné kanály také aktivují TRPV1 receptory (Siemens et al., 2006). Ze syntetických látek je možné TRPV1 receptory aktivovat pomocí 2-APB (2-aminoethoxydifenylborát), který blokuje též TRPM8 a TRPC receptory (Vennekens et al., 2008), olvanilu nebo phenylacetylvanilu (Alexander et al., 2008). Endogenním agonistům TRPV1 receptorů je věnována následující kapitola.

3.2. Endogenní agonisté TRPV1 receptorů

V míše nedochází k výraznějšímu zvýšení teploty a snížení pH nebo výlevu mnoha mediátorů zánětu, které aktivují nebo senzitivizují TRPV1 receptory, jako při periferním poškození tkáně. Aktivace míšních TRPV1 receptorů tudíž nemůže být dosaženo stejnými způsoby jako na periferních zakončeních primárních sensorických neuronů. Z tohoto důvodu bylo v posledních letech vynaloženo velké úsilí na detekci možných endogenních agonistů centrálních TRPV1 receptorů (Starowicz et al., 2007).

Prvním nalezeným endogenním ligandem TRPV1 receptorů byl anandamid (AEA, *N*-arachidonylethanolamin; Zygmunt et al., 1999) původně známý jako agonista kanabinoidních receptorů (Devane et al., 1992). Jako možné přímé aktivátory TRPV1 receptorů byly navrženy některé produkty lipoxygenázy, nejúčinnější z nich jsou 12- a 15-HPETE (hydroperoxyeikosatetraenové kyseliny), 5- a 15-HETE (hydroeikosatetraenové kyseliny) a leukotrien B₄, které byly testovány na izolovaných membránových terčích ze sensorických neuronů. Tyto produkty lipoxygenázy bývají generovány při zánětu, který je spojen s hypersenzitivitou. Úloha produktů lipoxygenázy ve zvýšené citlivosti byla prokázána jejich intradermální injekcí s následným vznikem hyperalgie (Hwang et al., 2000).

Další skupinou endogenních ligandů TRPV1 receptorů jsou některé nenasycené *N*-acyldopaminy původně izolované ze striata krávy. *N*-arachidonoyldopamine (NADA) účinně aktivoval TRPV1 receptory na neuronech spinálních ganglií potkana a v míšním řezu indukoval výlev SP a CGRP. Koncentrace potřebná k výlevu neuropeptidů (10-100 nM) byla desetkrát nižší než u anandamidu (Huang et al., 2002).

Na neuronech spinálních ganglií bylo také ukázáno, že účinek NADA je vyšší po fosforylaci TRPV1 receptoru pomocí PKC (Premkumar et al., 2004). Další analýzu striatálního extraktu, ze kterého byla izolována NADA, provedli Chu et al. (2003), kteří odhalili dalšího endogenního agonistu TRPV1 receptorů *N*-oleoyldopamin (OLDA). Extracelulární aplikace OLDA na kulturu TRPV1-transfekovaných HEK buněk vyvolala vtok Ca^{2+} iontů dovnitř těchto buněk. Pokud byl OLDA v *in vivo* experimentech injikován subkutánně do *planty pedis* zadní končetiny potkana zapříčinil vznik tepelné hyperalgezie dokonce s větším potenciálem než NADA. Navíc se OLDA ukázal být pouze slabým agonistou kanabinoidních CB1 receptorů narozdíl od NADA. Stejně jako NADA je však OLDA rozpoznáván membránovým transportérem pro anandamid, což může regulovat jeho lokální koncentraci u vazebného místa na receptoru. Je také slabým substrátem pro hydrolázu amidu mastných kyselin, která by ho mohla rozkládat.

Nedávno bylo zjištěno, že TRPV1 receptory přímo interagují s omega-3 polynenasycenými mastnými kyselinami, přičemž jejich účinky mohou být protikladné. Zatímco kyselina dokosahexaenová (DHA) je agonistou TRPV1 receptorů v závislosti na jeho fosforylaci prostřednictvím PKC, tak kyseliny eikosapentaenová (EPA) a linoleová inhibují odpovědi vyvolané vaniloidním agonistou TRPV1 receptorů (Matta et al., 2007). Omega-3 polynenasycené mastné kyseliny jsou součástí plazmatických membrán buněk, jejich podíl v organismu může být regulován dietou, protože jsou obsaženy především v rybím tuku a rostlinných olejích. Při jejich zvýšeném příjmu potravou mohou působit analgeticky.

Míšní TRPV1 receptory by mohly být rovněž aktivovány signální molekulou NO, která je známá pleiotropním účinkem při regulaci řady buněčných procesů (Yoshida et al., 2006). Dále s TRPV1 receptorem mohou ve vazebném místě pro protony elektrostaticky interagovat extracelulární jednomocné nebo dvoumocné kationty (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}). Elektrofyzilogická měření prokázala senzitivaci a přímou aktivaci TRPV1 receptoru prostřednictvím kationtů v závislosti na jejich koncentraci (Ahern et al., 2005). Podobnými aktivátory TRPV1 receptorů jsou také přirozené polyaminy, jako je spermin, spermidin a putrescin. Hladina polyaminů se zvyšuje při zánětu a negativně reguluje aktivaci makrofágů (Zhang et al., 2000). Extracelulární polyaminy mohou přímo aktivovat TRPV1 receptor v závislosti na velikosti jejich náboje (Ahern et al., 2006).

3.3. Distribuce TRPV1 receptorů v míše

Pomocí autoradiografické vazebné metody využívající radioaktivně značený resiniferatoxin ^3H -RTX byly v hojné míře detekovány a vizualizovány TRPV1 receptory v superficiální oblasti zadního rohu míšního u potkana, prasete a člověka (Szallasi, 1994). TRPV1 receptory nebylo možné vůbec detekovat anebo hustota označených receptorů dramaticky klesla po aplikaci neurotoxické dávky kapsaicinu a po unilaterální dorzální rizotomii ipsilaterálně. Z toho vyplývá, že drtivá většina TRPV1 receptorů v míše je lokalizována na centrálních zakončeních neuronů spinálních ganglií (Szallasi, 1994; Guo et al., 1999; Valtschanoff et al., 2001). Neurony spinálních ganglií exprimují TRPV1 receptory nejenom na periferním a centrálním výběžku, ale také na tělech neuronů (Acs et al., 1994b). Metodou *in situ* hybridizace mRNA pro TRPV1 receptory (Caterina et al., 1997) a imunohistochemicky (Guo et al., 1999) bylo prokázáno, že exprese TRPV1 receptorů je omezena na malé a středně velké neurony s axony typu C a A δ (Mezey et al., 2000; Pingle et al., 2007; Zacharova a Palecek, 2009).

Centrální primární aferentní vlákna senzitivní na kapsaicin jsou převážně zakončena v superficiální oblasti zadního rohu míšního, a to v lamině I a II. V lamině II projikuje větší počet kapsaicin senzitivních vláken do její vnitřní části II_i než do II_o (Guo et al., 1999; Valtschanoff et al., 2001). Zřetelná TRPV1 exprese byla nalezena podél laterální kolaterální dráhy, kde je zakončena většina primárních viscerálních vláken. V laminách III-V byly pomocí imunohistochemického barvení detekovány TRPV1 receptory pouze ojediněle (Hwang a Valtschanoff, 2003). TRPV1 receptory se v malém množství vyskytují i na neuronech v superficiální oblasti zadního rohu míšního. Na tělech neuronů v lamině II bylo pozorováno pozitivní imunohistochemické barvení pro TRPV1 receptory (Valtschanoff et al., 2001), z nichž některé kolokalizují s NK1 receptory (Doly et al., 2004a,b). Nedávno bylo prokázáno, že neurony zadního rohu míšního exprimující TRPV1 receptory jsou glutamatergní a jejich aktivace může zesílit excitační synaptický přenos v míše (Zhou et al., 2009). TRPV1 receptory se v zadním rohu míšním nevyskytují pouze na nervových buňkách, ale jejich přítomnost byla pozorována také na buňkách gliových. Imunohistochemie na ultrastrukturální úrovni s využitím dvojitého značení pro kyselý gliální fibrilární protein (GFAP) odhalila TRPV1 receptory na astrocytech v lamině I a II. TRPV1 receptory označené

uvedeným způsobem představovaly 7% celkového počtu označených receptorů v dané oblasti (Doly et al., 2004b).

Při zkoumání jednotlivých segmentů míchy pomocí autoradiografického značení využívajícího vazby ^3H -RTX se ukázalo, že hustota TRPV1 receptorů se v míše mění rostrokaudálně. Množství detekovaných receptorů v cervikální a thorakální míše bylo srovnatelné a odpovídalo přibližně 70 fmol/mg proteinu, ale v lumbálním segmentu bylo dvojnásobné. Přitom afinita použitého ligandu RTX k TRPV1 receptoru byla shodná ve všech míšních segmentech (Szallasi et al., 1995). Pozdější studie využívající jiných metod, a to imunofluorescence a konfokální mikroskopie, odhalila vzrůstající denzitu TRPV1 receptorů v rámci lumbálního segmentu míchy od L4 k L6 (Hwang a Valtschanoff, 2003). Tato práce také předpokládá vysokou míru exprese TRPV1 receptorů ve viscerálních aferentech.

Lokalizace a hustota TRPV1 receptorů v míše je závislá na vývojovém stádiu organismu. Buněčné membrány izolované z homogenátu míchy mláďat laboratorního potkana exprimují druhý den po narození minimálně třikrát více TRPV1 receptorů než membrány dospělých zvířat (Acs et al., 1994a). Skupina Guo et al. (2001) sledovala změny v počtu a výskytu TRPV1 receptorů na centrálních zakončeních neuronů spinálních ganglií v embryonálním a postnatálním vývoji. Pozitivní imunohistochemické barvení pro TRPV1 receptory se objevuje již 16. embryonální den vývoje v lamině I a je stěží viditelné v lamině II. Obdobně tomu je i v P2, ale v P10 se oblast exprese rozšiřuje a zřetelně zasahuje do laminy II. V P20 je možné v lamině II detekovat stále více TRPV1 receptorů a v P30 jsou již receptory exprimovány ve dvou zřetelně odlišitelných zónách v lamině I a II_i, stejně jako u dospělých zvířat.

3.4. Kolokalizace TRPV1 pozitivních primárních aferentních vláken s peptidy

Aplikace kapsaicinu na míšní řezy evokuje simultánní výlev neuropeptidů substance P a CGRP v zadním rohu míšním (Saria et al. 1986). To je v souladu s uvolněním SP z primárních sensorických neuronů po intratekální aplikaci kapsaicinu, která způsobí dlouhodobé zvýšení prahu pro bolestivé teplené podněty (Yaksh et al., 1979). Asi u 30% neuronů spinálních ganglií exprimujících TRPV1 receptory byla detekovatelná SP, přičemž asi 75% neuronů pozitivně značených pro SP bylo rovněž TRPV1 pozitivních. Kolokalizace TRPV1 receptorů a SP zůstává během vývoje

konstantní (Guo et al., 2001). Rozsah kolokalizace imunoreaktivity pro TRPV1 receptory a SP v superficiální oblasti zadního rohu míšního byl však menší, než se očekávalo dle výsledků studie zpracovávající těla neuronů spinálních ganglií (Guo et al., 1999; Valtshanoff et al., 2001). Zatímco v lamině I a podél laterální kolaterální dráhy v míšním segmentu L4 nebyla kolokalizace TRPV1 receptorů a SP častá, tak na úrovni L6 byla mnohem robustnější, což koresponduje s vyšším stupněm kolokalizace ve viscerální aferentaci ve srovnání s kožní (Hwang a Valtchanoff, 2003). V lamině II_i byla také prokázána kolokalizace TRPV1 receptorů s purinergními P2X₃ receptory, které mají též důležitou úlohu v synaptickém přenosu bolestivých podnětů, a s glykoproteinem vázajícím lektin IB4 (Guo et al., 1999), který exprimují především malé neurony spinálních ganglií nesyntetizující neuropeptidy (Silverman a Kruger, 1990).

Asi 80% projekčních neuronů v lamině I exprimuje neurokininový receptor (NK1) pro substanci P (Todd, 2002). Tyto receptory se významně podílejí na vzniku tepelné hyperalgie (Mantyh et al., 1997). Bylo prokázáno, že primární aferentní vlákna exprimující TRPV1 receptory jsou v přímém kontaktu s NK1 pozitivními neurony zadního rohu míšního v lamině I. Díky metodě retrogradního značení míšních projekčních neuronů injekcí barvy do parabrachiálního jádra se usuzuje, že většina těchto synapsí je součástí monosynaptické dráhy z periferie do laterálního parabrachiálního jádra (Hwang et al., 2003). Mnohonásobné imunofluorescenční barvení pro TRPV1, AMPA a NMDA receptory též odhalilo, že TRPV1 pozitivní vlákna kontaktují častěji NK1/ NMDA pozitivní neurony než neurony exprimující NK1/AMPA receptory (Hwang et al., 2004).

3.5. Modulace synaptického přenosu TRPV1 receptory v zadním rohu míšním

Kapsaicinem evokovaný výlev glutamátu z primárních aferentních vláken v míše potkana byl poprvé prokázán pomocí fluorometrického on-line monitorujícího systému spojeného s *in vitro* superfúzním aparátem (Ueda et al., 1994). Aplikace 0,1 - 3 μ M koncentrace kapsaicinu na dorzální míšní řez způsobila zvýšení výlevu glutamátu a jeho 1 - 10 μ M koncentrace vyvolala uvolnění SP. Zvýšený výlev glutamátu a aspartátu v míše je možné stimulovat také pomocí SP nebo CGRP (Kangrga a Randic,

1990). Oba tyto neuropeptidy se podílejí na nociceptivní signalizaci a jejich uvolnění do extracelulárního prostoru může být stimulováno kapsaicinem.

Dopad zvýšeného výlevu glutamátu na excitační synaptický přenos v zadním rohu míšním, jako odpověď na aplikaci kapsaicinu, byl sledován také pomocí elektrofyzilogických metod. Aplikace kapsaicinu (2 μ M) způsobila dramatický nárůst frekvence spontánních i miniaturních EPSC v míšních řezech z dospělého potkana. Zvýšení výlevu glutamátu bylo možné zabránit aplikováním antagonisty TRPV1 receptorů kapsazepinu, přitom veškerou aktivitu bylo možné blokovat pomocí antagonisty non-NMDA glutamátových receptorů CNQX (Yang et al., 1998). Z toho vyplývá, že kapsaicin aktivoval presynaptické TRPV1 receptory a glutamát uvolněný z primárních aferentních vláken aktivoval postsynaptické AMPA receptory. Kapsaicinem stimulované zvýšení frekvence mEPSC bylo prokazatelné již od P0 s dramatickým zvětšením efektu mezi P6 a P10. Kapsazepinem se ovšem u mláďat potkanů mezi P8-P11 nepodařilo zcela zablokovat zvýšení frekvence mEPSC vyvolaných 2 μ M kapsaicinem, k úplnému zablokování odpovědi musel být použit jiný nespecifický antagonist TRPV1 receptorů rutheniová červeň (Baccei et al., 2003).

Odlišnou úlohu TRPV1 receptorů na zakončeních C a A δ primárních aferentních vláken naznačují pokusy provedené na míšních řezech z dospělých potkanů. C vlákna evokovaný EPSC byl inhibován aplikací kapsaicinu zhruba u 80% zkoumaných neuronů v lamině II, přitom aplikovaný kapsaicin nijak neovlivnil evokované excitační proudy vyvolané elektrickou stimulací A δ vláken (Yang et al., 1999). V souladu s tímto zjištěním jsou pozdější výsledky z experimentů provedených na řezech z míchy potkaních mláďat (P7-P10), kde aplikace kapsaicinu zamezila vzniku elektricky evokovaného EPSC na neuronech zadního rohu míšního (Baccei et al., 2003). Spontánní výlev glutamátu po aplikaci kapsaicinu se ale v tomto případě ukázal být dostatečný ke generování salv akčních potenciálů na neuronech zadního rohu míšního v ranném postnatálním vývoji (P1-P5).

Původně se usuzovalo, že inhibiční synaptický přenos v zadním rohu míšním není ovlivněn aktivací TRPV1 receptorů. Na řezech z míchy dospělých potkanů totiž nebyly nalezeny žádné změny po aplikaci kapsaicinu v GABAergních a glycinergních spontánních inhibičních postsynaptických proudcích (IPSCs) ani na A δ vlákna evokovaných IPSCs (Yang et al., 1998; Yang et al., 1999). Ačkoliv na základě imunohistochemické studie vznikla hypotéza naznačující možnost aktivace GABAergních interneuronů v zadním rohu míšním kočky po výlevu SP z primárních

nociceptivních neuronů (Wei a Zhao, 1996). Navíc bylo u potkana po intradermální injekci kapsaicinu pozorováno zvýšení exprese genu časně odpovědi c-Fos v GABAergních neuronech (Zou et al., 2001). Vyvrátit původní představu se nedávno podařilo skupině Ferrini et al. (2007), když detekovala zvýšení frekvence sIPSCs na neuronech v lamině II po aplikaci kapsaicinu (2 μ M) na akutní řezy připravené z míchy mláďat myši (P8-P12). Asi 75% těchto sIPSCs bylo GABAergních a 25% GABA/glycinergních. Kapsaicinem stimulované zvýšení frekvence sIPSC bylo omezeno aplikací vysoce selektivního antagonisty TRPV1 receptorů SB 366791. Sledovaný efekt kapsaicinu na sIPSCs snímané na neuronech v lamině II byl značně závislý na aktivaci NK1 receptorů a výrazně blokován aplikací tetrodotoxinu, což poukazuje na mechanismus působení využívající akčních potenciálů. Autoři hypotetizují, že výlev SP, který je závislý na TRPV1 receptorech, excituje inhibiční neurony v lamině I, III a IV, což může vést ke zvýšenému výlevu neurotransmiteru GABA a glycinu v oblasti laminy II. Zvýšení frekvence glycinergních sIPSCs v superficiální oblasti zadního rohu míšního indukované aplikací kapsaicinu na akutní řezy z potkana bylo také prokázáno skupinou Zhou et al. (2007).

Přímé funkční spojení mezi kapsaicin senzitivními sensorickými vlákny a míšními neurony exprimujícími NK1 receptory popsali Labrakakis a MacDermott (2003). S využitím SP konjugované s fluorescenční barvou označili NK1 pozitivní neurony, které byly lokalizovány především v lamině I a zřídka v laminách III a IV. Na označených neuronech metodou terčíkového zámku snímali mEPSC. Aplikace kapsaicinu způsobila zvýšení frekvence mEPSC asi u 73% neuronů exprimujících NK1 receptory v lamině I a 43% neuronů v laminách III a IV.

Míra excitace v zadním rohu míšním byla sledována pomocí fluorescenční barvy citlivé na malé změny napětí, kterou byly označeny neurony v míšních řezech připravených z potkanů mezi P12 a P25. Po aplikaci kapsaicinu nebo zvýšením teploty lázně byla inhibována excitace vyvolaná elektrickou stimulací C vláken. Tento efekt se podařilo zablokovat pomocí antagonisty TRPV1 receptorů kapsazepinu a antagonisty dvou purinoreceptorů P2X a P2Y suraminu, přitom byl usnadněn agonistou P2Y receptorů (Kusudo et al., 2006).

3.6. Úloha míšních TRPV1 receptorů v patologických stavech

Intratekální aplikace kapsaicinu vede ke vzniku přechodné hyperalgie, po které může následovat dlouhodobá analgesie. Při behaviorálních pokusech došlo po intratekální injekci kapsaicinu u potkanů i myši ke zvýšení prahu citlivosti k tepelným podnětům, který byl na molekulární úrovni spojen s uvolněním SP v zadním rohu míšním (Yaksh et al., 1979; Gamse, 1982). Skupina Mousseau et al. (1994) pozorovala po intratekální injekci nízké koncentrace kapsaicinu rozvoj akutní bolesti. Významné redukce takto vyvolané bolesti bylo dosaženo rovněž intratekální aplikací kapsaicinu, ale ve vyšší koncentraci, nebo aplikací fragmentu N-konce SP (SP1-7) 24h před zákrokem. Kapsaicinem vyvolaná akutní bolest byla pozorována již u mláďat potkanů v P10, u dospělých zvířat ovšem trvala déle, přitom intenzita bolesti byla shodná u obou zkoumaných skupin zvířat (Guo et al., 2001). Intratekální aplikace jiného agonisty TRPV1 receptorů resiniferatoxinu zablokovala vznik hyperalgie spojené se zánětem u potkana a ulevila od artritické bolesti a bolesti spojené s nádorovým bujením u psa (Kurai et al., 2004). Dlouhodobý analgetický účinek kapsaicinu může být zapříčiněn selektivní degenerací neuronů spinálních ganglií exprimujících TRPV1 receptory nebo jejich výběžků. Aktivované TRPV1 receptory umožní masivní vtok Ca^{2+} iontů otevřeným kanálem do buněk a jeho uvolnění z endoplazmatického retikula, neurotoxicky vysoká intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů naruší funkci organel a následně celé buňky (Olah et al., 2001).

Za účelem potlačení chronické bolesti byly kromě agonistů TRPV1 receptorů testovány také jejich antagonisté. Na modelu neuropatické bolesti, která vznikla po ligatuře sedacího nervu, Kanai et al. (2005) ukázali, že intratekálně aplikovaný antagonist TRPV1 receptorů BCTC mírní mechanickou allodynii spojenou s tímto typem bolesti. Antagonista též zablokoval kapsaicinem stimulované uvolnění neuropeptidů v akutním míšním řezu. Nedávno vyvinutí antagonisté TRPV1 receptorů A-784168 a A-795614 podání intratekálně zmírnilo tepelnou hyperalgiu a mechanickou allodynii spojené se zánětlivou bolestí a také osteoartritickou bolest (Cui et al., 2006). Úlohu periferních a centrálních TRPV1 receptorů v hyperalgiu vyvolané experimentálně navozeným periferním zánětem zkoumali Kanai et al. (2007). Zatímco intraplantárně aplikovaný antagonist TRPV1 receptorů (BCTC nebo SB 366791) tlumil tepelnou hyperalgiu, intratekální aplikace stejných antagonistů TRPV1

receptorů tlumila nejen tepelnou hypersenzitivitu, ale i mechanickou. Míšní TRPV1 receptory se tedy podílejí na vzniku obou typů hyperalgie.

Wilson-Gerwing et al. (2005) na modelu neuropatické bolesti způsobené ligaturou sedacího nervu prokázali, že intratekálně podaný neurotrofin-3 (NT-3), negativní modulátor exprese nervového růstového faktoru, brání rozvoji tepelné hyperalgie, přitom přecitlivělost na mechanické podněty zůstává zachována. Tepelná hyperalgie korelovala se zvýšenou expresí mRNA kódující TRPV1 receptory i samotným TRPV1 proteinem v neuronech spinálních ganglií. Přecitlivělost k tepelným podnětům a zvýšení exprese TRPV1 receptorů byly blokovány intratekální infuzí NT-3. Zvýšená exprese TRPV1 genu byla pozorována v zadním rohu míšním potkana s rozvinutou tepelnou hyperalgií po poranění míchy v porovnání se zvířaty, u kterých se hyperalgie nerozvinula (DomBourian et al., 2006). Karrageenanem vyvolaný periferní zánět zvýšil transport mRNA pro TRPV1 receptory z těl neuronů spinálních ganglií do jejich centrálních zakončení v zadním rohu míšním, jak doložili Tohda et al. (2001). Změny v distribuci mRNA pro TRPV1 receptory byly zablokovány inhibitorem axonálního transportu kolchicinem. Kapsaicinem stimulovanému zvýšení výlevu glutamátu v zadním rohu míšním, jako následek periferního zánětu, bylo zabráněno cyclohexamidem, inhibitorem syntézy proteinů a také intratekální injekcí antisense oligonukleotidů komplementárních k mRNA pro TRPV1 receptory. Intratekální podání těchto antisense oligonukleotidů omezilo rovněž mechanickou hypersenzitivitu u potkanů s ligaturou míšních nervů (Christoph et al., 2007).

Některé aktivátory TRPV1 receptorů rovněž účinně aktivují kanabinooidní CB receptory. Příkladem je endogenní látka anandamid, která ve vysoké koncentraci excituje TRPV1 pozitivní aferentní vlákna v zadním rohu míšním, což vede k uvolnění neuropeptidů. Nízká koncentrace anandamidu naopak působí skrze CB receptory, jejichž aktivace je spojována s inhibičními mechanismy v této oblasti (Tognetto et al., 2001). Možnost redukce tepelné hyperalgie vyvolané intraplantární injekcí karrageenanu byla prokázána intratekální aplikací anandamidu, přitom byl tento proces závislý na TRPV1 receptorech (Horvath et al., 2008).

Lappin et al. (2006) ukázali, že po aplikaci antagonisty TRPV1 receptorů SB 366791 na akutní míšní řezy z potkana (P17-P29) s periferním zánětem dojde na neuronech zadního rohu míšního ke snížení frekvence spontánních a miniaturních EPSC a snížení amplitudy EPSC evokovaného elektrickou stimulací C vláken. Tento efekt vyvolaný aplikací antagonisty nebyl pozorován na neuronech v míšních řezech

z kontrolních zvířat. Na základě svých výsledků autoři předpokládají, že TRPV1 receptory v zadním rohu míšním jsou tonicky aktivovány u zvířat s periferním zánětem, což vede ke zvýšení výlevu glutamátu. To je v souladu se zjištěním, že kapsaicin může zvýšit koncentraci uvolněného glutamátu v laminách I, II a X ipsilaterálně k perifernímu zánětu (Sasaki et al., 1998).

Ohromující množství experimentálních důkazů z posledního desetiletí o úloze TRPV1 receptorů v nocicepci při různých patologických bolestivých stavech bylo výzvou pro vývoj nových léčiv. Nalezení vhodných způsobů, jak ovlivnit funkci TRPV1 receptorů, je příslibem nového terapeutického přístupu k léčbě bolesti. Jak shrnují Gunthorpe a Chizh (2009), nabízí se několik možných strategií zacílených na snížení aktivity TRPV1 receptorů s využitím antagonistů, agonistů, protilátek nebo inhibice RNA. Dochází k velké kompetici ve vývoji a klinickém testování antagonistů TRPV1 receptorů. Na modelu zánětlivé bolesti bylo prokázáno, že antagonisté TRPV1 receptorů mohou tlumit bolest působením nejenom na periferní, ale i na centrální receptory (Cui et al., 2006). Z klinických studií provedených na zdravých dobrovolnících jsou již známy některé výsledky prokazující analgetický účinek antagonistů TRPV1 receptorů na různé druhy bolesti. V některých případech však analgezii doprovázela zvýšená tělesná teplota. Tento vedlejší účinek mohl být zapříčiněn zablokováním TRPV1 receptorů exprimovaných v hypothalamu, v centru regulace tělesné teploty, nebo periferních TRPV1 receptorů exprimovaných na neuronech spinálních ganglií inervujících břišní viscerální orgány (Gavva et al., 2007b; Romanovsky et al., 2009). TRPV1 receptory na viscerálních, primárních afferentních vláknech jsou pravděpodobně tonicky aktivní a regulují vazokonstrikci a termogenezi (Steiner et al., 2007). Nalezením vhodného způsobu jak zamezit vzniku hypertermie při podání TRPV1 antagonistů se zabývají pokračující klinické studie (Gunthorpe a Chizh, 2009). Jednou z možností jejího zmírnění by mohla být opakovaná aplikace antagonisty TRPV1 receptorů (Gavva et al., 2007a).

CÍLE PRÁCE

Studie vypracované v rámci této dizertační práce byly vedeny cílem přispět k objasnění mechanismů nociceptivní signalizace na míšní úrovni s důrazem na procesy probíhající při patologických stavech doprovázených chronickou bolestí. Zkoumány byly především možnosti modulace synaptického přenosu v zadním rohu míšním, kde se nacházejí první synapse nociceptivních drah, které utvářejí vhodné místo pro regulaci nocicepce. Specifické snížení účinnosti nociceptivního synaptického přenosu v této oblasti má potenciál tlumit výsledný vjem bolesti.

Výsledky jednotlivých studií odpovídají na následující konkrétní otázky:

1. Moduluje endogenní agonista TRPV1 receptorů *N*-oleoyldopamin (OLDA) miniaturní excitační postsynaptické proudy na neuronech v zadním rohu míšním? Je možné aktivovat míšní TRPV1 receptory nízkou koncentrací aplikovaného OLDA po aktivaci proteinkinázy C nebo po aplikaci mediátoru zánětu bradykininu? Dochází ke zvýšení citlivosti míšních TRPV1 receptorů k OLDA při experimentálně vyvolaném periferním zánětu?
2. Může cytokin TNF α modulovat miniaturní excitační postsynaptické proudy na nociceptivních synapsích? Ovlivňuje TNF α citlivost míšních TRPV1 receptorů k endogennímu agonistovi OLDA?
3. Lze regulovat rychlý excitační synaptický přenos zprostředkovaný AMPA receptory v zadním rohu míšním inzulinem? Je modulace postsynaptických AMPA proudů inzulinem závislá na aktivaci protein-tyrozinkinázy?

METODY

Použité postupy a procedury ve všech studiích byly schváleny komisí pro práci se zvířaty Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání 246/1992 Sb., ve znění pozdějších předpisů, v souladu s pravidly IASP (International Association for the Study of Pain) pro práci s laboratorními zvířaty a Evropskou direktivou 86/609/EEC.

1. Elektrofyziologické metody

1.1. Příprava akutních míšních řezů

Lumbální řezy byly připraveny z míšní tkáně samců laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*) kmene Wistar v období od 19. do 23. postnatálního dne (P19 - P23) a mláďat laboratorní myši (*Mus musculus*) kmene B6 mezi P6 - P10 podle postupu popsaného v práci Paleček et al. (1999b).

Laboratorní potkan byl uveden do celkové hluboké anestezie pentobarbitalem sodným (90 mg/kg), aby mohla být provedena disekce míchy. Po zpřístupnění páteřního kanálu provedením laminektomie byla mícha vyjmuta a ihned vnořena do disekčního extracelulárního roztoku, jehož teplota nepřesahovala 4°C. Od míchy byly odděleny zadní kořeny, zcela odstraněna *dura mater* a částečně *pia mater*, tak aby nedošlo k poškození neuronů v zadním rohu míšním. Takto připravenou míchu bylo nutné zafixovat umístěním do žlábků mezi dvěma pevnými agarovými bločky, které byly vteřinovým lepidlem připevněny k podložce kráječe (Leica, VT1000S, Německo). Transverzální míšní řezy o tloušťce 300 μM byly krájeny žiletkou nebo safírovým nožem v disekčním roztoku chlazeném na $\leq 4^{\circ}\text{C}$ a následně inkubovány 30 min v disekčním roztoku zahříváném na $\sim 33^{\circ}\text{C}$. Po uplynutí dané doby byly řezy přemístěny do snímacího roztoku o laboratorní teplotě 21°C - 24°C. Řezy byly připraveny k vlastnímu pokusu minimálně 1h po disekci, kdy mohly být umístěny do snímací komůrky s neustálým přívodem snímacího roztoku o rychlosti ~ 2 ml/min. Buňky

v takto ošetřených řezech zachovávaly vitalitu asi 6 hodin. Oba extracelulární roztoky byly neustále syceny carbogenem (95% O₂ a 5% CO₂).

Příprava akutních řezů z míchy laboratorní myši probíhala obdobně jako u potkanů pouze s následujícími rozdíly. Do chlazeného disekčního roztoku bylo vnořeno dekapitované tělo myši a na vyjmuté míše byly v její lumbální části ponechány zadní kořeny. Mícha byla následně umístěna do středu bloku tekutého agaru o teplotě ~27°C, který při zchlazení rychle ztuhl. Teplota disekčního roztoku pro inkubaci řezů se pohybovala kolem 30°C.

1.2. Metoda terčíkového zámku (patch clamp)

Jednotlivé neurony byly vizualizovány pomocí mikroskopu s diferenciálním interferenčním kontrastem (Leica, DM LFSA, Německo), snímány kamerou (IR kamera Hitachi, KP-200P, Japonsko) v infračervené oblasti spektra a zobrazeny na TV/Video monitoru (Hitachi, VM-172, Japonsko). Elektrické proudy registrované v konfiguraci z celé buňky (whole-cell) byly zaznamenány pomocí zesilovače Axopatch-1D a analogově-digitálního převodníku (Axon Instruments, CA, USA) spojeného s počítačem vybaveným softwarem pClamp 9.0 (Axon Instruments, USA), který byl také využit při pozdější off-line analýze. Sériový odpor neuronů byl kompenzován na 80% a sledován po celou dobu experimentu. Analyzována byla pouze data získaná z neuronů, u kterých sériový odpor nepřekročil 20 MΩ.

Terčíkové mikropipety vyrobené z borosilikátových skleněných trubiček (Rüchli Glass, Otovice, Česká republika) měly po naplnění snímací elektrody intracelulárním roztokem odpor v rozmezí 3,5 – 7,0 MΩ. Miniaturní nebo evokované excitační postsynaptické proudy (EPSC) byly snímány vždy na neuronech v superficiální oblasti zadního rohu míšního v lamině I nebo II. Ve všech pokusech byly do extracelulárního snímacího roztoku přidány antagonisté dvou receptorů, které zprostředkovávají hlavní inhibiční synaptický přenos v míše, reverzibilní antagonist GABA_A receptorů bikukulin (10 μM) a kompetitivní antagonist glycinových receptorů strychnin (5 μM).

1.2.1. Specifika snímání mEPSC modulovaných pomocí OLDA a TNF α

V první a druhé studii zabývající se úlohou endogenního agonisty TRPV1 receptorů OLDA a cytokinu TNF α v nociceptivní signalizaci byly snímány mEPSC zprostředkované AMPA receptory. Registrované proudy byly filtrovány při 2 kHz a digitálně vzorkovány při 10 kHz. Izolace miniaturních AMPA proudů byla zajištěna udržováním stálého napětí -70mV na plazmatické membráně snímaného neuronu a farmakologicky (viz výše). Navíc byl do extracelulárního roztoku přidán reverzibilní blokátor sodíkových kanálů tetrodotoxin (TTX; 0,5 μ M), aby nemohlo dojít ke vzniku akčního potenciálu. Míšní neurony se vstupy z primárních aferentních vláken citlivých ke kapsaicinu byly identifikovány zvýšením frekvence mEPSC (>20%) při aplikaci kapsaicinu (0,1 - 0,2 μ M) na konci experimentálního protokolu.

Elektrofyzilogické snímání probíhalo při laboratorní teplotě nebo při stanovené teplotě 24°C a 34°C, což bylo zajištěno aplikačním systémem s přesným řízením teploty (Dittel; Dittert et al., 2006). Za pomoci tohoto systému byl přiváděn extracelulární roztok k zadnímu rohu míšního řezu skleněnou kapilárou s izolovaným měděným drátkem ohřívajícím roztok, jehož teplota byla měřena miniaturním termočlánkem v ústí kapiláry. V pokusech, kde byl testován účinek aplikace forbolesteru PMA, bylo obtížné provést snímání s relevantními parametry při teplotě 34°C, které by trvalo přibližně 30 min. Z tohoto důvodu byla v experimentálním protokolu střídavě měněna teplota 24°C a 34°C tak, aby byla získána kontrolní data i hodnoty z jednotlivých experimentálních aplikací při obou teplotách. Kontrolní data z buněk snímaných s tímto protokolem byla použita jako kontrola pro srovnání s daty získanými ze skupiny zvířat s periferním zánětem (Obr. 11 a 12). Změna ve frekvenci mEPSC vyvolaná 5 min aplikací PMA byla hodnocena těsně před druhou aplikací OLDA na konci vymývání PMA, které trvalo 10 min. Všechny aplikované experimentální látky byly přidány do extracelulárního snímacího roztoku.

1.2.2. Specifika snímání eEPSC modulovaných inzulinem

Ve třetí studii zaměřené na modulaci synaptického přenosu inzulinem byly snímány AMPA EPSC evokované elektrickou stimulací periferních aferentních vláken v zadním kořenu míšním, nebo v oblasti vstupu periferních vláken do míchy na

rozhraní šedé a bílé hmoty v akutním řezu. Ke stimulaci byla použita standardní terčíková elektroda plněná snímacím extracelulárním roztokem spojená s proudovým stimulátorem (Isolator-11, Axon Instruments, USA). Stimulační puls o délce 0,2 ms a intenzitě od 0,05 mA do 0,30 mA evokoval stabilní EPSC s minimálním proudem. Stimulační puls byl aplikován s frekvencí 0,033 Hz. Registrované proudy byly filtrovány při 5 kHz a digitálně vzorkovány při 50 kHz. Napětí na plazmatické membráně snímaných neuronů bylo udržováno na -70mV, inhibiční synaptický přenos byl blokován farmakologicky (viz výše), a navíc byl do extracelulárního roztoku přidán antagonist NMDA receptorů MK-801 (15 μ M). Pro zamezení vzniku akčních potenciálů byl do intracelulárního roztoku přidán lidokain QX (0,2 mM). Pro potvrzení izolace pouze AMPA proudů byly v některých pokusech do snímacího roztoku přidány antagonisté: AMPA/kainátových receptorů CNQX (10 μ M), AMPA receptorů GYKI 52466 (100 μ M) a kainátových receptorů SYM (3 μ M). Ostatní experimentální látky inzulin (0,5 a 10 μ M) a antagonist PTK lavendustin A (10 μ M) byly aplikovány rovněž do extracelulárního roztoku.

1.3. Složení použitých roztoků a rozpouštění látek

Intracelulární roztok obsahoval (v mM): glukono-delta-lakton (125); CsCl (15); CaCl₂ (1); EGTA (10); HEPES (10); Na₂ATP (2); NaGTP (0,5); pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 7,2 pomocí CsOH; osmolarita: 310 mOsm.

Roztok pro přípravu agarů obsahoval (v mM): NaCl (160); KCl (2,5); MgCl₂ (5); CaCl₂ (0,5); D-glukóza (10); HEPES (10).

1. a 2. studie zabývající se modulací mEPSC pomocí OLDA a TNF α :

Disekční extracelulární roztok obsahoval (v mM): NaCl (95); KCl (1,8); MgSO₄ (7); CaCl₂ (0,5); KH₂PO₄ (1,2); NaHCO₃ (26); D-glukóza (25); sacharóza (50); osmolarita: 290 mOsm.

Snímací extracelulární roztok obsahoval (v mM): NaCl (127); KCl (1,8); MgSO₄(1,3); CaCl₂ (2,4); KH₂PO₄ (1,2); NaHCO₃(26); D-glukóza (25); osmolarita 290 mOsm.

3. studie zabývající se modulací AMPA EPSC inzulinem:

Disekční extracelulární roztok obsahoval (v mM): NaCl (130); KCl (2,5); MgCl₂ (3); CaCl₂ (0,5); NaH₂PO₄ (1,25); NaHCO₃ (28); D-glukóza (25).

Snímací extracelulární roztok obsahoval (v mM): NaCl (130); KCl (2,5); MgCl₂ (3); CaCl₂ (2); NaH₂PO₄ (1,25); NaHCO₃ (28); D-glukóza (25).

Látky kapsaicin, OLDA, SB 366791, BCTC a PMA byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO), jehož výsledná koncentrace ve snímacím roztoku nepřesáhla 0,1%. Cytokin TNF α byl rozpuštěn v 0,1% BSA a ostatní experimentální látky ve vodě. Veškeré použité chemikálie byly dodány od společností Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika), Tocris Bioscience (Bristol, Velká Británie) nebo AnalaR (Londýn, Velká Británie).

1.4. Analýza dat

V první a druhé studii zabývající se modulačním vlivem OLDA a TNF α na synaptický přenos byly vyhodnoceny frekvence a amplitudy mEPSC vždy v úseku o délce 2 min v kontrolní a experimentálních částech záznamu. Pro analýzu frekvence a amplitudy byly použity shodné segmenty záznamů a stejná kritéria hodnocení. Analyzovány byly pouze miniaturní proudy o amplitudě ≥ 5 pA, což odpovídá minimálně dvojnásobku velikosti šumu.

Frekvence a amplitudy mEPSC byly vyjádřeny v průměrných hodnotách se standardní odchylkou aritmetického průměru (SEM). Data byla normalizována ke kontrolním hodnotám před jakoukoliv aplikací látek (100%). Statisticky významné rozdíly v datech byly zjišťovány jednocestnou analýzou variance ANOVA a jednocestnou analýzou ANOVA s opakovaným měřením a následnými Student-Newman-Keuls a Bonferroni post hoc testy. Hladina významnosti $P < 0,05$ byla považována za statisticky signifikantní. Pro stanovení statistické významnosti kumulativních dat byl použit Kolmogorov-Smirnov test.

Ve třetí studii zaměřené na modulaci evokovaných AMPA proudů inzulinem byly některé EPSC polysynaptické. Velikost AMPA EPSC byla tedy porovnávána podle velikosti integrované plochy pod křivkou evokovaných proudů, podobně jak již dříve

provedl Baba et al. (2003) ve své práci. Velikost plochy pod křivkou všech evokovaných proudů na jednom neuronu byla měřena ve stejném časovém úseku. Analyzovaný úsek byl vymezen u prvního evokovaného EPSC, a to po stimulačním artefaktu od místa vychýlení proudu od základní úrovně šumu do poklesu na úroveň 10% amplitudy. Velikost AMPA EPSC byla u jednotlivých neuronů normalizována k průměrné velikosti proudů čtyř počátečních kontrolních pulzů (100%). Velikosti proudů byly vyjádřeny v průměrných hodnotách se standardní odchylkou aritmetického průměru (SEM). Statisticky významné rozdíly ve velikosti AMPA EPSC byly zjišťovány jednocestnou analýzou variance ANOVA a následným Bonferroni post hoc testem. Hladina významnosti $P < 0,05$ byla považována za statisticky signifikantní.

2. Periferní neurogení zánět jako model patologického stavu

Periferní zánět byl vyvolán u samců laboratorních potkanů kmene Wistar (P19 - P22) v éterové anestézii 24h před přípravou míšních řezů. Obě zadní končetiny potkanů byly subkutánně injikovány 3% směsí karrageenanu a kaolinu ve fyziologickém roztoku. Zvířata byla poté navrácena do jejich domovských chovných klecí.

3. Behaviorální metody

K pokusům byli použiti dospělí samci laboratorních potkanů kmene Wistar o hmotnosti 250 – 300 g, kteří byli chováni při dvanáctihodinovém cyklu světla a tmy v plastových klecích s měkkou podestýlkou a neomezeným přístupem k potravě a vodě.

3.1. Implantace intratekálního katetru

Jeden týden před experimentem byl v celkové anestézii ketaminem (100 mg/kg i.p., Narkamon, Zentiva) a xylazinem (10 mg/kg i.m., Rometar, Zentiva) implantován lumbosakrální katetr z polyethylenové hadičky o velikosti PE-5. Katetr byl zasunut do subarachnoidálního prostoru, tak aby jeho konec byl v oblasti lumbální intumescence fixován pomocí dentálního cementu (Duracryl, Spofa). Druhý konec katetru byl

fixován na hadičku PE-10 a exponován na povrchu kůže hřbetu. Umístění katetru bylo na konci experimentu vizuálně ověřeno injekcí methylenové modři.

Katetr sloužil k intratekální aplikaci 20 μ l kontrolního roztoku složeného z 0,2% DMSO ve fyziologickém roztoku nebo 20 μ l OLDA (100 μ M, 500 μ M; rozpuštěného v DMSO) a následné aplikaci 40 μ l fyziologického roztoku.

3.2. Testování citlivosti zvířat k tepelným podnětům

U laboratorních potkanů byla testována citlivost k tepelným podnětům pomocí tepelného stimulatoru v oblasti *planty pedis* zadní končetiny. Od počátku působení tepelného podnětu byl měřen čas až do reflexního odtažení zadní končetiny. Tepelný podnět byl aplikován na danou končetinu čtyřikrát v pětiminutových intervalech a hodnoty byly u jednotlivých zvířat zprůměrovány. Statisticky významné rozdíly byly vyhledány jednocestnou analýzou variance ANOVA s opakovaným měřením a následným post hoc Bonferroni testem vzhledem ke kontrolním hodnotám zaznamenaným před intratekálním podáním experimentálních látek.

VÝSLEDKY

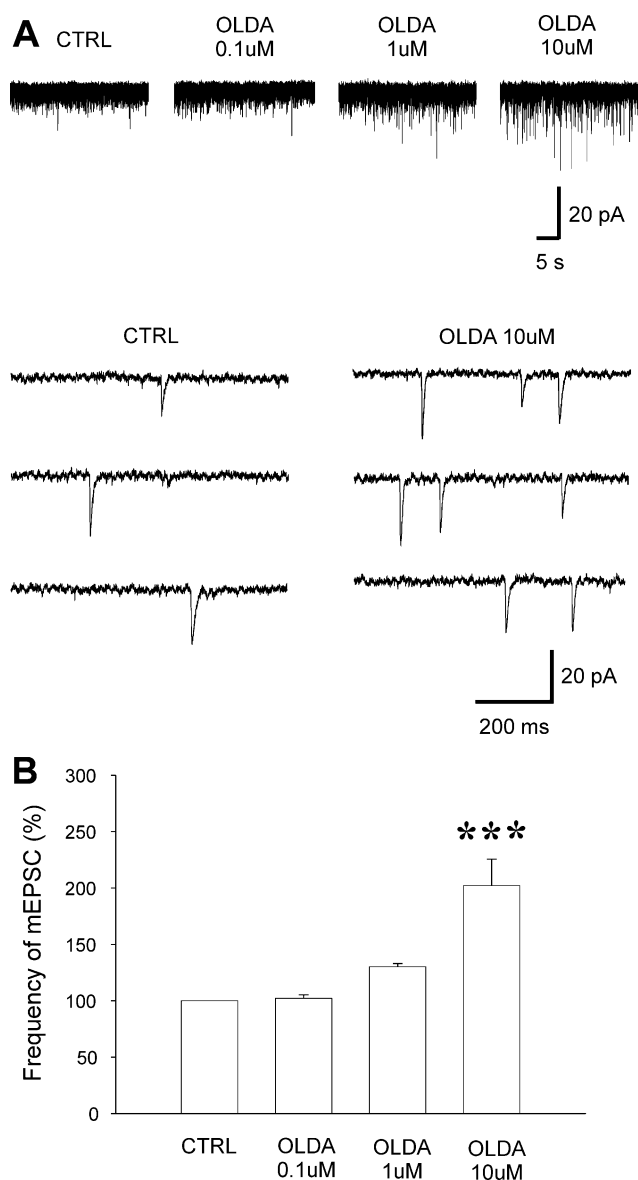
1. Úloha endogenního agonisty TRPV1 receptorů *N*-oleoyldopaminu (OLDA) v modulaci nociceptivní signalizace na míšní úrovni

1.1. Frekvence mEPSC za kontrolních a experimentálních podmínek

V elektrofyziologických pokusech této studie bylo snímáno celkem 108 neuronů lokalizovaných v superficiální oblasti zadního rohu míšního, v lamině I a II. U 73% neuronů z celkového počtu vyvolala aplikace agonistů TRPV1 receptorů kapsaicinu (0,1 μ M; 0,2 μ M), anebo OLDA (0,2 μ M; 10 μ M; 20 μ M) zvýšení frekvence mEPSC. Vzestup frekvence miniaturních proudů byl zřejmě podmíněn presynaptickými změnami. Námi pozorované odpovědi poukazují na aktivaci presynaptických TRPV1 receptorů, které jsou hojně exprimovány na centrálních zakončeních primárních nociceptivních neuronů. U zbývajících 27% testovaných neuronů nebyly TRPV1 receptory na presynaptických kontaktech pravděpodobně exprimovány, tyto buňky totiž na aplikaci agonistů TRPV1 receptorů v našem preparátu neodpovídaly. Průměrná kontrolní frekvence mEPSC před podáním agonistů na neuronech zadního rohu míšního, na které projikují primární nociceptivní vlákna s funkčními TRPV1 receptory byla $0,76 \pm 0,08$ Hz. Jednotlivé hodnoty se přitom pohybovaly v rozmezí od 0,08 Hz do 2,37 Hz ($n = 53$). Kontrolní průměrná frekvence mEPSC na neuronech bez presynaptických kontaktů s TRPV1 receptory byla významně vyšší $2,07 \pm 0,39$ Hz. Jednotlivé hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 0,65 Hz do 7,55 Hz ($n = 23$, $P < 0,001$). Uvedené kontrolní frekvence mEPSC charakterizují pouze neurony v míšních řezech připravených z kontrolních zvířat, za kontrolních aplikačních podmínek a při laboratorní teplotě.

1.2. Aplikace OLDA zvýšila frekvenci mEPSC na neuronech zadního rohu míšního

Účinek endogenního agonisty TRPV1 receptorů na funkci prvních synapsí nociceptivních drah byl testován aplikací tří různých koncentrací OLDA 0,1 μM , 1 μM a 10 μM . Jednotlivé koncentrace byly aplikovány postupně od nejnižší k nejvyšší po dobu 3 min u každého z testovaných neuronů. Snímání mEPSC ze superficiálních neuronů zadního rohu míšního probíhalo při laboratorní teplotě pohybující se mezi 21°C - 24°C. Zvýšení frekvence mEPSC vyjádřené v procentech vzhledem ke kontrole nebylo po aplikaci 0,1 μM a 1 μM OLDA statisticky významné (102,1 \pm 3,1%, 130,2 \pm 2,9%; Obr. 6). Na rozdíl od toho aplikace 10 μM OLDA zvýšila frekvenci mEPSC významně na 202,2 \pm 23,4% (n = 8, P < 0,001). Je známo, že kapsaicin - vysoce účinný agonista TRPV1 receptorů - zvyšuje frekvenci mEPSC na superficiálních neuronech zadního rohu míšního v závislosti na jeho koncentraci přes aktivaci presynaptických TRPV1 receptorů lokalizovaných na primárních nociceptivních vláknech (Yang et al., 1998; Baccei et al., 2003). V našich pokusech byl tedy kapsaicin aplikován vždy na konci experimentálního protokolu, aby byl na snímaném neuronu potvrzen vstup z centrálních zakončení primárních aferentních vláken exprimujících TRPV1 receptory. Na neuronech, které reagovaly na aplikaci OLDA, se po 3 min aplikaci 0,1 μM kapsaicinu zvýšila frekvence mEPSC v průměru na 602,7 \pm 125,6% kontrolních hodnot. V případech, kdy OLDA nevedl k navýšení frekvence mEPSC, tak ani kapsaicin nevyvolal adekvátní odpověď. Tyto výsledky ukazují, že k vyvolání změny ve frekvenci mEPSC v kontrolních řezech byla nezbytná aplikace vysoké koncentrace (10 μM) endogenního agonisty TRPV1 receptorů OLDA.



Obr. 6 *N*-oleoyldopamin (OLDA) zvýšil frekvenci mEPSC na neuronech zadního rohu míšního. **A:** Při laboratorní teplotě byla ke zvýšení frekvence mEPSC nutná aplikace vysoké koncentrace (10 μM) OLDA. **B:** Zvýšení frekvence mEPSC po aplikaci různých koncentrací OLDA (0,1 μM; 1 μM a 10 μM) vyjádřené v procentech základní frekvence za kontrolních podmínek (n = 8; ***P < 0,001; SEM).

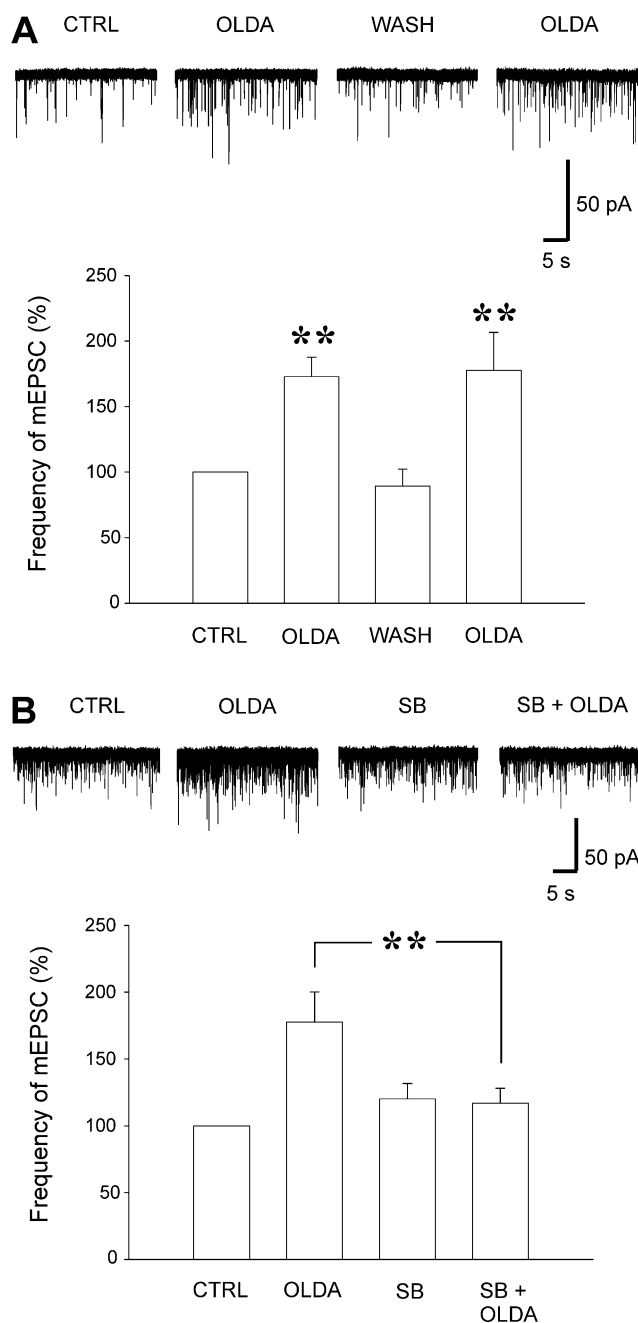
1.3. Odpověď vyvolaná aplikací OLDA byla zablokována antagonisty TRPV1 receptorů

Pro potvrzení selektivní aktivace TRPV1 receptorů pomocí OLDA byl testován také vliv dvou TRPV1 antagonistů SB 366791 a BCTC. Nejprve byly provedeny kontrolní pokusy ukazující možnost opakovaného vyvolání odpovědi pomocí dvou časově oddělených aplikací OLDA na stejném neuronu. Při laboratorní teplotě obě 3 min aplikace 20 μM koncentrace OLDA vedly ke statisticky významnému zvýšení frekvence mEPSC (Obr. 7A). Tyto dvě aplikace OLDA oddělovala 10 min fáze vymývání agonisty. Vyšší 20 μM koncentrace OLDA byla v těchto pokusech použita k

zajištění výrazné odpovědi neuronů. První i druhá odpověď na aplikaci OLDA dosáhly stejné úrovně ($172,9 \pm 14,8\%$; $177,6 \pm 29,1\%$; $n = 6$) vzhledem k základní frekvenci mEPSC před aplikací agonisty. Během 10 min vymývání se frekvence mEPSC opět snížila na základní kontrolní úroveň ($89,3 \pm 12,9\%$).

V další sérii pokusů již mohla být ověřena specifická aktivace TRPV1 receptorů endogenním agonistou, jehož aplikaci předcházelo zablokování TRPV1 receptorů antagonisty SB 366791 ($10 \mu\text{M}$), nebo BCTC ($10 \mu\text{M}$). Po první 3 min kontrolní aplikaci $20 \mu\text{M}$ koncentrace OLDA byl během vymývání aplikován po dobu 10 min jeden z antagonistů a poté následovala 3 min koaplikace daného antagonisty s OLDA ($20 \mu\text{M}$). První kontrolní aplikace OLDA bez SB 366791 vyvolala statisticky významný vzrůst frekvence mEPSC ($177,6 \pm 22,5\%$; Obr. 7B). Během následující aplikace SB 366791 se frekvence mEPSC snížila blízko ke kontrolní hodnotě ($120,3 \pm 11,4\%$). Úroveň frekvence mEPSC na konci vymývání spojeného s aplikací SB 366791 zůstala mírně zvýšená, ale naměřený rozdíl nebyl od kontroly statisticky významný. Druhá aplikace OLDA společně s SB 366791 v porovnání s předchozí samostatnou aplikací antagonisty TRPV1 receptorů již frekvenci mEPSC nezměnila ($117,0 \pm 11,0\%$; $n = 6$).

První aplikace OLDA bez BCTC vyvolala zvýšení frekvence mEPSC na $189,9 \pm 23,6\%$ vzhledem ke kontrole. Během vymývání spojeného s aplikací BCTC se frekvence mEPSC snížila na $134,3 \pm 21,8\%$ kontrolní úrovně. Druhá aplikace OLDA společně s BCTC již frekvenci mEPSC nezměnila ($130,3 \pm 20,1\%$; $n = 7$, statistická významnost změn mezi aplikacemi OLDA a OLDA + BCTC byla $P < 0,05$). Tyto pokusy potvrdily, že změny ve frekvenci mEPSC vyvolané aplikací OLDA byly zajištěny aktivací TRPV1 receptorů. Mezi účinky jednotlivých antagonistů TRPV1 receptorů nebyl pozorován žádný rozdíl.



Obr. 7 Opakovaná aplikace OLDA vyvolala zvýšení frekvence mEPSC, kterému bylo možné zabránit působením TRPV1 antagonisty. **A:** První a druhá aplikace OLDA (20 μM) evokovala za kontrolních podmínek srovnatelné zvýšení frekvence mEPSC ($n = 6$; $**P < 0,01$). **B:** Antagonista TRPV1 receptorů SB 366791 (10 μM) zablokoval zvýšení frekvence mEPSC ($n = 6$; $**P < 0,01$).

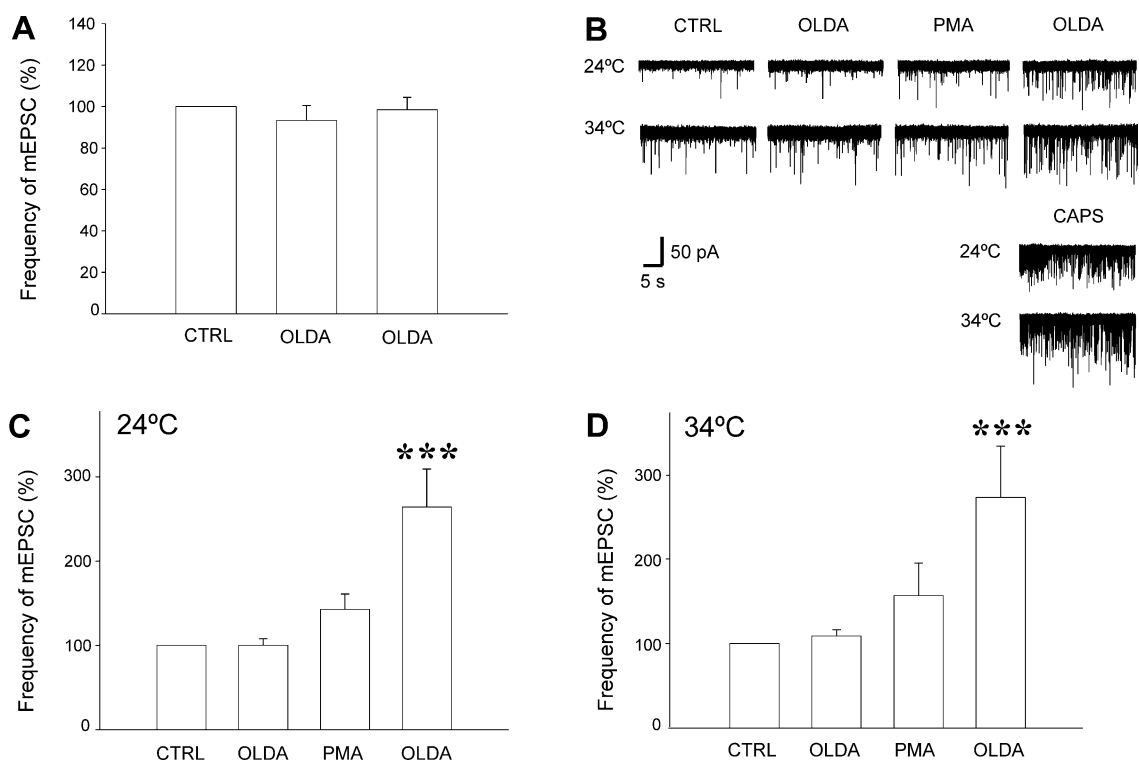
1.4. Aplikace nízké koncentrace OLDA zvýšila po aktivaci PKC frekvenci mEPSC

Za kontrolních podmínek byla ke zvýšení frekvence mEPSC stimulovanému agonistou nezbytná aplikace vysoké 10 μM koncentrace OLDA, přitom jeho nízká koncentrace 0,2 μM žádnou změnu nevyvolala. V dalších pokusech jsme testovali možnost aktivace TRPV1 receptorů za normálních podmínek neúčinnou nízkou 0,2 μM koncentrací OLDA, a to po aktivaci proteinkinázy C. Je známo, že PKC fosforyluje

TRPV1 receptory, což vede k jejich senzitivizaci (Cesare a McNaughton, 1996; Numazaki et al., 2002). V našich pokusech jsme k aktivaci PKC použili forbol-12-myristát-13-acetát (PMA). Nejdříve jsme ověřili, že dvě opakované 4 min aplikace nízké koncentrace OLDA, mezi kterými byl agonista 10 min vymýván, nevyvolávají za kontrolních podmínek žádnou odpověď (Obr. 8A). Zatímco dvě aplikace 0,2 μM koncentrace OLDA nezměnily základní kontrolní frekvenci mEPSC ($93,3 \pm 7,1\%$; $98,4 \pm 6,0\%$; $n = 6$), tak po nich následující aplikace 0,1 koncentrace μM kapsaicinu evokovala výrazné zvýšení frekvence mEPSC na $1430,6 \pm 490,5\%$ ($P < 0,001$) vzhledem ke kontrolní úrovni. Z toho vyplývá, že snímané neurony zadního rohu míšního měly synaptická spojení s aferentními nociceptivními vlákny exprimujícími TRPV1 receptory. Tyto presynaptické TRPV1 receptory však za kontrolních podmínek nebylo možné aktivovat ani opakovanou aplikací nízké koncentrace OLDA.

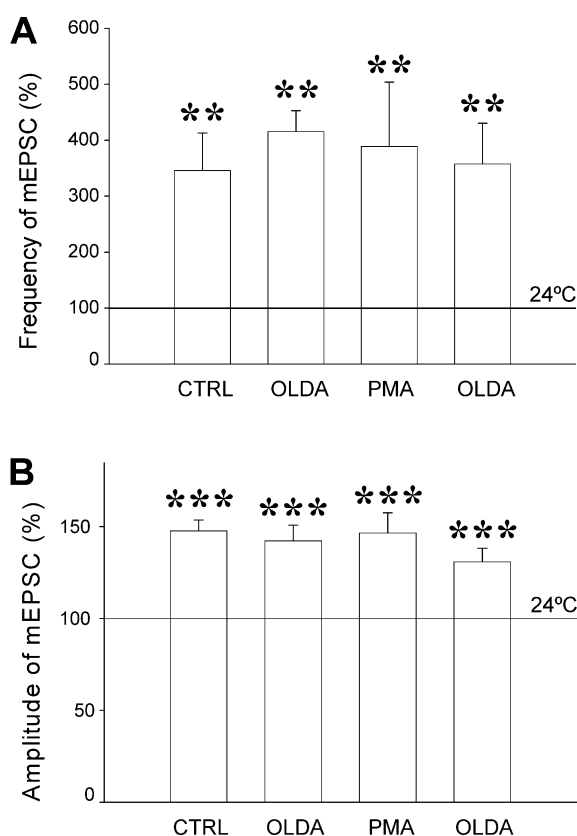
V první sérii experimentů probíhajících při laboratorní teplotě byl testován účinek aplikace forbolesteru PMA na aktivaci TRPV1 receptorů nízkou koncentrací OLDA. Kontrolní 4 min aplikace 0,2 μM OLDA podle očekávání opět nevyvolala žádnou odpověď. Následující 5 min aplikace 1 μM koncentrace PMA zvýšila po jeho vymytí frekvenci mEPSC na $171,0 \pm 34,9\%$ vzhledem ke kontrole ($P > 0,05$). Vymývání forbolesteru trvalo 10 min, aby mohla být opětovně aplikována nízká koncentrace OLDA. Druhá 4 min aplikace 0,2 μM koncentrace OLDA vyvolala významné zvýšení frekvence mEPSC na $246,1 \pm 40,6\%$ ($P < 0,001$; $n = 7$). Kapsaicin (0,1 μM) aplikovaný na konci pokusu zvýšil frekvenci mEPSC na $1845,2 \pm 516,5\%$.

Abychom zjistili možný vliv teploty extracelulárního roztoku na agonistou evokované odpovědi, byl stejný experimentální protokol použit za definované teploty 24°C a 34°C (Obr. 8B). Frekvence mEPSC vyjádřená procenty základní aktivity před jakoukoliv aplikací byla změněna během postupné aplikace látek OLDA, PMA a OLDA na $100,1 \pm 7,6\%$; $142,5 \pm 18,4\%$; $264,1 \pm 45,1\%$ ($n = 10$) při teplotě 24°C (Obr. 8B,C) a na $108,9 \pm 7,6\%$; $156,6 \pm 38,6\%$; $272,8 \pm 60,9\%$ ($n = 10$) při teplotě 34°C (Obr. 8B,D). Při obou testovaných teplotách zůstala základní frekvence mEPSC při první kontrolní aplikaci OLDA nezměněna. Druhá aplikace OLDA po působení PMA výrazně zvýšila frekvenci mEPSC. Dosažená úroveň zvýšení frekvence mEPSC byla u obou teplot přibližně stejná. Průměrná amplituda mEPSC se během postupné aplikace jednotlivých testovaných látek nezměnila. Její hodnoty byly při laboratorní teplotě v průběhu experimentálního protokolu následující $27,33 \pm 1,80$ pA (kontrola); $27,01 \pm 2,56$ pA (OLDA); $25,88 \pm 2,62$ pA (PMA) a $24,62 \pm 2,45$ pA (OLDA).



Obr. 8 Nízká 0,2 μM koncentrace OLDA nevyvolala za normálních podmínek žádné změny, ale po aktivaci PKC zvýšila frekvenci mEPSC. **A:** První a druhá aplikace nízké koncentrace OLDA (0,2 μM) nevyvolala žádné významné změny ve frekvenci mEPSC při laboratorní teplotě pohybující se v rozmezí od 23°C do 25°C ($n = 6$; SEM). **B:** Nízká koncentrace OLDA zvýšila frekvenci mEPSC po aplikaci PMA za definované teploty 24°C a 34°C. Tento účinek OLDA na frekvenci mEPSC byl slabší než účinek následně aplikovaného kapsaicinu. **C a D:** Nízká 0,2 μM koncentrace OLDA aplikovaná po působení a vymytí PMA zvýšila významně frekvenci mEPSC při obou teplotách 24°C a 34°C ($n = 10$; *** $P < 0,001$; SEM).

Samotné zvýšení teploty lázně z 24°C na 34°C významně ovlivnilo frekvenci a amplitudu mEPSC (Obr. 9). Frekvence a amplitudy mEPSC se statisticky významně zvýšily při 34°C za různých experimentálních podmínek (CTRL, OLDA, PMA, OLDA) v porovnání s frekvencemi a amplitudami při 24°C jako 100%. Relativní zvýšení frekvence a amplitudy mEPSC stimulované zvýšením teploty lázně na 34°C dosáhlo stejné úrovně za kontrolních i experimentálních podmínek, kdy byly aplikovány výše uvedené látky.

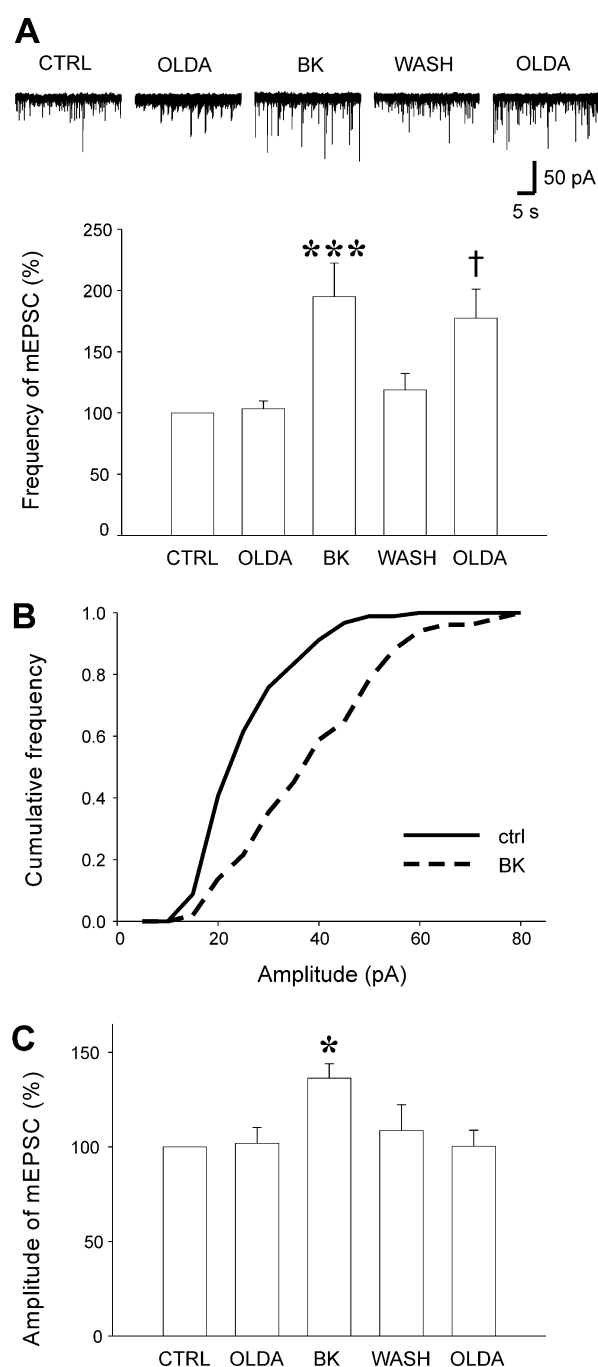


Obr. 9 Vliv zvýšení teploty extracelulárního roztoku z 24°C na 34°C na frekvenci a amplitudu mEPSC během postupných aplikací kontrolního roztoku, OLDA (0,2 μ M), PMA (1 μ M) a OLDA (0,2 μ M). Zvýšení teploty na 34°C vyvolalo významné změny ve frekvenci (**A**, $n = 9$; $**P < 0,01$) a amplitudě (**B**, $n = 9$; $***P < 0,001$; SEM) mEPSC za všech experimentálních podmínek, přičemž hodnoty naměřené při 24°C byly považovány za kontrolních 100%.

1.5. Aplikace nízké koncentrace OLDA zvýšila po působení bradykininu frekvenci mEPSC

Abychom zjistili, zda je možné zvýšit citlivost mišních TRPV1 receptorů k agonistovi nějakou z endogenních látek, použili jsme v dalších pokusech mediátor zánětu bradykinin (BK). V experimentálním protokolu z předchozích pokusů byla aplikace 10 μ M koncentrace BK použita místo forbolesteru. Po působení BK byla opět testována možnost aktivace TRPV1 receptorů nízkou 0,2 μ M koncentrací OLDA. Stejně jako v předchozích pokusech nezměnila první 4 min aplikace OLDA frekvenci mEPSC ($103,4\% \pm 6,4\%$) vzhledem ke kontrolním hodnotám (Obr. 10A). Aplikace BK po dobu 3 min indukovala výrazné akutní zvýšení frekvence mEPSC ($195,0\% \pm 27,4\%$). Následné 10 min vymývání zajistilo pokles frekvence mEPSC blízko ke kontrolní hodnotě ($118,9\% \pm 13,5\%$). Aplikace nízké koncentrace OLDA poté evokovala výrazné zvýšení frekvence mEPSC ($177,5\% \pm 23,4\%$), ke kterému při jeho první kontrolní aplikaci nedošlo. Obě akutní zvýšení frekvence mEPSC byla statisticky významná vzhledem ke kontrolnímu stavu ($n = 9$; $P \leq 0,001$).

Aplikace BK způsobila také zvýšení amplitudy mEPSC, jak je patrné z posunu křivky histogramu kumulativní distribuce amplitudy snímané na jednom neuronu k vyšším hodnotám (Obr. 10B). Amplituda mEPSC se po aplikaci BK zvýšila u 5 neuronů z celkového počtu 9 testovaných na $136,0\% \pm 7,6\%$ ($P < 0,05$; Obr. 10C). Během ostatních experimentálních podmínek nedošlo na míšních neuronech k významné změně amplitudy mEPSC v porovnání s průměrnou amplitudou změřenou za podmínek kontrolních.



Obr. 10 Nízká $0,2 \mu\text{M}$ koncentrace OLDA zvýšila frekvenci mEPSC po působení bradykininu při teplotě 24°C . **A:** Aplikace $10 \mu\text{M}$ koncentrace BK vyvolala akutní vzestup frekvence mEPSC. Při následném vymývání se velikost frekvence mEPSC přiblížila ke kontrolní hodnotě. Druhá aplikace nízké $0,2 \mu\text{M}$ koncentrace OLDA opětovně zvýšila frekvenci mEPSC ($n = 9$; $***P < 0,001$; $†P = 0,001$; SEM). **B** a **C:** Akutní aplikace BK zvýšila amplitudu mEPSC. Kumulativní distribuce amplitud mEPSC z jednoho neuronu (**B**, $P < 0,001$), normalizované průměrné hodnoty amplitud (**C**, $n = 5$; $*P < 0,05$; SEM).

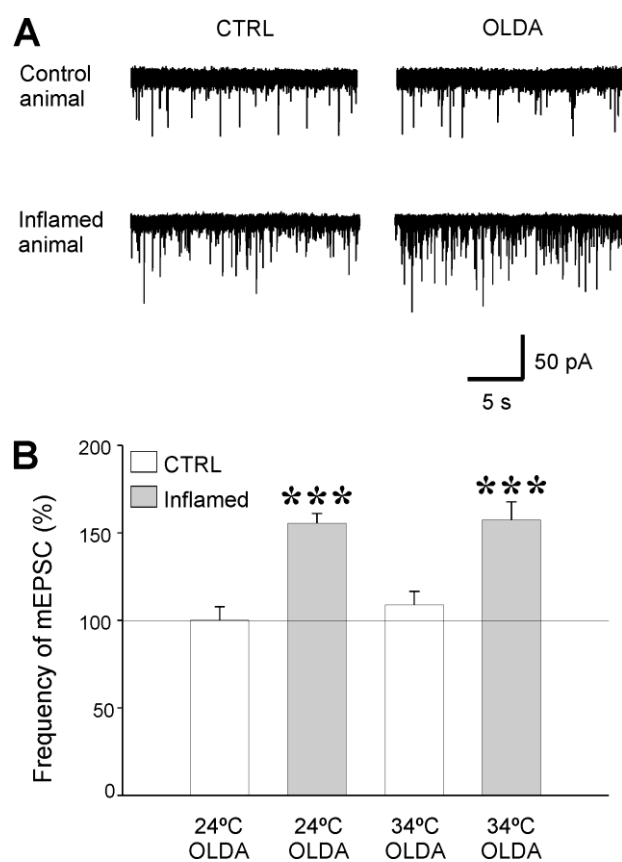
1.6. Během periferního zánětu evokovala aplikace nízké koncentrace OLDA zvýšení frekvence mEPSC na neuronech zadního rohu míšního

Periferní zánět byl indukován subkutánní injekcí směsi karrageenanu a kaolinu 24 hodin před přípravou lumbálních míšních řezů. Aplikace nízké 0,2 μM koncentrace OLDA po dobu 4 min byla testována za definované teploty 24°C a 34°C. Aplikace nízké koncentrace OLDA na řezy z kontrolních zvířat nezměnila základní frekvenci mEPSC, jejichž průměrné hodnoty byly $100,1 \pm 7,6\%$ ($n = 10$) při teplotě 24°C a $108,9 \pm 7,6\%$ ($n = 10$) při teplotě 34°C. Kontrolní frekvence 100% byla změřena před aplikací OLDA samostatně pro každou teplotu. Na rozdíl od kontrolních řezů vyvolala stejná koncentrace OLDA (0,2 μM) na neuronech v řezech připravených ze zvířat s periferním zánětem významné zvýšení frekvence mEPSC na $155,6 \pm 5,4\%$ ($P < 0,001$; $n = 10$) při teplotě 24°C a $157,3 \pm 10,4\%$ ($P < 0,001$; $n = 10$) při teplotě 34°C. Toto zvýšení frekvence mEPSC na neuronech zadního rohu míšního bylo statisticky významné v porovnání s odpověďmi získanými na neuronech z kontrolních zvířat (Obr. 11). Zvýšení frekvence mEPSC vyvolané aplikací nízké koncentrace OLDA na neuronech v superficiální oblasti zadního rohu míšního v řezech ze zvířat s periferním zánětem dosáhlo stejné úrovně při obou testovaných teplotách.

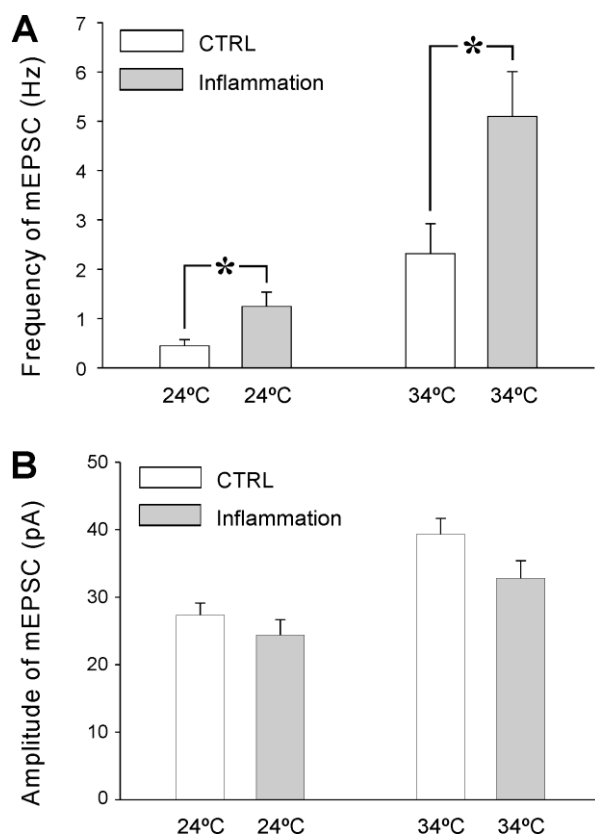
Základní kontrolní frekvence mEPSC snímaných na počátku každého experimentu na neuronech v řezech ze zvířat s periferním zánětem byly statisticky významně vyšší ve srovnání s kontrolními hodnotami naměřenými na neuronech v řezech z kontrolních potkanů (Obr. 12A). Toto platilo pro obě teploty 24°C (kontrola $0,45 \pm 0,13$ Hz; $n = 10$ a zánět $1,25 \pm 0,30$ Hz; $n = 10$) a 34°C (kontrola $2,32 \pm 0,61$ Hz; $n = 10$ a zánět $5,10 \pm 0,91$ Hz; $n = 10$). Základní frekvence mEPSC snímaných na neuronech v řezech ze zvířat s periferním zánětem byly zvýšeny na stejnou úroveň při 24°C i 34°C, jejich hodnoty byly vyjádřeny v procentech relevantních frekvencí naměřených v řezech z kontrolních zvířat ($278,8 \pm 62,0\%$ při 24°C a $220,0 \pm 37,1\%$ při 34°C).

Mezi kontrolní a experimentální skupinou zvířat nebyl statisticky významný rozdíl v amplitudě mEPSC ani u jedné z testovaných teplot (Obr. 12B). Průměrná amplituda mEPSC na neuronech kontrol a v řezech ze zvířat se zánětem byla $27,33 \pm 1,80$ pA ($n = 10$, kontrola), $24,36 \pm 2,33$ pA ($n = 10$, zánět) při teplotě 24°C a $39,29 \pm 2,38$ pA ($n = 10$, kontrola), $32,78 \pm 2,63$ pA ($n = 10$, zánět) při teplotě 34°C.

Teplota lázně významně ovlivňovala frekvenci mEPSC i jeho amplitudu na neuronech zadního rohu míšního. Při teplotě 34°C dosáhla frekvence mEPSC zvýšení na $518,8 \pm 128,5\%$ u kontrol a $409,4 \pm 69,0\%$ u experimentální skupiny zvířat vzhledem k hodnotám naměřeným při teplotě 24°C. Amplituda mEPSC byla při teplotě 34°C zvýšena na $143,8 \pm 8,3\%$ v řezech z kontrolních zvířat a na $134,6 \pm 10,2\%$ v řezech ze zvířat s periferním zánětem opět vzhledem k adekvátním hodnotám při teplotě 24°C.



Obr. 11 Během periferního zánětu zvýšila nízká 0,2 μM koncentrace OLDA frekvenci mEPSC na neuronech zadního rohu míšního při obou teplotách 24°C a 34°C. U kontrolních zvířat nedošlo po aplikaci 0,2 μM koncentrace OLDA ke změně ve frekvenci mEPSC. **A:** Snímání z neuronů kontrolní a experimentální skupiny zvířat při 24°C. **B:** Normalizované průměry: kontrolní zvířata při obou teplotách (n = 10; SEM) a experimentální zvířata při obou teplotách (n = 10; SEM; ***P < 0,001).



Obr. 12 Periferní zánět zvýšil základní kontrolní frekvenci mEPSC na neuronech zadního rohu míšního, aniž by byla změněna jejich amplituda. **A:** Zvýšení frekvence mEPSC indukované periferním zánětem při teplotách 24°C a 34°C (n = 10 v kontrolní i experimentální skupině zvířat; SEM; *P < 0,05). **B:** Periferní zánět nevyvolal změnu v amplitudě mEPSC (n = 10 v kontrolní i experimentální skupině zvířat; SEM).

1.7. Intratekální aplikace OLDA vyvolala tepelnou hyperalgezi

V behaviorálních pokusech byl testován vliv intratekální aplikace OLDA na latenci reflexního odtažení končetiny (PWL) od tepelného zdroje. Intratekální aplikace 100 μM koncentrace OLDA stejně jako aplikace vehikula nijak PWL neovlivnila. Kontrolní hodnota PWL před aplikací 100 μM OLDA byla $19,5 \pm 0,3$ s (n = 4) a v časových úsecích 1h, 2h a 4h po této aplikaci se jejich hodnota významně neměnila ($19,5 \pm 0,1$ s; $19,6 \pm 0,1$ s; $19,9 \pm 0,1$ s; n = 4). Na rozdíl od intratekální injekce 100 μM koncentrace OLDA vyvolala aplikace vyšší 500 μM koncentrace OLDA významné snížení hodnot PWL. Průměrná kontrolní hodnota PWL před intratekální aplikací 500 μM koncentrace OLDA byla $18,9 \pm 0,4$ s (n = 4). Již 1h po aplikaci došlo ke statisticky významnému snížení PWL na $17,3 \pm 0,2$ s (P < 0,01). Maximální pokles na $15,3 \pm 0,2$ s (P < 0,001) byl naměřen ve 2h po aplikaci. Pomalý návrat ke kontrolní úrovni byl zaznamenán ve 4h ($17,2 \pm 0,2$ s; P < 0,01) a 24h ($17,9 \pm 0,4$ s; P > 0,05) po aplikaci. Experimentální data byla vztažena ke kontrole před intratekální aplikací OLDA. Zjištěné hodnoty PWL z behaviorálních pokusů poukazují na zřejmé rozvinutí tepelné hyperalgezie po intratekální aplikaci endogenního agonisty TRPV1 receptorů.

2. Úloha cytokinu TNF α v regulaci nociceptivních synapsí

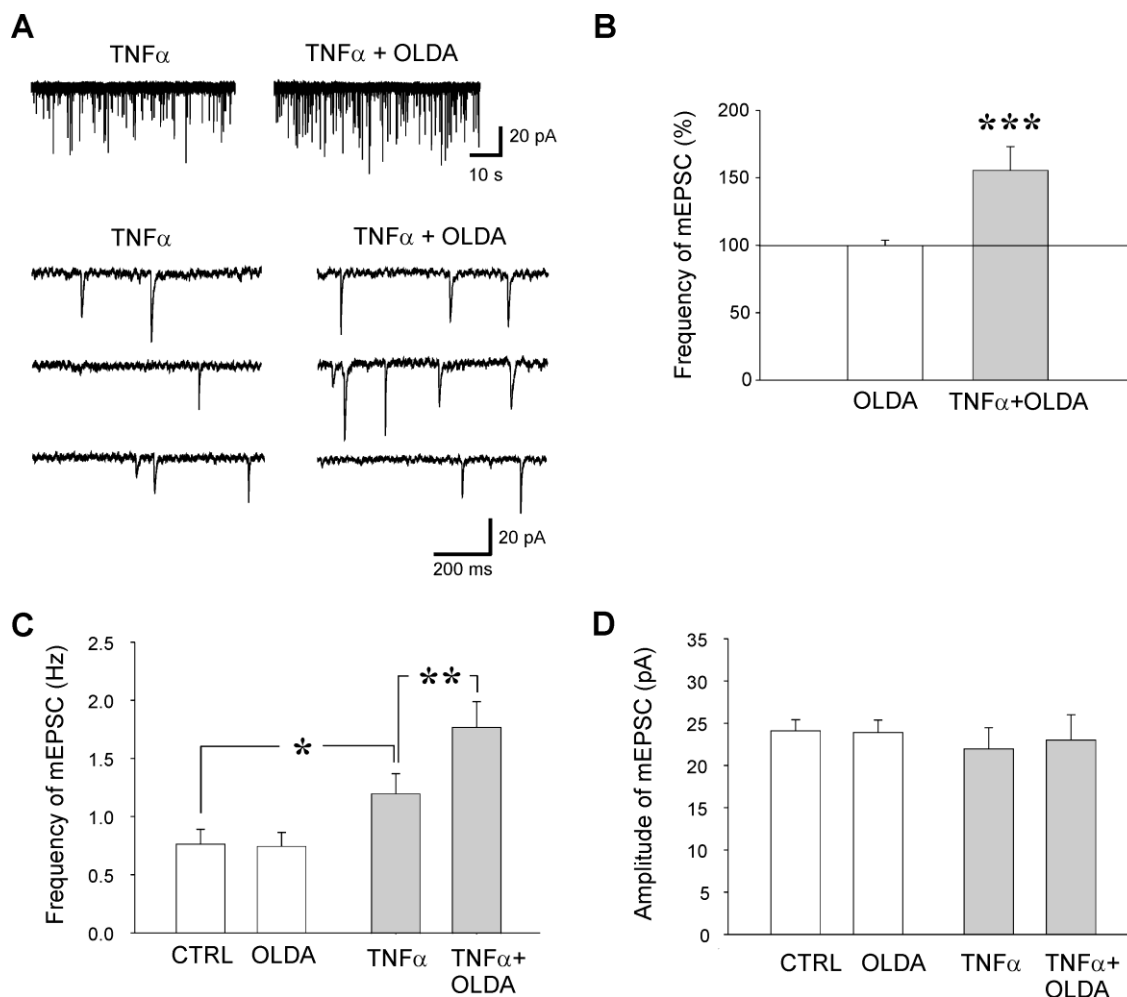
2.1. Aplikace nízké koncentrace OLDA zvýšila po působení TNF α frekvenci mEPSC

Na neuronech v superficiální oblasti zadního rohu míšního byly testovány případné změny citlivosti TRPV1 receptorů k endogennímu agonistovi OLDA v závislosti na aktivaci receptorů pro cytokin tumor necrosis factor α (TNF α). Na regulaci citlivosti TRPV1 receptorů prostřednictvím TNF α bylo usuzováno ze změn frekvence mEPSC na neuronech v akutním míšním řezu při laboratorní teplotě. Před vlastním intracelulárním snímáním byly řezy minimálně 2h inkubovány v 60 nM koncentraci TNF α rovněž při laboratorní teplotě. Aplikace nízké 0,2 μ M koncentrace endogenního agonisty TRPV1 receptorů OLDA, která za kontrolních podmínek nevyvolává žádné změny (Obr. 13B a C), zvýšila na neuronech inkubovaných v TNF α frekvenci mEPSC na $155,5 \pm 17,5\%$ ($P < 0,001$; $n = 10$; Obr. 13A a B) vzhledem ke kontrolní hodnotě před aplikací OLDA. Data kontrolních pokusů prokazující, že aplikace 0,2 μ M koncentrace OLDA nemění frekvenci mEPSC ($99,6 \pm 4,0\%$; $n = 25$) byla použita z předešlé studie (viz kapitola 1). Zvýšení frekvence mEPSC působením OLDA na neuronech inkubovaných v TNF α ($1,78 \pm 0,22$ Hz; Obr. 13C) bylo statisticky významné nejen v normalizovaném vyjádření, ale i při srovnání naměřených hodnot v základních jednotkách vzhledem ke stavu před aplikací ($1,21 \pm 0,17$ Hz; $P < 0,01$) a vzhledem k základní frekvenci na neuronech v kontrolních řezech ($0,76 \pm 0,13$ Hz; $P < 0,001$). Samotná inkubace řezů v TNF α vedla ke zvýšení základní kontrolní frekvence mEPSC ($1,21 \pm 0,17$ Hz; $P < 0,05$) na míšních neuronech vzhledem ke kontrolní frekvenci mEPSC ($0,76 \pm 0,13$ Hz) na neuronech v kontrolních řezech.

V řezech inkubovaných v TNF α bylo celkem snímáno 16 neuronů, u kterých byla na konci experimentálního protokolu aplikována 0,2 μ M koncentrace kapsaicinu. Aplikace OLDA vyvolala zvýšení frekvence mEPSC na 10 neuronech, u těchto buněk zvýšila frekvenci mEPSC ještě s větší intenzitou také aplikace kapsaicinu ($387,4 \pm 109,5\%$). Zbývajících 6 neuronů na aplikaci OLDA neodpovídalo, ale na 3 z nich se po aplikaci kapsaicinu zvýšila frekvence mEPSC ($337,9 \pm 81,6\%$), což naznačuje synaptické spojení s primárními aferentními neurony exprimujícími TRPV1 receptory.

Inkubace akutních řezů v TNF α neovlivnila průměrnou amplitudu mEPSC na snímaných neuronech při aplikaci OLDA ($23,02 \pm 2,98$ pA; $n = 10$) vzhledem

k hodnotám před jeho aplikací ($21,98 \pm 2,50$ pA; Obr. 13D), ani vzhledem k amplitudě mEPSC na neuronech z kontrolních řezů ($24,12 \pm 1,23$ pA; $n = 25$).

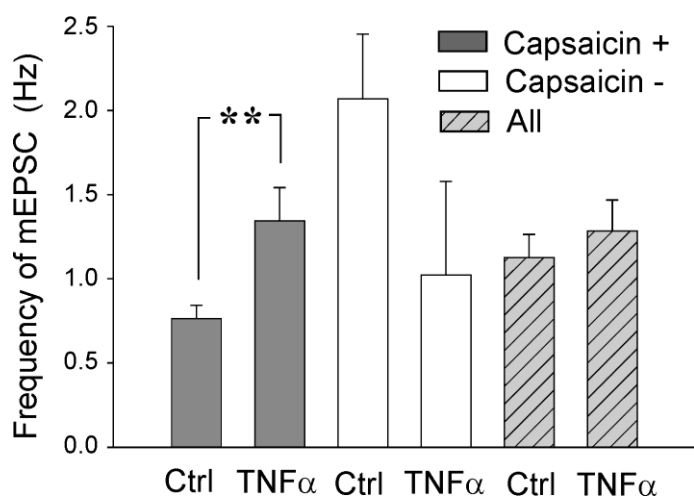


Obr. 13 Aplikace nízké koncentrace OLDA zvýšila frekvenci mEPSC na neuronech v míšních řezech inkubovaných v TNF α . **A:** Nízká 0,2 μ M koncentrace OLDA zvýšila frekvenci mEPSC na neuronu v řezu inkubovaném v TNF α (60 nM) v porovnání s kontrolou před její aplikací. **B:** Nízká koncentrace OLDA za kontrolních podmínek frekvenci mEPSC nezměnila ($n = 25$), ke zvýšení frekvence mEPSC došlo až po inkubaci řezu v TNF α ($n = 10$; $***P < 0,001$) **C:** Vysoká statistická významnost zvýšení frekvence mEPSC působením OLDA v řezu inkubovaném v TNF α ($**P < 0,01$) je patrná i při vyjádření v základních jednotkách. Cytokin TNF α rovněž zvýšil základní kontrolní frekvenci mEPSC ($*P < 0,05$) vzhledem k její úrovni na neuronech v kontrolních řezech. **D:** Amplituda mEPSC při aplikaci OLDA byla shodná na neuronech v kontrolních i experimentálních řezech.

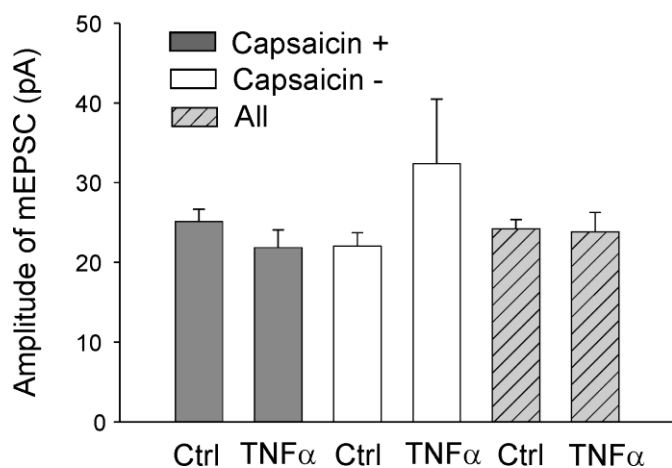
2.2. Inkubace neuronů v TNF α zvýšila základní frekvenci mEPSC

Data získaná z neuronů v míšních řezech inkubovaných v 60 nM koncentraci TNF α byla porovnána se základní kontrolní frekvencí a amplitudou změřenými v předchozí studii (viz kapitola 1). Podle zvýšení frekvence mEPSC po aplikaci kapsaicinu bylo určeno, zda byly snímané neurony zadního rohu míšního synapticky spojeny s primárními aferentními vlákny exprimujícími TRPV1 receptory. Neurony, které měly vstupy z TRPV1 pozitivních primárních aferentních vláken a byly inkubovány v TNF α měly statisticky významně vyšší základní frekvenci mEPSC ($1,35 \pm 0,20$ Hz; $n = 13$; $P < 0,01$) v porovnání se stejnou populací neuronů z kontrolní skupiny ($0,76 \pm 0,08$ Hz; $n = 53$; Obr. 14). Naopak neurony se vstupy z TRPV1 negativních aferentních vláken inkubované v TNF α měly nižší základní frekvenci mEPSC ($1,02 \pm 0,56$ Hz; $n = 3$) vzhledem ke stejné populaci neuronů z kontrolní skupiny ($2,07 \pm 0,39$ Hz; $n = 23$). Tento rozdíl byl však statisticky nevýznamný. Průměrná základní frekvence mEPSC z celkového počtu neuronů, bez rozlišení jednotlivých populací, se v řezech inkubovaných v TNF α ($1,28 \pm 0,18$; $n = 16$) nelišila od řezů kontrolních ($1,13 \pm 0,14$; $n = 76$).

Průměrná amplituda mEPSC se u neuronů se vstupy z TRPV1 pozitivních a negativních aferentních vláken inkubovaných v TNF α statisticky významně nelišila od hodnot naměřených u kontrolních skupin neuronů (Obr. 15). Stejně tak se amplituda nelišila při srovnání hodnot z celkového počtu neuronů v inkubovaných a kontrolních řezech.



Obr. 14 Frekvence mEPSC na neuronech se vstupy z TRPV1 pozitivních aferentních vláken (Capsaicin +) byla významně vyšší u neuronů inkubovaných v TNF α (n = 13) vzhledem ke stejné populaci neuronů v kontrolních řezech (n = 53; **P < 0,01). Snížení frekvence mEPSC na neuronech bez vstupů z TRPV1 pozitivních aferentních vláken (n = 3; Capsaicin -) působením TNF α bylo vzhledem ke stejné populaci neuronů v kontrolních řezech (n = 23) statisticky nevýznamné.

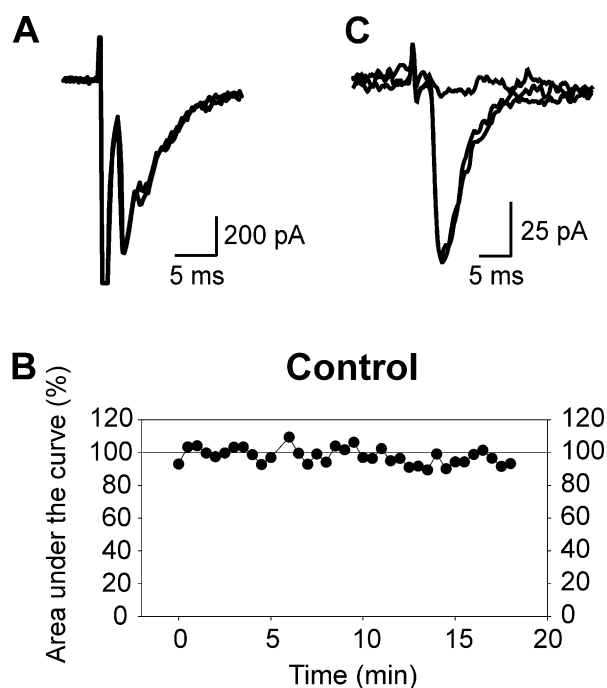


Obr. 15 Inkubace akutních řezů v 60 nM koncentraci TNF α neovlivnila průměrnou amplitudu mEPSC ani u celkového počtu snímaných neuronů zadního rohu míšního ani u populací neuronů se vstupy z TRPV1 pozitivních (kapsaicin senzitivních) a TRPV1 negativních primárních aferentních vláken.

3. Modulace evokovaných AMPA proudů inzulinem v zadním rohu míšním

3.1. Izolace AMPA EPSC na neuronech v superficiální oblasti zadního rohu míšního

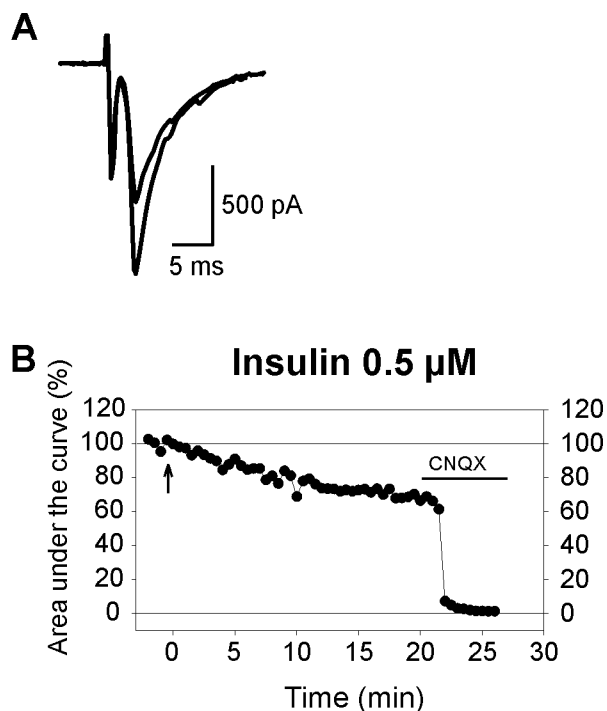
Excitační postsynaptické AMPA proudy byly na neuronech zadního rohu míšního evokovány elektrickou stimulací zadních kořenů míšních, nebo stimulací oblasti vstupu zadních kořenů do míchy v 30s intervalech. V kontrolních pokusech byla nejprve sledována stabilita evokovaných AMPA EPSC v čase bez aplikace experimentálních látek. Velikost a tvar AMPA EPSC se v těchto pokusech neměnily během ~20 min snímání (Obr. 16A,B a 18). Pro ověření, zda evokované EPSC byly zprostředkovány aktivovanými AMPA receptory, na konci experimentálního protokolu některých snímání (n = 11) byl aplikován antagonist AMPA/kainátových receptorů CNQX. Na všech takto testovaných neuronech aplikace 10 μ M koncentrace CNQX eliminovala evokované EPSC (Obr. 17B). Excitační AMPA a kainátové proudy byly odlišeny aplikací selektivního antagonisty kainátových (SYM 2081) a AMPA receptorů (GYKI 52466). Zatímco 3 μ M koncentrace SYM 2081 velikost evokovaných EPSC významně nezměnila, jejich velikost dosáhla $97,9 \pm 3,1\%$ kontrolní hodnoty, 100 μ M koncentrace GYKI 52466 snížila velikost evokovaného proudu na $1,9 \pm 2,3\%$ ($P < 0,001$; n = 5). Tyto výsledky prokazují, že evokované proudy byly zprostředkovány AMPA receptory.



Obr. 16 Evokované EPSC na neuronech v zadním rohu míšním. **A:** Stabilní kontrolní snímání AMPA EPSC na počátku a na konci (17. min) experimentálního protokolu. **B:** Velikost plochy pod křivkou AMPA EPSC se v průběhu ~20 min snímání z neuronu na obr. A nezměnila. **C:** Aplikace antagonisty kainátových receptorů SYM 2081 (3 μ M) neovlivnila eEPSC, jeho velikost byla srovnatelná s kontrolou. Následující společná aplikace SYM 2081 (3 μ M) a GYKI 52466 (100 μ M) evokovaný proud zablokovala.

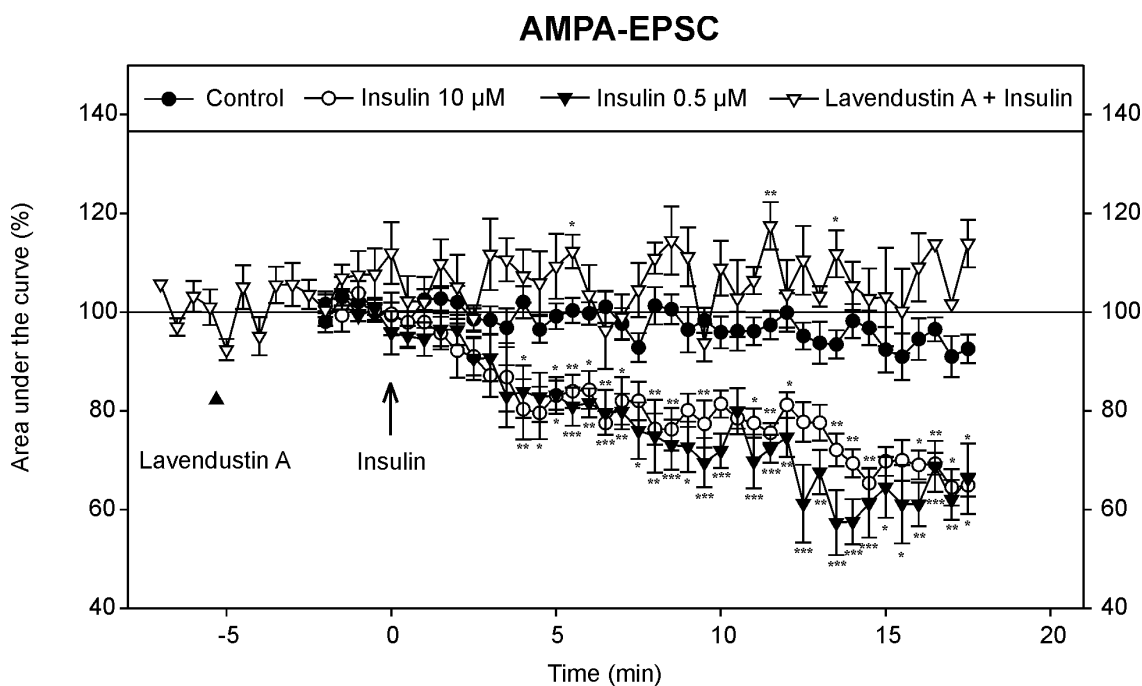
3.2. Aplikace inzulínu snížila velikost AMPA EPSC

Modulace AMPA EPSC aplikací 0,5 μ M koncentrace inzulínu byla testována za stejných podmínek, při kterých probíhaly kontrolní experimenty. Inzulín byl aplikován po zaznamenání čtyř kontrolních eEPSC (Obr. 17B, čas 0) a byl obsažen v extracelulárním roztoku po celý zbytek snímání. Účinek inzulínu byl patrný několik minut od počátku aplikace, když začal být zřejmý pokles velikosti evokovaného EPSC (Obr. 17). Snižování velikosti eEPSC po 10 minutách od počátku aplikace inzulínu dále nenarůstalo a ustálilo se. Pokles velikosti AMPA EPSC byl statisticky významný od čtvrté minuty po aplikaci inzulínu (Obr. 18).



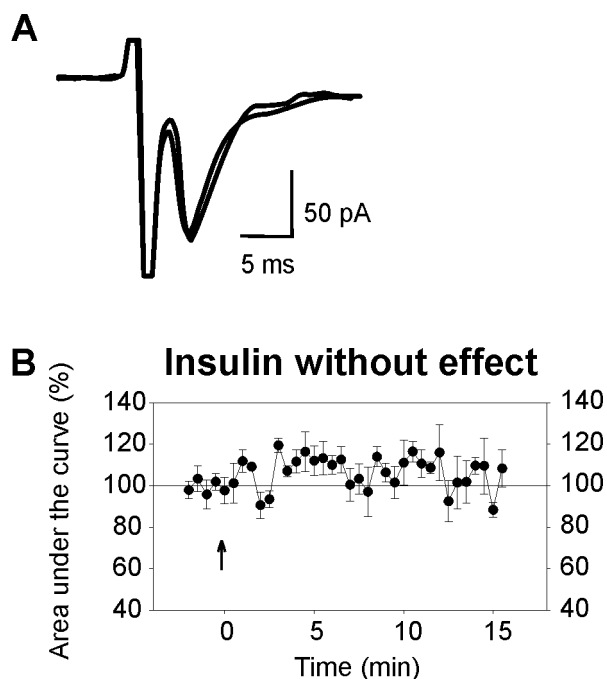
Obr. 17 Inzulinem stimulované snížení velikosti AMPA EPSC. **A:** Kontrolní nativní záznam AMPA EPSC a snížení jeho velikosti v 17. min po aplikaci inzulinu. **B:** Během aplikace inzulinu ($0,5 \mu\text{M}$) došlo u tohoto neuronu ke snížení velikosti AMPA EPSC. Evokovaný proud byl zcela blokován aplikací CNQX ($10 \mu\text{M}$). Počátek aplikace inzulinu je označen šipkou.

Na jiné skupině neuronů v superficiální oblasti zadního rohu míšního byla testována modulace AMPA EPSC vyšší $10 \mu\text{M}$ koncentrací inzulinu (Obr. 18). Vliv aplikace $10 \mu\text{M}$ a $0,5 \mu\text{M}$ koncentrace inzulinu na evokované AMPA EPSC byl shodný, hodnoty snížení velikosti proudů tedy nebyly statisticky odlišné. Aby byly minimalizovány rozdíly mezi individuálními neurony, hodnoty velikosti EPSC byly zprůměrovány v intervalech 5 min (Obr. 20). Toto vyhodnocení odhalilo inzulinem indukovanou depresi AMPA EPSC, která dosáhla při aplikaci jeho $10 \mu\text{M}$ koncentrace $68,9\% \pm 1,0\%$ ($n = 9$; $P < 0,001$) vzhledem ke kontrolním hodnotám a při aplikaci $0,5 \mu\text{M}$ koncentrace $62,1\% \pm 1,2\%$ ($n = 9$; $P < 0,001$). Hodnoty deprese AMPA EPSC vyvolané oběma testovanými koncentracemi inzulinu nebyly od sebe statisticky významně odlišné.



Obr. 18 Inzulinem stimulovaná deprese AMPA EPSC na neuronech lokalizovaných v superficiální oblasti zadního rohu míšního byla blokována inhibitorem PTK lavendustinem A. V kontrolní skupině neuronů byla velikost AMPA EPSC stabilní ($n = 15$). Aplikace dvou různých koncentrací inzulinu $0,5 \mu\text{M}$ ($n = 9$; $P < 0,001$) a $10 \mu\text{M}$ ($n = 9$; $P < 0,001$) vyvolala významné snížení velikosti AMPA EPSC. Aplikace lavendustinu A ($10 \mu\text{M}$) zablokovala inzulinem ($0,5 \mu\text{M}$) stimulovanou depresi AMPA EPSC ($n = 9$; $P = 0,61$). Velikost AMPA proudů se po aplikaci lavendustinu A v několika sledovaných časech zvýšila při porovnání vzhledem ke kontrolní skupině neuronů. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Modulace excitačního přenosu na neuronech v zadním rohu míšním pomocí dvou různých koncentrací inzulinu byla testována celkem na 24 neuronech. Změna velikosti AMPA EPSC po aplikaci $0,5 \mu\text{M}$ nebo $10 \mu\text{M}$ koncentrace inzulinu byla pozorována u 18 z těchto neuronů. U zbývajících 6 neuronů aplikace inzulinu velikost evokovaných AMPA proudů neovlivnila (Obr. 19). To naznačuje, že neurony, které neodpovídaly na stimulaci inzulinem, pravděpodobně neexprimují funkční inzulinové receptory.

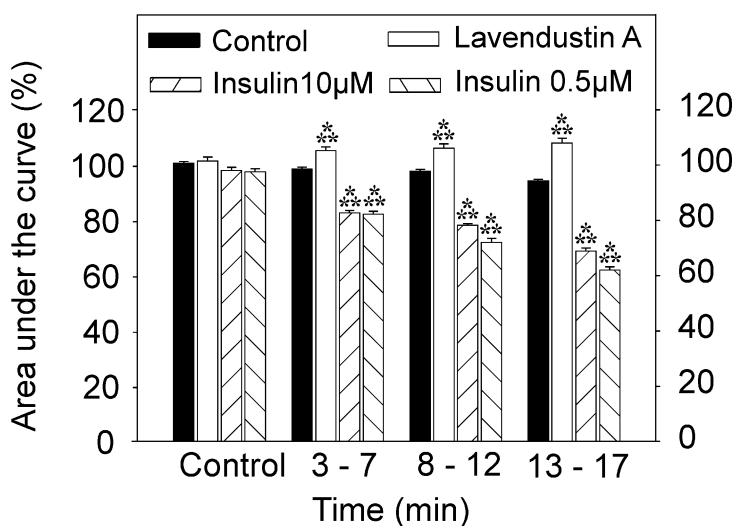


Obr. 19 Aplikace inzulínu velikost AMPA EPSC na některých neuronech zadního rohu míšního neovlivnila. **A:** Stabilní nativní snímání AMPA proudů za kontrolních podmínek na počátku snímání a po aplikaci 10 μM koncentrace inzulínu v 15. min na konci snímání. **B:** Velikost AMPA EPSC se po aplikaci inzulínu (označen šipkou) u šesti snímaných neuronů nezměnila.

3.3. Aplikace lavendustinu A zamezila vzniku inzulínem stimulovaného snížení velikosti AMPA EPSC

Při stimulaci inzulínem mohou být aktivovány různé intracelulární signální dráhy. Z jiných oblastí CNS je známo, že na endocytóze AMPA receptorů z plazmatické membrány se podílí protein-tyrozinkináza (PTK). Za účelem potvrzení možného zapojení PTK do signální dráhy, která zprostředkovává účinek inzulínu v zadním rohu míšním, byl použit lavendustin A, což je plazmatickou membránou procházející inhibitor PTK. Lavendustin A byl aplikován v koncentraci 10 μM již 5 min před aplikací 0,5 μM koncentrace inzulínu a po zbytek snímání byly v extracelulárním roztoku přítomny obě tyto látky. Při společné aplikaci inzulínu s lavendustinem A nebyl pozorován žádný pokles ve velikosti AMPA EPSC. Naopak velikost evokovaných AMPA proudů při současné aplikaci lavendustinu s inzulínem mírně vzrostla vzhledem ke kontrolním hodnotám před aplikací lavendustinu A, tento nárůst však nedosáhl statistické významnosti (Obr. 18; $P = 0,61$; $n = 9$). Nárůst velikosti AMPA EPSC se přitom ukázal být statisticky významný v několika sledovaných časech v porovnání s kontrolní skupinou neuronů, na kterou nebyly aplikovány žádné experimentální látky (Obr. 18). Zvýšení velikosti AMPA EPSC

během aplikace lavendustinu A s inzulinem byl vysoce statisticky významný při zprůměrování daných hodnot v 5 min intervalech (Obr. 20). Z výsledků je patrné, že aplikace lavendustinu A účinně blokovala inzulinem indukovanou depresi AMPA EPSC na neuronech zadního rohu míšního.



Obr. 20 Změny velikosti AMPA EPSC během aplikace inzulinu a lavendustinu A. Ovlivnění velikosti AMPA EPSC inzulinem bylo vysoce statisticky významné při zprůměrování hodnot v 5 min intervalech. Společná aplikace lavendustinu A a inzulinu znemožnila indukci inzulinem stimulované deprese, navíc přitom došlo ke zvýšení velikosti evokovaných AMPA EPSC. *** $P < 0,001$.

DISKUZE

V zadním rohu míšním dochází k synaptickému přenosu informace o podnětech detekovaných v periferních tkáních a v jeho superficiální oblasti především o podnětech nociceptivních. Synaptická spojení v této oblasti jsou velmi důležitá pro modulaci signalizace o vnějších i vnitřních podnětech a pro případný vjem bolesti. První synapse nociceptivních drah lokalizované právě v zadním rohu míšním umožňují ovlivnění nocicepce ještě před vstupem do vyšších mozkových center. V následujících kapitolách jsou diskutovány výsledky našich tří studií, které se zabývaly modulací synaptického přenosu nociceptivní signalizace prostřednictvím presynaptických i postsynaptických mechanismů.

1. Regulace synaptického přenosu nociceptivní signalizace aplikací OLDA

Ovlivnění funkce vaniloidních TRPV1 receptorů otvírá nové možnosti léčby chronické bolesti spojené s řadou různých onemocnění (Levine a Alessandri-Haber, 2007). TRPV1 receptory mají totiž klíčovou úlohu v mechanismech podmiňujících vznik a přetrvání mnoha patologických stavů bolesti. V našich pokusech jsme se zaměřili na TRPV1 receptory exprimované na centrálních zakončeních neuronů spinálních ganglií projikujících do zadního rohu míšního. Tyto centrální TRPV1 receptory modulují synaptický přenos nociceptivní signalizace v míše. K aktivaci TRPV1 receptorů jsme použili nedávno identifikovaného endogenního agonistu TRPV1 receptorů *N*-oleoyldopamin (OLDA), který byl izolován ze savčího mozku (Chu et al., 2003). Behaviorální testy z naší laboratoře ukázaly, že aktivace míšních TRPV1 receptorů intratekálním podáním OLDA vede u laboratorního potkana k rozvoji tepelné hyperalgezie. Pozorovaná tepelná hyperalgezie, jejíž vznik byl podmíněn centrálními mechanismy, rozšiřuje předchozí poznatky o vyvolání periferní tepelné hyperalgezie po intraplantární injekci OLDA (Chu et al., 2003). Naše elektrofyzilogické pokusy ukázaly, že k vyvolání statisticky významného zvýšení frekvence mEPSC na neuronech v superficiální oblasti zadního rohu míšního byla nezbytná relativně vysoká 10 μ M koncentrace OLDA. Přitom podstatně nižší 0,2 μ M

koncentrace OLDA byla dostačující k vyvolání zvýšení frekvence mEPSC po aktivaci PKC pomocí forbolesteru, aplikaci BK nebo v případě, kdy byly proudy snímány na neuronech v řezech připravených ze zvířat s experimentálně navozeným periferním zánětem. Tyto výsledky prokazují, že TRPV1 receptory lokalizované v presynaptické části na výběžcích primárních nociceptivních aferentních neuronů mohou být za patologických podmínek aktivovány řádově nižší koncentrací endogenního agonisty. Za patologických podmínek se může zvýšit citlivost TRPV1 receptorů k jejich ligandům a jedním z klíčových mechanismů jejich senzitivace je pravděpodobně fosforylace. Ve výsledku tak TRPV1 receptory získávají podstatně větší regulační vliv na nociceptivní přenos v míše, než za fyziologických podmínek.

1.1. Účinek a specifita aktivace TRPV1 receptorů pomocí OLDA

Míru aktivace presynaptických TRPV1 receptorů jsme hodnotili jako změnu ve frekvenci mEPSC na neuronech zadního rohu míšního. Z literatury je známo, že aktivace presynaptických TRPV1 receptorů pomocí kapsaicinu zvyšuje výlev glutamátu z primárních aferentních vláken, což vede ke zvýšení frekvence mEPSC na míšních neuronech (Ueda et al., 1993; Yang et al., 1998; Nakatsuka et al., 2002; Baccei et al., 2003; Sikand a Premkumar, 2007). Kapsaicin je dobře známý a velmi účinný exogenní agonista TRPV1 receptorů. My jsme ovšem za účelem zkoumání možnosti aktivace míšních TRPV1 receptorů *in vivo* použili endogenního agonistu těchto receptorů *N*-oleoyldopamin. Pro vyvolání statisticky významné změny frekvence mEPSC byla nutná aplikace 10 μ M koncentrace OLDA. To je v souladu s EC_{50} pro aktivaci TRPV1 receptorů laboratorního potkana stanoveným na 1,8 μ M OLDA v buněčných kulturách (Szolcsanyi et al., 2004) a EC_{50} pro tepelnou hyperalgezií stimulovanou subkutánní injekcí OLDA do *planty pedis* rovněž laboratorního potkana změřeným na 34,5 μ M OLDA (Chu et al., 2003). V úvahu je nezbytné brát odlišné experimentální podmínky a způsob aplikace v jednotlivých studiích. Účinnost OLDA při aktivaci lidských TRPV1 receptorů je přitom významně vyšší, EC_{50} bylo stanoveno na pouhých 36 nM (Chu et al., 2003).

Specifitu aktivace TRPV1 receptorů pomocí OLDA jsme v našich pokusech potvrdili zablokováním odpovědi prostřednictvím dvou kompetitivních antagonistů TRPV1 receptorů SB 366791 a BCTC. Zatímco SB 366791 je vysoce selektivní

antagonista TRPV1 receptorů, BCTC může inhibovat navíc ještě jeden receptor z TRP rodiny, a to melastatinový TRPM8, který je rovněž exprimován v neuronech spinálních ganglií (Weil et al., 2005). Účinek aplikace BCTC na frekvenci mEPSC na míšních neuronech v našich akutních řezech byl shodný s účinkem selektivního antagonisty TRPV1 receptorů SB 366791. Z toho vyplývá, že zvýšení frekvence mEPSC po aplikaci OLDA bylo zprostředkováno TRPV1 receptory.

Endogenní agonisté TRPV1 receptorů jsou často také ligandy receptorů kanabinoidních. Aktivace daného typu receptoru je pak závislá na koncentraci agonisty. OLDA může také aktivovat kanabinoidní CB1 receptory, ale je pouze jejich slabý agonista. V porovnání s NADA, dříve charakterizovaným endogenním agonistou TRPV1 receptorů, je OLDA účinnějším a selektivnějším agonistou TRPV1 oproti CB1 receptorům (Chu et al., 2003). Předpokládáme, že v našich pokusech pravděpodobně nehrála aktivace CB receptorů významnou roli. Míšní receptory *in vivo* mohou být aktivovány i jinými potenciálními endogenními agonisty TRPV1 receptorů, zvláště za patologických podmínek, když vzrůstá jejich senzitivita. Jeden z případných kandidátů je anandamid, který naopak ve vysoké koncentraci aktivuje TRPV1 receptory a následně zvyšuje výlev neuropeptidů, přitom v nízké koncentraci má díky aktivaci CB receptorů antinociceptivní účinky (Tognetto et al., 2001; Jennings et al., 2003; Horvath et al., 2008). Aktivace TRPV1 a CB receptorů může působit protichůdně, aktivace TRPV1 receptorů je spíše excitačního charakteru a aktivace CB1 receptorů způsobuje presynaptickou inhibici postsynaptických excitačních proudů v zadním rohu míšním (Morisset a Urban, 2001). Kooperace mezi vaniloidními TRPV1 a kanabinoidními CB1 receptory může mít významnou úlohu v modulaci nociceptivního přenosu na míšní úrovni, zvláště když většina známých endogenních agonistů TRPV1 receptorů aktivuje oba typy receptorů.

1.2. Účinek aplikace forbolesteru a bradykininu

Forbolestery jsou vysoce účinnými aktivátory PKC, jež na míšní úrovni mají významné modulační účinky. Po aplikaci forbolesteru může docházet k senzitivizaci neuronů spinothalamické dráhy (Palecek et al., 1994), indukci mechanické allodynii a tepelné hyperalgie, což je spojeno se zvýšeným výlevem excitačních aminokyselin (Palecek et al., 1999a). V míšních řezech, ve shodě s našimi výsledky, aplikace

forbolesteru zvyšuje frekvenci mEPSC (Hori et al., 1996). V kulturách embryonálních neuronů spinálních ganglií a neuronů zadního rohu míšního laboratorního potkana aplikace forbolesteru také zvýšila frekvenci mEPSC, ale nezávisle na aktivaci PKC (Sikand a Premkumar, 2007). Takovéto zefektivnění glutamatergního synaptického přenosu může být způsobeno přímým působením na presynaptické proteiny, které ve výsledku ovlivní výlev přenašeče ze synaptických váčků (Rhee et al., 2002; Lou et al., 2005). Ve výše zmíněné neuronální kultuře forbolester indukoval senzitivizaci presynaptických TRPV1 receptorů v závislosti na PKC, takže mohly být aktivovány tělesnou teplotou 37°C (Sikand a Premkumar, 2007). To je v naprostém souladu s předchozím zjištěním, že forbolester v buněčných kulturách zesiluje odpovědi zprostředkované TRPV1 receptory (Premkumar a Ahern, 2000; Vellani et al., 2001). Aplikace forbolesteru na neurony spinálních ganglií také indukovala zvýšení koncentrace agonisty TRPV1 receptorů anandamidu, což může vést k amplifikaci signální kaskády (Vellani et al., 2008). V naší studii způsobila aplikace forbolesteru zvýšení frekvence mEPSC na neuronech v zadním rohu míšním. Následná aplikace nízké koncentrace OLDA evokovala další robustní nárůst frekvence mEPSC. To naznačuje, že křivka koncentrační závislosti aktivace TRPV1 receptorů prostřednictvím OLDA byla posunuta doleva, podobně jako kapsaicinem vyvolané proudy snímané na neuronech spinálních ganglií v kulturách po aplikaci forbolesteru (Vellani et al., 2001).

Forbolestery jsou velmi účinnými exogenními aktivátory PKC (Castagna et al., 1982), jejichž aplikace ovlivňuje funkci TRPV1 receptorů. Abychom se přiblížili k *in vivo* podmínkám, použili jsme k senzitivizaci TRPV1 receptorů endogenní látku bradykinin (Premkumar a Ahern, 2000), který je lokálně produkován v místě periferního zánětu. Navíc bylo prokázáno, že po aktivaci nociceptorů intraplantární injekcí kapsaicinu se koncentrace BK v míše významně zvyšuje (Wang et al., 2005a). Aplikace BK v našich pokusech indukovala velmi výrazné zvýšení frekvence a amplitudy mEPSC. To je v souladu s nedávným zjištěním Wanga et al. (2005a), že BK ovlivňuje synaptický přenos v superficiální oblasti zadního rohu míšního presynaptickými i postsynaptickými mechanismy. Presynapticky působí přes bradykininové receptory B2, jejichž aktivace vede ke zvýšenému výlevu glutamátu. Na neuronálních kulturách bylo prokázáno, že BK zvyšuje frekvenci mEPSC a senzitivizuje odpovědi po aplikaci kapsaicinu v závislosti na PKC (Sikand a Premkumar, 2007). Postsynapticky BK opět přes B2 receptory zvyšuje proudy zprostředkované glutamátovými AMPA a NMDA receptory v lamině II v závislosti na aktivaci PKA a

PKC (Kohno et al., 2008). *In vivo* je možné bradykininem indukovat tepelnou hyperalgezií pomocí jeho intraplantární aplikace. Tato BK indukovaná hyperalgezie je závislá na TRPV1 receptorech, protože u TRPV1 knock out myši se nerozvíjí (Chuang et al., 2001). Tepelnou hyperalgezií lze ovšem vyvolat i intratekální aplikací BK (Kohno et al., 2008). Na BK indukované tepelné hyperalgezií se tedy podílí periferní i centrální mechanismy. Naše měření ukázala, že po působení BK vede aplikace nízké koncentrace OLDA ke zvýšení frekvence mEPSC. Vzestup frekvence těchto excitačních proudů je tedy pravděpodobně podmíněn aktivací senzitivovaných presynaptických TRPV1 receptorů. Na základě publikovaných studií by mohla BK vyvolaná senzitivace TRPV1 receptorů být zapříčiněna aktivací různých signálních drah, které mohou zahrnovat aktivaci PKC (Cesare et al., 1999; Sugiura et al., 2002; Sikand a Premkumar, 2007), fosfolipázy C, inozitol trifosfátu a diacylglycerolu (Burgess et al., 1989; Ferreira et al., 2004), fosfolipázy A2 a generování metabolitů lipoxygenázy (Hwang et al., 2000; Shin et al., 2002) nebo aktivací cyklooxygenázy (Tang et al., 2004). Naše výsledky ukazují možnost zvýšení citlivosti míšních TRPV1 receptorů forbolesterem nebo BK k nízké koncentraci endogenního agonisty. Z toho vyplývá, že za *in vivo* podmínek by mohlo docházet k podobné senzitivaci TRPV1 receptorů díky aktivaci PKC anebo PKA různými neurozánětlivými molekulami. Zvýšená citlivost TRPV1 receptorů k endogenním agonistům by mohla modulovat nociceptivní synaptickou aktivitu na míšní úrovni.

1.3. Ovlivnění mEPSC teplotou lázně

Řada našich pokusů probíhala za kontrolované teploty extracelulárního snímacího roztoku a jejího udržování na 24°C. V některých sériích experimentů byla teplota zvýšena na 34°C tak, aby se přiblížila normální fyziologické teplotě těla. Od původního záměru snímat proudy při teplotě 37°C jsme upustili, protože bylo technicky velmi obtížné provést měření se standardními parametry v průběhu celého experimentálního protokolu. Zvýšení teploty extracelulárního roztoku z 24°C na 34°C vyústilo v dramatické zvýšení frekvence mEPSC a jejich amplitudy. Změny navozené teplotou byly pravděpodobně způsobeny presynaptickými i postsynaptickými mechanismy. Velikost nárůstu frekvence i amplitudy miniaturních proudů byla velmi podobná za kontrolních i různých experimentálních podmínek (CTRL, OLDA, PMA,

OLDA). To naznačuje, že presynaptický mechanismus nezahrnoval aktivaci TRPV1 receptorů, ale příčinou mohlo být zvýšení výlevu přenašeče způsobené změnami v kinetice exocytózy a endocytózy synaptických váčků (Yang et al., 2005); snížení energetických nároků na fúzi synaptických váčků, která je nezávislá na Ca^{2+} a nebo zvýšení rychlosti opětovného plnění synaptických váčků (Pyott a Rosenmund, 2002). Na postsynaptických mechanismech se mohla podílet akcelerace reakční kinetiky AMPA receptorů, takže se kanál AMPA receptoru mohl otevírat s vyšší pravděpodobností ve vysokovodivostním otevřeném stavu (Postlethwaite et al., 2007).

Je dobře známo, že teplotní práh pro aktivaci TRPV1 receptorů je výrazně snížen po fosforylaci receptoru. Za kontrolních podmínek jsou TRPV1 receptory exprimované v kultuře HEK buněk aktivovány přibližně při 43°C. Přitom aplikace bradykininu nebo forbolesteru může zajistit otevření kanálů již při teplotě 32°C (Sugiura et al., 2002). Aktivace presynaptických TRPV1 receptorů při 37°C po aktivaci PKC byla prokázána v embryonálních kulturách neuronů spinálních ganglií s neurony zadního rohu míšního (Sikand a Premkumar, 2007). Zvýšení frekvence mEPSC aplikovaným OLDA po předchozí stimulaci forbolesterem dosáhlo v našich pokusech obdobné úrovně při teplotě 24°C i 34°C. Z toho vyplývá, že nedošlo k významné aktivaci TRPV1 receptorů, která by byla indukována zvýšením teploty lázně na 34°C. Pravděpodobně byla teplota naší lázně pod aktivačním prahem pro TRPV1 receptory i po aktivaci PKC. Nelze však vyloučit ani funkční rozdíly TRPV1 receptorů a celého presynaptického aparátu mezi odlišnými experimentálními modely, jako jsou míšní řezy a buněčné kultury, které byly využity v dřívějších studiích.

1.4. Úloha míšních TRPV1 receptorů při periferním zánětu

Význam míšních TRPV1 receptorů v modulaci nociceptivní signalizace především v patologických bolestivých stavech získává v posledních letech stále více pozornosti a také experimentálních důkazů. Po vyvolání periferního zánětu byla prokázána zvýšená exprese TRPV1 receptorů (Luo et al., 2004) a mRNA pro tyto receptory v zadním rohu míšním (Tohda et al., 2001). V takto navozených podmínkách zablokoval intratekálně aplikovaný antagonist TRPV1 receptorů tepelnou hyperalgezií (Cui et al., 2006; Luo et al., 2008). Ukazuje se, že TRPV1 receptory mohou modulovat i mechanopercepci, což dřívější studie nenaznačovaly. Mechanická allodynie spojená

s periferním zánětem byla redukována aplikací antagonisty TRPV1 receptorů, jak vyplynulo ze sledování odpovědí míšních neuronů s širokým dynamickým rozsahem na lehké taktilní podněty (McGaraughty et al., 2008). Aplikace antagonisty TRPV1 receptorů na míšní řezy ze zvířat s periferním zánětem inhibovala glutamatergní přenos s využitím presynaptického mechanismu (Lappin et al., 2006). Naše výsledky poskytují důkazy o zvýšené citlivosti míšních zakončení primárních nociceptivních neuronů k endogennímu agonistovi TRPV1 receptorů po vyvolání periferního zánětu. Na zvýšení citlivosti se mohlo podílet mnoho faktorů např. zvýšení hladiny prozánětlivého mediátoru bradykininu v míše, následná fosforylace TRPV1 receptorů anebo zvýšení jejich exprese v buňkách spinálních ganglií. Senzitizace míšních TRPV1 receptorů během patologických podmínek se ukazuje být významným mechanismem, který je zahrnut v modulaci nociceptivního synaptického přenosu v zadním rohu míšním. Zacílení právě na tyto míšní TRPV1 receptory má velký potenciál pro léčbu bolesti.

2. Úloha cytokinu TNF α v nociceptivním synaptickém přenosu v míše

Cytokin TNF α je zapojen do mechanismů podmiňujících některé stavy chronické bolesti. Jeho koncentrace se zvyšuje lokálně v místě periferního neurogenního zánětu, proto byl zařazen mezi mediátory zánětu. K jeho nadprodukcii ovšem dochází také ve spinálních gangliích a míše, kde je hojně uvolňován zmnoženými aktivovanými gliovými buňkami při periferním zánětu nebo neuropatii (Winkelstein et al., 2001; Schafers et al., 2003a; Ohtori et al., 2004; Raghavendra et al., 2004). V našich pokusech jsme zkoumali vliv TNF α na excitační synaptický přenos v superficiální oblasti zadního rohu míšního a jeho modulaci funkce TRPV1 receptorů, které mají klíčovou úlohu v nociceptivní signalizaci. Aplikace nízké koncentrace endogenního agonisty TRPV1 receptorů OLDA, která za kontrolních podmínek nestimuluje zvýšení frekvence mEPSC, zvýšila frekvenci mEPSC na neuronech v řezech inkubovaných v extracelulárním roztoku obohaceném o cytokin TNF α . Endogenním agonistou TRPV1 receptorů stimulovaný akutní vzestup frekvence mEPSC byl pozorován u 10 ze 16 snímaných neuronů (~60%), přitom 13 těchto neuronů (~80%) reagovalo na stimulaci vysoce účinným agonistou TRPV1 receptorů kapsaicinem. Tyto míšní neurony pravděpodobně měly vstupy z kapsaicin

senzitivních primárních aferentních vláken exprimujících TRPV1 receptory. Amplituda mEPSC nebyla aplikací OLDA ovlivněna.

Průměrná základní frekvence mEPSC z celkového počtu snímaných neuronů z řezů inkubovaných v TNF α se významně nelišila od základní kontrolní frekvence mEPSC bez jakékoli experimentální aplikace na neuronech v kontrolních řezech. Je zajímavé, že základní kontrolní frekvence mEPSC u populace neuronů zadního rohu míšního, která přijímá aktivitu z kapsaicin senzitivních primárních aferentních vláken, byla významně vyšší v řezech inkubovaných v TNF α než u stejné populace neuronů v řezech kontrolních. Přitom nebyl zjištěn žádný rozdíl v průměrné amplitudě mEPSC.

3 ze 13 neuronů (~23%) v superficiální oblasti zadního rohu míšního inkubované v TNF α nereagovaly na aplikaci nízké koncentrace OLDA zvýšením frekvence mEPSC, i když na jejich presynaptických kontaktech byly exprimovány TRPV1 receptory, jak bylo ověřeno aplikací kapsaicinu. Je pravděpodobné, že na těchto centrálních zakončeních primárních aferentních vláken nebyly exprimovány receptory pro TNF α , jejichž aktivace zajišťovala citlivost k výrazně nižší koncentraci endogenního agonisty TRPV1 receptorů.

Účinek TNF α může být zprostředkován aktivací dvou receptorů TNFR1 (p55) a TNFR2 (p75). V neuronech spinálních ganglií byly detekovány oba typy TNF α receptorů, jejichž množství se podstatně zvyšuje v patologickém stavu (Shubayev a Myers, 2001; Pollock et al., 2002; Schafers et al., 2003b; George et al., 2005). Pozdější studie zpochybnily expresi TNFR2 receptorů na neuronech spinálních ganglií a lokalizovaly ji výhradně do jiných buněk než neuronů (Li et al., 2004; Inglis et al., 2005). Je možné, že exprese TNFR2 receptorů je za normálních podmínek na hranici detekovatelnosti, přitom hojný počet TNFR1 receptorů na neuronech spinálních ganglií není obtížné současnými metodickými přístupy identifikovat.

V zadním rohu míšním byly TNFR1 receptory hojně detekovány právě na centrálních výběžcích neuronů spinálních ganglií (Holmes et al., 2004). Ke zvýšené expresi TNFR1 receptoru opět dochází při některých patologických stavech bolesti, takže se stávají detekovatelnými i na míšních neuronech, mikroglíích, astrocytech a oligodendrocytech (Li et al., 2004; Ohtori et al., 2004; Xu et al., 2006). Receptory TNFR2 byly detekovány rovněž za patologických podmínek při poranění míchy na gliích a míšních neuronech, na kterých byly lokalizovány vždy postsynapticky (Yan et al., 2003). Stěžejní úloha aktivace TNFR1 receptoru za patologických podmínek byla demonstrována na experimentálním modelu neuropatické bolesti, kdy byla pomocí

neutralizačních protilátek pro TNFR1 receptor redukována tepelná hyperalgezie a mechanická alldynie (Sommer et al., 1998). Společná exprese mRNA pro TNFR1 a TRPV1 receptory na neuronech spinálních ganglií byla také demonstrována (Li et al., 2004). Zvýšení frekvence mEPSC pomocí OLDA na míšních neuronech inkubovaných v TNF α v našich pokusech poukazuje na presynaptický mechanismus působení. Námí sledovaný efekt byl patrně zapříčiněn aktivací kolokalizujících TNFR1 a TRPV1 receptorů na centrálních zakončeních primárních aferentních vláken.

Na neuronech spinálních ganglií v kultuře bylo zjištěno, že dlouhodobé (48h) působení TNF α vede ke zvýšení počtu TRPV1 imunopozitivních neuronů. Tato zvýšená exprese TRPV1 receptorů byla závislá na TNFR1 receptorech, jak bylo prokázáno pomocí neuronů spinálních ganglií izolovaných z TNFR1^{-/-} knock out myši (Hensellek et al., 2007). To je v souladu s předchozím pozorováním zvýšeného počtu neuronů spinálních ganglií značených kobaltem po aktivaci TRPV1 receptorů kapsaicinem, k čemuž docházelo pouze v případě, pokud byl do kultivačního média přidán na 24h TNF α (Nicol et al., 1997). Cytokin TNF α v této kultuře zvýšil citlivost sensorických neuronů ke kapsaicinu, a to již po 4h působení. U trigeminálních neuronů byla také pozorována změna fenotypu po působení TNF α , přitom zvýšená exprese TRPV1 receptorů byla spojena se zvýšeným výlevem CGRP po stimulaci kapsaicinem (Khan et al., 2008). Zdvojnásobení množství mRNA pro TRPV1 receptory bylo patrné již po 30 min inkubaci v TNF α . Kromě tohoto dlouhodobého efektu závislého na transkripci došlo ke zvýšení kapsaicinem stimulované intracelulární akumulace Ca²⁺ iontů, kterému předcházela pouze krátká (5 min) inkubace v TNF α (Khan et al., 2008).

Rychlý účinek TNF α na synaptický přenos v superficiální oblasti zadního rohu míšního byl zaznamenán také skupinou Kawasakiho et al. (2008), která ukázala, že akutní aplikace TNF α zvyšuje u některých neuronů v lamině II frekvenci spontánních EPSC (8 neuronů ze 14) bez ovlivnění jejich amplitudy a také zvyšuje účinnost proudů stimulovaných AMPA (5 neuronů z 9). Přitom vyšší účinnost proudů stimulovaných NMDA byla pozorována u všech snímaných neuronů. Zvýšení frekvence sEPSC i mEPSC při akutní aplikaci TNF α potvrdili Youn et al. (2008b), kteří ovšem v rozporu s předchozími výsledky demonstrovali TNF α stimulované zvýšení frekvence sIPSC. Zajímavé bylo, že u monosynaptických EPSC evokovaných stimulací A δ a C vláken byla působením TNF α dlouhodobě snížena amplituda, přitom stejná aplikace TNF α zvýšila účinnost polysynaptických EPSC evokovaných stimulací A δ vláken. Tyto evokované proudy byly významně redukovány inhibicí vazby TNF α na TNFR1

receptor. Při měření celkové neuronální excitace v zadním rohu míšním pomocí fluorescenční barvy citlivé k malým změnám napětí došlo k jejímu zvýšení působením TNF α (Ikeda et al., 2007). Na rozdíl od dospělých laboratorních potkanů dochází u mláďat (P9-11) k modulaci excitačního synaptického přenosu pomocí TNF α až za patologických podmínek, což bylo ukázáno na modelu periferní neuropatie (Li et al., 2009). Je tedy pravděpodobné, že modulace nociceptivní signalizace v zadním rohu míšním působením TNF α je závislá na vývojovém stádiu zvířete.

Z předchozích a našich výsledků vyplývá, že TNF α indukovaná modulace excitačního synaptického přenosu v zadním rohu míšním je komplexně podmíněna jak rychlými mechanismy, tak pomalými změnami závislými na transkripci. Klíčové procesy působení TNF α v našich pokusech zřejmě probíhají v presynaptické části na centrálních zakončeních neuronů spinálních ganglií. Může zde docházet k regulaci exprese TRPV1 receptorů a jejich citlivosti k agonistům, což vede ke zvýšenému výlevu glutamátu. Pravděpodobně dochází i ke změnám v postsynaptické části, ale jejich mechanismy nejsou dosud objasněny. Jednou z možností je aktivace CCR2 receptorů pro chemokin MCP-1 na míšních neuronech, což vede nejen ke zvýšené účinnosti sEPSC, ale i potenciaci AMPA a NMDA proudů (Gao et al., 2009). Dramatické zvýšení koncentrace MCP-1 v míše může být stimulováno injekcí TNF α do míchy (Gao et al., 2009).

K podstatným změnám dochází v zadním rohu míšním za patologických podmínek, jak bylo demonstrováno v celé řadě studií využívajících různé modely neuropatické bolesti. Při neuropatii je synaptický přenos výrazně citlivější k regulaci TNF α . Základním předpokladem pro uplatnění regulace pomocí TNF α je zvýšení jeho produkce a zároveň exprese především TNFR1 receptoru, ale i receptoru TNFR2.

Z literatury jsou známy další možné způsoby regulace cytokinem TNF α , které by mohly mít dopad na synaptický přenos v míše. Např. Jin a Gereau (2006) pozorovali při aplikaci TNF α na neurony spinálních ganglií v kultuře zvýšení TTX rezistentních Na⁺ proudů, které bylo závislé na TNFR1 receptorech. I další kanály exprimované na neuronech spinálních ganglií mohou být regulovány aplikací TNF α . Bylo prokázáno TNF α stimulované zvýšení proudu zprostředkovaného napětím aktivovanými Na⁺ kanály a snížení proudu zprostředkovaného napětím aktivovanými Ca²⁺ kanály (Czeschik et al., 2008). V případě napětím aktivovaných Ca²⁺ kanálů byl proud modulován kapsaicinem a tento proces byl také senzitivován cytokinem TNF α (Hagenacker et al., 2010). ATP stimulované odpovědi aferentních vláken v *nervus*

vagus byly zase zesíleny prostřednictvím TNF α otevřením ryanodinových kanálů na endoplazmatickém retikulu a s ním spojeným zvýšením Ca²⁺ iontů v cytoplazmě (Rogers et al., 2006). Pollock et al. (2002) ukázali, že aktivace TNFR mobilizuje intracelulární zásobárny Ca²⁺, které jsou závislé na ryanodinu. Se zásobárnami Ca²⁺ mohou být spojeny jak TNFR1, tak TNFR2 receptory, jimi aktivované signální dráhy se však liší. Neuromodulační účinky TNF α s dopadem na synaptický přenos byly popsány i v mozku (Beattie et al., 2002; Bernardino et al., 2005; Stellwagen a Malenka, 2006), mechanismy působení TNF α však nemusí být v různých oblastech CNS totožné.

3. Modulace excitačních postsynaptických AMPA proudů inzulinem v zadním rohu míšním

Naše výsledky naznačují možnou regulaci synaptické aktivity v míše prostřednictvím inzulinu. S využitím elektrofyziologických metod jsme stimulovali primární aferentní vlákna a tím evokovali monosynaptické nebo polysynaptické AMPA EPSC na neuronech v superficiální oblasti zadního rohu míšního v akutních lumbálních řezech. Monosynaptické odpovědi vznikaly stimulací jediného primárního aferentního vlákna, které projikovalo přímo na snímaný neuron. V případě současné stimulace několika primárních aferentních vláken stejného typu mohlo dojít na míšním neuronu k součtu amplitud excitačních proudů evokovaných ve stejném čase. Polysynaptické odpovědi mohly zahrnovat stimulaci jednoho primárního aferentního vlákna, které aktivovalo excitační interneurony projikující na snímaný neuron. Inhibiční synapse přitom byly zablokovány relevantními antagonisty. Mohlo být také stimulováno několik primárních aferentních vláken, která buď přímo projikovala na snímaný neuron, nebo aktivovala excitační interneurony, jejichž aktivita přicházela do presynaptické části snímaného neuronu.

Evokované EPSC byly zcela blokovány aplikací antagonisty AMPA/kainátových receptorů CNQX i selektivního antagonisty AMPA receptorů GYKI 52466. Selektivní antagonist kainátových receptorů SYM 2081 evokované excitační proudy neovlivnil. Z toho vyplývá, že snímané EPSC byly zprostředkovány AMPA receptory, podobně jako ve studii provedené na míšních neuronech v řezech z dospělých laboratorních potkanů (Park et al., 2009).

3.1. Vývojové změny periferních aferentních vláken a AMPA receptorů

Naše pokusy byly prováděny na mláďatech laboratorní myši v období mezi P6-10. Vývoj centrálního a periferního nervového systému u savců není po narození dokončen. Řada prací se v minulosti zabývala zkoumáním vývojových změn u laboratorního potkana. Bylo zjištěno, že kožní polymodální nociceptory stimulované mechanickými, chemickými a tepelnými podněty mohou být aktivovány již po narození v P0 (Fitzgerald, 1987). Primární nociceptivní vlákna, která exprimují TRPV1 receptory, utvářejí funkční synapse s neurony v superficiální oblasti zadního rohu míšního již od narození, ale jejich účinnost stoupá mezi P5 a P10 (Baccei et al., 2003). Zatímco krátce po narození je projekce A vláken rozptýlena do celého zadního rohu míšního, tak již od P22 jsou centrální zakončení A vláken koncentrována v laminách III - V stejně jako u dospělých potkanů (Fitzgerald et al., 1994). Vodivost A vláken se zvyšuje asi 4,5krát od P3 do P21 (Jennings a Fitzgerald, 1998). Pokud budeme předpokládat obdobnou maturaci nervové tkáně u mláďat laboratorní myši, můžeme u pokusných zvířat v naší studii (P6-10) uvažovat o rozsáhlejší projekci A β vláken do superficiální oblasti zadního rohu míšního a o nedokončené myelinizaci primárních aferentních vláken. V takovém případě je obtížné rozlišovat aktivaci jednotlivých typů primárních aferentních vláken elektrickou stimulací. Námi použitý stimulační puls pravděpodobně aktivoval C a A δ společně s A β primárními aferentními vlákny. Přestože většina superficiálních neuronů zadního rohu míšního se podílí na nociceptivním přenosu, nemůžeme vyloučit, že inzulinem navozené změny velikosti AMPA proudů po eventuální stimulaci A β vláken v našem preparátu ovlivnily přenos i ostatních sensorických modalit, které běžně k nociceptivnímu dráždění nevedou.

AMPA receptory rovněž podléhají výrazným vývojovým změnám. Jakowec et al. (1995a,b) ukázali, že nejhojněji exprimované podjednotky AMPA receptorů v zadním rohu míšním GluR1 a GluR2 jsou přítomny napříč míchou ve větším množství u mláďat laboratorního potkana P7 ve srovnání s dospělými zvířaty. V superficiální oblasti zadního rohu míšního dochází během vývoje k dramatickému poklesu počtu obou těchto podjednotek AMPA receptoru, přitom GluR1 je redukována výrazněji v porovnání s GluR2 podjednotkou. U mláďat v období mezi P6 a P14 je GluR2 podjednotka více koncentrována v lamině II_i (Engelman et al., 1999) podobně jako u dospělých laboratorních potkanů (Tolle et al., 1993; Popratiloff et al., 1996; Yasaka et al., 2009) a myši (Hartmann et al., 2004). AMPA receptory, které nemají ve

své struktuře zabudovanou podjednotku GluR2, jsou propustné pro Ca^{2+} ionty. Funkční AMPA receptory propustné pro Ca^{2+} jsou u mláďat lokalizovány v laminách I a II (Engelman et al., 1999). Změny v poměru podjednotek GluR1/GluR2 během vývoje mohou ovlivňovat počet AMPA receptorů propustných pro Ca^{2+} . K regulaci počtu AMPA receptorů propustných pro Ca^{2+} nedochází pouze během vývoje, ale také při patologických stavech bolesti (Hartmann et al., 2004; Katano et al., 2008; Vikman et al., 2008; Youn et al., 2008a). Změna podjednotkového složení synaptických AMPA receptorů po aplikaci inzulínu může mít podstatnou úlohu v regulaci nociceptivní signalizace na míšní úrovni.

3.2. Exprese AMPA receptorů a inzulínem navozené snížení AMPA proudů

U 75% námi snímaných neuronů v superficiální oblasti zadního rohu míšního došlo po aplikaci inzulínu k depresi evokovaných AMPA EPSC. Přitom velikost AMPA EPSC u zbývajících 25% neuronů po aplikaci inzulínu zůstala neovlivněna. V neuronech zadního rohu míšního byla hojně detekována mRNA pro inzulínový receptor (IR) na rozdíl od pozitivního značení samotných IR, které bylo detekováno především v laminách V a X (Sugimoto et al., 2002). Exprese IR v neuronech spinálních ganglií byla rovněž potvrzena (Baiou et al., 2007), ale jejich přítomnost na centrálních zakončeních neuronů spinálních ganglií prokázána nebyla. Námi pozorovaná inzulínem indukovaná deprese AMPA EPSC poukazuje na rozsáhlou kolokalizaci IR a AMPA receptorů na snímaných neuronech. Je pravděpodobné, že translace mRNA pro IR a následné sestavení funkčních receptorů neprobíhá pouze v neuronech laminy V a X, ale rovněž v superficiální oblasti zadního rohu míšního.

Ze studií provedených na hipokampálních neuronech je známo, že pro inzulínem stimulovanou internalizaci AMPA receptorů je nezbytná fosforylace tyrozinu na intracelulárním konci GluR2 podjednotky (Ahmadian et al., 2004). Pokud budeme uvažovat o uplatnění stejného mechanismu také v míše, tak neurony reagující na stimulaci inzulínem v našich pokusech exprimují v postsynaptické membráně AMPA receptory s alespoň jednou GluR2 podjednotkou. V zadním rohu míšním je dominující podjednotkou AMPA receptorů právě GluR2 (Tolle et al., 1993; Popratiloff et al., 1996). Také většina synapsí s AMPA receptory v zadním rohu míšním je spojována s expresí GluR2 podjednotky (Nagy et al., 2004). Za patologických

podmínek může být množství GluR2 podjednotek na synapsích regulováno. Bylo prokázáno, že při hyperalgezií vyvolané periferním zánětem dochází k internalizaci synaptických GluR2 a inzerci GluR1 podjednotek a s tímto mechanismem regulace je spojen zvýšený průnik Ca^{2+} skrze AMPA receptory v zadním rohu míšním (Katano et al., 2008; Park et al., 2009). Přitom nedochází ke změnám v celkové expresi AMPA receptorů, pouze k jejich redistribuci (Park et al., 2008). Poměr GluR1 podjednotek ke GluR2/3 může být při hyperalgezií významně zvýšen na synapsích tvořených především centrálními zakončeními C vláken a míšními neurony (Larsson a Broman, 2008). Neurony, které v našich pokusech nereagovaly na aplikaci inzulinu změnou velikosti AMPA EPSC buď nemají GluR2 podjednotky zabudované ve struktuře AMPA receptorů lokalizovaných v postsynaptické membráně, anebo neexprimují IR. Naše hypotéza zahrnuje inzulinem stimulovanou internalizaci AMPA receptorů jako hlavní faktor podmiňující depresi AMPA EPSC. Nelze však vyloučit, že se na depresi proudů podílí i jiné formy modulace AMPA receptorů, jako regulace jejich biofyzikálních vlastností, kdy může docházet ke snížení afinity receptoru ke glutamátu, pravděpodobnosti otevírání kanálu nebo vodivosti.

Z literatury je známo, že inzulin může regulovat funkci TRPV1 receptorů exprimovaných na neuronech spinálních ganglií. Aplikace inzulinu (1 μM) na tyto neurony v kultuře zvýšila senzitivitu TRPV1 receptorů a způsobila jejich inzerci do plazmatické membrány (Van Buren et al., 2005). Možnost přímé aktivace TRPV1 receptorů inzulinem byla demonstrována metodou značení neuronů spinálních ganglií průnikem kobaltu kanálem TRPV1 receptoru do buněk po aplikaci inzulinu (10 μM ; Sathianathan et al., 2003). Na základě těchto poznatků a za předpokladu, že IR receptory jsou exprimovány na centrálních zakončeních primárních nociceptivních neuronů společně s TRPV1 receptory by mohla aplikace inzulinu regulovat funkci míšních TRPV1 receptorů a tak ovlivňovat uvolňování glutamátu z primárních nociceptivních vláken. Usuzujeme, že v našich pokusech k ovlivnění presynaptických TRPV1 receptorů inzulinem nedocházelo. Vezmeme-li v úvahu nezbytnost navýšení koncentrace aplikovaných látek na akutní řezy vzhledem k buněčným kulturám >10krát, aby bylo dosaženo daného účinku, tak námi aplikované koncentrace inzulinu 0,5 a 10 μM s vysokou pravděpodobností TRPV1 receptory neaktivovaly. Senzitivizaci TRPV1 receptorů 10 μM inzulinem vyloučit nelze, ale k jejich aktivaci patrně nedošlo ani v tomto případě, protože nebyl aplikován žádný agonista TRPV1 receptorů. Navíc byla odpověď vyvolaná 0,5 a 10 μM inzulinem shodná, na námi pozorovaném snížení

velikosti AMPA EPSC po aplikaci inzulínu se tedy zřejmě TRPV1 receptory nepodílely.

3.3. Molekulární podstata inzulínem stimulované deprese AMPA proudů

Internalizace AMPA receptorů byla v kultuře buněk izolovaných z mozečku pozorována i po stimulaci inzulínu podobným růstovým faktorem I (insulin-like growth factor I, IGF-I; Wang a Linden, 2000). Autoři studie se domnívají, že internalizace AMPA receptorů vyvolaná pomocí IGF-I je zprostředkována stejným mechanismem jako při stimulaci inzulínem. Transkripty mRNA pro IGF-I receptor jsou rovněž exprimovány v lumbální oblasti míchy laboratorního potkana (Bitar et al., 1996). Inzulín může kompetovat s IGF-I při vazbě na IGF-I receptor, ale pouze s 1% účinností hlavního agonisty IGF-I (Rosenfeld et al., 1985). V našich pokusech mohla vysoká 10 μM koncentrace aplikovaného inzulínu aktivovat inzulínové i IGF-I receptory. Protože jsme nenalezli rozdíl mezi účinkem 0,5 μM a 10 μM koncentrací inzulínu na AMPA EPSC, tak by v případě aktivace IR společně s IGF-I receptory mohl být využíván stejný mechanismus transdukce signálu v neuronech zadního rohu míšního.

Vnitřní tyrozinkináza IR fosforyluje substrát inzulínového receptoru I (insulin receptor substrate-I, IRS-I), který se na míšních neuronech pravděpodobně vyskytuje společně s IR, IGF-I receptorem a fosfatidylinozitol 3'-kinázou (PI3K; Folli et al., 1994). IRS-I je společný element signální dráhy aktivované inzulínem a IGF-I, která vede k aktivaci PI3K (Myers et al., 1993). Inzulínem indukovaná dlouhodobá deprese v hipokampu zapříčiněná endocytózou AMPA receptorů je kromě PI3K závislá na aktivaci PKC, PTK a serin/threonin kinázy (Beattie et al., 2000; Huang et al., 2004). Na základě těchto předchozích poznatků můžeme uvažovat o zahrnutí stejných kináz do signální dráhy aktivované inzulínem v neuronech zadního rohu míšního. IRS-I může přímo aktivovat PI3K (Saltiel a Kahn, 2001), ale není zřejmé, jestli PI3K je aktivátorem PKC v inzulínem stimulované depresi AMPA EPSC. Proteinkináza C a PTK mohou přímo interagovat s GluR2 podjednotkou AMPA receptoru (Song a Huganir, 2002), přitom fosforylace pomocí PTK je stěžejní v procesu internalizace AMPA receptorů (Ahmadian et al., 2004). PKC může být aktivována přes PI3K, vtokem Ca^{2+} iontů procházejících pórem napětově aktivovaných Ca^{2+} kanálů, nebo skrze AMPA receptory propustné pro Ca^{2+} , v jejichž struktuře není integrovaná GluR2

podjednotka a nedochází k jejich internalizaci po stimulaci inzulinem. Je pravděpodobné, že AMPA proudy v našich pokusech byly po stimulaci inzulinem zprostředkovány především AMPA receptory propustnými pro Ca^{2+} , protože AMPA receptory pro Ca^{2+} nepropustné nemohou být v případě kolokalizace s IR po internalizaci aktivovány. To je v souladu s hypotézou, že neurony v zadním rohu míšním exprimují smíšené populace AMPA receptorů propustných a nepropustných pro Ca^{2+} ionty (Albuquerque et al., 1999) a že exprese GluR2 podjednotek AMPA receptoru je v superficiální oblasti zadního rohu míšního spojována v naprosté většině s excitačními neurony (Kerr et al., 1998).

3.4. Úloha PTK v inzulinem stimulované depresi AMPA EPSC v míše

Naše další výsledky dokládají nezbytnost aktivace PTK při vzniku inzulinem stimulované deprese AMPA EPSC v míše. To je v souladu s dříve popsanou inzulinem stimulovanou signalizací v hipokampálních řezech nebo neuronálních kulturách (Beattie et al., 2000; Ahmadian et al., 2004; Huang et al., 2004). Inhibitor PTK lavendustin A v našich pokusech nejenom účinně zablokoval modulační vliv inzulinu na AMPA proudy, ale jeho aplikace navíc zvýšila velikost AMPA EPSC vzhledem ke kontrolním hodnotám. Přímá modulace AMPA receptorů lavendustinem A není z literatury známa. Za fyziologických podmínek mohou PK a PTK fosforylovat AMPA receptory. Fosforylace jsou důležité pro regulaci kinetiky receptorů, vazbu ligandu a vodivost iontového kanálu (Song a Huganir, 2002), rovněž se podílejí na konstitutivní endocytóze a exocytóze AMPA receptorů (Kessels a Malinow, 2009). Nárůst velikosti AMPA EPSC po aplikaci lavendustinu A může být zapříčiněn omezením konstitutivní fosforylace AMPA receptorů pomocí PTK a s tím spojenou redukcí konstitutivní internalizace receptorů. Dalším faktorem, který se může podílet na zvýšení velikosti AMPA EPSC, je regulace biofyzikálních vlastností AMPA receptorů.

3.5. Modulace synaptického přenosu inzulinem na míšní úrovni a jeho úloha v nocicepci

Inzulinem indukovaná deprese AMPA EPSC může vést ke snížené depolarizaci daného neuronu a tím k oslabení synaptického přenosu mezi primárními aferentními vlákny a neurony zadního rohu míšního. Naše studie sledovala výhradně změny navozené aplikací inzulinu na proudech podmíněných aktivací AMPA receptorů. Možná aktivace NMDA, GABA_A a glycinových receptorů byla znemožněna aplikací adekvátních inhibitorů těchto receptorů. Z předchozích prací využívajících buněčných kultur nebo mozkových řezů jsou ale známy modulační účinky inzulinu i na další ionotropní receptory. Na kultuře žabích oocytů a hipokampálních řezech z potkana byla po aplikaci inzulinu demonstrována zvýšená účinnost evokovaných NMDA proudů (Liu et al., 1995). Kromě modulace excitačního přenosu byl také pozorován vliv na synaptický přenos inhibiční zprostředkovaný GABA_A a glycinovými receptory. Rychlá inserce GABA_A receptorů do postsynaptické membrány po aplikaci inzulinu byla prokázána na kultuře lidských embryonálních buněk a hipokampálních neuronech v řezu z mozku laboratorního potkana (Wan et al., 1997). Rychlé zvýšení účinnosti glycinergního synaptického přenosu po aplikaci inzulinu bylo odhaleno na kultuře míšních neuronů izolovaných z laboratorní myši (Caraiscos et al., 2007).

K vyřešení otázky, zda může být inzulin uvolňován v podmínkách *in vivo* a modulovat aktivaci IR receptorů sensorický přenos včetně nociceptivního, je nutné provést ještě další pokusy. Z inzulinem indukované deprese synaptického přenosu závislé na AMPA receptorech v našich pokusech a z předchozích prací popisujících zesilující účinek inzulinu na inhibiční synaptický přenos vyplývá celkový analgetický efekt. Výsledný výstup inzulinové signalizace na míšní úrovni však stále není objasněn. Modulační vliv inzulinu navíc může být odlišný za normálních fyziologických podmínek a při patologických stavech bolesti, kdy dochází v zadním rohu míšním k plejádě změn podmiňujících centrální senzitivizaci spojenou s hypersenzitivitou. Např. při neuropatiích nebo bolesti spojené s nádorovým bujením dochází v míše k masivní aktivaci gliových buněk (Scholz a Woolf, 2007), zánětlivá bolest je zase doprovázena redistribucí podjednotek AMPA receptorů (Galan et al., 2004; Katano et al., 2008; Larsson a Broman, 2008; Park et al., 2008, 2009). Tyto procesy se podílejí na vzniku centrální senzitivizace, při které může mít modulace synaptického přenosu prostřednictvím inzulinu významnou úlohu.

ZÁVĚR

Modulace synaptického přenosu v superficiální oblasti zadního rohu míšního může významně ovlivňovat nociceptivní signalizaci, zvláště při některých patologických bolestivých stavech. V takových případech se při přenosu na míšních synapsích uplatňuje celá řada známých a také bezpochyby dosud neobjevených mechanismů regulace. Naše výsledky detailněji podhalily některé presynaptické i postsynaptické mechanismy modulace nociceptivní signalizace na míšní úrovni.

TRPV1 receptory lokalizované na centrálních zakončeních neuronů spinálních ganglií byly v našich pokusech aktivovány aplikací endogenního agonisty TRPV1 receptorů OLDA (10 μM). Aktivace TRPV1 receptorů endogenním agonistou zvýšila výlev glutamátu z primárních aferentních vláken a následně frekvenci miniaturních excitačních postsynaptických proudů na míšních neuronech. K významné změně došlo po aktivaci PKC nebo aplikaci mediátoru zánětu bradykininu, kdy již nízká, za kontrolních podmínek neúčinná, koncentrace OLDA (0,2 μM) vedla k výraznému zvýšení frekvence AMPA mEPSC. Podstatné bylo, že aktivace TRPV1 receptorů s následným zvýšením frekvence mEPSC na míšních neuronech byla prokázána při aplikaci nízké koncentrace OLDA na akutní řezy připravené z míchy potkanů s experimentálně vyvolaným periferním zánětem. Možnost aktivace míšních TRPV1 receptorů endogenním agonistou OLDA a její biologický význam byl potvrzen behaviorálními pokusy, kdy intratekální aplikace OLDA vyvolala u testovaných potkanů tepelnou hyperalgezi. Změna citlivosti presynaptických TRPV1 receptorů k endogenním agonistům by se mohla významně podílet na vzniku centrální senzitivace a podmiňovat tak rozvoj patologických bolestivých stavů.

Při centrální senzitivaci může být synaptický přenos včetně excitability neuronů ovlivňován cytokinem TNF α . V našich míšních řezech inkubovaných v TNF α došlo ke zvýšení základní frekvence mEPSC, které bylo pravděpodobně důsledkem zvýšeného výlevu glutamátu z primárních aferentních vláken citlivých ke kapsaicinu. TNF α indukované zvýšení frekvence mEPSC bylo ještě navýšeno akutní aplikací nízké koncentrace OLDA. Tyto výsledky poukazují na kolokalizaci receptorů pro TNF α a TRPV1 receptorů na centrálních zakončeních neuronů spinálních ganglií, která umožňuje zvýšit účinnost endogenního agonisty TRPV1 receptorů po působení TNF α .

Zvýšená produkce TNF α v míše spojovaná např. s neuropatiemi nebo periferním zánětem a zvýšená citlivost TRPV1 receptorů k endogenním agonistům mohou podmiňovat zesílení nociceptivní signalizace na míšní úrovni při patologickém stavu.

Naše další pokusy ukázaly inzulinem stimulovanou depresi excitačních postsynaptických proudů zprostředkovaných AMPA receptory na neuronech v superficiální oblasti zadního rohu míšního v akutním řezu z míchy laboratorní myši. Tato deprese rychlého synaptického přenosu při aplikaci inzulinu byla pravděpodobně zapříčiněna internalizací postsynaptických AMPA receptorů v závislosti na aktivaci protein-tyrozinkinázy. Regulace synaptické účinnosti prostřednictvím inzulinu se může rovněž podílet na modulaci nociceptivního přenosu na míšní úrovni.

Hlubší poznání možností modulace synaptického přenosu nocicepce na míšní úrovni je jedním ze základních předpokladů pro vývoj nových specifických analgetik a hledání nových metod léčby bolesti různého původu.

SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORKY

Podkladem pro tuto dizertační práci jsou níže uvedené publikace, které shrnují výsledky mého výzkumu provedeného na oddělení funkční morfologie ve Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i.

Spicarova, D. and Palecek, J., 2008. The role of spinal cord vanilloid (TRPV1) receptors in pain modulation. *Physiol Res.* 57 Suppl 3, S69-77.

Spicarova, D. and Palecek, J., 2009. The role of the TRPV1 endogenous agonist *N*-Oleoyldopamine in modulation of nociceptive signaling at the spinal cord level. *J Neurophysiol.* 102, 234-243.

Spicarova, D. and Palecek, J., 2010. Modulation of AMPA excitatory postsynaptic currents in the spinal cord dorsal horn neurons by insulin. *Neuroscience.* 166, 305-311.

Spicarova, D. and Palecek, J., 2010. Tumor necrosis factor α sensitizes TRPV1 receptors to the endogenous agonist *N*-oleoyldopamine at the spinal cord level. V recenzním řízení.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Acs, G. and Blumberg, P. M., 1994a. Comparison of [3H]resiniferatoxin binding to spinal cord and dorsal root ganglia of newborn and adult rats. *Life Sci.* 54, 1875-1882.
- Acs, G., Palkovits, M. and Blumberg, P. M., 1994b. Comparison of [3H]resiniferatoxin binding by the vanilloid (capsaicin) receptor in dorsal root ganglia, spinal cord, dorsal vagal complex, sciatic and vagal nerve and urinary bladder of the rat. *Life Sci.* 55, 1017-1026.
- Ahern, G. P., Brooks, I. M., Miyares, R. L. and Wang, X. B., 2005. Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling. *J Neurosci.* 25, 5109-5116.
- Ahern, G. P., Wang, X. and Miyares, R. L., 2006. Polyamines are potent ligands for the capsaicin receptor TRPV1. *J Biol Chem.* 281, 8991-8995.
- Ahmadian, G., Ju, W., Liu, L., Wyszynski, M., Lee, S. H., Dunah, A. W., Taghibiglou, C., Wang, Y., Lu, J., Wong, T. P., Sheng, M. and Wang, Y. T., 2004. Tyrosine phosphorylation of GluR2 is required for insulin-stimulated AMPA receptor endocytosis and LTD. *Embo J.* 23, 1040-1050.
- Albuquerque, C., Lee, C. J., Jackson, A. C. and MacDermott, A. B., 1999. Subpopulations of GABAergic and non-GABAergic rat dorsal horn neurons express Ca²⁺-permeable AMPA receptors. *Eur J Neurosci.* 11, 2758-2766.
- Alexander, S. P., Mathie, A. and Peters, J. A., 2008. *Guide to Receptors and Channels (GRAC)*, 3rd edition. *Br J Pharmacol.* 153 Suppl 2, S1-209.
- Ali, Z., Meyer, R. A. and Campbell, J. N., 1996. Secondary hyperalgesia to mechanical but not heat stimuli following a capsaicin injection in hairy skin. *Pain.* 68, 401-411.
- Baba, H., Ji, R. R., Kohno, T., Moore, K. A., Ataka, T., Wakai, A., Okamoto, M. and Woolf, C. J., 2003. Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. *Mol Cell Neurosci.* 24, 818-830.
- Baccei, M. L., Bardoni, R. and Fitzgerald, M., 2003. Development of nociceptive synaptic inputs to the neonatal rat dorsal horn: glutamate release by capsaicin and menthol. *J Physiol.* 549, 231-242.
- Baiou, D., Santha, P., Avelino, A., Charrua, A., Bacskai, T., Matesz, K., Cruz, F. and Nagy, I., 2007. Neurochemical characterization of insulin receptor-expressing primary sensory neurons in wild-type and vanilloid type 1 transient receptor potential receptor knockout mice. *J Comp Neurol.* 503, 334-347.
- Banks, W. A., 2004. The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol.* 490, 5-12.
- Bartfai, T., 2001. Immunology. Telling the brain about pain. *Nature.* 410, 425, 427.
- Bautista, D. M., Movahed, P., Hinman, A., Axelsson, H. E., Sterner, O., Hogestatt, E. D., Julius, D., Jordt, S. E. and Zygmunt, P. M., 2005. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 12248-12252.
- Beattie, E. C., Carroll, R. C., Yu, X., Morishita, W., Yasuda, H., von Zastrow, M. and Malenka, R. C., 2000. Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat Neurosci.* 3, 1291-1300.
- Beattie, E. C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J. C., Ha, B. K., Von Zastrow, M., Beattie, M. S. and Malenka, R. C., 2002. Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science.* 295, 2282-2285.

- Bernardino, L., Xapelli, S., Silva, A. P., Jakobsen, B., Poulsen, F. R., Oliveira, C. R., Vezzani, A., Malva, J. O. and Zimmer, J., 2005. Modulator effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on AMPA-induced excitotoxicity in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurosci.* 25, 6734-6744.
- Bester, H., Beggs, S. and Woolf, C. J., 2000. Changes in tactile stimuli-induced behavior and c-Fos expression in the superficial dorsal horn and in parabrachial nuclei after sciatic nerve crush. *J Comp Neurol.* 428, 45-61.
- Bitar, M. S., Al-Bustan, M., Nehme, C. L. and Pilcher, C. W., 1996. Antinociceptive action of intrathecally administered IGF-I and the expression of its receptor in rat spinal cord. *Brain Res.* 737, 292-294.
- Burgess, G. M., Mullaney, I., McNeill, M., Dunn, P. M. and Rang, H. P., 1989. Second messengers involved in the mechanism of action of bradykinin in sensory neurons in culture. *J Neurosci.* 9, 3314-3325.
- Burgess, P. R. and Perl, E. R., 1967. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. *J Physiol.* 190, 541-562.
- Caraiscos, V. B., Bonin, R. P., Newell, J. G., Czerwinska, E., Macdonald, J. F. and Orser, B. A., 2007. Insulin increases the potency of glycine at ionotropic glycine receptors. *Mol Pharmacol.* 71, 1277-1287.
- Carlton, S. M. and Coggeshall, R. E., 2001. Peripheral capsaicin receptors increase in the inflamed rat hindpaw: a possible mechanism for peripheral sensitization. *Neurosci Lett.* 310, 53-56.
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y., 1982. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem.* 257, 7847-7851.
- Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., Petersen-Zeit, K. R., Koltzenburg, M., Basbaum, A. I. and Julius, D., 2000. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science.* 288, 306-313.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D. and Julius, D., 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 389, 816-824.
- Cesare, P., Dekker, L. V., Sardini, A., Parker, P. J. and McNaughton, P. A., 1999. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron.* 23, 617-624.
- Cesare, P. and McNaughton, P., 1996. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 15435-15439.
- Chen, L., Chetkovich, D. M., Petralia, R. S., Sweeney, N. T., Kawasaki, Y., Wenthold, R. J., Brecht, D. S. and Nicoll, R. A., 2000. Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature.* 408, 936-943.
- Chiu, S. L., Chen, C. M. and Cline, H. T., 2008. Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo. *Neuron.* 58, 708-719.
- Christoph, T., Gillen, C., Mika, J., Grunweller, A., Schafer, M. K., Schiene, K., Frank, R., Jostock, R., Bahrenberg, G., Weihe, E., Erdmann, V. A. and Kurreck, J., 2007. Antinociceptive effect of antisense oligonucleotides against the vanilloid receptor VR1/TRPV1. *Neurochem Int.* 50, 281-290.
- Chu, C. J., Huang, S. M., De Petrocellis, L., Bisogno, T., Ewing, S. A., Miller, J. D., Zipkin, R. E., Daddario, N., Appendino, G., Di Marzo, V. and Walker, J. M.,

2003. N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J Biol Chem.* 278, 13633-13639.
- Chuang, H. H., Prescott, E. D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S. E., Basbaum, A. I., Chao, M. V. and Julius, D., 2001. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature.* 411, 957-962.
- Coggeshall, R. E. and Carlton, S. M., 1997. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. *Brain Res Brain Res Rev.* 24, 28-66.
- Cortright, D. N. and Szallasi, A., 2004. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update. *Eur J Biochem.* 271, 1814-1819.
- Cui, M., Honore, P., Zhong, C., Gauvin, D., Mikusa, J., Hernandez, G., Chandran, P., Gomtsyan, A., Brown, B., Bayburt, E. K., Marsh, K., Bianchi, B., McDonald, H., Niforatos, W., Neelands, T. R., Moreland, R. B., Decker, M. W., Lee, C. H., Sullivan, J. P. and Faltynek, C. R., 2006. TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *J Neurosci.* 26, 9385-9393.
- Cunha, F. Q. and Ferreira, S. H., 2003. Peripheral hyperalgesic cytokines. *Adv Exp Med Biol.* 521, 22-39.
- Czeschik, J. C., Hagenacker, T., Schafers, M. and Busselberg, D., 2008. TNF- α differentially modulates ion channels of nociceptive neurons. *Neurosci Lett.* 434, 293-298.
- Davis, J. B., Gray, J., Gunthorpe, M. J., Hatcher, J. P., Davey, P. T., Overend, P., Harries, M. H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., Hughes, S. A., Rance, K., Grau, E., Harper, A. J., Pugh, P. L., Rogers, D. C., Bingham, S., Randall, A. and Sheardown, S. A., 2000. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature.* 405, 183-187.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. and Mechoulam, R., 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 258, 1946-1949.
- Devaskar, S. U., Giddings, S. J., Rajakumar, P. A., Carnaghi, L. R., Menon, R. K. and Zahm, D. S., 1994. Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J Biol Chem.* 269, 8445-8454.
- Dittert, I., Benedikt, J., Vyklicky, L., Zimmermann, K., Reeh, P. W. and Vlachova, V., 2006. Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *J Neurosci Methods.* 151, 178-185.
- Docherty, R. J., Yeats, J. C., Bevan, S. and Boddeke, H. W., 1996. Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflugers Arch.* 431, 828-837.
- Doly, S., Fischer, J. and Conrath, M., 2004a. The vanilloid receptor-1 (TRPV1) is expressed in some rat dorsal horn NK1 cells. *Brain Res.* 1004, 203-207.
- Doly, S., Fischer, J., Salio, C. and Conrath, M., 2004b. The vanilloid receptor-1 is expressed in rat spinal dorsal horn astrocytes. *Neurosci Lett.* 357, 123-126.
- DomBourian, M. G., Turner, N. A., Gerovac, T. A., Vemuganti, R., Miranpuri, G. S., Tureyen, K., Satriotomo, I., Miletic, V. and Resnick, D. K., 2006. B1 and TRPV-1 receptor genes and their relationship to hyperalgesia following spinal cord injury. *Spine.* 31, 2778-2782.
- Dostrovsky, J. O. and Craig, A. D., 2005. Wall and Melzack's Textbook of Pain, 5th edition, Churchill Livingstone, 187-193.

- Dubner, R. and Ruda, M. A., 1992. Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends Neurosci.* 15, 96-103.
- Elliott, M. J., Maini, R. N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H. and Woody, J. N., 1994. Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis. *Lancet.* 344, 1125-1127.
- Engelman, H. S., Allen, T. B. and MacDermott, A. B., 1999. The distribution of neurons expressing calcium-permeable AMPA receptors in the superficial laminae of the spinal cord dorsal horn. *J Neurosci.* 19, 2081-2089.
- Fang, L., Wu, J., Lin, Q. and Willis, W. D., 2002. Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II contributes to spinal cord central sensitization. *J Neurosci.* 22, 4196-4204.
- Fang, L., Wu, J., Lin, Q. and Willis, W. D., 2003. Protein kinases regulate the phosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors of spinal cord in rats following noxious stimulation. *Brain Res Mol Brain Res.* 118, 160-165.
- Ferreira, J., da Silva, G. L. and Calixto, J. B., 2004. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. *Br J Pharmacol.* 141, 787-794.
- Ferrini, F., Salio, C., Vergnano, A. M. and Merighi, A., 2007. Vanilloid receptor-1 (TRPV1)-dependent activation of inhibitory neurotransmission in spinal substantia gelatinosa neurons of mouse. *Pain.* 129, 195-209.
- Fitzgerald, M., 1987. Cutaneous primary afferent properties in the hind limb of the neonatal rat. *J Physiol.* 383, 79-92.
- Fitzgerald, M., Butcher, T. and Shortland, P., 1994. Developmental changes in the laminar termination of A fibre cutaneous sensory afferents in the rat spinal cord dorsal horn. *J Comp Neurol.* 348, 225-233.
- Folli, F., Bonfanti, L., Renard, E., Kahn, C. R. and Merighi, A., 1994. Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) distribution in the rat central nervous system. *J Neurosci.* 14, 6412-6422.
- Furuyama, T., Kiyama, H., Sato, K., Park, H. T., Maeno, H., Takagi, H. and Tohyama, M., 1993. Region-specific expression of subunits of ionotropic glutamate receptors (AMPA-type, KA-type and NMDA receptors) in the rat spinal cord with special reference to nociception. *Brain Res Mol Brain Res.* 18, 141-151.
- Galan, A., Laird, J. M. and Cervero, F., 2004. In vivo recruitment by painful stimuli of AMPA receptor subunits to the plasma membrane of spinal cord neurons. *Pain.* 112, 315-323.
- Gamse, R., 1982. Capsaicin and nociception in the rat and mouse. Possible role of substance P. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 320, 205-216.
- Gao, Y. J., Zhang, L., Samad, O. A., Suter, M. R., Yasuhiko, K., Xu, Z. Z., Park, J. Y., Lind, A. L., Ma, Q. and Ji, R. R., 2009. JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. *J Neurosci.* 29, 4096-4108.
- Garrison, C. J., Dougherty, P. M. and Carlton, S. M., 1994. GFAP expression in lumbar spinal cord of naive and neuropathic rats treated with MK-801. *Exp Neurol.* 129, 237-243.
- Gavva, N. R., Bannon, A. W., Hovland, D. N., Jr., Lehto, S. G., Klionsky, L., Surapaneni, S., Immke, D. C., Henley, C., Arik, L., Bak, A., Davis, J., Ernst, N., Hever, G., Kuang, R., Shi, L., Tamir, R., Wang, J., Wang, W., Zajic, G., Zhu, D., Norman, M. H., Louis, J. C., Magal, E. and Treanor, J. J., 2007a. Repeated administration of vanilloid receptor TRPV1 antagonists attenuates hyperthermia

- elicited by TRPV1 blockade. *J Pharmacol Exp Ther.* 323, 128-137.
- Gavva, N. R., Bannon, A. W., Surapaneni, S., Hovland, D. N., Jr., Lehto, S. G., Gore, A., Juan, T., Deng, H., Han, B., Klionsky, L., Kuang, R., Le, A., Tamir, R., Wang, J., Youngblood, B., Zhu, D., Norman, M. H., Magal, E., Treanor, J. J. and Louis, J. C., 2007b. The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J Neurosci.* 27, 3366-3374.
- George, A., Buehl, A. and Sommer, C., 2005. Tumor necrosis factor receptor 1 and 2 proteins are differentially regulated during Wallerian degeneration of mouse sciatic nerve. *Exp Neurol.* 192, 163-166.
- Gunthorpe, M. J. and Chizh, B. A., 2009. Clinical development of TRPV1 antagonists: targeting a pivotal point in the pain pathway. *Drug Discov Today.* 14, 56-67.
- Guo, A., Simone, D. A., Stone, L. S., Fairbanks, C. A., Wang, J. and Elde, R., 2001. Developmental shift of vanilloid receptor 1 (VR1) terminals into deeper regions of the superficial dorsal horn: correlation with a shift from TrkA to Ret expression by dorsal root ganglion neurons. *Eur J Neurosci.* 14, 293-304.
- Guo, A., Vulchanova, L., Wang, J., Li, X. and Elde, R., 1999. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci.* 11, 946-958.
- Hagenacker, T., Czeschik, J. C., Schafers, M. and Busselberg, D., 2010. Sensitization of voltage activated calcium channel currents for capsaicin in nociceptive neurons by tumor-necrosis-factor-alpha. *Brain Res Bull.* 81, 157-163.
- Hartmann, B., Ahmadi, S., Heppenstall, P. A., Lewin, G. R., Schott, C., Borchardt, T., Seeburg, P. H., Zeilhofer, H. U., Sprengel, R. and Kuner, R., 2004. The AMPA receptor subunits GluR-A and GluR-B reciprocally modulate spinal synaptic plasticity and inflammatory pain. *Neuron.* 44, 637-650.
- Havrankova, J., Roth, J. and Brownstein, M., 1978a. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature.* 272, 827-829.
- Havrankova, J., Schmechel, D., Roth, J. and Brownstein, M., 1978b. Identification of insulin in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75, 5737-5741.
- Hensellek, S., Brell, P., Schaible, H. G., Brauer, R. and Segond von Banchet, G., 2007. The cytokine TNFalpha increases the proportion of DRG neurones expressing the TRPV1 receptor via the TNFR1 receptor and ERK activation. *Mol Cell Neurosci.* 36, 381-391.
- Hollmann, M. and Heinemann, S., 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 17, 31-108.
- Holmes, G. M., Hebert, S. L., Rogers, R. C. and Hermann, G. E., 2004. Immunocytochemical localization of TNF type 1 and type 2 receptors in the rat spinal cord. *Brain Res.* 1025, 210-219.
- Honore, P., Rogers, S. D., Schwei, M. J., Salak-Johnson, J. L., Luger, N. M., Sabino, M. C., Clohisy, D. R. and Mantyh, P. W., 2000. Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience.* 98, 585-598.
- Hori, Y., Endo, K. and Takahashi, T., 1996. Long-lasting synaptic facilitation induced by serotonin in superficial dorsal horn neurones of the rat spinal cord. *J Physiol.* 492 (Pt 3), 867-876.
- Horvath, G., Kekesi, G., Nagy, E. and Benedek, G., 2008. The role of TRPV1 receptors in the antinociceptive effect of anandamide at spinal level. *Pain.* 134, 277-284.
- Huang, C. C., Lee, C. C. and Hsu, K. S., 2004. An investigation into signal transduction mechanisms involved in insulin-induced long-term depression in the CA1

- region of the hippocampus. *J Neurochem.* 89, 217-231.
- Huang, S. M., Bisogno, T., Trevisani, M., Al-Hayani, A., De Petrocellis, L., Fezza, F., Tognetto, M., Petros, T. J., Krey, J. F., Chu, C. J., Miller, J. D., Davies, S. N., Geppetti, P., Walker, J. M. and Di Marzo, V., 2002. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 8400-8405.
- Hwang, S. J., Burette, A., Rustioni, A. and Valtschanoff, J. G., 2004. Vanilloid receptor VR1-positive primary afferents are glutamatergic and contact spinal neurons that co-express neurokinin receptor NK1 and glutamate receptors. *J Neurocytol.* 33, 321-329.
- Hwang, S. J., Burette, A. and Valtschanoff, J. G., 2003. VR1-positive primary afferents contact NK1-positive spinoparabrachial neurons. *J Comp Neurol.* 460, 255-265.
- Hwang, S. J. and Valtschanoff, J. G., 2003. Vanilloid receptor VR1-positive afferents are distributed differently at different levels of the rat lumbar spinal cord. *Neurosci Lett.* 349, 41-44.
- Hwang, S. W., Cho, H., Kwak, J., Lee, S. Y., Kang, C. J., Jung, J., Cho, S., Min, K. H., Suh, Y. G., Kim, D. and Oh, U., 2000. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 6155-6160.
- Ikeda, H., Heinke, B., Ruscheweyh, R. and Sandkuhler, J., 2003. Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science.* 299, 1237-1240.
- Ikeda, H., Tsuda, M., Inoue, K. and Murase, K., 2007. Long-term potentiation of neuronal excitation by neuron-glia interactions in the rat spinal dorsal horn. *Eur J Neurosci.* 25, 1297-1306.
- Inglis, J. J., Nissim, A., Lees, D. M., Hunt, S. P., Chernajovsky, Y. and Kidd, B. L., 2005. The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. *Arthritis Res Ther.* 7, R807-816.
- Jakowec, M. W., Fox, A. J., Martin, L. J. and Kalb, R. G., 1995a. Quantitative and qualitative changes in AMPA receptor expression during spinal cord development. *Neuroscience.* 67, 893-907.
- Jakowec, M. W., Yen, L. and Kalb, R. G., 1995b. In situ hybridization analysis of AMPA receptor subunit gene expression in the developing rat spinal cord. *Neuroscience.* 67, 909-920.
- Jancso, G., Kiraly, E. and Jancso-Gabor, A., 1977. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature.* 270, 741-743.
- Jancso, G., Kiraly, E., Such, G., Joo, F. and Nagy, A., 1987. Neurotoxic effect of capsaicin in mammals. *Acta Physiol Hung.* 69, 295-313.
- Jennings, E. and Fitzgerald, M., 1998. Postnatal changes in responses of rat dorsal horn cells to afferent stimulation: a fibre-induced sensitization. *J Physiol.* 509 (Pt 3), 859-868.
- Jennings, E. A., Vaughan, C. W., Roberts, L. A. and Christie, M. J., 2003. The actions of anandamide on rat superficial medullary dorsal horn neurons in vitro. *J Physiol.* 548, 121-129.
- Ji, R. R., Befort, K., Brenner, G. J. and Woolf, C. J., 2002. ERK MAP kinase activation in superficial spinal cord neurons induces prodynorphin and NK-1 upregulation and contributes to persistent inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci.* 22, 478-485.

- Ji, R. R., Kohno, T., Moore, K. A. and Woolf, C. J., 2003. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci.* 26, 696-705.
- Jin, X. and Gereau, R. W. t., 2006. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci.* 26, 246-255.
- Julius, D. and Basbaum, A. I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 413, 203-210.
- Kanai, Y., Hara, T., Imai, A. and Sakakibara, A., 2007. Differential involvement of TRPV1 receptors at the central and peripheral nerves in CFA-induced mechanical and thermal hyperalgesia. *J Pharm Pharmacol.* 59, 733-738.
- Kanai, Y., Nakazato, E., Fujiuchi, A., Hara, T. and Imai, A., 2005. Involvement of an increased spinal TRPV1 sensitization through its up-regulation in mechanical allodynia of CCI rats. *Neuropharmacology.* 49, 977-984.
- Kangrga, I. and Randic, M., 1990. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide enhance release of endogenous glutamate and aspartate from the rat spinal dorsal horn slice. *J Neurosci.* 10, 2026-2038.
- Karai, L., Brown, D. C., Mannes, A. J., Connelly, S. T., Brown, J., Gandal, M., Wellisch, O. M., Neubert, J. K., Olah, Z. and Iadarola, M. J., 2004. Deletion of vanilloid receptor 1-expressing primary afferent neurons for pain control. *J Clin Invest.* 113, 1344-1352.
- Katano, T., Furue, H., Okuda-Ashitaka, E., Tagaya, M., Watanabe, M., Yoshimura, M. and Ito, S., 2008. N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) is involved in central sensitization in the spinal cord through GluR2 subunit composition switch after inflammation. *Eur J Neurosci.* 27, 3161-3170.
- Kawasaki, Y., Zhang, L., Cheng, J. K. and Ji, R. R., 2008. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci.* 28, 5189-5194.
- Kerr, R. C., Maxwell, D. J. and Todd, A. J., 1998. GluR1 and GluR2/3 subunits of the AMPA-type glutamate receptor are associated with particular types of neurone in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat. *Eur J Neurosci.* 10, 324-333.
- Kessels, H. W. and Malinow, R., 2009. Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron.* 61, 340-350.
- Khan, A. A., Diogenes, A., Jeske, N. A., Henry, M. A., Akopian, A. and Hargreaves, K. M., 2008. Tumor necrosis factor alpha enhances the sensitivity of rat trigeminal neurons to capsaicin. *Neuroscience.* 155, 503-509.
- Kim, J., Chung, Y. D., Park, D. Y., Choi, S., Shin, D. W., Soh, H., Lee, H. W., Son, W., Yim, J., Park, C. S., Kernan, M. J. and Kim, C., 2003. A TRPV family ion channel required for hearing in *Drosophila*. *Nature.* 424, 81-84.
- Knotkova, H., Pappagallo, M. and Szallasi, A., 2008. Capsaicin (TRPV1 Agonist) Therapy for Pain Relief: Farewell or Revival? *Clin J Pain.* 24, 142-154.
- Kohno, T., Moore, K. A., Baba, H. and Woolf, C. J., 2003. Peripheral nerve injury alters excitatory synaptic transmission in lamina II of the rat dorsal horn. *J Physiol.* 548, 131-138.
- Kohno, T., Wang, H., Amaya, F., Brenner, G. J., Cheng, J. K., Ji, R. R. and Woolf, C. J., 2008. Bradykinin enhances AMPA and NMDA receptor activity in spinal cord dorsal horn neurons by activating multiple kinases to produce pain hypersensitivity. *J Neurosci.* 28, 4533-4540.

- Koltzenburg, M., Wahren, L. K., Torebjork, H. E., 1992. Dynamic changes of mechanical hyperalgesia in neuropathic pain states and healthy subjects depend on the ongoing activity of unmyelinated nociceptive afferents. *Pflugers Archiv* 420:R52.
- Koplas, P. A., Rosenberg, R. L. and Oxford, G. S., 1997. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci.* 17, 3525-3537.
- Kusudo, K., Ikeda, H. and Murase, K., 2006. Depression of presynaptic excitation by the activation of vanilloid receptor 1 in the rat spinal dorsal horn revealed by optical imaging. *Mol Pain.* 2, 8.
- Labrakakis, C. and MacDermott, A. B., 2003. Neurokinin receptor 1-expressing spinal cord neurons in lamina I and III/IV of postnatal rats receive inputs from capsaicin sensitive fibers. *Neurosci Lett.* 352, 121-124.
- Lappin, S. C., Randall, A. D., Gunthorpe, M. J. and Morisset, V., 2006. TRPV1 antagonist, SB-366791, inhibits glutamatergic synaptic transmission in rat spinal dorsal horn following peripheral inflammation. *Eur J Pharmacol.* 540, 73-81.
- Larsson, M. and Broman, J., 2008. Translocation of GluR1-containing AMPA receptors to a spinal nociceptive synapse during acute noxious stimulation. *J Neurosci.* 28, 7084-7090.
- Levine, J. D. and Alessandri-Haber, N., 2007. TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochim Biophys Acta.* 1772, 989-1003.
- Li, J., Xie, W., Zhang, J. M. and Baccei, M. L., 2009. Peripheral nerve injury sensitizes neonatal dorsal horn neurons to tumor necrosis factor-alpha. *Mol Pain.* 5, 10.
- Li, Y., Ji, A., Weihe, E. and Schafer, M. K., 2004. Cell-specific expression and lipopolysaccharide-induced regulation of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) and TNF receptors in rat dorsal root ganglion. *J Neurosci.* 24, 9623-9631.
- Lin, J. W., Ju, W., Foster, K., Lee, S. H., Ahmadian, G., Wyszynski, M., Wang, Y. T. and Sheng, M., 2000. Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization. *Nat Neurosci.* 3, 1282-1290.
- Liu, B., Zhang, C. and Qin, F., 2005. Functional recovery from desensitization of vanilloid receptor TRPV1 requires resynthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci.* 25, 4835-4843.
- Liu, L., Brown, J. C., 3rd, Webster, W. W., Morrisett, R. A. and Monaghan, D. T., 1995. Insulin potentiates N-methyl-D-aspartate receptor activity in *Xenopus* oocytes and rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 192, 5-8.
- Lou, X., Scheuss, V. and Schneggenburger, R., 2005. Allosteric modulation of the presynaptic Ca²⁺ sensor for vesicle fusion. *Nature.* 435, 497-501.
- Lumpkin, E. A. and Caterina, M. J., 2007. Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature.* 445, 858-865.
- Luo, H., Cheng, J., Han, J. S. and Wan, Y., 2004. Change of vanilloid receptor 1 expression in dorsal root ganglion and spinal dorsal horn during inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant in rats. *Neuroreport.* 15, 655-658.
- Luo, H., Xu, I. S., Chen, Y., Yang, F., Yu, L., Li, G. X., Liu, F. Y., Xing, G. G., Shi, Y. S., Li, T., Han, J. S. and Wan, Y., 2008. Behavioral and electrophysiological evidence for the differential functions of TRPV1 at early and late stages of chronic inflammatory nociception in rats. *Neurochem Res.* 33, 2151-2158.
- Malenka, R. C. and Nicoll, R. A., 1999. Long-term potentiation--a decade of progress?

- Science. 285, 1870-1874.
- Man, H. Y., Lin, J. W., Ju, W. H., Ahmadian, G., Liu, L., Becker, L. E., Sheng, M. and Wang, Y. T., 2000. Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron*. 25, 649-662.
- Mantyh, P. W., Rogers, S. D., Honore, P., Allen, B. J., Ghilardi, J. R., Li, J., Daughters, R. S., Lappi, D. A., Wiley, R. G. and Simone, D. A., 1997. Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science*. 278, 275-279.
- Matta, J. A. and Ahern, G. P., 2007. Voltage is a partial activator of rat thermosensitive TRP channels. *J Physiol*. 585, 469-482.
- Matta, J. A., Miyares, R. L. and Ahern, G. P., 2007. TRPV1 is a novel target for omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Physiol*. 578, 397-411.
- McGarrahty, S., Chu, K. L., Brown, B. S., Zhu, C. Z., Zhong, C., Joshi, S. K., Honore, P., Faltynek, C. R. and Jarvis, M. F., 2008. Contributions of central and peripheral TRPV1 receptors to mechanically evoked and spontaneous firing of spinal neurons in inflamed rats. *J Neurophysiol*. 100, 3158-3166.
- McMahon, S. and Koltzenburg, M., 2005. *Wall and Melzack's Textbook of Pain*, 5th edition, Churchill Livingstone.
- Mendell, L. M., 1984. Modifiability of spinal synapses. *Physiol Rev*. 64, 260-324.
- Mendell, L. M. and Wall, P. D., 1965. Responses of Single Dorsal Cord Cells to Peripheral Cutaneous Unmyelinated Fibres. *Nature*. 206, 97-99.
- Mezey, E., Toth, Z. E., Cortright, D. N., Arzubi, M. K., Krause, J. E., Elde, R., Guo, A., Blumberg, P. M. and Szallasi, A., 2000. 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 U S A*. 97, 3655-3660.
- Millan, M. J., 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*. 57, 1-164.
- Moore, K. A., Kohno, T., Karchewski, L. A., Scholz, J., Baba, H. and Woolf, C. J., 2002. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci*. 22, 6724-6731.
- Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Garcia-Sanz, N. and Ferrer-Montiel, A., 2004. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J Biol Chem*. 279, 25665-25672.
- Morisset, V. and Urban, L., 2001. Cannabinoid-induced presynaptic inhibition of glutamatergic EPSCs in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord. *J Neurophysiol*. 86, 40-48.
- Mousseau, D. D., Sun, X. and Larson, A. A., 1994. An antinociceptive effect of capsaicin in the adult mouse mediated by the NH₂-terminus of substance P. *J Pharmacol Exp Ther*. 268, 785-790.
- Myers, M. G., Jr., Sun, X. J., Cheatham, B., Jachna, B. R., Glasheen, E. M., Backer, J. M. and White, M. F., 1993. IRS-1 is a common element in insulin and insulin-like growth factor-I signaling to the phosphatidylinositol 3'-kinase. *Endocrinology*. 132, 1421-1430.
- Nagy, G. G., Al-Ayyan, M., Andrew, D., Fukaya, M., Watanabe, M. and Todd, A. J., 2004. Widespread expression of the AMPA receptor GluR2 subunit at glutamatergic synapses in the rat spinal cord and phosphorylation of GluR1 in response to noxious stimulation revealed with an antigen-unmasking method. *J*

- Neurosci. 24, 5766-5777.
- Nagy, J. I., Iversen, L. L., Goedert, M., Chapman, D. and Hunt, S. P., 1983. Dose-dependent effects of capsaicin on primary sensory neurons in the neonatal rat. *J Neurosci.* 3, 399-406.
- Nakatsuka, T., Furue, H., Yoshimura, M. and Gu, J. G., 2002. Activation of central terminal vanilloid receptor-1 receptors and alpha beta-methylene-ATP-sensitive P2X receptors reveals a converged synaptic activity onto the deep dorsal horn neurons of the spinal cord. *J Neurosci.* 22, 1228-1237.
- Nicol, G. D., Lopshire, J. C. and Pafford, C. M., 1997. Tumor necrosis factor enhances the capsaicin sensitivity of rat sensory neurons. *J Neurosci.* 17, 975-982.
- Nilius, B., Talavera, K., Owsianik, G., Prenen, J., Droogmans, G. and Voets, T., 2005. Gating of TRP channels: a voltage connection? *J Physiol.* 567, 35-44.
- Novakova-Tousova, K., Vyklicky, L., Susankova, K., Benedikt, J., Samad, A., Teisinger, J. and Vlachova, V., 2007. Functional changes in the vanilloid receptor subtype 1 channel during and after acute desensitization. *Neuroscience.* 149, 144-154.
- Numazaki, M. and Tominaga, M., 2004. Nociception and TRP Channels. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 3, 479-485.
- Numazaki, M., Tominaga, T., Takeuchi, K., Murayama, N., Toyooka, H. and Tominaga, M., 2003. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 8002-8006.
- Numazaki, M., Tominaga, T., Toyooka, H. and Tominaga, M., 2002. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *J Biol Chem.* 277, 13375-13378.
- Obreja, O., Schmelz, M., Poole, S. and Kress, M., 2002. Interleukin-6 in combination with its soluble IL-6 receptor sensitises rat skin nociceptors to heat, in vivo. *Pain.* 96, 57-62.
- Ohtori, S., Takahashi, K., Moriya, H. and Myers, R. R., 2004. TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord. *Spine (Phila Pa 1976).* 29, 1082-1088.
- Oka, T., Oka, K., Hosoi, M. and Hori, T., 1995. Intracerebroventricular injection of interleukin-6 induces thermal hyperalgesia in rats. *Brain Res.* 692, 123-128.
- Oka, T., Wakugawa, Y., Hosoi, M., Oka, K. and Hori, T., 1996. Intracerebroventricular injection of tumor necrosis factor-alpha induces thermal hyperalgesia in rats. *Neuroimmunomodulation.* 3, 135-140.
- Olah, Z., Szabo, T., Karai, L., Hough, C., Fields, R. D., Caudle, R. M., Blumberg, P. M. and Iadarola, M. J., 2001. Ligand-induced dynamic membrane changes and cell deletion conferred by vanilloid receptor 1. *J Biol Chem.* 276, 11021-11030.
- Oprea, A. and Kress, M., 2000. Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *J Neurosci.* 20, 6289-6293.
- Palecek, J., Paleckova, V., Dougherty, P. M. and Willis, W. D., 1994. The effect of phorbol esters on the responses of primate spinothalamic neurons to mechanical and thermal stimuli. *J Neurophysiol.* 71, 529-537.
- Palecek, J., Paleckova, V. and Willis, W. D., 1999a. The effect of phorbol esters on spinal cord amino acid concentrations and responsiveness of rats to mechanical and thermal stimuli. *Pain.* 80, 597-605.
- Palecek, J. I., Abdrachmanova, G., Vlachova, V. and Vyklick, L., Jr., 1999b. Properties

- of NMDA receptors in rat spinal cord motoneurons. *Eur J Neurosci.* 11, 827-836.
- Park, J. S., Voitenko, N., Petralia, R. S., Guan, X., Xu, J. T., Steinberg, J. P., Takamiya, K., Sotnik, A., Kopach, O., Hukanir, R. L. and Tao, Y. X., 2009. Persistent inflammation induces GluR2 internalization via NMDA receptor-triggered PKC activation in dorsal horn neurons. *J Neurosci.* 29, 3206-3219.
- Park, J. S., Yaster, M., Guan, X., Xu, J. T., Shih, M. H., Guan, Y., Raja, S. N. and Tao, Y. X., 2008. Role of spinal cord alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors in complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain. *Mol Pain.* 4, 67.
- Patapoutian, A., Tate, S. and Woolf, C. J., 2009. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov.* 8, 55-68.
- Pellegrini-Giampietro, D. E., Fan, S., Ault, B., Miller, B. E. and Zukin, R. S., 1994. Glutamate receptor gene expression in spinal cord of arthritic rats. *J Neurosci.* 14, 1576-1583.
- Pingle, S. C., Matta, J. A. and Ahern, G. P., 2007. Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. *Handb Exp Pharmacol.* 155-171.
- Pollock, J., McFarlane, S. M., Connell, M. C., Zehavi, U., Vandenabeele, P., MacEwan, D. J. and Scott, R. H., 2002. TNF-alpha receptors simultaneously activate Ca²⁺ mobilisation and stress kinases in cultured sensory neurones. *Neuropharmacology.* 42, 93-106.
- Popratiloff, A., Weinberg, R. J. and Rustioni, A., 1996. AMPA receptor subunits underlying terminals of fine-caliber primary afferent fibers. *J Neurosci.* 16, 3363-3372.
- Pospisilova, E. and Palecek, J., 2006. Post-operative pain behavior in rats is reduced after single high-concentration capsaicin application. *Pain.* 125, 233-243.
- Postlethwaite, M., Hennig, M. H., Steinert, J. R., Graham, B. P. and Forsythe, I. D., 2007. Acceleration of AMPA receptor kinetics underlies temperature-dependent changes in synaptic strength at the rat calyx of Held. *J Physiol.* 579, 69-84.
- Premkumar, L. S. and Ahern, G. P., 2000. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature.* 408, 985-990.
- Premkumar, L. S., Qi, Z. H., Van Buren, J. and Raisinghani, M., 2004. Enhancement of potency and efficacy of NADA by PKC-mediated phosphorylation of vanilloid receptor. *J Neurophysiol.* 91, 1442-1449.
- Price, D. D., 1988. Psychological and neural mechanisms of pain. Raven Press, New York.
- Pyott, S. J. and Rosenmund, C., 2002. The effects of temperature on vesicular supply and release in autaptic cultures of rat and mouse hippocampal neurons. *J Physiol.* 539, 523-535.
- Raghavendra, V., Tanga, F. Y. and DeLeo, J. A., 2004. Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *Eur J Neurosci.* 20, 467-473.
- Randic, M., Jiang, M. C. and Cerne, R., 1993. Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. *J Neurosci.* 13, 5228-5241.
- Rathee, P. K., Distler, C., Obreja, O., Neuhuber, W., Wang, G. K., Wang, S. Y., Nau, C. and Kress, M., 2002. PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *J Neurosci.* 22, 4740-4745.
- Rexed, B., 1952. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J*

- Comp Neurol. 96, 414-495.
- Rhee, J. S., Betz, A., Pyott, S., Reim, K., Varoquaux, F., Augustin, I., Hesse, D., Sudhof, T. C., Takahashi, M., Rosenmund, C. and Brose, N., 2002. Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs. *Cell*. 108, 121-133.
- Rogers, R. C., Van Meter, M. J. and Hermann, G. E., 2006. Tumor necrosis factor potentiates central vagal afferent signaling by modulating ryanodine channels. *J Neurosci*. 26, 12642-12646.
- Romanovsky, A. A., Almeida, M. C., Garami, A., Steiner, A. A., Norman, M. H., Morrison, S. F., Nakamura, K., Burmeister, J. J. and Nucci, T. B., 2009. The transient receptor potential vanilloid-1 channel in thermoregulation: a thermosensor it is not. *Pharmacol Rev*. 61, 228-261.
- Rosenfeld, R. G., Ceda, G., Cutler, C. W., Dollar, L. A. and Hoffman, A. R., 1985. Insulin and insulin-like growth factor (somatomedin) receptors on cloned rat pituitary tumor cells. *Endocrinology*. 117, 2008-2016.
- Saltiel, A. R. and Kahn, C. R., 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414, 799-806.
- Samad, T. A., Moore, K. A., Sapirstein, A., Billet, S., Allchorne, A., Poole, S., Bonventre, J. V. and Woolf, C. J., 2001. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature*. 410, 471-475.
- Samad, T. A., Sapirstein, A. and Woolf, C. J., 2002. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. *Trends Mol Med*. 8, 390-396.
- Sandkuhler, J., 2009. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev*. 89, 707-758.
- Saria, A., Gamse, R., Petermann, J., Fischer, J. A., Theodorsson-Norheim, E. and Lundberg, J. M., 1986. Simultaneous release of several tachykinins and calcitonin gene-related peptide from rat spinal cord slices. *Neurosci Lett*. 63, 310-314.
- Sasaki, M., Tohda, C. and Kuraishi, Y., 1998. Region-specific increase in glutamate release from dorsal horn of rats with adjuvant inflammation. *Neuroreport*. 9, 3219-3222.
- Sathianathan, V., Avelino, A., Charrua, A., Santha, P., Matesz, K., Cruz, F. and Nagy, I., 2003. Insulin induces cobalt uptake in a subpopulation of rat cultured primary sensory neurons. *Eur J Neurosci*. 18, 2477-2486.
- Shafer, D. M., Assael, L., White, L. B. and Rossomando, E. F., 1994. Tumor necrosis factor-alpha as a biochemical marker of pain and outcome in temporomandibular joints with internal derangements. *J Oral Maxillofac Surg*. 52, 786-791; discussion 791-782.
- Sherrington, C. S., 1906. *The integrative action of the nervous system*. Scribner, New York.
- Shin, J., Cho, H., Hwang, S. W., Jung, J., Shin, C. Y., Lee, S. Y., Kim, S. H., Lee, M. G., Choi, Y. H., Kim, J., Haber, N. A., Reichling, D. B., Khasar, S., Levine, J. D. and Oh, U., 2002. Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 10150-10155.
- Shubayev, V. I. and Myers, R. R., 2001. Axonal transport of TNF-alpha in painful neuropathy: distribution of ligand tracer and TNF receptors. *J Neuroimmunol*. 114, 48-56.
- Schafers, M., Geis, C., Svensson, C. I., Luo, Z. D. and Sommer, C., 2003a. Selective increase of tumour necrosis factor-alpha in injured and spared myelinated

- primary afferents after chronic constrictive injury of rat sciatic nerve. *Eur J Neurosci.* 17, 791-804.
- Schafers, M., Sorkin, L. S., Geis, C. and Shubayev, V. I., 2003b. Spinal nerve ligation induces transient upregulation of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in injured and adjacent uninjured dorsal root ganglia in the rat. *Neurosci Lett.* 347, 179-182.
- Scholz, J., Broom, D. C., Youn, D. H., Mills, C. D., Kohno, T., Suter, M. R., Moore, K. A., Decosterd, I., Coggeshall, R. E. and Woolf, C. J., 2005. Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci.* 25, 7317-7323.
- Scholz, J. and Woolf, C. J., 2007. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci.* 10, 1361-1368.
- Siemens, J., Zhou, S., Piskrowski, R., Nikai, T., Lumpkin, E. A., Basbaum, A. I., King, D. and Julius, D., 2006. Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature.* 444, 208-212.
- Sikand, P. and Premkumar, L. S., 2007. Potentiation of glutamatergic synaptic transmission by protein kinase C-mediated sensitization of TRPV1 at the first sensory synapse. *J Physiol.* 581, 631-647.
- Silverman, J. D. and Kruger, L., 1990. Selective neuronal glycoconjugate expression in sensory and autonomic ganglia: relation of lectin reactivity to peptide and enzyme markers. *J Neurocytol.* 19, 789-801.
- Simone, D. A., Baumann, T. K., Collins, J. G. and LaMotte, R. H., 1989a. Sensitization of cat dorsal horn neurons to innocuous mechanical stimulation after intradermal injection of capsaicin. *Brain Res.* 486, 185-189.
- Simone, D. A., Baumann, T. K. and LaMotte, R. H., 1989b. Dose-dependent pain and mechanical hyperalgesia in humans after intradermal injection of capsaicin. *Pain.* 38, 99-107.
- Simone, D. A., Nolano, M., Johnson, T., Wendelschafer-Crabb, G. and Kennedy, W. R., 1998. Intradermal injection of capsaicin in humans produces degeneration and subsequent reinnervation of epidermal nerve fibers: correlation with sensory function. *J Neurosci.* 18, 8947-8959.
- Simone, D. A., Sorkin, L. S., Oh, U., Chung, J. M., Owens, C., LaMotte, R. H. and Willis, W. D., 1991. Neurogenic hyperalgesia: central neural correlates in responses of spinothalamic tract neurons. *J Neurophysiol.* 66, 228-246.
- Snider, W. D. and McMahon, S. B., 1998. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron.* 20, 629-632.
- Sommer, C., Schmidt, C. and George, A., 1998. Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. *Exp Neurol.* 151, 138-142.
- Song, I. and Huganir, R. L., 2002. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 25, 578-588.
- Sorkin, L. S., Xiao, W. H., Wagner, R. and Myers, R. R., 1997. Tumour necrosis factor-alpha induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. *Neuroscience.* 81, 255-262.
- Spicarova, D. and Palecek, J., 2010. Modulation of AMPA excitatory postsynaptic currents in the spinal cord dorsal horn neurons by insulin. *Neuroscience.* 166, 305-311.
- Spicarova, D. and Palecek, J., 2008. The role of spinal cord vanilloid (TRPV1) receptors in pain modulation. *Physiol Res.* 57 Suppl 3, S69-77.
- Spicarova, D. and Palecek, J., 2009. The role of the TRPV1 endogenous agonist N-

- Oleoyletydopamine in modulation of nociceptive signaling at the spinal cord level. *J Neurophysiol.* 102, 234-243.
- Starowicz, K., Nigam, S. and Di Marzo, V., 2007. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther.* 114, 13-33.
- Steiner, A. A., Turek, V. F., Almeida, M. C., Burmeister, J. J., Oliveira, D. L., Roberts, J. L., Bannon, A. W., Norman, M. H., Louis, J. C., Treanor, J. J., Gavva, N. R. and Romanovsky, A. A., 2007. Nonthermal activation of transient receptor potential vanilloid-1 channels in abdominal viscera tonically inhibits autonomic cold-defense effectors. *J Neurosci.* 27, 7459-7468.
- Stellwagen, D. and Malenka, R. C., 2006. Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature.* 440, 1054-1059.
- Stockhorst, U., de Fries, D., Steingrueber, H. J. and Scherbaum, W. A., 2004. Insulin and the CNS: effects on food intake, memory, and endocrine parameters and the role of intranasal insulin administration in humans. *Physiol Behav.* 83, 47-54.
- Sugimoto, K., Murakawa, Y. and Sima, A. A., 2002. Expression and localization of insulin receptor in rat dorsal root ganglion and spinal cord. *J Peripher Nerv Syst.* 7, 44-53.
- Sugiura, T., Tominaga, M., Katsuya, H. and Mizumura, K., 2002. Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J Neurophysiol.* 88, 544-548.
- Szallasi, A., 1994. The vanilloid (capsaicin) receptor: receptor types and species differences. *Gen Pharmacol.* 25, 223-243.
- Szallasi, A., Cortright, D. N., Blum, C. A. and Eid, S. R., 2007. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov.* 6, 357-372.
- Szallasi, A., Cruz, F. and Geppetti, P., 2006. TRPV1: a therapeutic target for novel analgesic drugs? *Trends Mol Med.* 12, 545-554.
- Szallasi, A., Nilsson, S., Farkas-Szallasi, T., Blumberg, P. M., Hokfelt, T. and Lundberg, J. M., 1995. 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.
- Szolcsanyi, J., Sandor, Z., Petho, G., Varga, A., Bolcskei, K., Almasi, R., Riedl, Z., Hajos, G. and Czeh, G., 2004. Direct evidence for activation and desensitization of the capsaicin receptor by N-oleoyletydopamine on TRPV1-transfected cell, line in gene deleted mice and in the rat. *Neurosci Lett.* 361, 155-158.
- Szolcsanyi, J., Szallasi, A., Szallasi, Z., Joo, F. and Blumberg, P. M., 1990. Resiniferatoxin: an ultrapotent selective modulator of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 255, 923-928.
- Tang, H. B., Inoue, A., Oshita, K. and Nakata, Y., 2004. Sensitization of vanilloid receptor 1 induced by bradykinin via the activation of second messenger signaling cascades in rat primary afferent neurons. *Eur J Pharmacol.* 498, 37-43.
- Thompson, S. W., King, A. E. and Woolf, C. J., 1990. Activity-Dependent Changes in Rat Ventral Horn Neurons in vitro; Summation of Prolonged Afferent Evoked Postsynaptic Depolarizations Produce a d-2-Amino-5-Phosphonovaleric Acid Sensitive Windup. *Eur J Neurosci.* 2, 638-649.
- Thompson, S. W., Woolf, C. J. and Sivilotti, L. G., 1993. Small-caliber afferent inputs produce a heterosynaptic facilitation of the synaptic responses evoked by primary afferent A-fibers in the neonatal rat spinal cord in vitro. *J Neurophysiol.* 69, 2116-2128.

- Todd, A. J., 2002. Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor. *Exp Physiol.* 87, 245-249.
- Todd, A. J. and Spike, R. C., 1993. The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. *Prog Neurobiol.* 41, 609-645.
- Tognetto, M., Amadesi, S., Harrison, S., Creminon, C., Trevisani, M., Carreras, M., Matera, M., Geppetti, P. and Bianchi, A., 2001. Anandamide excites central terminals of dorsal root ganglion neurons via vanilloid receptor-1 activation. *J Neurosci.* 21, 1104-1109.
- Tohda, C., Sasaki, M., Konemura, T., Sasamura, T., Itoh, M. and Kuraishi, Y., 2001. Axonal transport of VR1 capsaicin receptor mRNA in primary afferents and its participation in inflammation-induced increase in capsaicin sensitivity. *J Neurochem.* 76, 1628-1635.
- Tolle, T. R., Berthele, A., Zieglgansberger, W., Seeburg, P. H. and Wisden, W., 1993. The differential expression of 16 NMDA and non-NMDA receptor subunits in the rat spinal cord and in periaqueductal gray. *J Neurosci.* 13, 5009-5028.
- Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B. E., Basbaum, A. I. and Julius, D., 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron.* 21, 531-543.
- Tousova, K., Vyklicky, L., Susankova, K., Benedikt, J. and Vlachova, V., 2005. Gadolinium activates and sensitizes the vanilloid receptor TRPV1 through the external protonation sites. *Mol Cell Neurosci.* 30, 207-217.
- Towers, S., Princivalle, A., Billinton, A., Edmunds, M., Bettler, B., Urban, L., Castro-Lopes, J. and Bowery, N. G., 2000. GABAB receptor protein and mRNA distribution in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci.* 12, 3201-3210.
- Trevisani, M., Smart, D., Gunthorpe, M. J., Tognetto, M., Barbieri, M., Campi, B., Amadesi, S., Gray, J., Jerman, J. C., Brough, S. J., Owen, D., Smith, G. D., Randall, A. D., Harrison, S., Bianchi, A., Davis, J. B. and Geppetti, P., 2002. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. *Nat Neurosci.* 5, 546-551.
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M. W. and Inoue, K., 2003. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature.* 424, 778-783.
- Ueda, M., Kuraishi, Y. and Satoh, M., 1993. Detection of capsaicin-evoked release of glutamate from spinal dorsal horn slices of rat with on-line monitoring system. *Neurosci Lett.* 155, 179-182.
- Ueda, M., Kuraishi, Y., Sugimoto, K. and Satoh, M., 1994. Evidence that glutamate is released from capsaicin-sensitive primary afferent fibers in rats: study with on-line continuous monitoring of glutamate. *Neurosci Res.* 20, 231-237.
- Valtschanoff, J. G., Rustioni, A., Guo, A. and Hwang, S. J., 2001. Vanilloid receptor VR1 is both presynaptic and postsynaptic in the superficial laminae of the rat dorsal horn. *J Comp Neurol.* 436, 225-235.
- Van Buren, J. J., Bhat, S., Rotello, R., Pauza, M. E. and Premkumar, L. S., 2005. Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-I. *Mol Pain.* 1, 17.
- Vellani, V., Mapplebeck, S., Moriondo, A., Davis, J. B. and McNaughton, P. A., 2001. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol.* 534, 813-825.
- Vellani, V., Petrosino, S., De Petrocellis, L., Valenti, M., Prandini, M., Magherini, P.

- C., McNaughton, P. A. and Di Marzo, V., 2008. Functional lipidomics. Calcium-independent activation of endocannabinoid/endovanilloid lipid signalling in sensory neurons by protein kinases C and A and thrombin. *Neuropharmacology*.
- Venkatachalam, K. and Montell, C., 2007. TRP channels. *Annu Rev Biochem.* 76, 387-417.
- Vennekens, R., Owsianik, G. and Nilius, B., 2008. Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview. *Curr Pharm Des.* 14, 18-31.
- Vikman, K. S., Rycroft, B. K. and Christie, M. J., 2008. Switch to Ca²⁺-permeable AMPA and reduced NR2B NMDA receptor-mediated neurotransmission at dorsal horn nociceptive synapses during inflammatory pain in the rat. *J Physiol.* 586, 515-527.
- Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V. and Nilius, B., 2004. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature.* 430, 748-754.
- Vyklicky, L., Knotkova-Urbancova, H., Vitaskova, Z., Vlachova, V., Kress, M. and Reeh, P. W., 1998. Inflammatory mediators at acidic pH activate capsaicin receptors in cultured sensory neurons from newborn rats. *J Neurophysiol.* 79, 670-676.
- Vyklicky, L., Novakova-Tousova, K., Benedikt, J., Samad, A., Touska, F. and Vlachova, V., 2008. Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: a mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin. *Physiol Res.* 57 Suppl 3, S59-68.
- Wan, Q., Xiong, Z. G., Man, H. Y., Ackerley, C. A., Braunton, J., Lu, W. Y., Becker, L. E., MacDonald, J. F. and Wang, Y. T., 1997. Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature.* 388, 686-690.
- Wang, H., Kohno, T., Amaya, F., Brenner, G. J., Ito, N., Allchorne, A., Ji, R. R. and Woolf, C. J., 2005a. Bradykinin produces pain hypersensitivity by potentiating spinal cord glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci.* 25, 7986-7992.
- Wang, J. Q., Arora, A., Yang, L., Parelkar, N. K., Zhang, G., Liu, X., Choe, E. S. and Mao, L., 2005b. Phosphorylation of AMPA receptors: mechanisms and synaptic plasticity. *Mol Neurobiol.* 32, 237-249.
- Wang, Y. T. and Linden, D. J., 2000. Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis. *Neuron.* 25, 635-647.
- Watkins, L. R. and Maier, S. F., 2003. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nat Rev Drug Discov.* 2, 973-985.
- Watkins, L. R., Milligan, E. D. and Maier, S. F., 2001. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci.* 24, 450-455.
- Wei, F. and Zhao, Z. Q., 1996. Blockade of capsaicin-induced reduction of GABA-immunoreactivity by spantide in cat spinal superficial dorsal horn. *Neuroscience.* 71, 277-283.
- Weil, A., Moore, S. E., Waite, N. J., Randall, A. and Gunthorpe, M. J., 2005. Conservation of functional and pharmacological properties in the distantly related temperature sensors TRPV1 and TRPM8. *Mol Pharmacol.* 68, 518-527.
- Willis, W. D., Jr., 1985. Pain pathways in the primate. *Prog Clin Biol Res.* 176, 117-133.
- Willis, W. D., 2001. Role of neurotransmitters in sensitization of pain responses. *Ann N Y Acad Sci.* 933, 142-156.
- Willis, W. D., Jr., 2009. The role of TRPV1 receptors in pain evoked by noxious thermal and chemical stimuli. *Exp Brain Res.* 196, 5-11.

- Wilson-Gerwing, T. D., Dmyterko, M. V., Zochodne, D. W., Johnston, J. M. and Verge, V. M., 2005. Neurotrophin-3 suppresses thermal hyperalgesia associated with neuropathic pain and attenuates transient receptor potential vanilloid receptor-1 expression in adult sensory neurons. *J Neurosci.* 25, 758-767.
- Winkelstein, B. A., Rutkowski, M. D., Sweitzer, S. M., Pahl, J. L. and DeLeo, J. A., 2001. Nerve injury proximal or distal to the DRG induces similar spinal glial activation and selective cytokine expression but differential behavioral responses to pharmacologic treatment. *J Comp Neurol.* 439, 127-139.
- Woolf, C. J., 1983. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature.* 306, 686-688.
- Woolf, C. J., Allchorne, A., Safieh-Garabedian, B. and Poole, S., 1997. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. *Br J Pharmacol.* 121, 417-424.
- Woolf, C. J. and Costigan, M., 1999. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 7723-7730.
- Woolf, C. J. and King, A. E., 1990. Dynamic alterations in the cutaneous mechanoreceptive fields of dorsal horn neurons in the rat spinal cord. *J Neurosci.* 10, 2717-2726.
- Woolf, C. J. and Salter, M. W., 2000. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science.* 288, 1765-1769.
- Wozniak, M., Rydzewski, B., Baker, S. P. and Raizada, M. K., 1993. The cellular and physiological actions of insulin in the central nervous system. *Neurochem Int.* 22, 1-10.
- Wu, J., Fang, L., Lin, Q. and Willis, W. D., 2001. Nitric oxide synthase in spinal cord central sensitization following intradermal injection of capsaicin. *Pain.* 94, 47-58.
- Xu, H., Blair, N. T. and Clapham, D. E., 2005. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci.* 25, 8924-8937.
- Xu, J. T., Xin, W. J., Zang, Y., Wu, C. Y. and Liu, X. G., 2006. The role of tumor necrosis factor-alpha in the neuropathic pain induced by Lumbar 5 ventral root transection in rat. *Pain.* 123, 306-321.
- Xu, X. J., Hao, J. X., Andell-Jonsson, S., Poli, V., Bartfai, T. and Wiesenfeld-Hallin, Z., 1997. Nociceptive responses in interleukin-6-deficient mice to peripheral inflammation and peripheral nerve section. *Cytokine.* 9, 1028-1033.
- Yaksh, T. L., Farb, D. H., Leeman, S. E. and Jessell, T. M., 1979. Intrathecal capsaicin depletes substance P in the rat spinal cord and produces prolonged thermal analgesia. *Science.* 206, 481-483.
- Yan, P., Liu, N., Kim, G. M., Xu, J., Xu, J., Li, Q., Hsu, C. Y. and Xu, X. M., 2003. Expression of the type 1 and type 2 receptors for tumor necrosis factor after traumatic spinal cord injury in adult rats. *Exp Neurol.* 183, 286-297.
- Yang, K., Kumamoto, E., Furue, H., Li, Y. Q. and Yoshimura, M., 1999. Action of capsaicin on dorsal root-evoked synaptic transmission to substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal cord slices. *Brain Res.* 830, 268-273.
- Yang, K., Kumamoto, E., Furue, H. and Yoshimura, M., 1998. Capsaicin facilitates excitatory but not inhibitory synaptic transmission in substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *Neurosci Lett.* 255, 135-138.
- Yang, L., Blumbergs, P. C., Jones, N. R., Manavis, J., Sarvestani, G. T. and Ghabriel, M. N., 2004. Early expression and cellular localization of proinflammatory

- cytokines interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in human traumatic spinal cord injury. *Spine*. 29, 966-971.
- Yang, X. F., Ouyang, Y., Kennedy, B. R. and Rothman, S. M., 2005. Cooling blocks rat hippocampal neurotransmission by a presynaptic mechanism: observations using 2-photon microscopy. *J Physiol*. 567, 215-224.
- Yasaka, T., Hughes, D. I., Polgar, E., Nagy, G. G., Watanabe, M., Riddell, J. S. and Todd, A. J., 2009. Evidence against AMPA receptor-lacking glutamatergic synapses in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *J Neurosci*. 29, 13401-13409.
- Yoshida, T., Inoue, R., Morii, T., Takahashi, N., Yamamoto, S., Hara, Y., Tominaga, M., Shimizu, S., Sato, Y. and Mori, Y., 2006. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nat Chem Biol*. 2, 596-607.
- Youn, D. H., Royle, G., Kolaj, M., Vissel, B. and Randic, M., 2008a. Enhanced LTP of primary afferent neurotransmission in AMPA receptor GluR2-deficient mice. *Pain*. 136, 158-167.
- Youn, D. H., Wang, H. and Jeong, S. J., 2008b. Exogenous tumor necrosis factor-alpha rapidly alters synaptic and sensory transmission in the adult rat spinal cord dorsal horn. *J Neurosci Res*. 86, 2867-2875.
- Zacharova, G. and Palecek, J., 2009. Parvalbumin and TRPV1 receptor expression in dorsal root ganglion neurons after acute peripheral inflammation. *Physiol Res*. 58, 305-309.
- Zhang, M., Wang, H. and Tracey, K. J., 2000. Regulation of macrophage activation and inflammation by spermine: a new chapter in an old story. *Crit Care Med*. 28, N60-66.
- Zhao, W. Q. and Alkon, D. L., 2001. Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol Cell Endocrinol*. 177, 125-134.
- Zhou, H. Y., Chen, S. R., Chen, H. and Pan, H. L., 2009. The glutamatergic nature of TRPV1-expressing neurons in the spinal dorsal horn. *J Neurochem*. 108, 305-318.
- Zhou, H. Y., Zhang, H. M., Chen, S. R. and Pan, H. L., 2007. Increased C-fiber Nociceptive Input Potentiates Inhibitory Glycinergic Transmission in the Spinal Dorsal Horn. *J Pharmacol Exp Ther*.
- Zou, X., Lin, Q. and Willis, W. D., 2000. Enhanced phosphorylation of NMDA receptor 1 subunits in spinal cord dorsal horn and spinothalamic tract neurons after intradermal injection of capsaicin in rats. *J Neurosci*. 20, 6989-6997.
- Zou, X., Lin, Q. and Willis, W. D., 2001. NMDA or non-NMDA receptor antagonists attenuate increased Fos expression in spinal dorsal horn GABAergic neurons after intradermal injection of capsaicin in rats. *Neuroscience*. 106, 171-182.
- Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D. and Hogestatt, E. D., 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*. 400, 452-457.
- Zylka, M. J., Rice, F. L. and Anderson, D. J., 2005. Topographically distinct epidermal nociceptive circuits revealed by axonal tracers targeted to Mrgprd. *Neuron*. 45, 17-25.