

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Denisa Priessnerová

Přetrvávající bolest u animálních modelů neuropatické bolesti

Ongoing pain in animal models of neuropathic pain

Bakalářská práce

Školitel: doc. MVDr. Šimon Vaculín, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8.6. 2020

Podpis:

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé práce doc. MVDr. Šimonu Vaculínovi Ph.D. za trpělivost, vstřícnost a cenné rady. Ráda bych poděkovala také své rodině, partnerovi a přátelům, kteří mě při vytváření této práce podpořili, a bez jejichž pomoci by nebylo možné práci dokončit.

Denisa Priessnerová

Abstrakt

Přestože spontánní, přetrvávající bolest zužuje mnoho lidí na celém světě, stále na ní není žádná plně účinná léčba. Plnohodnotný výzkum spontánní bolesti se teprve začal provádět přibližně před 40 lety. Výzkum mechanismů bolesti a potenciální léčby se provádí na animálních modelech neuropatické bolesti. Tato práce se zaměřuje na animální modely, kterým byla navozena neuropatická bolest pomocí chronické konstriktce sedacího nervu (CCI) nebo ligace spinálního nervu (SNL). Oba invazivní zásahy by měly navodit spontánní, přetrvávající bolest, společně s bolestí evokovanou. Na modelech neuropatické bolesti se provádějí testy, založené na detekci a měření spontánní bolesti nevyužívající externí stimulus. Výsledky testů se zdají být ne vždy účinné. Mnohokrát nevykazují znaky spontánní, přetrvávající bolesti. Nejen, že tyto testy mají nižší úspěšnost, ale v porovnání s testy zahrnující externí stimulus je jich poměrně málo. Cílem této práce bylo provést analýzu výzkumu spontánní a přetrvávající bolesti u modelů CCI a SNL. Bylo potřeba se soustředit na metody, které nevyužívají externí stimulus během testování. K vyhledávání článků byla převážně použita databáze PubMed. Při vyhledávání byla použita slova „spontaneous“ nebo „ongoing“. Nalezené články byly zhodnoceny a posouzeny, zdali se v nich vyskytuje metoda detekující a měřící spontánní bolesti bez externího stimulu. Problémem je, že mnohé testy odkazující se na měření spontánní bolesti využívají externí podněty. Tyto metody měření mohou maskovat přítomnost spontánní bolesti. Bylo zjištěno malé množství testů, kterými je detekovaná spontánní, přetrvávající bolest bez externích stimulů. Tyto metody se často liší výsledky, a proto se stále zpochybňují. Zpochybňují se také zavedené modely neuropatické bolesti (CCI a SNL), které se u určitých experimentů prokázaly jako metody nenavozující spontánní bolest. Přestože část experimentů neprokazuje přítomnost spontánní bolesti, výzkum se stále posouvá pozitivním směrem. Směřuje k odhalení cílů léčby a snaze provedení úspěšných klinických testů, zajišťujících plné vyléčení osob trpících spontánní, přetrvávající bolestí.

Klíčová slova:

Spontánní bolest, přetrvávající bolest, chronická konstriktce sedacího nervu, ligace spinálního nervu, vokalizace, podmíněná preference místa

Abstract

Although spontaneous pain is a global problem, there is still no effective treatment. Constructive research started only 40 years ago. Research based on pain mechanisms and potential treatment has been done on animal models of neuropathic pain. This thesis is focused on animal models, which could be either induced by chronic constriction of the sciatic nerve (CCI) or spinal nerve ligation (SNL). Both models should induce spontaneous, ongoing pain along with evoked pain (allodynia and hyperalgesia). Tests, made on these models, are based on detection and measurement of spontaneous pain, while not using an external stimulus. The outcome of the tests is not always effective. Most of the time, they do not evince signs of spontaneous pain. These tests are also less effective and fewer in numbers compared to those using external stimulus. The goal of this thesis was to analyze all the research including spontaneous and ongoing pain in CCI and SNL models. It was important to focus on certain methods that do not use external stimulus during testing. PubMed database was used for searching articles. The most common words searched were „spontaneous“ and „ongoing“. Found articles were evaluated and searched for methods indicating and measuring spontaneous pain without an external stimulus. Most of the methods which claim to measure spontaneous pain are not credible. They are in fact measuring it, but by using an external stimulus, which could hide any evidence showing the presence of spontaneous, ongoing pain. There is a small number of methods which do not use external stimulus. Even though they are thought to be affective, they usually have different outcomes and are still frowned upon. Scientists also question neuropathic pain models (CCI and SNL), which do not seem to be affective while inducing spontaneous, ongoing pain. Although a lot of the experiments do not detect the presence of spontaneous pain, the research is still moving in the right direction. It is leading up to unmasking the treatment goals as well as the effort to pursue a successful clinical trial, which will ensure full treatment for the people going through spontaneous, ongoing pain.

Key words:

Spontaneous pain, ongoing pain, chronic constriction of the sciatic nerve, spinal nerve ligation, vocalization, conditioned place preference

Obsah

Úvod	1
1. Bolest	2
1.1. Definice bolesti	2
1.2. Typy bolesti.....	3
1.2.1. Nociceptivní bolest.....	3
1.2.2. Neuropatická bolest.....	4
1.3. Složky bolesti	5
1.3.1. Senzoricko diskriminační	6
1.3.2. Afektivně motivační	6
1.3.3. Kognitivně evaluační.....	7
1.4. Klasické metody měření bolesti u animálních modelů	7
1.4.1. Mechanický stimulus.....	8
1.4.2. Tepelný stimulus	9
1.4.3. Chladový stimulus.....	9
2. Neuropatická bolest	10
2.1. Evokovaná bolest	11
2.2. Spontánní bolest	11
2.3. Modely neuropatické bolesti	12
2.3.1. CCI	14
2.3.2. SNL	14
3. Metody měření spontánní bolesti u CCI a SNL	14
3.1. Podmíněná preference místa	15
3.2. Ultrasonické vokalizace	17
3.3. Hrabání	18
3.4. Zatěžování tlapy	19
3.5. Pohyb končetin.....	20
3.6. Nucené plavání.....	21
3.7. Preference cukrové vody	22
4. Závěr	23
5. Literatura	25

Úvod

Bolest je součástí každodenního života mnoha jedinců. Objevuje se ve dvou hlavních podobách. Nociceptivní bolest plní nezastupitelný úkol, varuje tělo před poškozením, nebo se mu alespoň snaží předejít. Neuropatická bolest již tento úkol ztrácí. Většinou se vyskytuje jako důsledek zranění nebo onemocnění. Problém nastává při bolesti spontánní, jakožto jedné formy neuropatické bolesti. Objevuje se spontánně bez žádného spouštěcího stimulu. Spontánní bolest zejména ovlivňuje afektivně motivační složku bolesti, a na ní navázané depresivní nebo úzkostlivé stavy pojící se s neustupující bolestí.

Lidé se obrací na lékaře při snaze odlevit si od bolesti bez ohledu na její druh. Problémem je, že většina populace trpí bolestí spontánní, na kterou zatím nebyla vynalezena plně účinná léčba. Snaha vyvinout analgetika na spontánně vznikající a nepomíjející bolest je velice vysoká, ale poměrně neúspěšná. Z moderního pohledu výzkum začal relativně nedávno, přibližně před 40 lety. Během těchto let byla a je snaha vytvořit účinnou léčbu pro pacienty trpící spontánní, přetrvávající bolestí. Výzkum potenciální účinné léčby se provádí převážně na hlodavcích, na kterých se invazivními metodami může zkoumat podstata spontánní bolesti. Pro úspěšné odstranění bolesti se musí objevit molekulární cíle, na které je potřeba se zaměřit. Vývin léčby je velice důležitý pro stárnoucí populaci, s níž se objevují onemocnění, která zahrnují spontánní, přetrvávající bolest.

Existuje mnoho metod využívajících měření bolesti pomocí stimulů. Tím se může měřit bolest neuropatická evokovaná nebo bolest nociceptivní. Pro detekci a měření spontánní bolesti je nutnost vyvinutí metod nevyužívajících externích stimulů. Přítomnost spontánní bolesti musí být určena na základě vizuálního hodnocení a behaviorálních změn hlodavců. Identifikace změn v chování a posouzení, zdali se opravdu jedná o spontánní bolest, může být velice náročné.

Práce je zaměřena na animální modely, u kterých se navodila spontánní bolest pomocí dvou invazivních metod; chronické konstriktce sedacího nervu (CCI) a ligace spinálního nervu (SNL). V práci je obsažen přehled všech používaných, relativně spolehlivých metod určení a měření spontánní bolesti bez externího stimulu u hlodavců provedených do dnešní doby na modelech CCI a SNL.

1. Bolest

1.1. Definice bolesti

Definice, která se používá doposud, byla přijata roku 1979. Definice bolesti dle Mezinárodní společnosti pro studium bolesti říká, že bolest je nepříjemný sensorický a emocionální prožitek spojený se skutečným či potenciálním poškozením tkáně, nebo popisovaný výrazy pro takové poškození (IASP, 1994).

K této současné definici se pojí i mnoho dodatečných informací. Důležitá je skutečnost, že mnoho jedinců nemá možnost verbálně vyjádřit své pocity či bolest. To ale neznamená, že bolest neprožívají a nepotřebují léčbu, kterou by došlo k jejímu odstranění. Jedinci pociťují bolest vždy subjektivně na základě svých zkušeností, a to již v raném věku. Pokud jedinec považuje svou zkušenost za bolest, nahlásí svou subjektivní bolest ve stejném smyslu jako bolest při poškození tkáně, mělo by se to pokládat za rovnocenné. Pocit bolesti vzniká na základě dostatečně silných stimulů způsobujících poškození tkáně na různých částech těla. Bolest nemusí být způsobena pouze přímým poškozením tkáně, ale může také zahrnovat řadu bolestivých stavů spojených s neuropatickou bolestí. V návaznosti na bolest se mohou objevovat situace, které se podobají bolesti, ale neměly by pod ni spadat (např. píchání, které by se nemělo kategorizovat pod bolest) (IASP, 1994).

Od roku 1979 docházelo k návrhům a úpravám taxonomie bolesti, či k návrhům jiných definic. Původní definice bolesti se od té doby skoro nezměnila, a přeměnila se v hlavní definici bolesti až do dnešní doby uznávanou po celém světě. Základy této definice byly navrženy Haroldem Merskeym. V meziobdobí byla taxonomie pozměněna celkem třikrát (1986, 1994 a 2011), byly přidány nové termíny a definice, přičemž originální definice zůstala stejná. V srpnu 2019 Mezinárodní společnost pro studium bolesti navrhla novou definici.

Nově navržená, neoficiální definice říká, že bolest je averzivní sensorická a emocionální zkušenost, obvykle způsobená aktuálním nebo potenciálním poškozením tkáně, nebo takové poškození připomínající/nebo se na takový původ odvolávající/nebo se takovému způsobení/původu podobající (IASP, 2019).

1.2. Typy bolesti

Dělení bolesti je obecně velmi obtížné. Existují různá dělení, ale ani jeden ze způsobů není všeobecně přijímán. Dle mechanismu vzniku se může dělit na bolest nociceptivní a neuropatickou. Při nociceptivní bolesti dochází k působení určitého stimulu, který ji většinou dává akutní charakter (okamžitá reakce na poškození či případně poškození tkáně). Neuropatická bolest nemusí být závislá na stimulu, a je vyvolaná poškozením nervové soustavy. Je charakterizovaná jako bolest chronická (přetrvává déle než hojení, neslouží k obraně a je velice náročná na léčbu). Neuropatická bolest je charakterizovaná jako jeden z nejbolestivějších symptomů, který se může vyskytnout v klinické praxi (Zhao et al., 2015; Deuis et al., 2017).

1.2.1. Nociceptivní bolest

Nociceptivní bolest nabývá informativního a obranného charakteru na základě skutečného nebo potenciálního poškození. Vzhledem k obrannému charakteru je nociceptivní bolest většinou akutní povahy. Základním mechanismem této bolesti je aktivace nociceptorů. Nociceptor je senzorický receptor periferního somatosenzorického nervového systému, který je schopen detekovat a přenášet škodlivé podněty (IASP, 1994; Gold a Gebhart, 2010). Nociceptory jsou volná nervová zakončení nacházející se v kůži, svalech, kloubech či útrobach (Dubin a Patapoutian, 2010). Rozpoznání škodlivých podnětů je založeno na prahu bolesti. Práh bolesti je minimální intenzita stimulu, který je vnímán jako bolestivý. Zakončení nervových vláken mohou být vysoko i nízkoprahová. Dříve se na základě hodnocení rozdílu mezi bolestivými a nebolestivými podněty předpokládalo, že nociceptory mají vysoké prahové odpovědi. Nyní je zřejmé, že práh sám o sobě není rozlišovací charakteristikou nociceptorů. Mechanonociceptory viscerální či umístěné v kůži, svalech nebo kloubech mají ve skutečnosti nízké prahové hodnoty odezvy. Po rozpoznání škodlivého podnětu se informace dále přenáší do míchy a mozku, kde se prožitek bolesti zpracovává (Deuis et al., 2017; Gold a Gebhart, 2010; IASP, 1994). Bolest je vedena aferentními nervovými vlákny typu C a A δ . Vláken typu C je většina, a jsou nemyelizovaná. Kvůli absenci myelinové pochvy se přenášený signál šíří velmi pomalu. Tato vlákna přenáší bolest, která se v mozku vyhodnocuje jako tupá a špatně lokalizovatelná. Vláken typu A δ jsou slabě myelizovaná, a bolest se jimi přenáší rychle. Bolest je ostrá a dobře lokalizovatelná (Handwerker a Kopal, 1993). Na poškození či hrozící poškození aktivací senzorických drah reaguje nocicepce (Crook a Walters, 2011).

Reakce na škodlivé podněty se projevuje jako reflexní odpověď organismu. Aktivita nocicepční dráhy vede k reflexním behaviorálním reakcím, a k uvědomění nocicepce neboli pocitu bolesti. Reflexní behaviorální reakce mohou vzniknout bez vstupu z vyšších center. Tyto reakce jsou součástí obranného reflexu neboli snahy aktivně se vyhnout situaci, při které by došlo k poškození tkáně. Chování podobající se úniku či vyhýbání již zahrnuje složitější nervové funkce (Crook a Walters, 2011; Walters, 1994; Defrin et al., 2007).

Důležitá vlastnost nociceptorů je senzitivizace. To znamená, že vzrušivost nociceptorů může být zvýšena. Senzitivizace se vyvíjí v důsledku tkáňového poškození a zánětu. Je definovaná jako snížení prahové hodnoty a zvýšení rozsahu odpovědi na škodlivé podněty (Bessou a Perl, 1969). Zvýšená odpověď na bolest se vyskytuje ve formě hyperalgie nebo allodynie (IASP, 1994). U neuropatické bolesti se vyskytují zejména tyto dvě formy bolesti. Bolest nociceptivní ale snadno může přejít v neuropatickou senzitivizaci neuronů, jelikož hranice mezi nociceptivní a neuropatickou bolestí není plně zřetelná (Gold a Gebhart, 2010).

1.2.2. Neuropatická bolest

Neuropatická bolest ztrácí informativní a obranný charakter o případném poškození tkáně. Většinou trvá několik měsíců (Smith, 2018). Z tohoto důvodu je zároveň charakterizovaná jako bolest chronická (Walters, 1994). Neuropatická bolest je způsobena lézí či onemocněním somatosenzorického nervového systému. Léze či onemocnění somatosenzorického nervového systému se mohou vyskytovat jak v centrálním, tak periferním nervovém systému. Neuropatická bolest se pojí s vysoce variabilní etiologií. V centrálním nervovém systému se může vyskytovat při cerebrovaskulárních, neurodegenerativních chorobách nebo demyelinizačním onemocnění míchy. V periferním nervovém systému je neuropatie způsobena například důsledky diabetu mellitus, nebo je jako důsledek protinádorové chemoterapie (Ambler, 2007; Smith, 2018; Scholz et al., 2019; Colloca et al., 2017). Neuropatická bolest je obtížně léčitelná, a proto se na ní provádí mnoho studií. Tyto studie používají animální modely, na nichž se zkoumají potenciální účinné látky, které by mohly pomoci s léčbou neuropatické bolesti. U animálních modelů bylo zjištěno několik účinných látek vedoucích k úspěšnému vyléčení. Při převedení zdánlivě účinných a bezpečných analgetik u hlodavců na lidi nastává problém. Pozitivní účinky, které se projevily u hlodavců, se u lidí nedostaví. Nedostatečnost se také projevuje nepříznivými vedlejšími účinky a nepostačující účinností léků (Mogil, 2009). Z toho vyplývá, že je zapotřebí provést mnoho dalších studií,

kteří budou testovat analgetika vhodná k léčbě neuropatické bolesti. Úspěšný přesun testovaných analgetik na animálních modelech do klinických testů u lidí je také nutností.

Neuropatická bolest může být rozlišovaná na spontánní a evokovanou. Evokovaná bolest je závislá na stimulaci nebo je jí vyvolaná, a je časově omezená. Dělí se do dvou druhů. Allodynie je bolest vyvolaná podnětem, který ji standardně nevyvolá (dotyk či teplo). Hyperalgie označuje zvýšenou citlivost a snížený práh k bolestivým stimulům nadprahové intenzity (Ambler, 2007; IASP, 1994). Evokovaná bolest se může jednoduše měřit u zvířat, a proto se výzkum bolesti provádí převážně na hlodavcích; myších a potkanech. Z důvodu snadného měření se většina výzkumu u zvířat provádí právě na evokované bolesti. Jednoduché měření je založené na velmi dobře charakterizovaných evokovaných odpovědích v modelech neuropatické bolesti vykazující bolestivé chování. Určení přítomnosti spontánní bolesti je mnohem náročnější (Dalm et al., 2015).

Spontánní bolest je důležitý aspekt většiny neuropatických bolestivých stavů. Je charakterizovaná jako bolest přetrvávající a tonická. Je to bolest objevující se spontánně bez spouštěcích mechanismů. Prokazatelné pocity u lidí, které můžeme asociovat s příznaky spontánní bolesti, jsou pálení, bodání, mravenčení nebo brnění. Mnoho pacientů s neuropatickou bolestí vykazuje symptomy spontánní bolesti, ale přesto se její výzkum posouvá velice pomalu. Výzkum se provádí na animálních modelech. Je založený na detekci a měření spontánní bolesti. Přítomnost spontánní bolesti u zvířat se nedá velmi dobře určit. Zvířata nemohou verbálně vyjadřovat své pocity a intenzitu bolesti. Přesto je velice důležité identifikovat přítomnost spontánní bolesti v animálních modelech, v závislosti na behaviorálních změnách, kterými se může pečlivě studovat léčba vedoucí ke zlepšení klinického stavu pacientů (Dalm et al., 2015; King et al., 2009; Ambler, 2007). Spontánní bolest u lidí můžeme měřit pomocí VAS (Visual Analogue Scale). To jsou stupnice psychometrické odezvy, které jsou určeny k dokumentování charakteristik závažnosti symptomů onemocnění u pacientů. Pomocí toho se dosáhne rychlé klasifikace závažnosti (Klimek et al., 2017).

1.3. Složky bolesti

Bolest je vědomá zkušenost, která zahrnuje diskriminační, afektivně motivační a kognitivně evaluační složky, vytvářející sjednocený pocit bolesti. Každá z těchto složek je zprostředkována skrz samostatné části mozku (Casey, 1999). Bolest je prožitek spojený nejen se sensoricko diskriminační složkou, jako je intenzita, lokace, kvalita nebo délka trvání stimulu,

ale i s emočními pocity afektivně motivační složky, jako je úzkost, strach, zlost či deprese (Price a Harkins, 1992). Kognitivní osa je zapojena do pozornosti, očekávání a paměti minulých zkušeností (Peyron et al., 1999). Zpracování smyslových a diskriminačních aspektů bolesti je do značné míry oddělené na kortikální úrovni. To možná probíhá i v nižších úrovních nervové soustavy zpracovávající afektivně motivační aspekt bolesti (Mogil, 2009). Všechny zmíněné složky bolesti se dají testovat na animálních modelech neuropatické bolesti, nebo u lidí pomocí fMRI (funkční magnetická rezonance) a PET (pozitronová emisní tomografie) (LaBuda a Fuchs, 2000).

Všechny 3 formy ovlivňují motorické mechanismy, odpovědné za komplexní vzor zjevných odpovědí charakterizujících bolest (Melzack a Casey, 1968).

1.3.1. Senzoricko diskriminační

Schopnost zjistit místo poranění se v lékařské praxi zjišťuje otázkou „Kde to bolí?“. Lokalizace škodlivých podnětů je přesná pro kůži, obtížnější pro tkáň uloženou hluboko (klouby a svaly) a špatná pro vnitřní orgány (Treede et al., 1999).

Senzoricko diskriminační složka je primárně kódovaná laterálním nociceptivním systémem, který zahrnuje spino-thalamickou cestu a aspekty lokalizace, intensity a modality rozlišování stimulu (Pedersen et al., 2007). Na základě PET a fMRI se předpokládá, že aktivace laterálního thalamu, primární somatické oblasti (SI), sekundární somatické oblasti (SII) a insuly je vázaná na senzoricko diskriminační systém (Peyron et al., 2000). K měření senzoricko diskriminační složky bolesti u lidí dochází pomocí neurozobrazovacích metod. U zvířat se převážně využívá testování na modelech neuropatické bolesti (Casey, 1999).

1.3.2. Afektivně motivační

Afektivně motivační složka je primárně kódovaná mediálním nociceptivním systémem. Ten se nachází v mediálním thalamu, amygdale, limbickém kortexu, a zahrnuje aspekty emocí. Právě ty se mohou vyskytovat ve formě pocitu nepříjemnosti, strachu či úzkosti. Mediální nociceptivní systém zároveň zahrnuje výběr odezvy a míry vzrušení. Bolest také ovlivňuje motorické chování, které se skládá z úniku a vyhýbání se (Pedersen et al., 2007; Auvray et al., 2010).

Kromě pouhé registrace skutečného poškození tkáně je důležité jeho předvídání. Z evolučního hlediska to má výhodu, jelikož předvídání a strach z bolesti minimalizuje

pravděpodobnost, že se organismus dostane do situace, která by vyvolávala poškození. Bolest musí mít motivační sílu vedoucí organismus k různým typům chování, které zahrnuje vyhnout se případnému nebezpečí, nebo snahu se alespoň dostat z již existujícího nebezpečí (Auvray et al., 2010). Afektivně motivační složka je tvořena dvěma stádii. Okamžitý nepříjemný pocit je integrovanou reakcí na to, co je v daném okamžiku vnímáno jako hrozba. Druhé stádium je založeno na dlouhodobějších důsledcích bolesti a také na tom, co si člověk pamatuje či představuje (Price a Harkins, 1992).

1.3.3. Kognitivně evaluační

Kognitivně evaluační složka je založená na analýze multimodálních informací, předchozích zkušeností a pravděpodobnosti výsledků různých reakčních strategií (Melzack a Casey, 1968). Je schopna interagovat s ostatními dvěma složkami; senzorio-diskriminační a afektivně motivační. Intenzita bolesti a pocit nepříjemnosti definuje bolestivý stimul, který bolesti přisuzuje určitou pozornost (Peyron et al., 1999).

Kortikální oblast a subkortikální spoje jsou hlavní oblastí pro zprostředkování kognitivních aspektů bolesti (Casey, 1999).

1.4. Klasické metody měření bolesti u animálních modelů

Výsledky výzkumu bolesti jsou velice zásadní pro pacienty, kteří si chtějí odlevit od bolesti. Zvýšení porozumění ohledně základních mechanismů bolesti, vyvinutí nových strategií, postupů a způsobů léčby je proto důležité (Deuis et al., 2017). K základnímu výzkumu nocicepce se používají laboratorní zvířata, nejčastěji myši a potkani. Jejich hlavním omezením je fakt, že nemohou verbálně vyjádřit intenzitu bolesti (Mogil, 2009).

Při měření bolesti je nezbytné použít stimulus, který vyvolá pocit bolesti (Mogil, 2009). Bolest se měří dle reakce bdělého zvířete vůči aplikovanému stimulu (tzv. nocifenzivní chování). Nejspolehlivější a běžně používaný způsob měření bolesti je určení prahu bolesti. Práh bolesti je minimální intenzita podnětu, která vyvolává bolestivé stavy a chování u zvířat. Měří se intenzita stimulu, která vyvolala obranné a únikové chování, nebo doba, která byla potřebná k vyvolání obranného chování. Nocifenzivní chování vůči aplikovanému stimulu se projevuje flexorovým reflexem. Dochází k rozrušení nebo zvýšení ošetřování postiženého místa, skákání, třesení nebo kousání (Deuis et al., 2017; IASP, 1994; Mogil, 2009; Barrot, 2012). Evokované averzivní odpovědi mohou také detekovat hypersensitivitu v podobě

allodynie nebo hyperalgie, které nejčastěji doprovázejí samotnou bolest (Gonzalez-Cano et al., 2018; Mogil, 2009).

Měření se zakládá na stimulech, které mohou být typu mechanického, tepelného nebo chladového. Základem prováděných experimentů je habituace zvířete v kleci po dobu 5 minut, kde bude experiment probíhat, aby se předešlo možnému stresu (Barrot, 2012).

V následujících odstavcích jsou vybrané, nejčastěji používané testy na základě různých stimulů.

1.4.1. Mechanický stimulus

Test využívající Von Freyova vlákna je metodický způsob měřící práh bolesti při mechanickém stimulu. Tato vlákna jsou 5 cm dlouhá s různými průměry. Během testu je zvíře umístěno v kleci s mřížkovitou podlahou. Monofilamenta jsou postupně aplikována na plantární povrch tlapy zvířete. Aplikace filament se provádí až do jejich prohnutí. Výsledek je považován za pozitivní, pokud se vyskytne defenzivní chování vůči stimulu, které zahrnuje odtažení tlapy, olizování nebo třesení. Odpovědi na stimulus nemusí být vždy jasné, a jejich interpretace se může lišit. Existují různé metody měření Von Freyovými vlákny, jedna z nich se nazývá up-down. Testování je zahájeno s filamentem, které působí silou většinou odpovídající závaží o hmotnosti 2 gramy. Pokud není zřejmá přítomnost obranné reakce, je vybrán silnější stimul. V případě vyvolání reakce je naopak vybrán slabší stimul. Je potřeba nalézt filamentum určující prahovou hodnotu zvířete. Nevýhodou této metody je, že může dojít k senzitivizaci nebo naučení odpovědi v závislosti na četnosti opakování působení stimulu (Deuis et al., 2017; Vrinten a Hamers, 2003; Chaplan et al., 1994; Gonzalez-Cano et al., 2018). V současné době se používají automatizovaná Von Freyova vlákna. Výhodou automatizace je použití pouze jednoho vlákna, kterým dochází k nepřetržité manipulaci rostoucími silami (Barrot, 2012).

Randall-Selitto test je jeden z dalších způsobů měřící bolest pomocí mechanického stimulu. Tento test byl původně využíván na hodnocení schopnosti analgetik ovlivňovat prahové hodnoty odezvy na mechanickou tlakovou stimulaci zanícené tkáně. V počátcích vývinu testu muselo být zvíře během testování drženo v poloze, ve které musela být tlapa nebo ocas umístěn na rovném povrchu. Zadní tlapa či ocas byl umístěn mezi pevný a mobilní prvek, který vyvolával regulovaný tlak. Tlak byl zajišťován pákovým mechanismem s posuvným protizávažím (Randall a Selitto, 1957). Touto metodou se zvíře dostávalo do stresových situací.

Bylo potřeba, aby zvíře bylo habituováno kvůli přesnějším výsledkům. Aby zvířata byla pod co nejmenším stresem, musela se začít trénovat a připravovat. Nyní se častěji používají kalibrované kleště, které elektronicky zaznamenávají aplikovaný tlak na tlapku. Tato technika vystavuje zvíře minimálnímu stresu (Barrot, 2012; Deuis et al., 2017; Anseloni et al., 2003).

1.4.2. Tepelný stimulus

Tail flick test se zakládá na akutní nocicepci. Při testu je tepelný stimulus v podobě řízeného infračerveného tepelného paprsku s vysokou intenzitou nasměrovaný k ocasu myši či potkana. Jako náhrada za tepelný paprsek může být také použita horká voda v teplotním rozmezí od 46 °C do 52 °C, do které je umístěn ocas zvířete. Během testu je důležité udržet zvíře v postoji, který vyvolá minimální stres. Během měření se zaznamenává doba od začátku stimulace, až do rychlého odtažení ocasu od zdroje tepla. Odtážení ocasu je míšní reflex vystavený supraspinálním vlivům, které mohou tento reflex ovlivnit. Zaznamenaný čas švihnutí ocasu je ukazatelem prahu bolesti (Bannon a Malmberg, 2007; Deuis et al., 2017; Barrot, 2012). Bylo zjištěno, že latence odtažení ocasu od tepelného záření silně závisí na teplotě ocasu a pravděpodobně na průtoku krve (Handwerker a Kopal, 1993).

Hot plate test je další přístroj, který umožňuje posouzení tepelných prahů bolesti. Zvíře je umístěno na kovový povrch udržovaný při konstantní teplotě 50-55 °C. K vyvolání reakce u tohoto testu je zapotřebí nastavení vyšší teploty přibližně o 10-15 °C, než je prahová hodnota odezvy tepelných nociceptorů. Při měření je pozorovaná latence odezvy. To je potřebný čas ke zvýšení teploty kůže, až do detekce nociceptivního stimulu, při kterém se pozoruje chování podobné bolesti. Chování se projevuje jako stažení předních tlapek nebo jejich olizování, dupání, opíravý postoj či poskakování (Deuis et al., 2017; Barrot, 2012). Odpovědi na základě testu jsou supraspinální. Při prvním zpozorování reakce je nutné zvíře okamžitě stáhnout ze zdroje stimulu, aby se zabránilo nebo omezilo riziko poškození tkáně (Barrot, 2012).

1.4.3. Chladový stimulus

Cold plate test je obdobou hot plate testu. Při experimentu je zvíře postaveno na předem vychlazenou podložku určité teploty (0-8 °C). Je zaznamenáván čas, kdy se projeví evokované nociceptivní chování. To se projevuje jako třesení, skákání či olizování částí těla. Prahová hodnota pro vyvolání bolesti za studena u standardních potkanů je 5 °C (Allchorne et al., 2005; Deuis et al., 2017).

Acetonový test zaznamenává přítomnost allodynie v závislosti na chladném stimulu u modelů neuropatické bolesti. Je založen na pozorování přítomnosti averzního chování vůči stimulu. Aceton je aplikován na spodní část tlapky. Odpařováním vyvolá ochlazování pokožky na 15-21 °C (Deuis et al., 2017). Aplikace může být také provedena ponořením tlapky či jejím postříkáním (Vuralli et al., 2019). Standardní potkani za normálních podmínek na aplikaci acetonu nereagují. Po navození neuropatické bolesti se potkani stanou velmi senzitivními na aplikovaný aceton, a začnou vykazovat behaviorální znaky podobné bolesti. Chování může zahrnovat odtažení nohy a její třes, podupávání nebo olizování. Acetonový test je také velmi využíván k detekci allodynie u lidí (Yoon et al., 1994).

2. Neuropatická bolest

Neuropatická bolest vzniká onemocněním či lézí v centrálním nebo periferním somatosenzorickém systému, a pojí se s nepříjemnými symptomy. Přenašeči bolesti v periferním systému jsou primárně nervová vlákna; slabě myelizovaná A δ vlákna a nemyelizovaná vlákna typu C (Tal a Eliav, 1996; IASP, 1994). Hlavními příčinami periferní neuropatické bolesti může být diabetes mellitus a ostatní metabolické dysfunkce, infekční onemocnění, chemoterapie, neuropatie nebo imunitní a zánětlivé onemocnění. V centrálním systému jsou hlavními příčinami neuropatické bolesti například cerebrovaskulární choroby, neurodegenerativní onemocnění, poranění míchy, demyelizační onemocnění nebo myelitida (zánětlivá onemocnění míchy) (Colloca et al., 2017; Smith, 2018). Za neuropatickou bolestí stojí zvýšená excitabilita sensorických neuronů (Smith, 2018). Je nutno zmínit, že neuropatická bolest se vytvoří ne u všech pacientů s periferní neuropatií nebo se zraněním v centrálním nervovém systému (Colloca et al., 2017).

Nejčastější symptomy neuropatické bolesti mohou zahrnovat pálení, pocity podobné elektrickým šokům, vystřelování nebo píchání. Tyto symptomy většinou přetrvávají a přechází v chronickou bolest (Colloca et al., 2017; Allchorne et al., 2005; Tappe-Theodor a Kuner, 2014; Finnerup et al., 2016). Neuropatická chronická bolest se specifikuje tím, že přetrvává dlouho poté, co byl odstraněn stimulus nebo poté, co byla zahojena všechna zjevná poškození tkáně (Boyce-Rustay a Jarvis, 2009). Při přetrvávající chronické bolesti může afektivně motivační složka ovlivnit psychické zdraví jedince. Mohou se projevit poruchy spánku, úzkosti nebo deprese (Colloca et al., 2017).

V následujících kapitolách budou vysvětleny 2 hlavní komponenty neuropatické bolesti; evokovaná a spontánní bolest.

2.1. Evokovaná bolest

Evokovaná bolest je závislá na stimulu, který vyvolává averzní chování. Může být vyvolaná termálním, mechanickým nebo chemickým stimulem (Wu et al., 2017). Pod pojmem evokovaná bolest existují dva hlavní komponenty, které tuto bolest vytváří; allodynie a hyperalgie. Dle Mezinárodní asociace pro studium bolesti je allodynie bolest způsobena stimulem, který normálně bolest nevyvolává. Může to být uvedeno na příkladu dotyku, lehkého tlaku nebo aplikaci průměrné teploty na povrch těla (IASP, 1994). Allodynie je bolest, způsobená excitací nízkoprahových senzoryckých nervových vláken; přesněji nízkoprahových A δ a C vláken (Sandkühler, 2009). Hyperalgie je zvýšená bolest způsobena stimulem, který normálně bolest vyvolává. Tento termín je používán u případů se zvýšenou odpovědí při standardním nebo zvýšeném prahu bolesti. Hyperalgie může být pozorovaná na různých typech somatosenzorické stimulace, aplikované na různé tkáně. (IASP, 1994; Sandkühler, 2009). Zvýšená citlivost v podobě allodynie nebo hyperalgie může přetrvávat dlouho poté, co již původní příčina bolesti zmizela. V tomto případě se stává bolestí chronickou. Tyto dvě bolesti již nemají protektivní funkci. Spíše se stávají samotnou nemocí (Sandkühler, 2009; Vrinten a Hamers, 2003).

Většina studií zkoumající bolest je prováděná na animálních modelech, které jsou založené na stimulem evokovaných odpovědích (King et al., 2009). Evokovaná bolest je obecně měřena klasickými metodami měření prahu bolesti popsány výše. Tyto metody využívají mechanický, tepelný a chladový stimulus. Modely měřené klasickými metodami jsou velmi dobře prozkoumány (Dalm et al., 2015). Testy jsou prováděné na animálních modelech neuropatické bolesti. Přítomnost evokované bolesti ve zmíněných testech můžeme pozorovat jako odtažení tlapy nebo ocasu od stimulu, vokalizace, snížený pohyb nebo zřejmý neklid zvířete (Boyce-Rustay a Jarvis, 2009; Jaggi et al., 2011).

2.2. Spontánní bolest

Spontánní bolest je druhou hlavní složkou neuropatické bolesti. Co si můžeme představit pod pojmem spontánní bolest? Mezinárodní asociace pro studium bolesti nemá žádnou přímou definici. Může být charakterizovaná jako bolest objevující se spontánně, bez

spouštěcích mechanismů (stimulů), které se běžně objevují u evokované bolesti. Spontánní bolest je způsobena změnami, které jsou zcela vnitřní a nezávislé (Bennett, 2012; Wu et al., 2017). Pojem spontánní bolest je také charakterizovaný výrazy přetrvávající a tonická. Tato bolest se projevuje především při neuropatických bolestivých stavech, jako je diabetická neuropatie, postherpetická neuralgie a trigeminální neuralgie. Může se také objevovat při nádorových onemocněních (Jaggi et al., 2011; Dalm et al., 2015). Její symptomy mohou být pálení, brnění píchání, střílení nebo křeče (Boyce-Rustay a Jarvis, 2009). Mechanismy zprostředkovávající tento aspekt bolesti nejsou stále plně neznámé. Je pravděpodobné, že záleží na aktivaci spontánně aktivních aferentních vláken. Aktivací C vláken se vyvolává nepříjemný, často i nesnesitelný pocit pálivé a ostré bolesti (Djoughri et al., 2006). Otázkou stále zůstává, zdali se může do spontánní, přetrvávající bolesti zahrnovat bolest vyvolaná neznámými stimuly, jako jsou zánětlivé mediátory (Djoughri et al., 2006; Bennett, 2012; Baron et al., 2010; King et al., 2009).

Ve většině případů je spontánní bolest největší stížností pacientů. Studie se provádí na animálních modelech. Zvířata nejsou schopna verbálně sdělit své pocity, a proto je detekce a měření spontánní bolesti u animální modelů velice obtížné. Dalším problémem je, že většina výzkumu se soustředí ať už na bolest nociceptivní nebo na bolest neuropatickou - evokovanou. Pro studium se používají modely neuropatické bolesti (Jaggi et al., 2011; Chapman et al., 1985). Modely se zakládají na částečném nebo úplném poranění nervů u zvířat, které mají navozovat evokovanou a spontánní bolest (Qu et al., 2011). Nadměrné zvedání tlapy, kulhání, ochrana poraněné tlapy nebo vokalizace může být averzním chováním vůči přítomné spontánní bolesti (Jaggi et al., 2011; Djoughri et al., 2006).

2.3. Modely neuropatické bolesti

Studium mechanismů, které se podílejí na vytváření neuropatické bolesti, je stále vzdálené od kompletního porozumění (Sewell, 2018). Její etiologie je velice variabilní. Centrální neuropatická bolest může být způsobena lézí v mozku, demyelizačním onemocněním míchy, poraněním míchy a mozku, proděláním mrtvice nebo roztroušenou sklerózou. Periferní neuropatická bolest může být způsobena neuralgií, diabetem nebo důsledkem protirakovinné chemoterapie (Smith, 2018; Scholz et al., 2019). Neuropatická bolest výrazně znehodnocuje veškeré aspekty života každého, který ji trpí (Chapman et al., 1985). Je většinou chronického charakteru, to znamená, že přetrvává, nebo se projevuje jako opakující se bolestivé stavy (Gomtsian et al., 2018). Složky bolesti, jež jsou důležité komponenty vytvářející pocit bolesti,

se v návaznosti na opakující se bolestivé stavy zapojují více. Zapojuje se senzorio-diskriminační a především afektivně motivační složka bolesti, která způsobuje emoční poruchy; deprese, úzkosti nebo změny v sociálních interakcích projevující se jako výsledek neustupující bolesti (Hestehave et al., 2019; Tappe-Theodor a Kuner, 2014).

Muselo být vytvořeno mnoho modelů, které budou reprezentovat rozmanitou etiologii neuropatické bolesti. Hlavní myšlenkou při vytváření modelů neuropatické bolesti je navození allodynie, hyperalgie a spontánní bolesti (Jaggi et al., 2011). Navození modelů neuropatické bolesti se většinou provádí skrz přímé poškození ischiadického (sedacího) nervu nebo spinálních nervů. Poškození může být částečné nebo úplné. Poškození může být modelováno pomocí volné ligace, chronického zúžení kolem celého sedacího nervu nebo těsné ligatury přes třetinu až polovinu proximálního sedacího nervu (Decosterd a Woolf, 2000; Smith, 2018). Po částečném nervovém poškození u hlodavců se objevuje ochranné chování a snížený práh bolesti vůči tepelným a mechanickým stimulům, který skutečně signalizuje přítomnost neuropatické bolesti (Campbell a Meyer, 2006).

U zvířat se částečné nervové poškození simuluje z jednoho prostého důvodu. Většina pacientů s neuropatickou bolestí trpí částečným poškozením nervů. Celkové poškození nervů se projevuje při amputaci jako takzvaná fantomová bolest. Studium jak periferní, tak centrální neuropatické bolesti zahrnuje veškeré dosud vytvořené modely neuropatické bolesti. Před těmito studiemi byly pouze testy měřící akutní nociceptivní bolest. Tyto testy se prokázaly jako irelevantní, jelikož většina klinických případů je spontánní bolest nebo hypersensitivita ke škodlivým či neškodlivým stimulům (Jaggi et al., 2011; Decosterd a Woolf, 2000).

I když je studium léčby neuropatické bolesti pomalé, přesto se vyvíjí nové léky, které se zdají být účinné na animálních modelech. Na základě slabé podobnosti ischiadického a spinálního nervu s anamnézou pacientů mající neuropatickou bolest se mohou zkoumat postupy nemoci a léčebné procesy, které jsou schopny zvrátit bolestivé stavy pozorované v těchto modelech (Smith, 2018). Vyvinuté léky se dostávají do klinických testů na základě pozitivních účinků na hlodavcích (Campbell a Meyer, 2006). Klinické testy ve většině případů nejsou úspěšné, jelikož zdánlivě úspěšná analgetika na lidech nefungují nebo navozují vedlejší účinky. Vývin nových léčebných postupů je důležitý, jelikož stárnutí populace, zvyšování přítomnosti diabetu mellitus nebo podstupování chemoterapie v důsledku protinádorové léčby se bude pravděpodobně zvyšovat (Colloca et al., 2017).

Následující odstavce budou zaměřeny především na animální modely simulující periferní neuropatickou bolest. Bude se mluvit o modelech, které se používají již od 80. let.

2.3.1. CCI

Model chronické konstriktce sedacího nervu neboli CCI (chronic constriction injury) byl vytvořen roku 1988. Během zákroku se vytvoří 4 volné ligatury okolo ischiadického (sedacího) nervu. Ligace je udělaná tak, že sedací nerv je velmi málo zúžený, hlavně proto, aby se nezastavila cirkulace přes povrchovou vaskulaturu. K testům zjišťujícím přítomnost neuropatické bolesti posléze dochází přibližně 7 dní po operaci. Hlavní myšlenkou vytvoření modelu chronické konstriktce sedacího nervu je vyvolání spontánní, přetrvávající bolesti, společně s hyperalgií a allodynii (Dalm et al., 2015; Bennett a Xie, 1988; Jaggi et al., 2011; Kim a Chung, 1992). Tento model je velice široce využíván k veškerému studiu výroby léčiv, chování a změn v somatosenzorickém systému (Decosterd a Woolf, 2000). Je také používán v mnohých experimentech měření spontánní bolesti, které budou popsány níže.

2.3.2. SNL

Ligace spinálního nervu, známá pod zkratkou SNL (spinal nerve ligation), je dalším modelem neuropatické bolesti. Byl vytvořen roku 1992. Během zákroku se udělá kompletní ligace spinálního nervu (L5, nebo L5 a L6). V tomto modelu je prokázán vývin mechanické allodynii, hyperalgie a spontánní bolesti, která se projevuje jako ochrana tlapky nebo kulhání. Na rozdíl od ostatních dvou popsaných modelů je rozšířenější chirurgický zákrok jedinou nevýhodou (Kim a Chung, 1992; Jaggi et al., 2011; Decosterd a Woolf, 2000).

3. Metody měření spontánní bolesti u CCI a SNL

Z důvodu nedostatečného výzkumu neuropatické spontánní bolesti se musely vytvořit metody, kterými se může dokázat její přítomnost. Těmito metodami se může i měřit. Přítomnost spontánní bolesti na animálních modelech nebylo až do nedávna možné zkoumat. Teprve roku 1988 se objevil první animální model neuropatické bolesti, založený na ligaci nervů. Ten je dodnes známý pod názvem chronická konstriktce sedacího nervu. Model ligace spinálního nervu byl následně popsán roku 1992. Zmíněné modely, většinou zdárně vykazující spontánní bolest,

byly velice pozitivně přijaty. Nyní se na nich provádí měření spontánní bolesti, které je prováděno metodami založených na nepřímém hodnocení behaviorálních změn (King et al., 2009; Dalm et al., 2015). Testy, které se začaly využívat na indikaci spontánní bolesti, přesahují obyčejné reflexní reakce, a většinou již zahrnují mozkové zpracování na základě naučených reakcí. Testování a měření afektivně motivační složky je v případě spontánní bolesti velmi těžké. Proto se v uplynulých letech vyvinulo testování právě této složky na základě různých testů, ať už podmiňovacích nebo testů založených na uniknutí a vyhnutí se (Li, 2013; Pedersen et al., 2007). Pro odhalení spontánní bolesti je nutno pozorovat změny v chování, které se mohou vyskytovat v podobě snížené lokomoce, přerušovaného spánku, snížení tělesné váhy nebo spontánního zvedání a ochrany tlapky (Kumar et al., 2018). Na volně pohybujících se zvířatech se využívají metody určení a měření spontánní bolesti. Tyto zvířata se většinou nachází v domácím prostředí klece, nebo jsou alespoň na nové prostředí habituovaná. Všechny tyto faktory přispívají k redukci stresu z prováděného experimentu (Tappe-Theodor a Kuner, 2014).

Výskyt spontánní bolesti u animálního modelu je důležitým ukazatelem, díky kterému může být hodnocena a vyvinuta případná léčba. Podstata mechanismů spontánní bolesti je velice důležitá pro vývin léků, zaměřených na potenciální léčbu (King et al., 2009). Léčba by globálně pomohla zlepšení bolesti, nebo alespoň jejím příznakům, a celkové úlevě od bolesti (Dalm et al., 2015).

V následujících odstavcích budou popsány metody měření a kvantifikace spontánní bolesti u modelu chronické konstriktce sedacího nervu a ligace spinálního nervu.

3.1. Podmíněná preference místa

Tento test je primárně používán k prokázání přítomnosti spontánní bolesti u animálních modelů neuropatické bolesti. Test, založený na podmíněné preferenci místa, byl představen roku 2009 u modelu ligace spinálního nervu (SNL). U tohoto modelu se zjistilo, že spontánní aktivita není vysoká, a proto se začaly provádět studie na modelu chronické konstriktce sedacího nervu (CCI). Bylo potřeba prozkoumat, zdali model CCI neprokazuje vyšší spontánní aktivitu. Zjistilo se, že tato metoda se nezdá být tolik účinná, a proto se v převážné většině používá model SNL (Dalm et al. 2015; Chapman et al., 1998; King et al., 2009).

Před provedením experimentu se u zvířete musí navodit neuropatická bolest. Proto dochází k vytvoření modelu chronické konstriktce sedacího nervu (CCI) nebo ligace spinálního

nervu (SNL). Aby se minimalizoval stres, zvířata jsou po dobu několika dní před podmiňováním podrobena pěti minutové manipulaci. Zvířata jsou dva dny před testem umístěná do testovacího aparátu. Ten se skládá ze dvou větších komůrek a jedné podlouhlé, která je spojuje. Dvě větší komůrky jsou od sebe odlišeny. Rozdíl může být vizuální nebo pachový. Po dobu 15 minut jsou zvířata volně ponechána v testovacím zařízení s možností volného pohybu po celém aparátu. Je měřeno, po jakou dobu se v určité komůrce hlodavci zdržují. Preferované a nepreferované komůrky jsou tím zaznamenány. Den nebo několik dnů před testem jsou zvířata podmiňována – umístěná do jedné ze dvou větších komůrek zvlášť. Doba ponechání hlodavce v každé komůrce zvlášť je 45 minut. V jedné komůrce je zvířeti podáno analgetikum, přičemž ve druhé ne. V den měření je hlodavec opět umístěn do testovacího aparátu, po kterém se může volně pohybovat. Předpokládá se, že zvíře bude preferovat komůrku, kterou má spárovanou s podáním analgetika, a které mu přinese úlevu od bolesti. Preference komůrky s analgetikem je známkou přetrvávající bolesti. Kontrolní skupiny zvířat jsou také testovány. Tato zvířata by neměla vykazovat preferenci určité komůrky, a tudíž nevykazovat potřebu podání analgetika. Doba účinnosti naučené preference místa je také závislá na paměťové možnosti zvířete (Tappe-Theodor a Kuner, 2014; Dalm et al., 2015).

Motivační silou u tohoto experimentu je úleva od bolesti. Pro relevantní výsledky podmíněné preference místa je velmi důležitý výběr analgetik, která nemají odměňující vlastnosti u zvířat nevykazujících tonickou bolest. U zvířat bez bolesti se analgetika neprokázala jako odměňující. U hlodavců se spontánní bolesti se projevila jako účinná - měla odměňující tendenci, a docházelo k uvolnění od přetrvávající bolesti (He et al., 2012). První a zároveň pozitivní test podmíněné preference místa dokazující přítomnost spontánní bolesti byl popsán roku 2009 na potkaním modelu SNL (King et al., 2009). V roce 2012 byla snaha prokázat přítomnost spontánní bolesti na myším modelu SNL. Detekce přítomnosti spontánní bolesti u myši může být složitější. Ale přesto se snaha u myšího modelu SNL podařila (He et al., 2012; Urban et al., 2011). V roce 2013 byla opět popsána přítomnost spontánní bolesti u potkaního modelu SNL (Wang et al., 2013). Následná studie v roce 2015 poprvé provedla podmíněnou preferenci místa u potkaního modelu CCI. U tohoto modelu se neprokázala přítomnost spontánní bolesti. Dalm a spol. navrhuje možnost, že by tento model neměl být používán k výzkumu spontánní bolesti, jelikož ji nepřináší (Dalm et al., 2015). Přítomnost spontánní bolesti u potkaního modelu SNL se opět potvrdila v roce 2017 (Bannister et al., 2017). Poslední studie v roce 2019 pozitivně prokázala přítomnost spontánní bolesti na myším

modelu CCI v závislosti na ethanolu (Neddenriep et al., 2019). Žádné znaky spontánní bolesti neprojevala ani bilaterální CCI (Datta et al., 2010).

U myši je prokázání spontánní, přetrvávající bolesti složitější, a proto se ve většině studií používá potkaní model. V několika studiích se potvrdilo, že myši velmi zřídka vykazují spontánní bolest. V roce 2011 bylo dokonce navrženo, že spontánní bolest u myši navodit nelze. Alespoň ne v měřítku, které se odráží do každodenního života zvířete. A proto je otázkou, zdali se experimenty mají stále provádět, a zdali je to k něčemu prospěšné (He et al., 2012; Urban et al., 2011).

3.2. Ultrasonické vokalizace

Přítomnost ultrasonických vokalizací je dokázána již od roku 1970 (Sewell, 1970). Nicméně až v posledních letech se ultrasonické vokalizace staly předmětem studia spontánní bolesti. Tyto vokalizace jsou vydávány hlodavci při různých situacích. Předpokládá se, že ultrasonické vokalizace jsou spojovány se stresovým či bolestivým chováním. Na základě provedených studií se usuzuje, že ultrasonické vokalizace mohou indikovat přetrvávající, spontánní bolesti (Tappe-Theodor a Kuner, 2014; Calvino et al., 1996).

Test je založen na zaznamenávání ultrasonických vokalizací, které jsou jedním ze dvou komponent zvuků vydávající hlodavci. Ultrasonické vokalizace nejsou lidskému uchu slyšitelné, nicméně u hlodavců mohou indikovat přítomnost bolesti nebo stresu. Existují systémy, které je detekují automaticky. Stresové nebo bolestivé vokalizace se typicky měří na frekvenci 20 až 28 kHz. Frekvence 22 kHz byla nejčastěji využívána k detekci nepříjemných pocitů hlodavce, včetně bolesti. Roku 2010 bylo zjištěno, že tato frekvence není pro detekci bolesti zcela ideální. A proto se začaly využívat vyšší či nižší frekvence. Měření vokalizací na určité frekvenci probíhá po dobu přibližně 12 minut zvlášť na každém zvířeti. Okolní zvuk může být problémem při nahrávání (Wallace et al., 2005; Kurejova et al., 2010).

První zmínka o přítomnosti ultrasonických vokalizací v návaznosti na bolest byla provedena v 70. letech. Ale až roku 2005 proběhlo první měření ultrasonických vokalizací na animálním modelu neuropatické bolesti. Toto měření nebylo účinné z pohledu spontánní bolesti, jelikož se vždy jednalo o měření závislé na určitém podnětu. Vyhodnocení bylo, že tato technika není vhodná pro hodnocení nebo kvantifikaci bolestivého chování u hlodavců. Místo toho bylo navrženo měření úzkosti (Wallace et al., 2005; Sewell, 1970). Úspěšné měření na myších s neuropatickou bolestí bylo provedeno v roce 2010. Zjistilo se, že měření vokalizací

musí probíhat po delší dobu, aby se naměřilo jejich spolehlivé množství indikující přítomnost bolesti. Byly používány frekvence mezi 37 a 50 kHz. Ukázalo, že dříve používaná frekvence 22kHz není vhodná pro měření, protože má pouze návaznost na úzkostné stavy. Mnoho neúspěšných předchozích studií právě měřilo na frekvenci 22 kHz (Kurejova et al., 2010). Studie založená na CCI byla provedená až roku 2019. Ultrasonické vokalizace se sledovaly po dobu 24 hodin v domácích klecích. Byly měřeny hedonické (50 kHz) a averzivní (20 kHz) ultrasonické vokalizace. Zkoumalo se, zdali tyto vokalizace mohou být použity k měření spontánní bolesti. Zvířata vykazovala snížené hedonické vokalizace 50 kHz. Také byly naměřeny zvýšené evokované a spontánně averzivní 20 kHz vokalizace. To znamená, že hedonické a averzivní ultrasonické vokalizace mohou být použity k modelaci měření spontánní bolesti. V budoucnosti se musí provést navazující studie, které budou dále charakterizovat význam ultrasonických vokalizací. Právě tyto vokalizace mohou být použity k zachycení základních mechanismů a symptomů chronické bolesti (Burgdorf et al., 2019).

3.3. Hrabání

Hrabání je jeden z projevů spontánního chování hlodavců. Je to zároveň ukazatel jejich pohody. Chronická bolest má velký dopad na pohodu pacientů, a proto je navrženo, že absence hrabání by mohla simulovat spontánní bolest u animálních modelů. Absence hrabání může být obnovena analgetiky v určitých modelech neuropatické bolesti, ale ne ve všech (Muralidharan et al. 2016; Rutten et al., 2018). Je to nepřímý ukazatel spontánní bolesti, jelikož nedochází k jakémukoliv vnějšímu zásahu.

Experiment probíhá v klecích z plexiskla, ve kterých jsou duté trubice otevřené pouze z jedné strany nebo nory, které jsou naplněny 2,5 kg křemenným pískem nebo šterkem. Pokud se v kleci nachází trubice, její otevřený konec je zvýšen 6 cm ode dna klece. Před experimentem musí proběhnout trénink skládající se ze dvou částí; sociální facilitace (zlepšení individuálního výkonu při práci s ostatními) a individuální trénink. Během sociální facilitace jsou potkani umístěni do klecí po dvou. V klecích jsou dva dny po sobě, po dobu 1-2 hodin. Je měřeno, kolik křemenného písku nebo šterku nahrabou. Po tréninku jsou potkani po dobu tří dnů individuálně umístěni do klecí. V těch jsou po dobu 30 minut, aby se mohlo naměřit množství nhrabaného písku nebo šterku, pro určení základní hodnoty hrabání. Na začátku dne experimentu jsou potkani individuálně umístěni do klecí, aby došlo k jejich habituaci. Následně je nora nebo trubice naplněná 2,5 kg šterku nebo písku, umístěna do klece, ve které potkani mohou hrabat po dobu 1-2 hodin. Vyhrabaný a zbývající šterk nebo křemenný písek se zváží na konci testu.

Dle toho se usoudí, zdali došlo ke zvýšení či snížení hrabání vlivem bolesti (Rutten et al., 2018; Andrews et al., 2012).

Zkoumání hrabání, jako indikátora spontánní bolesti na animálních modelech neuropatické bolesti, se začalo objevovat teprve v roce 2012. Test hrabání na potkaním modelu CCI byl proveden až roku 2016. Hrabání se po konstrikci sedacího nervu výrazně snížilo (Muralidharan et al., 2016). Rutten a spol. v roce 2018 pozorovali hrabání u potkanů po prodělané CCI. Potkani po CCI a potkani, kteří operaci neprodělali byli porovnaní po dobu 20 dnů. U potkanů s CCI se zjistilo, že došlo ke snížení hrabání. V porovnání se stejnými potkany před operací se hrabání výrazně snížilo 17 a 20 dní po operaci. Celkový deficit hrabání byl mírný, ale přesto nezanedbatelný. Reverzibilita absence hrabání byla zkoumaná určitými analgetiky, kterými se podařilo tento stav zvrátit. Byl to pregabalin, gabapentin a morfin (Rutten et al., 2018).

Testy jsou momentálně známé na animálním modelu CCI, testování na modelu SNL zatím neproběhlo.

3.4. Zatěžování tlapy

Zatěžování tlapek je také jeden z testů patřící k ukazatelům pohody u zvířat. Spontánní bolest se může reflektovat při kladení menší zátěže na zadní postiženou tlapku a vyvolání její deformace. Může se také projevit asymetrickým pohybem tlapek (Pitzer et al., 2016).

Studie v roce 2009 zkoumala zatěžování tlapy na animálním modelu CCI. Ukázalo se, že CCI potkani vykazovali výrazně menší zátěž na tlapku přesně týden po operaci. Bolest mohla být pozorovaná i na deformaci zadní tlapy zvířete (Nakazato-Imasato a Kurebayashi, 2009; Kawasaki-Yatsugi et al., 2012). Další analýza chůze u potkaních modelů CCI a SNL se provedla v roce 2009. Ke změnám chůze došlo u modelu CCI. Délka kroku se zkrátila a kontaktní oblast tlapy na plexisklo se zmenšila. U modelu SNL se chůze nezměnila. S celkovým výsledkem experimentu byl vysloven názor, že zatěžování tlapy nesouvisí s modelem neuropatické bolesti; CCI nebo SNL. Pokusy o zvrácení změn vyvolaných poškozením nervu analgetiky (gabapentin nebo duloxetine) byly neúspěšné (Piesla et al., 2009). Na potkaním modelu CCI bylo roku 2011 pozorováno přesunutí většiny váhy na přední tlapy, celkové zatěžování tlapy zasažené bolestí se snížilo o 58 % (Tétreault et al., 2011). Přítomnost spontánní bolesti u potkaního modelu CCI nerovnoměrnou distribucí končetin se v roce 2012 potvrdila hned dvakrát (Jørgensen et al., 2012; Munro et al., 2012). Roku 2015 byl následně

proveden test na potkanech s CCI. U tohoto experimentu byla pozorovaná nerovnoměrná distribuce tlapek po dobu 3 týdnů. Tlapka nezasazená operací byla výrazně preferovaná, a byla na ní kladena většina váhy zvířete. Je zde ale možnost, že se nemusí jednat o spontánní bolest, ale allodynii vyvolanou kontaktem tlapy s podlahou. Tato studie opět potvrdila, že tato metoda nemusí měřit spontánní bolest (Kim et al., 2015).

3.5. Pohyb končetin

V roce 2012 byla představená nová metoda detekující přítomnost spontánní bolesti. Potkanům s CCI byl implantován malý magnet do tlapy, dle čeho se automaticky měřilo její zatěžování a pohyb. Zvíře bylo aklimatizováno a umístěno do testovací komůrky. Veškeré informace se automaticky zaznamenávaly do počítače. Došlo také k vizuálnímu zhodnocení. Výsledky u vizuálního hodnocení přinesly zjištění, že potkani s CCI vykazovaly časté abnormální asymetrické pohyby obsahující zvedání tlapy, její strážení, cukání nebo třesení. Automatickým měřením byly zaznamenány stejné výsledky. Dle vizuálního měření se také zvýšila četnost pohybu tlapy. V porovnání s kontrolními skupinami byl pohyb u automatizovaného měření velmi zvýšen. Veškeré hodnocení se provádělo po dobu 6 týdnů. Na základě dosažených výsledků se může usuzovat, že zvíře trpělo spontánní bolestí. Problém nastává při posuzování naměřených výsledků jako relevantních. Otázkou je, zdali tato metoda opravdu dokazuje přítomnost spontánní bolesti. Studie, která byla provedena roku 2010 tvrdí, že zatěžování tlapy není důkazem spontánní bolesti. Tato studie z roku 2010 používá myši model, a proto je možná teorie, že myši spontánní bolest nepocítují nebo u nich není navoditelná. U studie z roku 2012 je několik pochybností. Zdá se, že tato metoda měření nerozlišuje bolestivé pohyby od chůze (Mogil et al., 2010; Kawasaki-Yatsugi et al., 2012). Na tento výzkum bylo určitým způsobem navázáno v roce 2017 na potkanech s CCI. Potkanům byly implantovány 2 magnety, první do tlapy zasaženou neuropatickou bolestí a druhý, silnější, do nezasazené tlapy. Výsledky se projeví u potkanů s CCI, kdy docházelo k častějšímu zvedání poraněné tlapy, než u sham operovaných potkanů (potkani, kteří nepodstoupili poškození nervu). Bylo znázorněno, že tato metoda odlišuje specifické bolestivé pohyby od chůze, a je doporučena k hodnocení přítomnosti spontánní bolesti (Niikura et al., 2017).

3.6. Nucené plavání

Předpokládá se, že navození neuropatické bolesti pomocí SNL nebo CCI má vyvolávat depresivní nebo úzkostlivé chování v návaznosti na přetrvávající bolest. Chování vykazující depresi či úzkost by se mělo projevit v jednom z testů, které přítomnost tohoto chování mají signalizovat (Urban et al., 2011). Nucené plavání hodnotí motivaci, která je součástí afektivně motivačního komponentu. Tento komponent se pojí se spontánní, přetrvávající bolestí. Je dokázaná korelace mezi chronickou bolestí a úzkostlivým, depresivním chováním, a právě proto se toto chování hodnotí pomocí neinvazivních metod. Na základě toho se posuzuje případná přítomnost spontánní bolesti (Jesse et al., 2010). Proběhlo či probíhá mnoho výzkumů na prokázání přítomnosti depresivního chování, ale výsledky veškerých studiích se velice liší.

Během testu jsou hlodavci po jednom umístění do skleněné nádoby s vodou. Hloubka vody je 15-19 cm, aby se zvířata nemohla dotknout dna. V nádobě jsou ponecháni po dobu šesti minut. Jejich celková aktivita je pozorovaná a hodnocená. Jako znak depresivního chování je imobilita hlodavce ve vodě, kromě nezbytných úkonů k udržení hlavy nad vodou. Testy jsou prováděné na myších a potkanech, ale o relevantnosti využití myši se stále spekuluje (Jesse et al., 2010; Urban et al., 2011).

V roce 2007 se provedl experiment na myších se SNL. Při testu se projevila zvýšená imobilita 15 a 30 dnů po navození neuropatické bolesti (Suzuki et al., 2007). Roku 2010 byl proveden test na CCI myších, které opět vykazovaly depresivní chování během testu projevující se jako zvýšená imobilita zvířete (Jesse et al., 2010). Podobným výsledkům se dostalo roku 2019, když u potkanů s CCI došlo ke snížené mobilitě 15 a 29 dní po operaci (Jiang et al., 2019). Snížená mobilita během testu se ve stejném roce projevila u CCI myši (Li et al., 2019). Následně provedený test v roce 2019 nepotvrdil žádné znaky depresivního chování (imobility) u CCI myši. Neúspěchem mohlo být příliš brzké testování zvířat (Karl et al., 2019). Ve stejný rok bylo opět potvrzeno, že vyvolání neuropatické bolesti pomocí chronické konstriktce sedacího nervu (CCI) u myši značí depresivní chování, a tudíž předpokládá přítomnost spontánní bolesti (Medeiros et al., 2019). Nejisté a velmi rozdílné výsledky jsou stále spekulací o tom, zdali tento test je vhodný ke studiu a výzkumu chování značící depresi a úzkost v závislosti na spontánní bolesti.

3.7. Preference cukrové vody

Při testu preference cukrové vody se sleduje přítomnost ahedonie, která je jedním z důležitých projevů deprese. Po dobu 72 hodin před provedením testu jsou zvířata umístěna v kleci se dvěma láhvemi 1% cukerného roztoku. Na dalších 24 hodin je následně jedna láhev cukerného roztoku vyměněna za vodu. V dalších 24 hodinách jsou dvě láhve umístěny na různá místa v kleci, jedna s cukerným roztokem a druhá s vodou. Během toho jsou láhve přemístěny na jiná místa, aby nedošlo k preferenci určité strany. Během testu je měřeno spotřebované množství vody a cukerného roztoku. Hlavním měřeným parametrem je procento preference cukerného roztoku. Procento je vypočteno jako podíl zkonsumovaného cukerného roztoku s celkovým příjmem tekutin. Procento u standardních hlodavců může být až 90. Ahedonie je považována za přítomnou, pokud procento preference cukrové vody klesne pod 65 % (Li et al, 2017; Urban et al., 2011).

V roce 2015 se provedl test preference cukrové vody na myším modelu CCI. Ten ale pokles preference neprokázal (Baptista-de-Souza et al., 2015). Další test na modelu neuropatické bolesti se provedl v roce 2017. Testování SNL potkani vykazovali snížený příjem cukrové vody (Hu et al., 2017). Ve stejný rok se zjistilo, že testování CCI potkani měli nižší příjem cukerného roztoku 28 dní po operaci. To potvrdilo, že potkani model CCI vykazuje depresivní chování (Li et al., 2017). Na základě dostupných studií založených na modelech CCI nebo SNL se mohou pozorovat různé výsledky. Ahedonie se může objevovat jako reakce na stres, a proto je stále potřeba provádět testy, které budou dokazovat její přítomnost. Stres se v tomto případě objevuje v podobě bolesti (Hu et al., 2017).

4. Závěr

Neustále se provádí mnoho výzkumů na zjištění podstaty a vyléčení spontánní, přetrvávající bolesti. Studie, provedené do dnešního dne, se stále zdají být nepostačující. Testy na spontánní bolest se řádně začaly provádět až v posledních 10 letech, což může být jeden z důvodů nedostatečnosti poznatků. K výzkumu spontánní bolesti jsou využívány animální modely. K navození neuropatické bolesti u animálních modelů dochází k invazivnímu zásahu na nervech. Potkani a myši jsou zatím nejspolehlivější modely pro testování přítomnosti a léčby spontánní bolesti. Využití zvířat s sebou přináší mnoho limitací. U myši se vyskytuje vysoká intolerance ke specifickému zacházení u různých testů, a proto u výzkumů dochází k preferenci potkanů. Přítomnost vnějších vlivů na hlodavce je také velice podstatná. Jejich umístění v klecích, které se podobají standardnímu prostředí hlodavců, je velice důležité. Vnější aspekty snižující pohodlí, při kterých se mohou hlodavci dostávat do stresu, jsou také významné. Stres může velice viditelně ovlivňovat bolestivé chování nebo veškeré chování, které se mu může podobat. Nevýhodou posuzování a měření testů je, že se hlodavci nemohou verbálně vyjadřovat. Nemohou sdělit lokaci a intenzitu bolesti. Animální modely jsou přesto nejvíce využívány k výzkumu spontánní bolesti, jelikož se ukázaly jako prozatímne dostatečně spolehlivé.

Přímé poškození nervů je velmi často používáno k navození neuropatické bolesti a jejímu studiu. Bylo vynalezeno několik modelů neuropatické bolesti, včetně SNL a CCI. Ty mají za úkol navodit evokovanou a spontánní bolest. To se ale u některých testů nezdá být účinné. Mnoho studií měřící spontánní bolest její přítomnost nepotvrdila. Neobjevovaly se behaviorální projevy spontánní bolesti, které by reflektovaly její přítomnost. Tyto projevy se stále zkoumají, ale skoro v žádném výzkumu není možnost stoprocentní indikace její přítomnosti. Mohou se vyskytovat určité projevy spontánní bolesti, na které zatím výzkum nenarazil. V několika publikacích bylo navrženo, že CCI vůbec nenavozuje spontánní bolest, nebo pouze na krátkou dobu, což může být doznívající reakce na proběhlou bolest z operativního zásahu. Model SNL se v některých případech zdá, že ji navozuje slabě. Tyto poznatky podporují výsledky výzkumů, které byly popsány v této práci. U studií se pravidelně střídaly výsledky prokazující či neprokazující přítomnost spontánní bolesti v závislosti na modelu CCI nebo SNL. U myšího modelu se také ukazuje, že navozením neuropatické bolesti pomocí přímých zásahů na nervech nevykazuje žádné, nebo alespoň doposud známé projevy

přítomnosti spontánní bolesti. V roce 2010 bylo dokonce navrženo, že spontánní bolest neexistuje nebo ji alespoň nemůžeme měřit. To by znamenalo, že by bolest byla vždy evokovaná. Tento výrok nekoreluje s novějšími studiemi, které přítomnost spontánní bolesti téměř jistě potvrzují (Mogil et al., 2010).

Po provedených studiích dochází k nalézání nových látek, které se zdají být účinné na hlodavcích. Je ale zapotřebí provést klinické testy, které prokáží, zdali nově nalezená analgetika fungují i na lidech. Na tomto stupni výzkumu se nejčastěji objeví problémy. Nejčastějšími problémy jsou, že nalezené látky účinné u hlodavců nejsou účinné u lidí, účinnost léků je nepostačující nebo dochází k vedlejším účinkům.

U mnoha testů odkazujících se na měření spontánní bolesti se ukázalo, že k testování využívají ve většině případů určitý externí stimul. Způsobů měření spontánní, přetrvávající bolesti neinvazivním způsobem na modelech SNL a CCI je opravdu málo. Nalezené testy, nejspolehlivěji měřící spontánní bolest, mohou být metoda podmíněné preference místa, ultrasonické vokalizace nebo pohyb končetin. Při vyhledávání článků se opakovaně objevuje neustálená terminologie pojmů „spontaneous“, „ongoing“ a „tonic“.

Spontánní bolest je stále výzvou pro vědce, kteří musí objevit její podstatu, projevy u animálních modelů, zaměřit se na správné molekulární cíle a obstát klinické testy, pro úspěšné vynalezení analgetik a pomoci odlevení pacientům od spontánní bolesti. Další výzkum je zejména důležitý z hlediska přibývajících jedinců s nemocemi, jejichž dlouhodobé příznaky vykazují spontánní bolest. Proto je hledání cest měření spontánní bolesti u animálních modelů téma velmi aktuální a důležité.

5. Literatura

ALLCHORNE, Andrew J, Daniel C BROOM a Clifford J WOOLF. Detection of Cold Pain, Cold Allodynia and Cold Hyperalgesia in Freely Behaving Rats. *Molecular Pain*. 2005, **1**. DOI: 10.1186/1744-8069-1-36. ISSN 1744-8069.

AMBLER, Zdeněk. Neuropatická bolest - mechanismus, příčiny a možnosti farmakoterapie. *Neurologie pro praxi*. 2007, **2**, 107–110.

ANDREWS, N., E. LEGG, D. LISAK, et al. Spontaneous burrowing behaviour in the rat is reduced by peripheral nerve injury or inflammation associated pain. *European Journal of Pain*. 2012, **16**(4), 485-495. DOI: 10.1016/j.ejpain.2011.07.012. ISSN 10903801.

ANSELONI, Vanessa C.Z., Matthew ENNIS a Michael S. LIDOW. Optimization of the mechanical nociceptive threshold testing with the Randall–Selitto assay. *Journal of Neuroscience Methods*. 2003, **131**(1-2), 93-97. DOI: 10.1016/S0165-0270(03)00241-3. ISSN 01650270.

AUVRAY, Malika, Erik MYIN a Charles SPENCE. The sensory-discriminative and affective-motivational aspects of pain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2010, **34**, 214–223. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2008.07.008.

BANNISTER, Kirsty, Chaoling QU, Edita NAVRATILOVA, Janice OYARZO, Jennifer Yanhua XIE, Tamara KING, Anthony H. DICKENSON a Frank PORRECA. Multiple sites and actions of gabapentin-induced relief of ongoing experimental neuropathic pain. *Pain*. 2017, **158**(12), 2386-2395. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001040.

BANNON, Anthony W. a Annika B. MALMBERG. Models of Nociception: Hot-Plate, Tail-Flick, and Formalin Tests in Rodents. *Current Protocols in Neuroscience*. 2007, **41**(1). DOI: 10.1002/0471142301.ns0809s41. ISSN 1934-8584.

BAPTISTA-DE-SOUZA, Daniela, Ana C. NUNCIATO, Barbara C. PEREIRA, Gabriel FACHINNI, Caroline R. ZANIBONI a Azair CANTO-DE-SOUZA. Mice undergoing neuropathic pain induce anxiogenic-like effects and hypernociception in cagemates. *Behavioural Pharmacology*. 2015, **26**, 664-672. DOI: 10.1097/FBP.0000000000000170. ISSN 0955-8810.

BARON, Ralf, Andreas BINDER a Gunnar WASNER. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *The Lancet Neurology*. 2010, **9**(8), 807-819. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70143-5. ISSN 14744422.

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*. 2012, **211**, 39-50. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.041. ISSN 03064522.

BENNETT, Gary J. a Y.-K. XIE. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988, **33**(1), 87-107. DOI: 10.1016/0304-3959(88)90209-6. ISSN 0304-3959.

BENNETT, Gary J. What Is Spontaneous Pain and Who Has It? *The Journal of Pain*. 2012, **13**(10), 921-929. DOI: 10.1016/j.jpain.2012.05.008. ISSN 15265900.

BESSOU, P. a E. R. PERL. Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *Journal of Neurophysiology*. 1969, **32**(6), 1025-1043. DOI: 10.1152/jn.1969.32.6.1025.

BOYCE-RUSTAY, Janel a Michael JARVIS. Neuropathic Pain: Models and Mechanisms. *Current Pharmaceutical Design*. 2009, **15**(15), 1711-1716. DOI: 10.2174/138161209788186272. ISSN 13816128.

BURGDORF, Jeffrey S., Nayereh GHOREISHI-HAACK, Cassia N. CEARLEY, Roger A. KROES a Joseph R. MOSKAL. Rat ultrasonic vocalizations as a measure of the emotional component of chronic pain. *NeuroReport*. 2019, **30**(13), 863-866. DOI: 10.1097/WNR.0000000000001282. ISSN 0959-4965.

CALVINO, Bernard, Jean Marie BESSON, Annie BOEHRER a Antoine DEPAULIS. Ultrasonic vocalization (22–28 kHz) in a model of chronic pain, the arthritic rat. *NeuroReport*. 1996, **7**(2), 581-584. DOI: 10.1097/00001756-199601310-00049. ISSN 0959-4965

CAMPBELL, James N. a Richard A. MEYER. Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron*. 2006, **52**(1), 77-92. DOI: 10.1016/j.neuron.2006.09.021. ISSN 08966273.

CASEY, Kenneth L. Forebrain mechanisms of nociception and pain: Analysis through imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999, **96**(14), 7668–7674. DOI: 10.1073/pnas.96.14.7668.

CHAPLAN, S.R., F.W. BACH, J.W. POGREL, J.M. CHUNG a T.L. YAKSH. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*. 1994, **53**(1), 55-63. DOI: 10.1016/0165-0270(94)90144-9. ISSN 01650270.

CHAPMAN, C. R., K. L. CASEY, R. DUBNER, K. M. FOLEY, R. H. GRACELY a A. E. READING. Pain measurement: an overview. *Pain* [online]. 1985, **22**(1), 1-31 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/0304-3959(85)90145-9. ISSN 0304-3959.

CHAPMAN, Victoria, Rie SUZUKI a Anthony H. DICKENSON. Electrophysiological characterization of spinal neuronal response properties in anaesthetized rats after ligation of spinal nerves L5-L6. *The Journal of Physiology*. 1998, **507**(3), 881-894. DOI: 10.1111/j.1469-7793.1998.881bs.x. ISSN 00223751.

COLLOCA, Luana, Taylor LUDMAN, Didier BOUHASSIRA *et al.* Neuropathic pain. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017, **3**, 17002. DOI: 10.1038/nrdp.2017.2.

CROOK, Robyn J. a Edgar T. WALTERS. Nociceptive Behavior and Physiology of Molluscs: Animal Welfare Implications. *ILAR Journal*. 2011, **52**(2), 185–195. DOI: doi.org/10.1093/ilar.52.2.185.

DALM, Brian D., Chandan G. REDDY, Matthew A. HOWARD, Sinyoung KANG a Timothy J. BRENNAN. Conditioned place preference and spontaneous dorsal horn neuron activity in chronic constriction injury model in rats. *Pain*. 2015, **156**(12), 2562-2571. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000000365.

DATTA, Sukdeb, Koel CHATTERJEE, Robert H KLINE a Ronald G WILEY. Behavioral and Anatomical Characterization of the Bilateral Sciatic Nerve Chronic Constriction (bCCI) Injury: Correlation of Anatomic Changes and Responses to Cold Stimuli. *Molecular Pain*. 2010, **6**. DOI: 10.1186/1744-8069-6-7. ISSN 1744-8069.

DECOSTERD, Isabelle a Clifford J. WOOLF. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*. 2000, **87**(2), 149-158. DOI: 10.1016/S0304-3959(00)00276-1. ISSN 0304-3959.

DEFRIN, Ruth, Smadar PELEG, Harold WEINGARDEN, Rafi HERUTI a Gideon URCA. Differential effect of supraspinal modulation on the nociceptive withdrawal reflex and pain sensation. *Clinical Neurophysiology*. 2007, **118**(2), 427-437. DOI: 10.1016/j.clinph.2006.10.015. ISSN 13882457.

DEUIS, Jennifer R., Lucie S. DVORAKOVA a Irina VETTER. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2017, **10**, 284. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00284.

DJOUHRI, L., Stella KOUTSIKOU, Xin FANG, Simon MCMULLAN a Sally N. LAWSON. Spontaneous Pain, Both Neuropathic and Inflammatory, Is Related to Frequency of Spontaneous Firing in Intact C-Fiber Nociceptors. *Journal of Neuroscience*. 2006, **26**(4), 1281-1292. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3388-05.2006. ISSN 0270-6474.

DUBIN, Adrienne E. a Ardem PATAPOUTIAN. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *Journal of Clinical Investigation*. 2010, **120**(11), 3760-3772. DOI: 10.1172/JCI42843. ISSN 0021-9738.

FINNERUP, Nanna B., Simon HAROUTOUNIAN, Peter KAMERMAN, et al. Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. *PAIN*. 2016, **157**(8), 1599-1606. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000000492. ISSN 0304-3959.

GOLD, Michael S a Gerald F GEBHART. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nature Medicine*. 2010, **16**(11), 1248-1257. DOI: 10.1038/nm.2235. ISSN 1078-8956.

GOMTSIAN, Lusine, Kirsty BANNISTER, Nathan EYDE, Dagoberto ROBLES, Anthony H. DICKENSON, Frank PORRECA a Edita NAVRATILOVA. Morphine effects within the rodent anterior cingulate cortex and rostral ventromedial medulla reveal separable modulation of affective and sensory qualities of acute or chronic pain. *PAIN*. 2018, **159**(12), 2512-2521. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001355. ISSN 0304-3959.

GONZALEZ-CANO, Rafael, Bruno BOIVIN, Daniel BULLOCK, Laura CORNELISSEN, Nick ANDREWS a Michael COSTIGAN. Up–Down Reader: An Open Source Program for Efficiently Processing 50% von Frey Thresholds. *Frontiers in Pharmacology*. 2018, **9**. DOI: 10.3389/fphar.2018.00433. ISSN 1663-9812.

HANDWERKER, H. O. a G. KOBAL. Psychophysiology of experimentally induced pain. *Physiological Reviews*. 1993, **73**(3), 639–671. DOI: 10.1152/physrev.1993.73.3.639. ISSN 0031-9333.

HE, Ying, Xuebi TIAN, Xiaoyu HU, Frank PORRECA a Zaijie Jim WANG. Negative Reinforcement Reveals Non-Evoked Ongoing Pain in Mice With Tissue or Nerve Injury. *The Journal of Pain*. 2012, **13**(6), 598-607. DOI: 10.1016/j.jpain.2012.03.011. ISSN 15265900.

HESTEHAVE, Sara, Klas SP. ABELSON, Tina BRØNNUM PEDERSEN a Gordon MUNRO. Stress sensitivity and cutaneous sensory thresholds before and after neuropathic injury in various inbred and outbred rat strains. *Behavioural Brain Research*. 2019, **375**. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.112149. ISSN 01664328.

HU, Xiaofan, Yulin DONG, Xiaohang JIN, Chunkui ZHANG, Ting ZHANG, Jie ZHAO, Juan SHI a Jinlian LI. The novel and potent anti-depressive action of triptolide and its influences on hippocampal neuroinflammation in a rat model of depression comorbidity of chronic pain. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2017, **64**, 180-194. DOI: 10.1016/j.bbi.2017.03.005. ISSN 08891591.

IASP, Task Force on Taxonomy, MERSKEY, H. a N. BOGDUK, ed. Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage: Classification of Chronic Pain, Second Edition. In: *IASP Terminology* [online]. Seattle: IASP Press, 1994, s. 209-214 [cit. 2020-02-18]. Dostupné z: <https://www.iasp-pain.org/terminology?navItemNumber=576>

IASP. *IASP's Proposed New Definition of Pain Released for Comment* [online]. IASP, 2019 [cit. 2020-02-17]. Dostupné z: <https://www.iasp-pain.org/PublicationsNews/NewsDetail.aspx?ItemNumber=9218>

JAGGI, Amteshwar Singh, Vivek JAIN a Nirmal SINGH. Animal models of neuropathic pain. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2011, **25**(1), 1-28. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2009.00801.x. ISSN 07673981.

JESSE, Cristiano R., Ethel A. WILHELM a Cristina W. NOGUEIRA. Depression-like behavior and mechanical allodynia are reduced by bis selenide treatment in mice with chronic constriction injury: a comparison with fluoxetine, amitriptyline, and bupropion. *Psychopharmacology*. 2010, **212**(4), 513-522. DOI: 10.1007/s00213-010-1977-6. ISSN 0033-3158.

JIANG, Hai-xia, Bo-wen KE, Jin LIU, Gang MA, Ke-rong HAI, De-ying GONG, Zheng YANG a Cheng ZHOU. Inhibition of Fatty Acid Amide Hydrolase Improves Depressive-Like Behaviors Independent of Its Peripheral Antinociceptive Effects in a Rat Model of

Neuropathic Pain. *Anesthesia & Analgesia*. 2019, **129**(2), 587-597. DOI: 10.1213/ANE.00000000000003563. ISSN 0003-2999.

JØRGENSEN, Jesper Roland, Xiao-Jun XU, H. Moore ARNOLD, et al. Meteorin reverses hypersensitivity in rat models of neuropathic pain. *Experimental Neurology*. 2012, **237**(2), 260-266. DOI: 10.1016/j.expneurol.2012.06.027. ISSN 00144886.

KARL, Franziska, Maria B. Nandini COLAÇO, Annemarie SCHULTE, Claudia SOMMER a Nurcan ÜÇEYLER. Affective and cognitive behavior is not altered by chronic constriction injury in B7-H1 deficient and wildtype mice. *BMC Neuroscience*. 2019, **20**(1). DOI: 10.1186/s12868-019-0498-4. ISSN 1471-2202.

KAWASAKI-YATSUGI, S., Y. NAGAKURA, S. OGINO, et al. Automated measurement of spontaneous pain-associated limb movement and drug efficacy evaluation in a rat model of neuropathic pain. *European Journal of Pain*. 2012, **16**(10), 1426-1436. DOI: 10.1002/j.1532-2149.2012.00142.x. ISSN 10903801.

KIM HO, Sun a Jin MO CHUNG. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*. 1992, **50**(3), 355-363. DOI: 10.1016/0304-3959(92)90041-9. ISSN 0304-3959.

KIM, Hung Tae, Kazuhiro UCHIMOTO, Tyler DUELLMAN a Jay YANG. Automated assessment of pain in rats using a voluntarily accessed static weight-bearing test. *Physiology & Behavior*. 2015, **151**, 139-146. DOI: 10.1016/j.physbeh.2015.06.035. ISSN 00319384.

KING, Tamara, Louis VERA-PORTOCARRERO, Tannia GUTIERREZ, Todd W VANDERAH, Gregory DUSSOR, Josephine LAI, Howard L FIELDS a Frank PORRECA. Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nature Neuroscience*. 2009, **12**(11), 1364-1366. DOI: 10.1038/nn.2407. ISSN 1097-6256.

KLIMEK, Ludger, Karl-Christian BERGMANN, Tilo BIEDERMANN, et al. Visual analogue scales (VAS): Measuring instruments for the documentation of symptoms and therapy monitoring in cases of allergic rhinitis in everyday health care. *Allergo Journal International*. 2017, **26**(1), 16-24. DOI: 10.1007/s40629-016-0006-7. ISSN 2197-0378.

KUMAR, Anil, Harshpreet KAUR a Arti SINGH. Neuropathic Pain models caused by damage to central or peripheral nervous system. *Pharmacological Reports*. 2018, **70**(2), 206-216. DOI: 10.1016/j.pharep.2017.09.009. ISSN 17341140.

KUREJOVA, Martina, Ulrike NATTENMÜLLER, Ullrich HILDEBRANDT, Deepitha SELVARAJ, Sebastian STÖSSER a Rohini KUNER. An Improved Behavioural Assay Demonstrates That Ultrasound Vocalizations Constitute a Reliable Indicator of Chronic Cancer Pain and Neuropathic Pain. *Molecular Pain*. 2010, **6**. DOI: 10.1186/1744-8069-6-18. ISSN 1744-8069.

LABUDA, Christopher J. a Perry N. FUCHS. A Behavioral Test Paradigm to Measure the Aversive Quality of Inflammatory and Neuropathic Pain in Rats. *Experimental Neurology*. Texas, 2000, **163**(2), 490–494. DOI: 10.1006/exnr.2000.7395.

LI, Jun-Xu. The application of conditioning paradigms in the measurement of pain. *European Journal of Pharmacology*. 2013, **716**(1-3), 158-168. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.03.002. ISSN 00142999.

LI, Yanhui, Yumeng WANG, Chengluan XUAN, Yang LI, Lianhua PIAO, Jicheng LI a Hua ZHAO. Role of the Lateral Habenula in Pain-Associated Depression. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2017, **11**. DOI: 10.3389/fnbeh.2017.00031. ISSN 1662-5153.

LI, Yongfeng, Jianyu ZHU, Qiaohua ZHENG, et al. 5-HT_{1A} autoreceptor in dorsal raphe nucleus mediates sensitization of conditioned place preference to cocaine in mice experienced with chronic pain. *NeuroReport*. 2019, **30**(9), 681-687. DOI: 10.1097/WNR.0000000000001260. ISSN 0959-4965.

MEDEIROS, Priscila, Renato Leonardo FREITAS, Serena BOCCELLA, et al. Characterization of the sensory, affective, cognitive, biochemical, and neuronal alterations in a modified chronic constriction injury model of neuropathic pain in mice. *Journal of Neuroscience Research*. 2019, **98**(2), 338-352. DOI: 10.1002/jnr.24501. ISSN 0360-4012.

MELZACK, R. a K. L. CASEY. Sensory, motivational, and central control determinants of pain: A new conceptual model. KENSHALO, Dan R., ed. *The Skin Senses*. Charles C. Thomas, 1968, s. 423-443.

MOGIL, Jeffrey S, Allyson C GRAHAM, Jennifer RITCHIE, Sara F HUGHES, Jean-Sebastien AUSTIN, Ara SCHORSCHER-PETCU, Dale J LANGFORD a Gary J BENNETT. Hypolocomotion, Asymmetrically Directed Behaviors (Licking, Lifting, Flinching, and Shaking) and Dynamic Weight Bearing (Gait) Changes are Not Measures of Neuropathic Pain in Mice. *Molecular Pain*. 2010, **6**. DOI: 10.1186/1744-8069-6-34. ISSN 1744-8069.

MOGIL, Jeffrey S. Animal models of pain: progress and challenges. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009, **10**, 283–294. DOI: 10.1038/nrn2606.

MUNRO, Gordon, Ann STORM, Merete K. HANSEN, Helene DYHR, Lotte MARCHER, Helle K. ERICHSEN a Majid SHEYKHZADE. The combined predictive capacity of rat models of algogen-induced and neuropathic hypersensitivity to clinically used analgesics varies with nociceptive endpoint and consideration of locomotor function. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2012, **101**(3), 465-478. DOI: 10.1016/j.pbb.2012.02.008. ISSN 00913057.

MURALIDHARAN, Arjun, Andy KUO, Meera JACOB, Jacintha S. LOURDESAMY, Lara Melo Soares Pinho De CARVALHO, Janet R. NICHOLSON, Laura CORRADINI a Maree T. SMITH. Comparison of Burrowing and Stimuli-Evoked Pain Behaviors as End-Points in Rat Models of Inflammatory Pain and Peripheral Neuropathic Pain. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2016, **10**. DOI: 10.3389/fnbeh.2016.00088. ISSN 1662-5153.

NAKAZATO-IMASATO, Etsuko a Yoichi KUREBAYASHI. Pharmacological characteristics of the hind paw weight bearing difference induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Life Sciences*. 2009, **84**(17-18), 622-626. DOI: 10.1016/j.lfs.2009.02.014. ISSN 00243205.

NEDDENRIEP, Bradley, Deniz BAGDAS, Katherine M. CONTRERAS, Joseph W. DITRE, Jennifer T. WOLSTENHOLME, Michael F. MILES a M. Imad DAMAJ. Pharmacological mechanisms of alcohol analgesic-like properties in mouse models of acute and chronic pain. *Neuropharmacology*. 2019, **160**. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2019.107793. ISSN 00283908.

NIKURA, Kazuaki, Yuko TAKAHASHI, Masanobu IINO, Yukiko FUNATSU a Ritsuko MATSUDA. An automated method by which effects of compounds on locomotor activity and spontaneous neuropathic pain-specific movements can be simultaneously evaluated in rats with chronic-constriction nerve injury. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017, **96**, 551-559. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.10.037. ISSN 09280987.

PEDERSEN, Louise Henriette, Jørgen SCHEEL-KRÜGER a Gordon BLACKBURN-MUNRO. Amygdala GABA-A receptor involvement in mediating sensory-discriminative and affective-motivational pain responses in a rat model of peripheral nerve injury. *Pain*. 2007, **127**, 17–26. DOI: 10.1016/j.pain.2006.06.036.

PEYRON, R., B. LAURENT a L. GARCÍA-LARREA. Functional imaging of brain responses to pain. A review and meta-analysis. *Clinical neurophysiology*. 2000, **30**(5), 263-288. DOI: 10.1016/s0987-7053(00)00227-6.

PEYRON, Roland, Luis GARCÍA-LARREA, Marie-Claude GRÉGOIRE, et al. Haemodynamic brain responses to acute pain in humans: Sensory and attentional networks. *Brain*. 1999, **122**(9), 1765–1780. DOI: 10.1093/brain/122.9.1765.

PIESLA, Michael J., Liza LEVENTHAL, Brian W. STRASSLE, James E. HARRISON, Terri A. CUMMONS, Peimin LU a Garth T. WHITESIDE. Abnormal gait, due to inflammation but not nerve injury, reflects enhanced nociception in preclinical pain models. *Brain Research*. 2009, **1295**, 89-98. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.07.091. ISSN 00068993.

PITZER, Claudia, Rohini KUNER a Anke TAPPE-THEODOR. Voluntary and evoked behavioral correlates in neuropathic pain states under different social housing conditions. *Molecular Pain*. 2016, **12**. DOI: 10.1177/1744806916656635. ISSN 1744-8069.

PRICE, Donald D. a Stephen W. HARKINS. The affective-motivational dimension of pain A two-stage model. *APS Journal*. 1992, **1**(4), 229-239. DOI: 10.1016/1058-9139(92)90054-G.

QU, Chaoling, Tamara KING, Alec OKUN, Josephine LAI, Howard L. FIELDS a Frank PORRECA. Lesion of the rostral anterior cingulate cortex eliminates the aversiveness of spontaneous neuropathic pain following partial or complete axotomy. *Pain*. 2011, **152**(7), 1641-1648. DOI: 10.1016/j.pain.2011.03.002. ISSN 0304-3959.

RANDALL, LO a JJ SELITTO. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*. 1957, **111**(4), 409-419.

RUTTEN, Kris, Stacey A. GOULD, Luke BRYDEN, Henri DOODS, Thomas CHRISTOPH a Anton PEKCEC. Standard analgesics reverse burrowing deficits in a rat CCI model of neuropathic pain, but not in models of type 1 and type 2 diabetes-induced neuropathic pain. *Behavioural Brain Research*. 2018, **350**, 129-138. DOI: 10.1016/j.bbr.2018.04.049. ISSN 01664328.

SANDKÜHLER, Jürgen. Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia. *Physiological Reviews*. 2009, **89**(2), 707-758. DOI: 10.1152/physrev.00025.2008. ISSN 0031-9333.

SCHOLZ, Joachim, Nanna B. FINNERUP, Nadine ATTAL, et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11. *PAIN*. 2019, **160**(1), 53-59. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001365. ISSN 0304-3959.

SELZTER, Zeev a Yoram SHIR. Sympathetically-maintained Causalgiform Disorders in a Model for Neuropathic Pain: A Review. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 1991, **2**(1-2). DOI: 10.1515/JBCPP.1991.2.1-2.17. ISSN 2191-0286

SEWELL, GILLIAN D. Ultrasonic Communication in Rodents. *Nature*. 1970, **227**(5256), 410-410. DOI: 10.1038/227410a0. ISSN 0028-0836.

SEWELL, Robert D. E. Neuropathic pain models and outcome measures: a dual translational challenge. *Annals of Translational Medicine*. 2018, **6**(S1), S42-S42. DOI: 10.21037/atm.2018.09.58. ISSN 23055839.

SMITH, Ewan St. John. Advances in understanding nociception and neuropathic pain. *Journal of Neurology*. 2018, **265**(2), 231–238. DOI: 10.1007/s00415-017-8641-6.

SUZUKI, Takahiro, Mitsuyuki AMATA, Gaku SAKAUE, Shinya NISHIMURA, Takaya INOUE, Masahiko SHIBATA a Takashi MASHIMO. Experimental Neuropathy in Mice Is Associated with Delayed Behavioral Changes Related to Anxiety and Depression. *Anesthesia & Analgesia*. 2007, **104**(6), 1570-1577. DOI: 10.1213/01.ane.0000261514.19946.66. ISSN 0003-2999.

TAL, Michael a Eli ELIAV. Abnormal discharge originates at the site of nerve injury in experimental constriction neuropathy (CCI) in the rat. *Pain*. 1996, **64**(3), 511-518. DOI: 10.1016/0304-3959(95)00175-1. ISSN 0304-3959.

TAPPE-THEODOR, Anke a Rohini KUNER. Studying ongoing and spontaneous pain in rodents - challenges and opportunities. *European Journal of Neuroscience*. 2014, **39**(11), 1881-1890. DOI: 10.1111/ejn.12643. ISSN 0953816X.

TÉTREAU, Pascal, Marc-André DANSEREAU, Louis DORÉ-SAVARD, Nicolas BEAUDET a Philippe SARRET. Weight bearing evaluation in inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats. *Physiology & Behavior*. 2011, **104**(3), 495-502. DOI: 10.1016/j.physbeh.2011.05.015. ISSN 00319384.

TREEDE, Rolf-Detlef, Daniel R. KENSHALO, Richard H. GRACEY a Anthony K. P. JONES. The cortical representation of pain. *Pain*. 1999, **79**, 105–111. DOI: 10.1016/s0304-3959(98)00184-5.

URBAN, Rochelle, Gregory SCHERRER, Laurence H. TECOTT a Allan I. BASBAUM. Behavioral indices of ongoing pain are largely unchanged in male mice with tissue or nerve injury-induced mechanical hypersensitivity. *Pain*. 2011, **152**(5), 990–1000. DOI: 10.1016/j.pain.2010.12.003.

VRINTEN, Dorien H a Frank F.T HAMERS. ‘CatWalk’ automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. *Pain*. 2003, **102**(1), 203-209. DOI: 10.1016/s0304-3959(02)00382-2. ISSN 0304-3959.

VURALLI, Doga, Anne-Sophie WATTIEZ, Andrew F. RUSSO a Hayrunnisa BOLAY. Behavioral and cognitive animal models in headache research. *The Journal of Headache and Pain*. 2019, **20**(1). DOI: 10.1186/s10194-019-0963-6. ISSN 1129-2369.

WALLACE, Victoria C.J., Timothy A. NORBURY a Andrew S.C. RICE. Ultrasound vocalisation by rodents does not correlate with behavioural measures of persistent pain. *European Journal of Pain*. 2005, **9**(4), 445-445. DOI: 10.1016/j.ejpain.2004.10.006. ISSN 10903801.

WALTERS, E. T. Injury-Related Behavior and Neuronal Plasticity: an Evolutionary Perspective on Sensitization, Hyperalgesia, and Analgesia. *International Review of Neurobiology*. 1994, 325–427. DOI: 10.1016/s0074-7742(08)60307-4.

WANG, Ruizhong, Tamara KING, Milena DE FELICE, Wenhong GUO a Frank PORRECA. Descending Facilitation Maintains Long-term Spontaneous Neuropathic Pain. *The Journal of Pain*. 2013, **14**(8), 845–853. DOI: 10.1016/j.jpain.2013.02.011.

WU, Shao-Wei, Yi-Chia WANG, Paul-Chen HSIEH, et al. Biomarkers of neuropathic pain in skin nerve degeneration neuropathy: contact heat-evoked potentials as a physiological signature. *PAIN*. 2017, **158**(3), 516-525. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000000791. ISSN 0304-3959.

YALCIN, Ipek, Alexandre CHARLET, Marie-José FREUND-MERCIER, Michel BARROT a Pierrick POISBEAU. Differentiating Thermal Allodynia and Hyperalgesia Using Dynamic

Hot and Cold Plate in Rodents. *The Journal of Pain*. 2009, **10**(7), 767-773. DOI: 10.1016/j.jpain.2009.01.325. ISSN 15265900.

YOON, Choi, Yoon Young WOOK, Na Heung SIK, Kim Sun HO a Chung Jin MO. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain*. 1994, **59**(3), 369-376. DOI: 10.1016/0304-3959(94)90023-X. ISSN 0304-3959.

ZHAO, Yuanting, Yue QIN, Tuanjiang LIU a Dingjun HAO. Chronic nerve injury-induced Mas receptor expression in dorsal root ganglion neurons alleviates neuropathic pain. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2015, **10**(6), 2384-22388. DOI: 10.3892/etm.2015.2801. ISSN 1792-1015.