

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie (BBI)



**Denisa Dresslerová**

**Úloha kanabinoidního receptoru 1 v modulaci nociceptivní signalizace na míšní úrovni.**

**The role of cannabinoid receptor 1 in the modulations of nociceptive signaling at the spinal cord level.**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Diana Špicarová, Ph.D.

Praha 2022



**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, 5.5.2022

Denisa Dresslerová

.....

**Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat své školitelce, Mgr. Dianě Špicarové, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, za její velmi cenné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mi byla velkou oporou.

## **Abstrakt**

Bolest je nedílnou součástí našeho života, varuje nás před možným poškozením tkáně, představuje tedy určitou formu ochrany organismu. Bolest se může stát přímo škodlivou v případě jejího dlouhodobého přetrvávání. Bývá vnímána individuálně v různé intenzitě, místě a délce. V převážné většině se jedná o velmi nepříjemný a silný emoční prožitek. Vjemu bolesti předchází nociceptivní signalizace. Při detekci škodlivého podnětu v periferních tkáních, jsou aktivována volná nervová zakončení, dochází k depolarizaci plazmatické membrány a vzniku akčního potenciálu, který dále vede informaci o přítomnosti nociceptivního podnětu do zadního rohu míšního. Proces nocicepce zahrnuje podráždění nervových zakončení, transdukcii, vedení signálu nervovými vlákny do míchy, synaptický přenos a vedení akčního potenciálu do mozku, kde je nociceptivní signalizace vyhodnocena. Významnou oblastí pro modulaci nocicepce je zadní roh míšní, kde dochází k synaptickému přenosu mezi primárními a sekundárními nociceptivními neurony. Na modulaci tohoto synaptického přenosu se významně podílí jednotlivé složky endokanabinoidního systému. Hlavními kanabinoidními receptory jsou kanabinoidní receptory typu 1 (CB1) a typu 2 (CB2), přičemž řada endokanabinoidů aktivuje rovněž kapsaicinové (TRPV1) receptory známé svou klíčovou úlohou v nocicepci. Hlavní funkce CB1 je regulace výlevu neurotransmiteru. Díky expresi CB1 na centrálních zakončeních primárních aferentních neuronů se uplatňuje v presynaptické modulaci na nociceptivních synapsích v zadním rohu míšním. Tato bakalářská práce se soustředí především na dosavadní poznatky o úloze CB1 na míšní úrovni a možnosti využití jejich regulace při vývoji nových léčiv, analgetik.

**Klíčová slova:** bolest, nocicepce, kanabinoidní receptor 1, nervová soustava, mícha, zadní roh míšní, modulace synaptického přenosu

## **Abstract**

Pain is an integral part of our lives, it warns of possible impending tissue damage and represents a form of protection for the body. Pain can become directly harmful if it persists. It is perceived individually in different intensity, place and length. In most cases, it is a very unpleasant and robust emotional experience. Before pain perception, nociceptive signalling occurs. When a harmful stimulus is detected in peripheral tissues, free nerve endings are activated, the plasma membrane is depolarized and generated action potential conveys to information about the presence of a nociceptive stimulus to the dorsal horn of the spinal cord. The process of nociception includes stimulation of nerve endings, transduction, signal transmission by nerve fibers into the spinal cord, synaptic transmission and conducting an action potential to the brain, where nociceptive signaling is evaluated. An important area for nociceptive modulation is the dorsal horn of the spinal cord, where synaptic transmission occurs between primary and secondary nociceptive neurons. The individual components of the endocannabinoid system play a significant role in the modulation of synaptic transmission. The major cannabinoid receptors are cannabinoid receptors 1 (CB1) and 2 (CB2), and many endocannabinoids also activate capsaicin (TRPV1) receptors, known for their key role in nociception. The primary function of CB1 is to regulate neurotransmitter release. Due to the expression of CB1 at the central endings of primary afferent neurons, it is involved in presynaptic modulation at nociceptive synapses in the dorsal horn. This bachelor thesis focuses mainly on the current knowledge about the role of CB1 at the spinal cord level and the possibility of using their regulation in the development of new analgesics.

**Key words:** pain, nociception, cannabinoid receptor 1, nervous system, spinal cord, dorsal horn, modulation of synaptic transmission

## Seznam zkratk použitých v textu

<b>2-AG</b>	2-arachidonoylglycerol	2-arachidonoylglycerol
<b>AEA</b>	anandamide N-arachidonoylethanolamine	anandamid N-arachidonoylethanolamin
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolpropionová kyselina
<b>CB1</b>	cannabinoid receptor 1	kanabinoidní receptor 1
<b>CB2</b>	cannabinoid receptor 2	kanabinoidní receptor 2
<b>CGRP</b>	calcitonin gene-related peptide	peptid související s genem pro kalcitonin
<b>CNS</b>	central nervous system	centrální nervová soustava
<b>DRG</b>	dorsal root ganglion	ganglion zadních kořenů míšních
<b>FAAH</b>	fatty-acid amide hydrolase	hydroláza amidů mastných kyselin
<b>GABA</b>	$\gamma$ -aminobutyric acid	kyselina $\gamma$ -aminomáselná
<b>Glu</b>	glutamate	glutamát
<b>GPR55</b>	G protein-coupled receptor 55	receptor spřažený s G proteinem 55
<b>IASP</b>	international association for the study of pain	mezinárodní společnost pro studium bolesti
<b>MGL</b>	monoacylglycerol lipase	monoacylglycerol lipáza
<b>NK</b>	neurokinin	neurokinin
<b>NMDA</b>	N-methyl-D-aspartate receptor	N-methyl-D-aspartátové receptory
<b>PAF</b>	primary afferent fibers	primární aferentní vlákna
<b>PAG</b>	periaqueductal gray	periaquaduktální šed'
<b>PNS</b>	peripheral nervous system	periferní nervová soustava
<b>RVM</b>	rostroventromedial medulla	rostroventromediální prodloužená mícha
<b>SP</b>	substance P	substance P
<b>TRPV1</b>	transient receptor potential vanilloid 1	vaniloidní receptor TRPV1

## Obsah

1.	Úvod .....	1
2.	Bolest .....	2
2.1	Klasifikace bolesti .....	2
2.1.1	Dělení na základě mechanismu vzniku bolesti .....	2
2.1.2	Dělení nociceptivní bolesti .....	3
2.1.3	Dělení na základě doby trvání .....	3
2.2	Nervová soustava .....	4
2.2.1	Neurony a gliové buňky .....	5
2.2.2	Mícha a její organizace .....	6
2.2.3	Primární aferentní vlákna (PAF) .....	7
2.2.4	Ascendentní a descendentní dráhy .....	8
3.	Nocicepce .....	9
3.1	Nociceptory .....	9
3.2	Jednotlivé fáze nocicepce .....	9
3.2.1	Synaptický přenos na 1. nociceptivní synapsi .....	11
3.2.2	Periferní a centrální senzitivace .....	13
4.	Endokanabinoidní systém .....	14
4.1	Složky endokanabinoidního systému .....	15
4.1.1	Endokanabinoidy a enzymy .....	15
4.1.1.1	Anandamid .....	15
4.1.1.2	2-AG .....	16
4.1.2	Exogenní kanabinoidy .....	17
4.1.2.1	Fytokanabinoidy .....	18
4.1.2.2	Syntetické kanabinoidy .....	18
4.1.3	Receptory endokanabinoidního systému .....	18
4.1.3.1	CB1 receptor .....	19
4.1.3.2	CB2 receptory .....	21
4.1.3.3	Vaniloidní TRPV1 receptor .....	22
4.2	Úloha kanabinoidního receptoru CB1 v modulaci nociceptivní signalizace .....	22
5.	Závěr .....	25
6.	Použitá literatura .....	26

## 1. Úvod

Bolest. Bol. Muka. Jedná se o nepříjemný fyzický i psychický vjem, který doprovází poškození tkáně, ale i řadu různých onemocnění. Bolest může být způsobena chemickými, fyzikálními (chlad, teplo, tlak), biologickými škodlivými látkami, ale také psychickými poruchami (psychogenní bolest). Vnímání bolesti plní ochrannou funkci, může však docházet k celé řadě patofyziologických stavů, které je nutné léčit. V roce 1973 byla založena Mezinárodní společnost pro výzkum bolesti IASP (The International Association for the Study of Pain), která sdružuje vědce, lékaře a poskytovatele zdravotní péče z celého světa s cílem přinášet úlevu těm, kteří trpí bolestí. Je to tedy přední světová organizace podporující studium bolesti. Mimo jiné také stanovuje definici bolesti, nocicepce a dalších pojmů spojených s bolestí a jejím výzkumem. Mechanismy vzniku bolesti jsou intenzivně studovány a s postupem času a s přibývajícím poznatkem také přirozeně dochází k zpřesnění nebo rozšíření definice i dalších termínů spojených s výzkumem bolesti.

Bolest nás doprovází po celý život a umožňuje nám, vyvarovat se různým mírám nebezpečí poškození tkáně. Funguje jako naše ochranná složka. Na jednu stranu je prospěšná, ovšem mohou nastat i situace, kdy správně neplní svou funkci. V takovém případě je velmi důležité nalézt původ bolesti a pokusit se minimálně o její částečné utlumení, v nejlepším případě o její úplné odstranění. Fyziologická bolest nám napomáhá vyhnout se vážným zraněním, ovšem patologická bolest nám není prospěšná. Patří sem chronická bolest, která trvá i po odstranění podnětu či neuropatická. Důležité je bolest zkoumat, aby mohlo na základě nových poznatků dojít ke zkvalitnění léčby, která je často nedostatečná. Potřebné je též minimalizovat nežádoucí vedlejší účinky analgetik. Už v dávné historii byla bolest podrobena zkoumání, sice mnohem banálnějšímu, než je tomu dnes, ale i navzdory tomu byla snaha bolest léčit či alespoň ji utlumit.

Hlavním cílem této bakalářské práce je shrnout dosavadní poznatky o bolesti a nocicepci s hlavním důrazem na úlohu kanabinoidního receptoru 1 na míšní úrovni. V prvních kapitolách je popsána bolest z jejího fyziologického a anatomického hlediska a jejího vztahu s nervovou soustavou. Poté následuje část zaměřená na nociceptivní signalizaci a synaptický přenos. Poslední specifická část bakalářské práce je zaměřena na endokanabinoidní systém, jeho složky a funkci jednotlivých receptorů s důrazem na úlohu CB1 receptoru v míšním synaptickém přenosu.



## 2. Bolest

Mezinárodní asociace pro studium bolesti (IASP) definuje bolest jako: „*Nepříjemnou sensorickou a emocionální zkušenost spojenou s akutním nebo potenciálním poškozením tkáně.*“ Dále tuto definici doplňuje celá řada upřesňujících rozšíření, např.: „Bolest je vždy osobní zkušenost, která je v různé míře ovlivněna biologickými, psychologickými a sociálními faktory“ (Raja et al., 2020). Z dané definice a jejího rozšíření vyplývá, že bolest je subjektivní varovnou informací, která zároveň chrání organismus. Vzhledem k jejímu subjektivnímu prožívání je hůře měřitelná a specifikovatelná.

Bolest vzniká zpravidla podrážděním periferních nervových zakončení, čímž jsou aktivované biochemické a bioelektrické procesy, které jsou základem nocicepce. Informace o bolestivém podnětu je z periferních tkání vedena pomocí vzruchu aferentními nervovými vlákny do míchy, kde jsou lokalizovány první synaptické spoje mezi primárními a sekundárními neurony. Informace o přítomnosti podnětu je dále vedena sekundárními neurony do mozku, do oblasti thalamu a dále do mozkové kůry. Až v mozku tedy dochází ke zpracování informace o periferním podnětu a dojde k vjemu bolesti. Následně jsou aktivovány descendentní dráhy z mozku do míchy a místa poškození, eferentními vlákny.

Nociceptory, tedy receptory bolesti, zpravidla volná nervová zakončení mohou být stimulovány přímým poškozením receptorové buňky nebo nepřímo působením chemických látek, které se mohou uvolňovat v tkáních. Pro vznik bolesti je však zásadní přenos signálu do vyšších mozkových center, kde dochází k rozpoznání stimulů a vyvolání odpovědi. Pokud signál není přenesen do mozku, nemůže dojít ke vzniku bolesti (Riedel & Neeck, 2001).

### 2.1 Klasifikace bolesti

Bolest lze dělit do dvou kategorií na základě místa vzniku a délce trvání. Každá kategorie je následně dělena do jednotlivých typů, což usnadňuje diagnostiku bolesti a zaměření léčby. Správné rozpoznání patologického stavu bolesti je klíčové pro stanovení adekvátní léčby. Modulační mechanismy podmiňující jednotlivé typy bolesti jsou totiž odlišné.

#### 2.1.1 Dělení na základě mechanismu vzniku bolesti

Z hlediska místa vyvolání může být bolest dělena na neuropatickou a nociceptivní. Nociceptivní bolest se dále dělí na útrobní a somatickou, která se opět dá dále rozlišit, a to na hloubkovou (svaly, klouby, pojivo) a povrchní (kůže, sliznice).

**Neuropatická bolest** – na rozdíl od jiných typů bolestí, není způsobena podrážděním nociceptorů. Ke vzniku neuropatické bolesti dochází zejména při poškození samotné nervové soustavy,

kteřé může nastat nejen při úrazech, ale i při různých onemocněních. S neuropatickou bolestí se velmi často potýkají diabetici, kdy zvýšená hladina cukru vede k poranění periferních nervů, onkologicky nemocní lidé, popřípadě neuropatická bolest může doprovázet infekce (Brown, 1976; Clouston et al., 1992; Snider et al., 1983).

**Nociceptivní bolest** - naopak od neuropatické vzniká právě podrážděním nociceptorů, které jsou uloženy v kůži, svalech, kloubech a ve vnitřních orgánech.

### 2.1.2 Dělení nociceptivní bolesti

**Nociceptivní bolest** - je kategorizována na základě místa indukce do dvou skupin – viscerální a somatická bolest. Dříve byla viscerální bolest považována za součást somatické bolesti, nicméně po důkladnějším zkoumání bylo zjištěno, že se jedná o 2 rozdílné mechanismy, které však nesou spoustu společných vlastností (Cervero & Laird, 1999).

**Viscerální neboli útrobní bolest** - vzniká ve vnitřních orgánech dutiny břišní a dutiny hrudní a je přenášena autonomní nervovou soustavou (někdy zvaná jako vegetativní nervový systém), která je součástí periferní nervové soustavy. Většinou se jedná o tupou bolest, kterou není jednoduché lokalizovat, vzhledem k malému počtu volných nervových zakončení v daných tkáních. Bolest může vznikat např. nadměrnou kontrakcí svaloviny nebo špatným prokrvením.

**Somatická bolest** - vzniká následkem dráždění nociceptorů v kůži, svalech, hrudní a břišní stěně, anebo pobřišnici. Na rozdíl od viscerální se jedná o bolest ostrou a přesně lokalizovanou. Kůže a sliznic se týká hlavně povrchová somatická bolest, která je přenášena myelinizovanými vlákny A $\delta$  (Burgess & Perl, 1967). Zbylé části jsou definované pro hloubkovou somatickou bolest, která je tupější než povrchová, spíše palčivá a má delší trvání. Její přenos je zprostředkován nemyelinizovanými C vlákny (Falinower et al., 1994).

### 2.1.3 Dělení na základě doby trvání

**Akutní bolest** - dostavuje se ihned po působení bolestivého stimulu a trvá kratší dobu v rámci minut, hodin, dnů, maximálně 3 měsíců. Následně dochází k úplnému odeznění bolesti. Jedná se většinou o varovný signál o vyšší intenzitě chránící náš organismus. Zároveň je naše tělo vystavováno velké fyzické i psychické zátěži. Díky této tělesné zátěži bývá akutní bolest často doprovázena zvýšenou tepovou frekvencí (tachykardií), pocením, podrážděností nebo nevolností. Akutní bolest vzniká náhle poraněním tkáně či orgánů, může být způsobena i onemocněním, popřípadě pooperační rekonvalescencí.

Pokud není odstraněna příčina akutní bolesti, může dojít k přechodu na bolest chronickou a vzniku dalších nepříjemných komplikací.

**Chronická bolest** - sama o sobě je samostatnou nemocí. Trvá zpravidla více jak 3 měsíce a na rozdíl od akutní bolesti nemá ochrannou funkci. Nejčastěji se vyskytuje jako neuropatická bolest, bolest hlavy, pohybového aparátu, břicha a doprovází nádorové onemocnění. Stejně jako u akutní bolesti se projevuje a prohlubuje i psychická a fyzická nerovnováha organismu, která způsobuje zhoršenou kvalitu spánku, deprese, nechutenství nebo sníženou pohybovou aktivitu. Přenos nociceptivního signálu je v podstatě na stejné bázi jako u akutní bolesti, kdy je bolest vedena z nociceptorů z periferních nervových zakončení skrze C vlákna a A $\delta$  vlákna do míchy převážně do laminy I.-II., ale i do hlubších Rexedových zón. Uplatňuje se zde celá řada modulačních mechanismů. Léčba je mnohem složitější a současná analgetika nejsou často dostačující k úlevě od bolesti. Dochází k opakovanému a trvalému léčení, a často v průběhu léčby dochází ke změně terapie a medikace. Hlavním cílem je vždy utlumit bolest a zlepšit fyzické a psychické rozpoložení pacienta, které rovněž hraje význačnou roli při zotavování (Millan, 1999). Chronická bolest může být také dělena na *nádorovou* (bolest způsobena nádorovým onemocněním nebo protinádorovou léčbou) a *nenádorovou* (bolesti kloubů, hlavy, zad), lišící se mechanismy vzniku a přetrvání, tudíž i způsobem léčby (Rokyta et al., 2009).

## 2.2 Nervová soustava

Nervová soustava (NS) nám umožňuje vnímat bolest díky její schopnosti detekovat bolestivý stimul a následně ho šířit do vyšších center NS, kde probíhá zpracování podnětu a vytvoření odpovědi na bolestivý stimul. NS zajišťuje senzorické, asociační a motorické funkce. Umožňuje zpracování a vnímání podnětů, které na organismus působí. Zprostředkovává kontakt mezi vnějším prostředím a organismem. NS je schopna přijmout informace prostřednictvím dráždivých buněk, následné zpracování a šíření informace a odpověď na ni. NS je u obratlovců členěna na 2 části, na centrální nervovou soustavu (CNS) a periferní nervovou soustavu (PNS).

CNS je tvořena mozkem (cerebrum) a míchou (medulla spinalis), které se skládají z několika částí a jsou chráněny obaly. Jedná se o tvrdou plenu (dura mater), pavučnici (arachnoidea) a omozečnici (pia mater). Základními buňkami jsou neurony a neuroglie jako astrocyty, oligodendroglie, mikroglie, ependymální buňky. Části CNS jsou tvořeny šedou a bílou hmotou. Šedá hmota je tvořena těly neuronů, mikroglie a astrocyty. Bílá hmota je tvořena axony s myelinovými pochvami, které se sdružují do nervových drah.

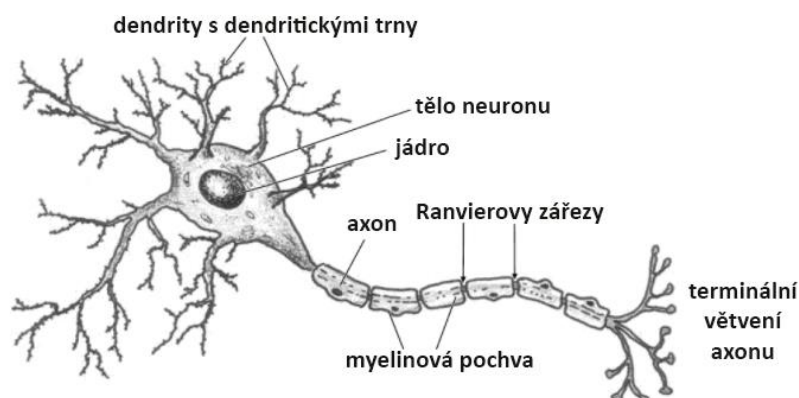
PNS spojuje prostřednictvím nervových vláken CNS se zbylými částmi těla. Je tvořen míšními nervy (nervi spinales), hlavovými nervy (nervi craniales), dále sympatickými a parasympatickými vlákny, které tvoří autonomní nervy. Hlavními neuroglie PNS jsou Schwannovy a satelitní buňky.

## 2.2.1 Neurony a gliové buňky

**Neurony** jsou dráždivé buňky nervové soustavy, které umožňují přenos signálu, jeho zpracování a vytvoření odpovědi (Obrázek 1). Díky neuronům je organismus schopen vnímat a případně reagovat na podněty z vnějšího i vnitřního prostředí.

Podle funkce lze neurony dělit na aferentní (senzorické), jež vedou informaci do CNS a eferentní (motorické) vedoucí signál z CNS do periferních tkání. Existují také interneurony vytvářející složité spojení mezi senzory a motorickými neurony. A dále lze rozdělovat na unipolární (zrakové a čichové neurony), bipolární (sluchové a rovnovážný ganglion), multipolární (většina neuronů CNS) a pseudounipolární neurony (spinální ganglion), lišící se počtem výběžků a výskytem (Orel, 2015).

Ve spinálních gangliích, ganglionu zadních kořenů míšních (DRG), se nacházejí těla primárních aferentních senzorych neuronů, ze kterých vycházejí 2 výběžky, jeden vedoucí na periferii a druhý vedoucí do míchy. Těla jednotlivých senzorych neuronů se liší velikostí a jsou členěna do 3 kategorií: malá, střední a velká. DRG neurony s tělem o nejmenším průměru mají C vlákna, středně velká těla mají A $\delta$  vlákna a těla s největším průměrem vysílají A $\beta$  vlákna (Harper & Lawson, 1985).



**Obrázek 1: Stavba neuronu**

Neuron tvoří tělo, ve kterém je uloženo buněčné jádro. Tělo je vyplněno neuroplasmou. Z perikaryonu vycházejí výběžky dvou typů, dlouhé odstředivé neurity (axony) a krátké dostředivé dendrity. Neurit (nervové vlákno) může být obalen myelinovou pochvou, která sestává z několika typů buněk. V PNS je myelin vytvořen gliemi a Schwannovými buňkami, naopak v CNS je myelinová pochva tvořena oligodendroglie. V myelinové pochvě jsou ztenčené úseky, Ranvierovy zářezy, urychlující přenos vzruchu. Ne všechna vlákna jsou ovšem obalena myelinovou pochvou, tak jak je to znázorněno na obrázku. Pro nocicepci velmi důležitá C vlákna myelinovou pochvu nemají (Orel, 2015).

**Gliové buňky**, nazývané též glie, jsou součástí nervové tkáně a dle výskytu se dělí na centrální (makroglie a mikroglie) a na periferní (Schwannovy a satelitové buňky). Jejich hlavní funkcí je podpora a výživa neuronů, udržují homeostázi a vytvářejí myelin, mohou ovšem ovlivňovat i synaptický přenos (Araque et al., 1998; Smit et al., 2001; Bennay et al., 2008).

**Astrocyty** jsou největšími gliemi (makroglie) a pomocí svých dlouhých výběžků vyživují neuron. Jedním výběžkem se napojují na kapiláry a druhým na neuron. Jsou to klíčové buňky uplatňující se nejen při nemoci, ale i při zdravím jedince. Za normálních okolností se v těle vyskytují naivní astrocyty.

Ovšem při určitém typu poranění dochází k astroglióze neboli jejich přeměně na reaktivní astrocyty a na astrocyty vytvářející jizvy, čemuž napomáhá kolagen typu I (Hara et al., 2017). Astrocyty mají velmi úzkou vazbu s mikroglie, kdy jsou navzájem ovlivňovány. Jedná se o tzv. crosstalk. Mikroglie stimulují funkci astrocytů, které prodlužují zánětlivou odpověď. Naopak astrocyty regulují fenotyp mikroglie. Buňky mezi sebou komunikují a jsou schopny modulovat nociceptivní přenos mechanismy sekrece cytokinů a prozánětlivých mediátorů při neuroinflamaci (Bezzi et al., 2001; Abudara et al., 2015; Chen et al., 2015).

*Oligodendrocyty* jsou, stejně jako astrocyty, makroglie. Vytvářejí myelinovou pochvu axonů, která umožňuje rychlejší přenos signálu. Na základě studií bylo prokázáno, že pro začátek procesu myelinizace je zapotřebí elektrická aktivita neuronů. Proces myelinizace může být inhibován blokací akčních potenciálů v okolí a naopak může být proces zesilován zvýšením elektrické aktivity v okolí (Demerens et al., 1996).

*Ependymové buňky* ve většině případů jsou ciliární a jsou uspořádány do mnohvrstevných epitelů. Vystylají dutiny CNS a tvoří mozkomíšní mok. Nicméně nejsou zapojeny do nociceptivní signalizace.

*Mikroglie*, někdy také nazývané mozkové makrofágy, jsou buňky malých rozměrů, k jejich robustní aktivaci dochází při neuropatické bolesti, a kromě procesu modulace synaptického přenosu se uplatňují i při imunitních procesech. Mají schopnost prezentovat antigeny T-buňkám a díky tomu zvyšují imunitní reakci. Hrají důležitou roli při degenerativních onemocněních CNS (Bö et al., 1994).

*Schwannovy buňky* myelinizují axon a tím ho mechanicky chrání. Jsou velmi podobné oligodendrocytům, vyskytující se v CNS. Jsou schopny vylučovat prozánětlivé cytokiny a zvyšovat citlivost nociceptorů v případě poranění (Rutkowski et al., 1999).

*Satelitní gliové buňky* mají strukturní, ochranou a vyživovací funkci neuronů. Jsou částečnou obdobou astrocytů v CNS, ale pouze z hlediska jejich funkcí, morfologicky jsou značně rozlišné. Důležitou společnou vlastností je recyklace glutamátu, v důsledku čehož dochází k modulaci nervové aktivity. Hrají velmi důležitou roli při chronické bolesti. Dochází k syntéze a uvolňování gliových prozánětlivých mediátorů, které ovlivňují nociceptivní přenos (Schon & Kelly, 1974; Norenberg & Martinez-Hernandez, 1979).

## 2.2.2 Mícha a její organizace

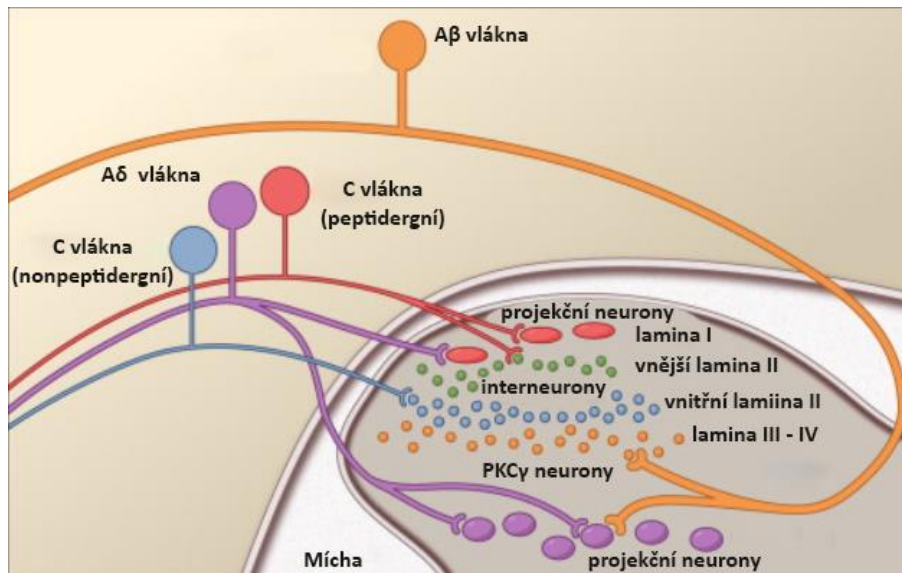
Pátevní mícha (Medulla spinalis) je kryta míšními obaly a uložena v páteřním kanálu. Jedná se o dlouhou, tenkou trubici (Saccus durae matris) navazující na prodlouženou míchu v mozkovém kmeni. Uprostřed páteřní míchy se nachází centrální kanálek míšní (Canalis centralis), který je vystlán

ependymovými buňkami a obsahuje mozkomíšni mok. Okolo míšního kanálku se nachází šedá hmota, která má charakteristický tvar písmene H a dělí se na 10 úseků, Rexedových zón. Šedá hmota je obklopena bílou hmotou, tvořenou myelinizovanými vlákny, axony. Aferentní sensorická vlákna vstupují do dorzální části míchy zadními kořeny, eferentní motorická vlákna vystupují z ventrální části míchy předními kořeny. Spojením předních a zadních míšních kořenů vzniká míšní nerv sestávající z aferentních a eferentních vláken v různém poměru (Hochman, 2007). Z míchy vystupuje celkem 31 párů míšních nervů inervující periferní tkáň.

### **2.2.3 Primární aferentní vlákna (PAF)**

Senzorické neurony neboli primární aferentní neurony jsou pseudounipolární buňky, které propojují míchu a periferní tkáň, kde jsou zakončeny volnými nervovými zakončeními. Při tom jejich dlouhý výběžek je veden do periferie a kratší výběžek centrálně do zadního rohu míšního. Shluky těl těchto sensorických neuronů vytvářejí společně s gliovými buňkami zauzliny neboli spinální ganglia, což jsou ztlustěliny na zadních kořenech míšních. DRG neurony představují primární neurony a hrají významnou roli při přenosu bolesti. V důsledku periferního poranění dochází ke změnám v DRG, např. k uvolňování cytokinů a změnám propustnosti iontových kanálů, což způsobuje hyperexcitabilitu DRG neuronů (Black et al., 1999).

Dle myelinizace nervových vláken se rozlišují 2 hlavní kategorie sensorických vláken, a to myelinizovaná A vlákna a nemyelinizovaná C vlákna (Obrázek 2). V závislosti na rychlosti přenosu signálu je možné je dělit na 4 základní typy, lišící se průměrem vláken a zda jsou či nejsou myelinizována. Jedná se o  $A\alpha$ ,  $A\beta$ ,  $A\delta$  a C vlákna.  $A\alpha$  vlákna jsou myelinizovaná vlákna o průměru 12-20  $\mu\text{m}$ , vedou akční potenciál rychlostí 70-120 m/s, ale nepodílejí se na vedení bolestivých podnětů.  $A\beta$  vlákna jsou stejně jak  $A\alpha$  vlákna myelinizovaná s průměrem, který může dosahovat více než 10  $\mu\text{m}$  a akční potenciál se po něm šíří nejrychleji 30-100m/s, která jsou na periferii aktivována běžným dotykem. Dalším typem jsou  $A\delta$  vlákna, která jsou mnohem méně myelinizovaná, mají menší průměr 2-6  $\mu\text{m}$  a akční potenciál šíří rychlostí 12-30m/s. Posledním typem jsou nemyelinizovaná C vlákna, která tvoří velkou část nociceptivních aferentních vláken. C vlákna mají nejmenší průměr 0,4-1,2  $\mu\text{m}$  a nejpomalejší vedení akčního potenciálu 0,5-2m/s (Millan, 1999). Hlavní vlákna spjatá s bolestí jsou myelinizovaná  $A\delta$  vlákna a nemyelinizovaná C vlákna, která vedou podnět do zadního rohu míšního, odkud je následně signál šířen z míchy do vyšších úseků CNS. V periferních oblastech jsou  $A\delta$  vlákna a C vlákna aktivována škodlivým teplem, chladem, mechanickým poškozením či změnou pH.



**Obrázek 2: Primární aferentní vlákna a jejich distribuce v laminách zadního rohu míšního**

Primární aferentní vlákna přenášejí informace z PNS do CNS. PAF nociceptivních neuronů projikují převážně do laminy I. a II., do superficiální oblasti zadního rohu míšního, kde interagují s míšními neurony. Aβ vlákna, které zpravidla nešíří bolestivé stimuly, projikují do hlubších vrstev do lamin III. – V. (Basbaum et al., 2009).

#### 2.2.4 Ascendentní a descendentní dráhy

Existují ascendentní (vzestupné) dráhy, které jsou senzitivní a dráhy descendentní (sestupné), které jsou motorické. V ascendentních drahách hrají důležitou roli projekční neurony, které vedou informaci ze zadního rohu míšního do mozku, do thalamu a odtud je informace vedena do koncového mozku a dalších mozkových oblastí, kde může docházet k modulaci nociceptivního přenosu (periaqueductální šed' (PAG), rostroventromediální prodloužená mícha (RVM), amygdala; Sandkühler & Gebhart, 1984). Vzestupné dráhy lze dělit do dvou traktů: spinothalamický trakt vedoucí do jader thalamu a spinoretikulární trakt vedoucí do retikulární formace. Trakty vzestupných drah slouží především k přenosu a vyhodnocení bolestivého podnětu. Descendentní dráhy se podílí na modulaci nociceptivní informace. Vlákna sestupných drah vedou informaci z mozkového kmene zpět do míchy, do oblasti zadního rohu míšního. PAG a RVM patří mezi hlavní oblasti podílející se na modulaci, které mohou bolest potlačovat, ale i podporovat. V RVM se nacházejí 2 typy neuronů projikující do dorzálního rohu míšního „on-cells“ a „off-cells“. „On-cells“ způsobují zesílení nociceptivního přenosu, naopak „off-cells“ působí inhibičně (Fields & Heinricher, 1985).

### 3. Nocicepce

IASP definuje nocicepci jako „*Neuronální proces kódování škodlivých podnětů.*“ Tento pojem tedy zahrnuje veškerou signalizaci o poškozujícím (nebo potenciálně poškozujícím) podnětu, ještě než dojde k vjemu bolesti. Modulace nociceptivní signalizace je využíváno při tlumení nebo léčbě bolesti. K objevu a pochopení mechanismů nocicepce došlo díky smyslové analýze savců a studie bezobratlých, kteří jakožto evoluční předkové nepocítují bolest, ale mají mechanismy, které jim úspěšně umožňují zaznamenat a vyhnout se nebezpečným podnětům. Právě jejich studie usnadnila identifikaci signálních drah u savců (Julius & Basbaum, 2001).

#### 3.1 Nociceptory

Nociceptorem se rozumí vysokoprahový sensorický receptor, který umožňuje transdukcii a kódování nociceptivního podnětu. Jedná se především o volné nervové zakončení exprimující specifické transmembránové ionotropní receptory a iontové kanály, které jsou schopné reagovat na nociceptivní podněty. Jejich aktivací dochází k transdukcii a následně kódování v podobě vzruchu/akčního potenciálu umožňujícího přenos nociceptivní informace. Nociceptory reagují v periferních tkáních na podněty, různých modalit, chemické, mechanické či tepelné. Přítomnost nociceptivního podnětu je po celou dobu detekována a zpracovávána, což znamená, že na rozdíl od jiných sensorických receptorů se volná nervová zakončení neadaptují.

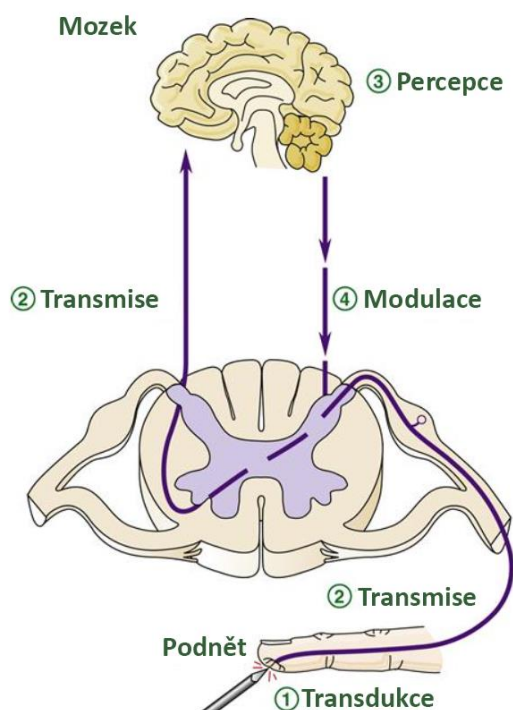
V kůži rozeznáváme zpravidla 3 typy nociceptorů: A $\delta$  mechanosenzitivní, A $\delta$  mechanotermální a polymodální na nemyelinizovaných C-vláknech. Volná nervová zakončení jsou umístěna na konci dlouhého výběžku pseudounipolárních neuronů spinálních ganglií nebo v trigeminálním ganglionu. Tyto primární nociceptivní neurony, projikují kratší centrální výběžky do zadního rohu míšního, kde se synapticky spojují se sekundárními nociceptivními neurony a signál tak může být veden do vyšších mozkových center v rámci vzestupných drah (Tracey, 2017). Nociceptory tedy zajišťují transdukcii podnětu a pokud je depolarizace plazmatické membrány dostatečná k překročení prahu pro vznik akčního potenciálu, tak je veden DRG neuronem do zadního rohu míšního.

#### 3.2 Jednotlivé fáze nocicepce

Proces nocicepce sestává z několika po sobě jdoucích mechanismů, nejprve musí být podnět detekován prostřednictvím nociceptorů, musí tedy dojít k jeho transdukcii. Následuje přenos signálu pomocí PAF do míchy, kde dochází k synaptickému přenosu a projekční neurony zadního rohu míšního mohou signál vést výše do mozku, kde dochází ke zpracování nociceptivní informace, vjemu bolesti a po následné descendentní modulaci k fyziologické odpovědi.



**Transdukce** - Úlohu transdukce vykonávají nociceptory. Silné či škodlivé podněty stimulují dané periferní receptory a mohou způsobit vznik akčního potenciálu. Transdukci zprostředkovává aktivace ionotropních receptorů a iontových kanálů. Tok iontů po koncentračním spádu skrze tyto kanály v plazmatické membráně vede ke změně koncentrace iontů na intracelulární a extracelulární straně, dojde k její depolarizaci a vzniku akčního potenciálu. Některé mediátory zvyšují frekvenci generování akčního potenciálu (prostaglandiny, leukotrieny, histamin, vodíkové a draselné ionty, bradykinin), jiné naopak snižují (endorfiny). Akční potenciál je následně převeden až do centrálního zakončení v zadním rohu míšním, kde dojde k uvolnění excitačního neurotransmiteru (Woolf & Ma, 2007).



**Obrázek 3: Nociceptivní signalizace a vjem bolesti: transdukce, transmise, percepce a modulace**

Prvním krokem je transdukce (1), kdy dochází k detekci podnětu v periferních oblastech prostřednictvím volných nervových zakončení. Při dostatečné depolarizaci plazmatické membrány dochází ke vzniku akčního potenciálu a jeho transmissi PAF do zadního rohu míšního (2), kde dochází k synaptickému přenosu z primárního neuronu na neuron sekundární. Akční potenciál je dále šířen (2) do mozku, kde dochází ke zpracování nociceptivní informace. Po zpracování může docházet k percepci bolesti (3). Nociceptivní signalizace může být také descendentně modulována (4; Marsh, 2016).

**Transmise z periferních tkání do mozku** – Přenos je další fází nocicepce, který zahrnuje vedení nociceptivní informace prostřednictvím primárních aferentních vláken nemyelinizovaných C a myelinizovaných A $\delta$  z periferie do míchy a dále do mozku (Obrázek 3). Aby vůbec došlo k přenosu informace z PNS do CNS, musí být dosaženo akčního potenciálu. Pro vznik akčního potenciálu je zapotřebí dostatečná depolarizace plazmatické membrány na volném nervovém zakončení vyvolaná nociceptivním podnětem. Pro šíření signálu v míše jsou důležité synapse v zadním rohu míšním. Primární aferentní vlákna nociceptivních neuronů projikují převážně do laminy I. a II., do superficiální oblasti zadního rohu míšního, kde dochází k jejich synaptickému spojení s míšními sekundárními neurony. V lamině I. se nacházejí projekční neurony, kam vstupují A $\delta$  vlákna a v lamině II. interneurony, kam vstupují převážně nociceptivní C vlákna (Millan, 1999). Synaptický přenos je velmi komplexní mechanismus, do kterého je zapojena celá řada neurotransmiterů a neuromodulátorů. Na 1. nociceptivní synapsi v zadním rohu míšním je synaptický přenos zahájen výlevem glutamátu, kterému

předchází příchod akčního potenciálu do centrálního zakončení sensorického neuronu, který má za následek depolarizaci membrány, otevření napětově závislých  $\text{Ca}^{2+}$  iontových kanálů a následkem zvýšené koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  exocytózu synaptických váčků s glutamát (Obrázek 4). Glutamát difunduje synaptickou štěrbinou a váže se na receptory postsynaptického neuronu (Meir et al., 1999). Dále je akční potenciál veden spinothalamickým traktem do thalamu.

### 3.2.1 Synaptický přenos na 1. nociceptivní synapsi

Glutamát, jeden z nejrozšířenějších a nejdůležitějších excitačních neuropřenašečů nejen v míše, ale celé CNS je zodpovědný za přenos informace z primárního na sekundární míšní neuron (Curtis et al., 1959). Glutamát je uvolňován v závislosti na zvýšené koncentraci vápenatých iontů v cytoplazmě a aktivuje ionotropní postsynaptické glutamátové receptory:  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionátové (AMPA), N-methyl-D-asparátové (NMDA) a kainátové receptory. Aktivace receptorů způsobí otevření iontových kanálů a depolarizaci postsynaptické membrány (Obrázek 4). Presynaptický výlev glutamátu a aktivace postsynaptických receptorů je tedy proces pronociceptivní. Během výzkumu prováděného na míše potkanů bylo zjištěno, že glutamát aktivuje především AMPA receptory na neuronech zadního rohu míšního, zatímco NMDA receptory se výrazně podílejí na odpovědi míšních neuronů při poškození na periférii (Aanonsen et al., 1990; Yang et al., 2009).

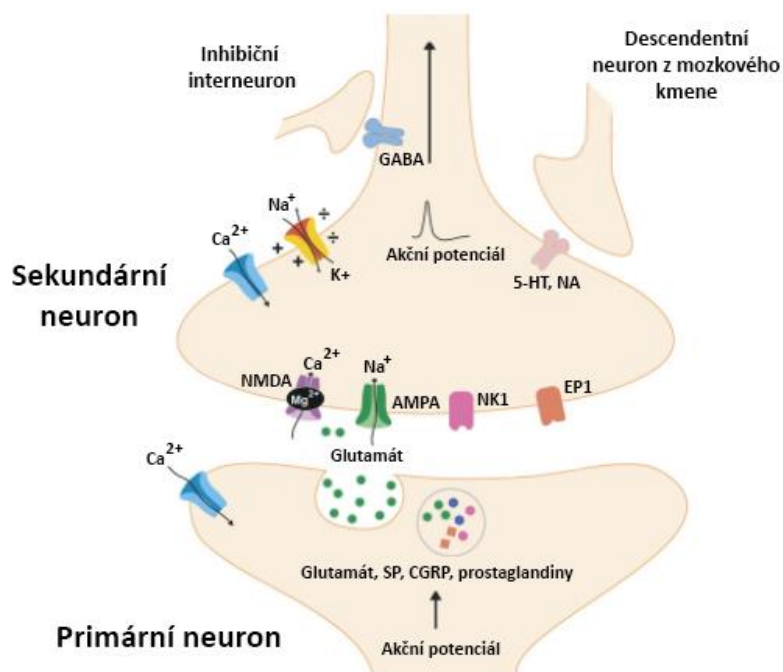
NMDA receptor je glutamátový receptor a kanál pro průtok iontů do buňky. Za použití indikátorového barviva arsenazo III bylo prokázáno, že po navázání glutamátu na NMDA receptor dochází k průtoku  $\text{Ca}^{2+}$  iontů z extracelulárního do intracelulárního prostoru. Může se tak podílet na senzitivaci míšního neuronu (MacDermott et al., 1986). NMDA receptory jsou za klidového membránového potenciálu blokovány hořčnatými ionty, které se vážou na specifická místa receptoru a tím znemožňují průchod iontů. Tato blokáda je závislá na membránovém napětí.  $\text{Mg}^{2+}$  blokuje kanál při hyperpolarizaci a naopak při depolarizaci plazmatické membrány dochází k jeho uvolnění a iontový kanál receptoru se stane opět propustným (Burnashev et al., 1992).

AMPA receptory hrají zásadní roli v nociceptivním synaptickém přenosu i jeho plasticitě. Jsou lokalizovány postsynapticky v zadním rohu míšním a stejně jako NMDA receptory jsou ionotropní, tedy tvoří kanál pro průtok iontů s tím rozdílem, že jsou více propustné pro jednomocné kationty, tudíž jimi proudí hlavně  $\text{Na}^+$ . AMPA receptory jsou tvořeny ze 4 podjednotek: GluR1, GluR2, GluR3 a GluR4. Podjednotkové složení receptoru se může lišit, a tím může docházet ke změnám jeho vlastností. Podjednotka GluR2 je zodpovědná za nepropustnost  $\text{Ca}^{2+}$ . Tedy pokud AMPA receptor neobsahuje GluR2, stává se propustným pro  $\text{Ca}^{2+}$  (Hollmann et al., 1991). AMPA receptory jsou funkčně spjaty s NMDA receptory a jsou společně lokalizovány postsynapticky na excitačních synapsích. Při navázání glutamátu na AMPA receptor dochází k jeho aktivaci, vtok iontů způsobí depolarizaci plazmatické

membrány a díky tomu dochází k uvolnění  $Mg^{2+}$  z NMDA receptoru a jeho aktivaci (Bekkers & Stevens, 1989).

Kainátové receptory jsou stejně jako AMPA propustné pro jednomocné kationty. Jsou exprimovány míšními neurony a napomáhají šíření signálu mezi primárními aferentními vlákny a neurony zadního rohu míšního (Li et al., 1999). Jsou aktivovány kainátem. Presynapticky uložené kainátové receptory snižují uvolňování glutamátu, a tedy potlačují glutamátergní synaptický přenos (Kerchner et al., 2001).

Kromě neuropřenašeče, glutamátu, se na nociceptivním synaptickém přenosu podílí také celá řada neuromodulátorů: substance P (SP), peptid související s genem pro kalcitonin (CGRP), oxid dusnatý, prostaglandiny. Nociceptivní stimulace periferních tkání způsobuje výlev SP a CGRP v zadním rohu míšním, k tomuto výlevu dochází při různých patologických stavech bolesti. Neuropeptidy se váží na své receptory, aktivují je a dochází k pomalé postsynaptické depolarizaci, která umožňuje časovou sumaci vstupů a tím zvyšuje pravděpodobnost vzniku akčního potenciálu na sekundárním nociceptivním neuronu. SP aktivuje receptor neurokininový (NK1) a podílí se na vzniku tepelné hyperalgezie (Mantyh et al., 1997). SP a CGRP se podílejí na nociceptivní signalizaci a mohou stimulovat další výlev glutamátu a asparátu v míše, a tak potencovat excitační synaptický přenos (Kangrga & Randic, 1990).



**Obrázek 4: Nociceptivní synaptický přenos z primárního neuronu na neuron sekundární.**

Příchod akčního potenciálu do presynaptického zakončení primárního neuronu v zadním rohu míšním depolarizuje plazmatickou membránu, aktivují se napětově závislé  $Ca^{2+}$  kanály. Zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů způsobí výlevy synaptických váčků s glutamátem do synaptické štěrby. Glutamát, který se váže na postsynaptické glutamátové receptory, které zároveň fungují jako iontové kanály: NMDA, AMPA. Aktivace receptorů umožní vtok iontů do cytosolu a depolarizaci postsynaptické membrány. Akční potenciál je veden po sekundárním neuronu až do mozku. Z primárního neuronu mohou být uvolňovány také neuromodulátory, např. SP a CGRP (zjednodušeně zobrazeno), které po aktivaci svých postsynaptických receptorů zesilují odpověď neuronů zadního rohu míšního (Olesen et al., 2012).

**Percepce** – Po zpracování nociceptivní informace vyššími mozkovými strukturami teprve může dojít k vjemu bolesti. Vnímání bolesti ovšem není ovlivňováno pouze fyziologickou stránkou, ale velkou roli zde hrají i psychické procesy a od toho se také odvíjí délka i intenzita vnímání bolesti (Melzack, 1961). V procesu percepce hraje roli i amygdala, která je zapojena do emočního okruhu. Vědci Carrasquillo a Gereau zjistili, že endogenní molekulární změny v amygdale hrají roli v modulaci periferní hypersenzitivity při zánětu. (Carrasquillo & Gereau, 2007).

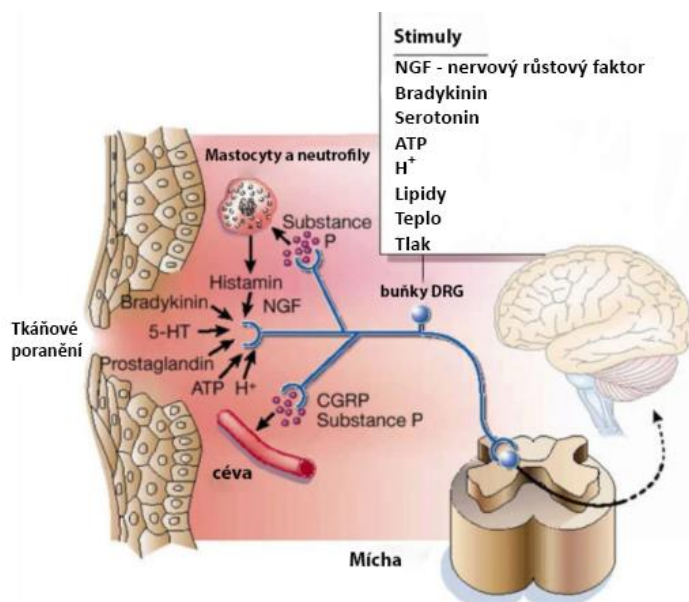
**Descendentní modulace** – Sestupná modulace, při které dochází ke zvýšení či snížení vnímání bolesti. Nejvýznamnější kontrolní oblastí descendentní modulace je PAG a RVM, které vedou informaci do dorzálního míšního rohu (Martin et al., 1995). Jedná se o sestupné dráhy, jejichž hlavními částmi jsou noradrenergní, serotonergní a dopaminergní systémy (Yaksh, 1985). Aktivací PAG a RVM oblastí dochází k inhibici vzestupného nociceptivního přenosu na úrovni míchy. „On-cells“ a „off-cells“, nacházející se v RMV oblasti, jsou schopny modulovat nociceptivní přenos. „On-cells“ mají pronociceptivní účinky a „off-cells“ naopak antinociceptivní. Dá se tedy říci, že descendentní dráhy působí antinociceptivně, jako zpětná vazba v případě, že nejsou „on-cells“ aktivovány.

### 3.2.2 Periferní a centrální senzitivace

Nociceptivní informace může podléhat i různým typům modulace. Hlavními mechanismy je tzv. senzitivace mající dvě úrovně: periferní a centrální, která probíhá na úrovni míchy.

#### Periferní senzitivace

*Periferní senzitivace* neboli periferní neuronální hyperexcitabilita je mechanismus vedoucí ke zvýšenému podráždění nociceptorů na periferních nervových vláknech. Mechanismy periferní senzitivace se uplatňují v místě poranění/podráždění. Hlavními procesy jsou ty, které vedou k uvolňování látek důležitých při zánětlivých reakcích (Obrázek 5). Tedy při poranění dochází k podráždění primárních aferentních neuronů a jejich aktivaci, kdy akční potenciál vede nociceptivní informace do zadního rohu míšního. Z volných nervových zakončení se uvolňují různé neuromodulátory. Zvýšená koncentrace  $H^+$  aktivuje vaniloidní receptory (TRPV1). Substance P a prostaglandiny ovlivňují vylití dalších mediátorů. Substance P způsobuje degranulaci žírných buněk (mastocyty), vedoucí k uvolnění histaminu. Zároveň SP a CGRP (calcitonin gene-related peptides) způsobují rozšíření cév a vznik otoku vedoucí k uvolnění bradykininu, což vede ke zvýšené aktivitě na nociceptivních vláknech.



**Obrázek 5: Aktivace primárních aferentních neuronů při poranění tkáně**

Znázorněn je přenos nociceptivní informace z periferních oblastí do dorzálního rohu míšního, odkud je informace šířena do mozku. Na obrázku lze vidět hlavní látky, které se podílejí na tvorbě zánětu (Julius & Basbaum, 2001).

### Centrální senzitivace

Zvýšená aktivita na primárních aferentních vláknech může vést k centrální senzitivaci, kdy dochází ke zvýšení citlivosti sekundárních míšních neuronů k podnětům detekovaným v periferních tkáních. Do procesu centrální senzitivace jsou zapojeny postsynaptické i presynaptické modulační mechanismy. Na postsynaptickém neuronu dochází k aktivaci NMDA receptorů a následně ke zvýšení intracelulární koncentrace  $Ca^{2+}$ . Důležitá je také inserce AMPA receptorů do plazmatické membrány, nebo také změna jejich podjednotkového složení, na němž je závislá propustnost pro  $Ca^{2+}$ . Na centrální senzitivaci se podílejí také gliové buňky, po jejichž aktivaci se uvolňuje celá řada cytokinů a chemokinů (Latremoliere & Woolf, 2009). Těmito mechanismy se zesílí účinnost synapse a aktivují se dráhy zajišťující přenos signálu do mozku.

## 4. Endokannabinoidní systém

Endokannabinoidní systém je nedílnou součástí nervové soustavy. Podílí se na modulaci nocicepce a mnoha dalších biologických procesech. Ovlivňuje spánek, náladu, pocit hladu, chuť, hladinu hormonů, homeostázi, pohyb, metabolismus lipidů a sacharidů (Komorowski & Stepień, 2007). Endokannabinoidní systém je aktivován v případě potřeby, nicméně existují oblasti v mozku, kde je trvale aktivní. Jsou to oblasti, které hrají důležitou roli při kontrole energetické rovnováhy. Významnou úlohu hraje v synaptickém přenosu, kde dochází k retrográdní signalizaci, přitom endokannabinoidy syntetizované postsynapticky aktivují presynaptické receptory. Zároveň představuje molekulární ochranu pro efektivní kontrolu nebezpečné nadměrné excitace neuronů (Katona & Freund, 2008).

## 4.1 Složky endokanabinoidního systému

Endokanabinoidní systém tvoří 3 základní složky, kterými jsou kanabinoidy, enzymy pro jejich syntézu a degradaci a receptory jimi aktivované. Kanabinoidy jsou dvojího typu: endogenní kanabinoidy, které si tělo samo vytváří a exogenní, které si tělo neumí vytvořit, ale může je přijmout ve formě fytokanabinoidů či syntetických kanabinoidů.

### 4.1.1 Endokanabinoidy a enzymy

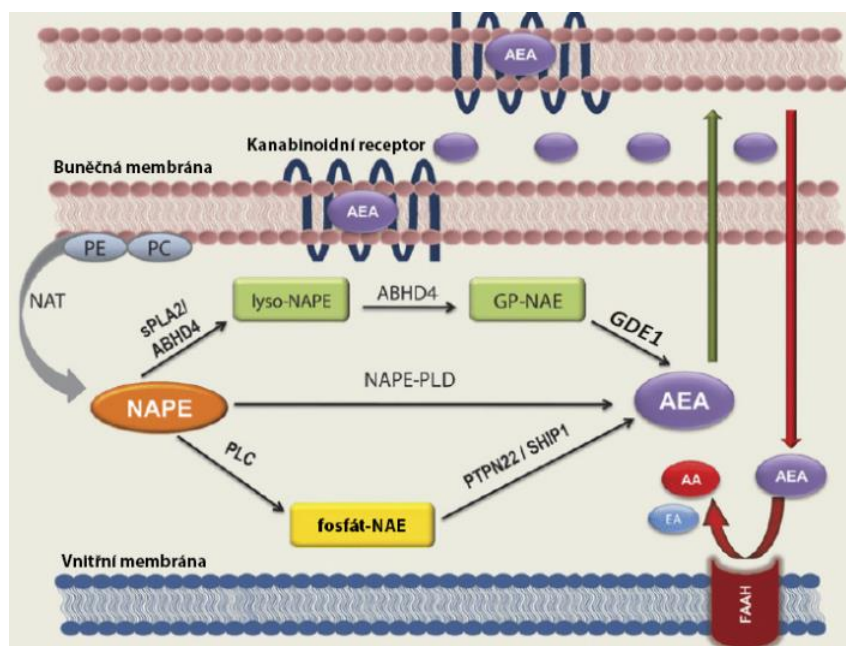
Endogenní kanabinoidy, přirozeně se vyskytující v živočiších, se váží na kanabinoidní receptory, aktivují je a tím spouštějí signalizaci. Umožňují retrogradní nebo-li zpětnou signalizaci, kdy mohou přenášet informaci z postsynaptické části na presynaptickou. Endokanabinoid je syntetizován postsynaptickým neuronem, prochází plazmatickou membránou a difunduje k presynaptické části, kde aktivuje presynaptické receptory. Nejdůležitější endokanabinoidy pro retrogradní signalizaci jsou 2-arachidonoylglycerol a N-arachidonylethanolamin (anandamid). 2-AG a AEA jsou deriváty kyseliny arachidonové a řadí se mezi kanabinoidní eikosanoidy (Hillard, 2015). Zároveň jsou strukturně odlišné od ostatních kanabinoidů. Dalšími jsou například noladin ether (2-erachidonoylglycerol) a virodhamin (O-arachidonylethanolamin). Nejsou syntetizovány do zásoby, ale pouze jako reakce na depolarizaci nebo aktivaci příslušných receptorů. Působí v místě vzniku, na krátké vzdálenosti. Kanabinoidy jsou degradovány prostřednictvím hydrolytických enzymů (např.: FAAH – fatty acid amide hydrolase, MGL- monoacylglycerol lipáza, COX-2 - cyklooxygenáza). Enzym FAAH je zodpovědný zejména za degradaci a regulaci hladiny anandamidu. V případě, že dochází k inhibici FAAH, dochází ke zvýšení hladiny anandamidu, což může vést k antinocicepci, úzkosti či nespavosti. Z toho důvodu může FAAH představovat vhodný terapeutický cíl se zaměřením na snížení bolesti (Lichtman et al., 2004). MGL a COX jsou hlavní degradační enzymy 2-AG a jejich působením vzniká arachidonát a glycerol.

#### 4.1.1.1 Anandamid

Prvním identifikovaným endokanabinoidem byl anandamid, izolovaný a hojně exprimovaný v mozku. K jeho izolaci (z prasečího mozku) došlo v roce 1992, kdy vědci R. Mechoulam, W. Devane a Lumír Hanuš našli molekulu, která právě interagovala s endokanabinoidními receptory (Devane et al., 1992). Později se ukázalo, že anandamid reaguje i s TRPV1 (Zygmunt et al., 1999). Anandamid je syntetizován „na vyžádání“ neurony a je vytvářen z jeho prekurzoru N-acylfosfatidylethanolamin (NAPE). Syntéza z NAPE může být vedena několika enzymatickými cestami (Obrázek 6). Nejjednodušší cesta je prostřednictvím jedné enzymatické reakce za pomoci N-acylfosfatidylethanolamin specifické fosfolipázy D (NAPE-PLD). Další možností je hydrolýza NAPE skrze fosfolipázu C, která umožní vznik

fosfát-NAE a následně působením fosfatáz vzniká AEA. Další cesta je katalyzována fosfolipázou A, která způsobuje dvě po sobě jdoucí hydrolytické reakce za vzniku lyso-NAPE a následně glycerofosfo-NAE (GP-NAE). Posledním krokem ke vzniku AEA je hydrolýza GP-NAE fosfodiesterázou GDE1. Za degradaci anandamidu je zodpovědný enzym FAAH, který reguluje jeho množství a rozkládá ho na arachidonovou kyselinu a ethanolamin.

Na základě studie prekursoru AEA, 20:4-NAPE a jeho vlivu na CB1 a TRPV1 receptory u zdravých a patologických jedinců, bylo prokázáno, že má inhibiční účinky na synaptický přenos v neuronech zadního rohu míšního. 20:4-NAPE způsobuje snížené uvolňování neurotransmiteru (glutamátu) z presynaptického zakončení a inhibici spontánních a elektricky evokovaných excitačních postsynaptických proudů. U kontrolních zdravých jedinců byla inhibice způsobena CB1 receptory, zatímco u jedinců se zánětem byla inhibice zprostředkována skrze oba tyto receptory, CB1 i TRPV1 receptory (Nerandzic et al., 2018).

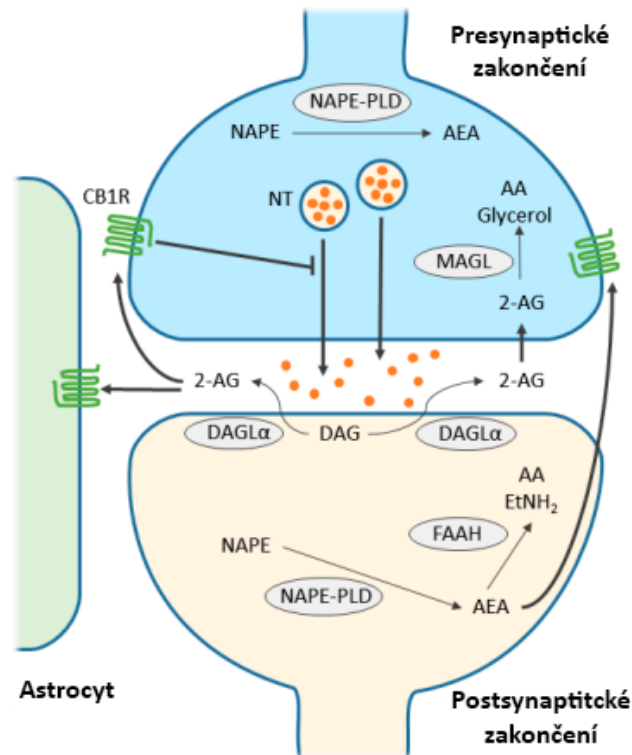


**Obrázek 6: Biosyntéza a degradace anandamidu** (Snider et al., 2010).

#### 4.1.1.2 2-AG

2-arachidonoylglycerol byl objeven jako druhý endokanabinoidní ligand po anandamidu, kdy byl izolován z psích střev (Mechoulam et al., 1995). Svoji nejdůležitější roli vykonává v mozku, plicích a játrech, neboť jeho kyselina napomáhá k syntéze hormonů (prostaglandinů), které jsou následně využity při patologických stavech (zánětech). Důležitou roli hraje také v míše, kde je 2-AG zapojen v procesu nocicepce na míšní úrovni při vazbě na kanabinoidní receptory, kdy zprostředkovává retrográdní supresi nociceptivního přenosu (Nyilas et al., 2009).

V neuronech může být syntetizován 2 způsoby. Jedna dráha vytváří 2-AG prostřednictvím fosfolipázy C (PLC), která hydrolyzuje membránové fosfolipidy (PIP<sub>2</sub>) a vzniká tak diacylglycerol (DAG). Následně je štěpením diacylglycerol lipázou (DAGL) vytvořen 2-AG. Jako druhý produkt štěpení PIP<sub>2</sub> vzniká inositoltrifosfát. Druhá varianta je zprostředkovávána fosfolipázou A1 (PLA1) vytvářející lysofosfolipid, který je hydrolyzován za pomoci lyso-PLC a následně vzniká endokanabinoid (Stella et al., 1997).



**Obrázek 7: Modulace synaptického přenosu retrogradní signalizací prostřednictvím endokanabinoidů AEA a 2-AG**

K biosyntéze endokanabinoidů dochází v postsynaptickém i presynaptickém neuronu. 2-AG je hojně syntetizován postsynapticky, snadno prochází plazmatickou membránou a je uvolňován do synaptické štěrby, kde následně difunduje k presynaptickému zakončení a aktivuje zde CB1 receptor. Aktivace má za následek uvolnění neurotransmiterů (NT). Zároveň 2-AG je schopen aktivovat i receptory CB1 lokalizované na astrocytech. V presynaptickém zakončení je syntetizován AEA, který aktivuje CB1 receptor. Enzymatické reakce jsou znázorněny tenkými šipkami, šipky s tupým zakončením označují inhibici a silné šipky indukují translokaci (Zou & Kumar, 2018).

#### 4.1.2 Exogenní kanabinoidy

Kromě endokanabinoidů lze kanabinoidní receptory aktivovat také exogenními látkami izolovanými z rostlin nebo synteticky vyrobenými. Tyto látky si živočich není schopen sám syntetizovat, ale mohou být v různých formách podávány. Vzhledem k jejich struktuře a schopnosti interagovat nejen s kanabinoidními receptory, se v poslední době výzkumy zaměřují na možnosti jejich využití při léčbě různých onemocnění.



#### **4.1.2.1 Fytokanabinoidy**

Fytokanabinoidy jsou ligandy kanabinoidních receptorů, které pocházejí z rostlin. Jednou z nejznámějších je *Cannabis sativa* neboli konopí seté, v nichž se nacházejí převážně v listenech květů a plodů. Mezi fytokanabinoidy patří tetrahydrocannabinol (THC), který je známý pro své halucinogenní účinky. Působí nejvíce psychotropně ze všech rostlinných kanabinoidních látek prostřednictvím aktivace receptoru CB1 (Devane et al., 1988). THC také aktivuje receptor CB2 a ovlivňuje tak imunitní reakce (Yuan et al., 2002). Mezi fytokanabinoidy patří také látky bez psychotropních účinků např. cannabidiol nebo cannabichromen.

#### **4.1.2.2 Syntetické kanabinoidy**

Syntetické kanabinoidy jsou dalším typem exogenních kanabinoidů. Jedná se o uměle vytvořené látky, které mají podobné funkce jako THC a patří mezi tzv. nové drogy. Do nedávné doby docházelo čistě k syntéze těchto látek za účelem jejich využití nejen v lékařství, ale i ve farmakologických studiích, kdy byly užívány pro výzkum endokanabinoidního systému. V posledních letech se však začínají vyskytovat obdobné látky ve volně prodejných výrobcích, ze kterých je možné snadno získat psychoaktivní THC. Některé studie ukázaly, že může docházet k nežádoucím vedlejším účinkům, a že syntetické kanabinoidy mají vyšší míru toxicity než přírodní konopí (Mills et al., 2015). Zároveň jsou uměle vytvořené kanabinoidy nezbytné pro studium endokanabinoidního systému, protože umožňují selektivní aktivaci jednotlivých kanabinoidních receptorů, a tím studium jejich úlohy.

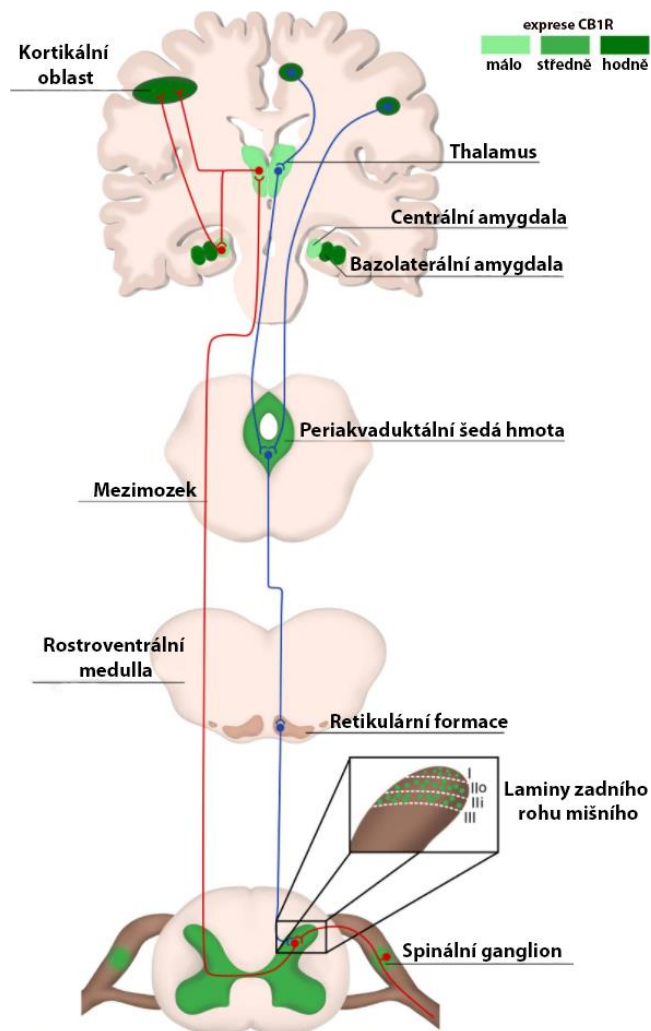
### **4.1.3 Receptory endokanabinoidního systému**

Hlavními kanabinoidními receptory jsou CB1 a CB2, jedná se o membránové receptory spřažené s G proteiny - skupina GPCRs, které jsou aktivovány prostřednictvím 3 typů ligandů: endokanabinoidů, rostlinných kanabinoidů (fytokanabinoidů) a syntetických kanabinoidů. Jedná se o receptory, kdy oba působí přes G-proteiny negativně na adenylátcyklázu a pozitivně na mitogenem aktivovanou proteinkinázu. CB1 se hlavně uplatňuje při nociceptivní bolesti a oba kanabinoidní receptory typu 1 a 2 jsou zapojeny do mechanismů patologické bolesti (Calignano et al., 1998; Strangman et al., 1998; Clayton et al., 2002). Jako možný třetí kanabinoidní receptor byl identifikován receptor spřažený s G proteinem 55 (GPR55), kdy při laboratorních pokusech na myších bylo zjištěno, že GPR55 se může stejně jako CB1 a CB2 uplatňovat při léčbě zánětlivé bolesti (Staton et al., 2008). Dalším možným kanabinoidním receptorem je GPR18 (McHugh et al., 2010). Celá řada endokanabinoidů působí také jako endovaniloidy aktivující TRPV1 nebo mohou aktivovat jaderné receptory aktivované proliferátorem peroxisomu.

#### 4.1.3.1 CB1 receptor

CB1 receptor je protein složený z 472 aminokyselin, tvoří sedm transmembránových helixů spojených smyčkami a je spřažený s G proteinem ukotveným na vnitřní straně plazmatické membrány. Ligandy se naopak váží do extracelulárního vazebného místa tohoto receptoru. Aktivace CB1 receptoru inhibuje napětově závislé  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{K}^+$  kanály, což hraje důležitou roli při snížení uvolňování neurotransmiterů (Sullivan, 1999). Dále inhibuje aktivitu adenylcyklázy, což vede ke snížení produkce cyklického adenosinmonofosfátu a aktivity proteinkinázy A (Howlett, 1984). Jejich aktivace působí i protizánětlivě, protože má vliv na tvorbu interleukinu 10 (Smith et al., 2000).

Anandamid a 2-AG, nejlépe charakterizované endokanabinoidní neuromodulátory, aktivují CB1 receptory. Dalšími endokanabinoidy, které mohou aktivovat CB1 receptor, jsou virodhamin, noladin ether a N-arachidonoyl-dopamin. Na základě *in situ* hybridizace, která byla prováděna na potkanech, byla prokázána distribuce messenger RNA pro CB1 v subpopulaci neuronů v DRG. Dále data ukázala, že subpopulace DRG neuronů obsahující SP nebo CGRP exprimuje také kanabinoidní receptory, které jsou transportovány do centrálních zakončení (Hohmann & Herkenham, 1999). Dle místa, kde se receptory nacházejí, mohou regulovat důležité nociceptivní mechanismy jako je modulace synaptického přenosu. CB1 jsou lokalizovány převážně presynapticky, kde regulují výlev neurotransmiteru. Na míšní úrovni je tedy významná jejich lokalizace na centrálních zakončeních DRG neuronů v zadním rohu míšním a na míšních inhibičních interneuronech lokalizovaných především v lamině II (Farquhar-Smith et al., 2000). V mnoha centrálních a periferních oblastech CB1 receptory ovlivňují uvolňování dalších neurotransmiterů, jako je acetylcholin, noradrenalin a dopamin. Jsou exprimovány v neuronech DRG, zadním rohu míšním a míšními interneurony v I. a II. lamině. Kromě neuronů se CB1 receptory také nachází v astrocytech a mikroglíích (Liu et al., 2019). Na míšní úrovni byly detekovány a studovány v astrocytech (Hegyí et al., 2018). V mozku jsou hojně exprimovány v mozkové kůře, mozečku a bazálních gangliích. Dále byla jejich přítomnost prokázána v oblasti Varolova mostu a prodloužené míchy (Herkenham et al., 1991).



**Obrázek 8: Expres CB1 receptoru v rámci vzestupných a sestupných nociceptivních drah**

Ascendentní dráha (červeně) vede nociceptivní informaci z periferních částí přes DRG do míchy a následně do thalamu a přímo nebo přes laterální amygdalu do mozkové kůry. Modře je znázorněna descendentní dráha, která vede informaci naopak z kortikální oblasti přes periaquoduktální šedou hmotu (PAG) a retikulární formaci do zadního rohu míšního. Expres CB1 receptoru je nejvyšší v oblasti bazolaterální amygdaly a mozkové kůry. S nižší expresí se poté setkáváme v oblastech PAG, DRG a míše. Dále byly receptory detekovány také v thalamu a centrální amygdale (Campos et al., 2021).

### Úloha CB1 receptorů v synaptické plasticitě

CB1 jsou aktivovány prostřednictvím endogenních a exogenních kanabinoidů. Fyziologické, farmakologické a anatomické studie poskytly důkaz, že hlavním fyziologickým účinkem kanabinoidů je regulace uvolňování neurotransmiterů aktivací presynaptických receptorů CB1 lokalizovaných na presynaptických zakončeních axonů. Následné objevy popisují důsledky této lokalizace demonstrací zapojení endokanabinoidů do retrográdní signalizace na kyselina  $\gamma$ -aminomáselná (GABA)–ergních a glutamátergických synapsích (Freund et al., 2003). Hlavní impuls pro tvorbu endokanabinoidů je zvýšení koncentrace  $Ca^{2+}$  v postsynaptické části, kde jsou právě hojně lokalizovány enzymy pro jejich tvorbu

(diacylglycerol lipáza). Následně může docházet k aktivaci receptorů. Při jejich aktivaci a zvýšené intracelulární hladiny  $Ca^{2+}$  probíhá tzv. depolarizací indukovaná suprese inhibice (DSI), která vede ke sníženému uvolňování GABA do synaptické štěrbiny. Poprvé byla popsána na mozečkových Purkyňových buňkách (Llano et al., 1991). Dalším velmi podobným mechanismem, také objeveným u Purkyňových buněk, je depolarizací indukovaná suprese excitace (DSE), kdy dochází ke sníženému uvolňování glutamátu do synaptické štěrbiny (Kreitzer & Regehr, 2001). Mechanismy DSI a DSE silně tlumí synaptický přenos. Dalšími mechanismy modulače účinnosti synapsí, avšak na  $[Ca^{2+}]$  nezávislými, jsou metabotropně-indukovaná suprese inhibice (MSI) a metabotropně-indukovaná suprese excitace (MSE). Synaptická plasticita je v tomto případě závislá na aktivaci metabotropních receptorů na postsynaptické membráně, které prostřednictvím indukce syntézy endokannabinoidů retrogradně ovlivňují presynaptické funkce (Maejima et al., 2001). Pro mechanismus MSE i MSI je důležitá fosfolipáza  $C\beta 1$ , která umožňuje uvolňování endokannabinoidů a aktivaci receptorů (Hashimoto et al., 2005).

#### **4.1.3.2 CB2 receptory**

Dalším důležitým receptorem endokannabinoidního systému je CB2. K jeho objevu došlo až po identifikaci CB1 receptoru a jedná se o protein sestávající ze 360 aminokyselin. Je částečně podobný s CB1, a proto trvalo delší dobu, než došlo k jeho objevu. Na rozdíl od CB1 receptoru po navázání kanabinoidů nedochází k psychogenní odpovědi. Nejčastěji jsou detekovány na imunitních buňkách, kde se také nacházejí CB1 receptory, ale v mnohem menší koncentraci. Na základě PCR amplifikace cDNA z míchy a z DRG u potkanů byla prokázána exprese CB2 v neuronech i mikroglíích v daných oblastech. Data také ukázala, že CB2 vyskytující se na presynaptickém zakončení mohou inhibovat uvolňování CGRP a tím se podílet na modulaci bolesti a vyvolávat antinociceptivní účinek (Beltramo et al., 2006). Dále je možné je najít ve tkáních, žlázách (slinivka břišní, nadledviny, vaječníky, varlata), v lymfatických orgánech, střevech, játrech a krevetvorných buňkách. V největší míře jsou tedy k nalezení na povrchu B buněk a jejich koncentrace klesá od NK buněk přes monocyty, neutrofilní granulocyty, T8 buňky, až po T4 buňky, kde je jejich exprese nejnižší (Galiegue et al., 1995).

CB2 receptory se podílejí na antinocicepci a při rozvoji imunitní odpovědi (Malan et al., 2001; Sipe, 2005). Za použití agonisty JWH-133 a antagonisty SR144528 receptoru CB2 byly prokázány inhibiční účinky CB2 na DRG neuronech u neuropatických potkanů, kdy docházelo k inhibici depolarizace, a tedy k inhibici nocicepce (Sagar et al., 2005).

#### 4.1.3.3 Vaniloidní TRPV1 receptor

TRPV1 je neselektivní kationtový kanál patřící do rozsáhlé skupiny TRP receptorů. Ve své struktuře obsahuje 6 transmembránových helixů a hydrofobní smyčku, která vytváří pór pro průchod  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  (Moiseenkova-Bell et al., 2008). Hojně jsou exprimovány v nociceptivních DRG neuronech a transportovány do obou jejich zakončení, periferního i centrálního. TRPV1 receptory jsou aktivované prostřednictvím tepla  $\geq 43^\circ\text{C}$ , snížením pH, tedy zvýšením  $[\text{H}^+]$  a skrze vaniloidní sloučeniny (Tominaga et al., 1998). Mediátory zánětu např. bradykinin, prostaglandiny,  $\text{TNF}\alpha$ , TRPV1 senzitivizují prostřednictvím fosforylace (Meng et al., 2016). Mezi velmi silné exogenní aktivátory patří kapsaicin a resiniferatoxin, což je látka, která je obsažena v latexu sukulentu *Euphorbia resinifera* (Szallasi & Goso, 1994).

Aktivace TRPV1 umožní vtok  $\text{Ca}^{2+}$  do intracelulárního prostoru, což způsobí výlev glutamátu, substance P a CGRP z periferních i centrálních výběžků do extracelulárního prostoru, a tím je umožněn přenos senzorké nociceptivní informace. Fosfolipáza C, jak už bylo výše zmíněno, hydrolizuje PIP2 a tím zvyšuje citlivost TRPV1 (Prescott & Julius, 2003). Připojování fosfátových skupin na specifické aminokyselinové zbytky TRPV1 vede k jeho senzitivizaci (Numazaki et al., 2002). Naopak defosforylace fosfatázou 2B inhibuje aktivitu receptoru (Mohapatra & Nau, 2005). Mediátory zánětu skrze své receptory a druhé posly aktivují buněčné enzymy, a ty následně regulují TRPV1.

Nejtypičtějším agonistou TRPV1 je látka obsažená v "pálivých" papírkách, kapsaicin, který způsobuje onu pálivost/štiplavost. Elektrofyziologické a biochemické studie ukázaly, že kapsaicin excituje nociceptory zvýšením permeability plazmatické membrány pro kationty, a to následně vede ke vzniku pálivé bolesti aktivací tohoto tepelně řízeného iontového kanálu (Caterina et al., 1997). Podle této látky byl dříve TRPV1 označován jako kapsaicinový receptor.

## 4.2 Úloha kanabinoidního receptoru CB1 v modulaci nociceptivní signalizace

CB1 receptory se podílejí na modulaci nociceptivního přenosu nejen v oblastech míchy, ale i na periférii a ve vyšších centrech CNS. V této bakalářské práci bude zmíněna pouze role CB1 receptorů na míšní úrovni, kde klíčovou oblastí pro modulaci nocicepce je zadní roh míšní. CB1 receptory mají jak antinociceptivní účinky, tak paradoxně i pronociceptivní účinky. Inhibicí výlevu glutamátu z presynaptického zakončení působí CB1 receptor antinociceptivně. Pronociceptivně se může projevovat regulací výlevu GABA a glycinu na inhibičních neuronech.

Základem potlačení synaptického přenosu je inhibice napětově závislých  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů po aktivaci CB1 receptorů, neboť výlev glutamátu je závislý na zvýšené intracelulární koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  (Mackie & Hille, 1992). Důkaz, že kanabinoidy způsobují analgetické účinky, bylo prokázáno různými agonisty

kanabinoidních receptorů. Intraventrikulární podávání kanabinoidních agonistů WIN-55,212-2 a CP-55,940, nebo intratekálně podaný levonantradol a desacetyllevonantradol vyvolali antinocicepci (Yaksh, 1981; Martin et al., 1993). Vysoká účinnost intratekálního podání selektivního agonisty CB1 receptorů, N-(2-chloroethyl)5,8,11,14-eicosaetraenamide (ACEA), byla prokázána při tlumení taktilní hypersensitivity navozené neuropatií (Paszczuk et al., 2011). Naopak při použití antagonisty CB1 receptoru SR141716A docházelo k hyperalgezií, což ukazuje na důležitou úlohu CB1 receptoru v nociceptivní signalizaci (Richardson et al., 1997). Významné poznatky o úloze kanabinoidních receptorů na míšní úrovni byly popsány na míšních řezech z juvenilních potkanů, kdy docházelo k aktivaci C-vláken kapsaicinem a sledovala se frekvence excitačních postsynaptických proudů za normálních okolností a za použití agonisty WIN-55,212-2. Data ukázala nejen presynaptické umístění CB1 receptorů, ale také antinociceptivní účinek jeho aktivace. Aktivace CB1 receptoru v zadním rohu míšním vedla k inhibici uvolňování glutamátu, hlavního neurotransmiteru, který umožňuje přenos nociceptivní informace z primárního na sekundární neuron (Morisset & Urban, 2001). Ke stejnému závěru, že aktivace CB1 receptorů na míšní úrovni vede ke sníženému šíření nociceptivní informace, bylo prokázáno i za použití formalínového testu, běžně používaného ke stanovení míry nociceptivního chování in vivo (Naderi et al., 2005).

Exprese a funkce CB1 receptoru byla také prokázána na kultivovaných DRG neuronech, kde inhibují napětově-závislé vápenaté kanály, které jsou stěžejní pro uvolňování glutamátu na prvních synapsích nociceptivních drah v zadním rohu míchy (Ross et al., 2001). CB1 receptor hraje také důležitou roli v regulaci dlouhodobé deprese (LTD) synaptického přenosu mezi PAF a neurony zadního rohu míšního. Mechanismus je založen na retrográdní signalizaci endokanabinoidů, kteří difundují z postsynaptické membrány na presynaptickou, kde aktivují CB1 receptor. Aktivované CB1 receptory, lokalizované na zakončeních PAF, brání vzniku dlouhodobé potenciace, napomáhají rozvoji LTD a tlumí aktivitu synaptického přenosu (Kato et al., 2012).

CB1 receptor se dále vyskytuje na míšních inhibičních neuronech, reguluje výlev GABA, čímž dochází k modulaci inhibičního synaptického přenosu (Tsou et al., 1999). Hyperalgezie se většinou vyskytuje během zánětlivých a neuropatologických stavů. Bylo ovšem zjištěno, že může nastat i za normálních okolností stimulací C-vláken. Aktivací CB1 receptorů lokalizovaných na inhibičních neuronech v zadním rohu míšním může docházet k modulaci synaptického přenosu vedoucího ke zvýšené senzitivizaci projekčních neuronů zadního rohu. Aktivace CB1 receptorů prostřednictvím endokanabinoidů snižuje uvolnění GABA a glycinu, tudíž snižuje inhibiční potenciál synaptického přenosu na inhibičních neuronech a může tak zvyšovat excitační synaptický přenos v míše (Pernía-Andrade et al., 2009). Na základě dosavadních poznatků byla vytvořena hypotéza, že CB1 receptor může působit pronociceptivně, procesem disinhibice na míšní úrovni, také v místě kontaktu inhibičních interneuronů s primárními aferentními vlákny v zadním rohu míšním. V případě uvolnění GABA

z míšních neuronů, dochází k inhibici uvolňování SP z PAF, což vede ke snížení excitačního synaptického přenosu. Aktivace CB1 receptoru na inhibičních neuronech může způsobovat inhibici výlevu GABA a indukovat uvolnění SP a tím zvyšovat excitační synaptický přenos (Zhang et al., 2010).

Kanabinoidy hrají také důležitou roli v ochraně před neuroinflamací a léčbě neurodegenerativních onemocnění mechanismem zamezení aktivace gliových buněk. K jejich masivní aktivaci dochází např. při periferní neuropatii. Aktivované míšní glie produkují prozánětlivé mediátory jako jsou cytokiny a chemokiny, které mohou senzitivizovat presynaptické TRPV1 receptory a zvyšovat výlev glutamátu z primárních aferentních vláken (Spicarova & Palecek, 2010). Systémové podání agonisty CB1 receptoru (WIN-55,212-2) inhibuje aktivaci míšních gliových buněk, a tak zamezuje uvolňování cytokinů, které se podílejí na potenciaci excitačního synaptického přenosu v zadním rohu míšním (Paszczuk et al., 2011). Hlavním kanabinoidním receptorem, který je exprimován gliovými buňkami a reguluje výlev prozánětlivých mediátorů je ovšem CB2 receptor (Ehrhart et al., 2005; Romero-Sandoval et al., 2009). Za použití potkaního modelu pooperační bolesti byla zjištěna zvýšená exprese CB1 receptorů na astrocytech v zadním rohu míšním. Studie naznačuje, že se CB1 receptory exprimované v astrocytech mohou podílet na inhibici prozánětlivé signalizace v těchto gliových buňkách (Alkatis et al., 2010). Funkční propojení nervového a imunitního systému je hojně studováno a nabývá na významu. Je známo, že zánětlivá odpověď je také modulována skrze imunitní buňky, kdy endokanabinoidní systém způsobuje potlačení aktivace, proliferace a migrace buněk imunitního systému (Sacerdote et al., 2000).

## 5. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo popsat úlohu CB1 receptorů v modulaci nociceptivní signalizace na míšní úrovni. Nocicepce je proces, který je velmi komplexní a může být ovlivněn modulací synaptického přenosu v zadním rohu míšním, kdy dochází k přenosu signálu z primárního neuronu na sekundární neuron. V tomto místě může být výrazně ovlivněna nociceptivní signalizace z periferních oblastí do vyšších center nervové soustavy. V zadním rohu míšním se výrazně uplatňují složky kanabinoidního systému, receptory, kanabinoidy a enzymy, které mají potenciál působit inhibičně a bránit tak šíření nociceptivního signálu do mozku, tudíž bránit výslednému vjemu bolesti. CB1 receptory jsou v míše lokalizovány především presynapticky na zakončení primárních aferentních vláken, jejich aktivace snižuje výlev glutamátu, dochází tak k inhibici nociceptivního synaptického přenosu. V poslední dekádě však byla popsána i pronociceptivní modulace synaptického přenosu v míše, a to aktivací CB1 receptorů exprimovaných inhibičními interneurony. Výsledný antinociceptivní efekt kanabinoidů tedy pravděpodobně závisí na rovnováze celého endokanabinoidního systému.

Pro lepší pochopení a porozumění nejen funkce CB1 receptorů v modulaci míšního přenosu, ale i celého kanabinoidního systému, je nezbytné provést další studie. Získání nových poznatků o modulačních mechanismech, zvláště za patologických stavů bolesti, může vést k vývoji nových analgetik nebo léčebných přístupů, které jsou v současné době nedostačující a neposkytují úlevu při rozvoji mnoha chronických bolestí. Kanabinoidy a jejich deriváty mají vysoký potenciál budoucího terapeutického využití, i když překážkou je také pohled široké veřejnosti na tyto látky jako na typ drogy. Současné rozsáhlé výzkumy však naznačují pozitivní působení kanabinoidů na tlumení některých bolestivých stavů.



## 6. Použitá literatura

- Aanonsen, L. M., Lei, S., & Wilcox, G. L. (1990). Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. *Pain*, *41*(3), 309–321. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(90\)90008-2](https://doi.org/10.1016/0304-3959(90)90008-2)
- Abudara, V., Roux, L., Dallérac, G., Matias, I., Dulong, J., Mothet, J. P., Rouach, N., & Giaume, C. (2015). Activated microglia impairs neuroglial interaction by opening Cx43 hemichannels in hippocampal astrocytes. *Glia*, *63*(5), 795–811. <https://doi.org/10.1002/glia.22785>
- Alkaitis, M. S., Solorzano, C., Landry, R. P., Piomelli, D., DeLeo, J. A., & Romero-Sandoval, E. A. (2010). Evidence for a Role of Endocannabinoids, Astrocytes and p38 Phosphorylation in the Resolution of Postoperative Pain. *PLoS ONE*, *5*(5), e10891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010891>
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1998). Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, *10*(6), 2129–2142. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00221.x>
- \*Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, *139*(2), 267–284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>
- Bekkers, J. M., & Stevens, C. F. (1989). NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at individual excitatory synapses in cultured rat hippocampus. *Nature*, *341*(6239), 230–233. <https://doi.org/10.1038/341230a0>
- Beltramo, M., Bernardini, N., Bertorelli, R., Campanella, M., Nicolussi, E., Fredduzzi, S., & Reggiani, A. (2006). CB2 receptor-mediated antihyperalgesia: possible direct involvement of neural mechanisms. *European Journal of Neuroscience*, *23*(6), 1530–1538. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04684.x>
- Bennay, M., Langer, J., Meier, S. D., Kafitz, K. W., & Rose, C. R. (2008). Sodium signals in cerebellar Purkinje neurons and Bergmann glial cells evoked by glutamatergic synaptic transmission. *Glia*, *56*(10), 1138–1149. <https://doi.org/10.1002/glia.20685>
- Bezzi, P., Domercq, M., Brambilla, L., Galli, R., Schols, D., de Clercq, E., Vescovi, A., Bagetta, G., Kollias, G., Meldolesi, J., & Volterra, A. (2001). CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF $\alpha$ : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nature Neuroscience*, *4*(7), 702–710. <https://doi.org/10.1038/89490>
- Black, J. A., Cummins, T. R., Plumpton, C., Chen, Y. H., Hormuzdiar, W., Clare, J. J., & Waxman, S. G. (1999). Upregulation of a Silent Sodium Channel After Peripheral, but not Central, Nerve Injury in DRG Neurons. *Journal of Neurophysiology*, *82*(5), 2776–2785. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.5.2776>
- Bö, L., Mörk, S., Kong, P. A., Nyland, H., Pardo, C. A., & Trapp, B. D. (1994). Detection of MHC class II-antigens on macrophages and microglia, but not on astrocytes and endothelia in active multiple sclerosis lesions. *Journal of Neuroimmunology*, *51*(2), 135–146. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(94\)90075-2](https://doi.org/10.1016/0165-5728(94)90075-2)
- Brown, M. J. (1976). Painful Diabetic Neuropathy. *Archives of Neurology*, *33*(3), 164. <https://doi.org/10.1001/archneur.1976.00500030020004>
- Burgess, P. R., & Perl, E. R. (1967). Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. *The Journal of Physiology*, *190*(3), 541–562. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1967.sp008227>

- Burnashev, N., Schoepfer, R., Monyer, H., Ruppersberg, J. P., Günther, W., Seeburg, P. H., & Sakmann, B. (1992). Control by Asparagine Residues of Calcium Permeability and Magnesium Blockade in the NMDA Receptor. *Science*, 257(5075), 1415–1419. <https://doi.org/10.1126/science.1382314>
- Calignano, A., Rana, G. la, Giuffrida, A., & Piomelli, D. (1998). Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*, 394(6690), 277–281. <https://doi.org/10.1038/28393>
- \*Campos, R. M. P., Aguiar, A. F. L., Paes-Colli, Y., Trindade, P. M. P., Ferreira, B. K., de Melo Reis, R. A., & Sampaio, L. S. (2021). Cannabinoid Therapeutics in Chronic Neuropathic Pain: From Animal Research to Human Treatment. *Frontiers in Physiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.785176>
- Carrasquillo, Y., & Gereau, R. W. (2007). Activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase in the Amygdala Modulates Pain Perception. *Journal of Neuroscience*, 27(7), 1543–1551. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3536-06.2007>
- \*Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>
- \*Cervero, F., & Laird, J. M. (1999). Visceral pain. *The Lancet*, 353(9170), 2145–2148. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)01306-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)01306-9)
- Chen, S.-H., Oyarzabal, E. A., Sung, Y.-F., Chu, C.-H., Wang, Q., Chen, S.-L., Lu, R.-B., & Hong, J.-S. (2015). Microglial regulation of immunological and neuroprotective functions of astroglia. *Glia*, 63(1), 118–131. <https://doi.org/10.1002/glia.22738>
- Clayton, N., Marshall, F. H., Bountra, C., & O’Shaughnessy, C. T. (2002). CB1 and CB2 cannabinoid receptors are implicated in inflammatory pain. *Pain*, 96(3), 253–260. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(01\)00454-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(01)00454-7)
- Clouston, P. D., DeAngelis, L. M., & Posner, J. B. (1992). The spectrum of neurological disease in patients with systemic cancer. *Annals of Neurology*, 31(3), 268–273. <https://doi.org/10.1002/ana.410310307>
- Curtis, D. R., Phillis, J. W., & Watkins, J. C. (1959). Chemical Excitation of Spinal Neurones. *Nature*, 183(4661), 611–612. <https://doi.org/10.1038/183611a0>
- Demerens, C., Stankoff, B., Logak, M., Anglade, P., Allinquant, B., Couraud, F., Zalc, B., & Lubetzki, C. (1996). Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18), 9887–9892. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9887>
- Devane, W. A., Dysarz, F. A., Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*, 34(5), 605–613.
- Devane, W. A., Hanuš, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., & Mechoulam, R. (1992). Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. *Science*, 258(5090), 1946–1949. <https://doi.org/10.1126/science.1470919>
- Ehrhart, J., Obregon, D., Mori, T., Hou, H., Sun, N., Bai, Y., Klein, T., Fernandez, F., Tan, J., & Shytle, R. D. (2005). Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *Journal of Neuroinflammation*, 2(1), 29. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-2-29>

- Falinower, S., Willer, J. C., Junien, J. L., & le Bars, D. (1994). A C-fiber reflex modulated by heterotopic noxious somatic stimuli in the rat. *Journal of Neurophysiology*, *72*(1), 194–213. <https://doi.org/10.1152/jn.1994.72.1.194>
- Farquhar-Smith, W. P., Egertová, M., Bradbury, E. J., McMahon, S. B., Rice, A. S. C., & Elphick, M. R. (2000). Cannabinoid CB1 Receptor Expression in Rat Spinal Cord. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *15*(6), 510–521. <https://doi.org/10.1006/mcne.2000.0844>
- Fields, H. L., & Heinricher, M. M. (1985). Anatomy and physiology of a nociceptive modulatory system. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, *308*(1136), 361–374. <https://doi.org/10.1098/rstb.1985.0037>
- Freund, T. F., Katona, I., & Piomelli, D. (2003). Role of Endogenous Cannabinoids in Synaptic Signaling. *Physiological Reviews*, *83*(3), 1017–1066. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2003>
- Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carriere, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Fur, G., & Casellas, P. (1995). Expression of Central and Peripheral Cannabinoid Receptors in Human Immune Tissues and Leukocyte Subpopulations. *European Journal of Biochemistry*, *232*(1), 54–61. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20780.x>
- Hara, M., Kobayakawa, K., Ohkawa, Y., Kumamaru, H., Yokota, K., Saito, T., Kijima, K., Yoshizaki, S., Harimaya, K., Nakashima, Y., & Okada, S. (2017). Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin–N-cadherin pathway after spinal cord injury. *Nature Medicine*, *23*(7), 818–828. <https://doi.org/10.1038/nm.4354>
- Harper, A. A., & Lawson, S. N. (1985). Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *The Journal of Physiology*, *359*(1), 31–46. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1985.sp015573>
- Hashimoto-dani, Y., Ohno-Shosaku, T., Tsubokawa, H., Ogata, H., Emoto, K., Maejima, T., Araishi, K., Shin, H.-S., & Kano, M. (2005). Phospholipase C $\beta$  Serves as a Coincidence Detector through Its Ca<sup>2+</sup> Dependency for Triggering Retrograde Endocannabinoid Signal. *Neuron*, *45*(2), 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.004>
- Hegyí, Z., Oláh, T., Kőszeghy, Á., Piscitelli, F., Holló, K., Pál, B., Csernoch, L., di Marzo, V., & Antal, M. (2018). CB1 receptor activation induces intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and 2-arachidonoylglycerol release in rodent spinal cord astrocytes. *Scientific Reports*, *8*(1), 10562. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28763-6>
- Herkenham, M., Lynn, A., Johnson, M., Melvin, L., de Costa, B., & Rice, K. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *The Journal of Neuroscience*, *11*(2), 563–583. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-02-00563.1991>
- \*Hillard, C. J. (2015). *The Endocannabinoid Signaling System in the CNS* (pp. 1–47). <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2015.10.001>
- \*Hochman, S. (2007). Spinal cord. *Current Biology*, *17*(22), R950–R955. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.014>
- Hohmann, A. G., & Herkenham, M. (1999). Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: a double-label in situ hybridization study. *Neuroscience*, *90*(3), 923–931. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00524-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00524-7)
- Hollmann, M., Hartley, M., & Heinemann, S. (1991). Ca<sup>2+</sup> Permeability of KA-AMPA—Gated Glutamate Receptor Channels Depends on Subunit Composition. *Science*, *252*(5007), 851–853. <https://doi.org/10.1126/science.1709304>

- Howlett, A. C. (1984). Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantradol compounds. *Life Sciences*, 35(17), 1803–1810. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(84\)90278-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(84)90278-9)
- Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203–210. <https://doi.org/10.1038/35093019>
- Kangrga, I., & Randic, M. (1990). Tachykinins and calcitonin gene-related peptide enhance release of endogenous glutamate and aspartate from the rat spinal dorsal horn slice. *The Journal of Neuroscience*, 10(6), 2026–2038. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-06-02026.1990>
- Kato, A., Punnakkal, P., Pernía-Andrade, A. J., von Schoultz, C., Sharopov, S., Nyilas, R., Katona, I., & Zeilhofer, H. U. (2012). Endocannabinoid-dependent plasticity at spinal nociceptor synapses. *The Journal of Physiology*, 590(19), 4717–4733. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.234229>
- \*Katona, I., & Freund, T. F. (2008). Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nature Medicine*, 14(9), 923–930. <https://doi.org/10.1038/nm.f.1869>
- Kerchner, G. A., Wilding, T. J., Li, P., Zhuo, M., & Huettner, J. E. (2001). Presynaptic Kainate Receptors Regulate Spinal Sensory Transmission. *The Journal of Neuroscience*, 21(1), 59–66. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-01-00059.2001>
- \*Komorowski, J., & Stepień, H. (2007). The role of the endocannabinoid system in the regulation of endocrine function and in the control of energy balance in humans. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, 61, 99–105.
- Kreitzer, A. C., & Regehr, W. G. (2001). Retrograde Inhibition of Presynaptic Calcium Influx by Endogenous Cannabinoids at Excitatory Synapses onto Purkinje Cells. *Neuron*, 29(3), 717–727. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00246-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00246-X)
- \*Latremoliere, A., & Woolf, C. J. (2009). Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *The Journal of Pain*, 10(9), 895–926. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2009.06.012>
- Li, P., Wilding, T. J., Kim, S. J., Calejesan, A. A., Huettner, J. E., & Zhuo, M. (1999). Kainate-receptor-mediated sensory synaptic transmission in mammalian spinal cord. *Nature*, 397(6715), 161–164. <https://doi.org/10.1038/16469>
- Lichtman, A. H., Leung, D., Shelton, C. C., Saghatelian, A., Hardouin, C., Boger, D. L., & Cravatt, B. F. (2004). Reversible Inhibitors of Fatty Acid Amide Hydrolase That Promote Analgesia: Evidence for an Unprecedented Combination of Potency and Selectivity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(2), 441–448. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.069401>
- Liu, Q.-R., Huang, N. S., Qu, H., O’Connell, J. F., Gonzalez-Mariscal, I., Santa-Cruz-Calvo, S., Doyle, M. E., Xi, Z.-Xiong., Wang, Y., Onaivi, Emmanuel. S., & Egan, J. M. (2019). Identification of novel mouse and rat CB1R isoforms and in silico modeling of human CB1R for peripheral cannabinoid therapeutics. *Acta Pharmacologica Sinica*, 40(3), 387–397. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0152-1>
- Llano, I., Leresche, N., & Marty, A. (1991). Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron*, 6(4), 565–574. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90059-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90059-9)
- MacDermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J., & Barker, J. L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature*, 321(6069), 519–522. <https://doi.org/10.1038/321519a0>

- Mackie, K., & Hille, B. (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(9), 3825–3829. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.9.3825>
- Maejima, T., Hashimoto, K., Yoshida, T., Aiba, A., & Kano, M. (2001). Presynaptic Inhibition Caused by Retrograde Signal from Metabotropic Glutamate to Cannabinoid Receptors. *Neuron*, 31(3), 463–475. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00375-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00375-0)
- Malan, P. T., Ibrahim, M. M., Deng, H., Liu, Q., Mata, H. P., Vanderah, T., Porreca, F., & Makriyannis, A. (2001). CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain*, 93(3), 239–245. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(01\)00321-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(01)00321-9)
- 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., & Simone, D. A. (1997). Inhibition of Hyperalgesia by Ablation of Lamina I Spinal Neurons Expressing the Substance P Receptor. *Science*, 278(5336), 275–279. <https://doi.org/10.1126/science.278.5336.275>
- \*Marsh, J. D. (2016). Physiology of Pain. *Basicmedical Key*. <https://basicmedicalkey.com/pain-3/>
- Martin, W. J., Lai, N. K., Patrick, S. L., Tsou, K., & Walker, J. M. (1993). Antinociceptive actions of cannabinoids following intraventricular administration in rats. *Brain Research*, 629(2), 300–304. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91334-O](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91334-O)
- Martin, W. J., Patrick, S. L., Coffin, P. O., Tsou, K., & Walker, J. M. (1995). An examination of the central sites of action of cannabinoid-induced antinociception in the rat. *Life Sciences*, 56(23–24), 2103–2109. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)00195-C](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)00195-C)
- McHugh, D., Hu, S. S., Rimmerman, N., Juknat, A., Vogel, Z., Walker, J. M., & Bradshaw, H. B. (2010). N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor. *BMC Neuroscience*, 11(1), 44. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-44>
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B. R., Compton, D. R., Pertwee, R. G., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J., & Vogel, Z. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 50(1), 83–90. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00109-D](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00109-D)
- \*Meir, A., Ginsburg, S., Butkevich, A., Kachalsky, S. G., Kaiserman, I., Ahdut, R., Demirgoren, S., & Rahamimoff, R. (1999). Ion Channels in Presynaptic Nerve Terminals and Control of Transmitter Release. *Physiological Reviews*, 79(3), 1019–1088. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.3.1019>
- \*Melzack, R. (1961). The Perception of Pain. *Scientific American*, 41–49.
- Meng, J., Wang, J., Steinhoff, M., & Dolly, J. O. (2016). TNF $\alpha$  induces co-trafficking of TRPV1/TRPA1 in VAMP1-containing vesicles to the plasmalemma via Munc18–1/syntaxin1/SNAP-25 mediated fusion. *Scientific Reports*, 6(1), 21226. <https://doi.org/10.1038/srep21226>
- \*Millan, M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57(1), 1–164. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00048-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00048-3)
- \*Mills, B., Yepes, A., & Nugent, K. (2015). Synthetic Cannabinoids. *The American Journal of the Medical Sciences*, 350(1), 59–62. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0000000000000466>

- Mohapatra, D. P., & Nau, C. (2005). Regulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent Desensitization in the Vanilloid Receptor TRPV1 by Calcineurin and cAMP-dependent Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 13424–13432. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410917200>
- \*Moiseenkova-Bell, V. Y., Stanciu, L. A., Serysheva, I. I., Tobe, B. J., & Wensel, T. G. (2008). Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(21), 7451–7455. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711835105>
- Morisset, V., & Urban, L. (2001). Cannabinoid-Induced Presynaptic Inhibition of Glutamatergic EPSCs in Substantia Gelatinosa Neurons of the Rat Spinal Cord. *Journal of Neurophysiology*, 86(1), 40–48. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.1.40>
- Naderi, N., Shafaghi, B., Khodayar, M.-J., & Zarindast, M.-R. (2005). Interaction between gamma-aminobutyric acid GABAB and cannabinoid CB1 receptors in spinal pain pathways in rat. *European Journal of Pharmacology*, 514(2–3), 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.03.037>
- Nerandzic, V., Mrozkova, P., Adamek, P., Spicarova, D., Nagy, I., & Palecek, J. (2018). Peripheral inflammation affects modulation of nociceptive synaptic transmission in the spinal cord induced by N-arachidonoylphosphatidylethanolamine. *British Journal of Pharmacology*, 175(12), 2322–2336. <https://doi.org/10.1111/bph.13849>
- Norenberg, M. D., & Martinez-Hernandez, A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Research*, 161(2), 303–310. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90071-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90071-4)
- Numazaki, M., Tominaga, T., Toyooka, H., & Tominaga, M. (2002). Direct Phosphorylation of Capsaicin Receptor VR1 by Protein Kinase C $\epsilon$  and Identification of Two Target Serine Residues. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 13375–13378. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200104200>
- Nyilas, R., Gregg, L. C., Mackie, K., Watanabe, M., Zimmer, A., Hohmann, A. G., & Katona, I. (2009). Molecular architecture of endocannabinoid signaling at nociceptive synapses mediating analgesia. *European Journal of Neuroscience*, 29(10), 1964–1978. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06751.x>
- \*Olesen, A. E., Andresen, T., Staahl, C., & Drewes, A. M. (2012). Human Experimental Pain Models for Assessing the Therapeutic Efficacy of Analgesic Drugs. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 722–779. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005447>
- \*Orel, M. (2015). *Nervové buňky a jejich svět* (1st ed.). Grada Publishing.
- Paszczuk, A. F., Dutra, R. C., da Silva, K. A. B. S., Quintão, N. L. M., Campos, M. M., & Calixto, J. B. (2011). Cannabinoid Agonists Inhibit Neuropathic Pain Induced by Brachial Plexus Avulsion in Mice by Affecting Glial Cells and MAP Kinases. *PLoS ONE*, 6(9), e24034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024034>
- Pernía-Andrade, A. J., Kato, A., Witschi, R., Nyilas, R., Katona, I., Freund, T. F., Watanabe, M., Filitz, J., Koppert, W., Schüttler, J., Ji, G., Neugebauer, V., Marsicano, G., Lutz, B., Vanegas, H., & Zeilhofer, H. U. (2009). Spinal Endocannabinoids and CB<sub>1</sub> Receptors Mediate C-Fiber-Induced Heterosynaptic Pain Sensitization. *Science*, 325(5941), 760–764. <https://doi.org/10.1126/science.1171870>
- Prescott, E. D., & Julius, D. (2003). A Modular PIP<sub>2</sub> Binding Site as a Determinant of Capsaicin Receptor Sensitivity. *Science*, 300(5623), 1284–1288. <https://doi.org/10.1126/science.1083646>
- \*Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F. J., Mogil, J. S., Ringkamp, M., Sluka, K. A., Song, X.-J., Stevens, B., Sullivan, M. D., Tutelman, P. R., Ushida, T., & Vader, K. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain:

- concepts, challenges, and compromises. *Pain*, 161(9), 1976–1982. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>
- Richardson, J. D., Aanonsen, L., & Hargreaves, K. M. (1997). SR 141716A, a cannabinoid receptor antagonist, produces hyperalgesia in untreated mice. *European Journal of Pharmacology*, 319(2–3), R3–R4. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(96\)00952-1](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(96)00952-1)
- \*Riedel, W., & Neeck, G. (2001). Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Zeitschrift Für Rheumatologie*, 60(6), 404–415. <https://doi.org/10.1007/s003930170003>
- Rokyta, R., Haklova, O., & Yamamoto, A. (2009). Assessment of chronic benign and cancer pain using blood plasma biomarkers. *Neuro Endocrinology Letters*, 30(5), 637–642.
- Romero-Sandoval, E. A., Horvath, R., Landry, R. P., & DeLeo, J. A. (2009). CANNabinoid Receptor Type 2 Activation Induces a Microglial Anti-Inflammatory Phenotype and Reduces Migration via MKP Induction and ERK Dephosphorylation. *Molecular Pain*, 5, 1744-8069-5–25. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-5-25>
- Ross, R. A., Coutts, A. A., McFarlane, S. M., Anavi-Goffer, S., Irving, A. J., Pertwee, R. G., MacEwan, D. J., & Scott, R. H. (2001). Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology*, 40(2), 221–232. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(00\)00135-0](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(00)00135-0)
- Rutkowski, J. L., Tuite, G. F., Lincoln, P. M., Boyer, P. J., Tennekoon, G. I., & Kunkel, S. L. (1999). Signals for proinflammatory cytokine secretion by human Schwann cells. *Journal of Neuroimmunology*, 101(1), 47–60. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(99\)00132-0](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(99)00132-0)
- Sacerdote, P., Massi, P., Panerai, A. E., & Parolaro, D. (2000). In vivo and in vitro treatment with the synthetic cannabinoid CP55,940 decreases the in vitro migration of macrophages in the rat: involvement of both CB1 and CB2 receptors. *Journal of Neuroimmunology*, 109(2), 155–163. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(00\)00307-6](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(00)00307-6)
- Sagar, D. R., Kelly, S., Millns, P. J., O’Shaughnessey, C. T., Kendall, D. A., & Chapman, V. (2005). Inhibitory effects of CB1 and CB2 receptor agonists on responses of DRG neurons and dorsal horn neurons in neuropathic rats. *European Journal of Neuroscience*, 22(2), 371–379. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04206.x>
- Sandkühler, J., & Gebhart, G. F. (1984). Characterization of inhibition of a spinal nociceptive reflex by stimulation medially and laterally in the midbrain and medulla in the pentobarbital-anesthetized rat. *Brain Research*, 305(1), 67–76. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)91120-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)91120-X)
- Schon, F., & Kelly, J. S. (1974). Autoradiographic localisation of [3H]GABA and [3H]glutamate over satellite glial cells. *Brain Research*, 66(2), 275–288. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(74\)90146-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(74)90146-2)
- Sipe, J. C. (2005). Reduced endocannabinoid immune modulation by a common cannabinoid 2 (CB2) receptor gene polymorphism: possible risk for autoimmune disorders. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(1), 231–238. <https://doi.org/10.1189/jlb.0205111>
- Smit, A. B., Syed, N. I., Schaap, D., van Minnen, J., Klumperman, J., Kits, K. S., Lodder, H., van der Schors, R. C., van Elk, R., Sorgedrager, B., Brejc, K., Sixma, T. K., & Geraerts, W. P. M. (2001). A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature*, 411(6835), 261–268. <https://doi.org/10.1038/35077000>
- Smith, S. R., Terminelli, C., & Denhardt, G. (2000). Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-

- 10 in endotoxemic mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 293(1), 136–150.
- \*Snider, N. T., Walker, V. J., & Hollenberg, P. F. (2010). Oxidation of the Endogenous Cannabinoid Arachidonoyl Ethanolamide by the Cytochrome P450 Monooxygenases: Physiological and Pharmacological Implications. *Pharmacological Reviews*, 62(1), 136–154. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001081>
- Snider, W. D., Simpson, D. M., Nielsen, S., Gold, W. M. J., Metroka, C. E., & Posner, J. B. (1983). Neurological complications of acquired immune deficiency syndrome: Analysis of 50 patients. *Annals of Neurology*, 14(4), 403–418. <https://doi.org/10.1002/ana.410140404>
- Spicarova, D., & Palecek, J. (2010). Tumor necrosis factor  $\alpha$  sensitizes spinal cord TRPV1 receptors to the endogenous agonist N-oleoyldopamine. *Journal of Neuroinflammation*, 7(1), 49. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-49>
- Staton, P. C., Hatcher, J. P., Walker, D. J., Morrison, A. D., Shapland, E. M., Hughes, J. P., Chong, E., Mander, P. K., Green, P. J., Billinton, A., Fulleylove, M., Lancaster, H. C., Smith, J. C., Bailey, L. T., Wise, A., Brown, A. J., Richardson, J. C., & Chessell, I. P. (2008). The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, 139(1), 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.04.006>
- Stella, N., Schweitzer, P., & Piomelli, D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388(6644), 773–778. <https://doi.org/10.1038/42015>
- Strangman, N. M., Patrick, S. L., Hohmann, A. G., Tsou, K., & Walker, J. M. (1998). Evidence for a role of endogenous cannabinoids in the modulation of acute and tonic pain sensitivity. *Brain Research*, 813(2), 323–328. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)01031-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)01031-2)
- Sullivan, J. M. (1999). Mechanisms of Cannabinoid-Receptor-Mediated Inhibition of Synaptic Transmission in Cultured Hippocampal Pyramidal Neurons. *Journal of Neurophysiology*, 82(3), 1286–1294. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.3.1286>
- Szallasi, A., & Goso, C. (1994). Characterization by [<sup>3</sup>H]resiniferatoxin binding of a human vanilloid (capsaicin) receptor in post-mortem spinal cord. *Neuroscience Letters*, 165(1–2), 101–104. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90719-6](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90719-6)
- Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B. E., Basbaum, A. I., & Julius, D. (1998). The Cloned Capsaicin Receptor Integrates Multiple Pain-Producing Stimuli. *Neuron*, 21(3), 531–543. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80564-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80564-4)
- \*Tracey, W. D. (2017). Nociception. *Current Biology*, 27(4), R129–R133. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.037>
- Tsou, K., Mackie, K., Sañudo-Peña, M. C., & Walker, J. M. (1999). Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystokinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation. *Neuroscience*, 93(3), 969–975. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00086-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00086-X)
- \*Woolf, C. J., & Ma, Q. (2007). Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors. *Neuron*, 55(3), 353–364. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.016>
- Yaksh, T. L. (1981). The Antinociceptive Effects of Intrathecally Administered Levonantradol and Desacetyllevonantradol in the Rat. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 21(S1), 334S–340S. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1981.tb02612.x>



- Yaksh, T. L. (1985). Pharmacology of spinal adrenergic systems which modulate spinal nociceptive processing. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 22(5), 845–858. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(85\)90537-4](https://doi.org/10.1016/0091-3057(85)90537-4)
- Yang, X., Yang, H.-B., Xie, Q.-J., Liu, X.-H., & Hu, X.-D. (2009). Peripheral inflammation increased the synaptic expression of NMDA receptors in spinal dorsal horn. *Pain*, 144(1), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.04.005>
- Yuan, M., Kiertscher, S. M., Cheng, Q., Zoumalan, R., Tashkin, D. P., & Roth, M. D. (2002).  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol regulates Th1/Th2 cytokine balance in activated human T cells. *Journal of Neuroimmunology*, 133(1–2), 124–131. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(02\)00370-3](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00370-3)
- Zhang, G., Chen, W., Lao, L., & Marvizón, J. C. G. (2010). Cannabinoid CB1 receptor facilitation of substance P release in the rat spinal cord, measured as neurokinin 1 receptor internalization. *European Journal of Neuroscience*, 31(2), 225–237. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.07075.x>
- \*Zou, S., & Kumar, U. (2018). Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 833. <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>
- Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sjørgård, M., di Marzo, V., Julius, D., & Högestätt, E. D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400(6743), 452–457. <https://doi.org/10.1038/22761>

\* označení sekundárních citací