

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie živočichů



Diplomová práce

Modulace synaptického přenosu, studium na míšních řezech *in vitro*

Modulation of synaptic transmission,
studies on spinal cord slices *in vitro*

Bc. Petra Mrózková
Praha 2011

Školitel: MUDr. Jiří Paleček, CSc.

Fyziologický ústav AV ČR v. v. i.
Oddělení Funkční morfologie

Prohlášení o samostatném vypracování práce

Předkládám tímto k posouzení a obhajobě diplomovou práci, zpracovanou na závěr svého magisterského studia na Přírodovědecké fakultě, Katedře fyziologie živočichů Univerzity Karlovy v Praze. Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, s použitím odborné literatury a pramenů uvedených v seznamu, který je součástí této diplomové práce, pod vedením MUDr. Jiřího Palečka CSc. Dále prohlašuji, že tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů.

Bc. Petra Mrózková

.....

Poděkování

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce MUDr. Jiřímu Palečkovi, CSc. za obrovskou pomoc, vedení, rady, vstřícný přístup, podnětné připomínky a trpělivost, které mi v průběhu psaní diplomové práce poskytoval.

Anotace

Modulace synaptického přenosu v zadním rohu míšním hraje klíčovou úlohu v nociceptivní signalizaci, zejména za patologických bolestivých stavů. Cílem naší práce bylo rozvinout metodu calcium imagingu na míšních řezech *in vitro*. Tato metoda umožňuje sledovat změny intracelulární koncentrace volných vápenatých iontů (iCa^{2+}), které jsou hlavním mediátorem neuronální plasticity. V naší práci jsme se soustředili na použití této metody na konvenčním fluorescenčním mikroskopu a na studium vlivu aplikace látek ovlivňujících synaptický přenos. V experimentech byly snímány koncentrační změny iCa^{2+} v 744 neuronech zadních rohů míšních (lamina I a II) po elektrické stimulaci zadních kořenů.

V první sérii experimentů byly použity stimulační protokoly preferenčně aktivující A a A+C vlákna zadních kořenů a ověřena dlouhodobá stabilita vápníkových odpovědí. Stimulace zadního kořene vyvolala ve sledovaných neuronech rychlý a pozdní typ vápníkové odpovědi.

Aplikace antagonistů glutamátových receptorů AMPA a NMDA typu, CNQX ($50\mu\text{M}$) a MK801 ($45\mu\text{M}$) snížila podle očekávání amplitudu vápníkové odpovědi oproti kontrolním hodnotám a potvrdila jejich jednoznačný význam pro synaptickou aktivaci. V několika pokusech jsme zkoumali účinek kapsaicinu, známého agonisty TRPV1 receptorů. Aplikace i nízké koncentrace kapsaicinu (30nM) výrazně a dlouhodobě snižovala vápníkovou odpověď po stimulaci oproti kontrolním hodnotám. Tyto výsledky svědčí o pravděpodobné inaktivaci presynaptických zakončení exprimujících TRPV1 receptory kapsaicinem. V předběžné sérii pokusů jsme také testovali, o nichž je známo, že mohou modulovat nociceptivní synaptický přenos (TNF α , PMA a bradykinin).

Získané výsledky ukázaly, že použitý model snímání neuronální aktivity *in vitro* umožňuje sledovat synaptickou aktivaci populace neuronů v míšním řezu a její modulaci po aplikaci farmak. Studium mechanismů modulace nociceptivního přenosu může přispět k novým terapeutickým přístupům při léčbě bolesti.

Klíčová slova

bolest, nocicepce, mícha, TRPV1, capsaicin, míšní synapse, calcium imaging, primární aferentní vlákna

Annotation

Modulation of a synaptic transmission in the spinal cord dorsal horn plays a key role in nociceptive signalling, especially in states of pathological pain. The goal of this study was to develop a method for calcium imaging in spinal cord slices *in vitro*. This method allowed us to record changes of intracellular free calcium ions concentration (iCa^{2+}), that are a major mediator of neuronal plasticity. In this work, we have focused on application of this method in a conventional fluorescence microscope and on the role of different neuromodulators of synaptic activity. Changes of iCa^{2+} induced by dorsal root electrical stimulation were recorded altogether in 744 dorsal horn (lamina I and II) neurons.

In the first series of experiments, stimulation protocols activating preferentially A and A + C dorsal root fibers were used and long-term stability of the calcium responses was verified. The dorsal root stimulation induced in the neurons fast and delayed type of calcium response.

Application of AMPA and NMDA receptors antagonists, CNQX (50 μ M) and MK801 (45 μ M), reduced the calcium response amplitude and confirmed the importance of glutamate receptors in synaptic activation. In several experiments the effect of capsaicin a TRPV1 receptors agonist, application was tested. Application of even low concentrations of capsaicin (30nM) significantly reduced the calcium response, compared to the control values. These results suggest a probable inactivation of presynaptic endings expressing TRPV1 receptors by capsaicin. In preliminary experiments, substances which are known as modulators of nociceptive synaptic transmission (TNF α , PMA, and bradykinin) were also tested.

Our results demonstrate that this *in vitro* technique allows monitoring synaptic activation of neuronal populations in the spinal cord slices. Further study of nociceptive transmission modulation mechanisms may contribute to new therapeutic approaches in the therapy of pathological pain states.

Keywords

pain, nociception, spinal cord, TRPV1, capsaicin, spinal synapses, calcium imaging, primary afferents

Seznam zkratek:

AC	Adenylátcykláza
ADPA	denosindifosfát
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol propionová kyselina
AMPAR	AMPA receptory
ATP	adenozintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
CaBP	vápník vázající proteiny
CaMKII	proteinkináza závislá na Ca^{2+} a kalmodulinu
CICR	vápeníkem indukované uvolňování vápníku
CGRP	peptid odvozený od genu pro kalcitonin
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxalin
CNS	centrální nervová soustava
COX	cyklooxygenáza
DAG	diacylglycerol
DH	dorsal horn (zadní roh míšni)
DRG	dorsal root ganglion (zadní kořen míšni)
DMSO	dimethylsulfoxid
ER	endoplazmatické retikulum
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GDNF	gliální nervový růstový faktor
GPCR	receptory spojené s G proteiny
IASP	Mezinárodní organizace pro výzkum bolesti
IC	intracelulární
iCa^{2+}	intracelulární volné vápenaté ionty
IL	interleukin
IP3	inositol-3-fosfát
IP3R	inositol-3-fosfátový receptor
LT	low threshold nízko prahový
LTD	dlouhodobá deprese
LTP	dlouhodobá potenciace
NB	neuropatická bolest
NCX	sodíko-vápníkový výměník
NGF	nervový růstový faktor
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
NMDAR	<i>N</i> -methyl-D-aspartátový receptor
NO	Oxid dusnatý
MIT	mitochondrie
PAF	periferní aferentní vlákna
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PKM	proteinkinasa M
PMCA	ATP závislá vápníková pumpa
PMA	forbol-12-myristát-13-acetát
PTK	protein-tyrozinkináza
$TNF\alpha$	tumor nekrotizující faktor α
TRPV1	transient receptor potential vanilloid 1
SCaMPER	vápníkový kanál na ER aktivovaný sfingolipidem-1-fosfátem
SERCA	vápníková ATPazová pumpa na ER
SOC	Store-operated channels na plazmatické membráně
SP	substance P
RYR	ryanodinový receptore
WDR	wide-dynamic range neurony

Obsah:

ÚVOD	9
1. LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
1.1. KLASIFIKACE BOLESTI.....	11
1.2. ANATOMICKÉ A FYZIOLOGICKÉ ZÁKLADY NOCICEPTIVNÍHO SYSTÉMU.....	13
1.2.1. Primární aferentní vlákna.....	13
1.2.2. Rexedovo členění šedé hmoty	16
1.2.3. Přenos informace a modulace na míšni úrovni	17
1.2.4. Synaptický přenos a projekce do CNS	17
1.2.5. Gliové buňky	19
1.3. NEUROPATICKÁ BOLEST	20
1.3.1. Buněčné a molekulární změny spjaté s neuropatickou bolestí	21
1.4. SYNAPTICKÉ RECEPTORY EXPRIMOVANÉ V ZADNÍM ROHU MÍŠNÍM	24
1.4.1. Glutamátové receptory – ionotropní.....	24
1.4.2. Glutamátové receptory – metabotropní.....	28
1.4.3. Excitotoxicita glutamátu	29
1.4.4. Úloha glutamátových receptoru v nocicepci	30
1.5. TRPV1 RECEPTORY A JEJICH FUNKCE	31
1.5.1. Molekulární stavba TRPV1 receptoru	32
1.5.2. Aktivace TRPV1 receptoru.....	33
1.5.3. Senzitizace TRPV1 receptoru.....	34
1.5.4. Antagonisté- desenzitizace TRPV1 receptoru.....	35
1.5.5. Úloha centrálních TRPV1 receptorů v synaptickém přenosu v DH.....	37
1.5.6. TRPV1 receptory v patologických bolestivých stavech	38
1.6. ZMĚNY KONCENTRACE VÁPENATÝCH IONTŮ V NEURONECH	40
1.6.1. Úloha vápenatých iontů v neuronech	40
1.6.2. Extracelulární zdroje vápníku	42
1.6.3. Intracelulární vápníkové rezervoáry	43
1.6.4. Vápník vázající proteiny	48
1.6.5. Ca^{2+} senzory.....	49
2. CÍLE PRÁCE	50
3. MATERIÁLY A METODY	51
3.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	51
3.2. SLOŽENÍ POUŽITÝCH ROZTOKŮ	51
3.3. PŘÍPRAVA MÍŠNÍCH ŘEZŮ	52
3.4. BARVENÍ FLUORESCENČNÍMI BARVAMI.....	53
3.5. CALCIUM IMAGING.....	53
3.6. APARATURA A PŘÍSLUŠENSTVÍ	53
3.7. APLIKACE LÁTEK A ELEKTRICKÁ STIMULACE.....	54
3.8. ANALÝZA DAT.....	54

4. VÝSLEDKY	56
4.1. VYVOLÁNÍ ZMĚNY KONCENTRACE VÁPENATÝCH IONTŮ V CYTOSOLU NEURONŮ ZADNÍCH ROHŮ POMOCÍ STIMULACE ZADNÍCH KOŘENŮ MÍŠNÍCH.....	56
4.2. ROZDÍLNÉ ČASOVÉ PRŮBĚHY ODPOVĚDI NA STIMULACI	57
4.3. ZÁVISLOST VÁPŇÍKOVÉ ODPOVĚDI NA PARAMETRECH STIMULACE	58
4.5. OVLIVNĚNÍ IONOTROPNÍCH GLUTAMÁTOVÝCH RECEPTORŮ ANTAGONISTY.....	62
4.5.1. <i>Antagonista AMPA receptorů</i>	63
4.5.2. <i>Antagonista NMDA receptorů</i>	66
4.6. VLIV KAPSAICINU NA SYNAPTICKÝ PŘENOS V ZADNÍM ROHU MÍŠNÍM	70
4.6.1. <i>Aplikace kapsaicinu při stimulaci neuronů pulzem o délce trvání 0,5ms</i>	70
4.6.2. <i>Vliv aplikace kapsaicinu při stimulaci neuronů oběma pulzy o délce trvání 0,5ms a 0,1ms</i>	74
4.7. VLIV APLIKACE LÁTEK MODULUJÍCÍCH SYNAPTICKÝ PŘENOS (TNF α , PMA A BRADYKININU).....	80
5. DISKUZE VÝSLEDKŮ	82
5.1. SYNAPTICKY EVOKOVANÉ ZMĚNY KONCENTRACE INTRACELULÁRNÍCH VÁPENATÝCH IONTŮ VYVOLANÉ ELEKTRICKOU STIMULACÍ ZADNÍCH KOŘENŮ MÍCHY	82
5.2. ZÁVISLOST VÁPŇÍKOVÉ ODPOVĚDI NA DÉLCE STIMULAČNÍHO PULZU – DIFERENCIÁLNÍ STIMULACE ZADNÍHO KOŘENU MÍŠNÍHO	85
5.3. STABILITA RYCHLÉ A POZDNÍ VÁPŇÍKOVÉ ODPOVĚDI V ČASE.....	86
5.4. MODULACE SYNAPTICKÉHO PŘENOSU FARMAKY	87
5.4.1. <i>Vliv aplikace antagonistů ionotropních glutanátových receptorů na synaptický přenos v zadním rohu míšním</i>	87
5.4.2. <i>Vliv kapsaicinu na modulaci synaptického přenosu v zadním rohu míšním</i> ..	89
5.4.3. <i>Vliv aplikace TNFα, PMA a Bradykininu na vápníkovou odpověď neuronů</i>	91
6. ZÁVĚR	93
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	95

Úvod

Bolest patří do základní výbavy smyslového vnímání každého jedince. Má zásadní vliv na přežití organismu. Je vždy subjektivní, každý ji prožíváme jinak. Informuje nás o skutečném či možném poškození tkání a tím nás chrání. Bolest je sensorický vjem, který má silnou kognitivní a emoční složku, je spojen s behaviorálními stereotypy vedoucími k vyhýbání se bolestivému podnětu a rovněž s vegetativní odezvou. Bolest, i přes to jak je to užitečný mechanismus je také velice nepříjemným vjemem. Bolestivými stavy se medicína zabývá již celá staletí. Do dnešních dnů se to ne zcela povedlo. A proto dál hledáme nové cesty k jejímu zmírnění či úplnému odstranění. Je velmi důležité pochopit a dále studovat všechny mechanismy vzniku a přetrvávání bolesti. Ačkoliv je bolest považována za jedinou sensorickou modalitu, existuje několik různých typů bolesti. Existují stavy, kdy bolest již neplní svůj ochranný účel, stává se přítěží a patologickým problémem. Přetrvávající bolest přestává být symptomem a stává se nemocí samotnou.

Dnes toho víme o příčinách a mechanismech bolesti více, a jsme tak mnohem efektivnější při jejím zvládnutí. A to hlavně díky vytrvalému studiu všech aspektů přenosu bolesti, které směřuje k detailnímu poznání mechanismů nociceptivní signalizace. Poškozující podněty jsou detekovány specifickými receptory-nociceptory. Nocicepce je proces signalizace přítomnosti bolestivého podnětu a vzniká podrážděním nociceptorů. Samotnou aktivitu nociceptorů však za bolest považovat nelze. Zvláštností je, že nociceptory většinou reagují až na velmi intenzivní podněty a nedochází u nich k adaptaci na přetrvávající podnět, naopak se k němu stávají citlivějšími. Informace jsou vedeny periferními aferentními vlákny neuronů zadních míšních ganglií do zadního rohu míchy. V míše dochází k synaptickému přepojení a modulaci informace je dále šířena po axonech projekčních neuronů do vyšších center centrální nervové soustavy. Modulace synaptického přenosu v zadním rohu míšním hraje klíčovou úlohu v nociceptivní signalizaci a v rozvoji bolestivých stavů.

Jedním z nejpečlivěji studovaných mechanismů je přenos nociceptivní informace zprostředkovaný TRPV1 kanály uložených na centrálních výběžcích PAF. Funkce TRPV1 na periférii je již poměrně dobře známa, avšak jejich funkce v CNS, zejména pak v zadních rozech míchy, ještě tak úplně objasněna nebyla. Je prokázáno, že presynapticky uložené TRPV1 v zadním rohu míchy mohou mít vliv na modulaci přenosu nocicepce do vyšších center.

Tato naše práce se koncentruje na studium modulace nociceptivního synaptického přenosu na míšní úrovni. Naším cílem bylo vyvinout model, na kterém by bylo možné sledovat aktivitu míšních neuronů zapojených do nociceptivního přenosu v řezech *in vitro* a zároveň modulovat synaptický přenos. Pro naše účely jsme proto použili metodu calcium imagingu, tedy snímání koncentračních změn vápenatých iontů v tělech neuronů, která umožňuje sledovat aktivitu celé neuronální populace najednou. Přizpůsobili jsme techniku calcium imagingu jako nástroje pro výzkum mechanismů bolesti na míšní úrovni pro použití na fluorescenčním mikroskopu. Soustředili jsme se především na neurony v superficiálních vrstvách zadního rohu míchy, laminy I. a II. kde je hlavní přepojení nociceptivních primárních aferentů na míšní neurony. V našich experimentech jsme analyzovali synapticky evokované změny koncentrace intracelulárních vápenatých iontů v neuronech po stimulaci zadních kořenů míšních.

Naše výsledky mohou přispět ke zpřesnění znalostí již známých a odhalení nových mechanismů modulace nociceptivní signalizace na míšní úrovni. Výsledky získané námi popsaným přístupem na míšních řezech *in vitro* mohou následně také přispět ke zlepšení a zvýšení účinnosti léčby bolesti a patologických bolestivých stavů.

1. Literární přehled

1.1. Klasifikace bolesti

Bolest je definována jako nepříjemná vjemová a emocionální zkušenost související se skutečným nebo potenciálním poškozením tkáně, nebo je jako taková popisována (ISAP). Zkrátka takový stav, kdy nás něco subjektivně bolí. Pro plné definování bolesti se užívají čtyři pojmy: nocicepce, bolest, utrpení a bolestivé chování (Roenn, 2006). Potencionální či skutečné poškození tkáně je vnímáno jako podnět – bolest (Loeser a Treede, 2008). Bolest však může být přítomna i bez nocicepce. Naproti tomu utrpení je způsobeno nejen bolestí, je to zejména psychologický stav vyvolaný například stresem, strachem nebo úzkostí (Roenn, 2006). Bolest je možné hodnotit i sledováním změn v chování jedince - bolestivého chování.

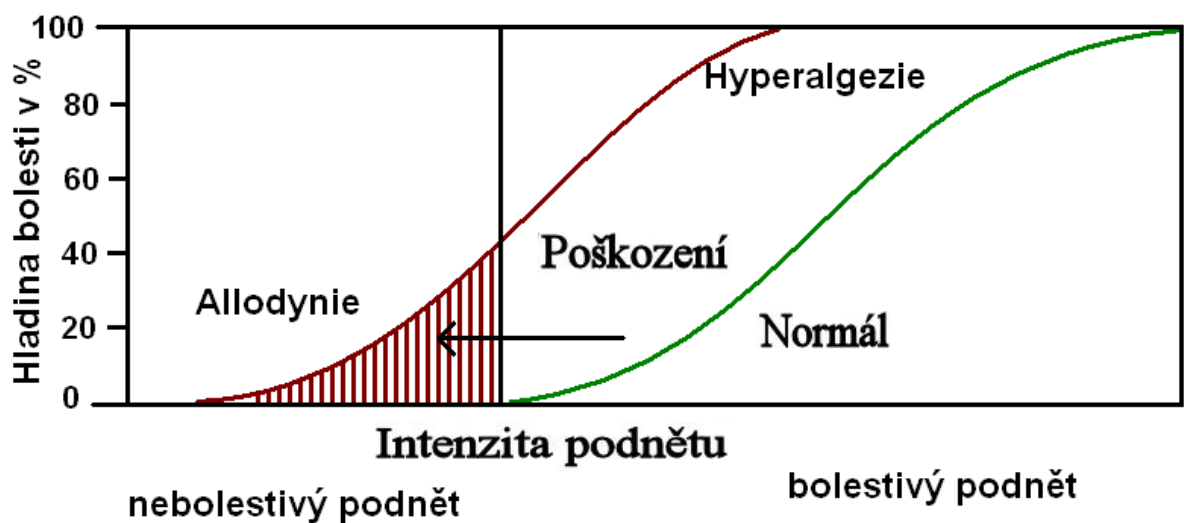
Bolest lze dělit z řady hledisek.

Dle místa vniku na periferní, centrální a viscerální. Bolest na periférii, v místě nociceptivního podnětu, ostrá, dobře lokalizovatelná. Lokalizace závisí na množství aferentních vláken v dané oblasti. Centrální bolest, může také vzniknout poškozením sensorických nervových drah v CNS. Viscerální bolest vzniká drážděním nitrobřišních orgánů stažením či roztažením, má charakter tupé bolesti s delší dobou trvání a špatně ohraničitelným rozsahem, může projikovat i do různých částí těla – přenesená bolest.

Dle doby trvání na akutní a chronickou. Akutní bolest je intenzivní a trvá po omezenou dobu. Je způsobena přímým poškozením tkání a lze ji považovat za symptom. Z lékařského hlediska je charakterizovaná dobou trvání kratší než 3-6 měsíců. Je snáze léčitelná. Chronická bolest je charakterizována dobou trvání překračující 3-6 měsíců, vyžaduje jiný přístup, nemusí být příznakem žádného akutního poškození a často ovlivňuje ostatní aspekty života. Nemá biologický informativní význam (Millan, 1999).

Dle fyziologických mechanismů dělíme bolest na nociceptivní, zánětlivou a neuropatickou. Bolest nociceptivní je způsobena nociceptivním stimulem - poškozením tkání mechanicky, chemicky či tepelně. Zánětlivá bolest doprovází zánětlivé procesy. Neuropatická bolest je vyvolaná v důsledku dysfunkce nebo poškození části periferního nebo centrálního nervového systému (Wolf, 2004). Neuropatická bolest může být přítomna i bez nociceptivního podnětů stejně jako je tomu u hyperalgesie a allodynie.

Bolest je často charakterizována stavy zvýšené citlivosti allodynii a hyperalgesii. Allodynie je bolest vyvolaná normálně nebolestivým podnětem. Nepoškozující podnět vyvolá takovou odpověď, která za fyziologických podmínek vzniká pouze při poškozujícím podnětu. Zahrnuje změnu v kvalitě cití, nepoškozující termické, mechanické a chemické podněty nejsou rozlišovány v původní podobě (kvalitě) a jsou popisovány jako bolestivé. K allodynii dochází v důsledku aktivace A β -vláken. Hyperalgesie je zvýšená citlivost k bolestivým podnětům a zvýšená bolestivá odpověď na ně. Nezahrnuje změny v kvalitě cití jako allodynie. Vzniká následkem poškození nebo zánětu tkání, a snížením prahu pro aktivaci C-nervových vláken. Rozlišujeme primární a sekundární hyperalgesii. Primární hyperalgezie se objevuje v přímo v místě poškození a vzniká senzitivací PAF. Sekundární hyperalgesie je naopak v neporaněném okolí a vzniká v CNS procesem centrální senzitivace (Campbell a Meyer, 2006). Průběh vnímání intenzity bolesti je znázorněn na obrázku 1. kdy zelená křivka označuje normální průběh vnímání bolesti v závislosti na intenzitě podnětu a červená znázorňuje stav zvýšené citlivosti.



Obrázek 1. Vnímání hladiny bolesti za kontrolní situace a po poškození (upraveno podle Textbook of Pain 2004)

1.2. Anatomické a fyziologické základy nociceptivního systému

Potenciálně poškozující podněty jsou v těle detekovány pomocí specifických receptorů, nociceptorů, které převádějí vnější podnět na akční potenciály. Nociceptorem se rozumí volné nervové zakončení v periférii, které plní funkci senzorického receptoru a umožňuje transdukcii a kódování nociceptivního podnětu. Nociceptory reagují až na velmi intenzivní podnět, nedochází u nich k adaptaci naopak se k přetrvávajícímu podnětu stávají citlivější (Scholz a Woolf, 2002).

Periferními aferentními vlákny (PAF) se informace šíří do zadního rohu míchy akčním potenciálem. V míše pak dochází k synaptickému přenosu nociceptivní signalizace na postsynaptické neurony. Informace je předána z primárního na sekundární neuron a poté šířena axony projekčních neuronů do vyšších center nervové soustavy (mozku). Nejčastěji předávání informace zajišťuje excitační neuropřenašeč glutamát, uvolněný presynapticky při depolarizaci membrány. Rychlý excitační přenos z velké části zprostředkovávají v postsynaptické membráně umístěné ionotropní AMPA a NMDA receptory, pomalejší část pak metabotropní receptory. Synaptická spojení umožňují uplatnění celé řady regulačních a modulačních mechanismů na nociceptivní systém. Modulaci také umožňuje uvolňování dalších přenašečů a neuromodulátorů.

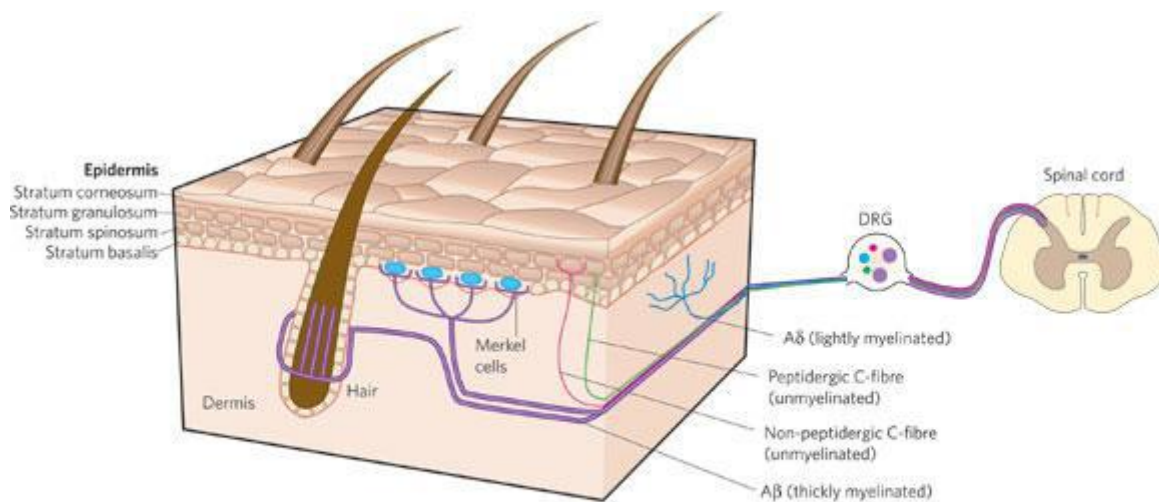
1.2.1. Primární aferentní vlákna

Primární aferentní vlákna (PAF) se odlišují od ostatních senzoričtých neuronů vyšším prahem excitace a specifická citlivost. Akutní bolest je tedy senzoričtá modalita, v přenosu informace se uplatňují neurony se specifickými receptivními vlastnostmi, detekující podněty odpovídající kvality a intenzity (Julius a Basbaum, 2001).

Podněty z vnějšího a vnitřního prostředí jsou detekovány periferními výběžky primárních senzoričtých neuronů, jejichž těla jsou uložena ve spinálních gangliích. Druhý výběžek těchto pseudounipolárních buněk vede zadními kořeny do zadního rohu míšního. Neurony reagují na jeden, nebo více druhů podnětů, a podle toho se dělí na unimodální, nebo polymodální.

Nociceptor je smyslový receptor, který reaguje na potenciálně škodlivé podněty a zprostředkovává je do míchy a mozku. Tento proces, nazývaný nocicepce, obvykle způsobí vjem bolesti. Nociceptory jsou především na volných zakončeních polymodálních primárních aferentních neuronů, jsou citlivé například na změny pH, zvýšenou

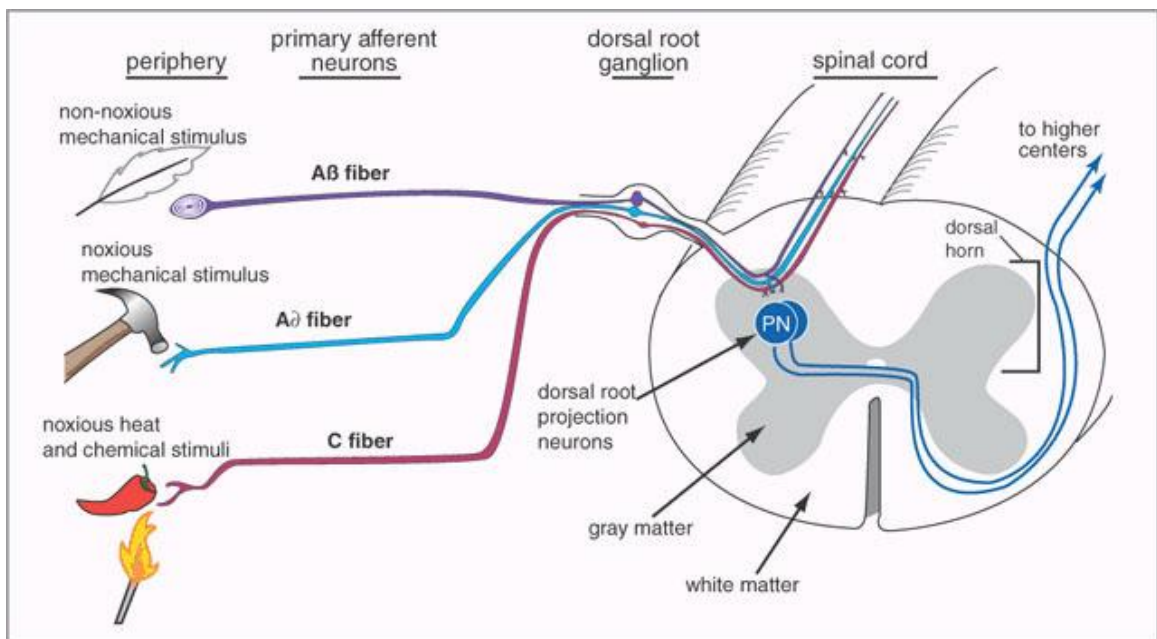
extracelulární koncentraci K^+ , prostaglandiny E2 a E1, substance P, leukotrieny, histamin. Polymodální nociceptory které kromě bolesti jsou citlivé i k vjemům jako je chlad, teplo a mechanické podněty. Jejich rozmístění v kůži je vidět na obrázku 2. i následný vstup do zadního rohu míchy. Dalšími receptory v kůži, které se mohou podílet na přenosu bolesti jsou například Ruffiniho tělíska, Krauseho tělíska, proprioreceptory, Vater-Paciniho tělíska, Merckelovy disky a Meissnerova tělíska (Dubner a Gold, 1999).



Obrázek 2. Neurony spinálních ganglií inervující kůži. Kůže je inervována somatosenzorickými neurony, které projikují do zadního rohu míšního. Silně myelinizovaná $A\beta$ vlákna inervují Merkelovy buňky a buňky střední části vlasového váčku, vedou informace o lehkých taktilních podnětech. $A\delta$ a C vlákna zahrnují termoreceptory a nociceptory. Slabě myelinizovaná $A\delta$ vlákna inervují dermis. Periferní výběžky peptidergických a non-peptidergických buněk spinálních ganglií s C vlákny (nemyelinizovaná) jsou zakončeny v odlišných vrstvách epidermis. (Lumpkin a Caterina, 2007)

Podle anatomických a funkčních kritérií se nociceptivní neurony spinálních ganglií rozdělují do tří základních kategorií. Podle velikosti průměru vlákna, která úzce souvisí s rychlostí vedení vzruchu, se rozlišují na neurony s vlákny typu $A\beta$, $A\delta$ a C jak je schematicky vidět na obrázku 3. (Julius a Basbaum, 2001). A to na $A\beta$ vlákna silně myelinizovaná s rychlostí vedení přibližně $100 \text{ m}\cdot\text{sec}^{-1}$ s velkými těly neuronů, detekující nebolestivé podněty z kůže, svalů a kloubů. Za normálních podmínek tedy primárně nesouvisejí s bolestí. Většinu primárních nociceptivních neuronů však tvoří malé a středně velké neurony spinálních ganglií. Středně velká těla neuronů mají slabě

myelinizovaná A δ nociceptory, s rychlostí 6-30 m.sec-1 která zprostředkovávají první, rychlou, akutní, ostrou bolest. A δ vlákna mohou být rozdělena na dvě hlavní skupiny I a II. Nociceptory typu I odpovídají na vysokou teplotu ~ 53°C, neurony typu II jsou excitovány již při teplotě ~ 43°C. Odpovědi na silné taktilní podněty jsou shodné. Nociceptory malých neuronů spinálních ganglií nemyelinizovaná C vlákna s nízkou rychlostí vedení 2 m za sec zprostředkovávají druhou, následnou, pomalou, opožděnou, tupou bolest jsou polymodální, podílejí se na přenosu tepelných, mechanických i chemických bolestivých podnětů (Dubner a Gold, 1999).

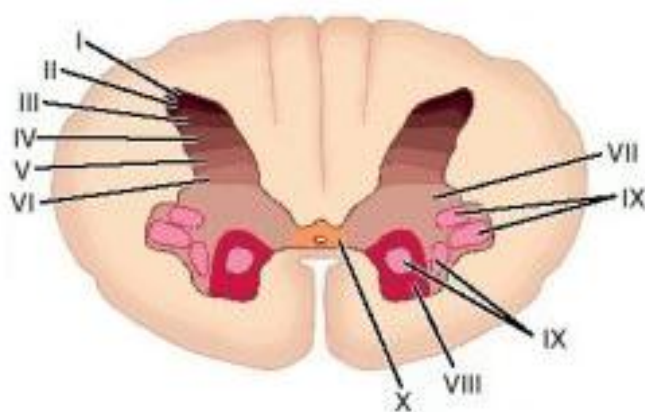


Obrázek 3. Typy periferních aferentních vláken (Stahl, 2008)

Nociceptory napojené na C vlákna mají celou řadu membránových receptorů, které reagují na rozdílné podněty. V poslední době byly detailně prozkoumávány TRPV1 receptory jenž jsou považovány za molekulární integrátor nociceptivních podnětů. Důležité je, že většina C vláken je excitována chemickými podněty, jako je pálivá složka paprik - kapsaicin. Z toho vyplývá, že na svém povrchu mají funkční vaniloidní TRPV1 receptory (transient receptor potential vanilloid 1), aktivované právě zvýšenou koncentrací H⁺, kapsaicinem nebo teplotou nad 43°C. Možnost detekce různých kvalit podnětů je dána vybavením nociceptoru odlišnými receptory a iontovými kanály, které charakterizují jednotlivé populace neuronů. Různé typy bolesti jsou tak zprostředkovány signalizací na rozdílných typech primárních nociceptivních neuronů (Belmonte a Cervero 1996; Handwerker a Kopal, 1993; Treed et al., 1990).

1.2.2. Rexedovo členění šedé hmoty

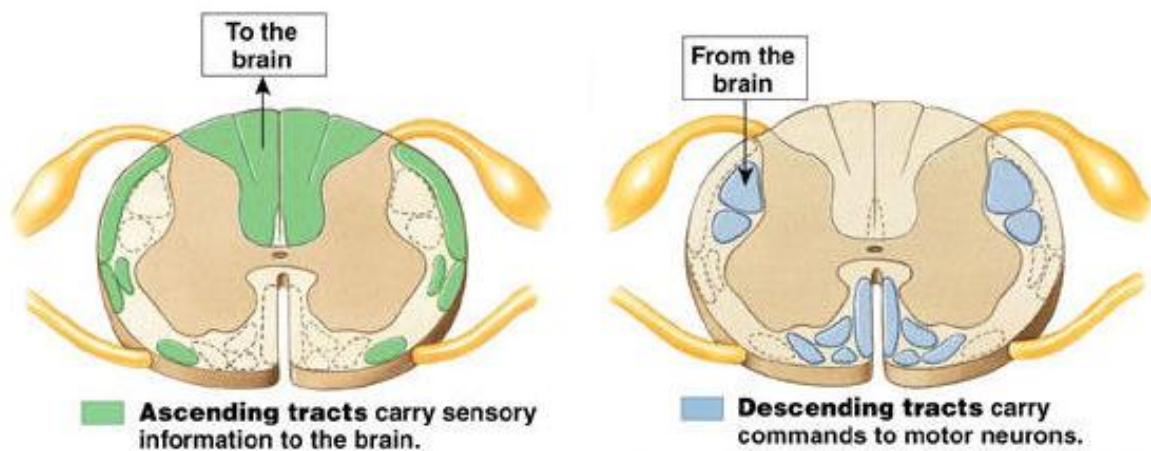
Šedá míšň hmot se podle Rexeda (1952) rozděluje na základě rozdílů ve velikosti a denzitě neuronů (cytoarchitektonicky) do deseti lamelárních vrstev (Obrázek 4.). Zadní roh je tvořen šesti paralelními vrstvami (laminami) I – VI. Do laminy I (marginální zóna) projikují zejména A δ vlákna a je v ní lokalizováno nejvíce projekčních neuronů. V lamině II (substantia gelatinosa) dominují interneurony. Laminu II můžeme rozdělit podle exprese různých receptorů na nociceptorech na vnější Ilo (outer) a vnitřní část Ili (inner). Laminy I a II označovány jako superficiální, jsou hlavní projekční oblasti nociceptivních neuronů. Laminy III – IV se sdružují pod názvem nukleus proprius. Neurony v laminách V – VI jsou také zapojeny do nociceptivní signalizace představují hluboké vrstvy zadního rohu míšňho. Lamina VI je zřetelně definovatelná pouze v intumescencích - zduřeních na úrovni segmentů odstopu končetin. Přední roh míšň je rozdělen do lamin VII – IX a umožňuje převážně funkce motorické, jsou v něm totiž také uloženy motoneurony inervující svalstvo. Lamina X obklopuje centrální kanál.



Obrázek 4. Organizace lamin šedé hmoty na příčném řezu míchou (Dorland's Medical Dictionary for Health Consumers, 2007)

Bílá hmot v míše obklopuje ze všech stran hmotu šedou, která ji svými rohy rozděluje na tři základní provazce přední, zadní a boční - funiculus anterior, posterior, lateralis. V bílé hmotě probíhají míšň vzestupné a sestupné dráhy. Přední provazce míšň vedou zejména vlákna motorická, zadní provazce míšň vedou vlákna senzoričká (Obrázek 5.). Nociceptivní PAF vlákna vstupují zadními (dorzálními) kořeny do zadních rohů míšňních (DH). Experimentálně byla také prokázána existence nociceptivních vláken (velmi malá část) vstupujících předními (ventrálními) kořeny. Vlákna nesoucí informace o nociceptivních podnětech jsou vedena zejména do I. a II. laminy. C a A δ vlákna vstupují

hlavně do I. laminy a do povrchové vrstvy II. laminy zadního rohu míchy. Vlákná A β projikují převážně do III. a IV. laminy. (Millan, 1999; Swett a Woolf, 1985)



Obrázek 5. Organizace bílé hmoty na příčném řezu míchou (Cummings, 2006)

1.2.3. Přenos informace a modulace na míšní úrovni

Informace o periferním podnětu je zakódována v akčních potenciálech šířících se po primárních aferentních vláknech, která vstupují do CNS projekcí ze zadního kořene míchy. V oblasti zadního rohu jsou lokalizovány první synapse nociceptivních drah. Hlavní neuromediátorem je glutamát a s ním další excitační aminokyseliny vážící se na ionotropní a metabotropní glutamátové receptory na postsynaptické membráně. Primární nociceptory navíc syntetizují další molekuly působící jako neuromodulátory. Jedná se o neuropeptidy SP a CGRP; adenosintrifosfát (ATP); difundující plyn NO; metabolity fosfolipidů prostaglandiny (PG); neurotrofiny jako je NGF nebo GDNF a další peptidy jako např. galanin, cholecystokinin (CCK) neuropeptid Y (Millan, 1999).

1.2.4. Synaptický přenos a projekce do CNS

Synapse umožňují zásadní modulaci intenzity signálu z periferie, může dojít k zeslabení, zániku ale i zesílení a vygenerování dalších akčních potenciálů. Synaptický přenos a jeho modulace jsou charakterizovány množstvím uvolněného přenašeče, hustotou a typem presynaptických i postsynaptických receptorů. Otvíráním a zavíráním iontových kanálů a způsobem odstraňování přenašeče ze synaptické štěrbin. Každý z těchto faktorů může podléhat řadě regulačních vlivů.

Neurony zadních rohů míchy rozdělujeme podle jejich odpovědi na periferní podněty, na 3 základní typy, nociceptivně specifické neurony (odpovídají pouze na silné poškozující podněty – nociceptive specific nebo high threshold neurons), neurony se širokým dynamickým rozsahem (wide-dynamic range - WDR) odpovídají na celou škálu podnětů od slabých po silné a neurony odpovídající s největší intenzitou na slabé podněty (low threshold - LT). První typ - nociceptivně specifické neurony, jsou normálních okolností aktivovány nociceptivními podněty a vedenými C a A δ aferentními vlákny. Druhý typ - WDR neurony odpovídají na širokou škálu podnětů, dochází v nich k sbíhání řady signálů a to nejen z kůže, ale i z vnitřních orgánů a kloubů. Jsou excitovány podněty mechanickými, tepelnými i chemickými. Za normálních okolností kódují intenzitu podnětu frekvencí svých akčních potenciálů. Třetím typ jsou LT neurony reagující zejména na lehké tlakové podněty a přímo se neúčastní vedení bolesti (Willis, 1985; Millan, 1999).

Neurony v míše se také dají rozdělit na supraspinální (projekční neurony) a propriospinální interneurony. Supraspinální vedou nociceptivní informace supraspinálně do vyšších mozkových center. Propriospinální intersegmentální a intrasegmentální neurony hrají důležitou roli v propojení, komunikaci, modulaci a integraci informací. Propriospinální neurony se rozdělují na excitační a inhibiční. Významnou úlohu v modulaci nociceptivní signalizace v míše hrají i gliové a imunokompetentní buňky. Jejich interakce jak s neurony, tak s ostatními buňkami hraje velkou roli v adaptaci nociceptivního systému (Cervero, 1995A; 1995B; Dubner, 1983A a 1983B; Mense, 1993).

Glie produkují a uvolňují prozánětlivé cytokiny a chemokiny a nejrůznější neuromodulátory a neuroaktivátory, které vedou k adaptaci neuronů zadního rohu míchy. Navíc, gliové buňky regulují také pohyb glutamátu na synapsi. Ztráta této funkce přispívá k patologické bolesti. Glie také udržují hladinu pH zejména pufrováním K⁺ iontů. Aktivita glií hraje zejména při chronických bolestivých stavech, neuropatiích a nádorovém onemocnění významnou úlohu v regulaci bolesti.

Druhý neuron – zadní roh míšní:

tractus spinothalamicus – rychlý přenos vzruchu do ventrální posterolaterální části talamu. Přenáší se ostrá, pronikavá bodavá bolest.

tractus spinoreticularis – pomalý přenos vzruchu do retikulární formace a odtud třetím neuronem spoje do talamu (proto někdy v literatuře název dráhy tr.

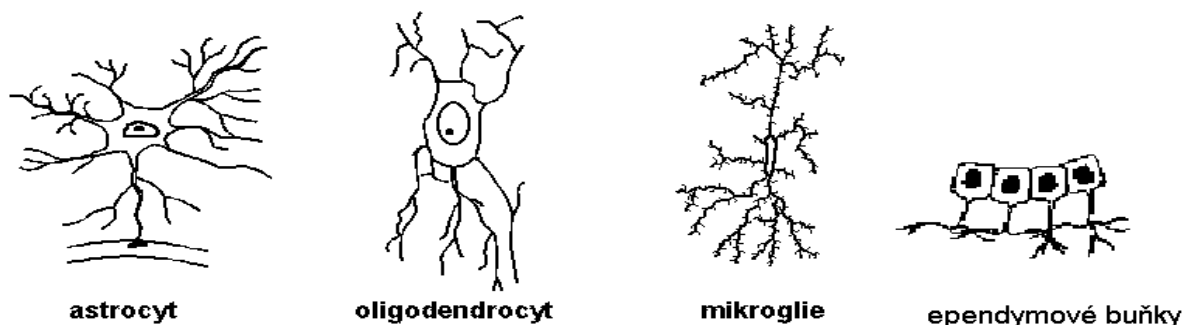
spinoreticulohalamicus). Vývojově starší dráha. Přenos pomalé, tupé, špatně lokalizovatelné bolesti.

tractus spinoparabrachioamygdalaris a tractus spinoparabrachiohypothalamicus – spoje do limbického systému, ovlivňují emoční složku bolesti (Besson, 1987; Willis, 1991).

Třetí neuron resp. čtvrtý neuron – přepojení z talamu do somatosenzorické kůry a asociačních korových oblastí. Analýza informací z periferie a eferentními vlákny je uskutečněna motorická nebo jiná odpověď. Centrální řízení umožňuje modifikaci bolesti.

1.2.5. Gliové buňky

Kromě neuronů se na udržení správného chodu nervového systému podílí i gliové buňky, které tvoří druhou složkou nervového systému. Zajišťují výživu, ochranu a vytvářejí podpůrný systém pro neuronální růst. Udržují stálé prostředí, nezbytné pro funkci neuronů a plní také funkci nervového imunitního systému. Jsou zásobárnou energie, kterou neuronům dodávají (Millan, 1999). Existuje řada typu gliových buněk. V CNS jsou to například astrocyty, oligodendrocyty, mikroglie nebo ependymové buňky (Obrázek 6.).



Obrázek 6. Gliové buňky v CNS (Němeček et al., 1972)

1.2.5.1. Význam gliových buněk v nocicepci

Na povrchu gliových buněk se vyskytuje řada iontových kanálů i receptorů, samy o sobě sice nejsou schopny vytvářet vzruch ani ho vést ale vytvářejí prostředí nezbytné pro neuronální aktivitu, prostředí pro vedení akčního potenciálu. Zejména za patologických podmínek se mohou podílet na modulaci neuronální aktivity. Gliové buňky jsou charakteristické svou vysokou lineární propustností pro K^+ ionty. Glie obsahují i jiné K^+ kanály, a to napětově závislé, dále pak také Na^+ Ca^{2+} Cl^- napětově závislé, dokonce i K^+ mechanické kanály. Na svém povrchu nesou i celou řadu receptorů (GABA receptory, glutamátové receptory, glycinové receptory, i receptory spřažené s G-proteiny).

Při poranění a vedení bolesti nastávají v gliových buňkách stejně jako v neuronech změny- při krátkodobé akutní bolesti se po určité době zase vrací k normálu, při patologické bolesti se může stát, že změny přetrvávají i na gliových buňkách, které se nyní stávají dalším přispěvateli bolesti a navíc neurony v tomto stavu udržují. Stav gliových buněk se výrazně podílí na rozvoji patologické bolesti.

1.3. Neuropatická bolest

Mechanismy uplatňující se při neuropatické bolesti po poškození nervu jsou podobné jako u chronických bolestivých stavů. K senzibilizaci dochází i v míšních gangliích a buňkách zadního míšního rohu. Hlavním mechanismem je zde zvýšená hladina excitačních aminokyselin, hlavně glutamátu. Déle trvající nebo intenzivní stimulace bolestivých vláken vyvolává v místech centrálního zakončení akumulaci glutamátu, jejímž důsledkem je posléze aktivace metabotropních excitačních receptorů NMDA typu, otevření vápníkových kanálů a vzniku syndromu kalciového přetížení s jeho toxickými důsledky pro buňku. Centrální mechanismy generující neuropatickou bolest zahrnují senzibilizaci všech spinotalamických drah a pokles účinnosti descendentních bolest inhibujících systémů. V důsledku poškození periferní části nociceptivního systému dochází k remodelaci neuronálního spojení v zadním rohu míšním a nárůstu počtu excitačních receptorů na membránách. Proto je model neuropatické bolesti využíván i ve výzkumu jiných bolestivých stavů a mechanismy změn u ní probíhající byly důležité i v našich pokusech (Ramer et al., 1997).

Neuropatická bolest (NB) je bolest vyvolána poraněním či poškozením centrální nebo periferní části nervového systému. Neuropatická bolest je charakteristická abnormální percepcí bolesti (alodyníe a hyperalgezie) a často i přítomností perzistující bolesti, nezávislé na stimulaci. Syndrom neuropatické bolesti je často spojen s mechanickým poraněním periferního nervu, ale může být vyvolán drogami, léky virovým onemocněním, toxiny, nebo metabolickými poruchami (Rodrigues-Filho et al., 2003).

Mechanismy vzniku neuropatické bolesti jsou komplikovanější a odlišné od vzniku akutní či zánětlivé bolesti a dosud nejsou plně poznány (Ueda, 2008). Mezi hlavní mechanismy vzniku lze zařadit poraněním vyvolanou senzitivizaci periferního i centrálního nervového systému, zvýšením účinnosti synapsí v zadních rožích míchy (DH), senzitivizace neuronů spinálních ganglií (DHG) a další (Dowdall et al., 2005). Periferní neuropatie vede ke zvýšení bolestivého cití (hyperalgezií) a k bolestivé percepci za fyziologických

podmínek nebolestivých podnětů (teplotní a mechanické alodynii), často se přidává i spontánní bolest (Ueda, 2008). Neuropatická bolest může přetrvávat měsíce, roky nebo i celý život. Neuropatická bolest nebývá často patrná hned, ale k rozvoji dochází až nějakou dobu po poranění nervu. U neuropatické bolesti se v některých případech objevuje bilateralita (bolest v nepoškozené protilehlé části těla) což znamená, že je do mechanismu neuropatické bolesti zapojen i centrální nervový systém (CNS) (Wang a Wang, 2003).

Běžné používané prostředky tišící bolest bývají v případě neuropatické bolesti často neúčinné. Z těchto důvodů jsou v posledních letech mechanismy neuropatické bolesti intenzivně studovány, s cílem vyvinout nové účinnější způsoby terapie (Ueda, 2008).

Neuropatické bolesti dělíme na neuralgie periferních nervů a centrální neuropatickou bolest (Zimmermann, 2001). Fenomenologická klasifikace neuropatické bolesti se vztahuje k typu poranění a rozlišujeme: mechanické nervové poranění, metabolické onemocnění, virové onemocnění, neurotoxicitu, zánět a jiné imunologické mechanismy, fokální ischemie nervového systému a mnohočetné dysfunkce neurotransmiterového systému (Zimmermann, 2001).

1.3.1. Buněčné a molekulární změny spjaté s neuropatickou bolestí

Neuropatická bolest může být částečně vysvětlena patofyziologickými změnami, které nastávají po poranění neuronů. Po poškození periferního nervu dochází k buněčným a molekulárním změnám v neuronech i v jejich okolí (Ramer et al., 1997; Zuo et al., 2002; Ueda, 2008).

Neurony **periferního nervového systému** reagují na poškození svých výběžků anabolickými změnami, dochází ke chromatolýze buněčná jádra, je patrná hyperplazie neurofilament a dochází k výrazným změnám v metabolismu neuronu (Dubový, 1998). Bezprostředně po poranění je Schwannovými buňkami, rezidentními žírnými buňkami, endoteliálními buňkami a fibroblasty produkován tumor necrosis factor- α (TNF α) prozánětlivý cytokin, který indukuje produkci dalších látek a iniciuje tak proces zánětu (Myers et al., 2006). Schwannovy buňky produkují neurotrofiny a adhezivní molekuly, a ovlivňují tak regeneraci. Tvoří permissivní prostředí pro růst a regeneraci nervových vláken. Regenerovaný nerv nikdy nedosahuje původní rychlosti vedení (Albe-Fessard, 1998).

Schopnost periferního nervu regenerovat je striktně závislá na kontaktech regenerujících axonů se Schwannovými buňkami a jejich bazálními laminami. Jestliže po poranění došlo k přerušení nervu - axotomii, ale kontinuita nervového obalu zůstala zachována (axonotmesis), axony regenerují k cílovým strukturám původní bazální laminou. Jiný případ nastává, dojde-li při poranění nervu k přerušení nejen axonů, ale také bazální laminy nervového vlákna (neurotmesis). Regenerující axonální větve, kterým se nepodaří prorůst místem poranění do bazální laminy, se dostanou do kontaktu s okolními nepermissivními tkáněmi a degenerují (Zuo et al., 1998; 2002).

Po jednostranném poškození periferního nervu u experimentálních zvířat nastává invaze postgangliových vláken sympatiku do DHG korespondujících s poraněným nervem tento jev je označován jako sympathetic sprouting (Kim et al., 2001). Ve spinálních gangliích intaktních zvířat se nervová vlákna sympatiku vyskytují pouze jako perivaskulární plexy, není vytvořen přímý kontakt s těly somatosenzorických neuronů. U poraněných zvířat se perivaskulární vlákna sympatiku větví a tvoří tzv. perineuronální košíky (baskets). Bylo zjištěno, že ve většině případů se tyto útvary tvoří kolem velkých neuronů (Ramer et al., 1997; Ma a Bisby, 1999). Uvažuje se, že tyto perineuronální košíky jsou možným místem kontaktu sympatického a somatosenzorického systému (sympathetic-sensory coupling) a následného vzniku abnormálních interakcí. (Häbler et al., 2000; Chung a Chung, 2001).

Neurony spinálních ganglií také vykazují změny v excitabilitě a v genové expresi. Tyto změny mohou hrát roli v patofyziologii neuropatické bolesti (Stichel a Müller, 1998; Obata et al., 2003). Částečné poranění periferního nervu způsobuje změny v elektrofyziologii a neurochemii aferentních neuronů, ty mohou být podkladem abnormální aferentní aktivity. Na vytváření abnormální aktivity ve spinálních gangliích se podílí sodíkové a vápníkové kanály (Newton et al., 2001; Cherkas et al., 2004).

Po poranění také dochází k útlumu exprese NGF v axotomizovaných neuronech spinálního ganglia a naopak zvýšení exprese NGF v satelitních gliových buňkách (Ramer et al., 1997; 1999). Dále se zvyšuje exprese substancí, zahrnutých v nocicepci, např. galanin (Nilsson et al., 2005). Ke zvýšené expresi galaninu v neuronech spinálních ganglií dochází po kompletním i částečném poranění periferního nervu.

Po poškození periferního nervu nastávají změny v mikroprostředí neuronů spinálního ganglia (Dubový, 1998). Neurony spinálních ganglií a satelitní gliové buňky tvoří navzájem závislé jednotky. Určité změny po poranění periferního nervu tedy probíhají i v satelitních gliových buňkách, které obalují neurony v DHG. Ve srovnání s gliovými buňkami centrálního nervového systému je o těchto změnách poměrně málo známo. Po poranění periferního nervu dochází k zvýšení počtu satelitních gliových buněk ve DHG (Shinder et al., 1999; Nilsson et al., 2005). Mezi regenerativní stimuly produkované gliovými buňkami patří NGF (Ramer et al., 1997). Ve zdravých DHG je NGF syntetizován převážně axony a retrogradně transportován.

Zánětlivé procesy hrají také důležitou roli v mechanismech neuropatické bolesti. Poranění periferního nervového systému vede k aktivaci rezidentních imunitních buněk a k infiltraci buněk imunitního systému z krve do místa poranění. Těmito buňkami jsou následně produkovány a sekretovány zánětlivé mediátory, které se mohou podílet na vzniku abnormálního vnímání senzitivizací PAF. K buňkám, které se účastní zánětlivé reakce periferního nervového systému, se řadí žírné buňky, neutrofilů, makrofágy a T lymfocyty (Moalem a Tracey, 2005). V periferním nervu a v DHG je za nepatologických podmínek přítomna populace klidových makrofágů. Po poranění periferního nervu byla popsána invaze buněk imunitního systému do korespondujících spinálních ganglií a nárůst počtu makrofágů (Matsumoto et al., 1999).

V **centrálním nervovém systému** se následkem poranění do místa léze dostávají krevní elementy z poškozených cév (monocyty, lymfocyty, mediátory zánětu apod.) a dochází k uvolnění aminokyselin, které působí na excitaci neuronů, iontů železa, které se podílejí na tvorbě kyslíkových radikálů, zvyšuje se množství vápníku, draslíku a dochází k akumulaci růstových faktorů a proteáz. Tyto faktory mají za následek smrt neuronů a gliových buněk a degeneraci v místě poranění (Stichel a Müller, 1998).

Astrocyty velmi brzy po poranění začínají sekretovat GFAP a indukují MHC antigeny. Dochází k remodelaci astrocytární membrány. Aktivované mikroglie a monocyty (makrofágy) dále sekretují cytokiny, proteázy, leukotrieny a superoxidy (Stichel a Müller, 1998).

1.4. Synaptické receptory exprimované v zadním rohu míšním

Chemicky a fyzikálně aktivovatelné primární nociceptivní aferenty dorzálních spinálních ganglii přinášejí nociceptivní informaci do zadního rohu míchy. Příchozí akční potenciál způsobí výlev různých neurotransmiterů, neuromodulátorů a ostatních neuroaktivních látek z presynaptické membrány centrálních synapsí které se váží na celou řadu různých typů receptorů na membráně postsynaptické (Millan, 1999; Willis a Cogeshal, 2004).

Všechny kroky přesunu informace přes synapsi mohou být modulovány, a to hlavně pomocí množství vypouštěných neurotransmiterů (jako je například acetylcholin, glycin, glutamát, dopamin, noradrenalin, adrenalin a GABA, histamin a serotonin) a počtu receptorů schopných na něj reagovat. Jednou z hlavních látek ovlivňujících synapse je excitační aminokyselina glutamát, který je agonistou celé řady receptorů. Dvěma hlavními rodinami jsou inotropní a metabotropní glutamátové receptory.

1.4.1. Glutamátové receptory – ionotropní

Ionotropní glutamátové receptory se rozdělují do 3 základních skupin, a to na AMPA, Kainátové a NMDA receptory.

1.4.1.1. AMPA receptory

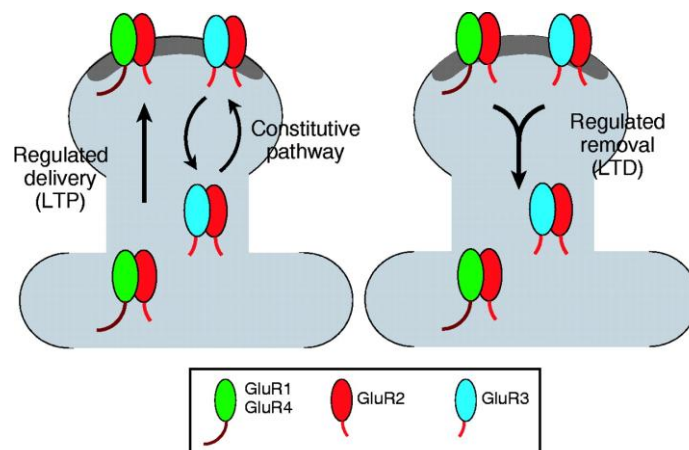
AMPA receptory (AMPA) jsou iontovými kanály propustnými zejména pro Na^+ a K^+ ionty ale i pro Ca^{2+} . Jejich primárním agonistou je α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxasole propionová kyselina a glutamát (Bettler a Mülle 1995). Receptor objevil Tage Honore v Kodani, a publikoval v roce 1982 v Journal of Neurochemistry. AMPAR se vyskytují v různých částech mozku a míchy a jsou nejhojněji se vyskytujícím receptorem vůbec.

Funkční vlastnosti AMPAR závisí zejména na jejich podjednotkovém složení – skládají se ze 4 podjednotek GluR1, GluR2, GluR3 a GluR4 z nichž tvoří heterotetramery. Různé složení tetrameru určuje podtyp receptoru (Hollmann a Heinenmann, 1994). Hlavní podjednotkou určující propustnost receptoru představuje podjednotka GluR2, kterou většina obsahuje. Pokud však podjednotka ve struktuře obsažena není, ztrácí kanál částečně svou specifickou propustnost a stává se propustný i pro Ca^{2+} ionty. Průnik Ca^{2+} iontů do buňky a zvyšující se intracelulární vápník je významným spouštěčem mnoha signálních kaskád, kde Ca^{2+} ionty plní úlohu druhého posla. AMPAR jsou tedy bránou pro

Na⁺ a K⁺ ionty a také pro Ca²⁺ ionty. Přítomnost GluR2 podjednotky chrání buňku před nadměrným vtokem vápníku (Angula, 1997). Velkou variabilitu v typech podjednotek umožňuje také alternativní sestřih a úprava RNA.

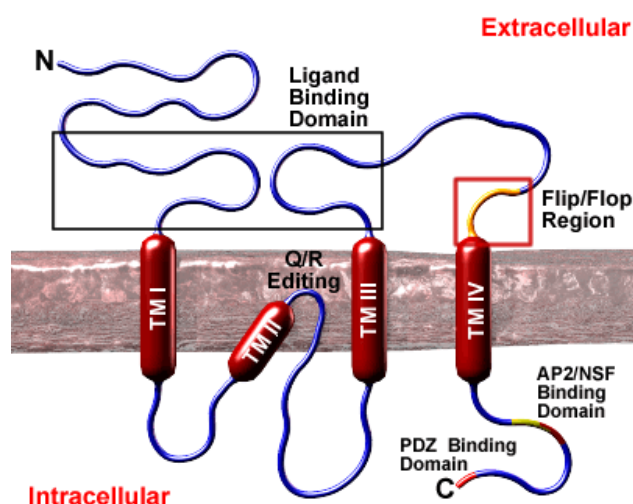
Dimerizace podjednotek začíná v endoplazmatickém retikulu interakcí N koncových domén, které jsou výsledně extracelulárními konci. C konce umístěné intracelulárně jsou důležité zejména pro regulaci a fosforylaci (Wang et al., 2005). Transmembránové domény se od sebe nejvíce liší svými C konci, a právě ty určují i jejich další interakce (Obrázek 8.). Všechny AMPARs obsahují vazebné domény (Hollmann a Heinenmann, 1994; Greger et al., 2002). Fosforylace AMPAR může regulovat vodivost a pravděpodobnost otevření kanálu. AMPAR fosforyluje celá řada protein kinas jako je PTK, PKM a hlavně PKC a CaMKII (Boehm a Malinow, 2005).

Pro AMPAR jsou charakteristické rychlé změny v jejich umístění. Jsou endocytovány a na jiných místech membrány exocytovány (Obrázek 7.). Má se ale za to, že celkový počet inzerovaných receptorů na extracelulární membráně zůstává stálý. Mechanismus indukované endo či exocytosy však může vést k LTP či LTD (Kessels a Malinow, 2009). Pro LTP je také významná fosforylace serinu 818 na podjednotce GluR1 způsobená PKC který pak brání endocytóze a zvyšuje vodivost kanálu (Boehm et al., 2006; Derkach et al., 1999).



Obrázek 7. Konstituční a regulovaný přechod AMPA receptorů v synapsích. AMPAR oligomery obsahující GluR1 a GluR4 podjednotky jsou regulovaně dodávány do synaptické štěrbiny během LTP. Oligomery s podjednotkami GluR2 a GluR3 jsou průběžně obměňovány. Regulované odstraňování AMPAR ze synapsí vede k LTD. (Esteban, 2003)

Počet a subtyp AMPAR na postsynaptické membráně má tedy velký vliv na chod a účinnost synapse. Nadměrná inzerce suptypů bez podjednotky GluR2 může vést k výrazné senzitivaci postsynaptické membrány (Larsson a Broman, 2008) Každý AMPAR má čtyři vazebná místa, na které se agonisti (např. glutamát) mohou vázat, jedno na každé podjednotce (Obrázek 8.) (Mayer, 2005). Vazebná místa pro ligand jsou na N-konci extracelulární smyčkami mezi transmembránovými doménami tři a čtyři (Armstrong et al., 1998). Když je agonista navázán, pór se otevře. Po otevření může být kanál zase rychle uzavřen, desenzitizován malou změnou uhlu vazebného místa (Armstrong et al., 2006).



Obrázek 8. Podjednotka AMPAR s vyznačeným vazebným místem pro agonistu. Převzato z MRC CENTRE FOR SYNAPTIC PLASTICITY

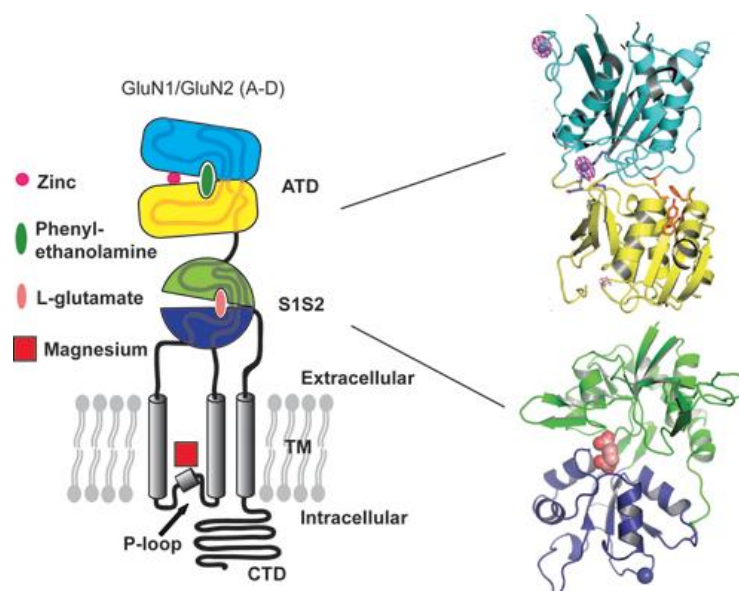
AMPAR se rychle otvírají a zavírají, jsou tedy zodpovědné za většinu rychlých excitačních synaptických přenosů v CNS (Platt, 2007). V zadním rohu míchy jsou dominantní subtypy s podjednotkami GluR2 hlavně lamina III a suptypy s GluR1 zejména v neuronech laminy I a II (Tolle et al., 1993). Podjednotka GluR3 je v zadním rohu míchy exprimována pouze v malém množství hlavně v laminách IV a V. Podjednotky GluR4 se vyskytují jen v nepatrném množství neuronů superficiálního rohu míšního (Tolle et al., 1993). Neurony s AMPAR propustnými pro Ca^{2+} ionty (bez GluR2 podjednotky) byly detekovány v laminách I a II kde je jejich výskyt vysoký. V lamině III byly objeveny jen málo. Nízký počet AMPAR propustných pro Ca^{2+} v lamině III je způsoben vysokou koncentrací GluR2 podjednotky v této oblasti.

1.4.1.2. Kainátové receptory

Strukturně podobné **Kainátové receptory**, jsou pojmenovány podle svého hlavního agonisty kainátu, také však reagují na glutamát. Jsou tvořeny různými kombinacemi podjednotek GluR5, GluR6, GluR7, KA1 a KA2. Jsou funkčně podobné AMPA receptorům. Jejich role v synaptickém přenosu je však menší než je tomu u AMPAR, nicméně jsou významné pro synaptickou plasticitu. Bylo dokázáno, že mohou hrát roli také v indukci dlouhodobé potenciace (LTP) (Hollmann et al., 1994). Jsou fosforylovány CAMP dependentní kinázou (Wang et al., 1993).

1.4.1.3. NMDA receptory

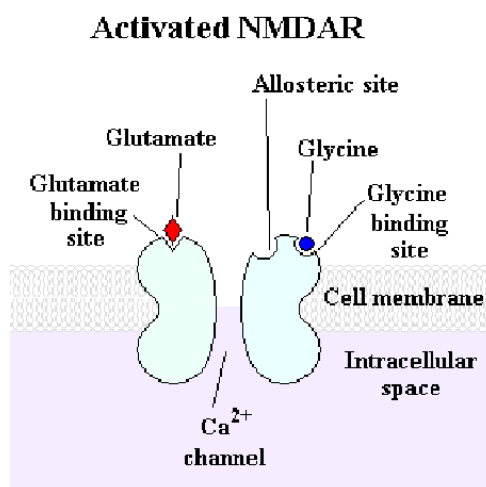
NMDA receptory (NMDAR) jsou dalšími možná ještě významnějšími glutamátovými receptory s iontovými kanály přístupným pro kationty Na^+ , K^+ a také v pro Ca^{2+} . Jsou přítomny jak presynapticky tak postsynapticky (Millan, 1999). Hlavním agonistou je N-metyl-D-aspartát. Jsou to heterotetramery, tvořené kombinací podjednotek NR1 mající 8 isoform a NR2 A-D (4 isoformy), zastoupení podjednotek je v receptorech na různých neuronech různé. Podjednotkové složení má vliv na funkci receptoru. (Cull-Candy, 2001) NR2 obsahují vazebné místo pro neurotransmitter glutamát (Obrázek 9.). Na rozdíl od NR1 podjednotky, jsou NR2 v různých typech buněk zastoupeny různě a mají kontrolní funkci, určují elektrofyziologické vlastnosti NMDA receptoru.



Obrázek 9. Molekulární organizace podjednotky NMDA receptoru a krystalové struktury amino-terminální domény (ATD) a S1S2 ligand-vázáního jádra (furukawalab.cshl.edu/HF_research.html)

NMDA receptory v neuronech mají pomalou kinetiku a jsou charakteristické napěťově závislou blokadou kanálu hořčnatými (Mg^{2+}) ionty. Každá podjednotka má rozsáhlé cytoplazmatické domény, které obsahují zbytky, které mohou být přímo modifikovány řadou proteinkinázy a fosfatáz. V důsledku aktivace PKA, PKC, AC, dojde k fosforylaci cytosolických domén zejména NR1, NR2A a NR2B podjednotek NMDA receptoru a k odstranění Mg^{2+} iontu z extracelulární části receptoru (Ultenius et al., 2006). Mg^{2+} iont je z kanálu uvolňován až během depolarizace, vyvolané aktivací AMPA kanálů během synaptické aktivity.

NMDA receptory mají také modulační vazebné místo pro glycin, jenž je esenciální pro funkci kanálu (Millan, 1999). K otevření NMDA kanálu je tedy zapotřebí navázání dvou ligandů, glycinu a glutamátu (Obrázek 10.), a pokles membránového napětí (je napěťově závislý). To vede k delší depolarizaci. Vtok vápníku přes NMDARs hraje rozhodující úlohu v synaptické plasticitě, a je buněčným mechanismem pro učení a paměť (Lester et al., 1990).



Obrázek 10. Stylizované zobrazení aktivního NMDAR. NMDARs vyžadují pro svou aktivitu vazbu dvou molekul, glutamátu nebo aspartátu a glycinu (Laube et al., 1997).

1.4.2. Glutamátové receptory – metabotropní

Druhou skupinu glutamátových receptorů tvoří metabotropní glutamátové receptory (mGluR) patřící do rodiny receptorů spojených s Gproteiny (GPCR). Tento typ glutamátových receptorů začal být intenzivně studován až se značným odstupem od ionotropních receptorů. Jedním z důvodů je i fakt, že do doby velmi nedávné nebyly dostupné specifické ligandy pro provádění vazebných studií. Doposud bylo klonováno osm

podtypů metabotropních glutamátových receptorů označených mGlu1 – mGlu8, které se dělí do tří skupin na základě podobnosti sekvencí a transdukčních metabolických cest (Riedel, 1996; Nicoletti et al., 1996). Po navázání ligandu aktivují řetězec metabolických dějů, a ten umožní otevření iontového kanálu. Skupina I zahrnuje mGlu1 a mGlu5, které jsou spojeny s hydrolyzou polyfosfoinositidů. Tyto receptory stimulují fosfolipázu C, tvorbu diacylglycerolu, který dále aktivuje proteinkinázu C. Zvyšují koncentraci Ca^{2+} v cytosolu a následné uvolnění Ca^{2+} iontů z intracelulárních zásobáren. Byl také prokázán negativní vliv metabotropních glutamátových receptorů skupiny I na K^+ kanály (v tkáňových kulturách) (Bleakman et al., 1992; Neugebauer, 2001).

Skupina II, kam patří receptory mGlu2 a mGlu3, a skupina III s metabotropními receptory mGlu4, mGlu6, mGlu7 a mGlu8 byly prokázány v neuronech i ostatních buňkách a není o nich toho tolik známo (Tabulka 1.). Ukazuje se, že i tyto receptory lze ještě dále dělit na další podtypy. Obecně lze říci, že většina receptorů třídy II a III je negativně ovlivňuje adenylátcyklázu a některé z nich rovněž negativně ovlivňují K^+ kanál (Nicoletti et al., 1996). Část těchto receptorů je lokalizována presynapticky a inhibuje uvolňování glutamátu do synaptické štěrbině, další naopak uvolňování glutamátu stimulují.

Skupina	Receptor	Gen	Chromosom (lidský)	Efekt
1	mGluR ₁	GRM1	6q24	zvysuje koncentraci Ca^{2+} v cytoplasmě uvolňuje K^+ z buňky aktivací K^+ iontových kanálů
	mGluR ₅	GRM5	11q14.3	
2	mGluR ₂	GRM2	3p21.2	inhibují adenylcyklasu a snizují hladinu cAMP
	mGluR ₃	GRM3	7q21.1-q21.2	
3	mGluR ₄	GRM4	6p21.3	aktivují Ca^{2+} kanály, umožňují vstup Ca^{2+} do buňky
	mGluR ₆	GRM6	5q35	
	mGluR ₇	GRM7	3p26-p25	
	mGluR ₈	GRM8	7q31.3-q32.1	

Tabulka 1. Přehled metabotropních glutamátových receptorů a jejich účinků.

1.4.3. Excitotoxicita glutamátu

Za normálních fyziologických podmínek se glutamát podílí na celé řadě důležitých procesů v CNS, včetně paměti a učení. Při určitých patologických stavech, jako jsou například hypoxicko-ischemické stavy, však dochází v neuronální tkáni k mnohonásobně vyššímu uvolňování excitačních aminokyselin na synapsi a současnému blokování jejich zpětného vychytávání. Dochází tak k hyperstimulaci všech typů glutamátových receptorů a

následnému spuštění celé škály reakčních kaskád, jejichž výsledkem je poškození nebo smrt neuronu.

Nejprve dojde k depolarizaci a průniku sodných a chloridových iontů táhnoucích molekuly H₂O do neuronu a následnému osmotickému poškození. Dále dojde i k masivnímu průniku vápníku do intracelulárního prostoru, na kterém se podílejí i některé metabotropní glutamátové receptory, nakonec jsou uvolněny vápenaté ionty z intracelulárních zásobáren. Zvýšená intracelulární koncentrace Ca²⁺ stimuluje řadu enzymů, lipázy, fosfolipázy, proteázy, proteinkinázy, z nichž některé mají při zvýšené aktivitě degradativní účinky, jiné v neregulovaném stavu iniciují reakce, jejichž výsledkem je smrt buňky.

1.4.4. Úloha glutamátových receptorů v nocicepci

Glutamátové receptory v míše a supraspinálních strukturách CNS jsou endogenně aktivovány excitačními aminokyselinami, nebo exogenně N-metyl-D-aspartátem (NMDA receptory). Aktivace centrálních glutamátových receptorů indukuje řadu molekulárních mechanismů vedoucích k syntéze dalších mediátorů. Tím je například Oxid dusnatý (NO), který aktivuje gvanylátcyklázu, zvýšením hladiny intracelulárního cyklického gvanozinmonofosfátu (cGMP) (Conn a Pin, 1997).

NMDA stimulace aktivuje proteinkinázu C (PKC), která zesiluje synaptický přenos, a adenylátcyklázu, tvořící intracelulárního druhého posla, cyklický adenosinmonofosfát (cAMP). Dochází také ke zvýšení biosyntézy prostaglandinů PGE₂ a PGF₂. Patofyziologické změny po aktivaci glutamátových receptorů (NMDA a non-NMDA receptorů) se projeví aktivací a zvýšením transmise bolesti, zejména v pozdější fázi, indukci behaviorálních reakcí na bolest a k rozvoji “wind-up” fenoménu -dráždění 1. neuronu vede k nárůstu potenciálů ve 2. neuronu, až začne sám generovat nociceptivní potenciály (Ferreira a Lorenzetti, 1994).

1.5. TRPV1 receptory a jejich funkce

Senzorický systém živých organismů je vybaven přesnými a důmyslnými mechanismy, umožňujícími mu rozpoznávat podněty přicházející z vnějšího prostředí, odlišit systém. Tato schopnost je dána především vlastnostmi iontových kanálů exprimovaných na periferních zakončeních primárních sensorických neuronů. Aktivace těchto iontových kanálů umožňuje převod (transdukci) podnětů (specifických a nadprahových) na depolarizaci buněčné membrány a vznik akčního potenciálu – signalizace, která je poté vedena do CNS. Významnou skupinou transdukčních iontových kanálů exprimovaných na sensorických neuronech jsou, TRP kanály (transient receptor potential channels). Savci pomocí TRP kanálů rozeznávají teplotní změny v rozsahu fyziologickém a patologickém a chemické látky vyvolávající bolest (Caterina et al., 2000). Významný je zejména TRPV1 receptor z vaniloidní rodiny TRP receptoru. Poznání struktury a funkce tohoto receptoru vedlo k mnohem hlubšímu pochopení řady nociceptivních mechanismů.

TRPV1 receptory jsou exprimovány na periferních i centrálních zakončeních senzitivních neuronů a hrají významnou úlohu v transmissi a modulaci nociceptivní informace. Jsou to molekulární integrátory fyzikálních a chemických bolestivých podnětů. TRPV1 jsou významně senzitivizovány mediátory zánětu uvolněnými z poškozené tkáně.

TRPV1 receptor byl naklonován v roce 1997 (Caterina et al., 1997), což umožnilo mimo jiné jeho transfekci do různých expresních systémů buněčných linií. Tyto experimenty pomohly zpřesnit informace o struktuře a funkci těchto receptorů. TRPV1 receptory mají vazebné místo pro látky z chemické skupiny homovanilinů, jsou to rostlinné extrakty a velmi dráždivé látky. Tyto látky jsou exogenními agonisty TRPV receptorů a celá skupina od nich odvozuje svůj název - vaniloidní. Nejvýznamnější z těchto látek je kapsaicin - látka izolovaná z paprik rodu *Capsicum* (Tresh, 1846). Citlivost na kapsaicin vykazují C i A δ vlákna, pro TRPV1 je kapsaicin zvláště důležitým agonistou, proto se mu také někdy říká kapsaicinový receptor (Bandell et al., 2004).

Objev kapsaicinového TRPV1 receptoru představoval zlom ve výzkumu percepce tepelných a chemických bolestivých podnětů. V míše se kapsaicinové receptory nacházejí zejména na primárních aferentních neuronech. Některé studie uvádí i jejich přítomnost na postsynaptických neuronech, především v I. a II. lamině. Nacházejí se také na neuronech spinálních ganglií. TRPV1 receptory byly také prokázány v některých centrech v mozku,

v epitelech, sliznicích, hladkých svalech a předpokládá se, že hrají roli i v neurogenických zánětech a viscerální bolesti (Ferreira et al., 2002).

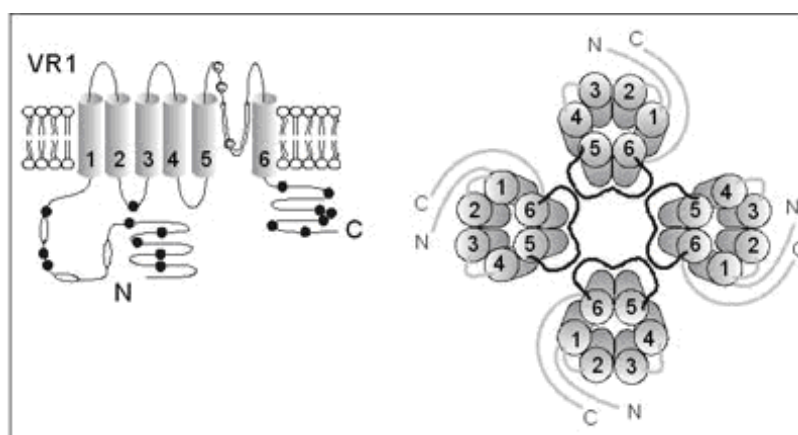
1.5.1. Molekulární stavba TRPV1 receptoru

TRPV1 je hlavním zástupcem rodiny TRPV proteinů, kterou můžeme rozdělit do 6 skupin (TRPV1-TRPV6). Naklonováním TRP lokusu bylo zjištěno, že všechny podjednotky TRPV kanálu mají podobnou strukturu (Montell a Rubin, 1989).

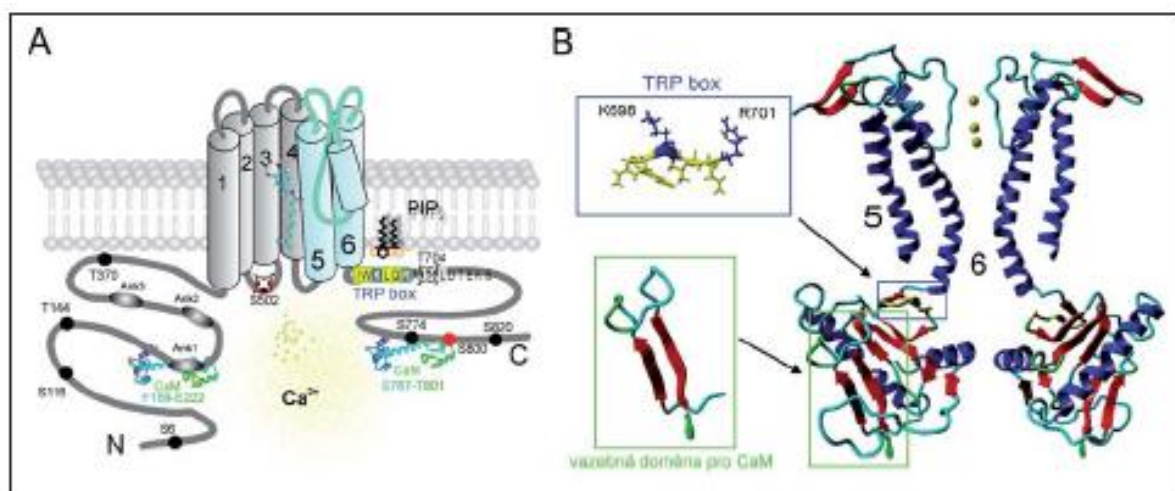
Podjednotka TRPV1 receptoru se skládá z 6 transmembránových domén (S1-S6), mezi transmembránovými úseky 5. a 6. se nachází krátký hydrofobní řetězec tvořící tzv. P kličku, a N a C konce jsou orientované intracelulárně. 5. a 6. transmembránová doména tvoří také vlastní oblast póru (Obrázek 11.). Kapsaicinový receptor TRPV1 je protein o délce 838 aminokyselin a mol. hmotnosti 95 kDa (Caterina et al., 1997).

TRPV1 receptory se skládají do tetrametrů s centrálním hydrofilním pórem - vytvářejí tak neselektivní kationtové kanály pro Na^+ K^+ a Ca^+ . Podjednotky TRP kanálů mohou vzájemně heteromerizovat (Smith et al., 2002).

Hydrofilní N koncová cytoplazmatická doména tvoří více než polovinu proteinu (432 aminokyselin), obsahuje oblasti bohaté na prolin a šest ankyrinových domén interagujících s cytoskeletem a jinými proteiny (Obrázek 12.). Druhá, také intracelulární, C koncová doména je důležitá pro fosforylaci proteinkináz a nese vazebná místa pro kalmodulin, PIP2 a ATP (Montell a Rubin, 1989).



Obrázek 11. A- Schéma transmembránové domény VR1 – 6 podjednotek, B- prostorové uložení v membráně (Vlachová a Vyklícký, 2006)



Obrázek 12. Molekulární struktura vaniloidního receptoru TRPV1, A- podjednotka TRPV1 B-model molekulární struktury (Toušová et al., 2007)

1.5.2. Aktivace TRPV1 receptoru

- tepelnými podněty- Teplota ovlivňuje funkci téměř všech iontových kanálů, avšak jen u několika způsobí aktivaci. Proteinová struktura TRPV1 receptoru je schopna přesně reagovat na teplotu prostředí a vyvoláním konformační změny při teplotách nad 43°C otevřít iontový kanál. Právě tato teplota představuje počátek vnímání bolestivé reakce na tepelné podněty. Tento práh pro aktivaci je velmi přesně regulován distální částí C koncového řetězce. Jestliže je TRPV1 vystaven teplotám vyšším než 53°C, dochází k částečné denaturaci (trvalé konformační změně) a k snížení teplotního prahu pro aktivaci receptoru (Caterina et al., 1997; Prescott a Julius, 2003). Přítomnost zánětlivých mediatorů jako prostaglandin, bradikinin, zvýšená koncentrace ATP nebo protonů také snižuje práh pro aktivaci TRPV1 což je zřejmě podstatou zesílení bolestivých vjemů – hyperalgie (Ferrer-Montiel et al., 2004; Jordt a Julius, 2002; Smith et al., 2002).

-kapsaicinem- Kapsaicin je silně lipofilní látka (8-methyl-N-vanillyl-6-monoamid) a jeho analogem je další agonista resiniferatoxin (RTX). Na aktivaci TRPV1 receptoru kapsaicinem se podílejí i intracelulární domény, jako je hydrofobní klička mezi 4. a 5. segmentem a obě koncové domény (C i N) (Jordt a Julius, 2002).

-acidou- při zánětech, poraněních, infekcích i při ischemii se pH extracelulárního prostředí snižuje ze své fyziologické hodnoty (7,3) v důsledku výlevu protonů. Místní

snížení pH (6,8-acidosa) je přirozeným aktivátorem TRPV1 (Handwerker a Kopal, 1993). Protony fungují nejen jako přímé aktivátory TRPV1 receptorů ale i jako jejich modulátory. Mírně snížené pH zesiluje aktivitu receptorů po navázání kapsaicinu a rovněž i po tepelném podnětu. Protony primárně zvyšují pravděpodobnost otevření iontového kanálu, pH nižší 6,3 dokonce způsobí aktivaci TRPV1 receptorů už při 35°C (Jordt a Julius, 2002). Snížení pH pod 6,0 pak způsobí trvalé otevření TRPV1 kanálu (Tominaga et al., 1998). Protony svým kladným nábojem neutralizují záporně nabitě aminokyseliny v oblasti póru z extracelulární strany, čímž jej otevírají (Caterina et al., 1997).

-lipidovými sloučeninami- Mezi endogenní vaniloidy aktivující TRPV1 receptory patří tři skupiny látek vznikající z kyseliny arachidonové, a jsou produkovány především v prostředí poraněné a zanícené tkáně. Do první skupiny patří anandamid, nejdůležitější endokannabinoid vznikající štěpením N-arachidonoylfostatidylethanolaminu fosfolipázou D. Do druhé skupiny patří N-arachidonoyldopamin (NADA). Další skupinou látek jsou produkty působení lipoxygenázy na kyselinu arachidonovou, tj. kyselina 12-(S)-hydroperoxyeikosatetraenová a 15-(S)-hydroperoxyeikosatetraenová. Také další látky jako jsou omega-3-polyneenasycené mastné kyseliny -dokosahexaenová kyselina (DHA), -linoleová (LNA) a -eikosapentaenová (EPA), v koncentracích 1–10 μM , přímo aktivují TRPV1 (Matta et al. 2007). TRPV1 receptory jsou aktivovány chemickými látkami (kapsaicin), kationy = snížením pH vnějšího prostředí pod 6.5, lipidovými mediátory a zvýšením teploty nad 43°C.

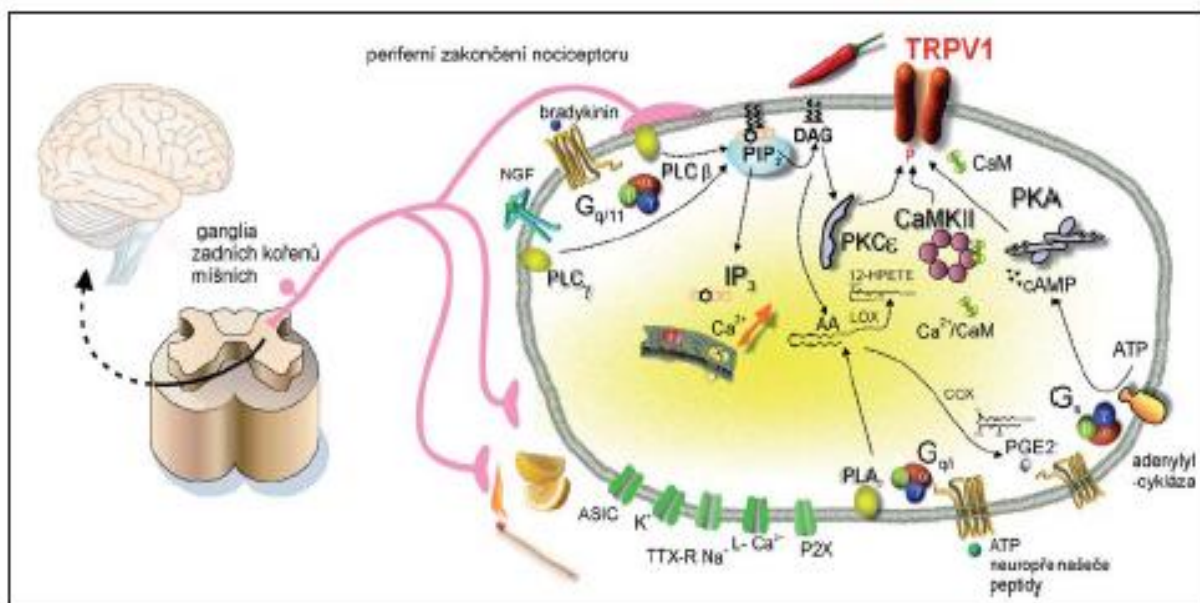
1.5.3. Senzitizace TRPV1 receptoru

Hlavním mechanismem senzitizace TRPV1 nociceptorů bolestivým teplem, chemickými látkami nebo mediátory zánětu je fosforylace. C koncová doména je bohatá na fosforylační místa, proto výrazně ovlivňuje míru afinity k agonistům i vlastní otevírání kanálu. Mezi nejdůležitější fosforylační místa patří Ser800, Thr704 pro proteinkinázu C (PKC), Ser 774 a Ser820 pro cAMP závislou proteinkinázu A (PKA) a Thr704 pro kalmomodulin závislou kinázu II (CaMK II) (Mohapatra a Nau, 2003). PIP2 interaguje s TRPV1 a způsobuje konstitutivní inhibici, protože fosforylační místo PKC Ser800 se nachází přímo uprostřed vazebného místa pro PIP2, aktivací působením PKC se PIP2 vyváže.

TRPV1 kanál podléhá senzitivizaci v prostředí zánětu vlivem tkáňových mediatorů a jiných látek, např. zvýšené hladiny NGF, GDNF a aktivita MAP kináz v DRG, nastávající během zánětu, zvyšují expresi TRPV1 receptorů a přispívají tak k hyperalgezi (Amaya et al., 2004). Vaniloidní receptor TRPV1 je v plazmatické membráně nervových buněk ovlivňován řadou adaptorových a signálních molekul, dokonce i proteiny cytoskeletu modulují jeho aktivitu. TRPV1 receptor je zodpovědný za nociceptivní, zánětlivé, hypotermické reakce, jako je akutní nociceptivní odpověď na tepelné podněty a hyperalgezie při zánětu (Caterina et al., 2000). Senzitivizace vaniloidního receptoru je jedním z hlavních mechanismů modulace jeho aktivity.

1.5.4. Antagonisté- desenzitivizace TRPV1 receptoru

Ze skutečnosti, že TRPV1 receptory hrají tak významnou roli v přenosu bolestivých podnětů, vychází i snaha o nalezení látek, které by účinně a selektivně blokovaly jejich aktivitu. Při aktivaci TRPV1 receptoru dochází zároveň k desenzitivizaci, tj. snížení odpovědi receptoru za stálé přítomnosti agonisty. Tento stav receptoru souvisí s konformační změnou proteinu, která vede k zavření iontového kanálu a přechodné nebo trvalé ztrátě jeho funkce. Přetrvávající přítomnost agonisty také dokáže TRPV1 desenzitivovat. Desenzitivizace má ochrannou funkci. Míra desenzitivizace TRPV1 receptoru je závislá na koncentraci Ca^{2+} vápníkových iontů, poměr mezi rychlostí desenzitivizace a resenzitivizace, souvisí s procesy fosforylace a defosforylace (Obrázek 13.) (Mandadi et al., 2004). Nejlépe prokazatelný mechanismus desenzitivizace závislé na vstupu Ca^{++} do buňky je aktivace kalcium-dependentní fosfatázy 2B (kalcineurin), která defosforyluje TRPV1 a tím sníží jeho aktivitu (Docherty et al., 1996). Dalším Ca^{2+} závislým mechanismem je desenzitivizace prostřednictvím Ca^{2+} vazebného proteinu kalmodulinu (CaM). Kalmodulin se váže na oblast karboxylového konce TRPV1 receptoru (Numazaki et al., 2003). Konformační změny TRPV1 receptoru vznikající důsledkem desenzitivizace a jsou dlouhotrvající (> 20 min) (Mohapatra a Nau, 2003).



Obrázek 13. Modulační dráhy uplatňující se v desenzitizaci vaniloidního receptoru TRPV1 na periferním zakončení nociceptivního vlákna. (Toušová et al., 2007))

Kapsazepin syntetický analog kapsaicinu byl dlouho jediným kompetitivním antagonistou TRPV1. Výzkum se nyní zaměřuje na využití látek s podobnou chemickou strukturou, jakou mají tyto desenzitizující látky (hlavně kapsaicin), ale které buď vůbec nevyvolávají u člověka bolest, nebo oproti kapsaicinu mají rychlejší kinetiku aktivace/desenzitizace TRPV1 receptoru (piperin). Se stejným cílem jsou testovány nově syntetizované vaniloidní látky (např. olvanil a nuvanil) a řada specifických antagonistů TRPV1 receptoru získaná metodami kombinatorické chemie (Rami a Gunthorpe, 2004). Nekompetitivní blokátory TRPV1 receptorů jsou většinou peptidy s 6 kladně nabitými aminokyselinami a od nich odvozené peptidy. Tyto peptidy jsou vysoko afinní.

Aktivita TRPV1 je také výrazně snižována oxidačními činidly. V oblasti centrálního póru na P klíče mezi 5 a 6 transmembránovým segmentem sedí cysteinové zbytky – ty se mohou oxidovat a interagovat za vzniku disulfidických můstků a napomáhat tak udržení nativní struktury a neaktivního stavu kanálu. V redukováném stavu setrvávají cysteinové zbytky s volnými SH skupinami. Poměr mezi oxidovaným a redukováným cysteinem rozhoduje o pravděpodobnosti otevření kanálu. Oxidační látka jako Cu(II)-phenantrolin s úspěchem kanál blokuje, řadí se tak mezi nekompetitivní antagonisty (Krause et al., 2005).

1.5.5. Úloha centrálních TRPV1 receptorů v synaptickém přenosu v zadním rohu míšním

Velmi dobře je prostudována stěžejní úloha TRPV1 receptorů v transdukcii a modulaci akutní i chronické bolesti na periférii a tím i možnost senzitivizace a aktivace periferních TRPV1 receptorů, působících jako integrátory nociceptivních podnětů, pomocí mediátorů zánětu jako jsou bradykinin, prostaglandiny nebo protony. Funkce TRPV1 receptorů na centrálních zakončeních primárních aferentních neuronů v zadním rohu míšním však dosud detailně prostudována nebyla, ani jejich úloha v nociceptivní signalizaci a její modulaci není zcela objasněna (Špicarová a Paleček, 2008). Na míšní úrovni nedochází k výraznému zvýšení teploty ani k snížení pH nebo výlevu mnoha mediátorů zánětu, které aktivují TRPV1 receptory na periférii. Aktivace míšních TRPV1 receptorů tudíž není dosaženo stejnými způsoby jako na periferních zakončeních PAF. V posledních letech se věnuje velké úsilí nalezení možných endogenních agonistů centrálních TRPV1 receptorů (Starowicz et al., 2007).

Bylo zjištěno, že v neuronech zadního rohu TRPV1 zesiluje excitační transmissi nociceptivního signálu primárních aferentů (Zhou et al., 2009). Na míšních zakončeních A δ a C vláken primárních aferentů aktivace TRPV1 kanálů stimuluje výlev například glutamátu, aspartátu a substance P z těchto presynaptických zakončení. Substance P také sama podporuje výlev neurotransmiterů glutamátu a aspartátu. To umožňuje zvýšení spontánních EPSC, a tím TRPV1 přispívá k bolestivému vjemu (Zhou et al., 2009). Výlev glutamátu z primárních aferentů působí zaprvé na excitační sekundární neurony, které mají na postsynaptické membráně ionotropní glutamátové receptory, a za druhé, působí nepřímo přes míšní interneurony - heterosynapticky na inhibiční GABAergní či GABA/glycinergní neurony. Interneurony jsou excitovány a dochází u nich k výlevu glutamátu na synapsi s inhibičním neuronem. Glutamát zde působí tak že sníží výlev inhibičního neurotransmiteru (GABA) (Zhou et al., 2007). Pokles inhibičního neurotransmiteru také přispívá k zesílení bolestivého vjemu a rozvoji hyperalgesie a allodynie.

Stimulace TRPV1 receptorů na centrálních zakončeních primárních aferentů vede ale také k výlevu glycinu (Zhou et al., 2008). Glycin, usnadňuje působení glutamátu na NMDA receptory, má tudíž zesilující efekt. Stejně jako na periférii i na míšních synapsích primárních aferentů se zvyšuje exprese TRPV1 v průběhu chronického zánětu. TRPV1 se zde podílí na rozvoji mechanické allodynie (Ji et al., 2002).

Vzhledem k rozšířenosti TRPV1 v mozku nelze předpokládat, že jeho úloha spočívá pouze v přenosu nociceptivních podnětů. V hipokampu, struktury zodpovědné za paměť, prostorovou orientaci a některé emoční pochody, funkce TRPV1 spočívá ve vyvolání LTD na interneuronech a LTP v zadním hipokampu (Gibson et al., 2008). Vtok Ca^{2+} spouští signální kaskádu vedoucí k dlouhodobému snížení výlevu glutamátu, což je jedním z principů LTD v hipokampu (Gibson et al., 2008). TRPV1 má vliv také na úlekové reakce, kontextovou paměť související se strachem (LTP) a regulaci úzkostného chování (Marsch et al., 2007). Hypotalamus na zakončeních míšních projekčních neuronů také obsahuje TRPV1 receptory. Ty ovlivňují jen glutamátergní neurony a zvyšují výlev glutamátu ze zakončení, což vede k aktivaci hypothalamických neuronů a zvýšení stimulace sympatické dráhy, ovlivňující do značné míry řídí homeostázu celého organismu (Li et al., 2004). Přes značnou rozšířenost TRPV1 v mozku, je největší úsilí věnováno zkoumání jejich funkce při bolestivých stavech na míšní úrovni.

Další látky mající vliv na TRPV1 receptory mají nejrůznější účinky. Bylo prokázáno že TRPV1 receptory přímo interagují například s omega-3 polynenasycenými mastnými kyselinami, a že jejich účinky jsou protichůdné. Kyselina dokosaheptaenová (DHA) je agonistou TRPV1 receptorů, prostřednictvím PKC, kyseliny eikosapentaenová (EPA) a linoleová mají antagonistický účinek, odpovědi inhibují (Matta et al., 2007). Jejich zvýšený příjem může působit analgeticky. Míšní TRPV1 receptory jsou rovněž aktivovány signální molekulou NO, která je známá širokým účinkem při regulaci řady buněčných procesů.

1.5.6. TRPV1 receptory v patologických bolestivých stavech

Aplikace kapsaicinu vede ke vzniku přechodné hyperalgezie, po které může následovat dlouhodobá analgesie (Yaksh et al., 1979; Gamse, 1982). Významného snížení bolesti bylo dosaženo intratekální aplikací kapsaicinu, ve vyšší koncentraci. Dlouhodobý analgetický účinek kapsaicinu může být zapříčiněn selektivní degenerací neuronů spinálních ganglií exprimujících TRPV1 receptory nebo jejich výběžků. Aktivované TRPV1 receptory umožní masivní vtok Ca^{2+} iontů otevřeným kanálem do buněk a jeho uvolnění z endoplazmatického retikula, neurotoxicky vysoká intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů poté naruší funkci organel a celé buňky (Olah et al., 2001). Pro potlačení chronické bolesti však nejsou používáni jen agonisté TRPV1 receptorů ale také jejich antagonisté.

Úloha periferních a centrálních TRPV1 receptorů v hyperalgezií byla testována experimentálně navozením periferního zánětu aplikací antagonisty TRPV1 receptorů (BCTC) Intraplantárně tlumil tepelnou hyperalgezií, intratekální aplikace stejných antagonistů tlumila nejen tepelnou hypersenzitivitu, ale i mechanickou. Míšní TRPV1 receptory se tedy podílejí na vzniku obou typů (Kanai et al., 2007).

Někteří, agonisté TRPV1 receptorů také aktivují kanabinoidní receptory. Například anandamid, který ve vysoké koncentraci excituje TRPV1 pozitivní aferentní vlákna v zadním rohu míšním a neuropeptidů. Nízká koncentrace anandamidu působí přes kanabinoidní receptory a odpovědi inhibuje (Tognetto et al., 2001).

Velké množství studií o úloze TRPV1 receptorů v nocicepci ukazuje jejich mimořádnou roli v rozvoji patologických bolestivých stavů. To vede k většímu zaměření na ně při vývoji nových léčiv. Antagonisté TRPV1 receptorů mohou tlumit bolest působením nejenom na periferní, ale i na centrální receptory (Cui et al., 2006).

1.6. Změny koncentrace vápenatých iontů v neuronech

1.6.1. Úloha vápenatých iontů v neuronech

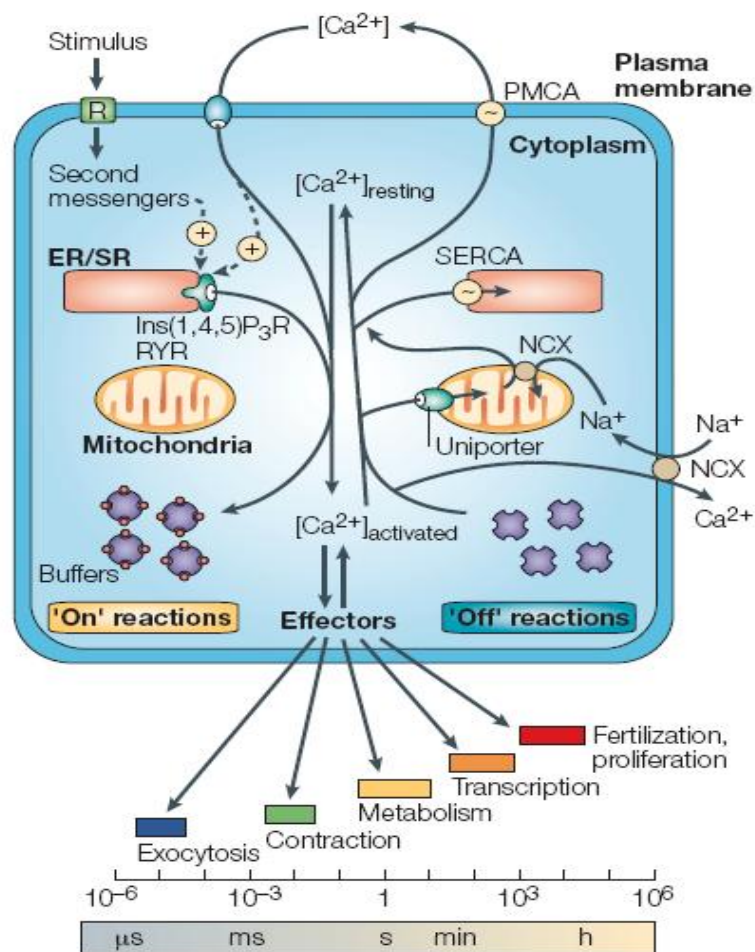
Vápníková signalizace je jedním z nejdůležitějších mechanismů probíhajících uvnitř živých buněk. Vtok vápníku (Ca^{2+} volných iontů) do cytoplazmy neuronů ovlivňuje a reguluje nejrůznější pochody a funkce včetně synaptické aktivity (Obrázek 14.) (Berridge et al., 2000). Hladina intracelulárního vápníku v neuronech se mění, a tak odpovídá na řadu různých chemických i elektrických signálů. Dynamika a síla změny koncentrace vápníku závisí nejen na tom určitém signálu, jeho síle a druhu, který na buňku přišel, ale také na signálech které mu předcházely, neboť to určuje, jak neuron zareaguje. Změny v odpovědích mohou vést k indukci LTP i LDP (Berridge et al., 2003). Vápníková signalizace je také systémem pro další zpracování informací na postsynaptickém neuronu. Vápník je jedním z nejdůležitějších druhých posílů, v neuronech i ostatních buňkách. Během neuronální excitace a také v průběhu akčního potenciálu se koncentrace vápníku v cytoplazmě zvyšuje. Existují dva hlavní směry, odkud se vápník do buňky dostává. Z extracelulárního prostoru nebo intracelulárních zdrojů. Vtok vápníku do buňky je přísně kontrolován. Vápníkové signály mají časovou a prostorovou složku, které jim umožňují odstupňování přenášeného signálu. Prostorovou složku ovlivňuje i zdroj vápníku, kterým se do cytosolu buňky dostává. Nízká intracelulární koncentrace (50nM) vytváří obrovský vápníkový gradient koncentrace v extracelulárním prostředí je jej až stotisíckrát více (Berridge, 1998). Nízkou intracelulární koncentrací Ca^{2+} je velmi nutné udržovat pro správné fungování neuronů.

Z intracelulárního prostředí se tedy Ca^{2+} odčerpává na 3 různá místa (úložiště). Zaprvé přes plazmatickou membránu ven z buňky do extracelulárního prostředí kde znovu vytváří gradient, ten reprezentuje ohromnou chemickou sílu využitelnou buňkou. Z velké části se o to stará vápníková ATP pumpa a sodíko-vápníkový výměník. Dalšími úložišti pro Ca^{2+} jsou intracelulární struktury, endoplazmatické retikulum a mitochondrie. Ty také pumpují, odstraňují vápník z cytoplazmy. Opětný výlev vápníku z těchto struktur však není vyvolán přímo změnou membránového potenciálu, jako je tomu u cytoplazmatické membrány.

Komplexní vápníkové signály jako jsou vápníkové oscilace a vápníkové vlny jsou základními složkami signálu, šířící se neuronem, jsou však prostorově omezené. Kvůli působení odčerpávajících a pufrčních složkám působícím na vápník. Vápníkové oscilace

jsou sledem prudkých změn v koncentraci intracelulárního vápníku a frekvenčně modulují příchozí informaci, mohou být vyvolány řadou podnětů, většinou to však bývá aktivita receptoru.

Řada kanálu na membránách buňky je na druhou stranu Ca^{2+} aktivována, a to zevnitř buňky, místním zvýšením koncentrace vápníku vyplavovaného z cisteren endoplazmatického retikula ležícího v jejich blízkosti. Míšní synapse je důležitým místem kde právě takovéto změny v aktivitách receptoru mohou vest k výrazné modulaci přenosu informace do vyšších center.



Obrázek 14. Rozsah buněčných procesů v časovém měřítku vyvolaných vápníkem (Berridge et al., 2000)

Vápník přítomný v cytoplazmě ať už pocházející z jakéhokoli zdroje extra či intracelulárního má na buňku velký efekt. Prakticky okamžitý efekt v řádech milisekund je ovlivnění elektrické aktivity buňky přes vápníkově závislé draslíkové kanály. Efekt

vápníkových změn je však na neuronu patrný i dlouho po jejich odeznění, je to jeden z hlavních mechanismů vzniku neuronální plasticity, a základních funkcí jako proliferace, sekrece, genové exprese a metabolismu.

1.6.2. Extracelulární zdroje vápníku

Vápenaté ionty (Ca^{2+}) se pohybují z extracelulárního prostředí přes plazmatickou membránu za pomoci vápníkových kanálů. Ca^{2+} kanály jsou dvojího druhu. Zaprvé napětově závislé vápníkové kanály, které umožňují ovlivňovat koncentraci intracelulárního (IC) vápníku díky změně membránového napětí. Napětím ovládané kanály se nacházejí jak na těle neuronu, tak i na jeho výběžcích. Jsou z velké části odpovědné za rychlé vápníkové změny vyvolané akčním potenciálem (Miyakawa et al., 1992).

Existuje 6 typů napětově závislých vápníkových kanálů: T, L, N, P, Q, R. Podle typu aktivace je můžeme rozdělit na 2 podskupiny. Kanály T typu tvoří podskupinu aktivovatelnou nízkými změnami napětí, ostatní tvoří podskupinu, která je aktivována vysokými změnami napětí. Na jednotlivých neuronech může existovat více typů Ca^{2+} kanálů. Napětově závislé vápníkové kanály (VDCC) se mimo neuronů nachází také v dalších typech vzrušivých tkání (např. sval, gliové buňky, neurony). Tyto kanály jsou mírně propustné pro ionty sodíku, ale jejich propustnost pro vápník je 1000 krát větší než pro sodík za normálních podmínek. Při klidovém membránovém potenciálu jsou zavřené, aktivují se při depolarizaci. Jejich aktivace umožňuje vstup většiny Ca^{2+} do buňky při akčním potenciálu (Yamakage a Namiki, 2002). Vstup vápníku pomocí napětově závislých kanálů je také základem rychlého uvolňování váček s neurotransmitery během synaptického přenosu.

Za druhé jsou to vápníkové kanály řízené ligandem, nejrozšířenější z těchto kanálů jsou zejména NMDA a AMPA receptory spojené s kanály (Mayer et al., 1987; Burnashev, 1996). O kterých jsem se již zmiňovala výše. Jsou zapojené také do synaptické plasticity, centrální senzitivace a indukce LTP a LDP. Propustnost AMPAR se liší podle toho, jestli obsahují i GluR2 podjednotku (Burnashev et al., 1995). Propustnost receptorů pro Ca^{2+} se také liší podle jejich umístění na těle neuronu nebo na dendritech (Garaschuk et al., 1996). Hlavní vstupní bránu však představují NMDA kanály kudy protéká až 20x více vápníku nežli je tomu u ostatních (Burnashev, 1998). Jsou známy i další kanály propustné pro Ca^{2+} , které mohou přispívat k celkovému vtoku Ca^{2+} do buňky, jako například kanály kainátové, serotoninové typu 3, TRPV1, P2X, a také acetylcholinové receptory.

Vápník je, poté co splní svou úlohu, opětovně odčerpáván z cytosolu pryč do extracelulárního prostoru pomocí ATP závislé vápníkové pumpy (PMCA) a sodíko-vápníkového výměníku (NCX). Vápníková pumpa odstraňuje, Ca^{2+} z buněk přes cytoplazmatickou membránu s vysokou afinitou ale také vysokými energetickými nároky. Pro přesun jednoho iontu vápníku se spotřebuje jedno ATP. Sodíko-vápníkový výměník je energeticky výhodnější využívá jen energii sodíkového gradientu. Za jeden iont Ca^{2+} se vymění 3 ionty sodíku (Na^+), tím také vzniká i velmi malý kladný náboj přispívající k depolarizaci. Sodíko-vápníkový výměník má afinitu k vápenatým iontům o něco nižší nežli PMCA jeho kapacita je však 50x vyšší.

Činnost NCX může být i přechodně obrácena v závislosti na koncentračním gradientu sodných iontů. To může být způsobeno buď to depolarizací membrány, nadměrným zvýšením koncentrace Na^+ iontu uvnitř buňky nebo snížením vně.

Další cestou kudy se do buňky může dostat vápník z extracelulárního prostředí jsou kanály reagující na úbytek vápníku v intracelulárních úložištích (SOC) jako je ER. Ty jsou aktivovány vápenatými ionty, které jsou uvolňovány právě z těchto intracelulárních zdrojů vápníku. SOC jsou napěťově nezávislé a jejich vodivost je velmi nízká (Bolitina, 2004; Parekh, 2008).

1.6.3. Intracelulární vápníkové rezervoáry

Mechanismy uvolňování vápníku z intracelulárních zásobáren nejsou zatím prostudovány, hlavními organelami uvolňujícími vápenaté ionty v buňce jsou endoplazmatické retikulum (ER) a mitochondrie (MIT).

1.6.3.1. Endoplazmatické retikulum

Endoplazmatické retikulum (ER) je soustava vzájemně propojených membránových cisteren a kanálků, kterou můžeme najít v cytoplazmě většiny eukaryotních buněk. Napojuje se na buněčné jádro a obvykle i na Golgiho aparát. ER je nejdůležitější strukturou pro vápníkovou signalizaci a také největší zásobárnou vápníku uvnitř buňky (Verkhatsky, 2005). ER integruje signály přicházející z vnějšku i z vnitřního prostředí a reaguje na ně uvolňováním či vychytáváním volných Ca^{2+} iontu a tím udržuje jejich homeostázu v cytoplazmě. Koncentrace volných Ca^{2+} iontu v cytoplazmě je velmi

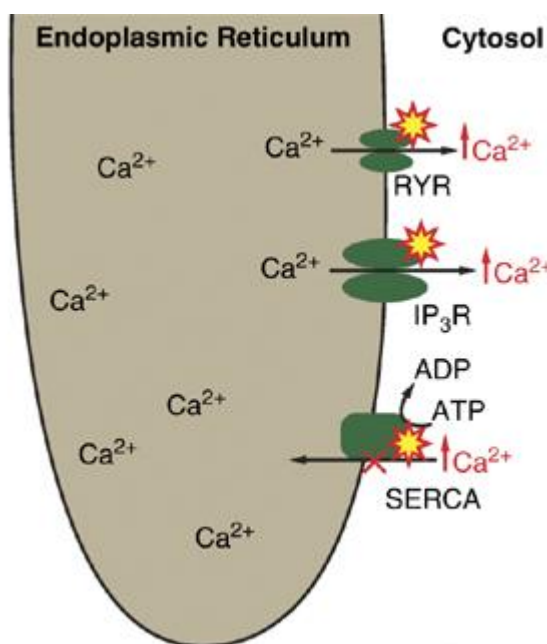
důležitým ukazatelem aktivity a fyziologického stavu buňky. ER udržuje rovnováhu tak že volné Ca^{2+} ionty pufruje ve svém intraluminálním prostoru. Při selhání endoplazmatických homeostatických mechanismů se buňka dostává do stresu a může dojít až k apoptóze (Verkhatsky a Toescu, 2003).

ER také dokáže Ca^{2+} do cytoplazmy uvolnit, děje se tak zejména dvěma hlavními vápníkovými kanály, které ER obsahuje ve své endomembráně a to inositol-3-fosfátovým receptorem (IP3R) a ryanodinovým receptorem (RYR) kterými vápenaté ionty snadno proudí do cytoplazmy (Obrázek 15.). Tyto dva hlavní kanály jsou řízeny ligandem a to inositolem-3-fosfátem (I_3P) (Allbritton et al., 1992). Oba jsou distribuovány na ER ve velkém počtu a jsou si strukturně podobné. Existuje ještě třetí kanál, který by mohl být do uvolňování vápníku z ER zapojen, je jím SCA_{MPER}, ten je aktivován sfingolipidem-1-fosfátem.

IP3R je membránový glykoproteinový komplex působící jako Ca^{2+} kanál, jeho aktivita je kontrolována hladinou volných cytosolických vápenatých iontů přes IP3 jimiž je aktivován. IP3R je odpovědný za výlev vápníku z ER v reakci na otevření plazmatických metabotropních receptoru reagujících na glutamát a neuropeptidy. IP3R byl nejprve oděven v mozečku krysy.

Ryanodinové receptory (RyRs) tvoří třídu intracelulárních vápníkových kanálů v různých formách vzrušivé tkáně, jako svaly a neurony. RYR mohou být aktivovány i přímo volnými Ca^{2+} ionty nacházejícími se v cytoplazmě. Díky tomu jsou hlavním buněčným mediátorem vápeníkem indukovaného uvolňování vápníku (CICR) v živočišných buňkách. RYR může být také aktivován endogenními sloučeninami jako je například kofein. RYR mohou být modulovány i cyklickou ADP ribózou. Na neuronech se uplatňují RYR typu 3 které reagují na napětím ovládané plazmatické kanály pro vápník. Už i mírné zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontu v jejich blízkosti je dokáže otevřít a spustit CICR. Pravděpodobnost otevření IP3Rs a RYRs se zvyšuje s cytosolickou koncentrací vápenatých iontů.

Hladina Ca^{2+} iontů v lumenech ER je udržována pomocí ATPázové pumpy (SERCA) která přenáší ionty Ca^{2+} z cytosolu do intraluminálního prostoru za spotřeby ATP. Doplňuje tak zásoby v ER a snižuje hladinu v cytosolu.

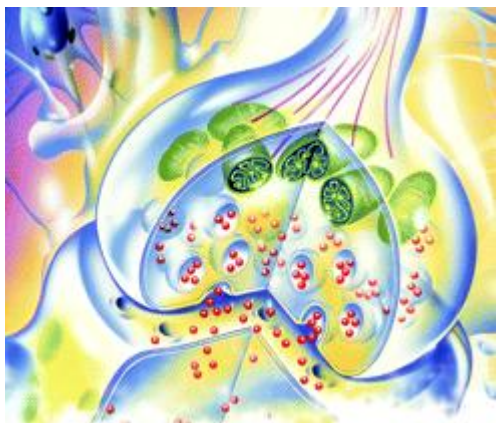


Obrázek 15. Cesty vtoku Ca^{2+} iontů do cytosolu z ER přes RYR a IP_3R . A zpětný přenos Ca^{2+} zprostředkovaný SERCA za spotřeby ATP. (Beveris a Neumar, 2008)

1.6.3.2. Mitochondrie

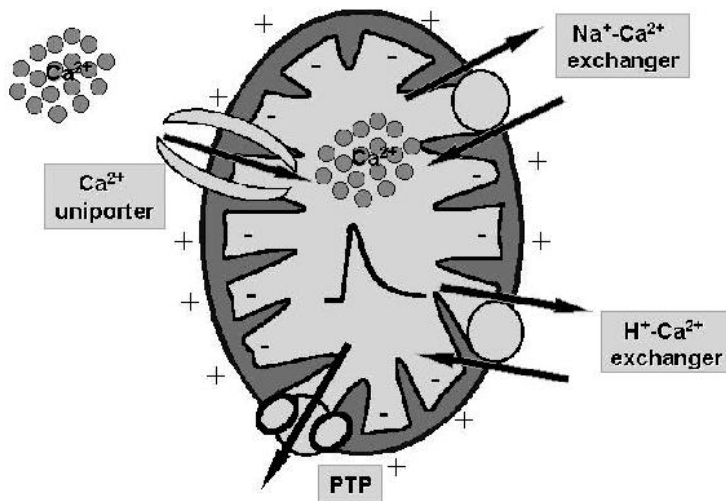
Mitochondrie je membránami obalená organela, kterou lze nalézt ve většině buněk. Vytváří se síť cysteren po celé buňce. Funkce mitochondrií tkví hlavně v energetickém metabolismu, jelikož v nich díky procesům buněčného dýchání vzniká energeticky bohatý adenosintrifosfát (ATP). Podílejí se však i na dalších procesech, jako je např. buněčná diferenciace, buněčná smrt a kontrola buněčného cyklu a růstu. Jejich výskyt je velmi hojný zejména v oblasti presynaptického zakončení kde dodávají energii pro sekreci neurotransmiterů a zpětně vychytávání glutamátu (Obrázek 16.) (Danbolt, 2001).

Mimo těchto dopodrobna prozkoumaných funkcí však navíc může matrix mitochondrií fungovat jako zásobárna vápníku. Podobně jako endoplazmatické retikulum, ovšem v mnohem menší míře, čímž také přispívá k udržení vnitřní homeostazy buňky. Již dávno bylo zjištěno, že část vápníkového vtoku do cytosolu pochází právě od mitochondrií. Ještě donedávna to, však bylo považováno za malý a nevýznamný podíl na vápníkové signalizaci. Současné studie však ukazují, že by Ca^{2+} ionty uvolňované mitochondriemi mohly mít značný vliv na velikost amplitudy i časový průběh vápníkové signalizace (Szabadkai a Duchen, 2008).

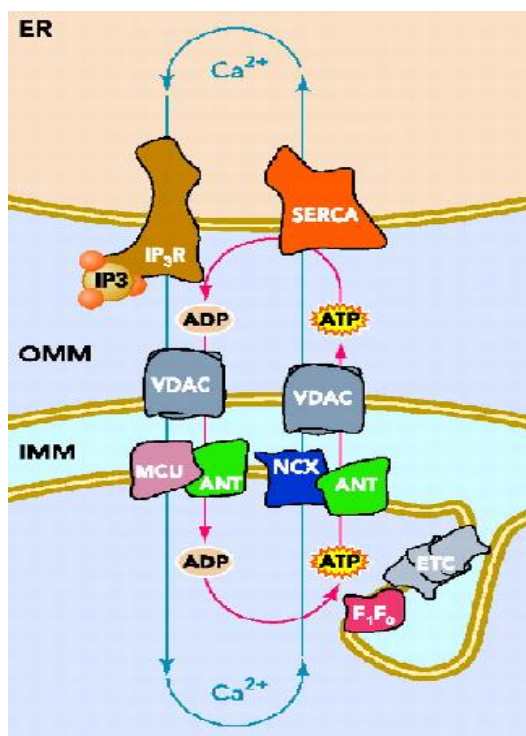


Obrázek 16. Mitochondrie jsou významné pro synaptický přenos a jsou převládající organelou v presynaptických zakončeních. Mitochondrie poskytují energii ve formě ATP a pufrují vápníku v těchto aktivních synapse. Některé synaptické mitochondrie může pufrovat vápník i na úkor produkce ATP. (Jonas, 2006)

Do matrix se dostávají ionty Ca^{2+} speciálním přenašečem, který je poháněn membránovým potenciálem, při masivním uvolňování vápníku. Vnější membrána je značně pórovitá a skutečnou bariéru pro malé molekuly představuje spíše vnitřní membrána. Vnější mitochondriální membrána je volně propustná pro vápníkové ionty. Kontrolní systém vstupu vápníkových iontů z a do mitochondriální matrix je uložen na její vnitřní membráně a zahrnuje řadu membránových proteinů, které zodpovídají za dodávky vápníku do matrix. Jsou to většinou uniportery závislé na membránovém potenciálu a transportují vápník po elektrochemickém gradientu (Obrázek 17. a 18.). Výlev vápenatých iontů do cytosolu je zprostředkovan hlavně sodíko-vápníkovým výměníkem (NCX) který je umístěn na vnitřní membráně. Pracuje stále. Další cestou pro výtoku Ca^{2+} iontu z matrix může být kanál k jehož otevření dochází až při vysoké koncentraci Ca^{2+} iontu v matrix. Jeho otevření může vést k vápníkem zprostředkované buněčné smrti.



Obrázek 17. Ca^{2+} vstupuje do mitochondrie především selektivním Ca^{2+} uniporterem, který je závislý na koncentraci Ca^{2+} inntů v cytosolu a také Ca^{2+} výměníky. (Campanella et al., 2004)



Obrázek 18. Vznik Ca^{2+} a ADP/ATP mikrodomén na kontaktních místech ER s mitochondriemi umožňuje přímou kontrolu nad výměnou Ca^{2+} do mitochondrií. Ca^{2+} vystupují z ER přes IP₃ receptory (IP₃R), a ztupují do mitochondrií prostřednictvím napěťově-závislých kanálů (VDAC) a uniporterů (MCU). Readsorpce Ca^{2+} do lumen ER se děje přes SERCA a je přímo řízena ATP dodávaným mitochondrií. (Szabadkai a Duchen, 2008)

1.6.4. Vápník vázající proteiny

Neurony mají kromě vylučování do extracelulárního prostředí nebo uskladňování endogenně, ještě třetí možnost jak se s nárůstem koncentrace volných vápenatých iontů vypořádat, a to prostřednictvím vápník vázajících proteinů (CaBP). Vápník-vazebné proteiny jsou proteiny, které se podílejí na vápníkové buněčné signalizaci vazbou na Ca^{2+} . Slouží jako intracelulární pufry a pomáhají tak buňce regulovat hladinu volného cytosolického vápníku (Neher a Augustine, 1992).

CaBP na sebe volný vápník naváží, a tím snižují jeho koncentraci. Volné Ca^{2+} ionty jak už bylo řečeno, jsou významným druhým poslem a mohly by se vázat na řadu jiných molekul a tím je uvést do aktivního stavu. Po navázání Ca^{2+} iontu má řada z nich i další funkce. Pro přežití buňky jsou nepostradatelné, předpokládá se, že až 90% endogenně uloženého vápníku je navázaná právě na ně. Koncentrace CaBP v buňce má vliv na časoprostorový průběh všech vápníkových změn které v neuronu probíhají (Chard et al., 1993).

Nejdůležitějšími takovými pufracími CaBP jsou parvalbumin a calbindin (Chard et al., 1993). Snížení počtu těchto proteinů vede ke kratším zato však výraznějším změnám v koncentraci volných Ca^{2+} . Naopak zvýšení jejich počtu se na průběhu vápníkových změn odrazí v jeho prodloužení a snížení amplitudy. Toto zvýšení nebo naopak snížení koncentrace pufrů hraje roli zejména v oblasti synaptické štěrby na pre- i postsynaptických neuronech kde může efektivně modulovat synaptickou účinnost a tím přispívat k plasticitě synapse (Muller et al., 2007).

Parvalbumin je lehká proteinová molekula (12kDA) mající vysokou afinitu k volným vápenatým iontům. Strukturně je podobná kalnodulinu a troponinu C, k navázání Ca^{2+} používá EF-hand domény. Nejhojněji se vyskytuje v neuronech vnitřní vrstvy laminy II.

V cisternách ER se také Ca^{2+} neskládá jednak volně nýbrž také navázané na CaBP a to zejména na calcequestrin a calreticulin. Endoplazmatické CaBP jsou charakteristické nízkou afinitou, avšak obrovskou kapacitou asi 50 vápenatých iontů dokáže navázat jediná molekula calcequestrinu. Parvalbumin má jen 4 vazebná místa pro vápník (Ren a Ruda, 1994).

1.6.5. Ca²⁺ senzory

Zvláštním případem CaBP jsou takzvané vápníkové senzory. Řada procesu probíhajících v neuronech je na přítomnosti volných Ca²⁺ iontů přímo závislá, potřebují ho jako spouštěč. Indukce takovýchto procesů je dosažena právě nárůstem hladiny vápenatých iontů a nastává při překročení jisté koncentrace v cytosolu během neurální aktivity.

Například vtok Ca²⁺ do nervového zakončení je jednou z klíčových událostí exocytosy. U rychlého výlevu nastává exocytosa cca 60μs po influxu Ca²⁺, tedy v kratším čase, než ve kterém probíhá většina enzymatických reakcí, z čehož se usuzovat že protein, jenž to umožňuje sloužící jako intracelulární vápníkový senzor, leží ve velmi těsné blízkosti Ca²⁺ kanálu, a váže ionty Ca²⁺ velmi rychle a s relativně nízkou afinitou. Tímto Ca²⁺ senzorem je synaptotagmin.

Dalším senzorem je kalmodulin. Komplex kalmodulinu s navázaným vápníkem je aktivátorem mnoha kináz včetně kalmodulin dependentní protein kinázy (CAMK). Ta má pak sama dlouhodobý efekt (Mellor a Parker, 1998).

2. Cíle práce

1. Sledovat změny koncentrace vápenatých iontů v cytosolu neuronů zadních rohů míšních po stimulaci zadních kořenů míšních za pomoci calcium imagingu. Přizpůsobit metodický přístup pro konvenční fluorescenční mikroskop.
2. Vyhodnotit koncentrační změny vápenatých iontů v tělech neuronů superficiálních vrstev zadního rohu míšního v závislosti na délce pulzu elektrické stimulace zadních kořenů míchy.
3. Ověřit stabilitu amplitudy vápníkové odpovědi rychlého i pozdního typu v průběhu trvání experimentu.
4. Modulovat synaptický přenos, aplikací látek ovlivňujících ionotropní glutamátové receptory (antagonisté CNQX a MK801), aplikací kapsaicinu (agonista TRPV1 receptorů) a aplikací neuromodulátorů ($\text{TNF}\alpha$, PMA a Bradykinin).

3. Materiály a metody

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

3.1. Použité chemikálie

Fluo-4 AM	Invitrogen
DMSO, CNQX, MK801, Antifoam A, Pluronic F-127,	Sigma – Aldrich
Capsaicin, TNF α , PMA, Bradykinin, KOH	Tocris Bioscience

A dále pak Agarosa (b. t. 80 – 85°C) - pro agarový blok fixující míchu při krájení, methiodide, D-glukosa, sacharosa, Dihydrogenfosforečnan sodný (NaH₂PO₄), EGTA (C₁₄H₂₄N₂O₁₀), HEPES (C₈H₁₈N₂O₄S), Hydrogenuhličitan sodný (NaHCO₃), Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), Hydroxid cesný (CsOH), Chlorid cesný (CsCl), Chlorid draselný (KCl), Chlorid hořečnatý (MgCl₂), Magnézium sulfát (MgSO₄), Chlorid sodný (NaCl), Chlorid vápenatý (CaCl₂), Glukonát delta lakton (C₆H₁₀O₆) N-leoyldopamin, BSA, DMSO (Invitrogen, Sigma – Aldrich, Tocris Bioscience)

3.2. Složení použitých roztoků

Pro přípravu akutních míšních řezů jsme používali disekční extracelulární roztok (ECS). Pro inkubaci byl použit snímací ECS s vyšší koncentrací (2,4 mM) vápníku. Pro barvení fluorescenčními barvami byl použit snímací ECS. Roztoky byly syceny karbogenem (Linde Technoplyn, a. s., Praha, Česká Republika), složení 95 % O₂ a 5 % CO₂, pro dostatečné okysličení a udržení stabilního pH. Pro přesné krájení řezů bylo nutné míchu fixovat agarovými bločky. K přípravě všech roztoků byla použita redestilovaná voda.

Disekční ECS: 95 mM NaCl; 1,8 mM KCl; 7 mM MgCl₂; 0,5 mM CaCl₂; 26 mM NaHCO₃; 1,25 mM KH₂PO₄; 25 mM D-glukosa; 50 mM sacharosa

Snímací ECS: 127 mM NaCl; 1,8 mM KCl; 1,3 mM MgSO₄; 2,4 mM CaCl₂; 26 mM NaHCO₃; 1,2 mM NaH₂PO₄; 25 mM D-glukosa.

Barvicí roztok: snímací ECS, 10 μ M Fluo-4 AM, 0.5 μ M Pluronic F-127, 0.05 μ M Antifoam A

Agar: 160 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,5 CaCl₂, 10 mM D-glukosa, 10 mM HEPES

3.3. Příprava míšních řezů

Experimentální zvířata byli samci laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*) z kmene Wistar v postnatálním stáří 19 – 23 dnů (P19 – P23). Míšní řezy z lumbální oblasti byly připraveny dle metody dříve popsané (Paleček et al., 1999; Špicarová a Paleček, 2009). Akutní transversální řezy se zadními kořeny byly připraveny z oblasti míchy vstupu kořenů ze zadních končetin L3-L6. Laboratorní potkan byl přiveden do celkové hluboké anestezie ketaminem (100 mg/kg, i. p., Narkamon, Zentiva) a xylazinem (10 mg/kg, i. p., Rometar, Zentiva). Následně byla provedena dorzální laminektomie, mícha byla vyjmuta a ihned přesunuta do disekčního ECS, o teplotě 2- 4°C (zpomalení ischemických procesů) s vyšším obsahem Mg²⁺ iontů a nízkým obsahem Ca²⁺ iontů. Poté byla přerušena mícha. Z míchy byla velmi opatrně odstraněna dura a pia mater tak aby nedošlo k poškození zadních kořenů míchy a neuronů v zadním rohu v míšním.

Mícha byla poté vložena do žlábků mezi dva agarové bločky a připevněnými k podložce kráječe vteřinovým lepidlem. Pomocí kráječe (Leica, VT 1000 S, Nussloch, Německo) s žiletkovým ostřím byly připraveny transversální míšní řezy o tloušťce 450 μ m. Po celou dobu krájení byla mícha ponořena v disekčním roztoku o teplotě 2-4°C. Krájení probíhalo za vysokých vibrací a nízké posuvné rychlosti, aby se co nejvíce zmenšilo mechanické poškození neuronů. Řezy byly následně inkubovány po dobu 30 minut v disekčním roztoku o teplotě 35°C v inkubační komoře (Memmert, Schwabach, Německo). Veškeré roztoky byly neustále syceny carbogenem.

Anestezie, disekce, čištění a krájení míchy jsou z hlediska úspěšnosti nejkritičtějšími fázemi celého experimentu. Rychlost a preciznost provedení největším dílem ovlivnila vitalitu neuronů v akutních řezech. Neurony v řezech připravených tímto způsobem byly vitální po dobu pěti až sedmi hodin.

3.4. Barvení fluorescenčními barvami

Pozorované fluorescenční emise jsou relativně slabé (10^{-4} až 10^{-9}) ve srovnání s excitačním světlem. Je proto velmi důležité dosáhnout účinného označování buněk. Intenzita fluorescence přímo souvisí s obsahem molekul fluorescenčního barviva uvnitř buněk. Důležité je také používat silný a stabilní zdroj světla a zavést světlo do mikroskopu s vysokou účinností.

Akutní řezy byly barveny fluorescenční barvou Fluo-4 AM (Invitrogen) citlivou na volné vápenaté ionty v intracelulárním prostředí. Fluo-4 AM je excitována světelným spektrem o délce 480 - 490 nm, při 488 nm poskytuje nejlepší rozlišení. Neurony v řezech byly inkubovány s Fluo-4 AM v barvicím roztoku po dobu 60 minut při pokojové teplotě 18-24°C a pH 7,4. Pro účinnější přechod barvy přes CM byl použit Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich). Po nabarvení byly řezy přeneseny zpět do snímacího ECS a pokojové teplotě, kde byly ponechány do konce experimentu.

3.5. Calcium imaging

Calcium imaging je optická metoda používaná ve výzkumu. Využívá chemických nebo genetických vápníkových ukazatelů (molekuly, schopné reagovat na vazbu Ca^{2+} iontů změnou svých spektrálních vlastností) pro zobrazení koncentrace vápenatých iontů v živých buňkách. Buňky obsahující tyto ukazatele lze zobrazit pomocí fluorescenčního mikroskopu a analyzovat podle intenzity emitovaného světla, to nakonec odráží obsah Ca^{2+} v buňce.

3.6. Aparatura a příslušenství

Jednotlivé míšňové řezy byly umístěny do snímací komůrky o objemu zhruba 2 ml, kudy neustále protékal snímací roztok z aplikačního systému rychlostí ~2 ml za minutu. Řez byl fixován pomocí platinové podkovičky s napnutými nylonovými vlákny. Vizualizace buněk probíhala pod fluorescenčním mikroskopem, (Leica, DM LFSA, Německo) za pomoci kamery (SPOT RT, Diagnostic instruments inc) pro světelnou excitaci vlnovou délkou 480nm byl používán Polychrome V monochromátor (TILL Photonics) s vysoko stabilní xenonovou lampou s výkonem 150 W. Stimulační zařízení Train/delay generátor a constant current isolated stimulator (Didimetr LTD).

Pro elektrickou stimulaci byla použita sací elektroda (A-M systems inc. USA), a skleněné mikroelektrody vytažené z borosilikátových trubiček (Rüchli Glass, Otovice,

Česká Republika) o vnějším průměru 1,6 mm a vnitřním 0,97 mm. Přípravovány byly na tahači kapilár modelu P-97 (Sutter Instrument Co.). Po vytažení byly plněny snímacím ECS.

3.7. Aplikace látek a elektrická stimulace

Díky aplikačnímu systému byla možná rychlá výměna extracelulárních roztoku a použitých látek o přesné koncentraci. Pro experimenty byly přidávány tyto látky.

1. CNQX (50 μ M) aplikace 6 minut – (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) kompetitivní antagonist AMPA/kainitových receptorů
2. MK801 (45 μ M) aplikace 12 minut – (dizocilpin) nekompetitivní antagonist NMDA a glutamátových receptorů
3. TNF α (6nM a 0,6 nM) – cytokín Tumor necrosis factor
4. PMA (1 μ M) – (phorbol 12-myristate 13-acetate) aktivátor PKC
5. Bradykinin (10 μ M)
6. Kapsaicin (1,5 μ M, 0,5 μ M, 0,25 μ M, 0,125 μ M, 62nM, 30nM, 15nM)

Všechny látky byly na svou výslednou koncentraci ředěny ve snímacím ECS. Synaptická aktivita v povrchových laminách míchy byla evokována stimulací zadního kořene míchy skleněnou sací elektrodou.

Elektrická stimulace byla aplikována ve tří minutových intervalech. Předchozí experimenty ukázaly, že to je doba nutná pro obnovení synapse. Každá stimulace trvala 1 sekundu a sestávala se z 10 pulzů za sebou, o délce trvání 0,5ms nebo 0,1ms, intenzitě 3mA a frekvenci 10Hz. Stimulace o délce trvání pulzu 0,1ms měla preferenčně aktivovat A vlákna a pulz o délce 0,5ms A+C vlákna zadního kořene. V řadě experimentů byla použita střídavá stimulace, kde byl alternován krátký a dlouhý pulz. Ostatní experimenty byly prováděny se stimulací o délce pulzu 0,5ms.

3.8. Analýza dat

Data byla zaznamenávána a analyzována za pomoci MetaFluor® Fluorescence Ratio Imaging Software Metafluor. Tento software byl využit i při pozdější off-line analýze. Změny intenzity fluorescence Fluo-4 odpovídající změnám volných vápenatých iontu v tělech neuronů jako důsledek neuronální aktivity byl hodnocen umístěním

definované oblasti zájmu (regionu tzv. ROI) nad tělem neuronu v této oblasti zájmu byl hodnocen vždy průměr intenzity fluorescence uvnitř ROI a jeho změna po stimulaci. V případech vitálních neuronů byla počáteční intenzita fluorescence tak nízká že neurony nebylo možno rozlišit od pozadí. Změna intenzity fluorescence byla zaznamenána jako změna amplitudy ΔF vypočítaná jako $(F1-F0)/F0=\Delta F$ a poté převedena na procentech. $F0$ je bazální aktivitou a byla počítána pro každý neuron zvlášť. $F1$ odpovídá změně po stimulaci. Byly provedeny kontrolní měření pro určení stabilního ΔF . Rychlost snímání kamerou byla za daných podmínek 5,6 snímku za vteřinu což poskytuje kvalitní a přesný obraz průběhu somatických vápníkových změn.

Bylo nanejvýš důležité snížit změny poklesu intenzity fluorescence způsobené vysvěcováním fluorescenční barvy a jejím únikem ven z buňky. Toho jsme dosáhli použitím nízké intenzity světelného zdroje a omezeným osvitem. Vysvěcování barvy bylo také kompenzováno matematicky, kdy byla za $F0$ považována průměrná hodnota bazální aktivity neuronu před každou stimulací neuronu zvlášť.

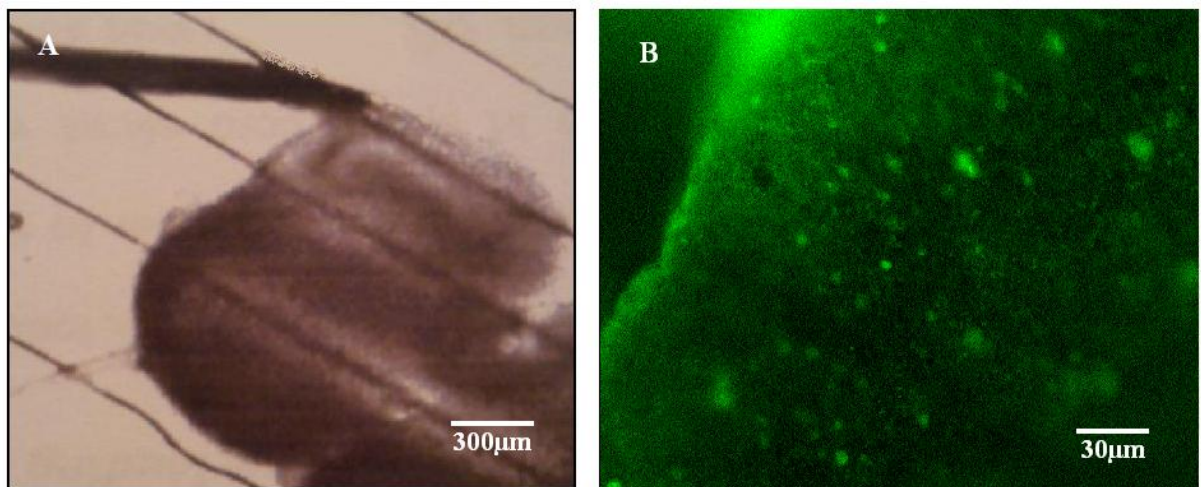
V této práci byly vyhodnoceny velikosti amplitud vápníkových změn jednotlivých neuronů v úsecích trvajících 30s, v pokusech byla vždy provedena kontrolní stimulace pro ověření správnosti barvení a vitality neuronů. Po kontrolních stimulacích následovala experimentální část záznamu (např. aplikace látek). Pro analýzu změn amplitudy v experimentální části byla použita právě hodnota kontrolních měření. Získaná data byla vztahována vůči kontrolním hodnotám naměřeným na začátku pokusu bez aplikace jakýchkoliv látek. Všechna prezentovaná data jsou vyjádřena jako, průměr se střední chybou průměru (SEM).

Statisticky významný rozdíl mezi skupinami byl vypočítán metodou jednocestné analýzy rozptylu ANOVA a post-hoc Fisherovým testem nebo t-testem při porovnání dvou skupin. Za signifikantní byla určena hladina významnosti $P < 0,05$; $0,01$ a $0,001$. K hodnocení a grafickému zobrazení byly použity programy Excel, SigmaStat 3.1 a SigmaPlot 9.0.

4. Výsledky

4.1. Vyvolání změny koncentrace vápenatých iontů v cytosolu neuronů zadních rohů pomocí stimulace zadních kořenů míšních

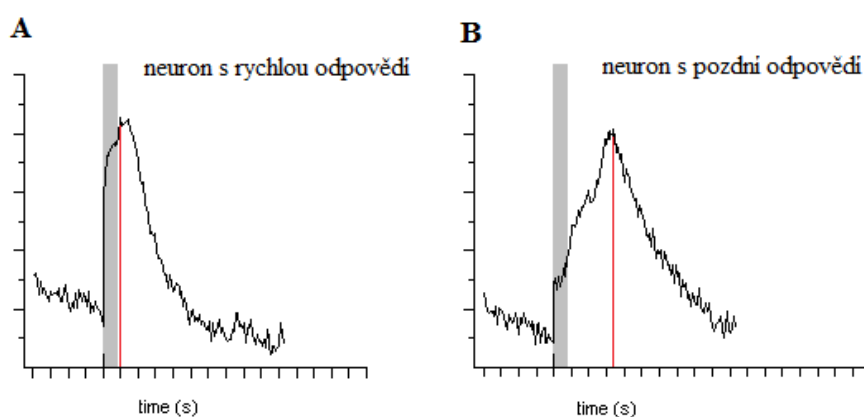
Změny koncentrace intracelulárních vápenatých iontů (iCa^{2+}) byly snímány z neuronů laminy I a II. Stimulace zadního kořene vyvolala zřetelné změny iCa^{2+} s dvěma časově odlišnými průběhy. Počet aktivovaných buněk na řezu se lišil v závislosti na jeho kvalitě, vitalitě buněk, účinnosti nabarvení a pozici elektrody na dorzálním kořeni. Důraz byl také kladen na neporušenost zadních kořenů, které jak je vidět na obrázku 19. A, byly nasáány stimulační elektrodou. Pro snímání vápníkových změn uvnitř živých buněk jsme použili vápníkovou sondu FLUO-4, molekulu reagující na vazbu vápenatých iontů změnou intenzity fluorescence signálu. Na míšním řezu byly po nabarvení sondou FLUO-4 viditelné jednotlivé buňky (Obrázek 19. B). Odpovědi neuronů na stimulaci zadního kořene jsme hodnotili podle změn intenzity emitovaného světla, které odráží intracelulární koncentraci Ca^{+2} v neuronech.



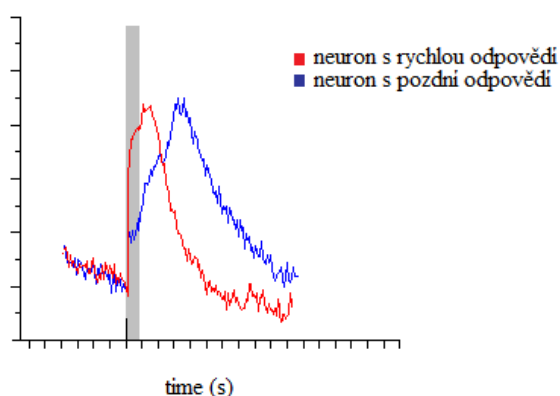
Obrázek 19. **A** Akutní transverzální míšní řez ponořený ve snímacím roztoku umístěný pod fluorescenčním mikroskopem, kde je zadní kořen nasátý do skleněné elektrody a fixován proti pohybu pomocí mřížky nylonových vláken. Takto fixovaný řez je připraven pro snímání. Obrázek pořízen v procházejícím světle. **B** Neurony zadního rohu míchy obarvené Fluo-4 v nízkém rozlišení.

4.2. Rozdílné časové průběhy odpovědi na stimulaci

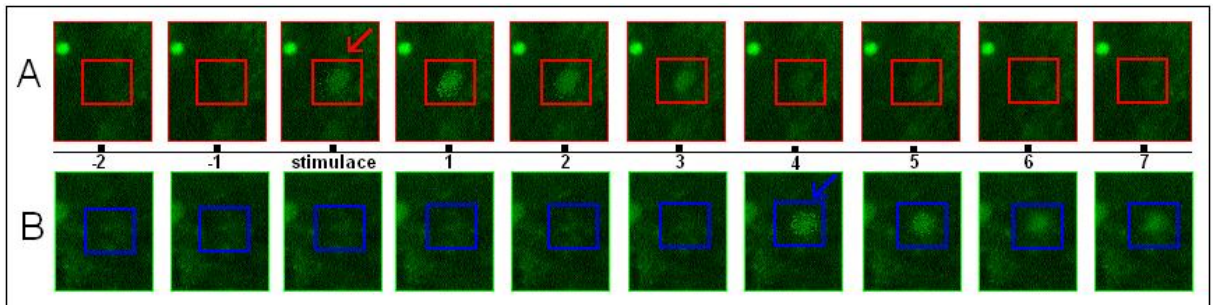
Stimulací zadního kořene lze vyvolat dva zřetelně odlišné časové průběhy koncentračních změn intracelulárních vápenatých iontů v tělech postsynaptických neuronů (viz. Obr. 20. a 21.). Jedná se o odpověď na stimulaci s rychlým průběhem, kdy neurony vykazovaly maximální změnu koncentrace intracelulárních vápenatých iontů během nebo ihned po ukončení stimulace. A odpověď na stimulaci s pomalým průběhem kdy maximální změnu koncentrace intracelulárních vápenatých iontů vykazovaly neurony až několik sekund po stimulaci. Neurony s pozdním typem odpovědi tvořily menší část $n=108$, to je 14,52% z celkového počtu $n=744$ sledovaných neuronů. Skupina neuronů s rychlou odpovědí dosahovala maximální odpovědi průměrně $1,38s \pm 0,21s$, a skupina neuronů s pozdními odpověďmi $4,392s \pm 0,34s$ po zahájení stimulace (Obrázek 22.).



Obrázek 20. Dva časově rozdílné průběhy odpovědi na stimulaci o délce trvání pulzu 0,5ms. Stimulace trvající 1s je značena šedým pruhem. Maximální změna koncentrace Ca^{2+} je označena červenou čarou. Fluorescenční odpověď obou skupin A neuron s rychlou odpovědí, B neuron s pozdní odpovědí.



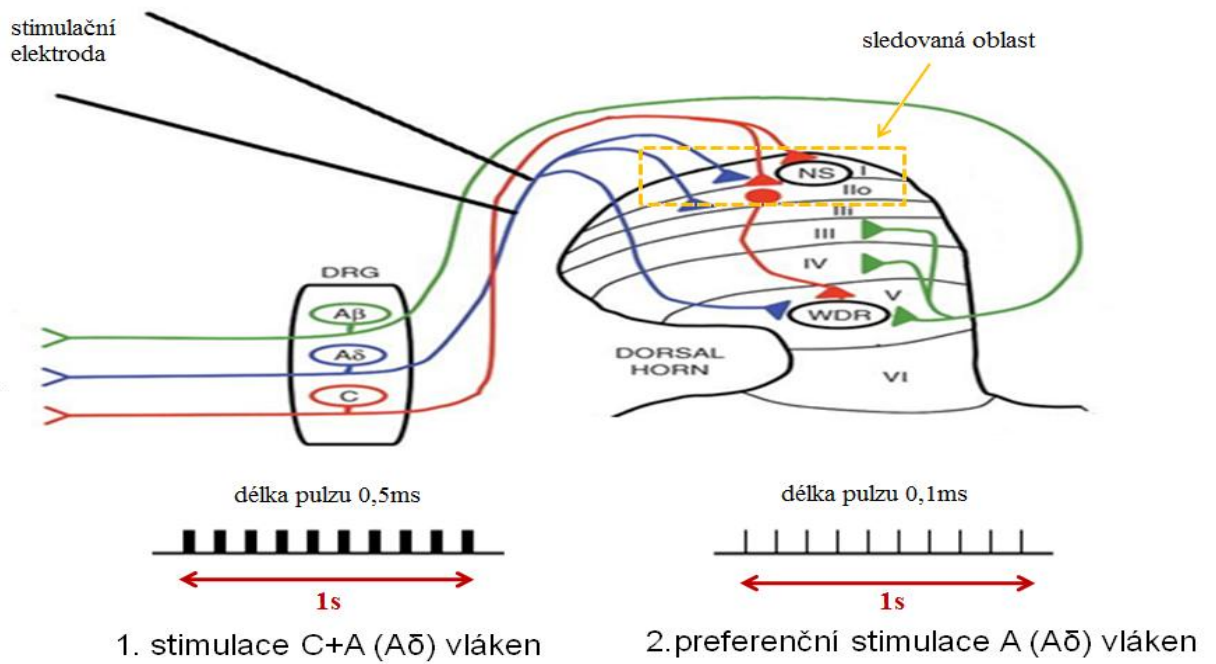
Obrázek 21. Přehlednější znázornění porovnávající časový průběh změny koncentraci Ca^{2+} v neuronech po stimulaci o době trvání pulzu 0,5ms.



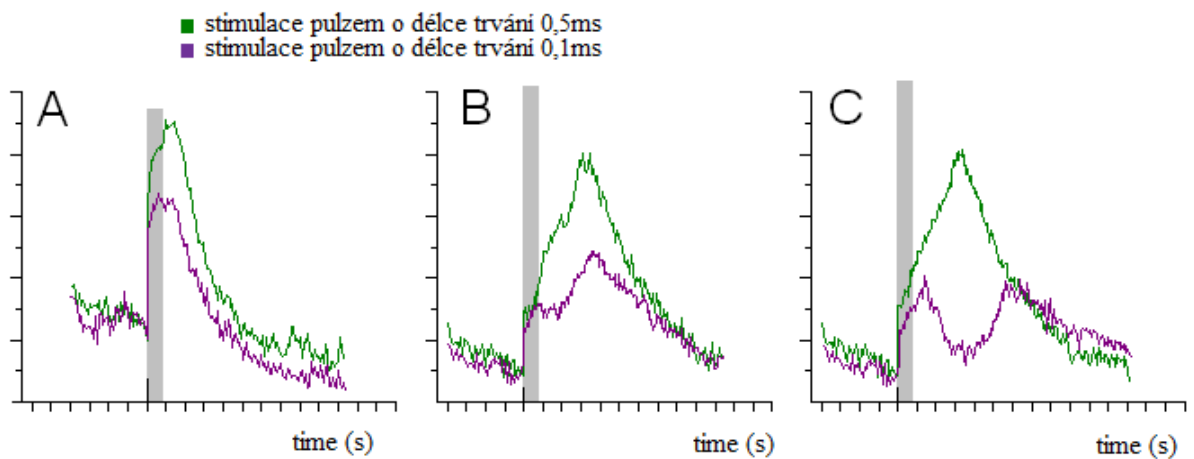
Obrázek 22. Sekvence znázorňující změny koncentrace iCa^{2+} v tělech neuronů, řada A neuron s rychlou odpovědí, řada B neuron s pozdní odpovědí. Pozdní nástup iCa^{2+} ukazuje na zapojení intracelulárních zdrojů vápníku.

4.3. Závislost vápníkové odpovědi na parametrech stimule

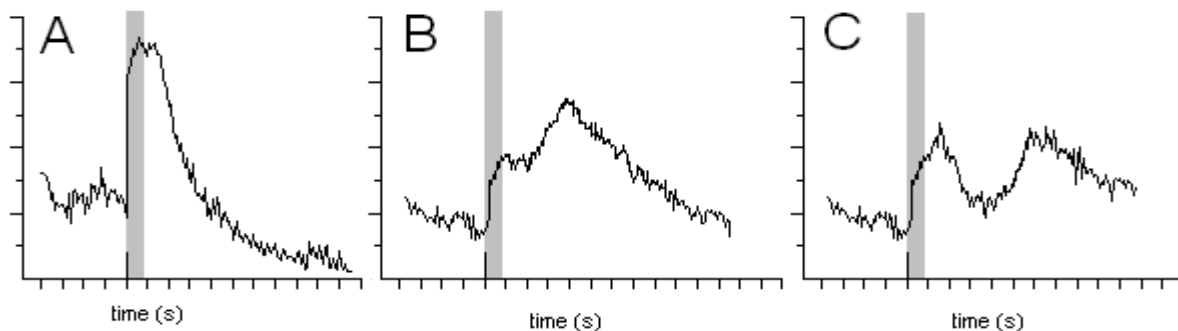
Pro naše pokusy jsme také využili vlastností periferních nervových vláken kdy je známo že aktivace nervových vláken je závislá na délce trvání stimulačního pulzu. Bylo prokázáno, že stimulační pulz o délce 0,1ms jsou preferenčně aktivována myelinizovaná vlákna A, zatímco stimulačním pulzem o délce 0,5ms budou aktivována vlákna obojího typu jak vlákna A tak i nemyelinizovaná vlákna C. Proto jsme mohli preferenčně stimulační pulz oddělit tyto dvě skupiny A a A+C vláken při zachování stejné intenzity stimule (3 mA a 10 pulzů, frekvenci 10 Hz). V průběhu experimentu jsme použili protokol s oběma délkami stimulačního pulzu. Stimule dlouhým i krátkým pulzem je znázorněna na obrázku 23. Při používání kratšího stimulačního pulzu 0,1ms nedošlo k signifikantní změně poměru mezi počtem neuronů s rychlou a pozdní odpovědí v porovnání se stimulačním pulzem o délce 0,5ms. Tento poměr byl 1:6,903 u stimule pulzem o délce 0,5 ms a 1:6,852 u stimule pulzem o délce 0,1 ms. Při stimulačním pulzem 0,1ms dojde k poklesu amplitudy vápníkové odpovědi u neuronů s rychlou odpovědí v průměru o $37,4\% \pm 4,6\%$ a u neuronů s pozdní odpovědí v průměru o $45,7\% \pm 5,1$ (Obrázek 24.) rozdíl mezi skupinami je signifikantní na hladině $P < 0,05$. Použitím stimulačního protokolu o délce pulzu 0,1ms se objevují dva časově rozdílné průběhy vápníkové odpovědi podobně jako u stimule pulzem dlouhým 0,5ms (Obrázek 25. A 26.) . U části populace neuronů testovaných oběma stimulačními pulzy s pozdní odpovědí (13 ze 45; 28,8%) se objevil odlišný průběh odpovědi po stimulačním pulzem 0,1ms (Obrázek 25. C). U tohoto typu odpovědi byl nárůst intenzity fluorescenčního signálu během stimule následován jasně patrným poklesem koncentrace vápenatých iontů před nástupem druhé opožděné složky odpovědi.



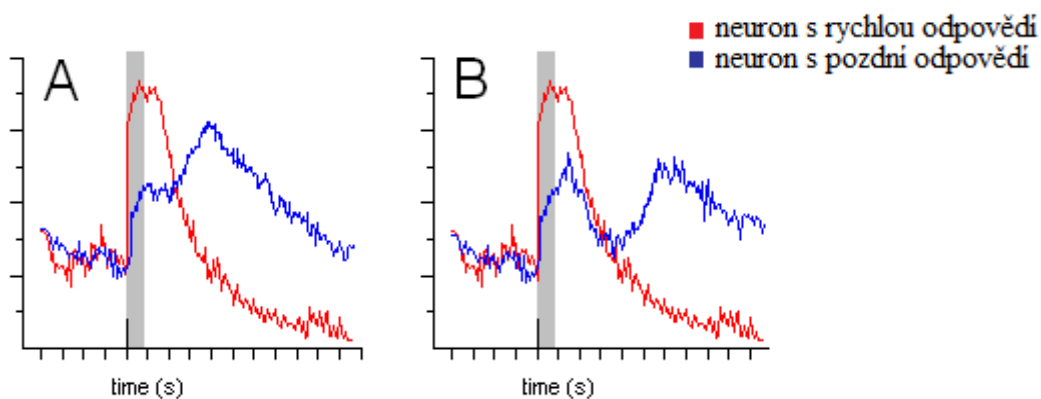
Obrázek 23. Dva rozdílné stimulační protokoly o délce pulzu 0,5ms a 0,1ms. Stimulace trvala 1s.



Obrázek 24. Porovnání odpovědi jednoho neuronu A s rychlou odpovědí a neuronu B,C s pozdní odpovědí na stimulaci o délce pulzu 0,1ms a 0,5ms neuronů.



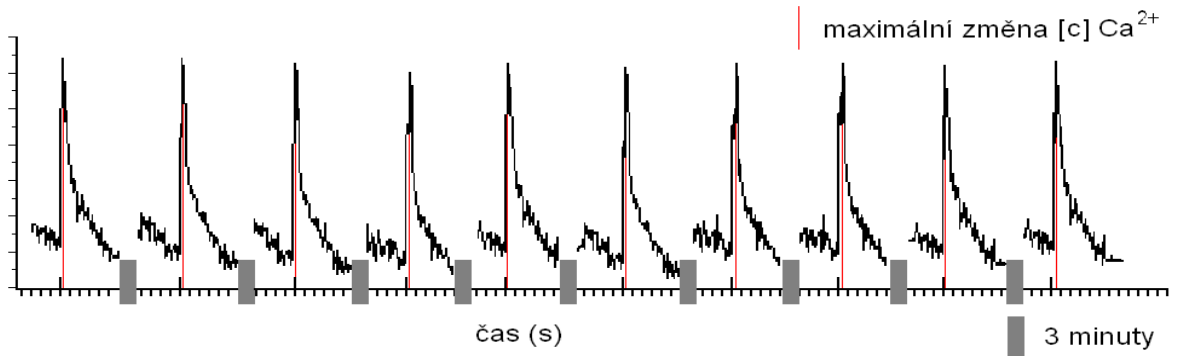
Obrázek 25. Neurony stimulované pulzem o délce 0,1ms s odlišnými průběhy vápníkové odpovědi, A – neuron s rychlou odpovědí, B neuron s pozdní odpovědí, jednodílnou a C neuron s dvoufázovým průběhem odpovědi na stimulaci. Stimulace trvající 1s je značena šedým pruhem.



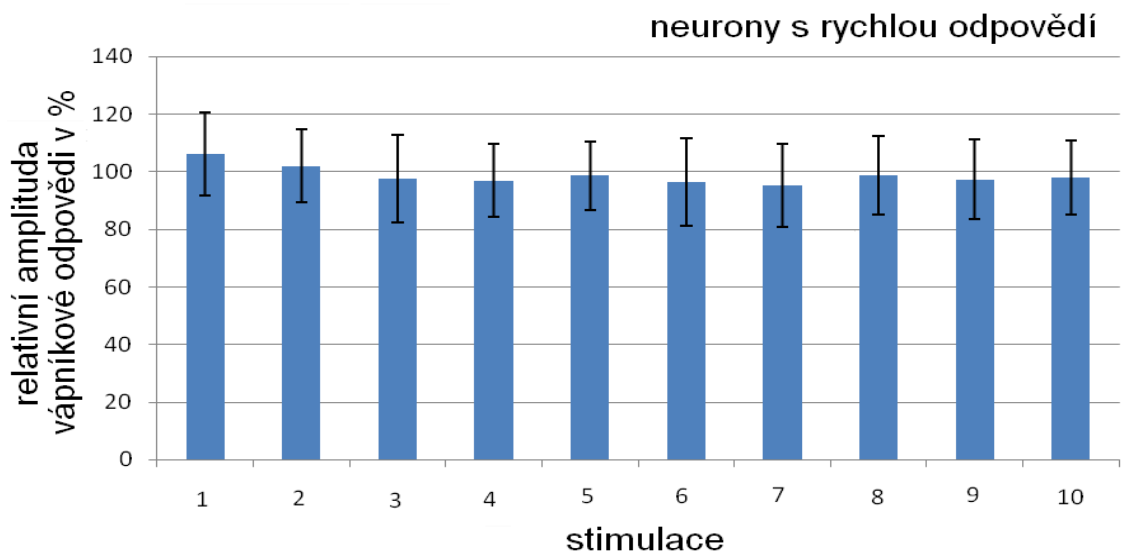
Obrázek 26. Přehlednější znázornění porovnávající časový průběh změny koncentraci iCa^{2+} po stimulaci o době trvání pulzu 0,1ms.

4.4. Stabilita vápníkové odpovědi v čase

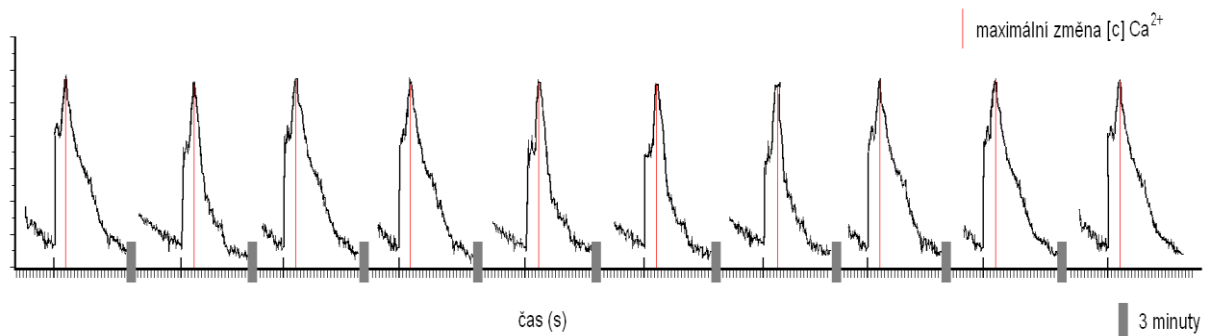
Aby bylo možné hodnotit vliv látek na synaptický přenos bylo nutné ověřit, že odpověď neuronů na stimulaci se v čase nemění. Kontrolní snímání byla prováděna za účelem ověření stability rychlých i pozdních evokovaných synaptických odpovědí na stimulaci i po několikanásobném opakování. Každé snímání bylo prováděno 30 sekund v 3minutových intervalech. Stimulací evokovaná odpověď byla stálá po celou dobu měření průměrně 40 minut tedy 12 stimulací (Obrázek 27, 28; Graf 1, 2).



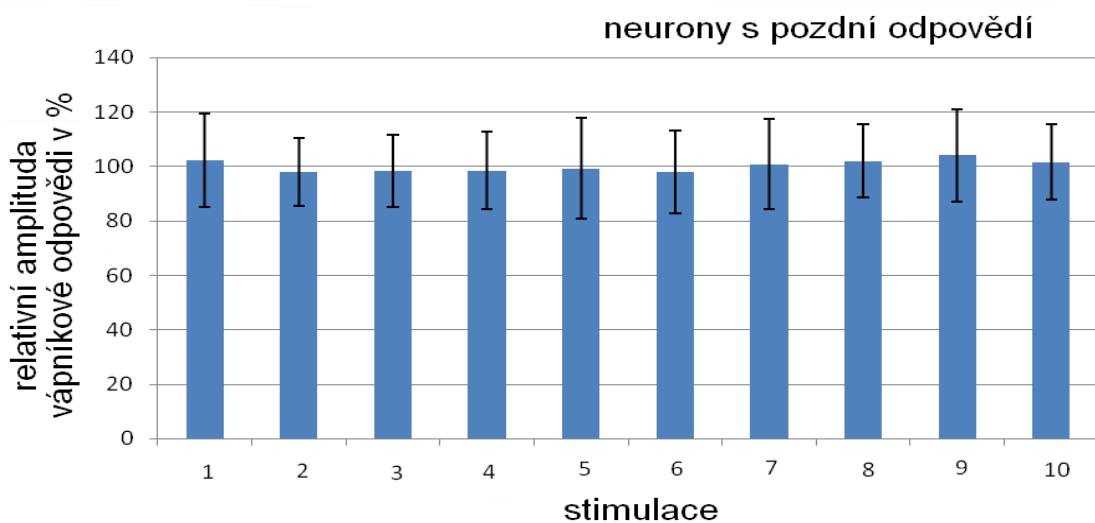
Obrázek 27. Synapticky evokované změny iCa^{2+} . Záznam jednoho neuronu s rychlou odpovědí. 30 sekundový záznam každé stimulace oddělená 3minutovým intervalem pro rehabilitaci synapse (šedé obdelníky).



Graf 1. Průměrné odpovědi kontrolní populace neuronů s rychlou odpovědí. $n=161$ Nebyly zjištěny žádné statisticky signifikantní trendy.



Obrázek 28. Synapticky evokované změny iCa^{2+} . Záznam jednoho neuronu s pozdní odpovědí. 30sekundový záznam každé stimulace oddělené 3minutovým intervalem pro rehabilitaci synapse (šedé obdelníky).



Graf 2. Průměrné odpovědi kontrolní populace neuronů s pozdní odpovědí. $n=36$ Nebyly zjištěny žádné statisticky signifikantní trendy.

4.5. Ovlivnění ionotropních glutamátových receptorů antagonisty

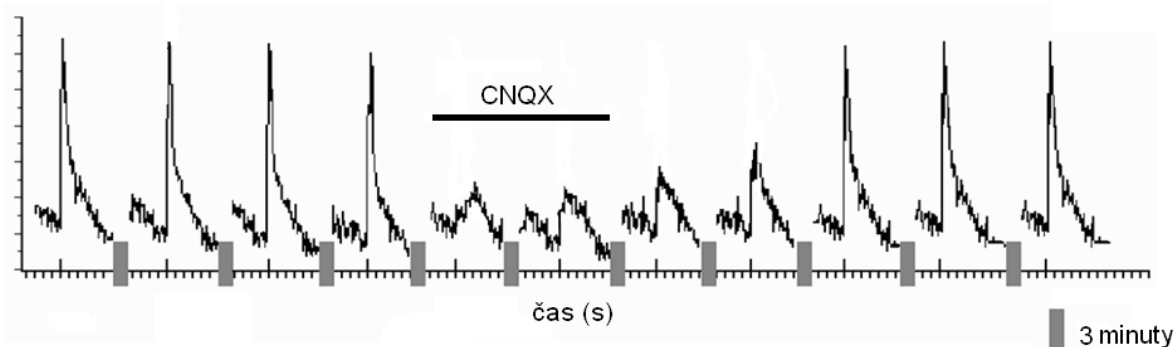
Synapticky evokované změny iCa^{2+} jsou z velké části závislé na ionotropních glutamátových receptorech způsobujících po své aktivaci depolarizaci membrány a tím i následně vznik akčního potenciálu a otevření napětově závislých vápníkových kanálů na neuronech. Pro zablokování AMPA receptorů byl použit antagonist CNQX ($50\mu M$) aplikovaný po dobu 6 minut a pro zablokování NMDA receptorů nekompetitivní antagonist MK801 ($45\mu M$) aplikovaný po dobu 12 minut. Zablokování ionotropních glutamátových kanálů bylo použito pro zjištění jejich úlohy v synaptické aktivaci sledovaných neuronů. Antagonisté AMPA a NMDA kanálů byli aplikováni každý zvlášť v separátních pokusech.

4.5.1. Antagonista AMPA receptorů

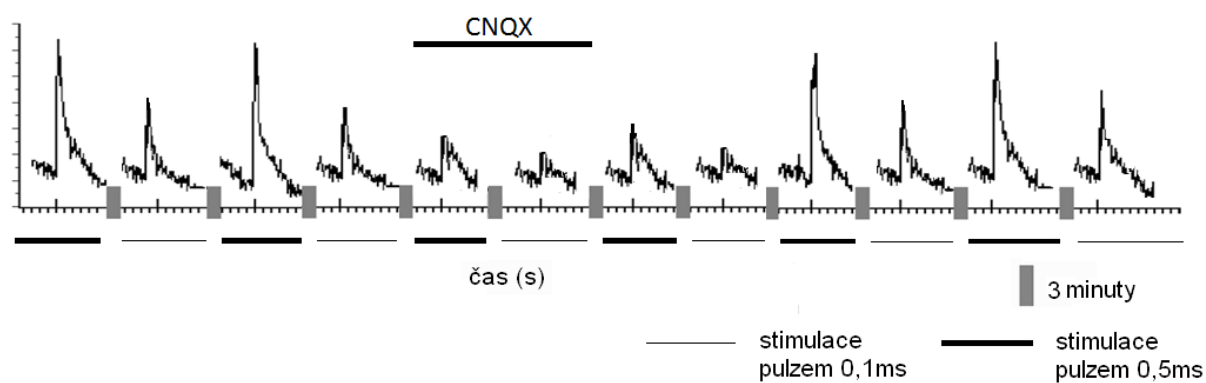
Prvním použitým antagonistou byl CNQX. Záznam jednoho neuronu s rychlou odpovědí a aplikací CNQX (50 μ M) 0.5ms po dobu 6 minut, 30 sekundový záznam každé stimulace oddělená 3 minutovým intervalem pro rehabilitaci synapse (Obrázek 29.) a záznam jednoho neuronu s rychlou odpovědí a aplikací CNQX (50 μ M) po dobu 6 minut při střídavé stimulaci pulzy o délce trvání 0,5ms a 0,1ms (Obrázek 30.).

Nejprve byly pokusy prováděny jen za stimulace o délce pulzu 0.5ms průměrná hodnota amplitudy vápníkové odpovědi klesla při podání CNQX oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o 76,44% \pm 4,01% (n=24) a ve skupině neuronů s pozdní odpovědí o 53,02% \pm 8,31% (n=3) (Graf 3. A a B). Pokles u obou skupin je statisticky signifikantní na hladině $P < 0,001$ a rozdíl v poklesu odpovědi mezi skupinami je také statisticky signifikantní na hladině $P < 0,01$ (Graf 4.).

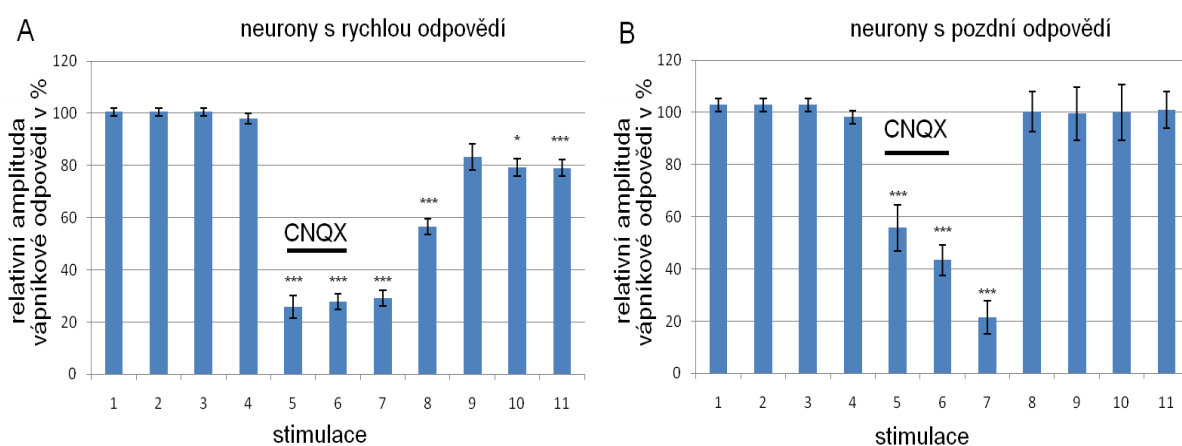
Pokusy byly opakovány také ve skupině neuronů stimulovaných oběma rozdílnými délkami pulzu 0,5 a 0,1ms. Při stimulaci pulzem o délce 0.5ms klesla průměrná hodnota amplitudy vápníkové odpovědi po stimulaci při podání CNQX oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o 52,44% \pm 5,01% (n=18) a ve skupině neuronů s pozdní odpovědí o 45,02% \pm 8,31% (n=3) (Graf 5. A a B). Pokles u obou skupin je statisticky signifikantní na hladině $P < 0,001$ a rozdíl mezi skupinami je také statisticky signifikantní na hladině $P < 0,05$ (Graf 6. A). Při stimulaci pulzem o délce 0.1ms průměrná hodnota amplitudy po stimulaci o délce pulzu 0,1ms klesla po podání CNQX oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o 67,74% \pm 2,59% a ve skupině neuronů s pozdní odpovědí o 63,83% \pm 3,47% (Graf 5. C a D). Pokles u obou skupin je statisticky signifikantní na hladině $P < 0,001$, rozdíl mezi skupinami není statisticky signifikantní (Graf 6. B). Rozdíl mezi poklesem průměrných odpovědí po stimulaci o délce pulzu 0,5ms a 0,1ms není statisticky signifikantní u skupin neuronů s rychlou odpovědí, je však signifikantní u skupin neuronů s pozdní odpovědí na hladině $P < 0,05$ (Graf 7.).



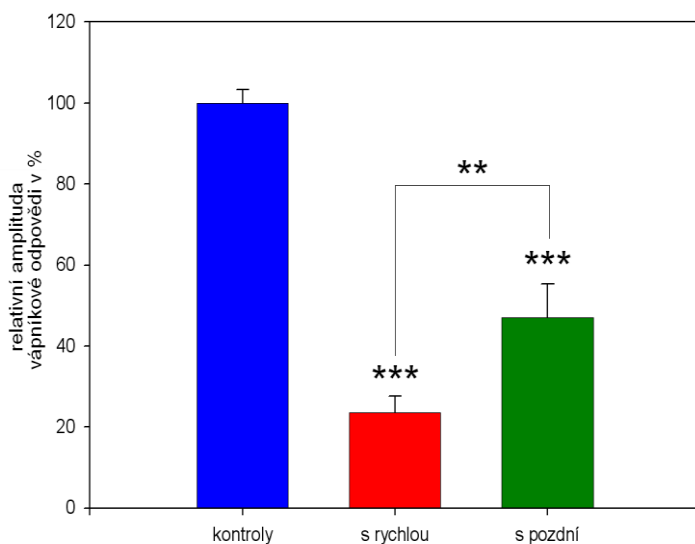
Obrázek 29. Synapticky evokované změny iCa^{2+} . Záznam jednoho neuronu s rychlou odpovědí a aplikací CNQX ($50\mu M$) po dobu 6 minut (aplikace označena pruhem) 30 sekundový záznam každé stimulace oddělená 3 minutovým intervalem (šedé obdelníky).



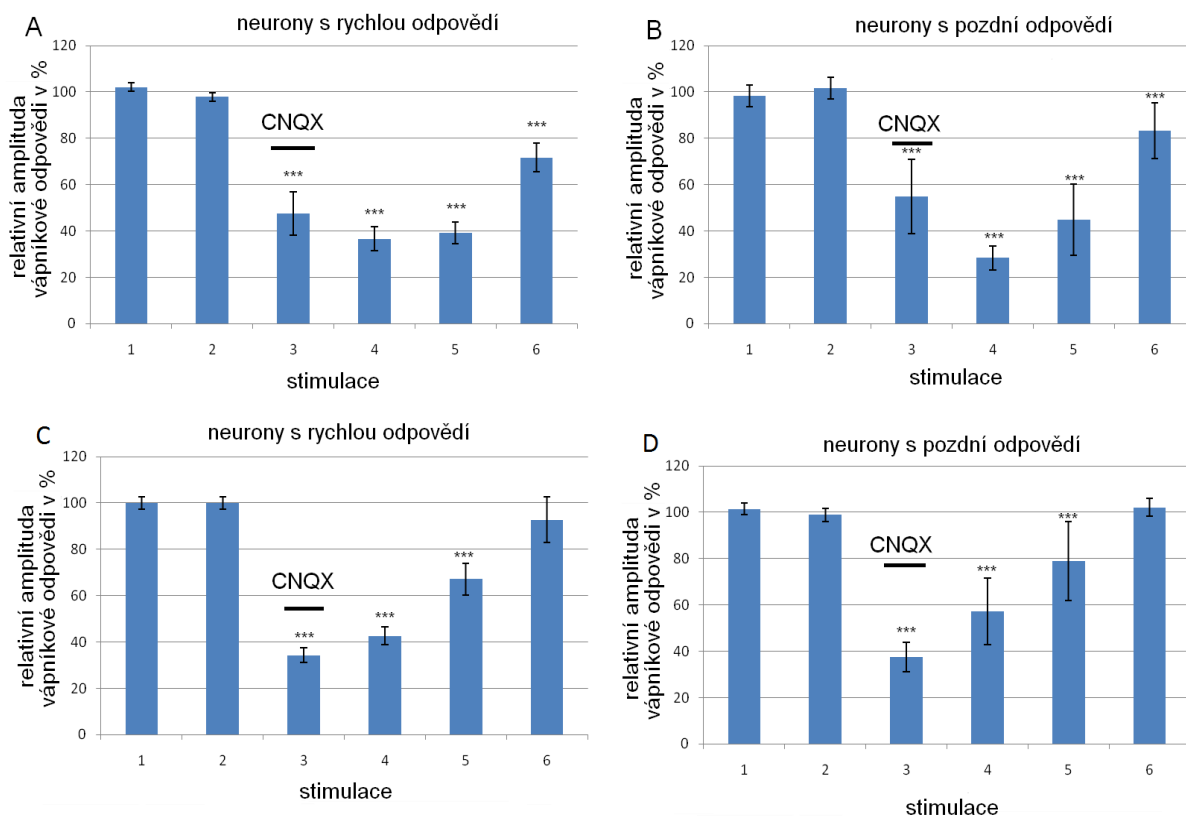
Obrázek 30. Záznam jednoho neuronu s rychlou odpovědí a aplikací CNQX při střídání pulzu o délce 0,1ms a 0,5ms.



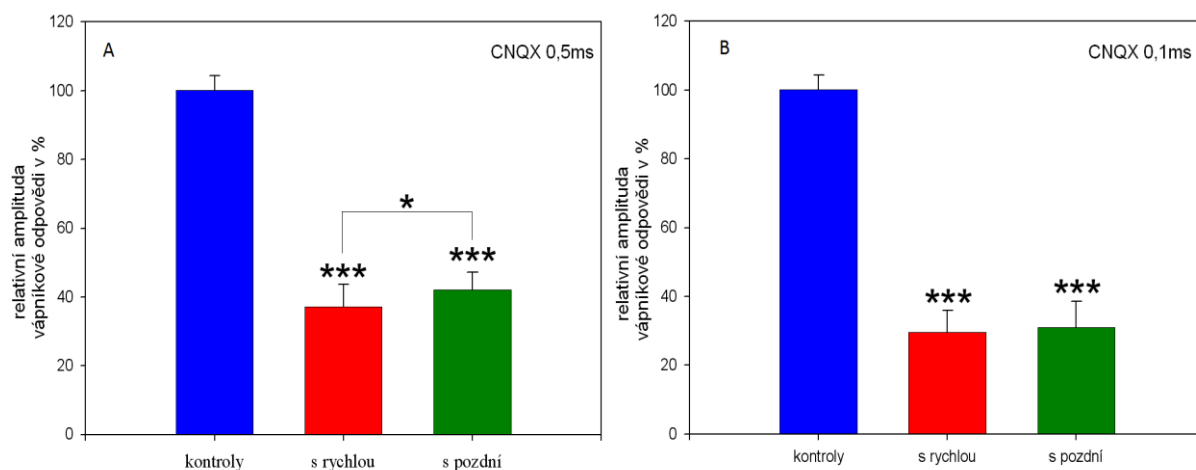
Graf 3. Snímání stimulaci s délkou pulzu 0,5ms. Průměrná hodnota amplitud neuronů s rychlou odpovědí $n=24$ (A) a neuronů s pomalou odpovědí $n=3$ (B).



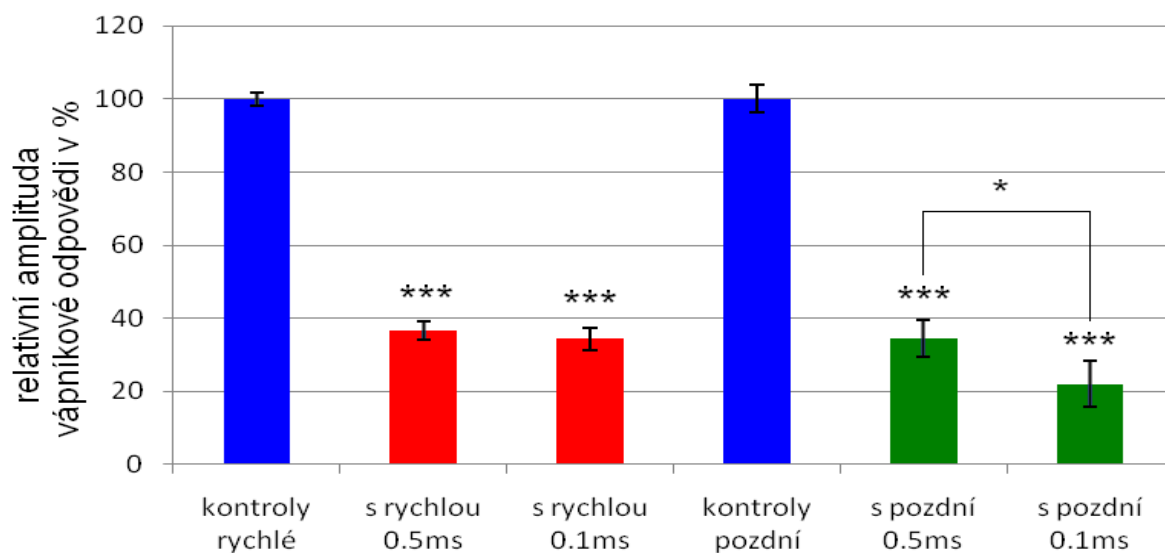
Graf 4. Průměrná hodnota amplitudy po stimulaci o délce pulzu 0,5ms.



Graf 5. Snímání stimulaci s délkou pulzu 0,5ms (A, B) a 0,1ms (C, D). Průměrné hodnoty amplitud neuronů s rychlou odpovědí $n=18$ (A,C) a neuronů s pomalou odpovědí $n=3$ (B,D).



Graf 6. Průměrná hodnota amplitudy po stimulaci o délce pulzu 0,5ms (A) a 0,1ms (B).



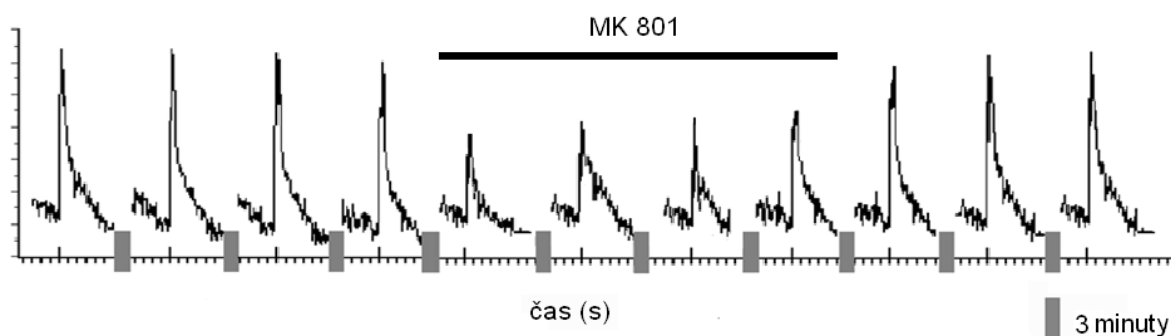
Graf 7. Rozdíl mezi poklesem průměrných odpovědí po stimulaci o délce pulzu 0,5ms a 0,1ms.

4.5.2. Antagonista NMDA receptorů

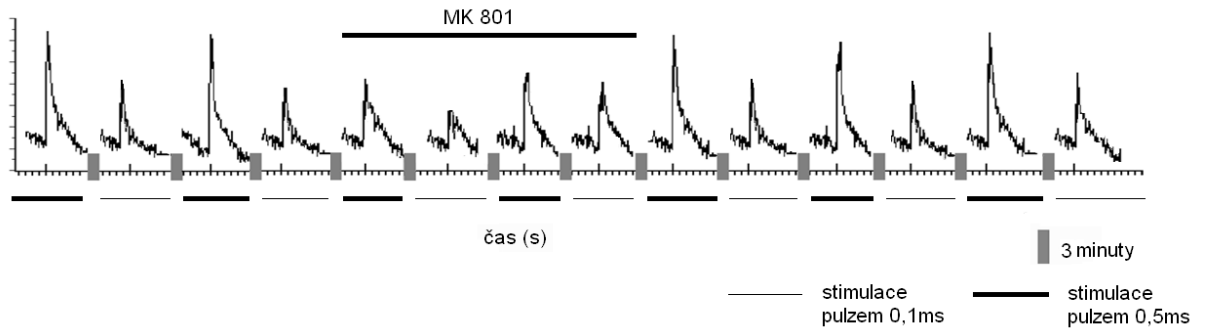
Druhým použitým antagonistou v našich předběžných pokusech byl MK 801. Záznam jednoho neuronu s rychlou odpovědí a aplikací MK 801 (45 μ M) po dobu 12 minut při stimulaci jen pulzem o délce trvání 0,5ms (Obrázek 31.) a záznam jednoho neuronu s rychlou odpovědí a aplikací MK 801 (45 μ M) po dobu 12 minut při střídavé stimulaci pulzy o délce trvání 0,5ms a 0,1ms (Obrázek 32.).

V první skupině experimentů byl použit při stimulaci skupiny neuronů pouze pulzem 0,5ms. Průměrná hodnota amplitudy vápníkové odpovědi po stimulaci o délce pulzu 0,5ms klesla při podání MK801 (45 μ M) oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o 46,24% \pm 4,21% (n=16) a ve skupině neuronů s pozdní odpovědí o 51,83% \pm 3,66% (n=2) (Graf 8.). Pokles u obou skupin je statisticky signifikantní na hladině P<0,001, rozdíl mezi skupinami není statisticky signifikantní (Graf 9.). Předběžné výsledky neuronů s pozdní odpovědí nemají velkou výpovědní sílu protože se v této skupině podařilo zaznamenat reakci pouze 2 neuronů.

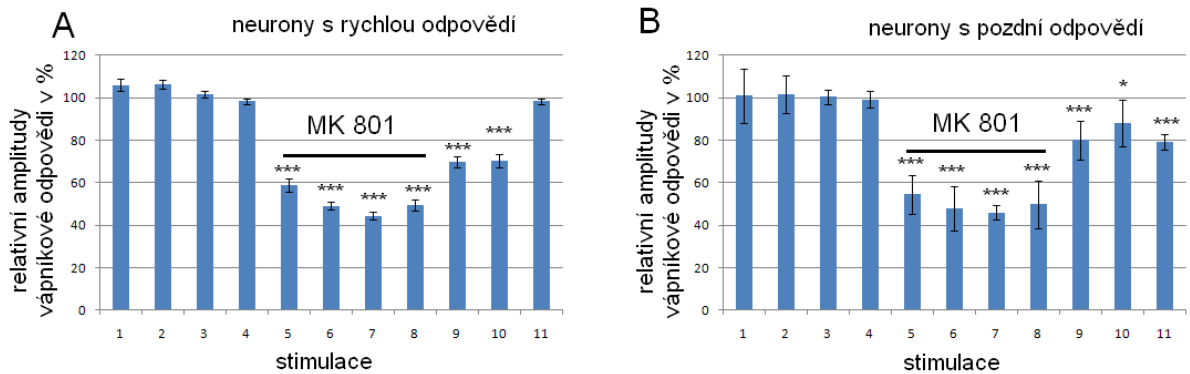
V dalších pokusech byl MK801 aplikován při střídavé stimulaci skupiny neuronů pulzem o délce trvání 0,5ms a 0,1ms. Po stimulaci o délce pulzu 0,5ms klesla průměrná hodnota amplitudy při podání MK801 oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o 56,24% \pm 4,21% (n=51) a ve skupině neuronů s pozdní odpovědí o 51,76% \pm 3,66% (n=6) (Graf 10. A a B). Pokles u obou skupin je statisticky signifikantní na hladině P < 0,001, rozdíl mezi skupinami není statisticky signifikantní (Graf 11. A). Po stimulaci o délce pulzu 0.1ms klesla průměrná hodnota amplitudy vápníkové odpovědi při podání MK801 oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o 48,24% \pm 4,21% (n=51) a ve skupině neuronů s pozdní odpovědí o 39,72% \pm 2,64% (n=6) (Graf 10. C a D). Pokles u obou skupin je statisticky signifikantní na hladině P < 0,001a také rozdíl mezi skupinami je statisticky signifikantní na hladině P < 0,05 (Graf 11. B).



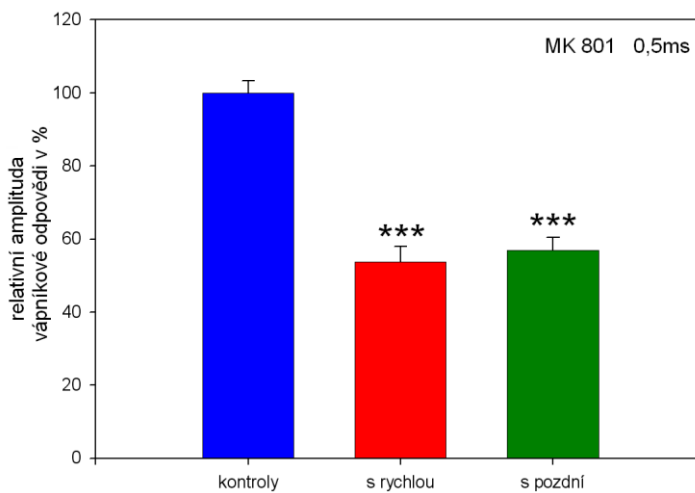
Obrázek 31. Vliv aplikace MK801 na synapticky evokované změny iCa^{2+} . Záznam jednoho neuronu s rychlou odpovědí a aplikací MK 801 (45 μ M) po dobu 12 minut (aplikace označena pruham) 30 sekundový záznam každé stimulace oddělená 3 minutovým intervalem pro rehabilitaci synapse (šedé obdelníky).



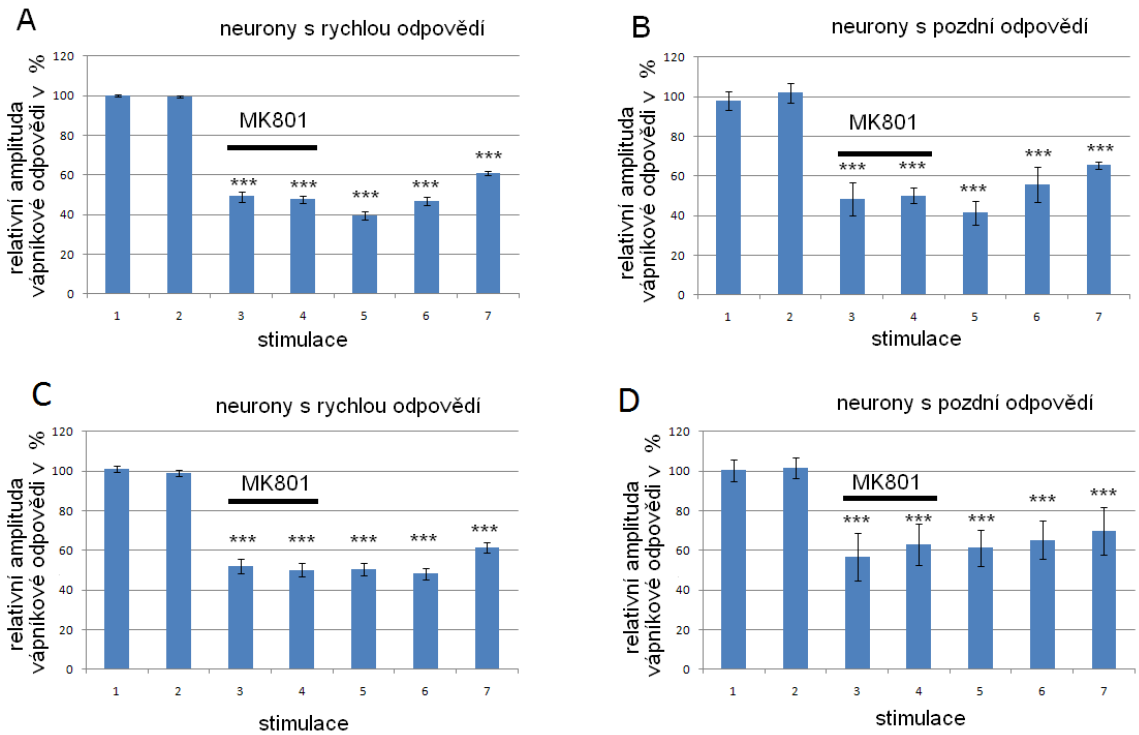
Obrázek 32. Vliv aplikace MK801 na synapticky evokované změny iCa^{2+} při střídání pulzu o délce 0,1ms a 0,5ms. Záznam jednoho neuronu s rychlou odpovědí a aplikací MK 801 ($45\mu M$) po dobu 12 minut (aplikace označena pruhem) 30 sekundový záznam každé stimulace oddělená 3 minutovým intervalem pro rehabilitaci synapse (šedé obdelníky).



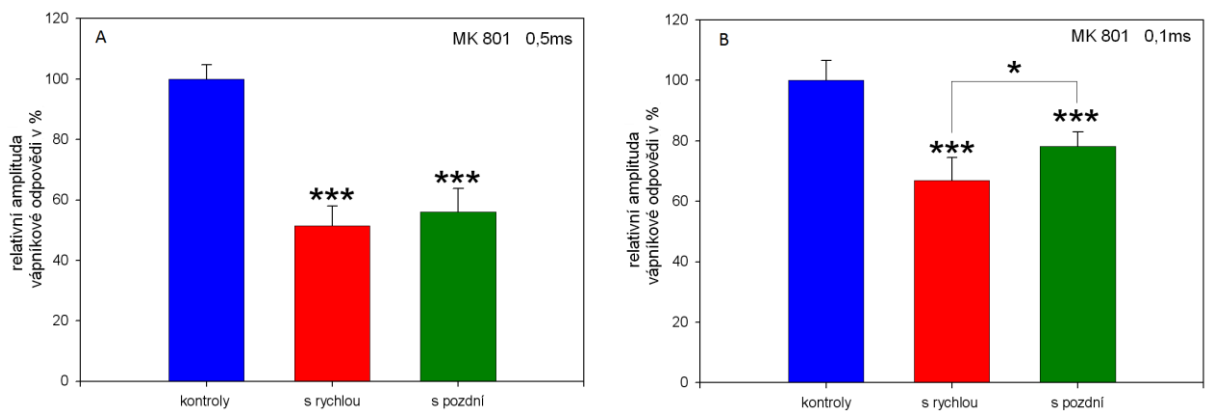
Graf 8. Snímání při stimulaci s délkou pulzu 0,5ms. Průměrné hodnoty amplitud neuronů s rychlou odpovědí $n=16$ (A) a neuronů s pomalou odpovědí $n=2$ (B).



Graf 9. Průměrná hodnota amplitudy po stimulaci o délce pulzu 0,5ms.



Graf 10. Snímání při stimulaci s délkou pulzu 0,5ms (A, B) a 0,1ms (C, D). Průměrné hodnoty amplitud neuronů s rychlou odpovědí $n=51$ (A,C) a neuronů s pomalou odpovědí $n=6$ (B,D).



Graf 11. Průměrná hodnota amplitudy po stimulaci o délce pulzu 0,5ms (A) a 0,1ms (B).

4.6. Vliv kapsaicinu na synaptický přenos v zadním rohu míšním

4.6.1. Aplikace kapsaicinu při stimulaci neuronů pulzem o délce trvání 0,5ms

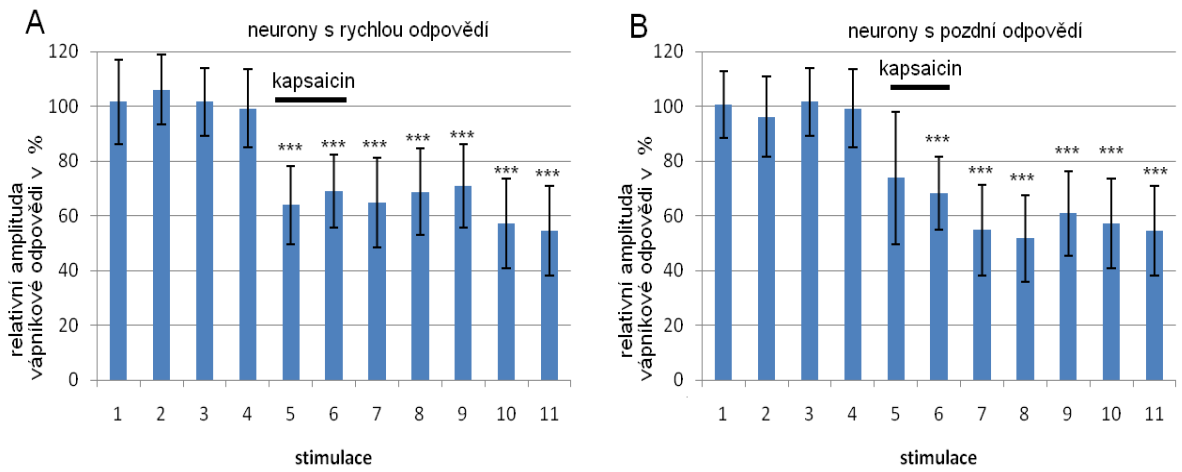
První pokusy s použitím kapsaicinu byly provedeny na neuronech zadního rohu míšního stimulovaných pouze pulzem o délce trvání 0,5ms. Aplikace kapsaicinu trvala vždy 6 minut a snímání neuronální aktivity pokračovalo vždy nejméně 15 minut po ukončení aplikace. Kapsaicin byl aplikován v různých koncentracích 1,5 μM ; 0,5 μM ; 0,25 μM a 0,125 μM . K desenzitizaci a poklesu amplitudy vápníkové odpovědi došlo u všech použitých koncentrací kapsaicinu. Pokles odpovědi ve většině případů přetrvával do ukončení pokusu.

Po podání kapsaicinu (1,5 μM) klesla průměrná hodnota amplitudy vápníkové odpovědi po stimulaci o délce pulzu 0,5ms oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o $34,60\% \pm 1,924\%$ (n=19) a ve skupině neuronů s pozdní odpovědí o $33,06\% \pm 3,68\%$ (n=5) (Graf 12.). Pokles u obou skupin je statisticky signifikantní na hladině $P < 0,001$, a rozdíl v poklesu mezi skupinami není statisticky signifikantní (Graf 16.).

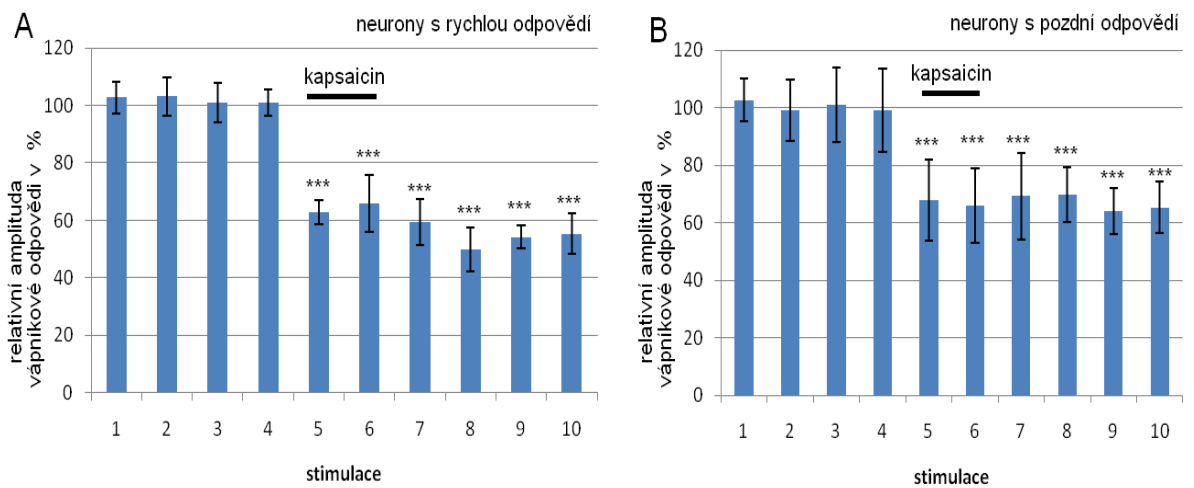
Průměrná hodnota amplitudy vápníkové odpovědi po podání kapsaicinu o koncentraci 0,5 μM (0,5 ms) klesla oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o $38,29\% \pm 1,48\%$ (n=47) a ve skupině neuronů s pozdní odpovědí o $29,38\% \pm 1,096\%$ (n=9) (Graf 13.). Pokles u obou skupin je statisticky signifikantní na hladině $P < 0,001$. Rozdíl v poklesu po podání kapsaicinu (0,5 μM) mezi skupinami je statisticky signifikantní, na hladině $P < 0,05$ (Graf 17.).

Po stimulaci o délce pulzu 0,5ms a podání kapsaicinu (0,25 μM) klesla průměrná hodnota amplitudy vápníkové odpovědi oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o $37,96\% \pm 2,09\%$ (n=54) a ve skupině neuronů s pozdní odpovědí o $33,08\% \pm 0,58\%$ (n=17) (Graf 14.). Pokles u obou skupin je statisticky signifikantní na hladině $P < 0,001$ a rozdíl mezi skupinami není statisticky signifikantní (Graf 18.).

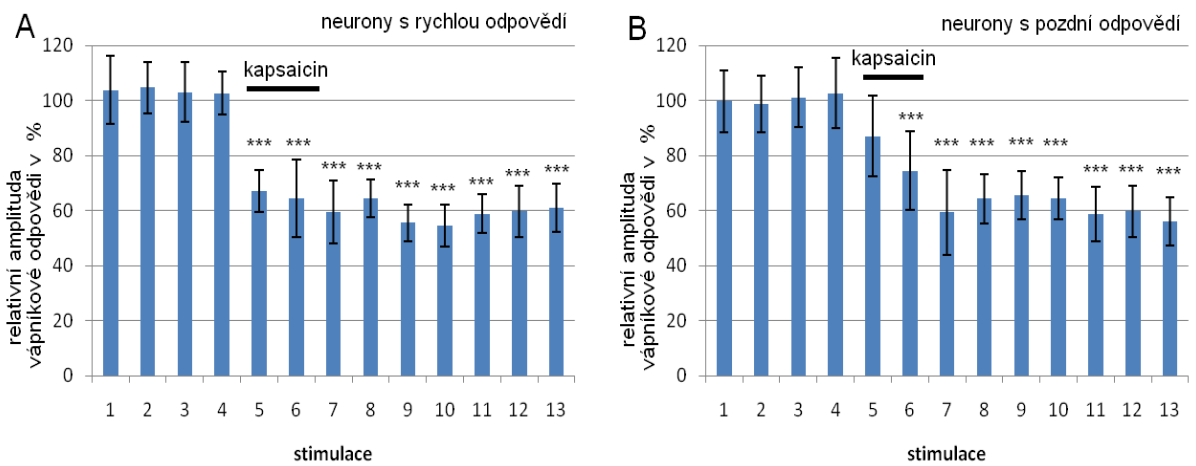
Průměrná hodnota amplitudy vápníkové odpovědi po stimulaci o délce pulzu 0,5ms klesla po podání kapsaicinu (0,125 μM) oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o $40,83\% \pm 3,89\%$ (n=8) a ve skupině neuronů s pozdní odpovědí o $51,05\% \pm 2,11\%$ (n=4) (Graf 15.). Rozdíl v poklesu mezi skupinami je statisticky signifikantní, na hladině $P < 0,05$. Pokles amplitud vápníkových odpovědí byl u této použité koncentrace kapsaicinu výraznější nežli tomu bylo u předchozích aplikací vyšších koncentrací (Graf 19.).



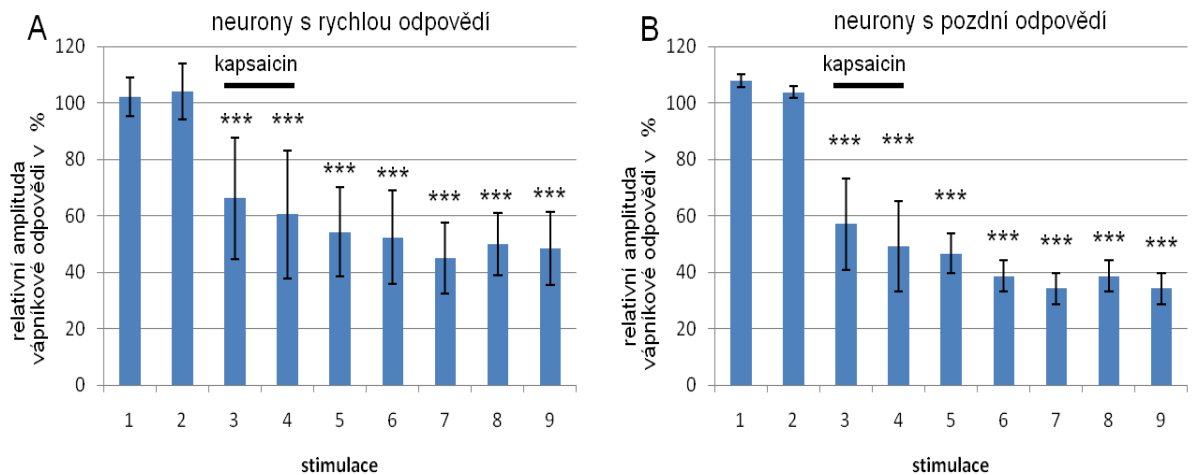
Graf 12. Snímání při stimulaci s délkou pulzu 0,5ms. Průměrné hodnoty amplitud neuronů s rychlou odpovědí $n=19$ (A) a neuronů s pomalou odpovědí $n=5$ (B). Aplikace kapsaicinu o koncentraci 1,5 μ M.



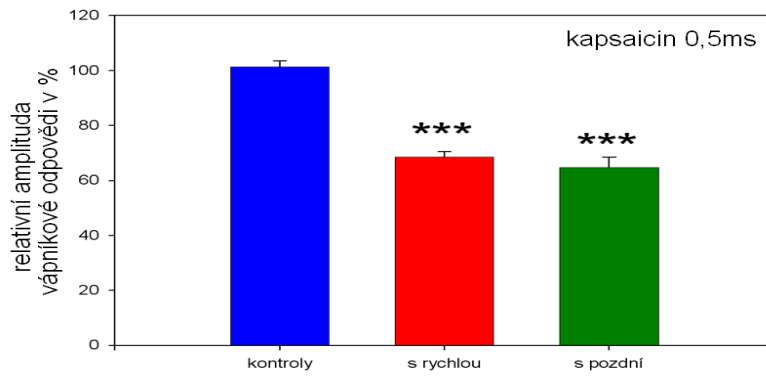
Graf 13. Snímání při stimulaci s délkou pulzu 0,5ms. Průměrné hodnoty amplitud neuronů s rychlou odpovědí $n=47$ (A) a neuronů s pomalou odpovědí $n=9$ (B). Aplikace kapsaicinu o koncentraci 0,5 μ M.



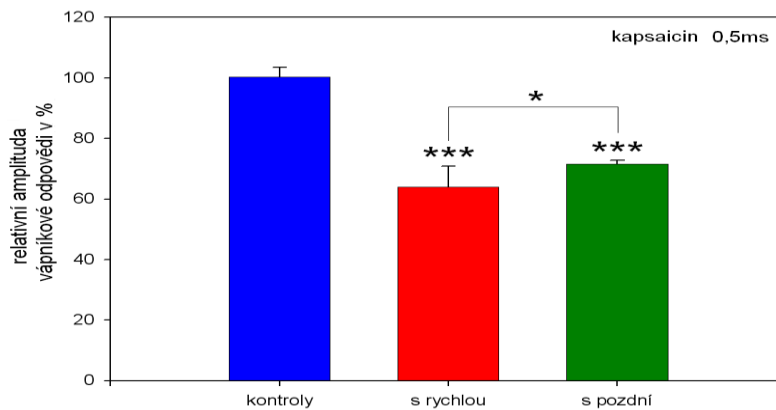
Graf 14. Snímání při stimulaci s délkou pulzu 0,5ms. Průměrné hodnoty amplitud neuronů s rychlou odpovědí $n=54$ (A) a neuronů s pomalou odpovědí $n=17$ (B). Aplikace kapsaicinu o koncentraci $0,25\mu\text{M}$.



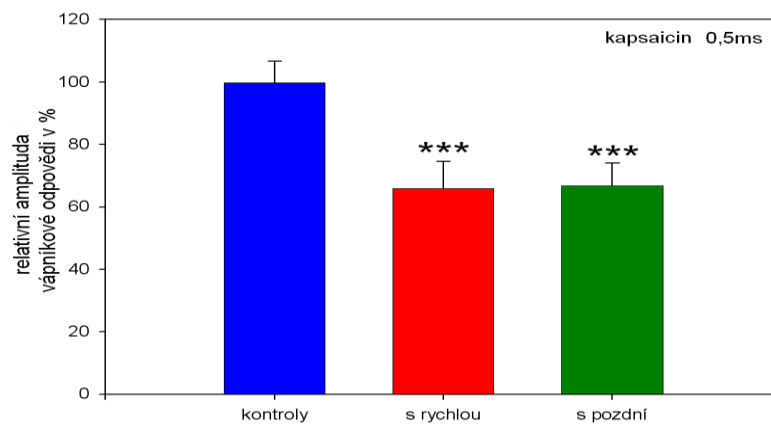
Graf 15. Snímání při stimulaci s délkou pulzu 0,5ms. Průměrné hodnoty amplitud neuronů s rychlou odpovědí $n=8$ (A) a neuronů s pomalou odpovědí $n=4$ (B). Aplikace kapsaicinu o koncentraci $0,125\mu\text{M}$.



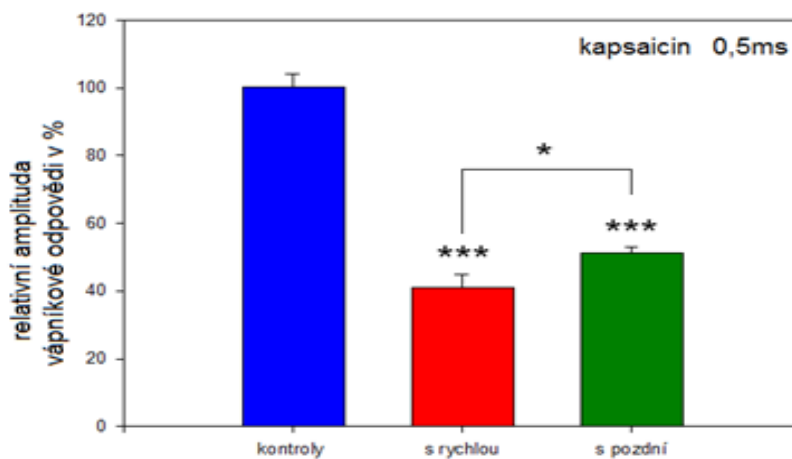
Graf 16. Porovnání poklesu u skupin po podání kapsaicinu ($1,5 \mu M$) a délce pulzu $0,5ms$.



Graf 17. Porovnání poklesu u skupin po podání kapsaicinu ($0,5 \mu M$) a délce pulzu $0,5ms$.



Graf 18. Porovnání poklesu u skupin po podání kapsaicinu ($0,25 \mu M$) a délce pulzu $0,5ms$.



Graf 19. Porovnání poklesu u skupin po podání kapsaicinu ($0,125 \mu M$) a délce pulzu $0,5ms$.

4.6.2. Vliv aplikace kapsaicinu při stimulaci neuronů oběma pulzy o délce trvání 0,5ms a 0,1ms

Další pokusy byly provedeny s použitím protokolu, při kterém byly neurony stimulovány střídavě pulzy o délce 0,5ms a 0,1ms. Takto byla stimulována střídavě preferenčně vlákna A (0,1ms) a vlákna A+C (0,5ms) periferních aferentních neuronů dohromady. Účinek kapsaicinu byl u krátké stimulace odlišný. Tento stimulační protokol byl proveden při aplikaci kapsaicinu o koncentracích 0,25 μM ; 0,125 μM ; 62nM; 30nM a 15nM. Snižování koncentrace kapsaicinu ukázalo, že pokles amplitudy vápníkové odpovědi, se slabě projevuje ještě při aplikaci 30nM kapsaicinu, ne však už při aplikaci 15nM roztoku kapsaicinu.

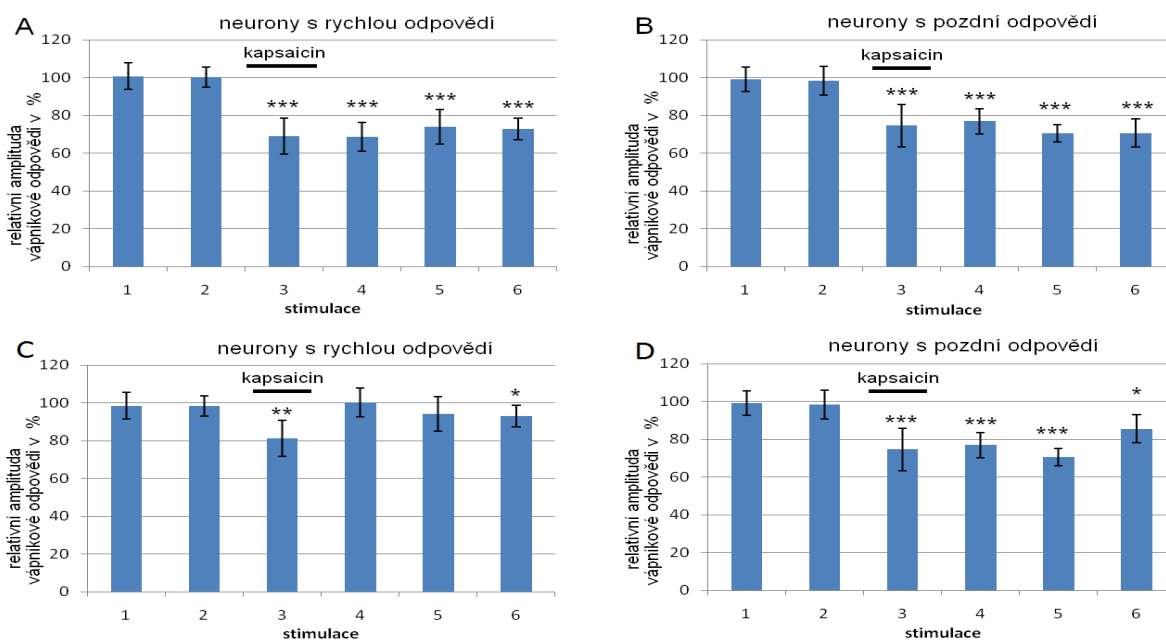
Po stimulaci o délce pulzu 0,5ms klesla průměrná hodnota amplitudy vápníkové odpovědi po podání kapsaicinu (0,25 μM) oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o 37,96% \pm 2,09% (n=40) a ve skupině neuronů s pozdní odpovědí o 33,08% \pm 4,58% (n=12) (Graf 20. A a B). Rozdíl v poklesu mezi skupinami není statisticky signifikantní. Průměrná hodnota amplitudy po stimulaci o délce pulzu 0,1ms klesla po podání kapsaicinu (0,25 μM) oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o 6,22% \pm 1,59% (n=40) a ve skupině neuronů s pozdní odpovědí o 21,85% \pm 2,42% (n=12) (Graf 20. C a D). Rozdíl v poklesu mezi skupinami je statisticky signifikantní, na hladině $P < 0,01$. Porovnání mezi skupinami neuronů s rychlými a pomalými odpověďmi stimulovanými pulzem o délce 0,1ms a 0,5ms mezi sebou. Rozdíl mezi skupinami neuronu s rychlými odpověďmi (0,5ms/0,1ms) je statisticky signifikantní na hladině $P < 0,01$, mezi skupinami neuronu s pozdními odpověďmi (0,5ms/0,1ms) je statisticky signifikantní na hladině $P < 0,05$ (Graf 25.).

Po podání kapsaicinu o koncentraci (0,125 μM) klesla průměrná hodnota amplitudy po stimulaci o délce pulzu 0,5ms oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o 45,96% \pm 3,68% (n=14) a ve skupině neuronů s pozdní odpovědí o 34,38% \pm 4,89% (n=6) (Graf 21. A a B). Pokles u obou skupin je statisticky signifikantní na hladině $P < 0,001$. Rozdíl v poklesu po podání kapsaicinu (0,125 μM ; 0,5ms) mezi skupinami je statisticky signifikantní, na hladině $P < 0,01$. Průměrná hodnota amplitudy po stimulaci o délce pulzu 0,1ms klesla po podání kapsaicinu (0,125 μM) oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o 44,71% \pm 2,21% (n=14) a ve skupině neuronů s pozdní odpovědí o 50,16% \pm 1,57% (n=6) (Graf 21. C a D). Pokles u obou skupin je statisticky signifikantní na hladině $P < 0,001$ a rozdíl mezi skupinami není statisticky signifikantní.

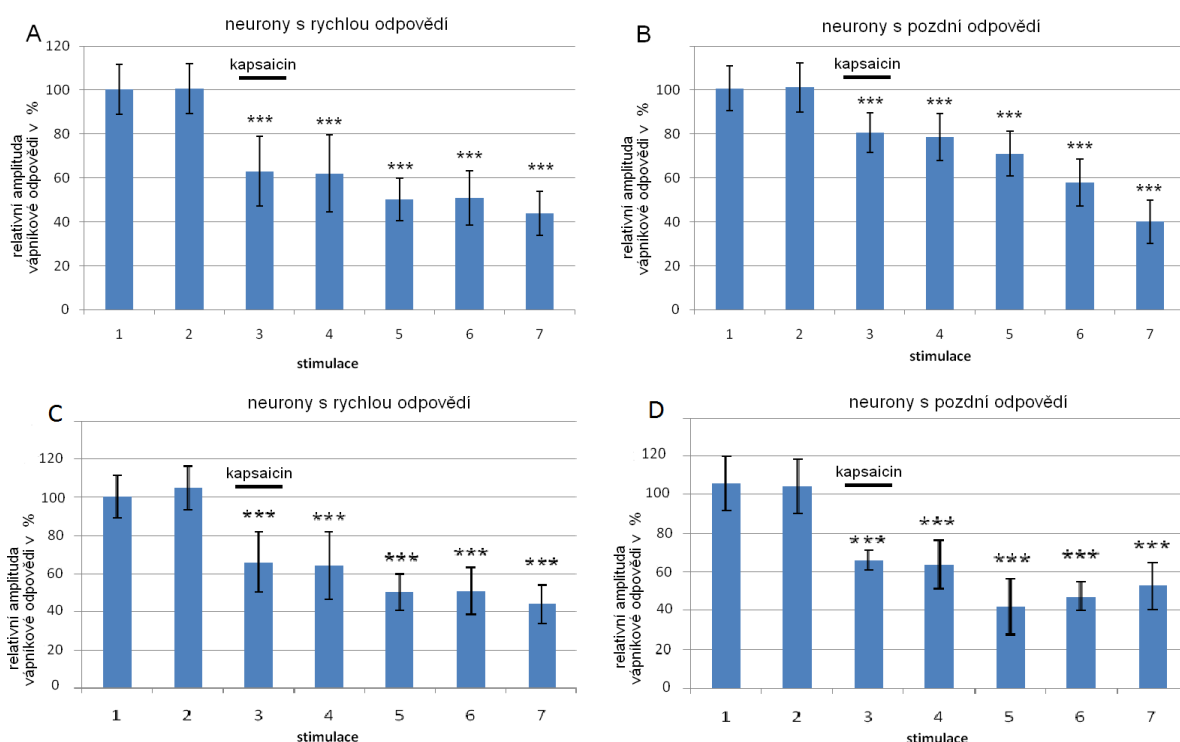
Po stimulaci o délce pulzu 0,5ms a po podání kapsaicinu (62 nM) klesla průměrná hodnota amplitudy vápníkové odpovědi oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o $47,34\% \pm 3,57\%$ (n=10) a ve skupině neuronů s pozdní odpovědí o $19,86\% \pm 3,71\%$ (n=15) (Graf 22. A a B). Pokles u skupiny neuronů s rychlou odpovědí je statisticky signifikantní na hladině $P < 0,001$. Pokles u skupiny neuronů s pozdní odpovědí je statisticky signifikantní na hladině $P < 0,01$. Rozdíl mezi skupinami je statisticky signifikantní na hladině $P < 0,01$ (Graf 26. A). Průměrná hodnota amplitudy po stimulaci o délce pulzu 0,1ms se změnila po podání kapsaicinu (62 nM) oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí klesla o $31,78\% \pm 2,54\%$ (n=10) a ve skupině neuronů s pozdní odpovědí narostla o $7,69\% \pm 2,36\%$ (n=15) (Graf 22. C a D). Pokles u skupiny neuronů s rychlou odpovědí je statisticky signifikantní na hladině $P < 0,001$. Nárůst u skupiny neuronů s pozdní odpovědí není statisticky signifikantní. Rozdíl mezi skupinami je statisticky signifikantní na hladině $P < 0,001$ (Graf 26. B).

Po podání kapsaicinu (30 nM) klesla průměrná hodnota amplitudy po stimulaci o délce pulzu 0,5ms oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o $16,54\% \pm 1,09\%$ (n=25) a ve skupině neuronů s pozdní odpovědí o $11,66\% \pm 1,75\%$ (n=6) (Graf 23. A a B). Pokles u obou skupin je statisticky signifikantní na hladině $P < 0,05$ a rozdíl mezi skupinami není statisticky signifikantní. Průměrná hodnota amplitudy po stimulaci o délce pulzu 0,1ms klesla po podání kapsaicinu (30 nM) oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o $17,24\% \pm 1,09\%$ (n=25) a ve skupině neuronů s pozdní odpovědí o $10,28\% \pm 2,01\%$ (n=6) (Graf 23. C a D). Pokles u obou skupin je statisticky signifikantní na hladině $P < 0,05$ a rozdíl mezi skupinami není statisticky signifikantní.

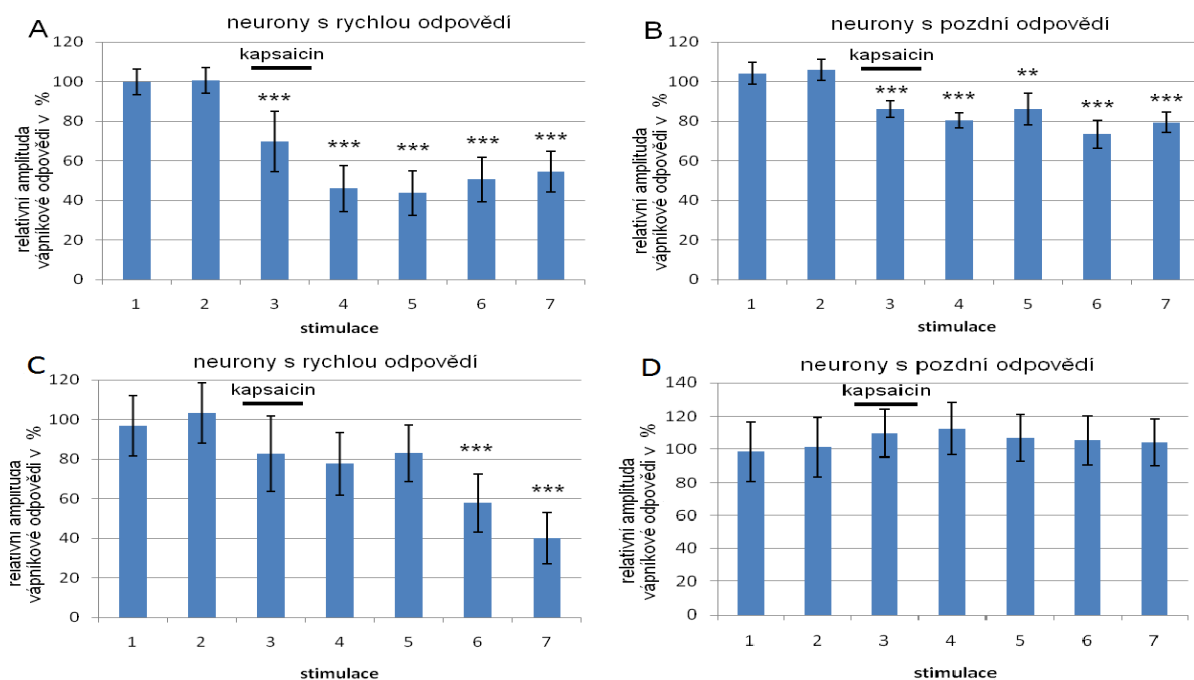
Průměrná hodnota amplitudy po stimulaci o délce pulzu 0,5ms a aplikaci kapsaicinu (15 nM) se oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí (n=27) ani ve skupině neuronů s pozdní odpovědí (n=7) signifikantně nelyšila (Graf 24. A a B). Průměrná hodnota amplitudy vápníkové odpovědi po stimulaci o délce pulzu 0,1ms se také oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí ani ve skupině neuronů s pozdní odpovědí signifikantně nelyšila (Graf 24. C a D; Graf 27).



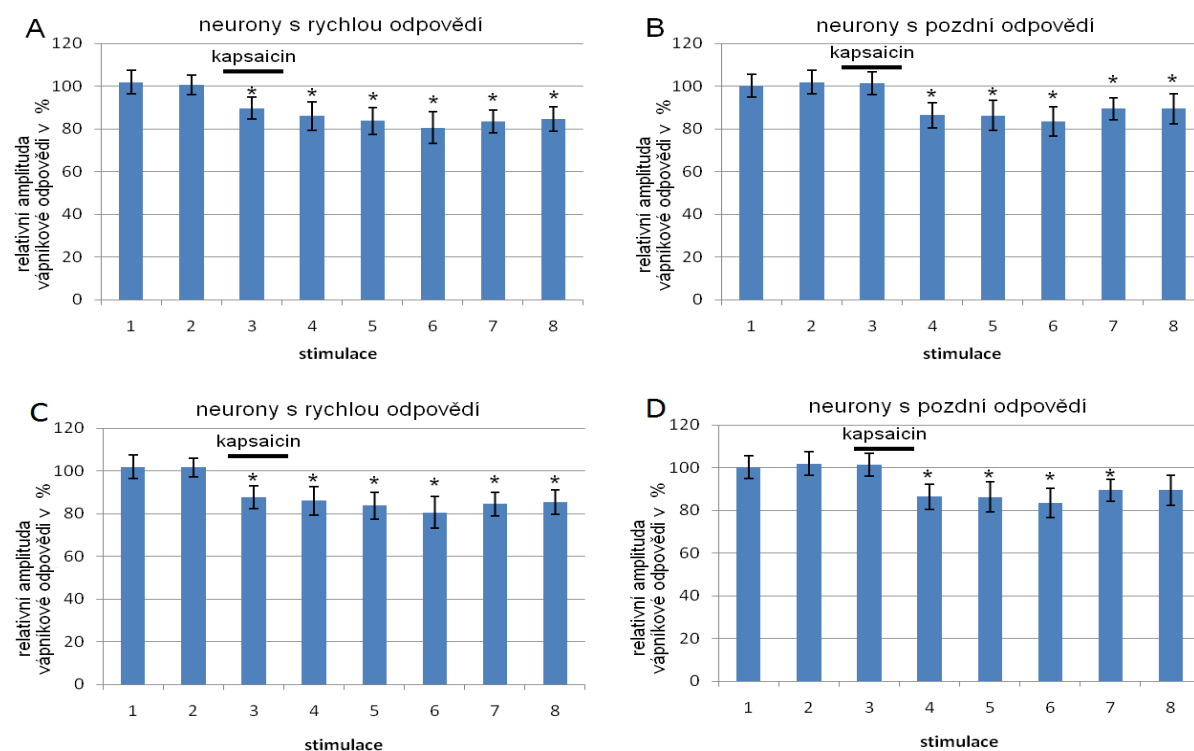
Graf 20. Snímání při stimulaci s délkou pulzu 0,5ms (A a B) a 0.1ms (C a D). Průměrné hodnoty amplitud neuronů s rychlou odpovědí $n=40$ (A a C) a neuronů s pomalou odpovědí $n=12$ (B a D) Aplikace kapsaicinu o koncentraci $0,25\mu\text{M}$.



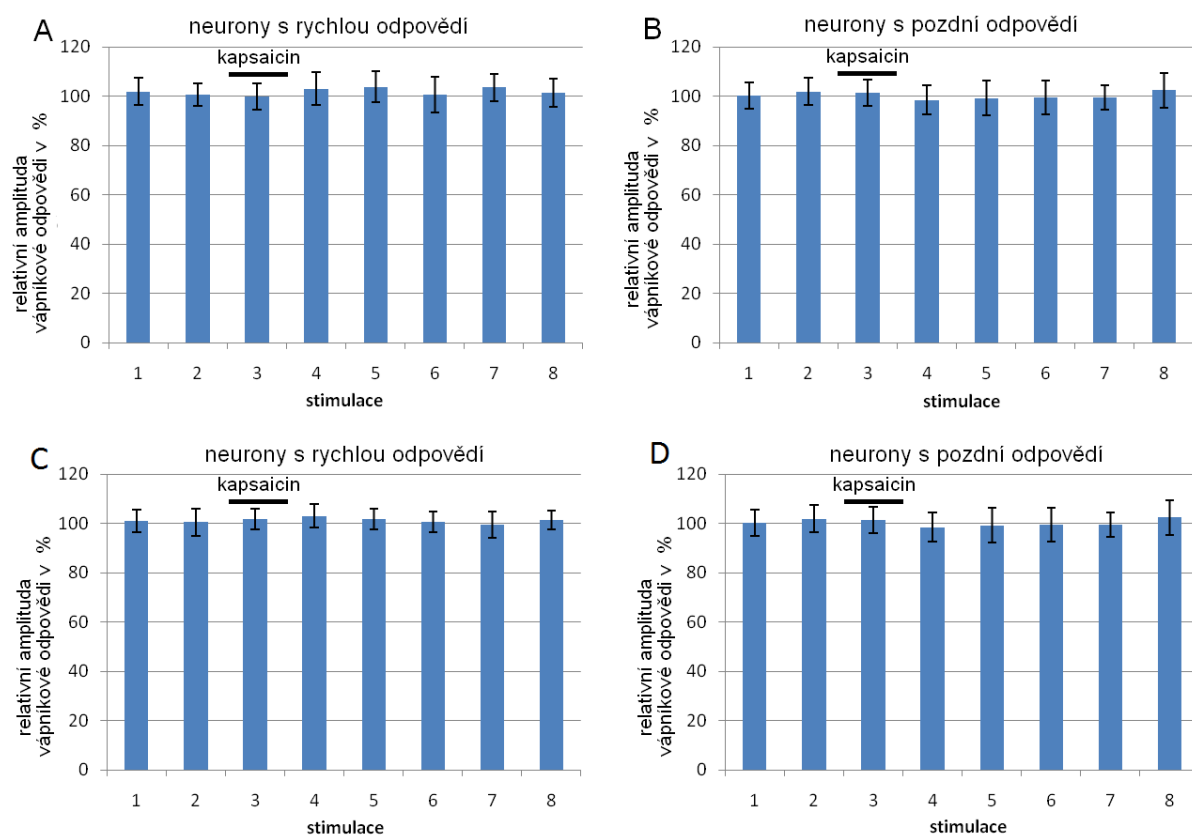
Graf 21. Snímání při stimulaci s délkou pulzu 0,5ms (A a B) a 0.1ms (C a D). Průměrné hodnoty amplitud neuronů s rychlou odpovědí $n=14$ (A a C) a neuronů s pomalou odpovědí $n=6$ (B a D.) Aplikace kapsaicinu o koncentraci $0,125\mu\text{M}$.



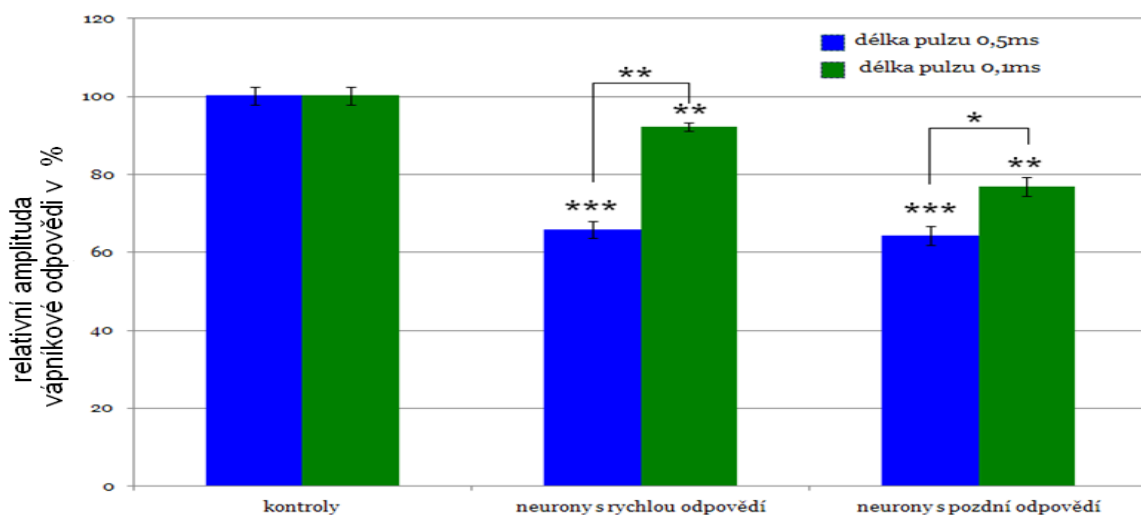
Graf 22. Snímání při stimulaci s délkou pulzu 0,5ms (A a B) a 0.1ms (C a D). Průměrné hodnoty amplitud neuronů s rychlou odpovědí $n=10$ (A a C) a neuronů s pomalou odpovědí $n=15$ (B a D). Aplikace kapsaicinu o koncentraci 62nM.



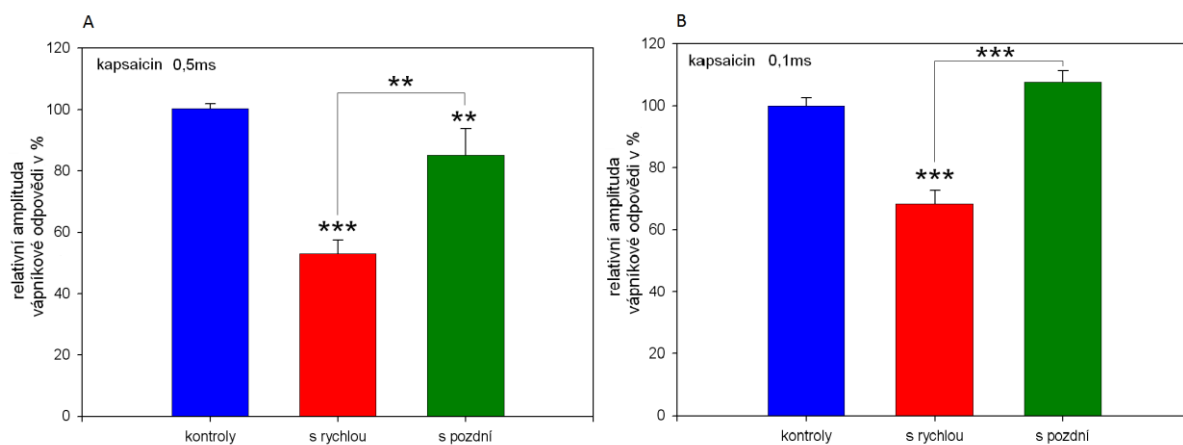
Graf 23. Snímání při stimulaci s délkou pulzu 0,5ms (A a B) a 0.1ms (C a D). Průměrné hodnoty amplitud neuronů s rychlou odpovědí $n=25$ (A a C) a neuronů s pomalou odpovědí $n=6$ (B a D). Aplikace kapsaicinu o koncentraci 30nM.



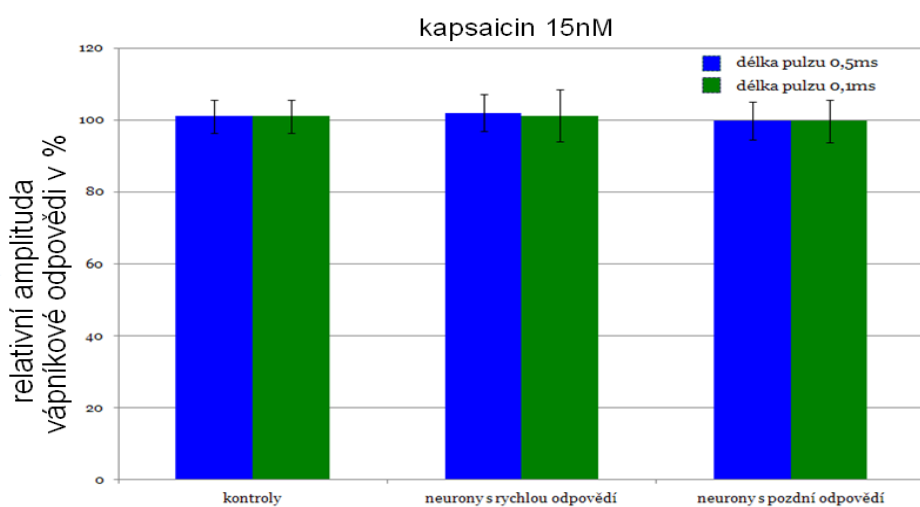
Graf 24. Snímání při stimulaci s délkou pulzu 0,5ms (A a B) a 0.1ms (C a D). Průměrné hodnoty amplitud neuronů s rychlou odpovědí $n=27$ (A a C) a neuronů s pomalou odpovědí $n=7$ (B a D). Aplikace kapsaicinu o koncentraci 15nM.



Graf 25. Porovnání mezi skupinami stimulovanými pulzem o délce 0,1ms a 0,5ms.



Graf 26. Porovnání poklesu u skupin rychlých a pozdních odpovědí po podání kapsaicinu (62nM) a délce pulzu 0,5ms (A) a délce pulzu 0,1ms (B).



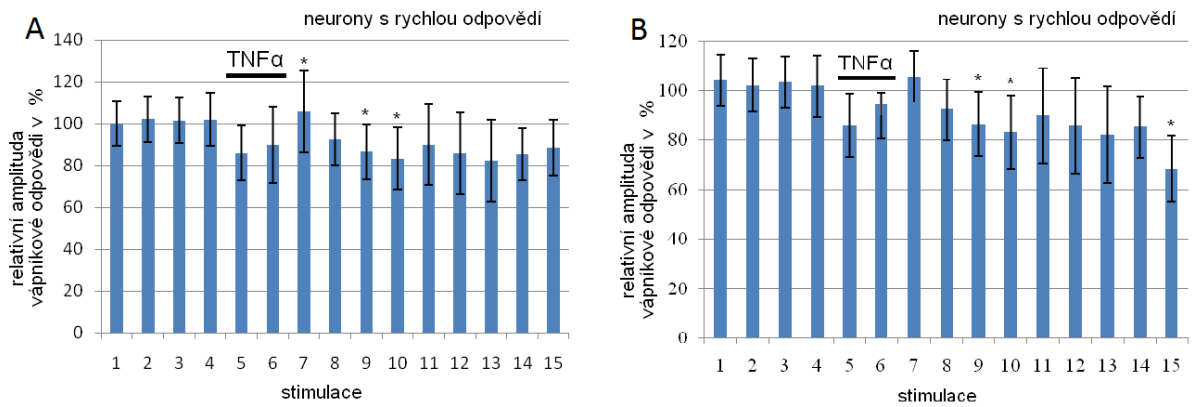
Graf 27. Porovnání mezi skupinami po podání kapsaicinu 15nM stimulovanými pulzem o délce 0,1ms a 0,5ms.

4.7. Vliv aplikace látek modulujících synaptický přenos (TNF α , PMA a Bradykininu) na vápníkovou odpověď neuronů při stimulaci zadních kořenů

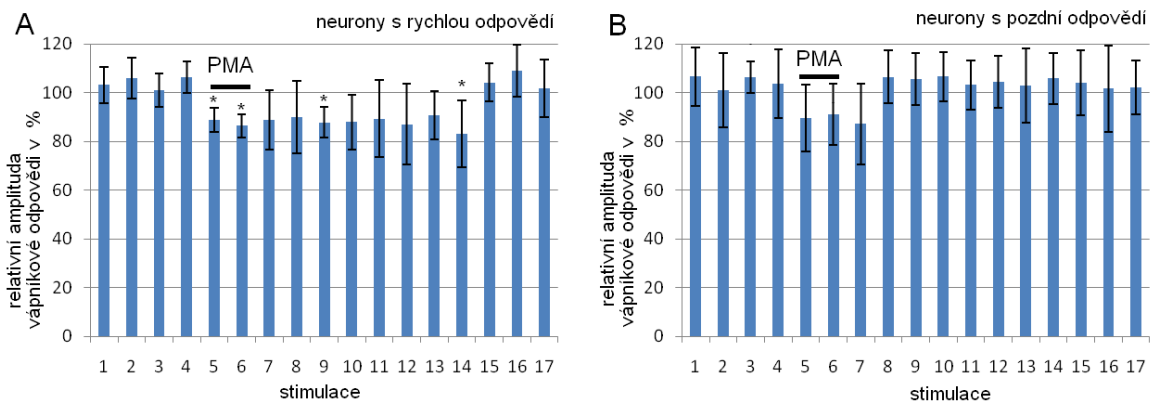
V dalších pokusech jsme provedli testování vlivu látek na amplitudu vápníkové odpovědi neuronů při stimulaci zadních kořenů. První z těchto látek byl TNF α . TNF α byl v pokusech použit ve dvou koncentracích 6nM a 0,6nM. Neuronů byly stimulovány pouze pulzem o délce 0,5ms. Průměrná hodnota amplitudy po stimulaci klesla po podání TNF α (6nM) oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o 10,76% \pm 5,634% (n=11) a u neuronů s pozdní odpovědí o 8,308% (n=1) (Graf 28. A). Ve skupině neuronů s rychlou odpovědí se objevil malý nárůst v 6. minutě aplikace TNF α (6nM) a ve stimulaci 3min po jejím skončení. Průměrná hodnota amplitudy vápníkové odpovědi klesla po podání TNF α (0,6nM) oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o 13,25% \pm 1,49% (n=5) a u neuronů s pozdní odpovědí o 4,44% (n=1) (Graf 28. B). Statistické vyhodnocení bylo provedeno pouze u skupin neuronů s rychlou odpovědí, neboť neuron s pozdní odpovědí byl u každé testované koncentrace zaznamenán pouze jeden. Rozdíl po podání TNF α o koncentraci 6nM a 0,6nM není signifikantní.

Další testovanou látkou bylo PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) o koncentraci 1 μ M skupina neuronů byla stimulovaná pouze pulzem o době trvání 0,5ms. Průměrná hodnota amplitudy klesla po podání PMA oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o 15,63% \pm 1,24% (n=27) a ve skupině neuronů s pozdní odpovědí o 8,42% \pm 1,98% (n=5) (Graf 29.). Rozdíl v poklesu po podání PMA (1 μ M) mezi skupinami není statisticky signifikantní.

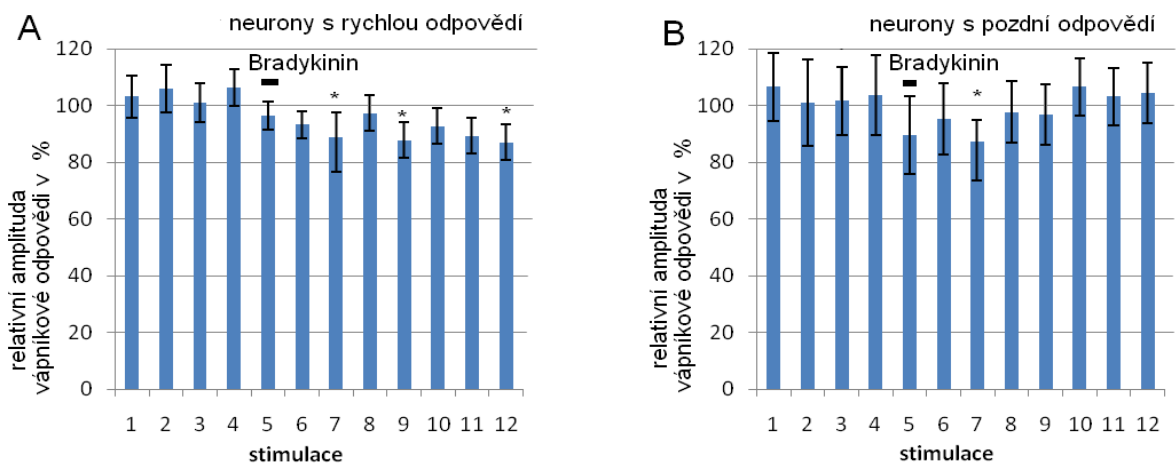
Poslední námi v pokusech použitou látkou byl bradykinin o koncentraci 10 μ M, skupina neuronů byla stimulovaná pouze pulzem o době trvání 0,5ms aplikovaný po dobu 3 minut. Průměrná hodnota amplitudy klesla po podání bradykinin oproti kontrolním stimulacím ve skupině neuronů s rychlou odpovědí o 8,63% \pm 4,24% (n=30) a ve skupině neuronů s pozdní odpovědí o 12,42% \pm 4,98% (n=5) (Graf 30.). Rozdíl v poklesu po podání bradykininu (10 μ M) mezi skupinami není statisticky signifikantní.



Graf 28. Průměrné hodnoty amplitud neuronů s rychlou odpovědí po aplikaci TNF α v koncentraci 6nM (A) $n=11$ a 0,6nM (B) $n=5$.



Graf 29. Snímání při stimulaci s délkou pulzu 0,5ms. Průměrné hodnoty amplitud neuronů s rychlou odpovědí $n=27$ (A) a neuronů s pomalou odpovědí $n=5$ (B). Při aplikaci PMA ($1\mu\text{M}$).



Graf 30. Snímání při stimulaci s délkou pulzu 0,5ms. Průměrné hodnoty amplitud neuronů s rychlou odpovědí $n=30$ (A) a neuronů s pomalou odpovědí $n=5$ (B). Při aplikaci bradykininu ($10\mu\text{M}$)

5. Diskuze výsledků

V této práci jsem se použila techniku calcium imagingu na akutních míšních řezech pro studium aktivity neuronů superficiálních vrstev zadního rohu míchy po elektrické stimulaci zadního kořene míchy. Experimenty jsem prováděla na míšních neuronech v řezech z lumbální oblasti vstupu periferních aferentních vláken ze zadních končetin. Rychlá extrakce a precizní příprava transverzálních řezů byla základem pro úspěšný průběh pokusu. Důraz byl také kladen na neporušenost zadních kořenů. Pro snímání vápníkových změn uvnitř živých buněk jsme použili vápníkovou sondu FLUO-4, molekulu reagující na vazbu vápenatých iontů změnou intenzity fluorescenčního signálu. Fluo-4. Odpovědi jsme analyzovali podle intenzity emitovaného světla, což odráží intracelulární koncentraci Ca^{+2} v neuronech. V našich pokusech jsme vycházeli z pokusů (Sojka, 2010), kde byly stanoveny některé základní parametry například odlišení neuronů od gliových buněk. Metodu jsme adaptovali pro použití na konvenčním fluorescenčním mikroskopu.

Po nabarvení akutních míšních řezů vápník senzitivním indikátorem Fluo-4 je možné zaznamenat změny v intracelulární koncentraci volných vápenatých iontů při použití konvenčního fluorescenčního mikroskopu. Stimulací (10Hz, 3mA, po dobu 1s s délkou pulzu 0,5ms) primárních aferentních vláken lze vyvolat v řadě neuronů zadního rohu zvýšení $[\text{c}]\text{iCa}^{2+}$. Neurony v našich pokusech na stimulaci odpovídaly dvěma odlišnými průběhy (rychlým a pozdním) změn $[\text{c}]\text{iCa}^{2+}$. Aplikace antagonistů AMPA/NMDA receptorů vede k výraznému snížení vápníkových odpovědí. Aplikace kapsaicinu vede za našich podmínek ke snížení odpovědí u neuronů zadního rohu míchy na stimulaci. Předběžné pokusy a aplikací neuromodulačních látek $\text{TNF}\alpha$, PMA a Bradykininu vedly za našich podmínek ke snížení odpovědí u neuronů zadního rohu míchy na stimulaci zadního kořene. Celkově naše výsledky ukázaly, že metoda calcium imagingu na konvenčním fluorescenčním mikroskopu je použitelná pro sledování aktivity neuronálních populací v akutních míšních řezech *in vitro*.

5.1. Synapticky evokované změny koncentrace intracelulárních vápenatých iontů vyvolané elektrickou stimulací zadních kořenů míchy

Stimulace zadního kořene v našich pokusech vyvolala dva zřetelně odlišné časové průběhy koncentračních změn intracelulárních vápenatých iontů v tělech postsynaptických neuronů. Jednalo se zaprvé o odpověď na stimulaci s rychlým průběhem, kdy neurony

vykazovaly nárůst koncentrace intracelulárních vápenatých iontů během stimulace a maximální amplitudu vápníkové odpovědi ihned po ukončení stimulace, podobně jak již bylo ukázáno (Lou et al., 2008). Tento typ odpovědi byl přítomen u 85,42% odpovědí. U menší populace neuronů jsme zaznamenali odpověď na stimulaci s opožděným průběhem, ta byla charakterizována maximální změnou koncentrace intracelulárních vápenatých iontů až několik sekund po ukončení stimulace. Tyto výsledky odpovídají předchozím pokusům provedeným za obdobných podmínek na konfokálním mikroskopu (Sojka, 2010). V našich pokusech jsme použili konvenční fluorescenční mikroskop, na rozdíl od předchozích pokusů, které byly prováděny na konfokálním mikroskopu. I když konvenční mikroskop neposkytuje kontrolu nad tím, ze které vrstvy řezu je možné snímat fluorescenční signál a je tak snížena prostorová diskriminace signálu, za našich podmínek umožňoval zejména rychlejší snímání signálu. To bylo důležité pro lepší časové rozlišení signálu. Také signál byl ze všech neuronů na řezu snímán v jeden okamžik, na rozdíl od konfokálního mikroskopu, kde během jednoho snímku docházelo ke skenování zorného pole. Pro naši práci byla rozhodující také dobrá dostupnost mikroskopu, na rozdíl od sdíleného konfokálního přístroje.

V našich pokusech jsme sledovali změny koncentrace v somatech neuronů po synaptické aktivaci navozené stimulací zadních kořenů míšních (Connor a Pozzo-Miller, 2003). Jak jsme ukázali, tato aktivace byla závislá na aktivaci glutamátových receptorů. Předpokládáme tedy, že došlo po aktivaci glutamátových receptorů k depolarizaci membrány a následně ke vzniku akčního potenciálu u snímaného neuronu. V našich pokusech byly snímány změny v $[c]iCa^{2+}$ způsobené zejména dvěma hlavními zdroji vápenatých iontů. Předpokládáme, že většina vápenatých iontů se do intracelulárního prostoru dostala během depolarizace membrány přes napětově závislé vápníkové kanály při průchodu akčního potenciálu neuronem (Miyakawa et al., 1992). To bylo prokázáno například v experimentech zkoumajících roli napětově závislých vápenatých kanálů s nespecifickými blokátory, a kde bylo zjištěno, že dominantní roli v tomto postsynaptické zvýšení koncentrace Ca^{2+} hrají napětově závislé kanály N-typu (Heinke et al., 2004). Další významnou složku hrál v našich pokusech pravděpodobně vápník uvolňovaný z intercelulárních zdrojů jako je endoplazmatické retikulum nebo mitochondrie. Tento zdroj vápenatých iontů se uplatnil pravděpodobně zejména u pozdního typu odpovědi, jak bylo prokázáno dříve (Sojka, 2010). Naše výsledky tedy naznačují, že při nociceptivním

přenosu v zadním rohu míšním se mohou uplatňovat obě možnosti a podílet se tak také na modulaci synaptického přenosu.

Rozdílný časový průběh koncentračních změn somatického vápníku v neuronech jako odpověď neuronů na stimulaci může být zapříčiněna řadou mechanismů. Asi nejdůležitějším je právě zdroj vápenatých iontů. Jak již bylo řečeno u většiny neuronu tvoří majoritní podíl rychlé složky vápníkové odpovědi právě vápník z extracelulárního prostředí a intracelulární zdroje se na zvýšení koncentrace podílejí pravděpodobně jen minimálně. Tak je tomu zřejmě i u neuronů s rychlou odpovědí, které tvoří 85,42% pozorovaných neuronů. Vtokem vápenatých iontů přes napěťově závislé kanály při akčním potenciálu ale není možné snadno vysvětlit vzestup koncentrace vápenatých iontů u neuronů s pozdní odpovědí. U nichž nastává, maximální zvýšení koncentrace vápenatých iontů uvnitř buňky až několik sekund po ukončení stimulace, tedy po ukončení průchodu akčního potenciálu i depolarizace membrány. Jako možné vysvětlení se zdá, že většinu tvoří vápenaté ionty z intracelulárních zásobáren, jako je hlavně endoplazmatické retikulum, které také dokáže Ca^{2+} do cytoplazmy uvolnit. Děje se tak zejména dvěma hlavními vápníkovými kanály IP3 receptorem a ryanodinovým receptorem (RyR) (Allbritton et al., 1992). Oba jsou distribuovány na ER ve velkém počtu a jsou si strukturně podobné. RyR mohou být aktivovány i přímo volnými Ca^{2+} ionty nacházejícími se v cytoplazmě. Díky tomu jsou hlavním buněčným mediátorem vápníkem (iCa^{2+}) indukovaného uvolňování vápníku (CICR) v živočišných buňkách. CICR by mohl pozdní odpovědi částečně vysvětlit (Shmigol et al., 1996). IP3R je další kanál ER působící jako Ca^{2+} kanál, jeho aktivita je také kontrolována hladinou volných cytosolických vápenatých iontů. IP3R je však odpovědný za výlev vápníku z ER v reakci na otevření plazmatických metabotropních receptorů reagujících na glutamát a neuropeptidy (Verkhratsky, 2005). Předpokládá se že metabotropní glutamátové receptory (mGluRs) mohou být aktivovány dodatečně glutamátem ze synapse inervované C vlákny. Stimulace C vláken také vede k uvolňování neuropeptidů jako substance P a neurokinin A na které mohou IP3Rs a RyRs reagovat a semitizovat se. Uvolňování vápenatých iontů z intracelulárních zdrojů tedy reaguje více na stimulaci C vláken a na receptory s pomalejší kinetikou což by pozdní odpovědi mohlo také vysvětlovat. Pravděpodobnost otevření IP3Rs a RyRs se zvyšuje s cytosolickou koncentrací vápenatých iontů (Verkhratsky a Toescu, 2003). Jiným vysvětlením pro pozdní odpovědi by mohl být tzv. after-discharge. V pokusech in vivo bylo ukázáno, že stimulace periferních nervů vede nejen k aktivitě míšních neuronů během

stimulace (pálení akčních potenciálů), ale často také k přetrvávání aktivity po ukončení stimulace. Tento takzvaný after-discharge je patrný zejména při stimulaci odpovídající aktivaci C-vláken. Jestliže akční potenciály na neuronech vznikaly během našich pokusů i po ukončení stimulace, a neuron je tedy aktivní déle, mohlo tak dojít k časovému posunu maxima amplitudy vápníkové odpovědi a zvýšení amplitudy $[Ca^{2+}]_i$ (Ikeda 2000).

Dalším možným vysvětlením přispívajícím k pozdní odpovědi může být zapojení interneuronů. Je nutné si uvědomit, že v tkáňovém řezu jaký jsme použili v našich pokusech je do přenosu informace aktivně zapojena celá neuronální síť, což znamená, že při stimulaci nedochází pouze k monosynaptickému spojení ale může dojít i k aktivaci a modulaci přes celou síť interneuronů. Předpokládá se, že zpoždění způsobené interneurony může činit až několik desítek milisekund. Dalším důvodem, který by se mohl podílet na pozdní odpovědi a nemůžeme ho zcela vyloučit je špatný metabolický stav jednotlivých neuronů a tím narušení jejich procesů vedoucích k homeostaze jejich vnitřního prostředí. Vzhledem k tomu, že neurony z pozdní odpovědi byly většinou přítomny na řezu i s populací neuronů z rychlou odpovědi a že charakter odpovědi byl ovlivnitelný délkou stimulačního pulzu a pozdní odpovědi byly stabilní můžeme tuto příčinu s velkou pravděpodobností vyloučit.

5.2. Závislost vápníkové odpovědi na délce stimulačního pulzu – diferenciální stimulace zadního kořenu míšního

Složení zadního kořene je velmi podobné složení periferních nervů, s tím že jsou zde přítomná pouze senzoričká vlákna, centrální výběžky neuronů spinálních ganglií. Zadní kořen se tedy skládá z řady nervových vláken, jak bylo popsáno v úvodu práce. Pro naše pokusy jsme proto využili vlastnosti periferních nervových vláken kdy je známo, že aktivace nervových vláken je závislá na délce trvání stimulačního pulzu. Bylo prokázáno, že stimulací o délce pulzu 0.1ms jsou preferenčně aktivovaná myelinizovaná A vlákna (nejen A δ ale hlavně silně myelinizovaná vlákna A β která nemají s nociceptivní signalizací za normálních okolností nic společného). Zatímco pulzem o délce půl milisekundy lze aktivovat vlákna obojího typu A i nemyelinizovaná C vlákna (Miyakawa et al., 1992). Proto jsme mohli preferenčně stimulací oddělit tyto dvě skupiny A a A+C, vláken při zachování stejné intenzity stimulace (proud 3mA a frekvenci 10Hz). V mých pokusech

jsem použila oba tyto dva rozdílné stimulační protokoly. Stimulaci dlouhým i krátkým pulzem. Již dříve bylo prokázáno že, k aktivaci C vláken je potřeba mnohem intenzivnější (delší) stimulace než jaké je potřeba u A vláken (Purves, 2001). V našich podmínkách ale snížení intenzity stimulace by mohlo vést k aktivaci menšího počtu nervových vláken díky menšímu šíření stimulačního proudu ze stimulační elektrody. Proto pouhou změnou délky trvání stimulačního pulzu jsme mohli tyto dvě populace preferenčně oddělit, ostatní parametry stimulace zůstaly zachovány.

Podíl neuronů s rychlou a pozdní odpovědí zůstal přibližně stejný u použití krátkého i dlouhého stimulačního pulzu. K mírnému, ne však signifikantnímu nárůstu, došlo u stimulace pulzem o délce trvání 0.1ms, což je v rozporu s naším předpokladem, že stimulace C vláken spíše indukuje výlev z intracelulárních zásobáren více než stimulace A vláken. Tyto rozpory mohou být způsobeny i poměrně nízkým počtem neuronů s pozdní odpovědí, testovaných oběma délkami stimulačního pulzu. Také preferenční aktivace jednotlivých skupin nervových vláken (A, C) nemusí vždy zcela odpovídat předpokládaným parametrům. Jistě by pomohlo sledování průběhu akčních potenciálů na zadním kořenu při stimulaci. To ale bylo znemožněno, velmi krátkým pahýlem zadního kořene u použitých míšních řezů.

U části populace neuronů stimulovaných pulzem o délce trvání 0.1ms s pozdní odpovědí (38,2%) byla pozorována i změna charakteru odpovědi kdy došlo k rozdělení odpovědi na dvě komponenty, rychlá a pozdní složka odpovědi byly jasně odděleny. Tento efekt mohl být způsoben nevýrazným výlevem vápníku z intracelulárních zásobáren u preferenční stimulace A vláken a potvrzoval by tak hypotézy, že pozdní odpověď je indukována zejména při stimulaci C vláken. Objasnění vzniku pozdní odpovědi bude vyžadovat ještě další experimenty, také proto, že jiné laboratoři tyto odpovědi nebyly pozorovány (Lou et al., 2008).

5.3. Stabilita rychlé a pozdní vápníkové odpovědi v čase

Aby bylo možné správně hodnotit a analyzovat změny koncentrací vápenatých iontů v tělech neuronů a tím i vliv látek na synaptické receptory, bylo v první řadě nutné ověřit že odpověď neuronů na stimulaci se v čase nemění. V našich experimentech to odpovídalo schopnosti zopakovat indukce vápníkových změn po stimulaci beze změny

velikosti amplitudy i časového průběhu fluorescenční odpovědi a tím tedy dosáhnout za stejných podmínek stimulace stejné změny koncentrace vápenatých iontů v neuronu.

Bylo nanejvýš důležité odfiltrovat změny poklesu intenzity fluorescence způsobené vysvěcováním fluorescenční barvy a jejím případným únikem ven z buňky. V našich experimentech jsme se toho snažili dosáhnout použitím světelného zdroje s malou intenzitou a osvitem omezeným pouze na co nekratší dobu (Tancredi et al., 2000). Vysvěcování barvy bylo kompenzováno také kontrolním výpočtem na začátku každé stimulace při analýze dat. Je také známo, že po opakované elektrické aktivaci (stimulaci) může na synapsích dojít ke snížení účinnosti synaptického přenosu, únavě synaptického spojení. Tomuto jsme se snažili vyhnout použitím stimulačního protokolu s tříminutovými odstupy mezi stimulacemi pro obnovení synapsí. Tomu odpovídá i velmi stabilní průběh kontrolních měření.

V kontrolních experimentech jsme provedli sérii snímání evokovaných synaptických odpovědí na stimulaci. Výsledky měření nevykazovaly žádné signifikantní změny ani trendy ve velikosti nebo době trvání amplitudy vápníkové odpovědi. Odpovědi byly stálé jak u populace neuronů s rychlou odpovědí tak u populace neuronů s pozdní odpovědí a to po dobu nejméně 40 minut. Z našich pokusů vyplývá, že elektrická stimulace zadního kořene prováděná podle protokolu (3mA, 10Hz a 3minutové odstupy), neovlivňuje (nemá potenciační ani inhibiční efekt) synaptický přenos a tento model může být využit pro sledování změn synaptické aktivity po podání modulačních látek.

5.4. Modulace synaptického přenosu farmaky

5.4.1. Vliv aplikace antagonistů ionotropních glutamátových receptorů na synaptický přenos v zadním rohu míšním.

Je známo, že hlavním neuropřenašečem v zadních rozích míchy je glutamát a glutamátové receptory se podílejí na přenosu akčního potenciálu v neuronech zadního rohu míchy (Dougherty et al., 1992). Nás zajímalo, do jaké míry se v našich pokusech projeví použití antagonistu těchto glutamátových ionotropních synaptických receptorů na velikosti navozených odpovědí, tedy do jaké míry jsou dané odpovědi závislé na aktivaci daného typu glutamátových receptorů.

Předpokládali jsme, že aktivace postsynaptických glutamátových receptorů je závislá na uvolnění glutamátu z presynaptického zakončení tedy z vláken zadního kořenu

míšního. Iontropní glutamátové receptory se podílejí na vyvolání depolarizace a tím na otevření napětově závislých vápníkových kanálů. Zablokováním těchto receptorů by mělo tedy dojít i k snížení vápníkové odpovědi na stimulaci (Zhou a Ross, 2002).

První použitou látkou byl kompetitivní antagonist AMPA a Kainátových receptorů CNQX, který byl podán v koncentraci 50 μ M a byl aplikovaný po dobu 6 minut. Aplikace způsobila signifikantní pokles amplitudy vápníkové odpovědi na stimulaci jak u populace neuronů s rychlou odpovědí tak i u populace s pozdní odpovědí. U skupiny neuronů s rychlou odpovědí však došlo k signifikantně většímu poklesu amplitudy oproti skupině neuronů s pozdní odpovědí. To může být způsobeno tím, že u pozdních odpovědí je amplituda tvořena také uvolněním vápenatých iontů z intracelulárních zdrojů. Tento mechanismus, nemusí být tak závislý na depolarizaci membrány a vzniku akčního potenciálu, jak je uvedeno výše. Při stimulaci pulzem o délce 0.1ms kdy došlo k preferenční aktivaci skupiny A vláken, bylo zjištěno, že pokles amplitudy se signifikantně lišil. V případě odpovědi na stimulační pulz o délce 0,1ms došlo k výraznějšímu zablokování odpovědi po aplikaci CNQX než při stimulaci 0,5ms a tedy aktivaci u skupiny A+C vláken dohromady. Vliv má zřejmě to, že AMPA receptory hrají u vápníkových odpovědí při stimulaci A vláken mnohem významnější úlohu než je tomu u C vláken (Kessels, a Malinow, 2009).

V dalších experimentech byl použit antagonist druhého typu glutamátových receptorů (NMDA), pro jejichž blokaci byl použit nekompetitivní antagonist MK801. Jak je známo, jejich aktivace je závislá na depolarizaci membrány a uvolnění Mg^{2+} bloku. Soudí se, že jejich aktivace slouží k modulaci synaptického přenosu, zejména díky vysoké vápníkové propustnosti. Zde byl také patrný jasný pokles amplitudy vápníkové odpovědi u obou skupin neuronů s rychlou i pozdní odpovědí. Tento pokles však nebyl tak výrazný jako u použití CNQX i když rozdíl v poklesu mezi skupinami CNQX a NMDA nebyl signifikantní. K většímu poklesu amplitudy zde pak došlo při stimulaci pulzem o délce 0.5ms než u stimulaci pulzem o délce 0,1ms, tedy v případě stimulaci A+ C vláken. To naznačuje, že při aktivaci C vláken jsou postsynaptické NMDA receptory více aktivovány než při aktivaci samotných A vláken. To odpovídá i studiím, které ukázaly, že NMDA receptory hrají významnou roli v synaptické modulaci po aktivaci C vláken (Li a Zhuo, 2001).

5.4.2. Vliv kapsaicinu na modulaci synaptického přenosu v zadním rohu míšním.

V našich pokusech jsme snímali změny koncentrace vápenatých iontů v somatech neuronů, které pravděpodobně odpovídaly počtu akčních potenciálů generovaných neuronem (Jacob a Meyer, 1997; Sojka, 2010). Jestliže v některých případech může fungovat převod počtu stimulačních pulzů v poměru 1:1 k akčním potenciálům. Pak nelze vyloučit, že některé neurony mohou odpovídat nižším nebo naopak vyšším počtem akčních potenciálů na stejnou stimulaci. Aktivita takových neuronů se zvýšeným počtem AP pak může výrazně přetrvávat i po skončení stimulace. Takovýto efekt senzitivace byl již dříve popsán v pokusech *in vivo*, kde při snímání neuronů v zadním rohu docházelo k přetrvávání neuronální aktivity tzv. after-discharge. Tento jev jsme plánovaly využít i náš model modulace synaptické aktivity *in vitro*. (Paleček et al., 1992)

Při senzitivaci míšních synapsí by pak mělo docházet k zvýšení počtu AP na danou stimulaci zadního kořene, prodloužení trvání neuronální aktivity a počtu akčních potenciálů. V našich podmínkách by se tato senzitivace projevila jako odpovídající zvýšení amplitudy vápníkového signálu po stimulaci.

Zásadní význam pro synaptický přenos v zadním rohu míšním má modulace synaptické účinnosti. Účinnost synaptického spojení se může pohybovat mezi extrémními stavy, a to od absence odpovědi v podobě akčního potenciálu, kdy je depolarizace membrány nedostatečná k aktivaci napěťově závislých Ca^{2+} kanálů až po případy, kdy jediný EPSC umožní překročení prahu a generování akčního potenciálu (Dougherty a Willis, 1992).

Neurony zadního rohu míšního mohou i po krátké aktivitě senzitivovat, stávají se citlivější k přicházejícím vstupům a synaptický přenos je potencován. Takovéto zvýšení účinnosti centrálních synapsí je projevem synaptické plasticity, centrální senzitivace. Na regulaci synaptického přenosu se zejména za patologických stavů mohou podílet také látky uvolňované gliovými buňkami. Změny v presynaptické části se mohou projevovat ovlivňováním množství uvolněného přenašeče nebo neuromodulátoru a postsynaptické změny zase mění citlivost míšních neuronů díky změněné expresi receptorů a jejich podjednotek (Woolf a Salter 2000).

Pro naše pokusy jsme k senzitivaci synaptického přenosu použili kapsaicin, známý aktivátor TRPV1 receptorů, přítomných i na centrálních výběžcích primárních aferentních

nociceptivních neuronů. Jak bylo již dříve ukázáno může kapsaicin indukovat výrazný nárůst excitačních postsynaptických proudů v neuronech zadního rohu míchy (Yang a Li, 2000; Špicarová a Paleček, 2009).

Aktivita TRPV1 kanálů může vést jednak k senzitivaci nervového zakončení ale také i k jeho desenzitivaci a úplné inaktivaci při použití vyšší koncentrace (Iadarola et al., 1988; Pospíšilová a Paleček, 2006). Na základě dřívějších pokusu jsme zkoušeli pomocí aplikace kapsaicinu vyvinout model senzitivace míšních neuronů. V našich experimentech měl ale kapsaicin jasně inaktivující účinky na všechny odpovědi. Po jeho aplikaci došlo k výraznému snížení vápníkové odpovědi sledovaných neuronů. Pouze jednotlivé neurony jevíly nárůst odpovědi. Pravděpodobný mechanismus poklesu je inaktivace celého nervového zakončení, díky otevření TRPV1 receptorů a vtoku vápníku. Toho jevu bylo využito i při pokusech s omezením artritické bolesti *in vivo*, kde byl podán kapsaicin intratekálně (Iadarola et al., 1988). Také pokusy na míšních řezech, kde byly snímány EPSC proudy z míšních neuronů při stimulaci A a C vláken, ukázaly jasně inaktivující vliv kapsaicinu, po jehož podání došlo ke snížení nebo zablokování EPSC (Baccei et al., 2003). Efekt snížení odpovědi v našich pokusech byl zcela jasně vidět po aplikaci kapsaicinu o vysoké koncentraci 1,5 μ M.

Při aplikaci kapsaicinu o koncentraci 0,5 μ M došlo také výraznému signifikantnímu poklesu vápníkové odpovědi. U neuronů s pozdní odpovědí byl pokles menší než ve skupině neuronů s rychlou odpovědí. Zajímavý efekt vznikl při preferenční aktivaci A vláken při aplikaci kapsaicinu o koncentraci 0,25 μ M. Výsledky naznačily, že zejména u neuronu s rychlou odpovědí dochází jen k mírné inhibici odpovědi zatímco při společné aktivaci A+C vláken byla inhibice mnohem výraznější. To potvrzuje, že vliv kapsaicinu byl přes TRPV1 receptory které jsou exprimovány zejména v C vláknech. Větší vliv na kapsaicinu na neurony s pozdní odpovědí také naznačuje, že k aktivaci pozdních odpovědí přispívají zejména primární aferentní vlákna exprimující TRPV1 receptory. Pro nalezení nejnižší koncentrace mající inhibiční účinky byla testována řada roztoků kapsaicinu o koncentracích 0,125 μ M, 62nM, 30nM a 15nM. Při snížení koncentrace na 15nM již nedochází k modulaci odpovědi po podání kapsaicinu. Odpovědi na stimulaci jsou při této koncentraci u všech skupin neuronů stabilní, bez signifikantní změny.

Efektu desenzitivace a inaktivace nervových zakončení kapsaicinem se používá v léčbě bolestivých stavů na periferiích, zejména jako náplastí nebo kapsaicinové masti

(Backonja et al., 2010; Pospíšilová a Paleček, 2006). Podání do CNS, například na míšní úrovni se testuje (Iadarola et al., 1998).

5.4.3. Vliv aplikace TNF α , PMA a Bradykininu na vápníkovou odpověď neuronů

V předložené práci jsem také provedla několik předběžných pokusů s aplikací látek, které by mohly ovlivnit nociceptivní přenos na míšní úrovni. V modulaci nocicepce TNF α hraje důležitou úlohu je přítomen při vzniku zánětlivé a zejména neuropatické bolesti (Watkins a Maier, 2003). Cytokín TNF α je zapojen také do mechanismů podmiňujících některé stavy chronické bolesti. Jeho koncentrace se zvyšuje lokálně v místě periferního neurogenního zánětu, proto byl zařazen mezi mediátory zánětu. Exogenní TNF α aplikovaný intraneurálně způsobuje hyperalgezii a allodynii (Watkins et al., 2001). Mechanizmy jeho působení nejsou zatím zcela vysvětleny. Jeho koncentrace se zvyšuje lokálně v místě periferního neurogenního zánětu, proto byl zařazen mezi mediátory zánětu. K jeho nadprodukcii ovšem dochází také ve spinálních gangliích a míše, kde je hojně uvolňován zmnoženými aktivovanými gliovými buňkami při periferním zánětu nebo neuropatii (Winkelstein et al., 2001; Ohtori et al., 2004;). V našich pokusech jsme zkoumali vliv TNF α na excitační synaptický přenos v superficiální oblasti zadního rohu míšního. TNF α působí také přes své receptory TNFR1 a TNFR2. V neuronech spinálních ganglií byly detekovány oba typy TNF α receptorů, jejichž množství se podstatně zvyšuje za patologických stavů. TNF α může zvyšovat neuronální odpověď tím, že zvýší výlev mediátorů z gliových buněk, např. glutamátu a NO tedy látek schopných modulace nocicepce (Khan et al., 2008).

TNF α také zvyšuje syntézu eikosanoidů, speciálně prostaglandinu E2 (PGE2). Prostaglandiny v míše hrají podstatnou roli v rozvoji hyperalgesie a allodynii (Ikeda et al., 2006). Jak potvrzují studie, PGE2 senzitivizuje neurony a zvyšuje jejich odpovědi na podněty. Bylo ukázáno, že spinální aplikace TNF α je schopna vyvolat u neuronů dlouhodobou potenciaci (LTP). Ve spinálních gangliích a v míše, je hojně uvolňován zmnoženými aktivovanými gliovými buňkami při periferním zánětu nebo neuropatii (Ikeda et al., 2003). Byl zkoumán také vliv TNF α na excitační synaptický přenos v superficiální oblasti zadního rohu míšního a jeho modulaci funkce TRPV1 receptorů, které mají klíčovou úlohu v nociceptivní signalizaci (Špicarova a Paleček, 2010).

V našich předběžných experimentech jsme zkoumali možnost senzitivizace synaptického přenosu pomocí aplikace TNF α . Za daných podmínek ale aplikací TNF α na

míšní řezy však nebylo dosaženo žádného navýšení amplitudy vápníkové odpovědi, a naopak došlo k mírnému poklesu. Pokles amplitudy po aplikaci se dostavil jak po použití koncentrace 6nM tak 0.6nM. Pokles byl signifikantní u koncentrace 6nM. K posouzení vlivu TNF α budou potřeba další experimenty.

Forbolestery jsou vysoce účinnými aktivátory PKC, jež na míšní úrovni mají významné modulační účinky. Po aplikaci forbolesteru může docházet k senzitivaci neuronů spinothalamické dráhy (Paleček et al., 1994), indukci mechanické allodynie a tepelné hyperalgezie, což je spojeno se zvýšeným výlevem excitačních aminokyselin (Paleček et al., 1999). Je známo, že PKC fosforyluje TRPV1 receptory, což vede k jejich senzitivaci a zvýšené citlivosti na endogenní agonisty (Špicarová a Paleček, 2009). V našich pokusech jsme k aktivaci PKC použili forbol-12-myristát-13-acetát (PMA). PMA je strukturně analogický diacylglycerolu a může také stejně jako DAG alostericky aktivovat proteinkinasu C (PKC) a tím produkci IP3 které vyvolávají zvýšené uvolňování Ca²⁺ z endoplazmatického retikula. Na základě těchto vlastností jsme čekali, že v našem předběžném pokuse dojde k aktivaci PKC, fosforylaci receptorů a následně ke zvýšení cytosolické koncentrace volných vápenatých iontů. Za daných podmínek však neurony reagovaly jen mírným nesignifikantním poklesem u skupiny neuronů s rychlou odpovědí a nesignifikantním nárůstem amplitudy vápníkové odpovědi u skupiny s pozdní odpovědí. 1 μ M PMA byl jedinou testovanou koncentrací a tato problematika bude vyžadovat další pokusy.

Bradykinin ovlivňuje synaptický přenos v superficiální oblasti zadního rohu míšního presynaptickými i postsynaptickými mechanizmy. Presynapticky působí přes bradykininové receptory B2, jejichž aktivace vede ke zvýšenému výlevu glutamátu. Postsynapticky bradykinin opět přes B2 receptory zvyšuje proudy zprostředkované glutamátovými AMPA a NMDA receptory v lamině II v závislosti na aktivaci PKA a PKC (Kohno et al., 2008). TRPV1 receptory je také možné aktivovat a senzitivovat, pomocí mediátorů zánětu jako je bradykinin (Sugiura et al., 2002). Koncentrace bradykininu je například zvýšená v míše po periferním zánětu (Wang et al., 2005). Bradykinin vede také ke zvýšení citlivosti presynaptických TRPV1 receptorů a zvýšení frekvence mEPSC (Špicarová a Paleček, 2009). Aplikace bradykininu v našich předběžných experimentech však nevedla ke zvýšení amplitudy vápníkové odpovědi.

6. Závěr

Naše práce se koncentrovala na studium modulační nociceptivního synaptického přenosu na míšňí úrovňi. Naším cílem bylo vyvinout model, na kterém by bylo možné sledovat aktivitu míšňích neuronů zapojených do nociceptivních drah v řezech *in vitro* a modulovat synaptický přenos na míšňí úrovňi. Hlavním tématem mé práce bylo ověřit, zda metoda sledování neuronální populace pomocí calcium imagingu je přenosná pro použití na konvenční fluorescenční mikroskop. Dále pak sledovat a modulovat aktivaci míšňích neuronů. Vyvinout experimentální podmínky pro preparát *in vitro* k udržení stabilní odpovědi neuronů na stimulaci během trvání experimentu. Sledovat a hodnotit koncentrační změny vápenatých iontů v tělech neuronů superficiálních vrstev zadního rohu míšňího v závislosti na typu elektrické stimulace zadního kořene míchy. Sledovat vliv aplikace různých látek na synaptickou aktivaci neuronů zadních rohů míchy při stimulaci míšňího kořene. (CNQX, MK801, kapsaicin, TNF α , PMA a bradykinin)

Calcium imaging se ukazuje jako účinná metoda pro snímání aktivity neuronálních populací zadního rohu míchy *in vitro* na míšňích řezech. Je možné zaznamenat změny v koncentraci cytosolického vápníku ($[Ca^{2+}]_i$) v neuronech po nabarvení fluorescenčním indikátorem Fluo 4 a snímat tyto změny fluorescenčním mikroskopem, jenž poskytuje lepší přehled o časovém průběhu koncentračních změn, a to díky vyšší rychlosti snímání než u dříve používaného konfokálního mikroskopu v případě snímání většího zorného pole.

Změny v koncentraci intracelulárních vápenatých iontů v neuronech zadního rohu míchy je možno dosáhnout stimulací zadního kořene o parametrech, frekvence 10Hz, délce 1sekundy s deseti pulzy o délce trvání 0,5ms a 0,1ms. Tato odpověď je stabilní po dobu delší než 40 minut. Neuronální odpověď na stimulaci se projevuje dvěma různými časovými průběhy změn v koncentraci iCa^{2+} , a to rychlým a pozdním. Rychlá vápníková odpověď je zřejmě způsobena vtokem vápníku přes napětově závislé vápníkové kanály, které jsou otevírány depolarizací membrány v průběhu akčního potenciálu generovaného neuronem po stimulaci. Depolarizace je závislá na synaptických AMPA a NMDA receptorech. Pozdní vápníková odpověď je zřejmě způsobena uvolněním vápníku z intracelulárních zásobáren, jako je endoplazmatické retikulum a mitochondrie. V našich pokusech se populace neuronů s pozdními odpověďmi ukázala být menšíně. Oproti populaci neuronů s rychlou odpovědí, tvoří jen 14,52% z celkového počtu analyzovaných neuronů v zadním rohu míšňím. Stimulací pulzem o délce trvání 0,1ms lze preferenčně stimulovat A vlákna. Při této preferenční stimulaci A vláken došlo u části populace

neuronů s pozdní odpovědí (28,8%) ke změně charakteru odpovědi, došlo k oddělení komponent rychlé a pozdní složky změny koncentrace vápenatých iontů, která se na záznamu projevila jako dvě oddělené amplitudy.

Testovali jsme vliv antagonistů glutamátových receptorů na vápníkovou odpověď neuronů. Kompetitivní antagonist AMPA a Kainátových receptorů CNQX měl signifikantně větší vliv na neurony s rychlou odpovědí. To bylo zřejmě způsobeno závislostí rychlé složky vápníkové odpovědi na aktivaci AMPA receptorů. Při preferenční stimulaci A vláken došlo ještě k výraznějšímu zablokování, než tomu bylo u skupiny A+C vláken dohromady. AMPA receptory hrají zřejmě při aktivaci A vláken významnější úlohu. Nekompetitivní antagonist NMDA kanálů MK801 způsobil při aplikaci v našich pokusech také pokles amplitudy vápníkové odpovědi u obou skupin. K většímu poklesu amplitudy došlo při stimulaci A+C vláken. Při aktivaci C vláken hrají NMDA receptory pravděpodobně významnější roli než u aktivace samotných A vláken.

TRPV1 receptory známé integrátory fyzikálních a chemických podnětů jsou klíčové jak pro přenos bolesti na periferii tak při modulaci v centrální nervové soustavě. Mohou být senzitivizovány řadou látek. Naproti tomu jejich aktivace může také vést k jejich desenzitizaci a inaktivaci celého nervového zakončení. TRPV1 exprimované na centrálních výběžcích periferních aferentních vláken v zadních rozích míchy hrají důležitou úlohu v modulaci synaptického přenosu. V našich pokusech aplikace agonisty kapsaicinu vedla k výraznému snížení sledované vápníkové odpovědi. To naznačuje, že za daných podmínek měl kapsaicin převážně inaktivující účinek. Pokusy s aplikací látek modulujících synaptický přenos na míšní úrovni (TNF α , PMA, bradykinin) budou vyžadovat další testování.

Naše úsilí i nadále směřuje k vývoji účinnější léčby akutních a chronických bolestivých stavů. Zejména chronické stavy, kde se mohou významně podílet modulační mechanismy synaptického přenosu na míšní úrovni, jsou v centru naší pozornosti.

7. Seznam použité literatury

- Allbritton NL, Meyer T, Stryer L. Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science*. 1992 Dec 11;258(5089):1812-5.
- Amaya F, Shimosato G, Nagano M, Ueda M, Hashimoto S, Tanaka Y, Suzuki H, Tanaka M. NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia. *Eur J Neurosci*. 2004 Nov;20(9):2303-10
- Armstrong N, Sun Y, Chen GQ, Gouaux E (October 1998). "Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate". *Nature* 395 (6705): 913–7. doi:10.1038/27692. PMID 9804426.
- Armstrong N, Jasti J, Beich-Frandsen M, Gouaux E (October 2006). "Measurement of conformational changes accompanying desensitization in an ionotropic glutamate receptor". *Cell* 127 (1): 85–97. doi:10.1016/j.cell.2006.08.037. PMID 17018279.
- Baccei ML, Bardoni R, Fitzgerald M. Development of nociceptive synaptic inputs to the neonatal rat dorsal horn: glutamate release by capsaicin and menthol. *J Physiol*. 2003 May 15;549(Pt 1):231-42. Epub 2003 Apr 4.
- Backonja MM, Malan TP, Vanhove GF, Tobias JK; C102/106 Study Group. NGX-4010, a high-concentration capsaicin patch, for the treatment of postherpetic neuralgia: a randomized, double-blind, controlled study with an open-label extension. *Pain Med*. 2010 Apr;11(4):600-8. Epub 2010 Jan 22.
- Bandell, M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J., Earley, T.J., and Patapoutian, A. (2004) Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin: *Neuron* 41, pp. 849-857
- Belmonte C., Cervero F. *Neurobiology of Nociceptors* p. 531. Oxford University Press 1996 Oxford.
- Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. *Neuron*. 1998 Jul;21(1):13-26.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Oct;1(1):11-21.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jul;4(7):517-29.
- Besson JM, Chaouch A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev*. 1987 Jan;67(1):67-186.
- Bettler B, Mülle C. Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*. 1995 Feb;34(2):123-39.
- Bervers MB, Neumar RW. Mechanistic role of calpains in postischemic neurodegeneration. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008 Apr;28(4):655-73. Epub 2007 Dec 12.

- Bleakman D, Rusin KI, Chard PS, Glaum SR, Miller RJ. Metabotropic glutamate receptors potentiate ionotropic glutamate responses in the rat dorsal horn. *Mol Pharmacol*. 1992 Aug;42(2):192-6.
- Boehm J, Malinow R. AMPA receptor phosphorylation during synaptic plasticity. *Biochem Soc Trans*. 2005 Dec;33(Pt 6):1354-6.
- Boehm J, Kang MG, Johnson RC, Esteban J, Huganir RL, Malinow R (July 2006). "Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1". *Neuron* 51 (2): 213–25. doi:10.1016/j.neuron.2006.06.013. PMID 16846856.
- Bolotina VM. Store-operated channels: diversity and activation mechanisms. *Sci STKE*. 2004 Jul 20;2004(243):pe34.
- Burnashev N, Zhou Z, Neher E, Sakmann B. Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J Physiol*. 1995 Jun 1;485 (Pt 2):403-18.
- Burnashev N. Calcium permeability of glutamate-gated channels in the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol*. 1996 Jun;6(3):311-7.
- Burnashev N. Calcium permeability of ligand-gated channels. *Cell Calcium*. 1998 Nov-Dec;24(5-6):325-32.
- Campanella M, Pinton P, Rizzuto R. Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in health and disease. *Biol Res*. 2004;37(4):653-60.
- Campbell, J. N.; Meyer, R. A. Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron*. 2010, vol. 52, no. 1, s. 77-92.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997 Oct 23;389(6653):816-24.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*. 2000 Apr 14;288(5464):306-13. *Science*. 2000 Apr 14;288(5464):241-2.
- Cervero F. Visceral pain: mechanisms of peripheral and central sensitization. *Ann Med*. 1995 Apr;27(2):235-9 A
- Cervero F. Pain. What is a nociceptor-specific (class 3) cell? *Pain*. 1995 Jul;62(1):1235.B
- Chard PS, Bleakman D, Christakos S, Fullmer CS, Miller RJ. Calcium buffering properties of calbindin D28k and parvalbumin in rat sensory neurones. *J Physiol*. 1993 Dec;472:341-57.
- Cherkas P.S., Huang T.Y., Pannicke T., Tal M., Reichenbach A., Hanani M. (2004) The effects of axotomy on neurons and satellite glial cells in mouse trigeminal ganglion. *Pain* 110:290-298
- Chung K., Chung J.M. (2001) Sympathetic sprouting in the dorsal root ganglion after spinal nerve ligation: evidence of regenerative collateral sprouting. *Brain Res* 895:204-212.
- Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997;37:205-37.

- Connor J, Pozzo-Miller LD. Synaptically driven Ca²⁺ release in hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 2003 Nov;90(5):3579; author reply 3579-80.
- Cui, M., Honore, P., Zhong, C., Gauvin, D., Mikusa, J., Hernandez, G., Chandran, P., Gomtsyan, A., Brown, B., Bayburt, E. K., Marsh, K., Bianchi, B., McDonald, H., Niforatos, W., Neelands, T. R., Moreland, R. B., Decker, M. W., Lee, C. H., Sullivan, J. P. and Faltynek, C. R., 2006. TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *J Neurosci.* 26, 9385-9393.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol.* 2001 Jun;11(3):327-35.
- Cummings Benjamin: *Get Ready for Biology*, Pearson Education Inc. 2006
- Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 2001 Sep;65(1):1-105.
- Derkach V, Barria A, Soderling TR (March 1999). "Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (6): 3269–74. doi:10.1073/pnas.96.6.3269. PMID 10077673. PMC 15931.
- Dougherty PM, Willis WD. Enhanced responses of spinothalamic tract neurons to excitatory amino acids accompany capsaicin-induced sensitization in the monkey. *J Neurosci.* 1992 Mar;12(3):883-94.
- Docherty, R. J., Yeats, J. C., Bevan, S. and Boddeke, H. W.,. Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflugers Arch.* 1996. 431, 828-837.
- Dowdall, T.; Robinson, I.; Meert, T. F. Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. *Pharmacology biochemistry and behavior.* 2005, vol. 80, no. 1, s. 93-108.
- Dubner R, Bennett GJ. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception *Annu Rev Neurosci.*1983;6:381-418. A
- Dubner R. Pain research in animals. *Ann N Y Acad Sci.* 1983;406:128-32. B
- Dubner R, Gold M. The neurobiology of pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jul 6;96(14):7627-30.
- Dubový P. (1998) *Struktura a dráhy nervové soustavy člověka.* Masarykova universita, Lékařská fakulta, Brno.
- Esteban JA. AMPA receptor trafficking: a road map for synaptic plasticity. *Mol Interv.* 2003 Oct;3(7):375-85.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. *Neuropharmacology.* 1994 Nov;33(11):1479-85.

- Ferreira J, Campos MM, Araújo R, Bader M, Pesquero JB, Calixto JB. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. *Neuropharmacology*. 2002 Dec;43(7):1188-97.
- Ferrer-Montiel A, García-Martínez C, Morenilla-Palao C, García-Sanz N, Fernández-Carvajal A, Fernández-Ballester G, Planells-Cases R. Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design. *Eur J Biochem*. 2004 May;271(10):1820-6.
- Gamse, R., 1982. Capsaicin and nociception in the rat and mouse. Possible role of substance P. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 320, 205-216.
- Garaschuk O, Schneggenburger R, Schirra C, Tempia F, Konnerth A. Fractional Ca²⁺ currents through somatic and dendritic glutamate receptor channels of rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *J Physiol*. 1996 Mar 15;491 (Pt 3):757-72.
- Greger IH, Khatri L, Ziff EB (May 2002). "RNA editing at arg607 controls AMPA receptor exit from the endoplasmic reticulum". *Neuron* 34 (5): 759–72. doi:10.1016/S0896-6273(02)00693-1. PMID 12062022.
- Handwerker HO, Kobal G. Psychophysiology of experimentally induced pain. *Physiol Rev*. 1993 Jul;73(3):639-71.
- Häbler H.J., Eschenfelder S., Liu X.G. Jänig W. (2000) Sympathetic-sensory coupling after L5 spinal nerve lesion in the rat and its relation to changes in dorsal root ganglion blood flow. *Pain* 87:335-345.
- Heinke B, Balzer E, Sandkühler J. Pre- and postsynaptic contributions of voltage-dependent Ca²⁺ channels to nociceptive transmission in rat spinal lamina I neurons. *Eur J Neurosci*. 2004 Jan;19(1):103-11
- Hollmann M, Maron C, Heinemann S (1994). "N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1". *Neuron* 13 (6): 1331–43. doi:10.1016/0896-6273(94)90419-7. PMID 7993626.
- Iadarola MJ, Douglass J, Civelli O, Naranjo JR. Differential activation of spinal cord dynorphin and enkephalin neurons during hyperalgesia: evidence using cDNA hybridization. *Brain Res*. 1988 Jul 12;455(2):205-12.
- Iadarola MJ, Berman KF, Zeffiro TA, Byas-Smith MG, Gracely RH, Max MB, Bennett GJ. Neural activation during acute capsaicin-evoked pain and allodynia assessed with PET. *Brain*. 1998 May;121 (Pt 5):931-47.
- Ikeda H, Asai T, Murase K. Robust changes of afferent-induced excitation in the rat spinal dorsal horn after conditioning high-frequency stimulation. *J Neurophysiol*. 2000 Apr;83(4):2412-20.
- Ikeda H, Heinke B, Ruscheweyh R, Sandkühler J. Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science*. 2003 Feb 21;299(5610):1237-40.

- Ikeda H, Stark J, Fischer H, Wagner M, Drdla R, Jäger T, Sandkühler J. Synaptic amplifier of inflammatory pain in the spinal dorsal horn. *Science*. 2006 Jun 16;312(5780):1659-62.
- Jacobs JM, Meyer T. Control of action potential-induced Ca²⁺ signaling in the soma of hippocampal neurons by Ca²⁺ release from intracellular stores. *J Neurosci*. 1997 Jun 1;17(11):4129-35.
- Ji, R. R., Kohno, T., Moore, K. A. and Woolf, C. J., 2003. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci*. 26, 696-705.
- Jonas Elizabeth 2006 BCL-xL Regulates Synaptic Plasticity *MI August* vol. 6 no. 4 208-222
- Jordt SE, Julius D. Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell*. 2002 Feb 8;108(3):421-30
- Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001 Sep 13;413(6852):203-10.
- Kanai, Y., Hara, T., Imai, A. and Sakakibara, A., 2007. Differential involvement of TRPV1 receptors at the central and peripheral nerves in CFA-induced mechanical and thermal hyperalgesia. *J Pharm Pharmacol*. 59, 733-738.
- Kessels, H. W. and Malinow, R., 2009. Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron*. 61, 340-350.
- Khan, A. A., Diogenes, A., Jeske, N. A., Henry, M. A., Akopian, A. and Hargreaves, K. M., 2008. Tumor necrosis factor alpha enhances the sensitivity of rat trigeminal neurons to capsaicin. *Neuroscience*. 155, 503-509.
- Kim H.J., Na H.S., Back S.K., Hong S.K. (2001) Sympathetic sprouting in sensory ganglia depends on the number of injured neurons. *Neuroreport* 12:3529-3532.
- Kim S, Kang C, Shin CY, Hwang SW, Yang YD, Shim WS, Park MY, Kim E, Kim M, Kim BM, Cho H, Shin Y, Oh U. TRPV1 recapitulates native capsaicin receptor in sensory neurons in association with Fas-associated factor 1. *J Neurosci*. 2006 Mar 1;26(9):2403-12.
- Kohno, T., Wang, H., Amaya, F., Brenner, G. J., Cheng, J. K., Ji, R. R. and Woolf, C. J., 2008. Bradykinin enhances AMPA and NMDA receptor activity in spinal cord dorsal horn neurons by activating multiple kinases to produce pain hypersensitivity. *J Neurosci*. 28, 4533-4540.
- Krause JE, Chenard BL, Cortright DN. Transient receptor potential ion channels as targets for the discovery of pain therapeutics. *Curr Opin Investig Drugs*. 2005 Jan;6(1):48-57
- Laube, B; Hirai H, Sturgess M, Betz H, and Kuhse J (1997). "Molecular determinants of antagonists discrimination by NMDA receptor subunits: Analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit". *Neuron* 18 (3): 493–503.

- Lee SH, Rosenmund C, Schwaller B, Neher E. Differences in Ca²⁺ buffering properties between excitatory and inhibitory hippocampal neurons from the rat. *J Physiol*. 2000 Jun 1;525 Pt 2:405-18.
- Lester RA, Clements JD, Westbrook GL, Jahr CE. Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature*. 1990 Aug 9;346(6284):565-7.
- Li P, Zhuo M. Substance P and neurokinin A mediate sensory synaptic transmission in young rat dorsal horn neurons. *Brain Res Bull*. 2001 Jul 1;55(4):521-31.
- Li, Y., Ji, A., Weihe, E. and Schafer, M. K., 2004. Cell-specific expression and lipopolysaccharide-induced regulation of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) and TNF receptors in rat dorsal root ganglion. *J Neurosci*. 24, 9623-9631.
- Larsson, M. and Broman, J., 2008. Translocation of GluR1-containing AMPA receptors to a spinal nociceptive synapse during acute noxious stimulation. *J Neurosci*. 28, 7084-7090.
- Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*. 2008 Jul 31;137(3):473-7. Epub 2008 Jun 25.
- Lumpkin, E. A. and Caterina, M. J., 2007. Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature*. 445, 858-865.
- Luo C, Seeburg PH, Sprengel R, Kuner R. Activity-dependent potentiation of calcium signals in spinal sensory networks in inflammatory pain states. *Pain*. 2008 Nov 30;140(2):358-67. Epub 2008 Oct 15.
- Ma W., Bisby M.A. (1999) Partial sciatic nerve transection induced tyrosine hydroxidase immunoreactive axon sprouting around both injured and spared dorsal root ganglion neurons which project to the gracile nucleus in middle-aged rats. *Neurosci Lett* 275:117-120.
- Mandadi S, Numazaki M, Tominaga M, Bhat MB, Armati PJ, Roufogalis BD. Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV1 ion channels. *Cell Calcium*. 2004 May;35(5):471-8.
- Marsch R, Foeller E, Rammes G, Bunck M, Kössl M, Holsboer F, Zieglgänsberger W, Landgraf R, Lutz B, Wotjak CT. Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. *J Neurosci*. 2007 Jan 24;27(4):832-9.
- Matta, J. A., Miyares, R. L. and Ahern, G. P., 2007. TRPV1 is a novel target for omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Physiol*. 578, 397-411.
- Matsumoto Y., Hayashi S., Ibuki T., Tahala M., Ubyta Y. (1999) Morphological and functional roles of macrophages and postganglionic sympathetic fibres in DRGs of rat neuropathic pain model. *Acta Histochem Cytol* 32:85-93.

- Mayer ML, MacDermott AB, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL. Agonist- and voltage-gated calcium entry in cultured mouse spinal cord neurons under voltage clamp measured using arsenazo III. *J Neurosci*. 1987 Oct;7(10):3230-44.
- Mayer, M. L. (2005). "Glutamate receptor ion channels". *Current Opinion in Neurobiology* 15 (3): 282–288. doi:10.1016/j.conb.2005.05.004. PMID 15919192.
- McMahon S. a Koltzenburg M., Wall and Melzack's Textbook of Pain, Churchill Livingstone 2004
- Mellor H, Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J*. 1998 Jun 1;332 (Pt 2):281-92.
- Mense S. Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. *Pain*. 1993 Sep;54(3):241-89
- Millan M.J. The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: focus on receptor multiplicity. In *The Pharmacology of pain. Handbook of Experimental Pharmacology*.1997 Vol 130 p.385-446.
- Millan M.J. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*. 1999 Jan;57(1):1-164.
- Miller LD, Petrozzino JJ, Golarai G, Connor JA. Ca²⁺ release from intracellular stores induced by afferent stimulation of CA3 pyramidal neurons in hippocampal slices. *J Neurophysiol*. 1996 Jul;76(1):554-62.
- Miyakawa H, Ross WN, Jaffe D, Callaway JC, Lasser-Ross N, Lisman JE, Johnston D. Synaptically activated increases in Ca²⁺ concentration in hippocampal CA1 pyramidal cells are primarily due to voltage-gated Ca²⁺ channels. *Neuron*. 1992 Dec;9(6):1163-73.
- Moalem G., Tracey D.J. (2005) Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev*, in press.
- Mohapatra DP, Nau C. Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J Biol Chem*. 2003 Dec 12;278(50):50080-90. Epub 2003 Sep 23.
- Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*. 1989 Apr;2(4):1313-23.
- Müller M, Felmy F, Schwaller B, Schneggenburger R. Parvalbumin is a mobile presynaptic Ca²⁺ buffer in the calyx of held that accelerates the decay of Ca²⁺ and short-term facilitation. *J Neurosci*. 2007 Feb 28;27(9):2261-71.
- Myers R.R., Campana W.M., Shubayev I. (2006) The role of neuroinflammation in the neuropathic pain: mechanisms and therapeutics targets. *Drug Discov Today* 11:8-20.
- Nakamura T, Barbara JG, Nakamura K, Ross WN. Synergistic release of Ca²⁺ from IP₃-sensitive stores evoked by synaptic activation of mGluRs paired with backpropagating action potentials. *Neuron*. 1999 Nov;24(3):727-37.

- Neher E, Augustine GJ. Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *J Physiol.* 1992 May;450:273-301.
- Neugebauer V. Peripheral metabotropic glutamate receptors: fight the pain where it hurts. *Trends Neurosci.* 2001 Oct;24(10):550-2.
- Newton R.A., Bingham S., Case P.C., Sanger G.J., Lawson S.N. (2001) Dorsal root ganglion neurons show increased expression of the calcium channel $\alpha_2\delta-1$ subunit following partial sciatic nerve injury. *Mol Brain Res* 95:1-8.
- Němeček S., Lodin Z., Wolf J., Vyskočil F.: *Neurobiologie*, Avicenum, zdrav. nakl., Praha, 1972.
- Nilsson A., Moller K., Dahlin L., Lundborg G., Kanje M. (2005) Early changes in gene expression in the dorsal root ganglia after transection of sciatic nerve; effects of amphiregulin and PAI-1 on regeneration. *Mol Brain Res* 136:65-74.
- Numazaki M, Tominaga T, Takeuchi K, Murayama N, Toyooka H, Tominaga M. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jun 24;100(13):8002-6. Epub 2003 Jun 13.
- Olah, Z., Szabo, T., Karai, L., Hough, C., Fields, R. D., Caudle, R. M., Blumberg, P. M. and Iadarola, M. J., 2001. Ligand-induced dynamic membrane changes and cell deletion conferred by vanilloid receptor 1. *J Biol Chem.* 276, 11021-11030.
- Obata K., Yamanaka H., Fukuoka T., Yi D., Tokunaga A., Hashimoto N., Yoshikawa H., Noguchi K. (2003) Contribution of injured and uninjured dorsal root ganglion neurons to pain behavior and the changes in gene expression following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Pain* 101:65-77.
- Ohtori, S., Takahashi, K., Moriya, H. and Myers, R. R., 2004. TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord. *Spine (Phila Pa 1976).* 29, 1082-1088.
- Palecek J, Palecková V, Dougherty PM, Carlton SM, Willis WD. Responses of spinothalamic tract cells to mechanical and thermal stimulation of skin in rats with experimental peripheral neuropathy. *J Neurophysiol.* 1992 Jun;67(6):1562-73.
- Palecek, J., Paleckova, V., Dougherty, P. M. and Willis, W. D., 1994. The effect of phorbol esters on the responses of primate spinothalamic neurons to mechanical and thermal stimuli. *J Neurophysiol.* 71, 529-537.
- Palecek, J., Paleckova, V. and Willis, W. D., 1999. The effect of phorbol esters on spinal cord amino acid concentrations and responsiveness of rats to mechanical and thermal stimuli. *Pain.* 80, 597-605.
- Parekh AB. (2008) Store-operated channels: mechanisms and function. *J Physiol.* Jul 1;586(13):3033.
- Platt SR (2007). "The role of glutamate in central nervous system health and disease--a review". *Vet. J.* 173 (2): 278–86. doi:10.1016/j.tvjl.2005.11.007. PMID 16376594.

- Pospisilova, E. and Palecek, J., 2006. Post-operative pain behavior in rats is reduced after single high-concentration capsaicin application. *Pain*. 125, 233-243.
- Prescott ED, Julius D. A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science*. 2003 May 23;300(5623):1284-8.
- Ramer M.S., French G.D., Bisby M.A. (1997) Wallerian degeneration is required for both neuropathic pain and sympathetic sprouting into the DRG. *Pain* 72:71-78.
- Ramer M.S., Thompson W.N., McMahon S.B. (1999) Causes and consequences of sympathetic basket formation in dorsal root ganglia. *Pain* 6:111-120.
- Rami HK and Gunthorpe MJ The therapeutic potential of TRPV1 (VR1) antagonists: clinical answers await. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategie*. 2004,(1):97-104
- Ren K, Ruda MA. A comparative study of the calcium-binding proteins calbindin-D28K, calretinin, calmodulin and parvalbumin in the rat spinal cord. *Brain Res Brain Res Rev*. 1994 May;19(2):163-79.
- Rexed, B., 1952. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J 108 Comp Neurol*. 96, 414-495.
- Von Roenn, Jamie H.; PAICE, Judith A.; PREODOR, Michael E. *Current diagnosis and treatment of pain*. United States of America : The MacGraw-Hill Company, 2006. 349s
- Rodrigues-Filho R., Santos A.R.S., Bertelli J.A., Calixto J.B. (2003) Avulsion injury of the rat brachial plexus triggers hyperalgesia and allodynia in the hindpaws: a new model for the study of neuropathic pain. *Brain Res* 982:186-194.
- Saunders: *Dorland's Medical Dictionary for Health Consumers*, Elsevier Inc. 2007
- Shinder V., Govrin-Lippmann R., Cohen S., Belenky M., Ilin P., Fried K., Wilkinson H.A., Devor M. (1999) Structural basis of sympathetic-sensory coupling in rat and human dorsal root ganglia following peripheral nerve injury. *J Neurocytol* 28:743-761.
- Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? *Nat Neurosci*. 2002 Nov;5 Suppl:1062-7.
- Shmigol A, Svichar N, Kostyuk P, Verkhratsky A. Gradual caffeine-induced Ca²⁺ release in mouse dorsal root ganglion neurons is controlled by cytoplasmic and luminal Ca²⁺. *Neuroscience*. 1996 Aug;73(4):1061-7.
- Sojka D., Disertační práce. 2010 Calcium Homeostasis and Modulation of Nociceptive Synaptic Transmission. Přírodovědecká fakulta UK, Fyziologie živočichů, Praha
- Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P, Davis JB. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature*. 2002 Jul 11;418(6894):186-90. Epub 2002 Jun 23.

- Spicarova, D. and Palecek, J., 2008. The role of spinal cord vanilloid (TRPV1) receptors in pain modulation. *Physiol Res.* 57 Suppl 3, S69-77.
- Spicarova D, Palecek J. The role of the TRPV1 endogenous agonist N-Oleoyldopamine in modulation of nociceptive signaling at the spinal cord level. *J Neurophysiol.* 2009 Jul;102(1):234-43. Epub 2009 Apr 15.
- Spicarova, D. and Palecek, J., 2010. Modulation of AMPA excitatory postsynaptic currents in the spinal cord dorsal horn neurons by insulin. *Neuroscience.* 166, 305-311.
- Stahl M. : *Stahl's Essential Psychopharmacology* 3rd Edition, Cambridge University Press 2008.
- Starowicz, K., Nigam, S. and Di Marzo, V., 2007. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther.* 114, 13-33.
- van der Stelt M, Trevisani M, Vellani V, De Petrocellis L, Schiano Moriello A, Campi B, Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying Ca²⁺ influx via TRPV1 channels. *EMBO J.* 2005 Sep 7;24(17):3026-37. Epub 2005 Aug 18.
- Stichel C.C., Müller H.W. 1998 Experimental strategies to promote axonal regeneration after traumatic central nervous injury. *Progr Neurobiol* 56:119-148.
- Sugiura, T., Tominaga, M., Katsuya, H. and Mizumura, K., 2002. Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J Neurophysiol.* 88, 544-548.
- Swett, J.E. and Wolf, C. 1985 The somatotopic organization of primary afferent terminals in the superficial laminae of the dorsal horn of the rat spinal cord. *J. Comp.Neurol.*231, 66-71.
- Szabadkai G, Duchen MR. 2008 Mitochondria: the hub of cellular Ca²⁺ signaling. *Physiology (Bethesda).* Apr;23:84-94.
- Tancredi V, Biagini G, D'Antuono M, Louvel J, Pumain R, Avoli M. 2000 Spindle-like thalamocortical synchronization in a rat brain slice preparation. *J Neurophysiol.* Aug;84(2):1093-7.
- Treede RD, Meyer RA, Campbell JN. 1990 Comparison of heat and mechanical receptive fields of cutaneous C-fiber nociceptors in monkey. *J Neurophysiol.* 1990 Nov;64(5):1502-13.
- Tognetto, M., Amadesi, S., Harrison, S., Creminon, C., Trevisani, M., Carreras, M., Matera, M., Geppetti, P. and Bianchi, A., 2001. Anandamide excites central terminals of dorsal root ganglion neurons via vanilloid receptor-1 activation. *J Neurosci.* 21, 1104-1109
- Tolle, T. R., Berthele, A., Zieglgansberger, W., Seeburg, P. H. and Wisden, W., 1993. The differential expression of 16 NMDA and non-NMDA receptor subunits in the rat spinal cord and in periaqueductal gray. *J Neurosci.* 13, 5009-5028.

Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B. E., Basbaum, A. I. and Julius, D., 1998 The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*.21, 531-543.

Ueda, Hiroshi; TSUDA, Makoto; INOUE, Kazuhide.; MURASE, Kazuyuki. Long-term potentiation of neuronal excitation by neuron-glia interactions in the rat spinal dorsal horn. *European Journal of Neuroscience*. 2007, vol. 25, no. 5, s. 1297-1306.

Ueda, Hiroshi. 2008 Peripheral mechanisms of neuropathic pain : involvement of lysophosphatidic acid receptor-mediated demyelination. *Molecular pain*. 2008, vol. 4, no. 11.

Ulfenius C, Linderöth B, Meyerson BA, Wallin J. Spinal NMDA receptor phosphorylation correlates with the presence of neuropathic signs following peripheral nerve injury in the rat. *Neurosci Lett*. 2006 May 15;399(1-2):85-90. Epub 2006 Feb 8.

Verkhatsky A, Toescu EC. Endoplasmic reticulum Ca(2+) homeostasis and neuronal death. *J Cell Mol Med*. 2003 Oct-Dec;7(4):351-61.

Verkhatsky A. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol Rev*. 2005 Jan;85(1):201-279.

Vlachová V. a Vyklický L. : Buněčné a molekulární mechanizmy nocicepce, *Bolest* ,Tigris 2006 p.46

Wang H, Kohno T, Amaya F, Brenner GJ, Ito N, Allchorne A, Ji RR, Woolf CJ. Bradykinin produces pain hypersensitivity by potentiating spinal cord glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci*. 2005 Aug 31;25(35):7986-92.

Wang LY, Taverna FA, Huang XP, MacDonald JF, Hampson DR. Phosphorylation and modulation of a kainate receptor (GluR6) by cAMP-dependent protein kinase. *Science*. 1993 Feb 19;259(5098):1173-5.

Wang L.X., Wang Z.J. (2003) Animal and cellular models of chronic pain. *Adv Drug Deliv Rev* 55:949-965.

Watkins, L. R. and Maier, S. F., 2003. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nat Rev Drug Discov*. 2, 973-985.

Watkins, L. R., Milligan, E. D. and Maier, S. F., 2001. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci*. 24, 450-455.

Winkelstein, B. A., Rutkowski, M. D., Sweitzer, S. M., Pahl, J. L. and DeLeo, J. A., 2001. Nerve injury proximal or distal to the DRG induces similar spinal glial activation and selective cytokine expression but differential behavioral responses to pharmacologic treatment. *J Comp Neurol*. 439, 127-139.

White FA, Jung H, Miller RJ Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 18;104(51):20151-8. Epub 2007 Dec 14.

Wikipedia 1 (en.wikipedia.org/wiki/File:Synapse_with_NMDAR_and_AMPAR.png)

- Willis, W. D., Jr., 1985. Pain pathways in the primate. *Prog Clin Biol Res.* 176, 117-133.
- Willis, W. D., 2001. Role of neurotransmitters in sensitization of pain responses. *Ann N Y Acad Sci.* 933, 142-156.
- Womack MD, MacDermott AB, Jessell TM. Sensory transmitters regulate intracellular calcium in dorsal horn neurons. *Nature.* 1988 Jul 28;334(6180):351-3.
- Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science.* 2000 Jun 9;288(5472):1765-9.
- Woolf CJ. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. *Life Sci.* 2004 Apr 9;74(21):2605-10
- Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science.* 2000 Jun 9;288(5472):1765-9.
- Yaksh, T. L., Farb, D. H., Leeman, S. E. and Jessell, T. M., 1979. Intrathecal capsaicin depletes substance P in the rat spinal cord and produces prolonged thermal analgesia. *Science.* 206, 481-483.
- Yamakage M, Namiki A (2002). "Calcium channels basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels a review". *Can J Anaesth* 49 (2): 151-64. doi:10.1007/BF03020488
- Yang K, Li YQ. Origins of spontaneous and noxious stimuli-evoked miniature EPSCs in substantia gelatinosa. *Neuroreport.* 2001 Jan 22;12(1):39-42.
- Zimmermann M. (2001) Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 429:23-37.
- Zuo J., Neubauer D., Dyess K., Ferguson T.A., Muir D. (1998) Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neurite-promoting potential of spinal cord tissue. *Exp Neurol* 154:654-662.
- Zuo J., Neubauer D., Graham J., Krekoski C.A., Ferguson T.A., Muir D. (2002) Regeneration of axons after nerve transection repair is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan. *Exp Neurol* 176:221-228.
- Zhou, H. Y., Chen, S. R., Chen, H. and Pan, H. L., 2009. The glutamatergic nature of TRPV1-expressing neurons in the spinal dorsal horn. *J Neurochem.* 108, 305-318.
- Zhou, H. Y., Zhang, H. M., Chen, S. R. and Pan, H. L., 2007. Increased C-fiber Nociceptive Input Potentiates Inhibitory Glycinergic Transmission in the Spinal Dorsal Horn. *J Pharmacol Exp Ther.*
- Zhou S, Ross WN. Threshold conditions for synaptically evoking Ca(2+) waves in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 2002 Apr;87(4):1799-804.