

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

**Charles University
Faculty of Science**



Autoreferát disertační práce
Summary of the doctoral thesis

**VÝZNAM MODULACE NOCICEPTIVNÍHO
SYNAPTICKÉHO PŘENOSU NA MÍŠNÍ ÚROVNI
ZA RŮZNÝCH BOLESTIVÝCH STAVŮ**

**THE ROLE OF NOCICEPTIVE SYNAPTIC
TRANSMISSION MODULATION AT THE SPINAL
CORD LEVEL IN DIFFERENT PAIN STATES**

Mgr. Pavel Adámek

Praha, 2019

Doktorské studijní programy v biomedicině
Doctoral study programmes in biomedicines

*Univerzita Karlova
a Akademie věd České republiky*

*Charles University
and Czech Academy of Sciences*

Studijní program: Fyziologie živočichů
Study programme: Animal physiology

Předseda oborové rady/Committee Chairman:
Doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Školící pracoviště:
Oddělení Funkční morfologie, Fyziologický ústav,
Akademie věd České republiky, v.v.i.

Workplace:
Department of Functional Morphology, Institute of Physiology,
The Czech Academy of Sciences

Autor/Author:
Mgr. Pavel Adámek

Školitel/Supervisor:
MUDr. Jiří Paleček, CSc.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

The full text of the thesis is available in the relevant libraries of the Faculty of Science of Charles University.

Abstrakt

Bolest je běžným příznakem mnoha klinických syndromů a nemocí. Zejména léčba bolestí neuropatického původu představuje závažný medicínský problém, neboť dostupná analgesie je v řadě případů neúčinná, nebo má výrazné nežádoucí účinky. Vývoj nových analgetických přístupů a úspěšná léčba bolesti proto vyžaduje podrobnou znalost mechanismů vzniku akutních i chronických bolestivých stavů. Proces vzniku, kódování a přenosu signálů o bolestivých podnětech zprostředkovává nociceptivní systém, který je klíčový pro vznik vjemu bolesti v mozku. Modulace nociceptivního synaptického přenosu v zadním rohu míšním představuje důležitý mechanismus ve vývoji a udržování různých patologických stavů bolesti.

Tato disertační práce se zaměřila na zkoumání a objasnění některých mechanismů podílejících se na zpracování a modulaci míšního nociceptivního synaptického přenosu u různých bolestivých stavů. Hlavní pozornost byla věnována studiu následujících otázek: (I.) Jakou úlohu mají TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid type 1) kanály, TLR4 (Toll-Like Receptor 4) a PI3K (fosfatidylinositol 3-kináza) v rozvoji neuropatické bolesti po podání chemoterapeutika paclitaxel (PAC) v akutním *in vitro* a subchronickém *in vivo* myším modelu PAC-indukované periferní neuropatie (PIPNe)? (II.) Do jaké míry je ovlivněna míšní inhibiční synaptická kontrola u animálního modelu bolestivých stavů PIPNe, akutního periferního zánětu a chronického konstriktivního poranění sedacího nervu (CCI) u transgenního kmene myši VGAT-ChR2-eYFP? (III.) Jak ovlivní inhibice sodíkového kanálu $Na_v1.7$ specifickým antagonistou protoxinem II spinální nociceptivní signalizaci u modelu termálního poškození kůže? (IV.) Jak 20:4-NAPE, prekurzor anandamidu (AEA), moduluje nociceptivní synaptický přenos u modelu akutního periferního zánětu a jakou roli hrají kanabinoidní receptory typu 1 (CB_1) a TRPV1 kanály v tomto procesu?

Pro zkoumání těchto cílů byla využívána metoda patch-clamp v konfiguraci snímání z celé buňky, která nám umožnila snímání excitačních či inhibičních postsynaptických proudů (EPSC, resp. IPSC). Dále bylo využíváno behaviorálního měření mechanické či tepelné citlivosti a imunohistochemická analýza.

Naše výsledky ukázaly, že: (I.) Přímá funkční interakce mezi TLR4 a TRPV1 receptory, zejména prostřednictvím PI3K signalizace, hraje důležitou roli (a) v PAC-indukovaném v nárůstu frekvence miniaturních excitačních postsynaptických proudů (mEPSC) v neuronech zadního rohu míšního, (b) v modulaci a tachyfyxii kapsaicinem vyvolaných odpovědí zprostředkovaných TRPV1 kanály na presynaptických zakončeních primárních aferentů v míše a (c) v PAC-indukované mechanické alodynii. Všechny tyto PAC-indukované změny bylo možné zablokovat inhibítozem PI3K wortmanninem. Mechanismus závislý na TRPV1 je také nezbytný pro PAC-indukované zvýšení exprese proteinu c-Fos v neuronech zadního rohu. (II.) Naše předběžné výsledky poukazují na významnou roli disinhibice v zadním rohu míšním v rozvoji mechanické alodynii ve všech testovaných modelech bolestivých stavů (PIPNe, periferní zánět a CCI). (III.) Inhibitor $Na_v1.7$ kanálu protoxin II významně omezil zvýšenou excitační aktivitu v populaci nociceptivních, kapsaicin-senzitivních neuronů u modelu termálního poškození kůže. (IV.) Potvrdili jsme hypotézu, že 20:4-NAPE slouží jako zdroj pro endogenní syntézu AEA v míše *in vitro* a že inhibiční účinek 20:4-NAPE je zprostředkován mechanismem závislým na CB_1 . Tento analgetický účinek 20:4-NAPE zprostředkovaný CB_1 receptory je však za zánětlivých stavů částečně modifikován dalším mechanismem závislým na aktivaci TRPV1 kanálů.

V souhrnu naše data podporují názor, že modulace nociceptivního synaptického přenosu hraje klíčovou roli ve vývoji různých bolestivých stavů. Přestože primární příčiny a mechanismy vývoje těchto stavů jsou zcela odlišné, změny, ke kterým dochází na úrovni míchy, jsou často velmi podobné a zahrnují nadměrnou excitační aktivitu spolu s disinhibicí. Pochopení těchto mechanismů je nezbytným předpokladem pro navržení nových terapeutických přístupů pro léčbu patologických bolestivých stavů.

Abstract

Pain is a common symptom of many clinical syndromes and diseases. In particular, the treatment of neuropathic pain represents a serious public health issue because currently available analgesia is ineffective in many cases or it has adverse effects. Treatment of pain-related suffering requires knowledge of how pain signals are initially generated and subsequently transmitted by the nervous system. A nociceptive system plays a key role in this process of encoding and transmission of pain signals. Modulation of the nociceptive synaptic transmission in the spinal cord dorsal horn represents an important mechanism in the development and maintenance of different pathological pain states.

This doctoral thesis has aimed to investigate and clarify some of the mechanisms involved in the modulation of the spinal nociceptive processing in different pain states. The main attention was paid to study the following issues: (I.) Which is the role of Transient Receptor Potential Vanilloid type 1 channels (TRPV1), Toll-Like Receptors 4 (TLR4), and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) in the development of neuropathic pain induced by paclitaxel (PAC) chemotherapy in acute *in vitro*, and subchronic *in vivo* murine model of PAC-induced peripheral neuropathy (PIPN)? (II.) How is affected spinal inhibitory synaptic control under different pain states, using VGAT-ChR2-eYFP transgenic mice model of PIPN, acute peripheral inflammation, and chronic constriction injury (CCI)? (III.) How does the Na_v1.7 receptor blocker protoxin II affect the spinal nociceptive signaling in the model of burn injury? (IV.) How 20:4-NAPE, the precursor of anandamide (AEA), modulates the nociceptive synaptic transmission under the acute inflammatory condition and which role plays cannabinoid (CB₁) receptors and TRPV1 channels in this process?

To investigate these aims, the main method used was the whole-cell patch-clamp recording of excitatory- and/or inhibitory postsynaptic currents (EPSCs, respectively IPSCs). We also used behavioral measurement of mechanical/thermal sensitivity and immunohistochemistry.

Our results have shown that: (I.) Direct functional interaction between TLR4 and TRPV1 receptors, in particular via PI3K signaling, play an important role in (a) PAC-induced increase of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) frequency in dorsal horn neurons, (b) in the modulation of TRPV1 sensitivity and tachyphylaxis of capsaicin-evoked responses, and (c) in the PAC-induced mechanical allodynia. All these PAC-induced changes have been prevented by PI3K blocker wortmannin. The TRPV1-dependent mechanism is also necessary to PAC-induced enhancement of c-Fos expression in the dorsal horn neurons. (II.) Our preliminary data clearly demonstrates that disinhibition occurs in a significant manner in all tested models of pain (PIPN, peripheral inflammation, and CCI). (III.) Na_v1.7 receptor blocker protoxin II significantly reduced aberrant activity induced by burn injury in the population of capsaicin-sensitive nociceptive spinal cord dorsal horn neurons in the rat. Finally, (IV.) we confirmed the hypothesis that 20:4-NAPE serves as a source for endogenous AEA synthesis in the spinal cord *in vitro*. Inhibitory effect of 20:4-NAPE is mediated by CB₁-dependent mechanism. However, this CB₁-mediated analgesic effect of 20:4-NAPE, is under inflammatory conditions partly modified by an additional TRPV1-dependent mechanism.

In summary, these data support the view that spinal nociceptive modulation plays a key role in the development of different pain states. Although the primary causes and mechanisms of development are often entirely different, the changes that occur at the spinal cord level are often very similar, and include excessive excitatory activity, together with disinhibition. Understanding these mechanisms is necessary for the improvement of pain therapy in the future.

Obsah / List of Contents

<i>Abstrakt</i>	1
<i>Abstract</i>	2
<i>Obsah / List of Contents</i>	3
<i>Seznam zkratek / List of Abbreviations</i>	4
A. ČESKÁ ČÁST	5
1. ÚVOD	5
2. CÍLE PRÁCE	7
3. MATERIÁL A METODIKA	7
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	10
6. ZÁVĚR	13
B. ENGLISH PART	15
1. INTRODUCTION	15
2. AIMS OF THE THESIS	17
3. MATERIALS AND METHODS	17
4. RESULTS AND DISCUSSION	20
6. CONCLUSION	23
<i>Seznam použité literatury / References</i>	24
<i>Curriculum Vitae</i>	27
<i>Seznam publikací / List of Publications</i>	29

Seznam zkratek / List of Abbreviations

20:4-NAPE	<i>N</i> -arachidonoylphosphatidylethanolamine	<i>N</i> -arachidonoylphosphatidylethanolamin
AEA	Anandamid	Anandamide
Akt	Akt kináza/Protein kináza B	Akt kinase/Protein kinase B
CB₁	Kanabinoidní receptor typu 1	Cannabinoid receptor 1
CCI	Chronická konstriktce sedacího nervu	Chronic constriction injury of sciatic nerve
CIPN	Chemoterapií indukovaná periferní neuropatie	Chemotherapy-induced peripheral neuropathy
DH	Zadní roh míšni	Dorsal horn of spinal cord
DRG	Dorzální spinální ganglia	Dorsal root ganglion
eCB	Endogenní kanabinoid	Endocannabinoid
EPSC	Excitační postsynaptický proud	Excitatory postsynaptic current
IPSC	Inhibiční postsynaptický proud	Inhibitory postsynaptic current
LPS	Lipopolysacharid	Lipopolysaccharide
le-IPSC	Světelnou stimulací evokovaný inhibiční postsynaptický proud	Light evoked-inhibitory postsynaptic current
Na_v1.7	Napětově aktivovaný sodíkový kanál typu 1.7	Voltage-gated sodium channel type 1.7
PAC	Paclitaxel	Paclitaxel
P-APS	Syndrom akutní bolesti indukované paclitaxelem	Paclitaxel-induced acute pain syndrome
PI3K	Fosfatidylinositol 3-kináza	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP_N	Paclitaxelem indukovaná periferní neuropatie	Paclitaxel-induced peripheral neuropathy
PKC	Protein kináza C	Protein kinase C
ProTxII	Protoxin II (inhibitor Na _v 1.7 kanálu)	Protoxin II (inhibitor of Na _v 1.7 channel)
STAURO	Staurosporin (Ser/Thr kinázový inhibitor, např. PKC)	Staurosporine (inhibitor of Ser/Thr kinase, e.g. PKC)
TLR4	Toll-like receptor 4	Toll-like receptor 4
TRPV1	TRP (Transient Receptor Potential) Vaniloidní kanál typu 1	Transient Receptor Potential Vanilloid type 1
WMN	Wortmannin (PI3K inhibitor)	Wortmannin (inhibitor of PI3K)

A. ČESKÁ ČÁST

1. ÚVOD

Pochopení mechanismů vzniku bolestivých stavů představuje jeden z nejstarších problémů v historii medicíny. Potíž spočívá ve skutečnosti, že vnímání bolesti je komplexní biopsychosociální fenomén, který vzniká z interakce více neuroanatomických a neurochemických systémů s řadou kognitivních a afektivních procesů [16].

Bolest je obvykle vyvolána tehdy, jsou-li nociceptory vystaveny různým podnětům škodlivé intenzity [47]. Ačkoliv je AKUTNÍ NOCICEPTIVNÍ BOLEST doprovázena nepříjemným pocitem, představuje důležitý fyziologický mechanismus, který pomáhá chránit naše tělo před škodlivými a poškozujícími stimuly. Bolest je však také běžným nepříjemným příznakem mnoha klinických syndromů a nemocí, kdy ztrácí svou ochrannou funkci a způsobuje utrpení pacientů. Léčba CHRONICKÉ a NEUROPATICKÉ BOLESTI představuje závažný problém, protože v současnosti dostupná analgezie je často nedostatečně účinná, nevhodná nebo má v mnoha případech nepříznivé účinky [14; 18; 32; 33].

ZADNÍ ROH (DH) míšní představuje hlavní modulační centrum nociceptivní dráhy na cestě z periferie do vyšších mozkových center, protože se zde nachází první synapse dráhy bolesti. Modulace v dorzálním rohu může významně ovlivnit nociceptivní signalizaci a následně vnímání bolesti, zejména za různých patologických stavů [22; 43; 51; 52].

• Paclitaxelem-indukovaná neuropatická bolest & paclitaxelem-indukovaný syndrom akutní bolesti

Paclitaxel (PAC) je chemoterapeutické léčivo hojně používané v klinické praxi pro léčbu solidních tumorů, jako je rakovina prsu, vaječníků, prostaty a plic. Užívání chemoterapeutika PAC však běžně doprovází nežádoucí vedlejší účinky v podobě chronické bolestivé CHEMOTERAPIÍ-INDUKOVANÉ PERIFERNÍ NEUROPATIE (CIPN). Ta je často doprovázená *neuropatickou bolestí a syndromem paclitaxelem-indukované akutní bolesti* (P-APS) [28; 32; 46].

Příznaky doprovázející CIPN mohou být natolik obtěžující, že mohou vést až k snížení dávky chemoterapie nebo dokonce k ukončení léčby, což může být ve svém důsledku spojeno s horší mírou přežití. Bylo prokázáno, že prevalence CIPN je v prvním měsíci chemoterapie přítomna až u 68 % pacientů [37]. V současné době neexistuje účinná prevence CIPN a existují pouze omezené možnosti jak pomoci pacientům s již rozvinutou chronickou CIPN [15; 37]. Jak chronická bolestivá CIPN, tak P-APS jsou často rezistentní vůči standardním analgetikům. Navzdory širokému použití PAC v klinické praxi nejsou mechanismy chronické CIPN a P-APS dostatečně pochopeny. Největší část našich experimentů byla proto věnována studiu mechanismů vzniku neuropatické bolesti, respektive P-APS u PAC-indukované CIPN (PIPIN).

Rostoucí množství důkazů ukazuje, že PAC může mimikovat aktivitu prototypického agonisty Toll-like receptoru 4 (TLR4), bakteriálního lipopolysacharidu (LPS) [5; 18], a že TLR4 hraje důležitou roli ve vývoji PIPIN asociované s neuropatickou bolestí a P-APS [22; 23; 44; 46]. Dále bylo popsáno, že: (I.) Dorzální ganglia (DRG) představuje hlavní místo akumulace PAC v periferním nervovém systému; (II.) PAC může v nízkých koncentracích pronikat přímo do míchy (kde může potenciálně modulovat synaptický přenos) [7; 19; 46]; (III.) LPS může prostřednictvím TLR4-dependentního

mechanismu modulovat funkci TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) kanálů [10] — jedné z klíčových molekul v modulaci nociceptivního synaptického přenosu v DH [42]. Tato zjištění naznačují, že PAC-indukovaná signalizace mezi TLR4 a TRPV1 může ovlivnit synaptický přenos v rámci DH.

• *Úloha inhibiční transmise v patologii různých bolestivých stavů*

Rovnováha mezi excitačními a inhibičními mechanismy je zásadním předpokladem pro udržení normálního vnímání bolesti. Narušení této vratké rovnováhy, například v důsledku disinhibice (ztráty/oslabení inhibičního přenosu) nebo v důsledku senzitivizace excitační složky, může vést k alodynii, tj. stavu, kdy jsou jako bolestivé vnímány i jemné hmatové podněty [38]. Předpokládá se, že snížení aktivity inhibičních (GABAergních a glycinergních) spinálních obvodů může přispívat k rozvoji zánětlivé a neuropatické bolesti mnohem více než zvýšená citlivost samotných senzoryckých/excitační neuronů [49].

Proto jsme se v našich pilotních experimentech zabývali porovnáním změn v inhibiční transmisi u zvířecích modelů PIPN, chronické strikce sedacího nervu (CCI) a akutního periferního zánětu navozeného karagenanem. Ke studiu této otázky jsme využívali transgenního kmene myši VGAT-ChR2-eYFP. Tento kmen exprimuje světlo-citlivý kationtový kanál channelrhodopsin-2 (ChR2), a to pouze v populaci inhibičních interneuronů, což nám umožňuje rozlišovat mezi excitačními a inhibičními neurony a zároveň selektivně aktivovat pouze inhibiční interneurony za použití LED stimulace (470 nm).

• *Inhibice $Na_v1.7$ na míšní úrovni jako potenciální analgetický přístup pro zmírnění bolesti při popáleninovém traumatu*

Napětově řízený sodíkový kanál $Na_v1.7$ hraje u člověka zásadní roli v normálním vnímání bolesti [10]. Nedávné poznatky naznačují, že by inhibice $Na_v1.7$ v primárních senzoryckých neuronech mohla poskytnout slibný přístup ke kontrole bolesti u pacientů s popáleninami [7; 35; 38]. Proto jsme se zaměřili na tuto problematiku v našich experimentech, ve kterých jsme sledovali účinnost $Na_v1.7$ inhibitoru protoxinu II (ProTxII) na synaptický přenos na míšní úrovni při popáleninovém traumatu kůže na zvířecím modelu termálního poškození kůže [44].

• *Mechanismus 20:4-NAPE-zprostředkované modulace nociceptivního synaptického přenosu za normálních a zánětlivých podmínek*

20:4-NAPE (*N*-arachidonoylfosfatidylethanolamin) je prekurzor endogenního endokanabinoidu (eCB) anandamidu (AEA). eCB, jako např. AEA, hrají důležitou roli v modulaci a zpracování spinálního nociceptivního synaptického přenosu a mohou významně ovlivnit vnímání bolesti. AEA je považován za endogenního agonistu kanabinoidních receptorů typu 1 (CB_1) a také TRPV1 kanálů [53]. Za fyziologických podmínek mají eCB obecně analgetický účinek a zmírňují tedy nociceptivní signalizaci. Proto mohou být léčiva na bázi eCB považovány za vhodná ke zmírnění akutní a chronické bolesti [26; 32]. Na druhé straně, aktivace TRPV1 kanálů prostřednictvím eCB je primárně pronociceptivní a prozánětlivá, protože je známo, že aktivace TRPV1 může také podporovat tzv. neurogenní zánět prostřednictvím uvolňování neuropeptidů [46]. I přes tuto skutečnost však může být modulace TRPV1 kanálů eCB významná při léčbě bolesti a analgezií [31].

V našich experimentech jsme testovali, jak prekurzor AEA, 20:4-NAPE, moduluje nociceptivní míšní synaptický přenos za kontrolní situace a u modelu akutního periferního zánětu navozeného karagenanem.

2. CÍLE PRÁCE

I přes významný pokrok moderní medicíny a léčebných metod představuje léčba chronické a neuropatické bolesti stále významný problém. Přestože mnoho modulačních mechanismů nociceptivního synaptického přenosu bylo již identifikováno a popsáno, mnoho dalších mechanismů zůstává neobjasněno. Hlavní pozornost byla proto věnována studiu mechanismu PAC-indukované neuropatické bolesti, respektive P-APS. Dále jsme se také věnovali studiu bolestivých stavů způsobených termálním poškozením kůže, bolestem vyvolaným periferním zánětem a neuropatické bolesti vyvolané chronickou konstrikcí sedacího nervu. Ačkoli mají tyto bolestivé stavy zcela odlišné primární příčiny a mechanismy vzniku, jeden aspekt je pro všechny stejný — změny v modulaci nociceptivního synaptického přenosu na míšní úrovni.

V našich experimentech jsme zkoumali následující experimentální otázky:

- (I.) Hlavním cílem práce bylo zjistit: (a) Jaká je úloha TLR4 receptorů a TRPV1 kanálů v rozvoji chronické bolestivé periferní neuropatie vyvolané paclitaxelem? (b) Které intracelulární dráhy a konkrétní kinázy se účastní této signalizace? (c) Pomůže farmakologické ovlivnění těchto signálních drah zmírnit bolest navozenou paclitaxelem v animálním modelu *in vivo*?
- (II.) Jak různé bolestivé stavy ovlivňují inhibiční synaptický přenos v zadním rohu míšním? Cílem bylo popsat a porovnat rozvoj disinhibice v animálních modelech periferní neuropatie vyvolané paclitaxelem, periferního zánětu a chronické konstriktce sedacího nervu.
- (III.) Jak inhibice receptoru Nav1.7 antagonistou protoxinem II ovlivní spinální nociceptivní signalizaci u animálního modelu termálního poškození kůže?
- (IV.) Jak prekurzor anandamidu, 20:4-NAPE, moduluje nociceptivní synaptický přenos za zánětlivých stavů a jakou roli hrají CB₁ receptory v tomto procesu?

3. MATERIÁL A METODIKA

• **Používaná experimentální zvířata:** Dospělí samci myši kmene C57BL/6 o hmotnosti 25 až 30 g, dospělí samci transgenních myší VGAT-ChR2-eYFP linie 8 (The Jackson Laboratory; kat. č.: 014548) a samci potkana kmene Wistar (stáří P19–P21, nebo dospělí jedinci, ~180–200 g). Všechna zvířata byla chována v režimu 12/12 h světlo/tma za stálé pokojové teploty a s volným přístupem k standardní potravě a vodě. Všechny experimenty byly schváleny Etickou komisí Fyziologického ústavu AV ČR, v souladu s platnou legislativou.

• **Model paclitaxelem indukované periferní neuropatie (PIP_N):** Pro indukci PIP_N jsme používali dva experimentální protokoly. V části experimentů byli dospělí samci myši nebo potkani léčeni intraperitoneálně (*i.p.*) jednorázovou aplikací PAC (8 mg/kg; Paclitaxel Mylan). V dalším souboru experimentů jsme podávali čtyři *i.p.* injekce PAC (2 mg/kg)

ob den (dny 0, 2, 4 a 6). Konečná kumulativní dávka tedy byla také 8 mg/kg. Prahová hodnota mechanické citlivosti (PWT) byla testována před (den 0), během (ve dnech 2, 4, 6) a po podávání PAC (den 7). Následně byla zvířata využita pro elektrofyziologický experiment. Kontrolní zvířata byla léčena vehikulem PAC Mylan.

- **Model periferního zánětu:** Periferní zánět byl indukován v 3% isofluranové inhalační anestézií. 1% směs karagenanu ve fyziologickém roztoku (~ 30 μ l) byla použita pro indukci periferního zánětu u dospělých myši, zatímco 3% směs karagenanu s fyziologickým roztokem (~ 50 μ l) byla použita u potkanů ~P20. Karagenan byl podáván subkutánně do obou zadních tlapek. Mechanická citlivost (PWT) nebo latence odtažení tlapy k tepelným podnětům (PWL) byla testována před indukcí zánětu karagenanem (den 0) a po 24 hodinách, před přípravou míšních řezů a elektrofyziologickým experimentem. Jako kontrolní byla používána naivní zvířata.

- **Model chronické konstrikce sedacího nervu (CCI):** CCI byl navozen u dospělých myši v 3% isofluranové inhalační anestézii, pomocí tří volných ligatur, proximálně k trifurkaci sedacího nervu (*nervus ischiadicus*). PWT byl testován před (den 0) a po CCI (1. a 3. den) před přípravou míšních řezů. Jako kontrolní byla používána naivní zvířata.

- **Model termálního poškození kůže:** Byl použit animální model popálenin prvního stupně. Samci krys Wistar (P21) byli hluboce anestetizováni 3% isofluranem. Za nepřetržité hluboké anestézie byly obě zadní tlapy až po kolena ponořeny do vody o teplotě 60 °C (u experimentální skupiny) nebo 37 °C (u kontrolní/sham skupiny) po dobu 2 minut. Kontinuální anestézie (isofluran, 3%) byla udržována po dobu dalších 60 minut. Následně byly připraveny míšní řezy pro elektrofyziologický experiment.

- **Příprava míšních řezů:** Stejný experimentální protokol byl použit jak pro dospělé myši, tak pro přípravu míšních řezů u mladých potkanů. Laminektomie byla provedena v hluboké 3% isofluranové inhalační anestézii (Forane, Abbott), následně byla bederní část míchy vyjmuta a přenesena do vychlazeného (~4 °C) disekčního roztoku, obsahujícího (v mM) 95 NaCl, 1,8 KCl, 7 MgSO₄, 0,5 CaCl₂, 1,2 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 25 D-glukózu a 50 sacharózu. Zvířata byla následně usmrcena přerušením krční míchy. Akutní transverzální míšní řezy o tloušťce 300 μ m byly připraveny ze segmentů L4–L5 s použitím vibratomu VT 1200S (Leica). Řezy byly inkubovány v disekčním roztoku po dobu 30 minut při 35 °C. Následně byly řezy přeneseny do snímacího roztoku a uchovávány při pokojové teplotě (21–24 °C). Snímací roztok použitý během elektrofyziologického měření obsahoval (v mM) 127 NaCl, 1,8 KCl, 1,2 KH₂PO₄, 2,4 CaCl₂, 1,3 MgSO₄, 26 NaHCO₃ a 25 D-glukózu. Všechny extracelulární roztoky byly během celého experimentu syceny karbogenem (95% O₂, 5% CO₂).

- **Elektrofyziologické snímání metodou patch-clamp:** Snímání probíhalo v konfiguraci snímání z celé buňky (tzv. whole-cell) z vizuálně identifikovaných povrchových neuronů DH na mikroskopu Zeiss Axio Examiner A.1., který byl vybaven infračerveným LED-diodovým osvětlením a infračervenou kamerou Grasshopper 3 (Point Gray), připojenou ke standardnímu osobnímu počítači. Snímací elektrody/pipety měly po naplnění intracelulárním roztokem odpor v rozmezí 3,5–7,0 M Ω . Intracelulární roztok obsahoval (v mM): 125 lakton kyseliny glukonové, 15 CsCl, 10 EGTA, 10 HEPES, 1 CaCl₂, 2 Mg₂ATP, 0,5 NaGTP a byl upraven pomocí CsOH na pH 7,2. Elektrofyziologické měření metodou patch-clamp bylo prováděno pomocí zesilovače Axopatch 1D (Axon Instruments) a digitálního převodníku Digidata 1440A (Molecular Devices) při pokojové teplotě (~23 °C). Záznamy byly filtrovány při 2 kHz a digitálně vzorkovány při 10 kHz. Sériový odpor neuronů byl rutinně kompenzována na 80 % a byl sledována během celého experimentu. AMPA receptory-zprostředkované spontánní nebo miniaturní excitační

postsynaptické proudy (sEPSC/mEPSC) byly snímány z vizuálně identifikovaných neuronů DH v lamině I a vnější lamině II_o, při membránovém napětí -70 mV. Snímací roztok pro snímání s/mEPSC obsahoval inhibiční antagonisty, $10 \mu\text{M}$ bicuculin a $5 \mu\text{M}$ strychnin. Pro záznam mEPSC snímací roztok navíc obsahoval tetrodotoxin ($0,5 \mu\text{M}$), tj. blokátor napěťových sodíkových kanálů. Spontánní inhibiční postsynaptické proudy (sIPSC) zprostředkované GABA_A receptory a/nebo glycinovými receptory a IPSC vyvolané světelnou stimulací (le-IPSC) u transgenního modelu byly rutinně zaznamenávány za použití stejného intracelulárního a snímacího roztoku při napětí 0 mV. IPSC byly snímány v přítomnosti antagonisty AMPA receptorů CNQX (20 mM) a blokátoru NMDA receptorů AP5 (25 mM). le-IPSC byly vyvolány foto-stimulací modrým světlem o vlnové délce 470 nm, v sérii deseti 5 ms dlouhých foto-stimulací s frekvencí $0,1$ Hz. Softwarový balíček pCLAMP 10.5 (Axon Instruments) byl použit pro snímání i pro off-line analýzu dat.

• **Imunohistochemická analýza pAkt:** Samci kmene Wistar (180 – 200 g) byly náhodně rozděleny do tří experimentálních skupin: (I.) kontrola (vehikulum *i.p.*); (II.) paclitaxel (skupina PAC; vehikulum *i.p.* + PAC, 8 mg/kg *i.p.*); (III.) wortmannin + paclitaxel (skupina WMN + PAC; WMN $0,6$ g/kg *i.p.* + PAC 8 mg/kg *i.p.*). Zvířata byla 1 hodinu po podání PAC/vehikula hluboce anestetizována ketaminem (100 mg/kg, Narketan, Zentiva) a xylazinem (25 mg/kg, Xylapan, Zentiva) a intrakardiálně perfundována fyziologickým roztokem a následně 4% paraformaldehydem. L5 DRG byly vyjmuty a post-fixovány ve 4% paraformaldehydu při 4 °C po dobu 2 hodin, přes noc. Kryoprotekce byla zabezpečena 30% sacharózou. $16 \mu\text{m}$ tlusté řezy DRG byly zhotoveny v kryostatu Leica CM3000, a následně imunohistochemicky zpracovány. pAkt byla detekována za použití anti-pAkt (Ser473) primární protilátky (rabbit; Cell Signaling Technology, #4060S) a sekundární Cy2 konjugované protilátky (donkey anti-rabbit; Jackson ImmunoResearch Lab.). Oblast pAkt-imunoreaktivity byla v jednotlivých sekcích DRG měřena za použití softwaru ImageJ.

• **Experimentální stanovení uvolňování anandamidu in vitro:** Míšní řezy byly připraveny stejným způsobem jak bylo uvedeno výše, ze samců potkana kmene Wistar (P21). Řezy byly během experimentu inkubovány po dobu 10 minut ve snímacím roztoku (syceném karbogenem) se zvyšující se koncentrací prekurzoru anandamidu — $20:4$ -NAPE ($20 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$, $200 \mu\text{M}$). Po každé 10 minutové inkubaci byl celý objem roztoku odebrán a ihned zmrazen pro pozdější experimentální zpracování metodou hmotnostní spektrometrie (provedeno ve spolupráci s prof. Ing. Ivanem Mikšíkem, DrSc., FgÚ, AV ČR). Odebraný roztok byl ihned nahrazen novým čistým snímacím roztokem, či roztokem s vyšší koncentrací $20:4$ -NAPE, a řezy byly inkubovány po dobu dalších 10 minut.

• **Statistická analýza:** Výsledky byly vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Pro nalezení významných rozdílů mezi skupinami s normální distribucí dat byla použita jednocestná ANOVA následovaná Bonferroniho post hoc testem (vícenásobné porovnání oproti kontrole nebo vícenásobné párové porovnání). Pro nalezení významných rozdílů v jedné skupině během léčby jsme použili jednocestnou metodu ANOVA pro opakovaná měření. Pro porovnání standardizovaných dat s ne-normální distribucí byl použit neparametrický Wilcoxonův Signed Rank test. Pokud to bylo nutné, byl rozdíl mezi testovanými skupinami zjišťován s použitím párového t-testu/t-testu s Bonferroniho korekcí (při opakovaném testování téže skupiny). Behaviorální data byla analyzována pomocí dvoucestné metody ANOVA (treatment \times time) a následným vícenásobným porovnáním (Bonferroniho post hoc test). Kritériem pro statistickou významnost byla hodnota $P < 0,05$.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

• *TLR4* receptory, *TRPV1* kanály a *PI3-kináza* hrají významnou roli v rozvoji PAC-indukované neuropatické bolesti:

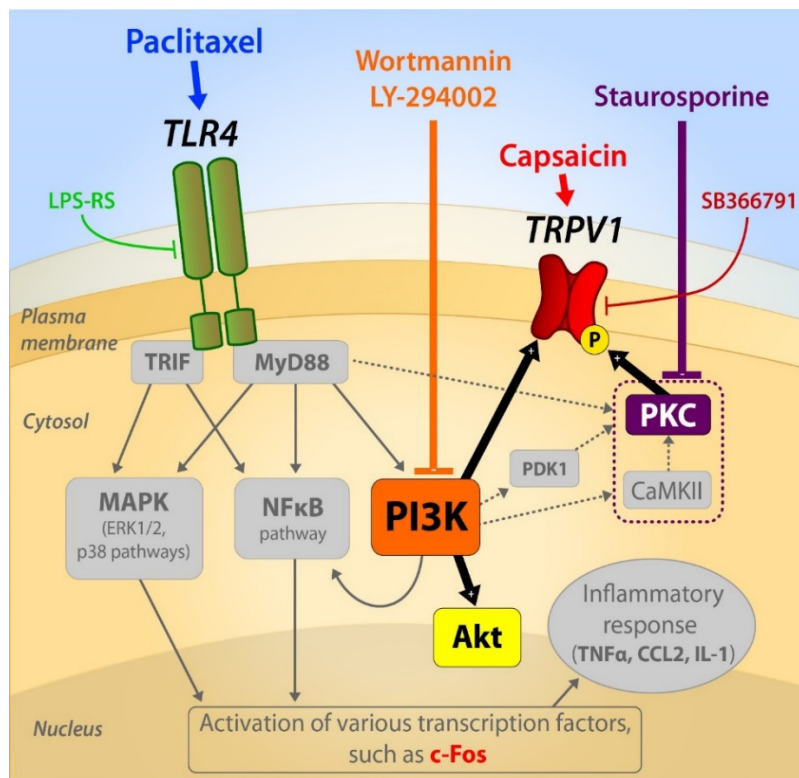
V našich experimentech jsme jako první prokázali, že akutní podání PAC (50 nM) prostřednictvím modulace funkce *TRPV1* kanálů zvyšuje uvolňování glutamátu z presynaptických zakončení v zadním rohu míšním. PAC zvýšil frekvenci mEPSC na 141 % bazální kontrolní frekvence. Tento účinek PAC byl zablokovan podáním *TRPV1* antagonisty SB366791, což naznačuje *TRPV1*-dependentní mechanismus.

Rovněž jsme prokázali, že PAC prostřednictvím *TLR4*-dependentního mechanismu zvyšuje výlev glutamátu vyvolaný aktivací *TRPV1* kanálů agonistou kapsaicinem. Zatímco za kontrolních podmínek dochází při opakovaném podání kapsaicinu k výrazné tachyfylixi/snížení druhé odpovědi (33 %), po podání PAC (50 nM) byla tachyfylyse výrazně zablokována a druhá odpověď byla takřka srovnatelná s první (91 %; frekvence mEPSC druhé kapsaicinové odpovědi byla vyjádřena v procentech první odpovědi, tj. 100 %). Tato data prokazují, že po podání PAC dochází k modulaci funkce *TRPV1* receptorů, což může v důsledku vést ke zvýšenému výlevu glutamátu v zadním rohu míšním. Kromě toho naši kolegové z University of Texas M. D. Anderson Cancer Center potvrdili, že k přímé funkční interakci mezi *TLR4* a *TRPV1* dochází také v potkáních a lidských DRG neuronech a *TLR4/TRPV1*-transfekovaných HEK293 buňkách [24].

V našich následujících experimentech jsme ukázali, že PAC (100 nM) vede v zadním rohu míšním ke zvýšené expresi proteinu c-Fos, a to prostřednictvím *TRPV1*-dependentního mechanismu [19]. Tyto výsledky naznačují, že PAC vede k zvýšené aktivaci a senzitivaci neuronů zadního rohu míšního [9; 22; 40; 41].

Nedávno jsme také jako první ukázali, že signalizace prostřednictvím *PI3K*-signální dráhy hraje důležitou roli v časném vývoji a udržování mechanické alodynie v myším modelu PIPN (8 mg/kg, PAC *i.p.*, jednorázové podání). Ukázali jsme, že jednorázové podání *PI3K* inhibitoru wortmanninu (WMN, 0,6 mg/kg, *i.p.*) 1 h před podáním PAC významně zmírnilo zvýšenou mechanickou senzitivitu a to až po dobu osmi dní po podání PAC. Premedikace WMN před samotným PAC rovněž zabránila změnám v tachyfylixi *TRPV1*-zprostředkovaných kapsaicinových odpovědí v elektrofyziologickém *in vitro* experimentu. Výsledky *in vitro* experimentů s akutními PAC aplikacemi spolu s *PI3K* antagonisty WMN nebo LY-294002 podporují naše *in vivo* nálezy ve všech testovaných situacích. Blokování aktivity serin/threonin kináz (jako je např. PKC, PKA a CaMKII) pomocí antagonisty staurosporinu bylo účinné v akutních *in vitro* experimentech a první den behaviorální studie, nemělo však významný vliv později, během následujících osmi dní po aplikaci PAC. Zapojení *PI3K* bylo potvrzeno také imunohistochemickou analýzou markeru *PI3K* aktivity, tj. fosforylované formy Akt kinázy (pAkt) v DRG neuronech po akutním podání PAC 8 mg/kg *in vivo*. Analýza pAkt imunoaktivity odhalila, že PAC indukuje významné zvýšení pAkt v populaci neuronů s malým až středním průměrem těla (<25 μ m), což zahrnuje zejména nociceptivní neurony malé a střední velikosti s C- a/nebo A δ -vlákny. Premedikace WMN před podáním PAC významně snížila účinek PAC na fosforylaci Akt [1].

Schéma námi navrženého signálního mechanismu PAC-indukované modulace funkce *TRPV1* kanálů prostřednictvím *TLR4/PI3K*-dependentní dráhy je znázorněn na Obr. 1 na str. 11. Tato modulace může ve svém důsledku vést k zvýšenému výlevu neurotransmiterů z presynaptických zakončení nociceptivních DRG neuronů.



Obr. 1.: Navrhovaná signální dráha PAC-indukované modulační funkce TRPV1 kanálů v nociceptivních neuronech DRG, resp. jejich presynaptických zakončeních v zadním rohu míšním. Signalizace testovaná v našich experimentech je naznačena barevně, zatímco jiné signální dráhy popsané v literatuře jsou naznačeny šedě. K transdukcii signálu po aktivaci TLR4 dochází prostřednictvím dvou adaptorových signálních molekul MyD88 (Myeloid-differentiation response gen 88) a TRIF (Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter-inducing interferon- β). Signální dráha fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K) může být po aktivaci TLR4 stimulována mechanismem závislým na MyD88 [23]. Aktivace TLR4 může také aktivovat protein kinázu C (PKC; přerušované čáry) a to přes MyD88 [13], případně může být PKC aktivována prostřednictvím PI3K a CaMKII [5], a nebo PDK1 kinázy [12]. Naše experimenty ukázaly, že PI3K inhibitory wortmannin a LY-294002, a dále také inhibitor serin/threonin kinázy staurosporin, zabránily PAC-indukovaným změnám v tachyfylixi reakcí vyvolaných kapsaicinem *in vitro*. Kromě toho, inhibice PI3K wortmanninem významně blokovala rozvoj mechanické alodynie *in vivo*.

• **Disinhibice je významným podkladem patologických změn v animálních modelech PIPN, CCI a periferního zánětu:**

Naše předběžné výsledky jasně ukazují, že u různých bolestivých stavů dochází v podobném rozsahu k významným změnám v inhibiční kontrole spinální synaptické transmise.

Naše výsledky ukazují, že u modelu PIPN, CCI a periferního zánětu dochází k narušení rovnováhy mezi excitačním a inhibičním synaptickým přenosem v excitačních neuronech zadního rohu míšního. Výsledky ukazují, že zatímco frekvence sEPSC, měřená v excitačních neuronech DH v lamině I–II, vzrostla ve všech experimentálních skupinách ve srovnání s kontrolní skupinou, tak v případě sIPSC došlo ve všech skupinách k významnému snížení frekvence sIPSC. Tato zjištění jsou v souladu s již dříve publikovanými studiemi [2; 28; 36; 49]. Tyto výsledky přinejmenším částečně vysvětlují vznik bolestivých stavů (mechanické alodynie) v námi testovaných modelech/podmínkách.

Pomocí optogenetického přístupu jsme zjistili, že amplituda le-IPSC, indukovaného fotostimulací všech ChR2-exprimujících inhibičních neuronů se také významně snížila. Tato data jasně naznačují, že ve všech testovaných modelech došlo k významnému rozvoji disinhibice v DH. Tyto předběžné výsledky však jasně neodpovídají na otázku, zda jsou tyto změny zprostředkovány presynaptickými, či postsynaptickými mechanismy. Proto je nezbytné provést další podrobnější experimenty, například tzv. „paired-pulse ratio“ stimulaci, abychom mohli jasněji definovat úlohu pre- nebo postsynaptických mechanismů, zodpovědných za pozorované změny.

• *Inhibitor $Na_v1.7$ kanálu ProTxII významně snižuje zvýšenou excitační aktivitu v populaci spinálních nociceptivních neuronů u modelu termálního poškození kůže:*

Náš elektrofyziologický experiment prokázal důležitou úlohu $Na_v1.7$ v modulaci spinálního nociceptivního přenosu u modelu termálního poškození kůže, v rozsahu popálenin I.–II. stupně, které zahrnuje poškození epidermis a případně i horních částí dermis. Frekvence sEPSC byla ve srovnání s kontrolními zvířaty (0,8 Hz) signifikantně zvýšena po navození termálního poškození kůže (3,1 Hz). Akutní aplikace ProTxII neovlivnila frekvenci sEPSC za kontrolních podmínek, nicméně ProTxII významně snížil frekvenci sEPSC v míšních řezech připravených z jedinců s termálním poškozením (2,1 Hz, 61%) [44]. Naši spolupracovníci z Imperial College London navíc ukázali, že termální poškození významně zvyšuje expresi proteinu $Na_v1.7$ v segmentech L4–L5 DRG, a to ipsilaterálně k termálnímu poškození [44]. Podobná up-regulace byla dříve ukázána také u jiných modelů, např. modelu periferního zánětu [4; 17]. Termální poškození indukovalo také bifázickou upregulaci exprese fosforylované formy transkripčního faktoru CREB (cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element-binding protein; pCREB) [44]. ProTxII účinně snížil nejen nadměrnou excitační aktivitu v DH, ale také významně snížil up-regulaci fosforylované formy kinázy ERK1/2 (pERK1/2), vyvolanou termálním poškozením, a fosforylaci serinu 10 v histonu H3 (pS10H3), což je nový marker aktivace nociceptivních neuronů DH [45].

V souhrnu naše výsledky ukázali, že ProTxII významně snižuje aberantní aktivitu indukovanou termálním poškozením v populaci nociceptivních (kapsaicin sensitivních) neuronů zadního rohu míšního. Inhibice $Na_v1.7$ na míšní úrovni tedy představuje potenciálně slibný terapeutický přístup, který by mohl mít významný analgetický účinek s výrazně nižšími vedlejšími účinky než opioidy, které jsou v současnosti používány při léčbě pacientů s popáleninami [44].

• *Periferní zánět ovlivňuje modulační mechanismy prekurzoru AEA, 20:4-NAPE:*

Ukázali jsme, že aplikace substrátu pro syntézu AEA, 20:4-NAPE (NAPE), vedla *in vitro* k zvýšení produkce AEA v míše. Ačkoli nemůžeme kategoricky vyloučit přímé účinky samotného NAPE nebo nepřímé účinky jiných metabolitů souvisejících s NAPE/AEA na některé jiné receptory, předpokládáme, že většina pozorovaných účinků indukovaných NAPE, potažmo syntetizovaným AEA, je zprostředkována výhradně CB_1 receptory a TRPV1 kanály [29]. Tento předpoklad je v souladu s předchozími zjištěními [53].

V našich elektrofyziologických experimentech jsme porovnávali účinek NAPE v kontrolních podmínkách a u zvířat s akutním periferním zánětem. Zatímco NAPE inhibovalo excitační synaptický přenos (sEPSC a eEPSC) jak za kontrolních podmínek, tak u zánětu, akutní periferní zánět změnil mechanismus NAPE- (resp. AEA)-indukované modulace na míšní úrovni u potkanů. Ukázali jsme totiž, že při zánětu vede inhibice CB₁ receptorů pomocí blokátoru PF514273 (0,2 μM) k „odhalení“ potenciačního účinku NAPE na frekvenci sEPSC. Tomuto zvýšení frekvence sEPSC bylo možné zamezit blokádou TRPV1 kanálů antagonistou SB366791 (10 μM). Lze předpokládat, že toto TRPV1-dependentní zvýšení frekvence sEPSC je důsledkem tonické aktivace TRPV1 receptorů během zánětu. Nicméně potenciační účinek NAPE, resp. AEA na TRPV1 byl relativně slabý a byl odhalen pouze po inhibici CB₁ receptorů [29]. V konečném důsledku však tato tonická aktivace TRPV1 může působit až anti-nociceptivně, neboť je známo, že aktivace TRPV1 tlumí na akčním potenciálu závislé eEPSC [3].

V souhrnu naše data ukazují, že za kontrolních podmínek jsou inhibiční účinky NAPE zprostředkovány výhradně CB₁ receptory, zatímco po navození akutního periferního zánětu je zapojen také TRPV1-dependentní mechanismus [29]. Naše výsledky rovněž naznačují, že by aplikace substrátu (např. NAPE) pro lokální syntézu AEA mohla představovat účinnější analgetický přístup, než systémová aplikace AEA nebo inhibice jeho degradace [26].

6. ZÁVĚR

Zadní roh míšní představuje hlavní modulační místo nociceptivní dráhy, neboť se zde nachází první synapse na „dráze bolesti“ z periferie do centrální nervové soustavy. Modulace na míšní úrovni je potenciálně klinicky velice výhodná, protože vhodné ovlivnění/modulace nociceptivního synaptického přenosu v zadním rohu míšním by mohlo zmírnit vnímání bolesti bez ovlivnění vyšších mozkových center.

V této disertační práci jsou prezentovány výsledky z pěti původních článků a také nepublikované výsledky, všechny zaměřené na mechanismy modulace nociceptivního synaptického přenosu za patologických bolestivých stavů.

V modelu periferní neuropatie indukované paclitaxelem jsme poprvé ukázali, že přímá funkční interakce mezi TLR4 receptory a TRPV1 kanály hraje důležitou roli v aktivaci a senzitivaci neuronů *in vitro*, a také v rozvoji mechanické hypersenzitivity *in vivo* v animálním modelu PIPN [24]. V naší následující studii jsme prokázali, že mechanismus závislý na TRPV1 kanálech je nezbytný pro PAC-indukované zvýšení exprese c-Fos proteinu v neuronech DH [19]. V současné době jsme také ukázali, že PI3K hraje důležitou úlohu (I.) v PAC-indukované mechanické alodynii, (II.) v modulaci citlivosti TRPV1 kanálů a (III.) v modulaci tachyfylaxe kapsaicinových odpovědí [1].

Dále jsme popsali mechanismus analgetického účinku 20:4-NAPE, který se zdá být vhodným zdrojem pro endogenní syntézu AEA. Ačkoliv je za kontrolních podmínek inhibiční efekt 20:4-NAPE, potažmo AEA, zprostředkován výhradně CB₁ receptory, zdá se, že po navození zánětu je tento mechanismus doplněn o TRPV1-dependentní mechanismus [29].

V další studii jsme prokázali, že inhibitor Na_v1.7 kanálu ProTxII v modelu termálního poškození kůže výrazným způsobem tlumí zvýšenou excitační aktivitu indukovanou termálním poškozením v populaci nociceptivních neuronů DH, což může ve svém důsledku působit analgeticky [44].

Konečně, naše předběžné údaje naznačují, že disinhibice významně přispívá k rozvoji mechanické alodynie a ke změnám v synaptickém přenosu v DH u všech testovaných modelů bolestivých stavů, tj. PIPN, CCI a v modelu akutního periferního zánětu.

Tyto výsledky jasně ukazují, že nociceptivní synaptický přenos je podstatně ovlivněn a modulován za patologických bolestivých stavů a že vhodná farmakologická intervence/léčba může pomoci zmírnit aberantní nociceptivní přenos *in vitro*, či chování související s bolestí u zvířat *in vivo*.

Nicméně, další výzkum a hlubší pochopení těchto komplikovaných procesů modulace spinální nociceptivní transmise je nezbytným předpokladem pro zlepšení stávajících a vývoj nových terapeutických přístupů pro účinnou léčbu chronických a neuropatických stavů bolesti v budoucnosti.

B. ENGLISH PART

1. INTRODUCTION

An understanding of pain mechanisms represents one of the oldest problems in the history of medicine. The difficulty lies in the fact that pain perception is a complex biopsychosocial phenomenon that arises from the interaction of multiple neuroanatomical and neurochemical systems with a number of cognitive and affective processes [16].

Pain is usually induced following exposure of nociceptors to different stimuli of noxious intensity [47]. Although ACUTE NOCICEPTIVE PAIN is accompanied by an unpleasant sensation, it represents an important physiological mechanism, which helps protect our bodies from harmful and damaging stimuli. However, pain is also a common annoying symptom of many clinical syndromes and diseases, when it loses its protecting function and cause the suffering of patients. In particular, the treatment of CHRONIC and NEUROPATHIC PAIN represents a serious issue because currently available analgesia is ineffective, inappropriate or it has adverse effects in many cases [14; 18; 32; 33].

The DORSAL HORN (DH) of the spinal cord represents a major modulatory site of the nociceptive pathway because there is located the first synapse of the pain pathway. Modulation in the dorsal horn may significantly influence the nociceptive signaling and subsequently pain perception, especially under different pathological conditions [22; 43; 51; 52].

• *Paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain & paclitaxel-induced acute pain syndrome*

Chemotherapeutic drug paclitaxel (PAC) is a frontline chemotherapeutic agent widely used in clinical practice for the treatment of solid tumors such as breast, ovarian, prostate and lung cancer. However, chemotherapy with PAC is commonly associated with the development of chronic painful CHEMOTHERAPY-INDUCED PERIPHERAL NEUROPATHY (CIPN), accompanied with *neuropathic pain* and *acute pain syndrome* (P-APS) as adverse debilitating side effects [30; 34; 50]. CIPN symptoms may require chemotherapy dose reduction or cessation that may be linked with poorer survival rates. The prevalence of CIPN was up to 68 % when measured in the first month after chemotherapy [37]. There is no effective CIPN prevention strategy; there is only limited evidence of effective drugs for the treatment of established chronic CIPN [15; 37]. Both chronic painful CIPN and P-APS are often resistant to standard analgesic treatments. Despite the widespread use of PAC in clinical practice, mechanisms of both chronic CIPN and P-APS remain insufficiently understood. Therefore, the largest part of our experiments was devoted to a study of the mechanisms of PAC-induced CIPN (PIPIN).

A growing body of evidence indicates that PAC can mimic the activity of prototypical TLR4 agonist—bacterial LPS [6; 20] and that TLR4 play important role in the development of PIPIN associated with neuropathic pain and P-APS [24; 25; 48; 50]. Moreover, it has been reported previously that: (I.) DRG represents the main site of PAC accumulation in the peripheral nervous system (PNS); (II.) Low concentration of PAC may also penetrate into the spinal cord [8; 21; 50]; (III.) LPS may via TLR4-dependent mechanism modulate the function of TRPV1 channels [11]—one of the key molecules in the nociceptive synaptic transmission modulation in the DH [42]. These findings

suggest that PAC-induced signaling between TLR4 and TRPV1 may affect synaptic transmission within the DH.

- ***The role of disinhibition in the pathology of different pain states***

The balance between excitatory and inhibitory mechanisms is essential to maintain normal pain perception. Disturbance of this balance, for example, due to *disinhibition* (loss/weakening of inhibitory transmission) or due to *sensitization* of excitatory component, can lead to allodynia, when light tactile stimuli are perceived as painful [39]. It has been suggested, that reducing the activity of inhibitory—GABAergic and glycinergic spinal circuits can contribute to the development of inflammatory and neuropathic pain much more than the increased sensitivity of sensory neurons themselves [51].

Therefore, we compare in our pilot experiments, how animal models of PIPN, CCI, and acute peripheral inflammation affect/diminish the synaptic transmission in the DH of the spinal cord in transgenic mice VGAT-ChR2-eYFP. This transgenic strain express channelrhodopsin-2 (ChR2) only in the population of inhibitory interneurons, which allows us to distinguish between excitatory/inhibitory neurons and selectively activate only inhibitory interneurons, using optogenetic approach and LED illumination (470 nm).

- ***Inhibition of $Na_v1.7$ sodium channel at the spinal cord as a potential analgesic approach to alleviate burn injury-induced pain***

The voltage-gated sodium channel $Na_v1.7$ plays an essential role in normal pain perception in humans [10]. Recent findings suggest that inhibition of $Na_v1.7$ in primary sensory neurons could provide a promising approach to control pain in patients with burn injury [7; 35; 38]. Therefore, we focused this issue in our experiments, in which we study the effectiveness of $Na_v1.7$ inhibitor protoxin II (ProTxII) on spinal cord nociceptive processing following burn injury in a model of thermal burn injury [44].

- ***The mechanism of anandamide precursor 20:4-NAPE-mediated modulation under the normal and inflammatory condition***

20:4-NAPE (*N*-arachidonoylphosphatidylethanolamine) is a precursor of endogenous endocannabinoid (eCB) anandamide (AEA). eCBs, such as anandamide (AEA), play an important role in modulating spinal nociceptive processing and may significantly affect pain perception. AEA has been reported as an endogenous activator of both cannabinoid receptor 1 (CB_1) and TRPV1 channels [53]. Under the physiological conditions, eCB attenuates nociceptive signaling and have an analgesic effect. Therefore, eCBs are considered as therapeutics to alleviate acute and chronic pain [27; 33].

On the other hand, activation of TRPV1 receptors by eCBs is primarily pronociceptive and proinflammatory, because TRPV1 activation may also support inflammation via the release of neuropeptides [46]. Despite this fact, TRPV1 modulation by eCBs may be explicitly important in pain management and analgesia [31].

We tested in our experiments how the AEA precursor 20:4-NAPE modulate the nociceptive transmission under the control situation and in the model of acute peripheral inflammation.

2. AIMS OF THE THESIS

Despite the impressive progress of modern medicine and therapeutic methods, management of chronic and neuropathic pain represents still a significant problem. While many of modulatory mechanisms have been already identified and described, many other mechanisms remain unrecognized. Hence, the main attention was paid to study the mechanism of PAC-induced neuropathic pain/P-APS, burn injury-induced pain, pain induced by peripheral inflammation and neuropathic pain induced by chronic constriction of the sciatic nerve. Although these pain states have entirely different causes and mechanisms of development, one aspect of our research was the same—the modulation of the nociceptive information at the spinal cord level.

We examined the following experimental questions:

- (I) The main aim of the thesis was to find out: (a) Which is the role of TLR4 and TRPV1 receptors in the paclitaxel-induced peripheral neuropathy? (b) Which intracellular pathways and kinases are involved in the signaling? (c) How does pharmacological targeting of these pathways help to alleviate pain *in vivo*?
- (II) How do different pain states affect/diminish the inhibitory synaptic transmission in the dorsal horn? The aim is to describe and compare the development of disinhibition in the models of paclitaxel-induced peripheral neuropathy, peripheral inflammation and in a chronic constriction injury of the sciatic nerve.
- (III) How does the Nav1.7 receptor inhibition by antagonist protoxin II affect the spinal nociceptive signaling in the burn injury model of pain?
- (IV) How does the anandamide precursor 20:4-NAPE modulate the nociceptive synaptic transmission under the inflammatory conditions and which role play CB₁ receptors in this process?

3. MATERIALS AND METHODS

• **Animals:** Adult male mice C57BL/6 weighting 25 to 30 g, adult male transgenic mice VGAT-ChR2-eYFP line 8 (The Jackson Laboratory; Stock No: 014548) and male P19–P21 or adult male Wistar rats (180–200 g) were used in our experiments. All animals were kept on 12/12 h light/dark cycle at room temperature-controlled conditions with free access to food and water. All experiments were approved by the local Institutional Animal Care and Use Committee of the Institute of Physiology, CAS.

• **Paclitaxel-induced peripheral neuropathy (PIP_N) model:** We used two experimental protocols to induce PIP_N. In some experiments, adult male mice or rats were treated intraperitoneally (*i.p.*) by a single high dose PAC application (8 mg/kg, Paclitaxel Mylan). In another set of experiments, we used a dosage of 2 mg/kg (*i.p.*) every other day (in total four injections on days 0, 2, 4 and 6). Final cumulative dose was 8 mg/kg as well. Mechanical paw withdrawal threshold (PWT) was tested before (on Day 0), during (on Days 2, 4, 6) and after PAC treatment (on Day 7). Vehicle-treated animals were used as controls.

• **Model of peripheral inflammation:** Peripheral inflammation was induced under 3% isoflurane anesthesia. A 1% mixture of carrageenan in a physiological solution (~30 μ l) was used to induce peripheral inflammation in mice, whereas 3% mixture of carrageenan with saline (~50 μ l) was used in ~P20 rats. Carrageenan was injected subcutaneously to both hind paws. Mechanical PWT or paw withdrawal latency (PWL) to thermal stimuli was tested before carrageenan injection (on Day 0), and after on Day 1 (~24 h later), before spinal cord slices preparation and patch clamp experiment. Naive animals were used as controls.

• **Model of chronic constriction injury (CCI):** CCI was performed in adult mice under 3% isoflurane anesthesia. Three loose ligatures were tied proximal to the trifurcation of the sciatic nerve. Mechanical PWT was tested before (Day 0), and after CCI on Day 1 and 3, before spinal cord slices preparation and patch clamp experiment. Naive animals were used as controls.

• **Burn injury model:** The animal model of partial thickness scalding-type burn injury was used. Male Wistar rats (P21) were deeply anesthetized with 3% isoflurane. The absence of any nocifensive response was confirmed and under continuous anesthesia, both hind paws were immersed into 60 °C (Burn injury group) or 37 °C (Sham group) water up to the knee for 2 minutes. Continuous anesthesia (isoflurane, 3%) was maintained for the next 60 minutes. Then, the laminectomy and spinal cord slices were prepared.

• **Spinal Cord Slice Preparation:** The same experimental protocol was used for both adult mice and juvenile rats spinal cord slices preparation. Laminectomy was performed under deep anesthesia with 3% isoflurane (Forane, Abbott) and the lumbar spinal cord was removed and immersed in oxygenated, ice-cold (~4 °C), dissection solution containing (in mM) 95 NaCl, 1.8 KCl, 7 MgSO₄, 0.5 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 25 D-glucose and 50 sucrose. Animals were killed by subsequent medulla interruption and exsanguination. Acute transverse spinal cord slices 300 μ m thick were cut from L4–L5 segments were prepared using a vibratome VT 1200S (Leica). Slices were incubated in the dissection solution for 30 min at 35 °C. Slices were then stored in a recording solution at room temperature (21–24 °C). The recording solution used during patch-clamp measurement contained (in mM) 127 NaCl, 1.8 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 2.4CaCl₂, 1.3 MgSO₄, 26 NaHCO₃, and 25 D-glucose. All extracellular solutions were saturated with carbogen (95% O₂, 5% CO₂) during the whole experiment.

• **Patch-Clamp Recording:** Whole-cell patch-clamp recordings were made from visually identified superficial dorsal horn neurons using a Zeiss Axio Examiner A.1 (Carl Zeiss Microscopy) microscope equipped with infrared LED diode illumination and an infrared-sensitive camera Grasshopper3 (Point Grey), connected to a standard personal computer. Patch pipettes were filled with an intracellular solution for final resistance of 3.5–7.0 M Ω . The intracellular pipette solution contained (in mM): 125 gluconic acid lactone, 15 CsCl, 10 EGTA, 10 HEPES, 1 CaCl₂, 2 Mg₂ATP, and 0.5 NaGTP and was adjusted to pH 7.2 with CsOH. Voltage-clamp recordings in the whole-cell configuration were performed with an Axopatch 1D (Axon Instruments) amplifier and Digidata 1440A digitizer (Molecular Devices) at room temperature (~23 °C). Whole-cell recordings were low-pass filtered at 2 kHz and digitally sampled at 10 kHz. The series resistance of neurons was routinely compensated by 80 % and was monitored during the whole experiment. AMPA-mediated spontaneous or miniature excitatory postsynaptic currents (sEPSCs/mEPSCs) were recorded from visually identified superficial dorsal horn neurons in laminae I and outer II, clamped at -70 mV in the presence of 10 μ M bicuculline and 5 μ M strychnine in the bath solution. For the recording of mEPSCs, bath solution contains also VGSCs blocker

tetrodotoxin (0.5 μ M). GABA_AR- and/or Glycine receptor-mediated spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSC) and light-evoked (le-IPSC) were routinely recorded using the same intracellular and recording solution at 0 mV. IPSCs were recorded in the presence of AMPA receptor antagonist CNQX (20 mM) and NMDA blocker AP5 (25 mM). le-IPSC were evoked by blue light (470 nm) photo-stimulation and recorded as a series of ten 5 ms long photo-stimulations with a frequency 0.1 Hz. Software package pCLAMP 10.5 (Axon Instruments, USA) was used for data acquisition and for off-line analysis.

• **Immunohistochemical analysis of pAkt:** Wistar rats (6 weeks old, 180-200 g) were randomly distributed in three experimental groups: Control (CTRL group, vehicle *i.p.*); paclitaxel (PAC group, 8 mg/kg *i.p.*); wortmannin + paclitaxel (WMN + PAC group; WMN 0.6 mg/kg *i.p.* + PAC 8 mg/kg *i.p.*). Animals were deeply anesthetized with ketamine (100 mg/kg, Narketan, Zentiva) and xylazine (25 mg/kg, Xylapan, Zentiva) 1 hour after paclitaxel/vehicle treatment, perfused intracardially with saline followed by ice-cold 4% paraformaldehyde. The L5 DRGs were removed and post-fixed in 4% paraformaldehyde at 4° C for 2 hours, cryoprotected with 30% sucrose overnight, and cut in cryostat Leica CM3000 to 16 μ m thick slices. These sections were then processed for pAkt immunohistochemistry using rabbit anti-pAkt (Ser473, Cell Signaling Technology, #4060S) primary antibody and a donkey anti-rabbit Cy2-conjugated secondary antibody (Jackson Immuno Research Lab. Inc). Area of pAkt-immunoreactivity for each DRG section was measured using ImageJ software using threshold function. To analyze a number of pAkt-IR DRG cells all cell bodies in DRG sections were manually outlined and intensity and area of individual cell bodies were measured using ImageJ software.

• **Anandamide release experiment:** Acute spinal cord slices from P21 rats were prepared in the same way as for patch-clamp experiment. Slices were during experiment incubated for 10 min in recording solution (saturated with carbogen) with an increasing concentration of anandamide precursor 20:4-NAPE (20 μ M, 100 μ M, 200 μ M). After each 10 min long incubation, the whole volume of the solution was extracted and immediately frozen for later mass spectrometry experiment (performed by the Prof. Ing. Ivan Mikšík, DrSc., IPHYS CAS) and the solution was immediately replaced and the slices were incubated with another solution sample for next 10 min.

• **Statistical analyses:** All data are represented as mean \pm SEM. To find significant differences between groups with normal data distribution, One Way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test (multiple comparison procedure versus control or all pairwise comparison procedure) was used. To find significant differences in one group during the treatment, we used One-Way repeated measures ANOVA. For comparison of standardized data with non-normal distribution, non-parametric Wilcoxon Signed Rank Test was used. If necessary, the difference between the two groups was compared using a paired t-test/t-test with Bonferroni correction. Behavioral data were analyzed by Two Way ANOVA (treatment \times time) followed by multiple comparison procedure (Bonferroni *post hoc* test). The criterion for statistical significance was $P < 0.05$.

4. RESULTS AND DISCUSSION

• *The role of TLR4, TRPV1, and PI3K in the development of PAC-induced neuropathic pain:*

We showed for the first time that acute PAC (50 nM) increase the frequency of mEPSC to 141 % of basal control frequency in TRPV1-dependent/inhibitable manner. This suggests that PAC via modulation of TRPV1 channels increase the release of glutamate from presynaptic endings in the DH of the spinal cord.

We also demonstrated that PAC sensitizes spinal neurons to TRPV1-mediated capsaicin responses via a TLR4-dependent mechanism. These changes were demonstrated as a decreased tachyphylaxis of second capsaicin response (PAC group 91 %, vs. CTRL group 33 %; Second capsaicin response is expressed as a percentage of first caps. response – 100 %), which indicates increased sensitivity of cells to TRPV1-mediated activation. Moreover, our colleagues from The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center confirm this direct functional interaction between TLR4 and TRPV1 as well in rat and human DRG, and TLR4/TRPV1-transfected HEK293 cells [24].

In our following experiments with PAC, we showed that treatment of spinal cord slices with PAC (100 nM) *in vitro* enhances expression of the c-Fos protein in TRPV1-inhibitable manner [19], suggesting the induction of sensitization of the dorsal horn neurons [9; 22; 40; 41].

Moreover, we have recently demonstrated for the first time that PI3K signaling plays an important role in the early development and maintenance of mechanical allodynia in a murine model of PIPN (8 mg/kg PAC *i.p.*). We showed that single administration of wortmannin (WMN) pretreatment (0.6 mg/kg *i.p.*) 1 h before PAC *in vivo* significantly attenuated increased mechanical sensitivity for up to eight days after the PAC treatment, and it prevented enhancement of TRPV1-mediated responses to repeated applications of capsaicin in the electrophysiological recordings. Results from *in vitro* experiments with acute PAC applications, together with PI3K antagonists WMN or LY-294002 supported the *in vivo* results in all of the tested situations. Blocking the activity of serine/threonine kinases (such as PKC, PKA, and CaMKII) by the staurosporine treatment was effective in the acute *in vitro* experiments and on the first day of the behavioral study, but it did not have a significant impact later – eight days after the PAC application. The involvement of PI3K was confirmed also by immunohistochemical analysis of marker of PI3K activity – pAkt in DRG neurons following acute *in vivo* PAC 8 mg/kg treatment. The analysis reveals that PAC induces a significant increase of pAkt immunoreactivity in the population of small diameter neurons (< 25 μ m), which represents putatively nociceptive specific small and medium-sized C/A δ -fiber neurons. WMN pretreatment significantly reduced the effect of PAC on Akt phosphorylation [1].

The scheme of the suggested signaling machinery of PAC-induced modulation of TRPV1 channels function via TLR4/PI3K-dependent pathway is shown in Fig. 1. The release of neurotransmitters from presynaptic endings of nociceptive DRG neurons within the DH can be increased as a consequence of this PAC-induced modulation of TRPV1.

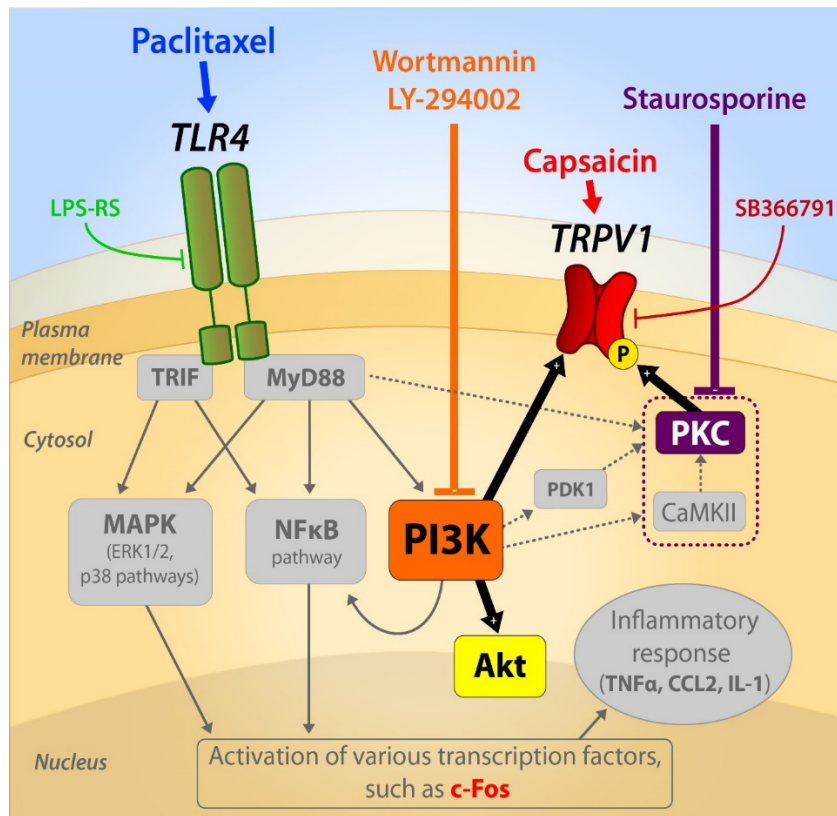


Fig. 1.: Schematic diagram of the proposed mechanism of the PAC-induced modulation of the TRPV1 channels function in nociceptive DRG neurons and their central endings within the DH. For clarity, signaling tested in our studies is in color, while other signaling pathways are in gray. Signal transduction following the TLR4 activation occurs via two adapter signaling molecules MyD88 (Myeloid-differentiation response gen 88) and TRIF (Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter-inducing interferon- β). The PI3K signaling pathway may be stimulated via MyD88-dependent mechanism after the TLR4 activation [23]. The TLR4 activation may activate PKC (the dotted lines) via MyD88 [13], or PKC may be activated by PI3K via CaMKII [5] or via PDK1 [12]. Our experiments showed that PI3K inhibitors WMN, LY-294002, and serine/threonine kinases inhibitor staurosporine prevented the PAC-induced changes in tachyphylaxis of capsaicin-induced responses.

• ***Disinhibition occurs in a significant manner in the models of PIPN, CCI, and peripheral inflammation:***

Our preliminary data clearly show that significant changes in spinal synaptic transmission occur in different pain conditions. In more detail, our results show that PIPN, carrageenan-induced peripheral inflammation, and CCI of sciatic nerve changed the balance between the excitatory and inhibitory synaptic transmission in spinal cord dorsal horn excitatory neurons. Our data show that the sEPSCs frequency measured in spinal cord DH lamina I–II excitatory neurons increased in all experimental groups compared with the Control group, while in all groups were significantly decreased sIPSCs frequency. These findings are in agreement with previously published studies [2; 28; 36; 49], and at least partly explain the establishment of pathological changes (mechanical allodynia) in tested models/conditions. The amplitude of total le-IPSC induced by photostimulation of ChR2-expressing inhibitory neurons decreased significantly as well. These data suggest that disinhibition occurred in a significant manner in all tested models. However, these preliminary data do not clearly answer the question whether presynaptic

or postsynaptic mechanisms are mainly involved. Therefore, it is necessary to perform detailed experiments, e.g., paired-pulse ratio stimulation, to define the role of pre- or postsynaptic mechanisms in our experiments.

• ***Na_v1.7 inhibitor ProTxII reduces burn injury-induced spinal nociceptive processing:***

Our electrophysiological experiment confirms the important role of Na_v1.7 in spinal nociceptive processing following partial thickness burn injury of scalding-type, which includes damage of epidermis and eventually upper parts of dermis as well. The sEPSCs frequency was significantly increased following burn injury (3.1 Hz) in comparison with sham-operated animals (0.8 Hz). The application of ProTxII did not change the sEPSCs frequency under sham-condition, however, ProTxII significantly decreased sEPSCs frequency in burn injury animals (2.1 Hz, 61 %) [44]. Our collaborators from Imperial College London showed that burn injury significantly upregulates Na_v1.7 protein expression in L4–L5 rat DRGs ipsilateral to the burn injury [44]. Similar up-regulation has been reported previously in other peripheral inflammatory models [4; 17]. Burn injury induced also a biphasic upregulation in the expression of a phosphorylated form of transcription factor CREB (cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element-binding protein; pCREB)[44]. ProTxII attenuates effectively not only excessive excitatory activity within DH, but also significantly reduced burn injury-induced upregulation of phosphorylated form of ERK1/2 (pERK1/2), and phosphorylated serine 10 in histone H3 (pS10H3), a novel marker for nociceptive activation of spinal dorsal horn neurons [45].

In conclusion, we showed that ProTxII significantly reduced aberrant activity induced by burn injury in the population of capsaicin-sensitive nociceptive spinal cord dorsal horn neurons in the rat. Therefore, Na_v1.7 inhibition represents a potentially promising therapeutic approach that could produce a significant analgesics effect with significantly fewer side-effects than opioids [44].

• ***Peripheral Inflammation affects the modulatory mechanisms of AEA precursor 20:4-NAPE:***

We showed that application of the substrate for AEA synthesis—20:4-NAPE (NAPE), increased AEA concentration in the spinal cord *in vitro*. Although we cannot categorically exclude the direct effects of NAPE or indirect effects of others NAPE/AEA-related metabolites on some other receptors, we propose that the great majority of the effects induced by NAPE was mediated through the synthesis of AEA acting on CB₁ receptors and TRPV1 channels [29]. This assumption is in agreement with previous findings [53].

In our electrophysiological experiments, we compared the effect of NAPE in control conditions and in animals with acute peripheral inflammation. While NAPE treatment inhibited the excitatory synaptic transmission (sEPSCs and eEPSCs) in both naive and inflammatory conditions, acute peripheral inflammation altered the underlying mechanisms of NAPE (respectively of AEA action) at the spinal cord level in the rat. In more detail, under the inflammatory condition, inhibition of CB₁ receptors by PF514273 (0.2 μM) uncover potentiating effect of NAPE on a sEPSCs frequency that was prevented by blockade of TRPV1 channels (SB366791; 10 μM), which are following inflammation tonically activated. This effect is unmasked just following CB₁ receptors inhibition [29]. Nevertheless, tonic activation of TRPV1 may have an anti-nociceptive effect, since activation of TRPV1 may attenuate or block eEPSCs [3].

In conclusion, our data indicate that application of exogenous NAPE induced inhibitory effects, which were mediated mainly by CB₁ receptors in naive animals, while TRPV1-mediated mechanisms were also involved after acute peripheral inflammation [29]. We also suggest that applying AEA substrate for its local synthesis may be more effective for analgesic purposes than systemic anandamide application or inhibition of its degradation [26].

6. CONCLUSION

Dorsal horn of the spinal cord represents a major modulatory site of the nociceptive/pain pathway because there is located the first synapse of the pain pathway. Modulation at the spinal cord level is potentially advantageous because the appropriate modulation of pain perception in the DH could attenuate pain without affecting of higher brain centers.

In this doctoral thesis are presented results from five original articles and unpublished results, all focused on mechanisms of modulation of nociceptive synaptic transmission under pathological pain conditions.

In the model of paclitaxel-induced peripheral neuropathy, we showed for the first time that the direct functional interaction between TLR4 and TRPV1 receptors play important role in neuronal activation, sensitization, and behavioral hypersensitivity in PAC-induced CIPN [24]. In our following study, we have demonstrated that TRPV1 channels-dependent mechanism is necessary to PAC-induced enhancement of c-Fos protein expression in the dorsal horn neurons [19]. Moreover, we currently reported that PI3K plays an important role (I.) in the PAC-induced mechanical allodynia, (II.) in the modulation of TRPV1 sensitivity, and (III.) in the modulation of tachyphylaxis of capsaicin-evoked responses [1].

We also reported the promising analgesics effect of 20:4-NAPE, which seems to be a potentially good source for endogenous AEA synthesis [29], and Nav1.7 inhibitor ProTxII in the model of burn-injury [44].

Finally, our preliminary data suggest that disinhibition significantly contributes to the development of mechanical allodynia and to the changes in synaptic transmission in the dorsal horn in the model of PIPN, CCI and following acute peripheral inflammation.

Taking together, these data well demonstrates that nociceptive synaptic transmission is substantially influenced under pathological conditions, and that appropriate intervention and pharmacological treatment can help alleviate increased nociceptive transmission or pain-related behavior in animals.

Further Research and deeper understanding of these complicated processes of modulation of spinal nociceptive transmission are necessary to improve existing approaches and develop new ones for effective treatment of chronic and neuropathic pain states in the future.

Seznam použité literatury / References

- [1] Adamek P, Heles M, Palecek J. Mechanical allodynia and enhanced responses to capsaicin are mediated by PI3K in a paclitaxel model of peripheral neuropathy. *Neuropharmacology* 2019;146:163-174.
- [2] Ahmadi S, Lippross S, Neuhuber WL, Zeilhofer HU. PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat Neurosci*, Vol. 5. United States, 2002. pp. 34-40.
- [3] Baccei ML, Bardoni R, Fitzgerald M. Development of nociceptive synaptic inputs to the neonatal rat dorsal horn: glutamate release by capsaicin and menthol. *Journal of Physiology-London* 2003;549(1):231-242.
- [4] Black JA, Liu S, Tanaka M, Cummins TR, Waxman SG. Changes in the expression of tetrodotoxin-sensitive sodium channels within dorsal root ganglia neurons in inflammatory pain. *Pain*, Vol. 108. United States, 2004. pp. 237-247.
- [5] Bonnington JK, McNaughton PA. Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor. *Journal of Physiology-London* 2003;551(2):433-446.
- [6] Byrd-Leifer CA, Block EF, Takeda K, Akira S, Ding AH. The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. *European Journal of Immunology* 2001;31(8):2448-2457.
- [7] Cai WH, Cao J, Ren XH, Qiao L, Chen XM, Li M, Zang WD. shRNA mediated knockdown of Nav1.7 in rat dorsal root ganglion attenuates pain following burn injury. *Bmc Anesthesiology* 2016;16:7.
- [8] Cavaletti G, Cavalletti E, Oggioni N, Sottani C, Minoia C, D'Incalci M, Zucchetti M, Marmiroli P, Tredici G. Distribution of paclitaxel within the nervous system of the rat after repeated intravenous administration. *Neurotoxicology* 2000;21(3):389-393.
- [9] Chen YS, Balasubramanyan S, Lai AY, Todd KG, Smith PA. Effects of Sciatic Nerve Axotomy on Excitatory Synaptic Transmission in Rat Substantia Gelatinosa. *Journal of Neurophysiology* 2009;102(6):3203-3215.
- [10] Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K, Karbani G, Jafri H, Mannan J, Raashid Y, Al-Gazali L, Hamamy H, Valente EM, Gorman S, Williams R, McHale DP, Wood JN, Gribble FM, Woods CG. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature*, Vol. 444. England, 2006. pp. 894-898.
- [11] Diogenes A, Ferraz CCR, Akopian AN, Henry MA, Hargreaves KM. LPS Sensitizes TRPV1 via Activation of TLR4 in Trigeminal Sensory Neurons. *Journal of Dental Research* 2011;90(6):759-764.
- [12] Dutil EM, Toker A, Newton AC. Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PKD-1). *Current Biology* 1998;8(25):1366-1375.
- [13] Faisal A, Saurin A, Gregory B, Foxwell B, Parker PJ. The scaffold MyD88 acts to couple protein kinase C epsilon to toll-like receptors. *Journal of Biological Chemistry* 2008;283(27):18591-18600.
- [14] Fallon MT. Neuropathic pain in cancer. *Br J Anaesth* 2013;111(1):105-111.
- [15] Flatters SJL, Dougherty PM, Colvin LA. Clinical and preclinical perspectives on Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN): a narrative review. *Br J Anaesth* 2017;119(4):737-749.
- [16] Garland EL. Pain processing in the human nervous system: a selective review of nociceptive and biobehavioral pathways. *Prim Care* 2012;39(3):561-571.
- [17] Gould HJ, 3rd, England JD, Liu ZP, Levinson SR. Rapid sodium channel augmentation in response to inflammation induced by complete Freund's adjuvant. *Brain Res*, Vol. 802. Netherlands, 1998. pp. 69-74.
- [18] James DL, Jowza M. Principles of Burn Pain Management. *Clin Plast Surg*, Vol. 44. United States: 2017 Elsevier Inc, 2017. pp. 737-747.
- [19] Kalynovska N, Adamek P, Palecek J. TRPV1 receptors contribute to mediate paclitaxel-induced c-Fos expression in spinal cord dorsal horn neurons. *Physiol Res* 2017;66(3):549-552.
- [20] Kawasaki K, Akashi S, Shimazu R, Yoshida T, Miyake K, Nishijima M. Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Biol Chem* 2000;275(4):2251-2254.
- [21] Kemper EM, van Zandbergen AE, Cleypool C, Mos HA, Boogerd W, Beijnen JH, van Tellingen O. Increased penetration of paclitaxel into the brain by inhibition of P-Glycoprotein. *Clin Cancer Res* 2003;9(7):2849-2855.

- [22] Kuner R. Central mechanisms of pathological pain. *Nature Medicine* 2010;16(11):1258-1266.
- [23] Li XW, Tupper JC, Bannerman DD, Winn RK, Rhodes CJ, Harlan JM. Phosphoinositide 3 kinase mediates toll-like receptor 4-induced activation of NF-kappa B in endothelial cells. *Infection and Immunity* 2003;71(8):4414-4420.
- [24] Li Y, Adamek P, Zhang H, Tatsui CE, Rhines LD, Mrozkova P, Li Q, Kosturakis AK, Cassidy RM, Harrison DS, Cata JP, Sapire K, Zhang H, Kennamer-Chapman RM, Jawad AB, Ghetti A, Yan J, Palecek J, Dougherty PM. The Cancer Chemotherapeutic Paclitaxel Increases Human and Rodent Sensory Neuron Responses to TRPV1 by Activation of TLR4. *Journal of Neuroscience* 2015;35(39):13487-13500.
- [25] Li Y, Zhang H, Kosturakis AK, Cassidy RM, Zhang H, Kennamer-Chapman RM, Jawad AB, Colomand CM, Harrison DS, Dougherty PM. MAPK signaling downstream to TLR4 contributes to paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *Brain Behavior and Immunity* 2015;49:255-266.
- [26] Mallet C, Dubray C, Duale C. FAAH inhibitors in the limelight, but regrettably. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2016;54(7):498-501.
- [27] Manzanares J, Julian M, Carrascosa A. Role of the cannabinoid system in pain control and therapeutic implications for the management of acute and chronic pain episodes. *Curr Neuropharmacol* 2006;4(3):239-257.
- [28] Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci*, Vol. 22. United States, 2002. pp. 6724-6731.
- [29] Nerandzic V, Mrozkova P, Adamek P, Spicarova D, Nagy I, Palecek J. Peripheral inflammation affects modulation of nociceptive synaptic transmission in the spinal cord induced by N-arachidonoylphosphatidylethanolamine. *Br J Pharmacol* 2017.
- [30] Park SB, Goldstein D, Krishnan AV, Lin CSY, Friedlander ML, Cassidy J, Koltzenburg M, Kiernan MC. Chemotherapy-Induced Peripheral Neurotoxicity: A Critical Analysis. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* 2013;63(6):419-437.
- [31] Petrosino S, Schiano Moriello A, Cerrato S, Fusco M, Puigdemont A, De Petrocellis L, Di Marzo V. The anti-inflammatory mediator palmitoylethanolamide enhances the levels of 2-arachidonoyl-glycerol and potentiates its actions at TRPV1 cation channels. *Br J Pharmacol* 2016;173(7):1154-1162.
- [32] Premkumar LS, Abooj M. TRP channels and analgesia. *Life Sci* 2013;92(8-9):415-424.
- [33] Rahn EJ, Hohmann AG. Cannabinoids as pharmacotherapies for neuropathic pain: from the bench to the bedside. *Neurotherapeutics* 2009;6(4):713-737.
- [34] Reeves BN, Dakhil SR, Sloan JA, Wolf SL, Burger KN, Kamal A, Le-Lindqwister NA, Soori GS, Jaslowski AJ, Kelaghan J, Novotny PJ, Lachance DH, Loprinzi CL. Further Data Supporting That Paclitaxel-Associated Acute Pain Syndrome Is Associated With Development of Peripheral Neuropathy. *Cancer* 2012;118(20):5171-5178.
- [35] Salas MM, McIntyre MK, Petz LN, Korz W, Wong D, Clifford JL. Tetrodotoxin suppresses thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in a rat full thickness thermal injury pain model. *Neuroscience Letters* 2015;607:108-113.
- [36] Scholz J, Broom DC, Youn DH, Mills CD, Kohno T, Suter MR, Moore KA, Decosterd I, Coggeshall RE, Woolf CJ. Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci*, Vol. 25. United States, 2005. pp. 7317-7323.
- [37] Seretny M, Currie GL, Sena ES, Ramnarine S, Grant R, MacLeod MR, Colvin LA, Fallon M. Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. *Pain* 2014;155(12):2461-2470.
- [38] Shields SD, Cheng XY, Uceyler N, Sommer C, Dib-Hajj SD, Waxman SG. Sodium Channel Na(v)1.7 Is Essential for Lowering Heat Pain Threshold after Burn Injury. *Journal of Neuroscience* 2012;32(32):10819-10832.
- [39] Sivilotti L, Woolf CJ. The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiol* 1994;72(1):169-179.
- [40] Spicarova D, Adamek P, Kalynovska N, Mrozkova P, Palecek J. TRPV1 receptor inhibition decreases CCL2-induced hyperalgesia. *Neuropharmacology* 2014;81:75-84.
- [41] Spicarova D, Nerandzic V, Palecek J. Modulation of spinal cord synaptic activity by tumor necrosis factor alpha in a model of peripheral neuropathy. *Journal of Neuroinflammation* 2011;8.
- [42] Spicarova D, Nerandzic V, Palecek J. Update on the Role of Spinal Cord TRPV1 Receptors in Pain Modulation. *Physiological Research* 2014;63:S225-S236.

- [43] Todd AJ. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 2010;11(12):823-836.
- [44] Torres-Perez JV, Adamek P, Palecek J, Vizcaychipi M, Nagy I, Varga A. The Nav1.7 blocker protoxin II reduces burn injury-induced spinal nociceptive processing. *J Mol Med (Berl)* 2018;96(1):75-84.
- [45] Torres-Perez JV, Santha P, Varga A, Szucs P, Sousa-Valente J, Gaal B, Sivado M, Andreou AP, Beattie S, Nagy B, Matesz K, JS CA, Jancso G, Nagy I. Phosphorylated Histone 3 at Serine 10 Identifies Activated Spinal Neurons and Contributes to the Development of Tissue Injury-Associated Pain. *Sci Rep* 2017;7:41221.
- [46] Trevisani M, Gazzieri D, Benvenuti F, Campi B, Dinh QT, Groneberg DA, Rigoni M, Emonds-Alt X, Creminon C, Fischer A, Geppetti P, Harrison S. Ethanol causes inflammation in the airways by a neurogenic and TRPV1-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther*, Vol. 309. United States, 2004. pp. 1167-1173.
- [47] Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron* 2007;55(3):353-364.
- [48] Wu Z, Wang S, Wu I, Mata M, Fink DJ. Activation of TLR-4 to produce tumour necrosis factor-alpha in neuropathic pain caused by paclitaxel. *Eur J Pain* 2015;19(7):889-898.
- [49] Yan X, Jiang E, Weng HR. Activation of toll like receptor 4 attenuates GABA synthesis and postsynaptic GABA receptor activities in the spinal dorsal horn via releasing interleukin-1 beta. *J Neuroinflammation* 2015;12:222.
- [50] Yan X, Maixner DW, Yadav R, Gao M, Li P, Bartlett MG, Weng H-R. Paclitaxel induces acute pain via directly activating toll like receptor 4. *Molecular Pain* 2015;11.
- [51] Zeilhofer HU. Synaptic modulation in pain pathways. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2005;154:73-100.
- [52] Zeilhofer HU, Wildner H, Yevenes GE. Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol Rev* 2012;92(1):193-235.
- [53] Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 1999;400(6743):452-457.

Curriculum Vitae

Mgr. Pavel Adámek

Year of birth: 1989
Nationality: Czech Republic
E-mail: pavel.adamek89@gmail.com
pavel.adamek@fgu.cas.cz
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7131-6016>
ResearchGate: https://www.researchgate.net/profile/Pavel_Adamek2

Education:

2014 – now

Doctoral study

Charles University in Prague, Faculty of Science
Study programme: Animal Physiology

Doctoral thesis: The role of nociceptive synaptic transmission modulation at the spinal cord level in different pain states

Workplace: Institute of Physiology, CAS, Prague, Dept. of Functional Morphology

Supervisor: MUDr. Jiří Paleček, CSc.

2012 – 2014

Master's study

Charles University in Prague, Faculty of Science
Study programme: Biology/Animal physiology

Diploma thesis: The role of TRPV1 receptors in chemokine CCL2 induced modulation of nociceptive synaptic transmission at spinal cord level

Workplace: Institute of Physiology, CAS, Prague, Dept. of Functional Morphology

Supervisor: MUDr. Jiří Paleček, CSc.

2009 – 2012

Bachelor's study

Charles University in Prague, Faculty of Science
Study programme: Biology

Bachelor's thesis: The role of synaptic modulation in pain states

Workplace: Institute of Physiology, CAS, Prague, Dept. of Functional Morphology

Supervisor: MUDr. Jiří Paleček, CSc.

Educational activity:

7/2018 Summer course for Medical Students

Grants:

2018 – 2019 GAUK 734218 (Grant Agency of Charles University) *Mechanisms involved in the development of chemotherapy induced neuropathic pain*

2017 – 2015 GAUK 138215 (Grant Agency of Charles University) *Modulation of nociceptive synaptic transmission at spinal cord level*

Publications:

- P. Adamek**, M. Heles and J. Palecek, **2019**, Mechanical allodynia and enhanced responses to capsaicin are mediated by PI3K in a paclitaxel model of peripheral neuropathy: *Neuropharmacology* v. 146, p. 163-174. **(IF = 4.2)**
- Torres-Perez, J. V., **P. Adamek**, J. Palecek, M. Vizcaychipi, I. Nagy, and A. Varga, **2018**, The Na_v1.7 blocker protoxin II reduces burn injury-induced spinal nociceptive processing: *Journal of Molecular Medicine (Berl)*. v. 96(1), p. 75-84. **(IF = 4.9)**
- Nerandzic, V., P. Mrozkova, **P. Adamek**, D. Spicarova, I. Nagy, and J. Palecek, 2018, Peripheral inflammation affects modulation of nociceptive synaptic transmission in the spinal cord induced by N-arachidonoylphosphatidylethanolamine: *British Journal of Pharmacology*,. v. 175(12), p. 2322-2336. **(IF = 6.8)**
- Kalynovska, N., **P. Adamek**, and J. Palecek, **2017**, TRPV1 receptors contribute to paclitaxel-induced c-Fos expression in spinal cord dorsal horn neurons: *Physiological Research*, v. 66, p. 549-552. **(IF = 1,3)**
- Li, Y., **P. Adamek**, H. Zhang, C. E. Tatsui, L. D. Rhines, P. Mrozkova, Q. Li, A. K. Kosturakis, R. M. Cassidy, D. S. Harrison, J. P. Cata, K. Sapire, H. Zhang, R. M. Kennamer-Chapman, A. B. Jawad, A. Ghetti, J. Yan, J. Palecek, and P. M. Dougherty, **2015**, The Cancer Chemotherapeutic Paclitaxel Increases Human and Rodent Sensory Neuron Responses to TRPV1 by Activation of TLR4: *Journal of Neuroscience*, v. 35, p. 13487-13500. **(IF = 5,9)**
- Spicarova, D., **P. Adamek**, N. Kalynovska, P. Mrozkova, and J. Palecek, **2014**, TRPV1 receptor inhibition decreases CCL2-induced hyperalgesia: *Neuropharmacology*, v. 81, p. 75-84. **(IF = 4,8)**

Oral presentation:

P. Adamek. Activation of TLR4 receptors modulates function of TRPV1 receptors and nociceptive transmission in the model of paclitaxel induced neuropathy: *The Eleventh Conference of the Czech Neuroscience Society*, Nov 28, 2017

Poster presentations:

- 11/2018** Neuroscience 2018, SfN, San Diego
09/2018 World Congress on Pain 2018, IASP, Boston
07/2018 11th FENS Forum of Neuroscience, Berlin
11/2017 Neuroscience 2017, SfN, Washington
08/2017 IUPS 38th World Congress, International Union of Physiological Sciences, Rio de Janeiro
08/2017 ISN-ESN Meeting 2017, International Society for Neurochemistry, Paris
04/2017 Seminář společného preklinického výzkumu v IKEM a FGÚ AV ČR, Prague
11/2016 Neuroscience 2016, SfN, San Diego
09/2016 World Congress on Pain 2016, IASP, Yokohama
07/2016 10th FENS Forum of Neuroscience, Copenhagen
11/2015 Tenth Conference of the Czech Neuroscience Society, Prague
10/2015 Neuroscience 2015, SfN, Chicago
10/2015 FENS Featured Regional Meeting 2015, Thessaloniki
02/2015 2nd BIOCEV Annual Conference, Prague
09/2013 Neuroinflammation, A satellite symposium to the regional FENS meeting, Prague

Seznam publikací, které jsou podkladem disertační práce / List of Publications Related to the Doctoral Thesis

P. Adamek, M. Heles and J. Palecek, **2019**.

Mechanical allodynia and enhanced responses to capsaicin are mediated by PI3K in a paclitaxel model of peripheral neuropathy: *Neuropharmacology*, v. 146, p. 163-174.

IF = 4.249, Quartile 1, **Times Cited: 0** (4/2019 from WoS)

Torres-Perez, J. V., **P. Adamek**, J. Palecek, M. Vizcaychipi, I. Nagy, and A. Varga, **2018**.

The Nav1.7 blocker protoxin II reduces burn injury-induced spinal nociceptive processing: *Journal of Molecular Medicine (Berl)*. v. 96(1), p. 75-84.

IF = 4.938, Quartile 1, **Times Cited: 1** (4/2019 from WoS)

Nerandzic, V., P. Mrozkova, **P. Adamek**, D. Spicarova, I. Nagy, and J. Palecek, **2018**.

Peripheral inflammation affects modulation of nociceptive synaptic transmission in the spinal cord induced by *N*-arachidonoyl-phosphatidylethanolamine: *British Journal of Pharmacology*, v. 175(12), p. 2322-2336.

IF = 6.81, Quartile 1, **Times Cited: 2** (4/2019 from WoS)

Kalynovska, N., **P. Adamek**, and J. Palecek, **2017**.

TRPV1 receptors contribute to paclitaxel-induced c-Fos expression in spinal cord dorsal horn neurons: *Physiological Research*, v. 66(3), p. 549-552.

IF = 1.324, Quartile 4, **Times Cited: 3** (4/2019 from WoS)

Li, Y., **P. Adamek**, H. Zhang, C. E. Tatsui, L. D. Rhines, P. Mrozkova, Q. Li, A. K. Kosturakis, R. M. Cassidy, D. S. Harrison, J. P. Cata, K. Sapire, H. Zhang, R. M. Kennamer-Chapman, A. B. Jawad, A. Ghetti, J. Yan, J. Palecek, and P. M. Dougherty, **2015**.

The Cancer Chemotherapeutic Paclitaxel Increases Human and Rodent Sensory Neuron Responses to TRPV1 by Activation of TLR4: *Journal of Neuroscience*, v. 35(39), p. 13487-13500.

IF = 5.917, Quartile 1, **Times Cited: 57** (4/2019 from WoS)