

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Charles University in Prague
Faculty of Science



Autoreferát dizertační práce
Summary of the PhD Thesis

**Neurogení zánět a mechanismy vzniku
neuropatické bolesti**

**Neuroinflammation and mechanisms
of neuropathic pain development**

Mgr. Nataliia Kalynovska

Prague 2019

Doktorské studijní programy v biomedicine
Doctoral study programmes in biomedicine

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky
Charles University and The 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. Nataliia Kalynovska

Školitel/ Supervisor: MUDr. Jiří Paleček, CSc.

S dizertací je možné 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

Neuropatická bolest se nejčastěji objevuje po poškození nervové tkáně a také jako doprovodný příznak u řady onemocnění nebo jako nežádoucí vedlejší účinek některých cytostatických léčiv. V současné době neuropatická bolest představuje významný klinický problém, jelikož aktuálně dostupná analgetická léčba je stále neuspokojivá. Pro rozvoj nových účinných léčebných postupů neuropatické bolesti je důležité odhalit mechanismy jejího vzniku. Stále však chybí přesné informace o procesech, které se podílejí na vývoji a udržování neuropatické bolesti.

Cílem této dizertacní práce bylo prozkoumat mechanismy zapojené do vzniku neuropatických bolestivých stavů u několika modelů. Hlavní část práce je zaměřená na studium protizánětlivého účinku blokátoru angiotenzinových receptorů typu 1 (AT1R), losartanu, u dvou již etablovaných modelů periferní neuropatie a to navozené podáním cytostatika paclitaxelu (PIP) nebo podvázáním míšního nervu (SNL). Další část této práce je věnována zkoumání úlohy vaniloidních receptorů typu 1 (TRPV1) u procesů aktivace míšních neuronů pod vlivem aplikace chemoterapeutika paclitaxelu nebo chemokinu CCL2.

Pro dosažení postavených cílů byly použity jak behaviorální, tak i molekulárně biologické metody. U každého modelu byly měřeny odpovědi potkanů na tepelné/mechanické podněty, které indikují míru zvýšené patologické citlivosti k těmto podnětům (alodynie a hyperalgie). Imunohistochemické metody byly využity pro stanovení míry zvýšené aktivace neuronů v zadním rohu míšním (SCDH), a také pro vyhodnocení počtu cirkulujících makrofágů vstupujících do dorzálních ganglií (DRG). K vyhodnocení exprese specifických proteinů a mRNA v DRG a SCDH byly použity metody western blot, ELISA a RT PCR.

Naše výsledky ukázaly analgetické a protizánětlivé účinky systémového podání losartanu u SNL a PIPN modelů neuropatie. U obou zmíněných modelů léčba losartanem, pravděpodobně prostřednictvím agonizmu receptorů aktivovaných proliferatoru peroxizomů typu γ (PPAR γ), dokázala potlačit rozvoj neuropatické bolesti a snížit expresi prozánětlivých markerů CCL2, TNF α , CD11b, CD68 a dalších. U PIPN modelu léčba losartanem navíc způsobila zvýšení exprese protizánětlivých markerů, což naznačuje možný způsob modulace neurogenního zánětu. Naše výsledky ukazují také aktivní úlohu míšních TRPV1 receptorů v mechanismech centrální senzitivace. Zablokování těchto receptorů zabránilo zvýšené aktivaci neuronů v míšních řezech, inkubovaných s paclitaxelem nebo chemokinem CCL2. Intratekální aplikace TRPV1 antagonisty navíc zabránila vzniku akutní tepelné hyperalgie vyvolané podáním CCL2.

Studium mechanismů vzniku neuropatické bolesti je zásadní pro vývoj nových analgetických léčebných postupů. Tato práce přinesla nové poznatky, které mohou přispět k pochopení patofyziologických pochodů u neuropatických stavů a odhaluje nové informace o mechanismech rozvoje neurogenního zánětu na úrovni míchy a DRG.

Abstract

Neuropathic pain represents a possible outcome of neural tissue injury; it occurs also as a concomitant symptom of different diseases or as a side effect of several treatments. Up to date, it constitutes a great challenge in clinical practice, as currently available treatments are still unsatisfactory. Mechanism-based treatment approaches are promising strategy in neuropathic pain management. However, there is still a lack of information about the exact mechanisms involved in the development and/or maintenance of neuropathic pain.

This Doctoral Thesis is aimed to explore the mechanisms underlying the development of neuropathic pain states in different models. The principal part of this work is focused on the study of anti-inflammatory effect of Angiotensin II receptor type 1 (AT1R) blocker, losartan, in two different models of peripheral neuropathy: paclitaxel-induced peripheral neuropathy (PIPNe) and spinal nerve ligation (SNL). The work also aimed to access the involvement of spinal transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels in the process of neuronal activation induced by paclitaxel (PAC) and chemokine CCL2 treatment.

In order to fulfil the abovementioned aims, behavioral, immunohistochemical and molecular methods were used. For every model of peripheral neuropathy, the behavioral responses to thermal/mechanical stimuli were tested as a measure of increased pathological sensitivity - allodynia and hyperalgesia. Immunohistochemical methods were used to evaluate enhanced neuronal activation in the spinal cord dorsal horn (SCDH) and macrophage invasion in the dorsal root ganglia (DRGs). Western blot, ELISA, and RT PCR were used to determine the expression of specific proteins and mRNAs in SCDH and DRGs.

Our results demonstrate analgesic and anti-inflammatory effects of systemic treatment with losartan in the SNL and PIPNe models of neuropathy. In both these models, losartan treatment, presumably through peroxisome proliferator-activated receptors gamma (PPAR γ) agonism, attenuated the development of neuropathic pain and suppressed the expression of pro-inflammatory markers: CCL2, TNF α , CD11b, CD68, and others. Moreover, in the PIPNe model, losartan treatment induced the expression of pro-resolving markers, indicating the possible approach for the modulation of neuroinflammation. Our results also indicate active role of the spinal TRPV1 receptors in the mechanisms of central sensitization, as blockade of these receptors prevented increased activation of dorsal horn neurons in spinal cord slices, incubated with cytostatic PAC or chemokine CCL2. Moreover, TRPV1 antagonist intrathecal treatment prevented CCL2-induced thermal hyperalgesia in rats.

Studying mechanisms underlying the development of neuropathic pain is essential for the elaboration of new effective analgesic treatments. This work brings new information that may help to understand the complexity of neuropathic pain pathophysiology and reveals new evidence about the mechanisms underlying the development of neuroinflammatory changes in the DRGs and spinal cord.

Obsah/ Table of Contents

Abstrakt	3
Abstract	4
Obsah/Table of Contents	5
Seznam zkratek/List of Abbreviations	6
<u>Česká část</u>	7
Úvod.....	7
Cíle práce.....	8
Materiály a metody.....	9
Výsledky a diskuze.....	12
Závěr.....	16
<u>English Part</u>	17
Introduction.....	17
Aims of the Thesis.....	18
Materials and Methods.....	19
Results and Discussion.....	22
Conclusion.....	26
<i>Použitá literatura/References</i>	27
<i>Curriculum Vitae</i>	30
<i>Publikace, které jsou podkladem dizertace/ List of Publications that are Related to the Thesis</i>	31

Seznam zkratek/ List of Abbreviations

AT1R	Angiotenzinový receptor typu 1	/ Angiotensin II Receptor type 1
BSCB	Míšní krevní bariéra	/ Blood-spinal cord barrier
CCL2	Ligand 2 (C-C motiv)	/ Chemokine (C-C motif) ligand 2
CGRP	Kalcitoninu příbuzný peptid	/Calcitonin-gene related peptide
DR	Zadní kořen	/Dorsal root
DRG	Dorzální ganglia	/Dorsal root ganglia
ERK	Kináza regulovaná extracelulární	/Extracellular signal-regulated kinase signálizací
iNOS	Indukovatelná syntáza oxidu dusnatého	/Inducible NO syntase
NOX2	Oxidáza NADPH typu 2	/NADPH oxidase 2
PAC	Paclitaxel	/Paclitaxel
PIP2	Fosfatidyl inositol bisfosfát	/Phosphatidylinositol bisphosphate
PIPn	Periferní neuropatie navozená podáním paclitaxelu	/Paclitaxel-induced peripheral neuropathy
PPARγ	Receptor aktivovaný proliferatorů peroxizomů typu gamma	/Peroxisome proliferator activated receptor type γ
PWL	Prah citlivosti na tepelný podnět	/Paw withdrawal latency
PWT	Prah citlivosti na mechanický podnět	/Paw withdrawal threshold
SCDH	Zadní roh míšní	/Spinal cord dorsal horn
SNL	Podvázání míšního nervu	/Spinal cord ligation
TLR4	Toll-like receptor 4	/ Toll-like receptor 4
TNFα	Tumor nekrotizující factor alfa	/Tumor necrosis factor α
TRPV1	TRP vaniloidní kanál typu 1	/Transient receptor potential Vanilloid type 1

Česká část

Úvod

Bolest je nedílnou součástí ochranného systému těla. Mezinárodní asociace pro studium bolesti (IASP) definuje bolest jako „nepříjemný smyslový a emoční zážitek spojený se skutečným nebo potenciálním poškozením tkáně nebo popsáný jako takové poškození“. Akutní pocit bolesti má za následek reflexivní odtažení od bolestivých podnětů, tendenci chránit postiženou část těla a předcházet bolestivé situaci v budoucnosti. Definice bolesti podle IASP také naznačuje, že bolest je vysoce subjektivní záležitost, protože stejné podněty mohou u různých jedinců vyvolat různé reakce. Intenzita vnímání bolesti skutečně závisí na pohlaví, věku, psychickém stavu nebo dokonce i náladě.

Za patologických podmínek však bolest ztrácí svoji ochrannou funkci a stává se problémem sama o sobě. Neuropatická bolest představuje hlavní příznak neuropatie, patologického stavu, který má výrazný dopad na kvalitu života jednotlivce. Příčiny, které spouštějí patologické změny ve zpracování bolesti, byly studovány od samého počátku lidské medicíny, jelikož bolest je hlavním příznakem dysfunkce organismu na mnoha úrovních. Neuropatická bolest může být indukována poškozením periferního nebo centrálního nervového systému různými mechanismy zahrnujícími zejména traumatické a metabolické poškození, chemoterapii a virovou infekci (Woolf, 2010). Změny nocicepce (detekce, transdukce a přenos bolestivých podnětů do specializovaných struktur mozku) a vnímání bolesti mohou být ovlivněny také stresem, úzkostí nebo různými psychiatrickými poruchami. Navzdory dlouhodobé rozsáhlé studii nejsou mechanismy, které jsou základem vývoje neuropatické bolesti, zcela pochopené, takže léčebné strategie zatím nejsou uspokojivé.

Zánětlivé změny nervového systému, také označované jako neurogenní zánět neboli neuroinflamace, obvykle doprovázejí vývoj a udržování neuropatické bolesti (Ellis a Bennett, 2013). Intenzita a rozsah neuroinflamační reakce jsou vysoce závislé na typu a závažnosti poškození nervového systému. V centrálním a periferním nervovém systému navíc dochází k různým zánětlivým změnám. Mícha je považována za imunitně privilegovanou tkáň, protože je chráněna míšní hematoneurální bariérou (BSCB) a je vybavena imunitními gliovými buňkami nazývanými mikroglie (Bartanusz et al., 2011). Mikroglie se ve spolupráci s astrocyty reagují na specifické podněty svou aktivací, produkují prozánětlivé faktory a následně modulují nociceptivní přenos signálu. Na druhou stranu, DRG postrádají difúzní bariéru a tato morfoloická záležitost způsobuje, že buňky v DRG jsou více citlivé na různé cirkulující molekuly, které mají omezený přístup k imunitně privilegovaným orgánům (Liu et al., 2018).

Protinádorová léčba paclitaxelem často vyvolává nežádoucí vedlejší účinky zvané paclitaxelem vyvolaná periferní neuropatie (PIPNe), což je běžná příčina ukončení léčby (Polomano et al., 2001). Přesné mechanismy, z nichž tento jev vychází, zůstávají nejasné a představují tak významnou terapeutickou výzvu. Nedávné studie naznačují, že neuroinflamační změny v periferní i centrální nervové soustavě hrají klíčovou roli při vzniku a udržování periferní neuropatie způsobené jak chemoterapií, tak i periferním poškozením (Moalem a Tracey, 2006; Peters et al., 2007). Losartan je široce používán

blokátor angiotenzinových receptorů typu 1 (AT1R). Kromě antihypertenzního účinku byly losartan a další sartany studovány na protizánětlivé a neuroprotektivní vlastnosti u různých modelů. Například příznivé léčebné účinky sartanů byly prokázány u neurodegenerativních poruch, jako je Parkinsonova choroba (Mertens et al., 2010), Alzheimerova choroba (Wang et al., 2007), ateroskleróza (Yamamoto et al., 2015); diabetes (Nakamura et al., 2009) a u dalších zánětlivých stavů. Protizánětlivý účinek losartanu je pravděpodobně zprostředkován signalizací PPAR γ receptorů, jelikož jeden z metabolitů losartanu (EXP3179) je částečným agonistou těchto jaderných receptorů (Schupp et al., 2006).

Již před třiceti lety Hunt a jeho kolegové popsali indukci exprese proteinu c-Fos v povrchových vrstvách míchy po periferní stimulaci škodlivé intenzity (Hunt et al., 1987). c-Fos je proteinový produkt raného genu *c-fos*, který je exprimován v buněčné perinukleární cytoplazmě neuronů v SCDH, proto je široce používán jako marker aktivace nociceptivních neuronů při škodlivé periferní stimulaci. Škodlivá periferní stimulace zároveň aktivuje fosforylaci kináz regulovaných extracelulární signalizací typu 1 a 2 (ERK1 a ERK2) v povrchovém SCDH – oblasti, kde končí periferní aferentní vlákna (Ji et al., 1999). Fosforylovaný ERK (pERK) je také často používaným a dobře zavedeným markerem buněčné aktivace škodlivými stimuly. Podobně jako c-Fos je exprese pERK indukována různými stimuly a závisí na intenzitě (Gao a Ji, 2009).

Chemokin CCL2 je považován za jeden z hlavních pronociceptivních markerů po poškození periferních nervů. Zvýšená exprese chemokinu CCL2 v DRG neuronech byla popsána u různých modelů neuropatické bolesti, včetně konstriktory nervu (Zhang a De Koninck, 2006), CCI a SNL (Jeon et al., 2009). Kolokalizace CCL2 a substance P, CGRP a TRPV1 v DRG neuronech naznačuje syntézu CCL2 hlavně v nociceptivních neuronech (Dansereau et al., 2008). Po poškození periferních nervů je CCL2 syntetizován v postižených DRG neuronech, transportován přes centrální terminály do SCDH, kde působí jako pronociceptivní neuromodulátor (Van Steenwinckel et al., 2011).

Tato dizertační práce je primárně zaměřena na studium neuroinflamačních změn během stavů periferní neuropatie vyvolané chemoterapií a poraněním periferního nervu. Další část této práce je věnována mechanismům centrální senzitivace na míšňní úrovni a dopadům na nociceptivní signalizaci. S ohledem na rozmanitost možných patologických spouštěčů je zřejmé, že při vývoji potenciálně bezpečnějších a účinnějších léků pro periferní neuropatii jsou zásadní léčebné strategie založené na mechanismu vzniku tohoto onemocnění.

Cíle práce

Obecným cílem této práce bylo prozkoumat mechanismy vývoje patologických bolestivých stavů pomocí modelů akutní a chronické bolesti s využitím *in vitro* a *in vivo* přístupů. Hlavní část této práce je zaměřena na protizánětlivou roli systémové léčby losartanem u modelů neuropatické bolesti. Druhá část je věnována úloze signalizace TRPV1 receptorů ve vývoji centrální senzitivace.

Konkrétní cíle jsou následující:

- 1) studovat účinek systémové léčby losartanem na vývoj periferní neuropatie po poškození periferního nervu;
- 2) popsat účinek systémové léčby losartanem na neuropatické změny vyvolané PIPN a prozkoumat možný základní mechanismus účinku losartanu;
- 3) vyhodnotit účinek paclitaxelu na aktivaci míšních neuronů a popsat roli TRPV1 receptorů v tomto procesu;
- 4) charakterizovat účast signalizace TRPV1 receptorů na CCL2-indukované aktivaci míšních neuronů a na vývoji akutní hypersenzitivity u potkanů s intratekální aplikací CCL2.

Materiály a metody

Experimentální zvířata. Všechny experimenty byly schváleny Etickou komisí Fyziologického ústavu AV ČR v souladu s platnou legislativou. Všechny experimenty byly prováděny na samcích potkanů Wistar (šlechtitelský program CAS Fyziologického ústavu). Akutní míšní řezy byly připraveny z juvenilních samců potkanů Wistar (P21-P23). Všechny experimenty *in vivo* byly prováděny na dospělých samcích potkanů Wistar (250 - 300 g). Zvířata byla držena v 12hodinovém cyklu světlo / tma v plastových klecích s měkkou podestýlkou, v prostředí s odpovídající teplotou a ventilací (22 ± 1 ° C) s potravou a vodou *ad libitum*. Pokusy byly prováděny během světelné fáze denního cyklu.

Měření mechanické a tepelné citlivosti. Ve všech experimentálních skupinách byly kontrolní hodnoty získány před indukcí modelu periferní neuropatie nebo před jakýmkoli jiným experimentálním postupem. Mechanická citlivost (PWT) byla hodnocena na zadních tlapkách pomocí elektronického dynamického plantárního von Freyova estesiometru (IITC Inc Life Science, Model 2390 Series). Mechanický práh odtahu byl tlak vyvíjený (v gramech), který spustil odtažení tlapky. Latence odtažení tlapky k tepelným podnětům (PWL) byly měřeny sálavým teplem aplikovaným na povrch zadní tlapky, dokud nebyl pozorován úmyslný únikový pohyb.

Podvázání míšního nervu (SNL). Podvázání míšních nervů (SNL) byla provedena pod anestézií ketaminem (100 mg / kg i.p., Narketan, Zentiva) a xylazinem (25 mg / kg i.p., Xylapan, Zentiva). L5 SNL byla provedena podobně jako metoda popsaná Kimem a Chungem (Kim and Chung, 1992). Levý příčný výběžek obratle L6 byl nejprve odstraněn a poté míšní nerv L5 byl pevně podvázán hedvábnou nití 5,0. Byla potvrzena úplná hemostáza a rána byla chirurgicky uzavřena ve vrstvách.

Implantace intratekálního katétru. Katétrů byly vyrobeny ze dvou polyethylenových hadic o různé velikosti PE-5 a PE-10. Hadice PE-10 byla nejprve ohnuta do potřebné formy a poté na jedné straně spojena s hadicí PE-5 epoxidovým lepidlem. Implantace katétru byla prováděna v hluboké anestezii současně s operací SNL. Konec katétru PE-5 byl vložen do

subarachnoidálního prostoru a fixován zubním cementem. Konec katétru PE-10 byl externalizován v týlní oblasti a uzavřen.

Podání léčiv. Pro intratekální aplikaci CCL2 nebo SB366791 bylo podáno 10 μ l fyziologického roztoku, 10 μ l roztoku CCL2 nebo 15 μ l roztoku SB366791 a následně 45 μ l fyziologického roztoku pomocí lumbosakrálního intratekálního katétru. V další sadě experimentů byly intratekální injekce provedeny přímým vpichem mezi obratly L4 a L5. Krysám byl injekčně podán fyziologický roztok, CCL2 a /nebo SB366791 v objemu 30 μ l pod anestézií isofluranem (Forane, Abb Vie s.r.o., Česká republika). Losartan byl podáván *per os* (*p.o.*) nebo intratekálně (*i.t.*). Pro *p.o.* podávání (100 mg/kg/den), losartan (Lozap, Zentiva) byl rozpuštěn v pitné vodě (skupina LOS). Pro *i.t.* aplikace - 10 μ l 20 μ M roztoku losartanu (Losartan draselný, Tocris) následované 40 μ l fyziologického roztoku bylo injikováno lumbosakrálním katétrem v anestézii isofluranem (3%, Forane, AbbVie). Paclitaxel (PAC) byl podáván formou intraperitoneálních (*i.p.*) injekcí (5 x 2 mg/kg, skupina PAC). Křasy v kontrolní skupině dostaly *i.p.* injekce vehikula (Kolliphor EL (Sigma Aldrich, Německo) / ethanol, 1: 1, skupina VEH) ve stejný čas.

Imunohistochemie na DRG a dorzálních kořenech a kvantifikace dat. Experimentální křasy byly hluboce anestezizovány kombinací ketaminu (100 mg/kg, Narketan, Zentiva) / xylazinu (25 mg/kg, Xylapan, Zentiva), intrakardálně perfundovány fyziologickým roztokem a následně ledově studeným 4 % paraformaldehydem. L5 DRG a přilehlé dorzální kořeny (DR) byly odstraněny a dodatečně fixovány při 4 °C po dobu 24 hodin, kryoprotektovány sacharózou přes noc a krájeny v kryostatu při 16 μ m. Tyto řezy byly dále zpracovány pro imunohistobarvení na CD68 pomocí myší anti-CD68 (1:200; Serotec, Raleigh, NC) primární protilátky a oslí anti-myší sekundární protilátky Alexa Fluor® 488 (1:400, Jackson Immuno Research Inc, USA). Všechny řezy byly vizualizovány a zachyceny pomocí fluorescenčního mikroskopu vybaveného digitálním kamerovým systémem (Olympus BX53). Pro každou sekci byl měřen region zájmu (ROI) (v pixelech). Oblast CD68-imunoreaktivních (IR) buněčných těl v této oblasti byla měřena pomocí softwaru ImageJ (NIH, USA). Poměry IR / ROI byly vypočteny a vyjádřeny v procentech (IR%).

qPCR v reálném čase (RT PCR). Zvířata byla hluboce anestezizována 3% isofluranem (Forane®, Abb Vie s.r.o., Česká republika), požadované tkáně byly odstraněny, zmrazeny v tekutém dusíku a uloženy při -80 °C. Celková RNA ze zadního rohu míšního a DRG byla izolována komerčně dostupnou sadou RNeasy Mini (Qiagen, Německo) podle protokolu výrobce. Reverzní transkripce na cDNA byla provedena pomocí systému reverzní transkripce ImProm-II (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Kvantitativní RT PCR byla provedena za použití Viiia 7 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 5x Hot Firepol Probe QPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Tartu, Estonsko) a TaqMan Assays (Life Technologie) specifické pro studované geny. Přeložené rozdíly hladin mRNA oproti kontrole vehikula byly vypočteny metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak a Schmittgen, 2001).

Měření proteinů (ELISA). Hladiny proteinu arginázy 1 byly měřeny pomocí sady ELISA (Rat Arg1 ELISA Kit, MyBioSource, San Diego, CA, USA) podle pokynů výrobce. Potkani byli

hluboce anestetizováni isofluoranem; tkáně byly odstraněny a okamžitě zmrazeny v tekutém dusíku. Před ELISA měřením byly vzorky tkáně zpracovány pro kvantifikaci proteinu pomocí Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

Western blot. Zvířata byla hluboce anestetizována a byly odstraněny L3-L5 DRG a sekce míchy L3-L5. Vzorky byly zmrazeny a uloženy při -80 °C. Pro každý vzorek byla koncentrace proteinu stanovena metodou Bradfordové (BioRad proteinový test). Vzorky proteinů byly separovány SDS-PAGE 4-10% bis akrylamidovým (Serva) -ricinovým (Sigma-Aldrich) gelem. Nitrocelulókové membrány se vzorky transferového proteinu byly inkubovány přes noc s příslušnými primárními protilátkami. Bloty pak byly inkubovány s kozí anti-myší IRdye 800 spojenou s IRdye 680 a skenovány pomocí Odyssey System Imager. Imunoreaktivita sledovaných proteinů byla porovnána s kontrolními hodnotami imunoreaktivity β -aktinu a kvantifikována na základě skenů blotů pomocí softwaru Aida image analyzer (Aida™). Všechny hodnoty pro SNL studii byby získány první standardizací hodnot na odpovídající hodnoty β -aktinu a následnou normalizací s použitím kontralaterální hodnoty vzorku míchy jako reference (100%). Pro studii PINP byly hodnoty získány standardizací naměřených hodnot na odpovídající hodnoty β -aktinu a následnou normalizací s použitím hodnoty vzorku míchy kontrolní VEH skupiny jako reference (100%). Všechny hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM.

Příprava míšních řezů a indukce neuronální aktivity. Po hluboké anestézii isofluranem byla bederní mícha rychle odstraněna a ponořena do vychlazeného (4°C) a okysličeného disekčního roztoku. Mícha pak byla nakrájena pomocí vibratomu (Leica VT1200S, Německo) na 200 μ m (pro inkubaci s CCL2) nebo 350 μ m silné plátky (pro inkubaci s PAC). Ve studii s c-Fos byly plátky inkubovány s PAC (100 nM) po dobu 60 minut (skupina PAC). Jiné plátky byly inkubovány s TRPV1 antagonisty (10 μ M) po dobu 10 minut, a poté byl do inkubační komory přidán PAC (100 nM, 60 minut) (skupiny SB + PAC a AMG + PAC). Další skupina plátek byla inkubována pouze s antagonistou TRPV1 (10 μ M, 70 minut, skupiny SB a AMG). Kontrolní skupina plátek byla inkubována s vehikulem (DMSO, 2 %, 70 min, skupina CTRL). Pro indukci pERK byla jedna skupina plátek inkubována s CCL2 (10 nM po dobu 10 minut); další skupina byla inkubována s SB 366791 (10 μ m po dobu 5 minut), poté byl přidán CCL2 (10 nM po dobu 10 minut). Během inkubační doby byly plátky neustále promývány roztokem nasyceným 95% O₂ a 5% CO₂.

Imunohistochemická detekce c-Fos a pERK. Bezprostředně po inkubaci (viz výše) byly plátky fixovány ve 4% paraformaldehydu. Kryoprotekce byla zajištěna ponořením do roztoku sacharózy. Plátky pro studii s c-Fos o tloušťce 350 nM byly rozkrájeny pomocí kryostatu na tloušťku 16 μ m. Řezy byly poté zpracovány pomocí imunohistochemické metody SABC s použitím primárních protilátek anti-c-Fos (králík, 1: 2000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) nebo anti-pERK 1/2 (králík, 1: 500, Cell Signaling Technology). Pro detekci reakčního produktu byly plátky inkubovány po dobu 2-5 minut v roztoku 1,85 mM DAB a 0,003% peroxidu vodíku v PBS po dobu 2–5 minut (Sigma Aldrich, Česká republika). Preparát míchy byl vyfotografován (Olympus BX53) a povrchové laminy I /II zádního míšního rohu byly měřeny. Expres c-Fos byla kvantifikována pomocí software

ImageJ (NIH), byl spočítán počet imunoreaktivních (IR) c-Fos-pozitivních neuronálních jader na plochu (buňky/plocha x 1000). Pro studii pERK byl zprůměrován počet pERK pozitivních buněk z levého a pravého dorzálního rohu a poté byly zprůměrovány výsledky z jednotlivých zvířat.

Statistická analýza dat. Všechny statistické testy byly provedeny pomocí softwaru SigmaStat™ a kritériem statistické významnosti bylo $P < 0,05$. Všechna data jsou uvedena jako průměr \pm SEM. Pro imunohistochemii s akutními řezy byly skupiny porovnány pomocí jednocestné ANOVA a následným Holm-Sidakovým *post hoc* testem pro c-Fos studii a Student-Newman-Keulsovou metodou pro hodnocení pERK exprese. Pro SNL studii byla použita dvoucestná RM ANOVA následovaná Holm-Sidakovým *post hoc* testem rozdílů v čase mezi experimentální a kontrolní tlapkou. Pro vyhodnocení statistických rozdílů v různých časových bodech mezi experimentálními skupinami byla použita dvoucestná ANOVA. Pro studii PIPN byla použita dvoucestná ANOVA následovaná Holm-Sidakovým *post hoc* testem. Pro analýzu dat z western blotů ve studii SNL byly porovnány hladiny proteinů mezi ipsi- a kontralaterálními stranami nebo mezi skupinami SNK a LOS pomocí Mann-Whitney Rank Sum testu. Pro korekci násobných srovnání byla následně použita Bonferroniho korekce. Pro statistické srovnání hladin proteinu mezi experimentálními skupinami ve studii PIPN byla použita jednocestná ANOVA následovaná Holm-Sidakovým *post hoc* testem. Pro imunohistochemii na CD68 byly srovnány rozdíly mezi experimentálními stranami pomocí Wilcoxon Signed Rank testu; k porovnání významnosti rozdílů mezi skupinami SNL a LOS byl použit Mann-Whitney U test. Experimenty RT PCR a ELISA byly vyhodnoceny pomocí jednosměrné metody ANOVA a Holm-Sidakova *post hoc* testu.

Výsledky a diskuze

Protizánětlivý účinek systémové léčby losartanem v modelu periferní neuropatie vyvolané SNL (Publikace A: Kalynovska et al., 2019)

V této studii jsme ukázali, že léčba losartanem brání u potkanů rozvoji SNL-indukované tepelné hyperalgezie a neuroinflamačních změn v míše a DRG. Systémová léčba losartanem (100 mg/ kg /den, *p.o.*) také zmírnila zvýšenou expresi prozánětlivých proteinů v ipsilaterální míše zvířat s operací SNL. Účinnost léčby losartanem závisí na jeho schopnosti proniknout přes hematoencefalickou bariéru. Farmakokinetické studie potvrdily, že *p.o.* podání losartanu vede k dostatečné, ale ne úplné inhibici centrálně zprostředkovaných účinků angiotenzínu II, pokud je podávána dávka dostatečně vysoká (30-100 mg /kg) (Culman et al., 1999). Je důležité zdůraznit, že v naší studii jsme použili relativně vysokou dávku losartanu, která by měla vést k jeho účinné koncentraci v míše. SNL vyvolalo v míše zvýšení hladin TNF α a CCL2, o kterých je známo, že se podílejí na modulaci synaptického přenosu v SCDH (Spicarova et al., 2011, Spicarova et al., 2014).

Léčba losartanem výrazně snížila nadměrnou expresi těchto signálních proteinů, což koreluje se zmírněním tepelné hyperalgie u potkanů, léčených losartanem.

Je známo, že poškození periferních nervů vede k neuroimunitní reakci v centrálním i periferním nervovém systému. V naší studii SNL vyvolalo infiltraci makrofágů do ipsilaterálních DRG a přilehlých doryálních kořenů a také aktivaci mikroglie v SCDH na 7. den po operaci. Léčba losartanem snížila aktivaci spinálních mikroglíí, což se projevilo na hladinách proteinů CD11b (OX42). Výsledky imunohistochemie také odhalily sníženou akumulaci CD68-pozitivních makrofágů ve skupině LOS. Zde předpokládáme, že protizánětlivý účinek léčby losartanem na akumulaci makrofágů je zprostředkován agonismem PPAR γ receptorů, protože je známo, že metabolit losartanu, EXP3179, se váže na PPAR γ v makrofázích (Gordon, 2003).

V širším kontextu může léčba losartanem účinkovat proti patologiím vyvolaným neurogenním zánětem. Představuje tedy slibnou strategii rozvoje protizánětlivé léčby.

Antialodynické a protizánětlivé účinky systémové léčby losartanem u potkanů léčených paclitaxelem (publikace B; Kalynovska et al., předložený manuskript)

Naše behaviorální výsledky ukazují preventivní účinek systémové léčby losartanem (100 mg /kg /den) na vývoj mechanické alodynie, vyvolané léčbou paclitaxelem (5x2 mg /kg, *i.p.*). Tento účinek se projevil zmírněním poklesu PWT ve srovnání se skupinou PAC 14. den po zahájení léčby. Podávání losartanu také zmírnilo vývoj neuroinflamačních změn u DRG a SCDH u potkanů léčených paclitaxelem a tento účinek byl ještě výraznější během pozdější, chronické fáze PIPN (21. den po zahájení léčby paclitaxelem). Léčba losartanem konkrétně zrušila nadměrnou expresi hlavních prozánětlivých mediátorů - CCL2 a IL6 v DRG, a CCL2 a TNF α v SCDH, která je vyvolána paclitaxelem. Jak již bylo zmíněno, CCL2 a TNF α hrají důležitou roli při centrální senzitivaci a rozvoji patologické bolesti prostřednictvím modulace synaptického přenosu v SCDH. Snížení hladin CCL2 a TNF α vedlo k významnému oslabení behaviorálních odpovědí na mechanické stimulační srovnání se skupinou PAC. Paclitaxel při systematické aplikaci špatně prochází hematoencefalickou bariérou, proniká však bariérou hematoneurální a hromadí se převážně v DRG, kde přetrvává ve vysokých koncentracích až 10 a více dní po poslední injekci (Xiao et al., 2011). V této studii léčba paclitaxelem také indukovala zvýšení hladin specifických mRNA v DRG, což ukazuje na přítomnost prozánětlivých M1 makrofágů - CCR2, CD68, CD11b, NOX2, iNOS a CD64. PPAR γ receptory jsou teď intenzivně studovány v souvislosti s polarizací makrofágů. Rostoucí počet studií potvrzuje, že aktivace PPAR γ spouští změnu polarizace makrofágů z fenotypu M1 k protizánětlivému fenotypu M2, čímž snižuje místní neuroinflamaci a následně neuropatickou bolest (Churi et al., 2008, Hasegawa-Moriyama et al., 2012). Léčba losartanem podstatně snížila expresi M1 markerů, a zároveň vedla k robustnímu zvýšení hladin mRNA markerů M2 makrofágů - arginázy 1 a IL10. Několik studií potvrdilo, že aktivace PPAR γ vede k podstatnému zvýšení hladin proteinu arginázy 1 a IL10 a jejich mRNA v makrofázích (Bouhlef et al., 2007, Gao et al., 2015, Su et al., 2017). IL10 je protizánětlivý cytokin produkovaný M2 makrofágy. Mezi jeho

protizánětlivé vlastnosti patří také deaktivace makrofágů, charakterizovaná inhibicí produkce prozánětlivých cytokinů destabilizací transkriptů mRNA pro TNF nebo IL1 β (Vanderwall et al., 2018), zvýšenou produkcí protizánětlivých cytokinů a snížením exprese komplexu histokompatibility třídy II (Gordon a Taylor, 2005). Je známo, že zvýšené hladiny proteinu IL10 v míše způsobují úlevu od bolesti u modelů neuropatických bolestí včetně PIPN (Ledeboer et al., 2005, Vanderwall et al., 2018). PIPN-indukovanou mechanickou alodynii lze zmírnit a/nebo zvrátit intratekální terapií IL10 u potkanů (Ledeboer et al., 2007). V našich experimentech zvýšené hladiny IL10 mRNA v DRG potkanů skupiny LOS dobře koreluje se zmírněním allodynického stavu u potkanů léčených paclitaxelem. Exprese arginázy 1, která je obecně považována za typický marker M2 makrofágů (Gordon, 2003, Martinez a Gordon, 2014), je rovněž regulována prostřednictvím PPAR γ (Odegaard et al., 2007). V naší studii jsme navíc ukázali zvýšení mRNA hladin PPAR γ receptorů ve skupině LOS, což s největší pravděpodobností ukazuje na mechanismus pozitivní zpětné vazby (Wakabayashi et al., 2009). Tato data dále potvrzují hypotézu, že protizánětlivý účinek losartanu v našich studiích je zprostředkován hlavně prostřednictvím PPAR γ receptorů.

Naše studie ukazuje významné protizánětlivé účinky léčby losartanem u modelu PIPN. Vzhledem k známé toxicitě kompletních agonistů PPAR γ , představuje parciální agonismus PPAR γ receptorů s méně toxickým losartanem slibného kandidáta na léčebnou strategii pro pacienty s PIPN.

Léčba antagonisty TRPV1 receptorů zeslabuje aktivaci míšních neuronů vyvolanou paclitaxelem (Publikace C; Kalynovska et al., 2017)

V této studii jsme se zaměřili na zkoumání role míšních TRPV1 receptorů u procesu neuronální aktivace vyvolané paclitaxelem. Naše imunohistocemická analýza odhalila neuronální aktivaci v SCDH indukovanou paclitaxelem, což se projevilo zvýšenou expresí proteinového produktu raného genu c-Fos. Tato indukce exprese c-Fos je pravděpodobně závislá na signalizaci míšních TRPV1 receptorů, jelikož preinkubace akutních míšních řezů s antagonisty TRPV1 (SB366791 a AMG9810) vedla k útlumu exprese c-Fos v porovnání s inkubací se samotným paclitaxelem. Kvůli specifickému návrhu naší *in vitro* studie, byly v míšních řezech přítomny pouze centrální výběžky primárních aferentů. Účinek paclitaxelu na neurony mohl být zprostředkován buď aktivací presynaptických zakončení a/nebo přímým účinkem na postsynaptické neurony. Několik studií prokazuje, že aktivace TLR4 receptorů může přímo spustit aktivaci genu *c-fos* (Introna et al., 1986, Guha a Mackman, 2001). Je známo, že paclitaxel může přímo aktivovat TLR4 receptory u hlodavců (Li et al., 2014; Li et al., 2015). Avšak na úrovni míchy jsou TLR4 receptory exprimovány převážně v gliových buňkách (Saito et al., 2010, Li et al., 2014), ale ne v neuronech (Li et al., 2014). Aktivace mikroglíí dále vede k uvolňování cytokinů a chemokinů (Saito et al., 2010), což může potenciovat presynaptickou funkci TRPV1 receptorů (Spicarova et al., 2011, Spicarova et al., 2014). Tudíž, účinek paclitaxelu na neuronální aktivaci byl s největší pravděpodobností zprostředkován presynaptickými a/nebo gliovými TLR4 receptory, jejichž aktivace vedla k následné aktivaci presynaptických TRPV1 receptorů. Tato signální kaskáda vedla ke zvýšenému uvolňování neurotransmiterů a neuromodulátorů, jako je

glutamát, substance P a CGRP, s následnou aktivací postsynaptických neuronů a expresi c-Fos. Tato hypotéza je v souladu s elektrofyziologickými údaji měřenými za podobných podmínek *in vitro*, kdy zvýšená frekvence spontánních a miniaturních excitačních postsynaptických proudů po podání paclitaxelu byla závislá na aktivaci TRPV1 receptorů (Li et al., 2015). Naše nálezy dále potvrdily aktivní roli míšních TRPV1 receptorů ve vývoji neuropatické bolesti navozené léčbou paclitaxelem.

Úloha signalizace TRPV1 receptorů ve vývoji akutní bolestivé přecitlivělosti vyvolané CCL2 (publikace D; Spicarova et al., 2014)

Pro zjištění role TRPV1 receptorů ve vývoji hyperalgie vyvolané CCL2, jsme potkanům pomocí intratekální aplikace podávali antagonisty TRPV1 receptorů a/nebo CCL2. Aplikace CCL2 pomocí intratekálního katétru vyvolala významné snížení jak PWL, tak PWT již 1 hodinu po podání. Tyto výsledky potvrdily přítomnost tepelné hyperalgie a mechanické alodynie po intratekální aplikaci CCL2, což je v souladu s dříve publikovanými pozorováními (Tanaka et al., 2004, Dansereau et al., 2008, Gao et al., 2009). Aplikace antagonisty TRPV1 receptorů SB36679 před podáním CCL2 buď pomocí lumbosakrálního katétru nebo přímou intratekální injekcí odstranila rozvoj CCL2-indukované tepelné hypersenzitivity, zatímco vzniku mechanické alodynie se nepodařilo zabránit. Naše výsledky jsou v souladu s literaturou. Cavanaugh et al. (Cavanaugh et al., 2009) ukazují, že farmakologická ablace centrálních terminálů peptidergických nociceptorů exprimujících TRPV1 receptory má za následek podstatnou ztrátu nociceptivní tepelné, ale ne mechanické citlivosti. Autoři také pozorovali selektivní snížení mechanické citlivosti po genetické ablaci nemyelinizovaných sensorických neuronů exprimujících s G proteinem spřažený receptor Mrgprd (Cavanaugh et al., 2009). Pokud jde o přesný mechanismus působení CCL2 na míšní TRPV1 receptory, domníváme se, že je zprostředkován CCR2 receptory exprimovanými na presynaptických zakončeních v SCDH. Aktivovaný CCR2 receptor zprostředkovává své funkce prostřednictvím aktivace fosfolipázy C (PLC) a následné hydrolýzy fosfatidylinositol 4, 5-bisfosfátu (PIP2). TRPV1 receptory jsou tonicky blokovány PIP2, proto jeho hydrolýza umožňuje aktivaci TRPV1 receptorů (Chuang et al., 2001). Dále může být stav senzitivace/aktivace TRPV1 receptorů regulován fosforylací proteinovou kinázou C (PKC), která zvyšuje pravděpodobnost otevření kanálu pro tyto receptory (Huang et al., 2006, Jung et al., 2008). Naše výsledky dále podporují hypotézu, že míšní TRPV1 receptory se primárně podílejí na vývoji škodlivé přecitlivělosti na teplo, nikoli však na vzniku mechanické alodynie.

Naše imunohistochemická analýza ukazuje, že preinkubace s antagonistou TRPV1 receptoru SB366791 zamezuje zvýšení aktivity pERK v míšních řezech po aplikaci CCL2. Elektrofyziologické výsledky v naší studii (Publikace D, Spicarova et al., 2014) ukazují, že účinek CCL2 v SCDH je zprostředkován CCR2 receptory spřaženými s G-proteinem na presynaptických zakončeních. Aktivace CCR2 receptorů následně vyvolala na TRPV1 závislé uvolnění glutamátu ze synaptických terminálů. Preventivní účinek SB366791 na CCL2 indukovanou expresi pERK odpovídá také jeho protihyperalgetickému účinku v behaviorálních experimentech s intratekálním podáváním CCL2 a kombinace SB366791 /

CCL2. Tyto výsledky tedy ukazují na významnou roli míšních TRPV1 receptorů v mechanismu CCL2-indukované neuronální aktivace a akutní tepelné přecitlivělosti.

Závěr

Dle konkrétních cílů práce byly učiněny následující závěry:

- 1) Systémová léčba losartanem má preventivní účinek proti neuroinflamačním a neuropatickým změnám po poškození periferního nervu. Losartan však není účinný proti mechanické alodynii vyvolané SNK, což naznačuje odlišný mechanismus jejího vývoje ve srovnání s tepelnou hyperalgií. Léčba losartanem tak představuje slibnou strategii v rozvoji protizánětlivých léčebných postupů.
- 2) Systemická léčba losartanem je také účinná proti neuropatickým změnám vyvolaným chemoterapií. Vzhledem k našemu výzkumu a v širším kontextu je antineuropatický účinek losartanu s největší pravděpodobností zprostředkovan PPAR γ receptory. Spolu s analgetickými a protizánětlivými účinky losartanu jsme také prokázali významný vliv na aktivaci reparačních procesů, který může být zvláště zajímavý jako nová léčebná strategie pro pacienty s PIPN.
- 3) Naše výsledky ukázaly důležitou roli TRPV1 receptorů ve zvýšení aktivace míšních neuronů (prokázáno zvýšenou expresí c-Fos) po aplikaci paclitaxelu. To dále potvrzuje významnou úlohu TRPV1 receptorů ve vývoji neuropatické bolesti po léčbě paclitaxelem.
- 4) Naše studie prokazuje významnou roli CCL2/CCR2 signalizace v míše ve vývoji akutní hypersenzitivity. Dále ukazujeme, že míšní TRPV1 receptory hrají podstatnou roli ve vývoji CCL2-indukované akutní termální hyperalgie, odhalující nový možný cíl pro vývoj léčby hyperalgie. Spinální TRPV1 receptory jsou také zapojeny do mechanismů CCL2-indukované aktivace míšních neuronů v SCDH. Je tedy možné předpokládat aktivní roli míšních TRPV1 receptorů ve fenoménu centrální senzitivity, což může dále vést k rozvoji syndromu neuropatické bolesti.

English Part

Introduction

Pain is a principal integral part of the body's protective system. The International Association for the Study of Pain (IASP) defines pain as "an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage or described in terms of such damage". Acute sensation of pain results in reflexive retraction from the painful stimulus, and tendency to protect the affected body part while it heals, as well as to avoid painful situation in the future. The IASP definition of pain also suggests that pain is a highly subjective matter, as the equal stimuli may induce various reactions in different individuals. Indeed, the intensity of pain perception depends on sex, age, psychological state or even mood.

However, under pathological conditions pain loses its protective function and becomes a problem itself. Pathological neuropathic pain represents a main sign of neuropathy, a highly debilitating disorder that has a robust impact on the quality of individual's life. The variety of causes that trigger pathological changes in pain processing has been studied from very beginning of human medicine, as pain is the main symptom of organism's dysfunction at many levels. Neuropathic pain may be induced by injury of peripheral or central nervous system by various mechanisms involving traumatic injury, metabolic damage, chemotherapy and virus infection (Woolf, 2010). The changes in nociception (the detection, transduction and transmission of nocuous stimuli to specialized brain structures) and/or in pain perception may be influenced also by stress, anxiety or different psychiatric disorders. Despite of long-lasting extensive study, the mechanisms underlying neuropathic pain development are still not understood completely, hence, treatment strategies are not satisfactory for now.

Inflammatory changes in the nervous system, also referred as neuroinflammation, usually accompany the development and maintenance of neuropathic pain (Ellis and Bennett, 2013). The intensity and extent of the neuroinflammatory reaction is highly dependent on the type and severity of injury to the nervous system. Additionally, different neuroinflammatory changes take place in central and peripheral nervous systems. Spinal cord is considered as immune-privileged tissue, as it is protected with blood-spinal cord barrier (BSCB) and is equipped with immune-like glial cells – microglia (Bartanusz et al., 2011). Microglia, in cooperation with astrocytes, become activated in reaction to specific stimuli, produce pro-inflammatory factors and subsequently modulate nociceptive signal transmission. On the other side, DRGs lack any diffusion barrier, and this morphological issue makes DRG cells more susceptible to different circulating molecules that have limited access to the immune privileged organs (Liu et al., 2018).

Anticancer paclitaxel treatment often induces unwanted side effect called paclitaxel-induced peripheral neuropathy (PINP), which is a common cause for treatment termination (Polomano et al., 2001). The exact mechanisms underlying this phenomenon remain unclear, causing a significant therapeutical challenge. Recent studies suggest the neuroinflammatory changes in both peripheral and central levels to play a pivotal role in the establishment and maintenance of peripheral neuropathy caused by chemotherapy and

peripheral injury as well (Moalem and Tracey, 2006; Peters et al., 2007). Losartan is a widely used Angiotensin II receptor type 1 (AT1R) blocker. Besides its antihypertensive effect, losartan and other sartans were also studied for anti-inflammatory and neuroprotective properties on different disease models. For example, beneficial treatment effects of sartans were shown in neurodegenerative disorders, such as Parkinson's (Mertens et al., 2010) and Alzheimer's disease (Wang et al., 2007); in atherosclerosis (Yamamoto et al., 2015); in diabetes (Nakamura et al., 2009), and other inflammatory conditions. Anti-inflammatory effect of losartan is thought to be mediated via PPAR γ -induced signaling, as one of losartan's metabolites, EXP3179, is a partial agonist of these nuclear receptors (Schupp et al., 2006).

Already thirty years ago, Hunt and colleagues reported robust induction of c-Fos protein expression in spinal cord superficial laminae following peripheral noxious stimulation (Hunt et al., 1987). c-Fos is a protein product of early gene *c-fos*, which is expressed in the cell perinuclear cytoplasm of the SCDH neurons, hence, it is widely used as a marker of nociceptive neuron activation upon noxious peripheral stimulation. Along with the induction of c-Fos expression, noxious peripheral stimulation also activates the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1 and ERK2) in superficial SCDH, the area where peripheral afferents terminate (Ji et al., 1999). Phosphorylated ERK (pERK) is also an often used and well-established marker of cell activation by noxious stimuli. Like c-Fos, pERK expression is induced by the variety of stimuli, and is intensity-dependent (Gao and Ji, 2009).

Chemokine C-C motif ligand 2 (CCL2) is considered as one of the main pronociceptive markers after the peripheral nerve injury. The increased CCL2 expression by DRG neurons was described in different neuropathic pain models, including nerve constriction (Zhang and De Koninck, 2006), CCI and SNL (Jeon et al., 2009). Co-localization of CCL2 and the substance P, CGRP and TRPV1 in DRG neurons suggests the CCL2 synthesis mainly by nociceptive neurons (Dansereau et al., 2008). After the peripheral nerve injury, CCL2 is synthesized in the affected DRG neurons, transported via central terminals, and acts as pronociceptive neuromodulator in the SCDH (Van Steenwinckel et al., 2011).

This doctoral thesis is primarily focused on the study of neuroinflammatory changes during chemotherapy- and injury-induced peripheral neuropathy states. Another part of this thesis is devoted to the mechanisms of central sensitization at the spinal cord level in nociceptive signaling. Considering the diversity of possible pathological triggers, it is clear that mechanism-based treatment strategies should be essential in the elaboration of potentially safer and more effective medication for peripheral neuropathy.

Aims of the Thesis

The general goal of this thesis was to investigate the mechanisms underlying the development of pathological pain states using acute and chronic pain models with in vitro and in vivo approaches. The main part of this thesis is focused on the anti-inflammatory

role of systemic losartan treatment in neuropathic pain models. The other part is devoted to the role of TRPV1 receptor signaling in the development of central sensitization.

The specific aims are the following:

- 1) to study the effect of systemic losartan treatment on the development of peripheral neuropathy after peripheral nerve injury;
- 2) to describe the effect of systemic losartan treatment on PIPN-induced neuropathic changes and to investigate the possible underlying mechanism of losartan's action;
- 3) to evaluate the effect of paclitaxel treatment on spinal neuronal activation and to describe the role of TRPV1 receptors in this process;
- 4) to characterize the involvement of TRPV1 receptor signaling in CCL2-induced spinal neuronal activation and in the development of acute pain hypersensitivity in rats with intrathecal CCL2 application.

Materials and Methods

Experimental animals. All experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of the Institute of Physiology CAS. All experiments were conducted in male Wistar rats (Institute of Physiology CAS breeding program). Acute spinal cord slices were prepared from juvenile male Wistar rats (P21-P23). All in vivo experiments were conducted in adult male Wistar rats (250 - 300g). Animals were kept on a 12-h light/dark cycle in plastic cages with soft bedding, in an environment with adequate temperature and ventilation ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$) with pellet food and water ad libitum. The experiments were carried out during the light phase of the cycle.

Assessment of mechanical and heat sensitivity. In all the experimental groups, baseline behavioral data were obtained before the induction of peripheral neuropathy model or any other experimental procedure. Mechanical paw withdrawal threshold (PWT) was assessed on hind paws using electronic dynamic plantar von Frey aesthesiometer (IITC Inc Life Science, Model 2390 Series). The mechanical withdrawal threshold was the pressure exerted (in grams) that triggered the paw withdrawal. Paw withdrawal latencies (PWL) were measured via the radiant heat applied to the plantar surface until a deliberate escape movement was observed.

Spinal nerve ligation (SNL). The spinal nerve ligation (SNL) was performed on the left side of the rat under ketamine (100 mg/kg i.p., Narketan, Zentiva) and xylazine (25 mg/kg i.p., Xylapan, Zentiva) anesthesia. The day of the surgery is referred as day 0. The ligation of L5 spinal nerve was performed similar to the method described by Kim and Chung (Kim and Chung, 1992). The fur was shaved, and the skin was disinfected with antiseptic (Jodisol, Spofa), an incision was made on the left side of the spine at the L4-S1 level. The left transverse process of L6 vertebra was first removed; L5 spinal nerve was exposed and then

tightly ligated with 5.0 silk thread. Complete hemostasis was confirmed, and the wound was surgically closed in layers.

Intrathecal catheter implantation. Catheters were made with two polyethylene tubes of different size PE-5 and PE-10. PE-10 tube was first bended to the necessary form and then connected on one side with the PE-5 tubing with epoxy glue. Catheter implantation was performed under deep anesthesia simultaneously with the SNL operation. The PE-5 end of the catheter was inserted to the subarachnoidal space and fixed to the vertebral column with dental cement. PE-10 end of the catheter was externalized in the occipital region and sealed.

Drug administration. For the intrathecal application of CCL2 or SB366791, 10 µl of saline, 10 µl of CCL2 solution or 15 µl of SB366791 solution followed by 45 µl of saline, were delivered via lumbosacral intrathecal catheter. In another set of experiments, intrathecal injections were performed by a direct lumbar puncture between the L4 and L5 vertebrae. Briefly, rats were injected with saline, CCL2 and/or SB366791 in a volume of 30 µl under the isoflurane anesthesia (Forane, Abb Vie s.r.o., Czech Republic). Losartan was administered *per os* (*p.o.*) or intrathecally (*i.t.*). For the *p.o.* administration (100 mg/kg/day), losartan (Lozap, Zentiva) was dissolved in the drinking water. For the *i.t.* application - 10 µl of 20 µM solution of losartan (Losartan Potassium, Tocris) followed by 40 µl of saline was injected via lumbosacral catheter under isoflurane anesthesia (3%, Forane, AbbVie). Paclitaxel was administered via intraperitoneal (*i.p.*) injections (5 x 2 mg/kg) on five alternate days. Rats in the control group received *i.p.* injections of the vehicle (Kolliphor EL (Sigma Aldrich, Germany)/ethanol, 1:1) on the same 5 alternate days.

Immunohistochemistry on DRGs and dorsal roots and data quantification. The rats were deeply anesthetized with ketamine (100 mg/kg, Narketan, Zentiva)/xylazine (25 mg/kg, Xylapan, Zentiva) combination, perfused intracardially with a saline followed by ice cold 4% paraformaldehyde. L5 DRGs and adjacent dorsal roots (DR) were removed and post-fixed at 4°C for 24 hours, cryoprotected with sucrose overnight, and cut in cryostat at 16 µm. These sections were further processed for CD68 immunohistolabelling using mouse anti-CD68 (1:200; Serotec, Raleigh, NC) primary antibody and donkey anti-mouse secondary antibody Alexa Fluor® 488 (1:400, Jackson Immuno Research Inc, USA). All sections were visualized and captured using fluorescence microscope equipped with a digital camera system (Olympus BX53). For every section, the region of interest (ROI) was outlined and measured (in pixels). Area of CD68-immunoreactive (IR) cell bodies in this region was measured using ImageJ software (NIH, USA). IR/ROI ratios were calculated and expressed as percentage (IR%).

Real Time qPCR. The animals were deeply anesthetized with 3% isoflurane (Forane®, Abb Vie s.r.o., Czech Republic) and tissues of interest were briefly removed, frozen in liquid nitrogen and stored at - 80°C. The total RNA from the spinal cord dorsal horn and DRGs was isolated with the commercially available kit RNeasy Mini (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription to cDNA was performed using ImProm-II Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Quantitative RT-PCR was carried out using a Viia 7 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 5x Hot Firepol Probe QPCR Mix Plus (ROX) (Solis

BioDyne, Tartu, Estonia) and TaqMan Assays (Life Technologies) specific for the studied transcript. Fold differences of mRNA levels over vehicle control were calculated by $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

Protein assay. The Arginase 1 protein levels were measured by the ELISA kit (Rat Arg1 ELISA Kit, MyBioSource, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Rats were deeply anesthetized with isoflurane; tissues were removed and immediately frozen in liquid nitrogen. Prior to ELISA measurement, tissue samples were processed for protein quantification using Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

Western blot assay. Animals were deeply anesthetized and L3-L5 DRGs and L3-L5 spinal cord section were removed. The samples were frozen and stored at -80°C . For each sample, protein concentration was determined by Bradford method (BioRad protein assay). Protein samples were separated by SDS-PAGE 4-10% Bis acrylamide (Serva)-Tricine (Sigma-Aldrich) gel. The nitrocellulose membranes with transferred protein samples were incubated overnight with respective primary antibodies. Blots were then incubated with fluorocore-coupled goat anti mouse IRdye 800 and goat anti rabbit LiCor IRdye 680 and scanned with the Odyssey System Imager. The immunoreactivity of proteins of interest was compared with β -actin immunoreactivity values controls and quantified based on scanned images of the blots, with Aida image analyzer software (Aida™). For SNL study, all values were obtained after first standardization of the raw values to β -actin corresponding values and then normalization using the contralateral spinal cord sample value as reference of 100%. For PINP study, values were obtained after first standardization of the raw values to β -actin corresponding values and then after normalization using the VEH group spinal cord sample value as reference of 100%. All values are expressed as means \pm SEM.

Spinal cord slice preparation and induction of neuronal activation. After deep isoflurane anaesthesia, the lumbar spinal cord was briefly removed and immersed in oxygenated ice-cold dissection solution. The spinal cord was then cut with vibratome (Leica VT1200S, Germany) to slices 200 μm (for incubation with CCL2) or 350 μm thick (for incubation with PAC). In c-Fos study, slices were incubated with PAC (100nM) for 60 min (PAC group). Other slices were incubated with TRPV1 antagonists (10 μM) for 10 min, and then PAC (100nM, 60 min) was added to the incubation chamber (SB+PAC and AMG+PAC groups). Another group of slices was incubated with TRPV1 antagonist only (10 μM , 70 min, SB and AMG groups). A control group of slices was incubated with vehicle (DMSO, 2%, 70 min, CTRL group). For the pERK induction, one group of slices was incubated with CCL2 (10 nM for 10 min); another group was incubated with SB 366791 (10 μM for 5 min), then CCL2 (10 nM for 10 min) was added. During the incubation time slices were constantly perfused with solutions saturated with 95% O_2 and 5% CO_2 .

Immunohistochemistry for c-Fos and pERK. Immediately after the incubation, the slices were fixed in 4% paraformaldehyde and cryoprotected with sucrose. For c-Fos study, the 350 μm slices were cut in cryostat at 16 μm . These sections were then processed for immunohistochemistry using SABC method using anti-c-Fos (anti-rabbit, 1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or anti- pERK1/2 (Rabbit, 1:500, Cell Signaling Technology) primary antibody. The reaction product was visualized with 1.85 mM

DAB/0.003% hydrogen peroxide in PBS for 2–5 min (Sigma Aldrich, Czech Republic). Images of the spinal cord were captured; the superficial laminae I/II of the spinal dorsal horn were measured. For c-Fos slices, area and the numbers of immunoreactive (IR) neuronal nuclei for c-Fos were counted using ImageJ software and ratio was calculated (cells/area*1000). For pERK study, the numbers of pERK positive cells from the left and right superficial DH were averaged, and then the results from the individual animals were averaged.

Data analysis. All statistical tests were performed using SigmaStat™ software and the criterion for statistical significance was $P < 0.05$. All data are presented as means \pm SEMs. For acute slices immunohistochemistry, the difference between the groups was compared using One-way ANOVA followed by Holm-Sidak *post hoc* test for c-Fos, and Student-Newman-Keuls Method for pERK evaluation. For SNL study, Two-way RM ANOVA followed by Holm-Sidak *post hoc* test was used to analyze differences over time between the experimental and control paw. Two-way ANOVA was used to assess statistical differences at different testing time points between the experimental groups. For the PIPN study, Two-way ANOVA followed by Holm-Sidak *post hoc* test was used. For the western blot data analyses in the SNL study, Mann-Whitney Rank Sum Test was used for the statistical comparison of protein levels between ipsi- and contralateral sides, as well as between the SNL group and the LOS group, followed by Bonferroni correction to counteract the problem of multiple comparisons. One-way ANOVA followed by Holm-Sidak *post hoc* test was used for the statistical comparison of protein levels between the experimental groups in the PIPN study. For CD68 immunohistochemistry, Wilcoxon Signed Rank test was used to compare side-to-side differences and Mann-Whitney U test was used to determine the significance of the difference between the SNL and LOS groups. For RT PCR and ELISA experiments, One-way ANOVA was followed by Holm-Sidak *post hoc* test.

Results and Discussion

Anti-inflammatory effect of systemic losartan treatment in the model of SNL-induced peripheral neuropathy (Publication A: Kalynovska et al., 2019)

In this study, we show that treatment with losartan prevents the development of SNL-induced thermal hyperalgesia and neuroinflammatory changes in the DRG and spinal cord in rats. Systemic losartan treatment (100 mg/kg/day, *p.o.*) attenuated also the increased expression of pro-inflammatory proteins in the ipsilateral spinal cord of SNL-operated animals. The efficacy of the losartan treatment depends on its ability to penetrate the blood-brain barrier. Pharmacokinetic studies confirmed that losartan *p.o.* administration leads to satisfactory, but not complete inhibition of centrally mediated actions of angiotensin II, if the administered dose is high enough (30-100 mg/kg) (Culman et al., 1999). It is important to emphasize, that in our study we used relatively high dose of losartan for *p.o.* treatment that should lead to its effective levels in the spinal cord. The SNL induced increase in spinal levels of TNF α and CCL2, which are known to be involved in the modulation of synaptic transmission in the SCDH (Spicarova et al., 2011, Spicarova et al., 2014). Losartan

treatment markedly reduced the overexpression of these signaling proteins, and this correlates well with the abolishment of thermal hyperalgesia in losartan-treated rats. Peripheral nerve injury is known to lead to neuroimmune response both in central and peripheral nervous systems. In our study, SNL promoted the infiltration of macrophages into ipsilateral DRG and adjacent dorsal roots, as well as microglia activation in the SCDH on the Day 7 after the surgery. Losartan treatment attenuated the spinal microglia activation, reflected in CD11b (OX42) protein levels. Additionally, our immunohistochemistry results revealed decrease also in the SNL-induced CD68-positive macrophage accumulation in LOS group. We hypothesize here, that anti-inflammatory effect of losartan treatment on macrophage accumulation is mediated by PPAR γ agonism, as losartan metabolite, EXP3179, is known to bind to the PPAR γ in invaded macrophages (Gordon, 2003).

Taken together and considering a larger context, losartan treatment might be effective against neuroinflammation-driven pathologies. Hence, it represents a promising strategy for the anti-inflammatory treatment development.

Anti-allodynic and anti-inflammatory effects of systemic losartan treatment on paclitaxel-treated rats (Publication B; Kalynovska et al., submitted manuscript)

Our behavioral results demonstrate the preventive effect of systemic losartan treatment (100 mg/kg/day) on the development of mechanical allodynia induced by paclitaxel treatment (5x2 mg/kg, *i.p.*). This effect reflected in attenuation of PWT decrease, when compared to the PAC group, on Day 14 after the start of PAC treatment. Also, losartan treatment attenuated the development of neuroinflammatory changes in DRGs and SCDH of paclitaxel-treated rats, and this effect was even more prominent during later, chronic phase of PIPN (Day 21 after the start of paclitaxel treatment). Namely, losartan treatment abolished the PAC-induced overexpression of main pro-inflammatory mediators – CCL2 and IL6 in DRGs and CCL2 and TNF α in SCDH. As it was mentioned before, CCL2 and TNF α play an important role in central sensitization and pathological pain development through the modulation of synaptic transmission in the SCDH. The decrease in CCL2 and TNF α levels resulted in significant attenuation in behavioral responses to mechanical stimulations, when compared with the PAC group. When applied systemically, paclitaxel crosses the blood-brain barrier poorly, but penetrates the blood-nerve barrier and accumulates predominantly in DRGs, where persists in high concentrations up to 10 days and more after the last paclitaxel injection (Xiao et al., 2011). In this study, PAC treatment induced also an increase in specific mRNA levels in DRGs, indicating the presence of pro-inflammatory M1 macrophages - CCR2, CD68, CD11b, NOX2, iNOS, CD64. Recently, PPAR γ have been intensively studied for their role in macrophage polarization. A growing number of studies confirm, that PPAR γ activation triggers macrophage polarity shift from M1 to anti-inflammatory M2 phenotype, thus reducing local neuroinflammation and neuropathic pain behavior (Churi et al., 2008, Hasegawa-Moriyama et al., 2012). Indeed, losartan treatment abolished the expression of M1 markers and, on the other hand, resulted in robust increase in the mRNA levels of M2 macrophage markers – Arginase 1 and IL10. Several studies confirmed that activation of PPAR γ leads to the substantial elevation of Arginase 1 and IL10 protein and mRNA levels in macrophages (Bouhlef et al., 2007, Gao et al., 2015, Su et al., 2017). IL10 is an anti-inflammatory cytokine produced by M2

macrophages. Its pro-resolving properties include also macrophage deactivation, characterized by inhibition of pro-inflammatory cytokines production via destabilization of mRNA transcripts for TNF or IL1 β (Vanderwall et al., 2018), increased anti-inflammatory cytokine production and reduced major histocompatibility complex class II expression (Gordon and Taylor, 2005). Elevated protein levels of IL10 in spinal cord are known to produce pain relief in neuropathic pain models including PIPN (Ledeboer et al., 2005, Vanderwall et al., 2018). Moreover, PIPN-induced mechanical allodynia may be prevented and/or reversed by the intrathecal IL10 therapy in rats (Ledeboer et al., 2007). The elevated levels of IL10 mRNA in DRGs of the LOS rats correlate well with the abolishment of allodynic state in PAC-treated rats in our experiments. The expression of Arginase 1, which is widely viewed as a typical marker of M2 macrophages (Gordon, 2003, Martinez and Gordon, 2014), is also regulated by PPAR γ (Odegaard et al., 2007). Moreover, PPAR γ mRNA levels in the LOS group were elevated in our study, indicating most probably a positive feedback loop mechanism (Wakabayashi et al., 2009). These data further confirm the hypothesis that anti-inflammatory effect of losartan in our study is mainly mediated through PPAR γ receptors.

Our study demonstrates significant anti-inflammatory and pro-resolving effects of losartan treatment in the model of the PIPN. Considering the toxicity of PPAR γ complete agonists, the safety profile of losartan partial PPAR γ agonism with mainly positive outcomes may be used as a novel treatment strategy for PIPN patients.

Treatment with TRPV1 antagonists attenuates paclitaxel-induced neuronal activation in the SCDH (Publication C; Kalynovska et al., 2017)

In this study, we aimed to investigate the role of spinal TRPV1 receptors in the mechanism of PAC-induced neuronal activation. Our immunohistochemical analysis revealed paclitaxel-induced neuronal activation in the SCDH, reflected in the increased expression of early gene protein product c-Fos. The mechanism of c-Fos induction by paclitaxel appears to be dependent on spinal TRPV1 receptor signaling, as preincubation of acute spinal cord slices with TRPV1 antagonists (SB366791 and AMG9810) led to the attenuation of c-Fos expression, when compared to paclitaxel incubation alone. Due to the specificity of our in vitro study design, only central branches of primary afferents were present in our spinal cord slices. Thus, the effect of PAC on spinal dorsal horn neurons had to be mediated either by the activation of presynaptic endings and/or by the direct effect on the postsynaptic neurons. Several studies demonstrate that the activation of TLR4 receptors may trigger c-fos gene activation directly (Introna et al., 1986, Guha and Mackman, 2001). It is known that PAC may directly activate rodent toll-like receptors 4 (TLR4) receptors (Li et al., 2014; Li et al., 2015). However, at the spinal cord level, TLR4 receptors are expressed predominantly by glial cells (Saito et al., 2010, Li et al., 2014), but not by neurons (Li et al., 2014). The activation of microglia leads to the release of cytokines and chemokines (Saito et al., 2010), which in turn may potentiate presynaptic TRPV1 receptor function (Spicarova et al., 2011, Spicarova et al., 2014). The effect of paclitaxel incubation on neuronal activation was most likely mediated through presynaptic and/or glial TLR4 receptors, which induced the activation of presynaptic TRPV1 receptors. This signaling cascade led to the increased release of neurotransmitters and neuromodulators such as glutamate, substance P and CGRP, followed by activation of postsynaptic neurons

and c-Fos expression. This hypothesis is in agreement with electrophysiological data, measured under similar *in vitro* conditions, when increased spontaneous and miniature excitatory postsynaptic currents frequency after PAC treatment were dependent on TRPV1 receptors activation (Li et al., 2015). Our findings further confirmed an active role of spinal TRPV1 receptors in the development of neuropathic pain development after paclitaxel treatment.

The involvement of TRPV1 signaling in the development of acute CCL2-induced painful hypersensitivity (Publication D; Spicarova et al., 2014)

In order to evaluate the involvement of TRPV1 receptors in the development of CCL2-induced hyperalgesia, we treated adult Wistar rats with TRPV1 receptor antagonist and/or CCL2 via intrathecal application. CCL2 i.t. application through intrathecal catheter induced a significant decrease in both the PWL and the PWT already 1 hour after the administration, when compared to the saline treatment. These data confirmed the presence of thermal hyperalgesia and mechanical allodynia after the intrathecal application of CCL2, which are in the agreement of previously published observations (Tanaka et al., 2004, Dansereau et al., 2008, Gao et al., 2009). Application of TRPV1 antagonist SB36679 prior to CCL2 either using lumbosacral catheter or via direct intrathecal injection abolished the development of CCL2-induced thermal hypersensitivity, while failed to prevent the establishment of mechanical hypersensitivity. Our results are in accordance with previously published findings. Cavanaugh and colleagues (Cavanaugh et al., 2009) demonstrate that pharmacological ablation of the central terminals of TRPV1-expressing peptidergic nociceptors results in substantial loss of noxious heat, but not mechanical pain sensitivity. On the other side, they observed a selective reduction of mechanical sensitivity after genetic ablation of unmyelinated sensory neurons expressing the G protein-coupled receptor *Mrgprd*, which consist approximately 90% of the cutaneous nonpeptidergic nociceptors (Cavanaugh et al., 2009). Regarding the exact mechanism of CCL2 action on the spinal TRPV1 receptors, we believe that it is mediated also by CCR2 receptors expressed on the presynaptic endings in the SCDH. Upon activation, CCR2 receptor mediates its functions through the activation of phospholipase C (PLC) and further hydrolysis of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂). As TRPV1 receptors are tonically blocked by PIP₂, its hydrolysis enables TRPV1 receptors to become active (Chuang et al., 2001). Additionally, TRPV1 sensitization/activation state may be also modulated via phosphorylation by protein kinase C (PKC), which increases the channel open probability for TRPV1 receptors (Huang et al., 2006, Jung et al., 2008). These results further support the hypothesis that spinal TRPV1 receptors are involved primarily in the development of noxious heat hypersensitivity, but not of mechanical allodynia.

Our immunohistochemical analysis show that CCL2-induced increase pERK labeling in spinal cord slices was diminished after preincubation with TRPV1 receptor antagonist SB366791. The electrophysiological results in this study (Publication D) indicate that CCL2-induced effect in the SCDH is mediated via G-protein coupled CCR2 receptors on the presynaptic endings, the activation of which was followed by TRPV1-dependent glutamate release from the synaptic terminals. The preventive effect of SB366791 on the CCL2-induced pERK expression corresponds also with its anti-hyperalgesic effect in the

behavioral experiments with intrathecal administration of CCL2 and SB366791/CCL2 combination. Taking together, these results indicate a significant role of spinal TRPV1 receptors in the mechanism of CCL2-induced neuronal activation and acute thermal hypersensitivity.

Conclusion

Following conclusions were made according to the specific aims of the Thesis:

- 1) Systemic losartan treatment exerts protective effects against the neuroinflammatory and neuropathic changes after the peripheral nerve injury. However, losartan is ineffective against the SNL-induced mechanical allodynia, suggesting distinct mechanism of its development, when compared to the thermal hyperalgesia. Nevertheless, losartan treatment represents a promising strategy for the anti-inflammatory treatment development.
- 2) Systemic losartan treatment is also effective against chemotherapy-induced neuropathic changes. Considering our findings and a wider context, anti-neuropathic effect of losartan is the most likely mediated by the PPAR γ receptors. Along with analgesic and anti-inflammatory effects of losartan, we demonstrated also a significant pro-resolving effect, which may be of particular interest as a novel treatment strategy for PIPN patients.
- 3) Our results have shown an important role of TRPV1 receptors in increased activation of dorsal horn neurons (demonstrated by increased c-Fos expression) after application of paclitaxel. This further confirms the role of TRPV1 receptors in the development of neuropathic pain following paclitaxel treatment.
- 4) Our study demonstrates a significant role of spinal CCL2/CCR2 signaling in the development of acute pain hypersensitivity. Here, we also demonstrate that spinal TRPV1 receptors play a substantial role in the development of CCL2-induced acute thermal hyperalgesia, revealing a new possible target for anti-hyperalgesic treatment development. Spinal TRPV1 receptors are also involved in the mechanisms of CCL2-induced neuronal activation at the level of the SCDH. Hence, it is plausible to assume the active role of spinal TRPV1 receptors in the central sensitization phenomenon, which may further result in the development of neuropathic pain syndrome.

Použitá literatura/References

- Bartanusz V, Jezova D, Alajajian B, Digicaylioglu M (2011) The blood-spinal cord barrier: morphology and clinical implications. *Annals of neurology* 70:194-206.
- Bouhlef MA, Derudas B, Rigamonti E, Dievart R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G (2007) PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell metabolism* 6:137-143.
- Cavanaugh DJ, Lee H, Lo L, Shields SD, Zylka MJ, Basbaum AI, Anderson DJ (2009) Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:9075-9080.
- Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D (2001) Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* 411:957-962.
- Churi SB, Abdel-Aleem OS, Tumber KK, Scuderi-Porter H, Taylor BK (2008) Intrathecal rosiglitazone acts at peroxisome proliferator-activated receptor-gamma to rapidly inhibit neuropathic pain in rats. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 9:639-649.
- Culman J, von Heyer C, Piepenburg B, Rascher W, Unger T (1999) Effects of systemic treatment with irbesartan and losartan on central responses to angiotensin II in conscious, normotensive rats. *European journal of pharmacology* 367:255-265.
- Dansereau MA, Gosselin RD, Pohl M, Pommier B, Mechighel P, Mauborgne A, Rostene W, Kitabgi P, Beaudet N, Sarret P, Melik-Parsadaniantz S (2008) Spinal CCL2 pronociceptive action is no longer effective in CCR2 receptor antagonist-treated rats. *Journal of neurochemistry* 106:757-769.
- Ellis A, Bennett DL (2013) Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *British journal of anaesthesia* 111:26-37.
- Gao S, Zhou J, Liu N, Wang L, Gao Q, Wu Y, Zhao Q, Liu P, Wang S, Liu Y, Guo N, Shen Y, Wu Y, Yuan Z (2015) Curcumin induces M2 macrophage polarization by secretion IL-4 and/or IL-13. *Journal of molecular and cellular cardiology* 85:131-139.
- Gao YJ, Ji RR (2009) c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? *The open pain journal* 2:11-17.
- Gao YJ, Zhang L, Samad OA, Suter MR, Yasuhiko K, Xu ZZ, Park JY, Lind AL, Ma Q, Ji RR (2009) JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:4096-4108.
- Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nature reviews Immunology* 3:23-35.
- Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology* 5:953-964.
- Guha M, Mackman N (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular signalling* 13:85-94.
- Hasegawa-Moriyama M, Ohnou T, Godai K, Kurimoto T, Nakama M, Kanmura Y (2012) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone attenuates postincisional pain by regulating macrophage polarization. *Biochemical and biophysical research communications* 426:76-82.
- Huang J, Zhang X, McNaughton PA (2006) Modulation of temperature-sensitive TRP channels. *Seminars in cell & developmental biology* 17:638-645.

- Hunt SP, Pini A, Evan G (1987) Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 328:632-634.
- Introna M, Hamilton TA, Kaufman RE, Adams DO, Bast RC, Jr. (1986) Treatment of murine peritoneal macrophages with bacterial lipopolysaccharide alters expression of c-fos and c-myc oncogenes. *J Immunol* 137:2711-2715.
- Jeon S-M, Lee K-M, Cho H-J (2009) Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in rat dorsal root ganglia and spinal cord in experimental models of neuropathic pain. *Brain research* 1251:103-111.
- Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ (1999) Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nature neuroscience* 2:1114-1119.
- Jung H, Toth PT, White FA, Miller RJ (2008) Monocyte chemoattractant protein-1 functions as a neuromodulator in dorsal root ganglia neurons. *Journal of neurochemistry* 104:254-263.
- Kalynovska N, Adamek P, Palecek J (2017) TRPV1 receptors contribute to mediate paclitaxel-induced c-Fos expression in spinal cord dorsal horn neurons. *Physiological research* 66:549-552.
- Kalynovska N, Diallo M, Palecek J (2019) Losartan treatment attenuates the development of neuropathic thermal hyperalgesia induced by peripheral nerve injury in rats. *Life sciences* 220:147-155.
- Ledeboer A, Jekich BM, Sloane EM, Mahoney JH, Langer SJ, Milligan ED, Martin D, Maier SF, Johnson KW, Leinwand LA, Chavez RA, Watkins LR (2007) Intrathecal interleukin-10 gene therapy attenuates paclitaxel-induced mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in dorsal root ganglia in rats. *Brain, behavior, and immunity* 21:686-698.
- Ledeboer A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, Watkins LR (2005) Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain* 115:71-83.
- Li Y, Adamek P, Zhang H, Tatsui CE, Rhines LD, Mrozkova P, Li Q, Kosturakis AK, Cassidy RM, Harrison DS, Cata JP, Sapire K, Kennamer-Chapman RM, Jawad AB, Ghetti A, Yan J, Palecek J, Dougherty PM (2015) The Cancer Chemotherapeutic Paclitaxel Increases Human and Rodent Sensory Neuron Responses to TRPV1 by Activation of TLR4. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35:13487-13500.
- Li Y, Zhang H, Kosturakis AK, Jawad AB, Dougherty PM (2014) Toll-like receptor 4 signaling contributes to Paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 15:712-725.
- Liu H, Chen Y, Huang L, Sun X, Fu T, Wu S, Zhu X, Zhen W, Liu J, Lu G, Cai W, Yang T, Zhang W, Yu X, Wan Z, Wang J, Summerfield SG, Dong K, Terstappen GC (2018) Drug Distribution into Peripheral Nerve. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 365:336-345.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 25:402-408.
- Martinez FO, Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports* 6:13.
- Mertens B, Vanderheyden P, Michotte Y, Sarre S (2010) The role of the central renin-angiotensin system in Parkinson's disease. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* 11:49-56.
- Moalem G, Tracey DJ (2006) Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain research reviews* 51:240-264.
- Nakamura H, Domon Y, Inoue T, Arakawa N, Yokoyama T (2009) Olmesartan medoxomil ameliorates sciatic nerve regeneration in diabetic rats. *Neuroreport* 20:1481-1485.
- Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Red Eagle A, Vats D, Brombacher F, Ferrante AW, Chawla A (2007) Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447:1116-1120.

- Peters CM, Jimenez-Andrade JM, Jonas BM, Sevcik MA, Koewler NJ, Ghilardi JR, Wong GY, Mantyh PW (2007) Intravenous paclitaxel administration in the rat induces a peripheral sensory neuropathy characterized by macrophage infiltration and injury to sensory neurons and their supporting cells. *Exp Neurol* 203:42-54.
- Polomano RC, Mannes AJ, Clark US, Bennett GJ (2001) A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain* 94:293-304.
- Saito O, Svensson CI, Buczynski MW, Wegner K, Hua XY, Codeluppi S, Schaloske RH, Deems RA, Dennis EA, Yaksh TL (2010) Spinal glial TLR4-mediated nociception and production of prostaglandin E(2) and TNF. *British journal of pharmacology* 160:1754-1764.
- Schupp M, Lee LD, Frost N, Umbreen S, Schmidt B, Unger T, Kintscher U (2006) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by losartan metabolites. *Hypertension* 47:586-589.
- Spicarova D, Adamek P, Kalynovska N, Mrozkova P, Palecek J (2014) TRPV1 receptor inhibition decreases CCL2-induced hyperalgesia. *Neuropharmacology* 81:75-84.
- Spicarova D, Nerandzic V, Palecek J (2011) Modulation of spinal cord synaptic activity by tumor necrosis factor alpha in a model of peripheral neuropathy. *Journal of neuroinflammation* 8:177.
- Su M, Cao J, Huang J, Liu S, Im DS, Yoo JW, Jung JH (2017) The In Vitro and In Vivo Anti-Inflammatory Effects of a Phthalimide PPAR-gamma Agonist. *Marine drugs* 15.
- Tanaka T, Minami M, Nakagawa T, Satoh M (2004) Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in the dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain: possible involvement in the development of neuropathic pain. *Neuroscience research* 48:463-469.
- Van Steenwinckel J, Reaux-Le Goazigo A, Pommier B, Mauborgne A, Dansereau MA, Kitabgi P, Sarret P, Pohl M, Melik Parsadaniantz S (2011) CCL2 released from neuronal synaptic vesicles in the spinal cord is a major mediator of local inflammation and pain after peripheral nerve injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:5865-5875.
- Vanderwall AG, Noor S, Sun MS, Sanchez JE, Yang XO, Jantzie LL, Mellios N, Milligan ED (2018) Effects of spinal non-viral interleukin-10 gene therapy formulated with d-mannose in neuropathic interleukin-10 deficient mice: Behavioral characterization, mRNA and protein analysis in pain relevant tissues. *Brain, behavior, and immunity* 69:91-112.
- Wakabayashi K, Okamura M, Tsutsumi S, Nishikawa NS, Tanaka T, Sakakibara I, Kitakami J, Ihara S, Hashimoto Y, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H, Sakai J (2009) The peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor alpha heterodimer targets the histone modification enzyme PR-Set7/Setd8 gene and regulates adipogenesis through a positive feedback loop. *Molecular and cellular biology* 29:3544-3555.
- Wang J, Ho L, Chen L, Zhao Z, Zhao W, Qian X, Humala N, Seror I, Bartholomew S, Rosendorff C, Pasinetti GM (2007) Valsartan lowers brain beta-amyloid protein levels and improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of clinical investigation* 117:3393-3402.
- Woolf CJ (2010) What is this thing called pain? *The Journal of clinical investigation* 120:3742-3744.
- Xiao WH, Zheng H, Zheng FY, Nuydens R, Meert TF, Bennett GJ (2011) Mitochondrial abnormality in sensory, but not motor, axons in paclitaxel-evoked painful peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience* 199:461-469.
- Yamamoto S, Zhong J, Yancey PG, Zuo Y, Linton MF, Fazio S, Yang H, Narita I, Kon V (2015) Atherosclerosis following renal injury is ameliorated by pioglitazone and losartan via macrophage phenotype. *Atherosclerosis* 242:56-64.
- Zhang J, De Koninck Y (2006) Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *Journal of neurochemistry* 97:772-783.

Curriculum Vitae

Mgr. Nataliia Kalynovska

Date of birth: 29.10.1986

E-mail: nataliakalynovska@gmail.com

Education: 09/2012 – present
Ph.D., Animal Physiology
Charles University in Prague

09/2010 – 05/2012
Master of Science, Animal Physiology
Charles University in Prague

09/2007 – 05/2008
Specialist, Biophysics and Bioinformatics
Ivan Franko National University of Lviv

09/2003 – 05/2007
Bachelor of Science, Biology
Ivan Franko National University of Lviv

International 2015 – Neuroscience 2015, SfN's 45th annual meeting, Chicago IL, USA

conferences: 2015 – Neuroscience 2015, SfN's 45th annual meeting, Chicago IL, USA

2015 – FFRM 2015, Thessaloniki, Greece

2014 - Neuroscience 2014, SfN's 44th annual meeting, Washington DC, USA

2014 – 9th ISNIM Congress, Liege, Belgium

2013 - Neuroscience 2013, SfN's 43th annual meeting, San Diego CA, USA

Publications: **Kalynovska N.** Diallo M, Palecek J (2019) Losartan treatment attenuates the development of neuropathic thermal hyperalgesia induced by peripheral nerve injury in rats. *Life sciences* 220:147-155.

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.

Spicarova D, Adamek P, **Kalynovska N.** Mrozkova P, Palecek J. TRPV1 receptor inhibition decreases CCL2-induced hyperalgesia. *Neuropharmacology.* 2014; 81: 75-84.

Publikace, které jsou podkladem dizertace/

List of Publications that are Related to the Thesis

Kalynovska N. Diallo M, Sotakova-Kasparova D, Palecek J. Losartan treatment attenuates neuropathic pain and neuroinflammatory changes in the rat model of paclitaxel-induced peripheral neuropathy.

Submitted manuscript

Kalynovska N. Diallo M, Palecek J. Losartan treatment attenuates the development of neuropathic thermal hyperalgesia induced by peripheral nerve injury in rats. Life sciences 2019; 220:147-155.

IF = 3.448; Quartile 2; Times cited: 0; (8/2019 from WoS)

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.

IF = 1.701; Quartile 4; Times cited: 3; (8/2019 from WoS)

Spicarova D, Adamek P, **Kalynovska N.** Mrozkova P, Palecek J. TRPV1 receptor inhibition decreases CCL2-induced hyperalgesia. Neuropharmacology. 2014; 81: 75-84.

IF = 4.367; Quartile 1; Times cited: 21; (8/2019 from WoS)