

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Tereza Přibáňová

Mechanismy vzniku neuropatických bolestivých stavů
Mechanisms of neuropathic pain states development

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Petra Mrózková Ph.D.

Praha, 2021

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Petře Mrózkové, PhD. za její vstřícný přístup a trpělivost při vedení práce.

Prohlášení:

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

V Praze 5/2021

Podpis:

Tereza Příbáňová

Abstrakt

Bolest je přirozeným varovným signálem, který chrání organismus před případným nebo skutečným poškozením. Po podráždění (popálení, říznutí, zánět) nervových zakončení – nociceptorů, jsou nervové vzruchy vedeny periferními nervovými vlákny do míchy a dále do mozku, kde dojde k uvědomění si bolesti a reakci na ni. Naproti tomu neuropatická bolest je bolest způsobená zraněním či onemocněním somatosenzorického nervového systému jako takového.

Neuropatická bolest má výrazný vliv na kvalitu života pacientů a její výskyt se pravděpodobně ještě zvýší, a to v důsledku stárnutí populace, zvýšeného výskytu diabetu a zvýšení počtu chemoterapií. Účinnost léčby neuropatické bolesti je však mnohdy nedostačující s řadou vedlejších účinků, což představuje obrovský klinický problém. Výzkum vedoucí k pochopením molekulárních mechanismů vzniku a udržování neuropatické bolesti je nezbytný k budoucímu vylepšení a zefektivnění léčby těchto stavů.

Na rozvoji neuropatických stavů se zejména podílejí mechanismy udržující rovnováhu mezi excitační a inhibiční somatosenzorickou signalizací, změny v počtu a složení receptorů a kanálů na povrchu neuronu a nejvýrazněji pak jakým způsobem jsou informace o bolesti modulovány na míšní úrovni.

Záměrem této práce je shrnout základní poznatky o anatomii a fyziologii přenosu nociceptivní signalizace a zpracování bolesti se zvláštním zaměřením na rozdílné aspekty rozvoje a průběhu u neuropatické bolesti. Dále bude pozornost věnována zejména chemokinům a jejich roli v modulaci nociceptivní informace a přenosu neuropatické bolesti na míšní úrovni.

Abstract

Pain is a natural warning signal that protects organisms from actual or potential damage. Upon the stimulation (burns, cuts, inflammation) of nerve endings – nociceptors, nerve signals are conducted via the peripheral nerve fibres into the spinal cord and brain, where they are then processed as painful, and a reaction occurs. Neuropathic pain, on the other hand, is pain caused by an injury or disease of the somatosensory system itself.

Neuropathic pain has a substantial impact on the patient's quality of life and is likely to become more prevalent as the population grows older and the rates of diabetes and chemotherapy treatments rise. However, the treatment of neuropathic pain is often insufficient and comes with a number of undesirable side effects, which constitute a significant clinical problem. Research leading to the understanding of the molecular mechanisms of the development and maintenance of neuropathic pain is necessary in order to enhance the treatment of these states and to make it more effective.

There is a myriad of factors responsible for the development of neuropathic pain, namely mechanisms which maintain the balance between inhibitory and excitatory somatosensory signalling, changes in the amount or composition of receptors and channels at the surface of the neuron, and most importantly, the ways in which pain signals are modulated at the level of the spinal cord.

The aim of this work is to summarize the basic findings regarding the anatomy and physiology of nociceptive signalling and the processing of pain. We will focus on the various aspects of the development and maintenance of neuropathic pain, with particular attention to the role of chemokines in the modulation of nociceptive information and transmission of neuropathic pain signals at the spinal cord level.

Seznam použitých zkratek

ACC	Anteriorní cingulární kortex	IP3	inositoltrifosfát
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxasole propionová kyselina	IPSC	inhibiční postsynaptický proud
AMPAR	glutamátergní AMPA receptor	IS	imunitní systém
ATP	adenosintrifosfát	JNK	c-jun-N-terminalní kináza
BBB	hematoencefalická bariéra	Kv	napětově řízené draselné kanály
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	KMP	klidový membránový potenciál
Ca²⁺	vápenatý/é iont/y	MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
CaMKII	Ca ²⁺ /kalmodulin dependentní kináza	MCP-1	monocytový chemoatraktantový protein 1/ CCL2
CCI	chronická konstriktce sedacího nervu	NaV	napětově řízené sodné kanály
CCL2	chemokin CCL2	NGF	nervový růstový faktor
CCR2	receptor pro chemokin CCL2	NK1	neurokinový receptor
CFA	Freundovo kompletní adjuvans	NMDA	N-methyl-D-aspartát
CGRP	peptid odvozený od genu pro kalcitonin	NMDAR	glutamátergní NMDA receptor
CNS	centrální nervový systém	NO	oxid dusnatý
CX3CL1	fraktalkin	NS	nervový systém
CX3CR	fraktalkinový receptor	PAF	primární aferentní vlákna
Da	Dalton	PAG	periakvaduktální šedá hmota
DAG	diacylglycerol	PKA	proteinkináza A
DH	zadní roh míšni	PKC	proteinkináza C
DRG	dorzální spinální ganglium	PN/s	projekční neuron/y
EPSC	excitační postsynaptický proud	PNS	periferní nervový systém
ERK	extracelulárním signálem-regulovaná kináza	SGC	satelitní gliová buňka
GABA	kyselina γ -aminomáselná	SNI	model poškození dvou větví sedacího nervu
GFAP	gliální fibrilární acidický protein	SNL	ligace spinálního nervu
IASP	Mezinárodní asociace pro studium bolesti	SP	substance P
IFN	interferon	T_H	pomocné T-lymfocyty
IL-1β	interleukin-1 β	TLR	toll-like receptor
IL-6	interleukin 6	TNFα	tumor-nekrotizující faktor alfa
IN/s	interneuron/y	TrkA	tyrosin-kinázový receptor pro NGF
		TRP	transient receptor potential channel
		TRPV	vaniloidní TRP receptory

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Nocicepce a Bolest.....	8
2.1. Klasifikace druhů bolesti.....	8
3. Anatomie nociceptivního systému.....	11
3.1. Nociceptory a Primární aferentní vlákna (PAF).....	11
3.2. Spinální ganglia.....	12
3.3. Mícha.....	13
3.4. Nociceptivní míšní dráhy a zpracování bolesti mozkiem.....	14
3.5. Gliové buňky.....	16
4. Nociceptivní přenos na míšní úrovni.....	18
4.1. Excitační aminokyseliny a jejich receptory.....	19
4.2. Neuropeptidy modulující nociceptivní přenos.....	20
4.3. Inhibiční mediátory.....	21
5. Neuropatická bolest.....	22
5.1. Specifika a etiologie neuropatické bolesti.....	22
5.2. Mechanismy vzniku neuropatické bolesti.....	23
5.3. Synaptické mechanismy neuropatické bolesti.....	26
5.4. Neuroinflamace.....	27
6. Chemokiny a jejich role v neuropatická bolest.....	30
6.1. Chemokiny v míše.....	30
6.3. CCL2 v neuropatické bolesti.....	32
7. Závěr.....	35
8. Seznam použité literatury.....	36

1. Úvod

Bolest je nepříjemný sensorický a emocionální zážitek asociovaný se skutečným nebo potencionálním poškozením tkáně, který nás za normální situace upozorňuje na reálné nebo možné nebezpečí. Bolest vyvolává základní behaviorální a psychologické reakce pro funkční přežití, včetně ochranného chování, vyhýbání se podnětu generujícího bolest, jakožto i chování usnadňující hojení. Přestože je pro nás bolest často velmi negativní zážitek, její význam je nezastupitelný. Schopnost cítit bolest se vyvinula jako neocenitelný nástroj a pomáhá detekovat, a dokonce předvídat zranění či nemoc. Pacienti, kteří kvůli dědičným chorobám přišli o své nociceptory a stali se tak hyposensitivní vůči bolesti, často přicházejí k vážným zraněním a způsobují si tak nevratné poškození svého těla. Mnoho z nich se tak ani nedožije dospělosti.

Fyziologická nociceptivní bolest nastává v důsledku nociceptivní signalizace zprostředkované sítí specializovaných neuronů. V kterékoli části této dráhy – od periferních receptorů po mozková centra – mohou nastat změny nociceptivní signalizace, která se poté projeví jako patologická – neuropatická bolest. V současné době je neuropatická bolest jen velmi špatně zvládnutelná a představuje významný klinický problém, na nějž většina dostupných analgetik nemá uspokojivý efekt. Přesné informace o procesech, které se podílejí na vývoji a udržování neuropatické bolesti však stále schází. Proto je pro vývoj nových účinných léčebných metod neuropatické bolesti velmi důležité pokračovat ve výzkumu a detailně odhalit mechanismy jejího vzniku.

První synapse nociceptivní dráhy je umístěna v zadním rohu míchy a představuje jedno z hlavních míst nociceptivní modulace, kde je možné upravit sílu i charakter signálu. Změny, ke kterým dochází na první synapsi, představují základ pro rozvoj a udržování patologických bolestivých stavů. Proto se zdá, že tato první synapse může být ideálním místem pro léčebný zásah.

Různé endogenní látky mohou přispívat ke zvýšenému nociceptivnímu přenosu, včetně některých zánětlivých mediátorů produkovaných gliovými buňkami za patologických podmínek. Mezi nimi zaujímají prominentní pozici zejména zánětlivé chemokiny, které se už nepovažují jen za pouhé signální molekuly imunitního systému (IS), ale za mediátory obousměrné komunikace mezi neurony a gliemi, jež mohou přispívat k patologickým bolestivým stavům. Chemokín CCL2 je nyní v centru pozornosti, a to zejména pro jeho pro-nociceptivní účinek, který je spojen s modulací presynaptického receptoru TRPV1.

Cílem této práce je shrnout základní poznatky o bolesti jako takové a také o přenosu a modulaci nociceptivní informace na míšní úrovni jak za fyziologických, tak patologických podmínek. Větší důraz v textu bude kladen na popis neuropatické bolesti a úlohu chemokinů v rozvoji neuropatických bolestivých stavů.

2. Nocicepce a Bolest

IASP (Mezinárodní asociace pro studium bolesti) definuje bolest následovně:

Bolest je nepříjemný senzorický a emocionální zážitek asociovaný se skutečným nebo potencionálním zraněním tkáně, nebo je tak vnímán. Tato definice se liší od původní z roku 1979, která spoléhala na schopnost člověka svou bolest popsat a její výklad tedy nebral v úvahu novorozence, staré lidi a všechny ty, včetně zvířat, co nemohli svou bolest artikulovat. Bolest je osobní prožitek ovlivněný mnoha biologickými, psychologickými i společenskými faktory a její popis je vždy subjektivní (Treede 2018).

Nocicepce (z latinského *nocere* = škodit), definovaná dle IASP, je neurální proces kódování škodlivých stimulů. Proces začíná detekcí škodlivých nadprahových podnětů a aktivací specializovaných nociceptorů. Následně je vzruch veden nociceptivními vlákny do dorzálního rohu míchy a dále do CNS. Nocicepce ovšem nezahrnuje psychologickou složku (emoční a kognitivní zpracování v mozku), a na rozdíl od bolesti není považována za prožitek.

Nociceptory jsou specializované detektory škodlivých stimulů, které jsou značně modifikovatelné v jejich odpovědi na poranění či poškození tkáně, aby mohly živé organismy interagovat s prostředím a vyhybat se potencionálně škodlivým podnětům. Hlavní funkční části neuronů detekujících bolestivé podněty jsou jejich periferní zakončení (v kůži a tkáních) - nociceptory, které přijímají externí stimuly a iniciují akční potenciál, primární aferentní vlákna (PAF) vedoucí akční potenciál, tělo neuronu umístěné ve spinálních gangliích a centrální zakončení tvořící presynaptickou část první synapse v senzoričké dráze (Woolf and Ma 2007). Synapse je specifické spojení dvou neuronů umožňující přenos informace z elektrické na chemickou, a tím i efektivní komunikaci neuronů a modulaci tohoto přenosu.

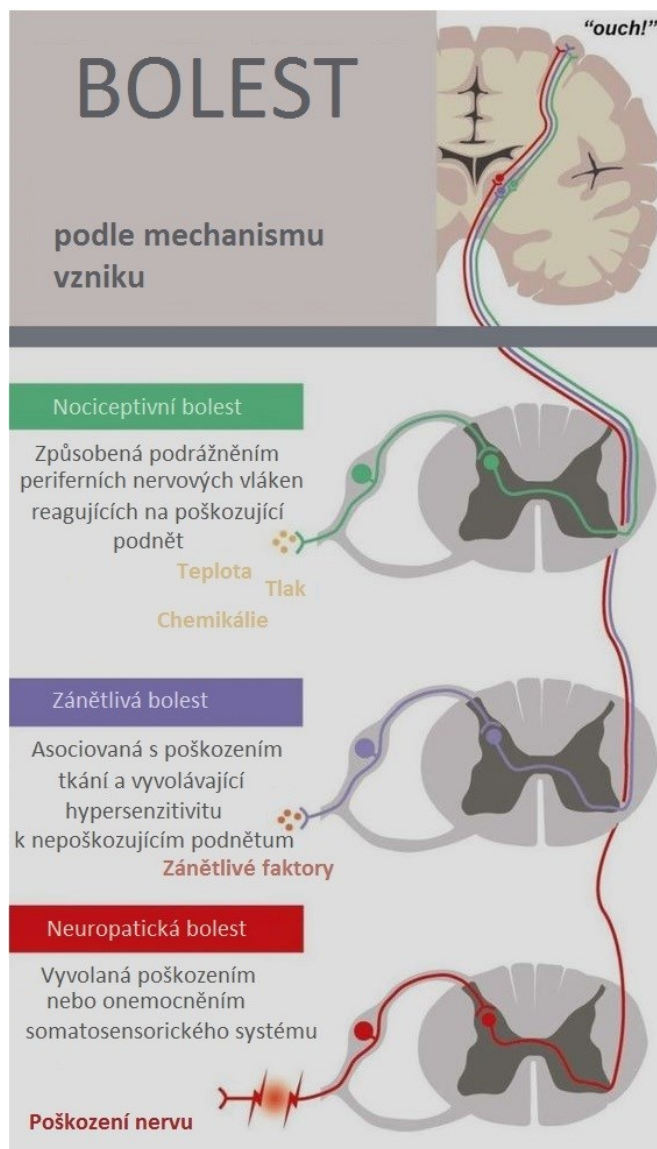
2.1. Klasifikace druhů bolesti

Bolest lze dělit dle řady různých hledisek. Podle **patofyziologického mechanismus** můžeme rozlišit nociceptivní, zánětlivou a neuropatickou bolest (Obrázek 1). Zánětlivá bolest nastává jako odpověď primárních senzoričkých neuronů na vazbu různých zánětlivých mediátorů (histamin, serotonin, bradykinin, prostaglandiny, interleukiny, ATP, H⁺ a mnoho dalších), které jsou produkovány buňkami postižené tkáně a imunitními buňkami během zánětu. Naproti tomu neuropatická bolest nesouvisí primárně s patologií inervované tkáně, ale je způsobena poškozením samotné nervové tkáně, periferní nebo centrální (Scholz and Woolf 2002). Tento specifický typ bolesti bude dále podrobněji popsán v 5. kapitole.

Nociceptivní bolest je aktivována poškozujícími podněty prostřednictvím receptorů – nociceptorů. Tak dostává organismus informaci o nastávajícím či skutečném nebezpečí a následně aktivuje odtahující reflex (Obrázek 1). Úkolem tohoto systému je organismus varovat a chránit, ztráta funkce či jeho úplná nepřítomnost má tudíž vážné následky (Woolf 2010). Práh pro aktivaci nociceptorů

musí být dostatečně vysoký, aby nezasahoval do běžných aktivit, ale dostatečně nízký, aby šlo předejít vážnému zranění. Tento práh však není fixní, může být posunut jedním či druhým směrem a tato změna může být adaptivní nebo maladaptivní. Změny v prahu bolesti závisí také na psychickém rozpoložení jedince či jeho kondici. Odpovědi na bolest jsou projevem neurální plasticity, díky které může nervový systém modulovat reakce na jakýkoliv stimul (Scholz and Woolf 2002).

Zánětlivá bolest se projevuje v souvislosti s poraněním tkáně nebo infekcí, následkem nádorového růstu, ischemie nebo autoimunní odpovědi. Dochází k uvolnění množství chemických mediátorů a buněk IS z postižené tkáně do okolí. Některé z těchto mediátorů, mezi které patří růstové faktory, kininy, puriny, aminy, prostanoidy a ionty včetně protonů, mohou aktivovat nociceptory, a tím přímo způsobovat bolest. Jiné spolupracují na senitizaci somatosenzorického nervového systému (NS), čímž snadněji evokují bolest (Scholz and Woolf 2002). Tím, že zánětlivá bolest odrazuje jedince od fyzického kontaktu a pohybu, usnadňuje hojení a předchází dalšímu zranění. Můžeme tedy říct, že rovněž vykonává ochrannou funkci.



Obrázek 1. Klasifikace bolesti podle mechanismu vzniku. Akutní, chronická a neuropatická bolest se velmi liší – a to jak svou příčinou, tak mechanismem signalizace. Akutní bolest obvykle souvisí se zraněním nebo ochranou před úrazem, zatímco chronická a neuropatická bolest mohou mít méně jasnou patologii. Pro včasnou a účinnou léčbu je nezbytné typy bolesti správně rozlišovat. Převzato a upraveno <http://knowingneurons.com>

Neuropatická bolest na rozdíl od předchozích dvou neslouží jakožto varovný signál, ale naopak je patologií sama o sobě. Dochází k ní následkem poškození nebo nemoci periferního nebo centrálního nervového systému, a není zde nutná stimulace nociceptorů. Neuropatická bolest se projevuje u stavů jako jsou např. fibromyalgie, syndrom dráždivého tračníku, tenzní bolest hlavy, onemocnění temporomandibulárního kloubu či intersticiální cystitida (Woolf 2010). Více se budu neuropatické bolesti a mechanismům jejího vzniku věnovat v páté kapitole této práce.

Další běžný systém klasifikace popisuje různé typy bolesti **podle délky jejího trvání**. Akutní bolest je náhlá, ostrá a bezprostředně po poranění. Fyziologická nociceptivní bolest obvykle trvá méně než 30 dní a zmizí léčbou poranění. Naopak chronická bolest obvykle přetrvává i po doléčení a regeneraci tkáně nebo k ní může docházet bez zjevné příčiny, působením patologií podél nervové dráhy (Millan 1999)

Akutní bolest začíná aktivací nociceptorů a projevuje se okamžitě. Její trvání je v řádu sekund a adaptivní odpovědí na ní je odtahovací reflex. Je vysoce důležitá z hlediska prevence zranění

Subchronická bolest trvání je v řádu hodin až dnů a mizí zároveň se zhojením tkáně. Typický je pro ni rozvoj primární i sekundární hyperalgesie, allodynies a spontánní bolesti. Její význam spočívá v prevenci dalšího poškození tkáně v době hojení.

Chronická bolest může trvat několik měsíců až let (za spodní hranici se většinou považuje 3 až 6 měsíců). Jedná se tedy o dlouhodobou bolest, která není spojena se zjevnou příčinou nebo je jí nepřiměřeně velká (Millan 1999). Taková bolest může být nepřetržitá nebo rekurentní a v každém případě může ovlivnit všechny aspekty každodenního života.

Bolest je také charakterizována **místem jejího původu**. Somatickou bolest generují periferní aferentní vlákna inervující kůži a svaly, je obvykle intenzivní a dobře lokalizovaná. Naopak viscerální bolest pochází z vnitřních orgánů a je více rozptýlená. Kromě toho lze bolest popsat anatomicky dle lokalizace v konkrétních segmentech a částech těla.

Somatická bolest vychází z kůže, svalů, periostu, fascií a stěn vnitřních orgánů. Vzniká nadprahovou stimulací nociceptorů, jejichž PAF vedou vzruch až do zadního rohu míšního, kde jsou v synapsi s neurony druhého řádu. Somatická bolest je popisována jako ostrá a ohraničená (Cervero and Laird 1999)

Viscerální bolest je bolest pocházející z útrob. Přestože se dříve uvažovalo o viscerální bolesti jako o typu bolesti somatické, dnes už je zřejmé, že jsou mezi nimi zásadní rozdíly. Mechanismus přenosu viscerální bolesti se liší nejen od somatické bolesti, ale i mezi jednotlivými orgány navzájem. Stejně tak se liší vnímání a psychologické zpracování mezi oběma typy bolesti (Cervero and Laird 1999).

3. Anatomie nociceptivního systému

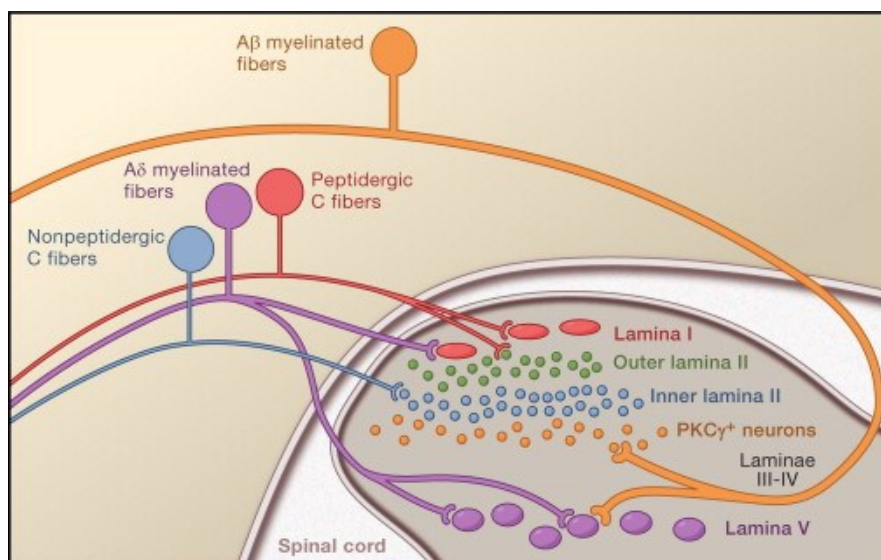
V 60. letech 20 století bylo zjištěno, že příjem a přenos informací o bolesti je zprostředkován specializovaným systémem primárních sensorických neuronů. Nociceptory byly pojmenovány díky své schopnosti detekovat škodlivé a potenciálně nebezpečné podněty (mechanické, chemické, tepelné) a transformovat informace o jejich přítomnosti na nociceptivní signály (Bessou and Perl 1969). Nociceptory mohou detekovat jeden nebo více typů stimulů a využívat různé transdukční mechanismy. Jsou také schopny integrovat širokou škálu signálů a následně reagovat na dynamiku změny v prostředí (Julius and Basbaum 2001).

3.1. Nociceptory a Primární aferentní vlákna (PAF)

Primární aferentní vlákna (PAF) jsou výběžky sensorických pseudounipolárních neuronů sídlících ve spinálních gangliích a inervující celé tělo (Obrázek 2. a 4.). Vlákna inervující oblast hlavy mají těla svých neuronů v trigeminálním gangliu. Na základě jejich anatomie a funkce můžeme PAF rozdělit do 3 skupin: A β , A δ a C vlákna (Obrázek 2.). A δ a C vlákna tvoří většinu nociceptorů a za fyziologických podmínek jsou to jen tato vlákna, která přenášejí nociceptivní informaci. Zastoupení těchto vláken v kůži člověka je 20 % A β , 10 % A δ a 70 % C vláken (Millan 1999).

A β jsou silná myelinizovaná vlákna (> 10 μ m), s rychlostí vedení 30-120 m/s, která za normálních okolností odpovídají na dotek, tlak a vibrace a nepodílejí se na vedení bolesti (Basbaum et al. 2009).

A δ vlákna jsou středního průměru (2-6 μ m) i rychlosti vedení (12-30 m/s) a slabě myelinizovaná (Obrázek 3). Existují dvě kategorie A δ vláken. Obě reagují na intenzivní mechanické podněty, ale mohou být rozlišeny jejich odlišnou odpovědí na intenzivní tepelné podněty.

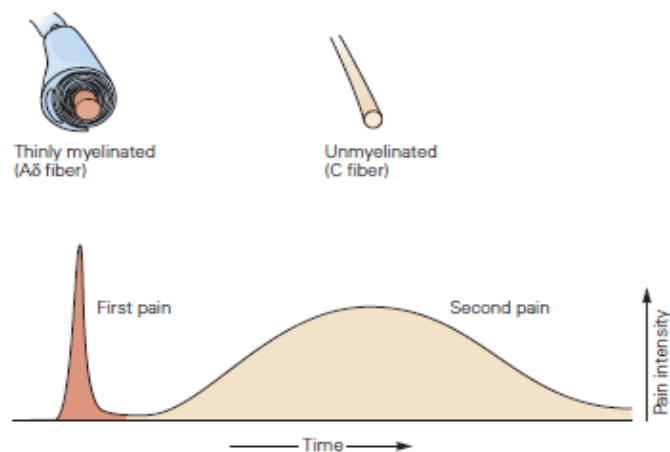


Obrázek 2. *Centrální projekce primárních aferentních vláken (nociceptory a mechanoreceptory) na neurony do Rexedovy laminy v zadním rohu míšním. Převzato a upraveno (Basbaum et al. 2009).*

Typ I má relativně vysoký práh pro teplotu ($> 50^{\circ}\text{C}$), ale při dlouhodobém působení tepla se tento práh snižuje. Stejně tak dochází k jejich senitizaci na mechanické i tepelné podněty následkem zranění. Typ II $A\delta$ vláken má nižší práh pro tepelné podněty, ale vysoký práh pro mechanické, a způsobuje tak prvotní ostrou bolest (Basbaum et al. 2009).

C vlákna jsou tenká ($0,4-1,2 \mu\text{m}$), vzruch vedou pomalu ($0,5-2 \text{ m/s}$) a nejsou myelinizovaná (Obrázek 3). C vlákna jsou polymodální – odpovídající na bolestivé mechanické i tepelné podněty. Některá C vlákna odpovídají na tepelné podněty, ale nejsou citlivá na mechanické podněty a většina jich je citlivá na chemické podněty, jako např. kapsaicin (Julius and Basbaum 2001). Zvláštní skupinou C vláken jsou tzv. „spící vlákna“ (silent/sleeping nociceptors), která jsou nemyelinizovaná a odpovídají jen na tepelné podněty, ale následkem poškození se mohou stát citlivými i k mechanickým podnětům (Basbaum et al. 2009).

S rychlostí vedení jednotlivých vláken souvisí rozlišení bolesti na první „rychlou“ a druhou „pomalou“ bolest. Rychlejší $A\delta$ vlákna jsou zodpovědná za prvotní ostrou bolest, po které následuje méně intenzivní, tupá bolest zprostředkovaná C vlákny. Výjimku tvoří viscerální bolest, u které tyto dvě fáze nepozorujeme, bolest je často špatně lokalizovatelná, hluboká a tupá (Julius and Basbaum 2001).



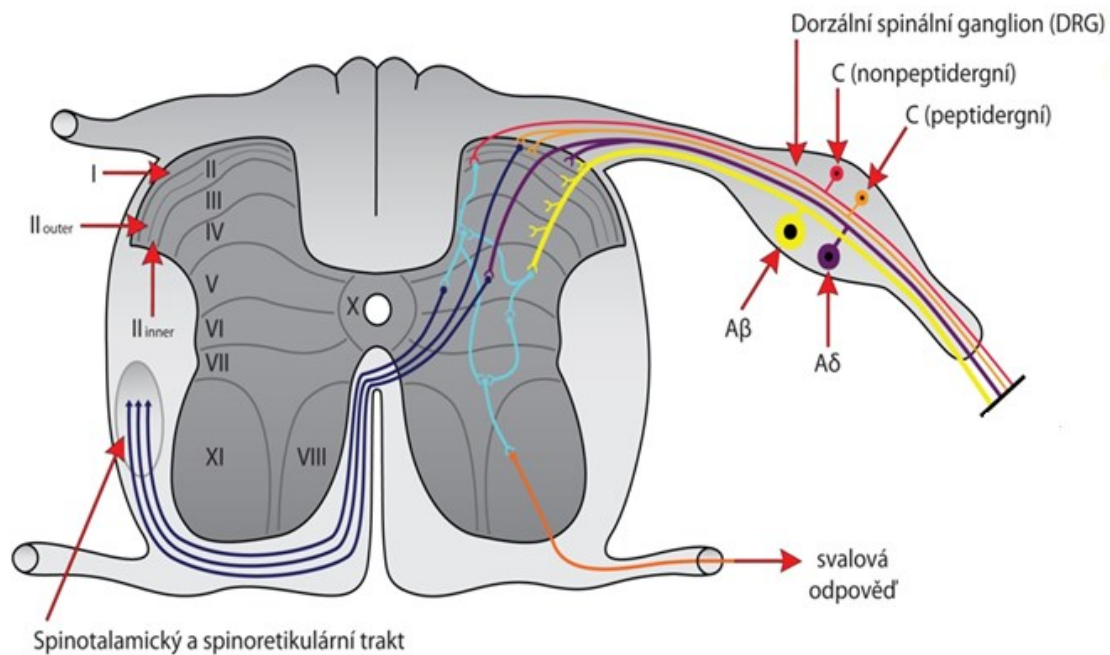
Obrázek 3. Rychlost vedení nociceptivního signálu a průměr je jednotlivých vláken. První vrchol zleva odpovídá myelinizovaným vláknům A. Zpožděná odpověď představuje součet akčních potenciálů nemyelinizovaného C vlákna. Převzato a upraveno (Kandel 2013).

3.2. Spinální ganglia

Spinální ganglia jsou nervové uzliny vřetenovitého tvaru uložena, až na výjimky, ve *foramina intervertebralia*. Obsahují těla pseudounipolárních neuronů, jejichž dendrity jsou senzorká vlákna periferních nervů a axony jsou vlákna zadních kořenů míchy (Krames 2014). Pseudounipolární neurony spinálních ganglií se původně vyvíjejí jako bipolární, ale jejich výběžky fúzíjí do jediného a odstupují z těla buňky v jednom místě. Axon se následně rozdělí na dva výběžky, z nichž jeden míří do míchy jakožto součást zadního míšního kořene a z druhého se stane PAF (Obrázek 2).

Gliové buňky mozkomíšních ganglií, podobně jako další gliové buňky, mohou přispívat k rozvoji chronické bolesti. Následkem zranění nervu u nich dochází k mnoha fenotypickým změnám

(např. proliferace, ztráta některých funkcí, produkce prozánětlivých faktorů, změny struktury), které mohou vést k rozvoji hypersenzitivity (Gosselin et al. 2010). Podobně jako u astrocytů i u satelitních gliových buněk (SGC) dochází k upregulaci exprese GFAP (glial fibrillary acidic protein) následkem poranění nervu, což naznačuje, že i SGC tento protein produkují, byť v nedetekovatelném množství za normálních okolností. Je důležité podotknout, že samy SGC málokdy podléhají zranění. Jejich změny přicházejí až druhotně následkem poranění periferních nervů (Ohara et al. 2009).



Obrázek 4. Schématické znázornění míchy a spinálního ganglia. Neurony spinálních ganglií jsou pseudounipolární, jejichž výběžek přivádějí informace somatosensorického systému do dorzálních rohů míchy, kde dochází k jejich přepojení na míšní neurony. Ve spinálních gangliích se nacházejí také těla satelitních buněk (mají funkci gliových buněk), případně fibroblastů, endotelových nebo Schwannových buněk (Adámek 2014).

3.3. Mícha

Mícha hřbetní, lat. *Medulla spinalis*, je provazec nervové tkáně uložený v páteřním kanálu. Mícha začíná pod *foramen magnum* výstupem prvního krčního nervu. Stejně tak jako mozek je i mícha pokryta obaly: od povrchu míchy ven to jsou měkká plena míšní (*pia mater spinalis*), arachnoidea a tvrdá plena míšní (*dura mater spinalis*). Mezi pia mater a arachnoideou se nachází subarachnoidální prostor, který je vyplněn mozkomíšním mokem (Millan 1999, Čihák 2004).

Na průřezu míchou je uprostřed situován centrální kanál (Obrázek 4), který je rovněž vyplněn mozkomíšním mokem a jde celou délkou míchy. Okolo centrálního kanálu se nachází šedá hmota míšní, tvarem připomínající motýla nebo písmeno H. Jednotlivá „křídla“ motýla se označují jako míšní rohy (přední, zadní a postranní) a v prostoru tvoří míšní sloupce. Bílá hmota míšní je na povrchu a mezi

sloupce šedé hmoty, jejichž polohou je bílá hmota rozdělena na tři párové provazce míšní: *funikulus dorsalis* – zadní provazec míšní, *funikulus lateralis* – postranní provazec míšní a *funikulus ventralis* – přední provazec míšní. Tvar průřezu míchy i jeho tloušťka se mezi jednotlivými úseky míchy liší (Čihák 2004). Přední kořeny jsou motorické, obsahují axony neuronů vedoucí vzruchy z míchy do svalů. Zadní kořeny jsou senzitivní a vedou vzruchy z neuronů spinálních ganglií (Čihák 2004, Basbaum et al. 2009).

V roce 1952 zveřejnil švédský profesor a neurolog Bror Rexed svou práci *The Cytoarchitectonic Organization of the Spinal Cord in the Cat*, ve které rozdělil šedou hmotu míchy na 10 lamin, které definoval dle odlišných cytologických charakteristik neuronů v jednotlivých laminách (Obrázek 4). Zadní roh tvoří laminy I-VI, přední roh laminy VII-IX a lamina X obklopuje centrální kanál. Pro nocicepci jsou důležité zejména ty laminy, kde mají synapse axony A δ a C vlákna s neurony druhého řádu, ale u patologických stavů se v nocicepci a vzniku bolesti mohou podílet i A β vlákna. U A δ vláken se první synapse nachází většinou v lamině I (marginální zóna), u C vláken to je potom vnější část laminy II. Obě skupiny vláken mohou v menší míře zasahovat i do lamin II-V (v případě A δ vláken) nebo do lamin I, IV a V (v případě C vláken). Vlákna A β potom projikují zejména do lamin III a IV (Millan 1999). Neurony druhého řádu v zadním rohu míchy dělíme podle jejich odpovědi na podněty přicházející z PAF na 3 typy: NS (nociceptive specific) vysokoprahové neurony odpovídající na nociceptivní podněty, LT (low-threshold, nízkoprahové) neurony odpovídající na slabé podněty vedené vlákny A β a WDR (wide dynamic range, širokého dynamického rozsahu) neurony, které odpovídají na podněty různých typů (mechanické, chemické, tepelné) i intenzit. Neurony druhého řádu lze také klasifikovat dle místa jejich cílového působení na supraspinální (projekční) neurony (PNs), propriospinální intersegmentální neurony a interneurony (INs), které můžeme dále dělit na intra – a interlaminární. Propriospinální neurony mají integrativní funkci, komunikují mezi jednotlivými segmenty i napříč zadním rohem míchy. Interneurony jsou zodpovědné za integraci a modulaci signálů přicházejících z PAF a přenos signálu mezi nebo v jednotlivých laminách. Projekční neurony jako jediné vedou informaci přímo do vyšších mozkových center (Millan 1999).

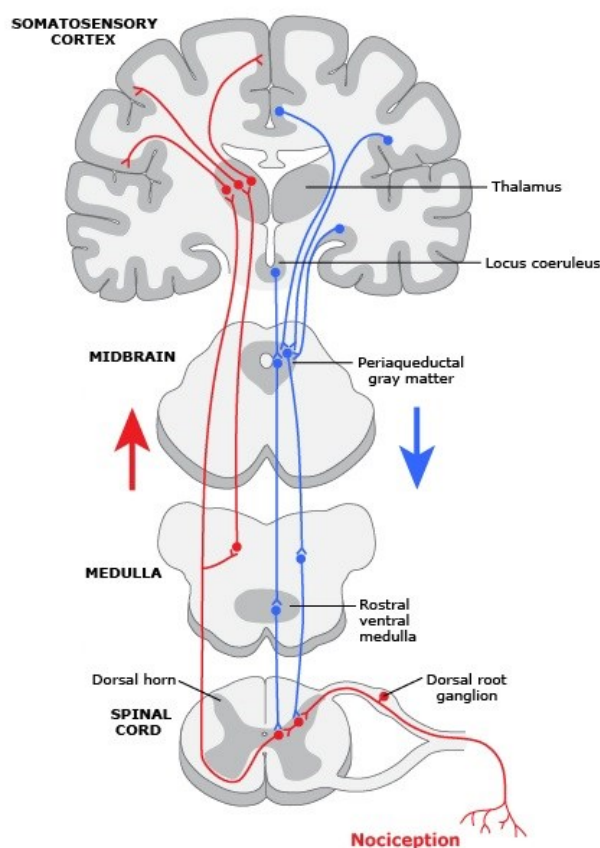
3.4. Nociceptivní míšní dráhy a zpracování bolesti mozkiem

Nociceptivní podnět přichází po PAF do dorzálního rohu míchy, kde je v synapsi s neuronem druhého řádu. Zde dochází k modulaci a primárnímu zpracování tohoto signálu.

Ascendentní dráhy – nociceptivní signál je dále veden projekčními neurony do vyšších mozkových center prostřednictvím ascendentních (vzestupných) drah, zejména spinotalamické, spinoretikulární dráhy a spinomesencefalické (Obrázek 5). Nejvýznamnější z hlediska nocicepce je dráha spinotalamická vedoucí do jader talamu (Tracey and Mantyh 2007, Willis 1991). Třetí neuron této dráhy tvoří *tractus thalamocorticalis*, který končí v primární korové oblasti (S1) a sekundárních senzitivních korových oblastech. Neurony spinoretikulární a spinomesencefalické dráhy končí

v prodloužené míše a mozkovém kmeni. Kde se zprostředkovává převod na autonomní nervový systém, odpovídající za vegetativní reakce (Čihák 2004, Steeds 2016).

Descendentní dráhy – vedou signál z mozku zpět do míchy a hrají významnou roli v modulaci nocicepce (Obrázek 5). Dělíme je na inhibiční (s antinociceptivním účinkem) a facilitační (s pronociceptivním účinkem). Mezi mozkové struktury podílející se na descendentní modulaci patří: čelní lalok, *anterior cingulate cortex* (ACC), insula, amygdala, hypothalamus, periakvaduktální šedá hmota (PAG), *nucleus cuneiformis* (NCF) a rostrální ventromediální dřev (RVM) (Tracey and Mantyh 2007).



Obrázek 5. Zjednodušené zobrazení vzestupných a sestupných signálních drah bolesti. Vzestupné dráhy bolesti = červená; modulační sestupné dráhy = modrá. PAF vstupují do míchy prostřednictvím DRG. Neurony sekundárního řádu stoupají v kontralaterálních spinothalamických a spinorektikulárních traktech, které přenášejí signál do kortikálních center mozku. Sestupné dráhy z PAG, somatosenzorického kortexu a rostrální RVM do hřbetního rohu. Převzato (Cioffi 2018)

Přestože descendentní dráhy vycházejí ze stejných mozkových struktur a mohou využívat stejné neurotransmitery (dopamin, noradrenalin, serotonin), jejich účinek na cílovou buňku může být rozdílný, excitační nebo inhibiční. Descendentní dráhy ovlivňují nociceptivní signál na PAF přímo nebo nepřímo prostřednictvím inhibičních interneuronů (Millan 2002).

Nejvýznamnější strukturou pro přenos nociceptivních signálů v mozku je **talamus**, ve kterém jednak končí několik ascendentních drah a také převádí signály o bolesti do dalších oblastí mozku. Talamus slouží nejen jako převodní centrum, ale také se podílí na zpracování nociceptivní informace, rozlišuje různé aspekty bolesti jako intenzita, místo a délka působení (Apkarian and Shi 1994, Craig et al. 1994). Nociceptivního procesu se účastní jádra ventrobazálního komplexu, jádra zadního talamu a ventrolaterální jádra a odtud informace pokračuje do primárního a sekundárního somatosenzorického kortexu, insuly, ACC a do prefrontálního kortexu (Steeds 2016). Somatosenzorická kůra, zajišťující především vyhodnocení lokalizace a intenzity bolestivého stimulu, parabrachiální jádro a amygdala zpracovávají především emoční složku bolesti. Neexistuje však jen jedna konkrétní oblast mozku samostatně zpracovávající bolest. Bolest je komplexní prožitek, jehož jednotlivé komponenty jsou vyhodnocovány v různých mozkových oblastech (Apkarian and Ayrapetian 1997).

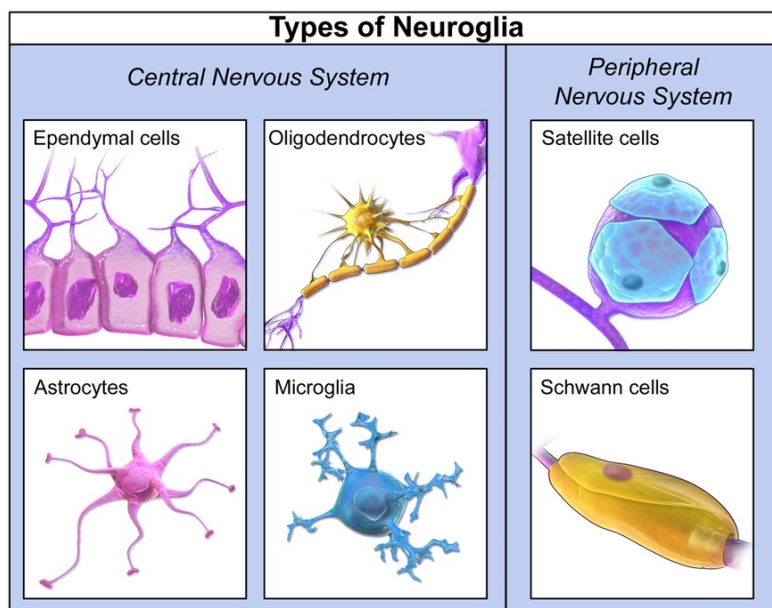
3.5. Gliové buňky

Gliové buňky tvoří významnou funkční složku a jsou pro NS nepostradatelné. Přestože gliové buňky pocházejí ze stejných embryonických prekursorových buněk, liší se od nervových buněk svou morfologií i funkcí a svým počtem je několikanásobně převáží (Obrázek 6.).

Mikroglie jsou buňky mezenchymálního původu, které se vyvíjejí v kostní dřeni a už v raném embryonálním vývoji migrují do CNS, kde se účastní imunitní odpovědi. V klidovém stavu mikroglie neustále zkoumají své okolí a kontrolují homeostázu pomocí svých vysoce pohyblivých výběžků obsahujících celou řadu receptorů. Mikroglie jsou aktivovány stimuly interpretovanými jako nebezpečné pro strukturní či funkční integritu CNS (zranění, ischemie, stres, patogeny) (Bradesi 2010). Aktivace mikroglie vede ke kaskádě reakcí za pomoci mnoha faktorů (prozánětlivé cytokiny, volné radikály, ztráta iontové homeostázy, neurotoxiny, dysfunkce nespecifické imunity), dochází také k morfologickým změnám (zvětšení, retrakce výběžků) a k expresi cytokinů a chemokinů buňkou. Většina faktorů produkovaných aktivovanými mikroglie jsou prozánětlivé a cytotoxické. Mezi tyto molekuly patří např. prozánětlivé cytokiny TNF α a IL-1 β , volné radikály (NO, superoxidový radikál) nebo metabolity mastných kyselin (eikosanoidy) (Cai, Hussain and Yan 2014). V míše mohou takto aktivované mikroglie přispívat k rozvoji zánětlivé hyperalgesie a allodynii následkem poranění kůže v oblasti periferního nervu (Bradesi 2010).

Oligodendrocyty jsou drobné buňky nacházející se v bílé i šedé hmotě CNS. Mají jen malý počet výběžků, které obalují axonální segmenty (internodia) a tvoří myelinovou pochvu. V závislosti na průměru axonu obalí každý oligodendrocyt 1-30 internodií (Baumann and Pham-Dinh 2001).

Schwannovy buňky se nacházejí v periferním nervovém systému, kde rovněž obalují nervy myelinovou pochvou. Na rozdíl od oligodendrocytů však každá Schwannova buňka obaluje pouze jeden segment jednoho axonu (Obrázek 6). Myelinizace axonů zrychluje vedení signálu a dává vzniknout Ranvierovým zářezům mezi jednotlivými myelinizovanými segmenty (Gosselin et al. 2010).



Obrázek 6. Typy glií. Existuje šest typů gliových buněk. Čtyři z nich se nacházejí v CNS a dva v PNS. Převzato z Blausen.com staff (2014). "Medical gallery of Blausen Medical 2014". *WikiJournal of Medicine* 1 (2). DOI:10.15347/wjm

Astrocyty patří mezi největší gliové buňky tvořící téměř polovinu všech buněk v mozku. Jejich funkce spočívá zejména ve výživě neuronů, ale jsou také součástí hematoencefalické bariéry (BBB) (tvoří její jednu vrstvu – *membrana limitans gliae perivascularis*) (Čihák 2004). Jejich tvar je nepravidelný, hvězdicovitý s velkým počtem výběžků (Obrázek 6).

Astrocyty mají několik hlavních funkcí: rozdělují buňky a izolují jednotlivé synapse, regulují koncentraci draselných iontů v mezibuněčném prostoru, podporují efektivitu signalizace např. pohlcením uvolněných neurotransmiterů ze synaptické štěrbině a vyživují neurony (Hansen and Malcangio 2013)

V reakci na poranění periferní i centrální nervové tkáně přechází astrocyty do reaktivního stavu, charakterizovaného určitými morfologickými změnami – dochází k jejich hypertrofii a zvýšené reaktivitě. Astrocyty jsou aktivovány širokým spektrem neurotransmiterů a uvolňují značné množství mediátorů včetně glutamátu, ATP, cytokinů, chemokinů a růstových faktorů. V závislosti na konkrétním stimulu mohou astrocyty uvolňovat různé mediátory a aktivovat různé signální kaskády vedoucí k rozličným morfologickým změnám. Jedna z prvních zmínek o roli astrocytů v neuropatické bolesti (Garrison et al. 1991) poukázala na hypertrofii na ipsilaterální straně míchy od zranění po chronické konstrikci sedacího nervu (CCI). Od té doby byly reaktivní astrocyty identifikovány v řadě modelů bolesti, včetně zánětlivé, neuropatické i bolesti způsobené rakovinou (Hansen and Malcangio 2013).

4. Nociceptivní přenos na míšní úrovni

Dorzální roh míchy, jak už bylo řečeno je prvním místem integrace a modulace nociceptivní informace, kde centrální výběžky neuronů spinálních ganglií tvoří synapse se sekundárními míšními neurony. Můžeme zde najít čtyři základní typy neuronů: primární aferentní neurony, interneurony, projekční neurony a neurony sestupné modulační dráhy z mozku (Todd 2010). Všechny tyto neurony jsou zapojeny v komplexní dynamické komunikaci, kterou je dále možné ovlivňovat.

Místo vstupu aferentního zakončení v DH je specifické pro každý DRG neuron a poloha je určena umístěním cílové tkáně, což odráží funkční identitu neuronu (Woolf and Ma 2007). Nociceptory jsou excitační neurony a jako primární neurotransmitter produkují glutamát spolu s různými neuropeptidy (jako SP a CGRP (calcitonin gene-related peptide)) a dalšími látkami, které umožňují modulovat přenos (ATP, NO, růstové faktory, cytokiny a chemokiny) (Woolf and Ma 2007).

Synaptický přenos mezi primárními nociceptivními aferenty a sekundárními neurony v DH není jednoduchým ani jednosměrným přenosem signálu, ale složitou kooperací mezi řadou neuronů podílejících se na přenosu a sousedícími gliovými buňkami. Gliové buňky na míšní úrovni velmi významně ovlivňují synaptický přenos, a to zejména díky produkci řady neuromodulátorů, jako jsou zánětlivé cytokiny a chemokiny (například CX3CL1 nebo CCL2) (Gao and Ji 2010).

Navíc nociceptivní přenos může být regulován v DH jak segmentovými mechanismy, tak příkazy ze supraspinální centra. Takové signály se sčítají nebo ruší a jejich rovnováha je zásadní pro udržení normálních funkcí nociceptivního systému. Narušení inhibičních vstupů může velmi zásadně přispět vývoji patologických bolestivých stavů (Heinricher et al. 2009).

Přenos nociceptivní informace je na úrovni míchy regulován množstvím neurotransmiterů a neuromodulátorů. Tyto látky mohou mít na přenos výrazný excitační nebo inhibiční vliv. Neuropeptidy (substance P, neurokinin A), excitační aminokyseliny (glutamát, aspartát) a některé další molekuly (ATP, NO, bradykinin, prostaglandiny) řadíme mezi látky s aktivujícím (pronociceptivním) účinkem, zatímco glycin, GABA a opioidy mezi inhibitory. Jaký bude mít neurotransmitter na buňku vliv je však dáno typem receptoru, který je jím aktivován na postsynaptické buňce (Millan 1999).

V synapsích se přenos realizuje chemickou cestou za pomoci neurotransmiterů a mediátorů nashromážděných v synaptických váčcích. K uvolnění neurotransmiterů dochází depolarizací synaptické membrány po příchodu akčního potenciálu. Depolarizace otevírá napětím ovládané vápníkové kanály a zvýšená koncentrace Ca^{2+} zahájí exocytózu – vylití neurotransmiteru (Kandel 2013). Po vylití do synaptické štěrbině se neurotransmitery vážou na specifické receptory a ty jsou spojeny kanálem určitého typu. Při excitačních synapsích se otevírají kanály pro kladné ionty (Na^+ a Ca^{2+} , které proudí do buňky). Postsynaptická membrána se depolarizuje a vzniká excitační postsynaptický potenciál (EPSC). U inhibiční synapse se otevírají kanály pro Cl^- ionty s následnou stabilizací membrány a tím vzniká inhibiční postsynaptický potenciál (IPSC) (Kandel 2013).

Existuje celá řada neuroaktivních látek podílejících se na přenosu nebo modulaci nervového – nociceptivního přenosu, v následující kapitole se budu věnovat jen několika z nich.

4.1. Excitační aminokyseliny a jejich receptory

Excitační aminokyseliny zvyšují pravděpodobnost vzniku akčního potenciálu na postsynaptické buňce, čímž v přenosu bolesti podporují šíření nociceptivní informace.

Glutamát je hlavním excitačním neurotransmiterem mozku a míchy. Jeho excitační účinek spočívá v aktivaci receptorů spojených s iontovými kanály a následném vstupu sodných a draselných iontů způsobující depolarizaci buňky a vznik EPSC (Obrázek 7.). Glutamátové receptory dělíme na ionotropní a metabotropní. Ionotropní receptory jsou kanály otevírané ligandem – glutamát. Metabotropní jsou receptory spřažené s G proteiny, které aktivují signální kaskády prostřednictvím druhých posílů. (Zeilhofer et al. 2005)

Iontové glutamátové receptory dělíme na tři skupiny: NMDA, AMPA a kainátové receptory, podle jejich syntetických agonistů, které je aktivují.

NMDA receptory (podle N-methyl-D-aspartátu) jsou heterotetramery, které mají kanály propustné zejména pro vápenaté, ale i sodné a draselné ionty. Otevření kanálu je napětově závislé a je třeba kofaktoru, kterým je extracelulární glycin. Během klidového membránového potenciálu (KMP) je kanál inhibován hořčnatým kationtem, který je při depolarizaci vypuzen elektrostatickými silami, čímž je umožněn průchod pro Na^+ , K^+ a Ca^{2+} (Millan 1999). NMDA receptory propouští vápník do buňky, zvyšují tak jeho intracelulární koncentraci, pomáhají aktivovat signální kaskády závislé na vápníku a tím překládají elektrický signál na biochemický. Některé tyto biochemické procesy mohou vést k dlouhodobým změnám ve vlastnostech synapse, tzv. dlouhodobá synaptická plasticita (long-term synaptic plasticity) (Kandel 2013).

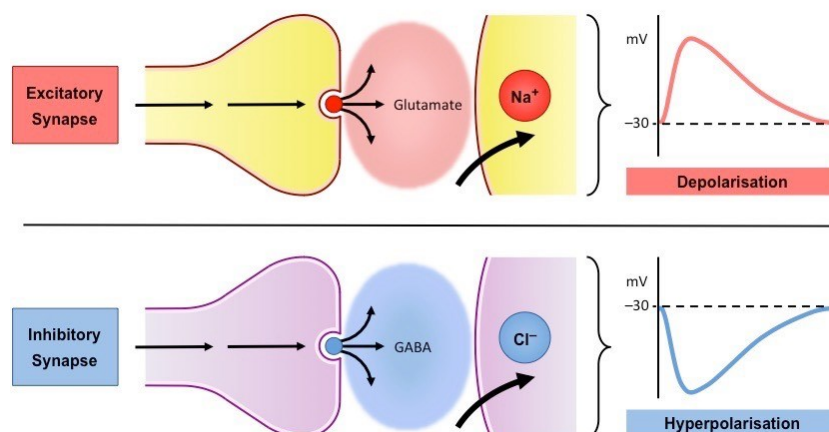
AMPA receptory jsou heterotetramery s rychlou kinetikou. Jednotlivé podjednotky GluR1-GluR4 jsou kódovány čtyřmi geny. Stejně jako NMDA receptory jsou propustné pro Na^+ , K^+ i Ca^{2+} , přičemž za propustnost pro vápník zodpovídá podjednotka GluR2 (Bettler and Mülle 1995).

Kainátové receptory patří mezi tzv. non-NMDA receptory spolu s AMPA receptory, kterým jsou funkčně podobné. Taktéž se jedná o heterotetramery, ale podjednotky jsou kódovány pěti geny. Receptory jsou aktivovány kainátem, strukturním analogem glutamátu. Kainátové receptory se zřejmě vyskytují výhradně na synapsích tvořených vysokoprahovými nociceptivními a tepelnými PAF (Li et al. 1999).

Metabotropní glutamátové receptory jsou rodina receptorů spřažených s G-proteiny aktivované glutamát, které se účastní v pomalém synaptickém přenosu. Bylo objeveno 8 podtypů mGlu1-8, které se podle svých aminokyselinových sekvencí a farmakologických účinků dále dělí do 3 skupin. Receptory I. skupiny (mGlu1 a mGlu5) jsou selektivně aktivovány 3,5-dihydroxyphenylglycinem. Podílejí se na aktivaci fosfolipázy C a následné produkci IP3 a DAG.

IP3 dále způsobuje uvolnění intracelulárních zásob vápníku a aktivaci PKC, která má značný vliv na genovou transkripci a regulaci receptorů. Receptory II. (mGlu2, mGlu3) a receptory III. (mGlu4, 6, 7, 8) skupiny jsou negativně spojeny s adenylát cyklázou, ale mají odlišné agonisty (Ferraguti and Shigemoto 2006, Millan 1999).

Acetylcholin byl první látkou rozpoznanou jako neurotransmitter. Neurony uvolňující acetylcholin jsou známy jako cholinergní neurony (10 % všech neuronů). Acetylcholin se váže na dva typy receptorů: muskarinové a nikotinové. Muskarinové receptory jsou rychlé (ionotropní) a uplatňují se především v procesech modulace nálad, tlumení bolesti.



Obrázek 7. Nervové impulsy jsou iniciovány nebo inhibovány v postsynaptických neuronech jako výsledek součtu všech excitačních a inhibičních neurotransmiterů přijatých z presynaptických neuronů. Převzato a upraveno: <https://ib.bioninja.com.au/options/option-a-neurobiology-and/a5neuro-pharmacology/synaptic-transmission.html>

4.2. Neuropeptidy modulující nociceptivní přenos

Nejdůležitějšími zástupci jsou **Substance P** a **Neurokinin A**, patřící mezi tachykininy. U savců jsou tachykininy souhrnně nazývány neurokininy (Neurokinin A, Neurokinin B a Substance P) a nachází se v řadě tkání včetně nervové soustavy. Na úrovni míchy působí Neurokinin A a Substance P zejména v povrchových laminách dorzálního rohu míchy, na synapsích C vláken v lamině I a *substantia gelatinosa*, kde se také nachází jejich receptory v největší koncentraci (Bentley and Gent 1995, Coggeshall and Carlton 1997). Jsou popsány tři tachykininové receptory NK1-3, přičemž Substance P se váže zejména na NK1 a Neurokinin A na NK2. Jedná se o heptamery patřící do rodiny receptorů spřažených s G proteiny, jejichž aktivací dojde ke spuštění signální kaskády přes fosfolipázu C, IP3 a vápenaté ionty (Khawaja and Rogers 1996). Bylo demonstrováno, že k uvolnění obou látek v dorzálním rohu dochází následkem škodlivého podnětu vysoké intenzity nebo následkem silného elektrického impulsu (Bentley and Gent 1995).

Bradykinin je dalším významným zástupcem peptidů s pronociceptivním účinkem. Jedná se o nonapeptid se značnou biologickou aktivitou. K jeho uvolňování dochází v poškozené tkáni a účastní se zánětlivých procesů. Způsobuje vasodilataci a hypotenzi, zvyšuje permeabilitu cév a má účast i na nociceptivním přenosu. Existují 2 bradykininové receptory spřažené s G-proteiny, receptor B1 a B2. Receptor B2 se častěji vyskytuje ve zdravé tkáni, zatímco receptor B1 je ve zvýšené míře přítomen v poškozené tkáni (Hanani 2005).

4.3. Inhibiční mediátory

Dochází k otevření K⁺ a Cl⁻ kanálů a proudu kladných iontů ven z buňky a záporných do buňky. Membrána je pohyby iontů hyperpolarizována a snižuje se excitabilita neuronu (Obrázek 7).

GABA – kyselina γ -amino-máselná je hlavní inhibiční neuropřenašeč v CNS. V organismu je syntetizovaná z glutamátu enzymem dekarboxyláza L-glutamátu, kofaktorem reakce je pyridoxalfosfát, aktivní forma vitamínu B6. GABA působí na receptory GABA_A a GABA_B (Hwang et al. 2004).

GABA_A je ionotropní receptor, který po vazbě ligandu přímo otevírá chloridový kanál. Vtok chloridových iontů způsobuje hyperpolarizaci membrány, čímž vznikají inhibiční postsynaptické proudy (IPSC). Kompetitivním antagonistou GABA_A receptoru je bikukulin, alkaloid přítomný v rostlinách čeledi mákovitých (*Papaveraceae*) a zemědýmovitých (*Fumariaceae*), který se chová jako neurotoxin (Curtis et al. 1971).

GABA_B je metabotropní receptor patřící do rodiny receptorů spřažených s G-proteiny. Je unikátní tím, že je složen ze dvou podjednotek, které jsou na sobě funkčně závislé. Aktivací receptoru dojde ke spuštění kaskády druhých posílů a nepřímo tak aktivuje K⁺ kanály (Bettler et al. 2004).

Glycin je v mozku a míše přítomen v menší míře než GABA, také ale hraje zásadní roli v nocicepci. Glycin se váže na ionotropní receptor otevírající chloridové kanály, podobně jako GABA_A. Jejich topologie je podobná acetylcholinovému receptoru nikotinového typu. Inhibitorem glycinového receptoru je strychnin, indolový alkaloid ze semen kulčiby dávivé (*Strychnos nux vomica*) vyvolávající křeče.

Endogenní opioidy jsou látky, které rovněž mají schopnost inhibice nociceptivního přenosu. Jsou to v organismu přirozeně se vyskytující ligandy opioidních receptorů schopné tlumit bolest, mezi něž řadíme endorfiny, enkefaliny, dynorfin a endomorfíny. U lidí se vyskytují 3 druhy opioidních receptorů: μ , κ a δ , které mají dále své podskupiny. Opioidy rozdělujeme na 4 skupiny: endogenní, přirozené (morfin, kodein), polosyntetické (heroin, oxycodon), syntetické (fentanyl). Poslední tři zmíněné můžeme dělit podle jejich afinity k opioidním receptorům a vnitřní aktivity na agonisty, parciální agonisty, agonisty-antagonisty a antagonisty. Na léčbu silné nádorové nebo chronické bolesti jsou vhodné μ agonisté (morfin), jelikož nejsou blokovány tzv. „stropovým“ (ceiling) efektem a se zvyšováním jejich dávky se zvyšuje i analgetický účinek (Portenoy 1996, Rees 1987).

5. Neuropatická bolest

Neuropatická bolest je definována dle IASP jako „bolest způsobená lézí nebo onemocněním nervového systému“. Jedná se o obsáhlou definici, která zahrnuje přes 100 různých patologických bolestivých stavů (Jensen et al. 2011).

K rozvoji neuropatických bolestivých stavů může dojít následkem změn v nociceptivní signalizaci (po poškození či nemoci) v celém nervovém systému jak na periférii, tak v míše, mozkovém kmeni či mozku. Důsledkem těchto změn je neadekvátní a nepřesná odpověď na bolestivé podněty, zahrnující nervový systém (neurony, gliové i imunitní buňky) i s jejich modulátory, kdy dochází ke spontánní produkci bolestivých vjemů (Meacham et al. 2017).

5.1. Specifika a etiologie neuropatické bolesti

Jako taková může neuropatická bolest nastat nezávisle na jiném poškození tkáně, a na rozdíl od jiných druhů bolesti chybí jakýkoli ochranný účel bolesti. Často pak přetrvává i po vyléčení nervového poškození (Ueda 2008).

Neuropatie je často považována za patologický syndrom způsobený řadou různých onemocnění poškozující nervy (Jensen et al. 2011). Možné příčiny vzniku neuropatické bolesti zahrnují trauma, metabolické syndromy (jako je diabetická polyneuropatie), nežádoucí vedlejší účinky léků nebo toxiny, dále pak dědičné poruchy a infekční nebo postinfekční poškození nervů (například infekce herpes nebo HIV) (Zimmermann 2001). Naproti tomu klinické projevy neuropatie (poškození nervů různé etiologie) je mnohem jednodušší. Pacienti obvykle vykazují zvýšenou citlivost k podnětům jako je alodynne a hyperalgezie, nebo naopak sníženou citlivostí končetin (Baron, Binder and Wasner 2010).

Velký podíl na rozvoji a udržování neuropatických bolestivých stavů mají také gliové buňky. Excitabilita neuronů je ve velké míře ovlivněna nejen spontánní aktivací periferních vláken, ale také různými gliovými a imunitními mediátory uvolňovanými z astrocytů a mikroglíí nebo T-buňkami v CNS. Z tohoto důvodu je neuropatická bolest nyní považována za neuroimunitní poruchu (Grace et al. 2014). V současné době existuje vysoký počet pacientů trpících neuropatickou bolestí pro které je stávající terapie nedostatečná nebo nevhodná vzhledem k vedlejším účinkům (Smith and Torrance 2012). Až dvě třetiny pacientů s neuropatickou bolestí dosáhnou úlevy od bolesti, což je ve velké míře způsobeno přetrvávající neschopností identifikovat a zaměřit mechanismy které spouštějí, podporují a udržují neuropatickou bolest (Finnerup, Sindrup and Jensen 2010).

Existuje celá řada mechanismů, které se na neuropatických bolestivých stavech podílejí a mohou se vzájemně doplňovat. Vlastnost, kterou mají všechny neuropatické bolestivé stavy společné, je produkce bolestivé signalizace bez přetrvávající tkáňové příčiny – následkem léze či poranění některé z komponent samotného NS (PAF, DRG nebo v zadním kořenu míchy) (Woolf 2004). Poškození nervu může být následkem trauma, utlačení nervu, nádorového růstu, ischemie, zánětu, metabolických poruch, nutričního deficitu, přítomností cytotoxických látek nebo následkem degenerativních onemocnění, jako

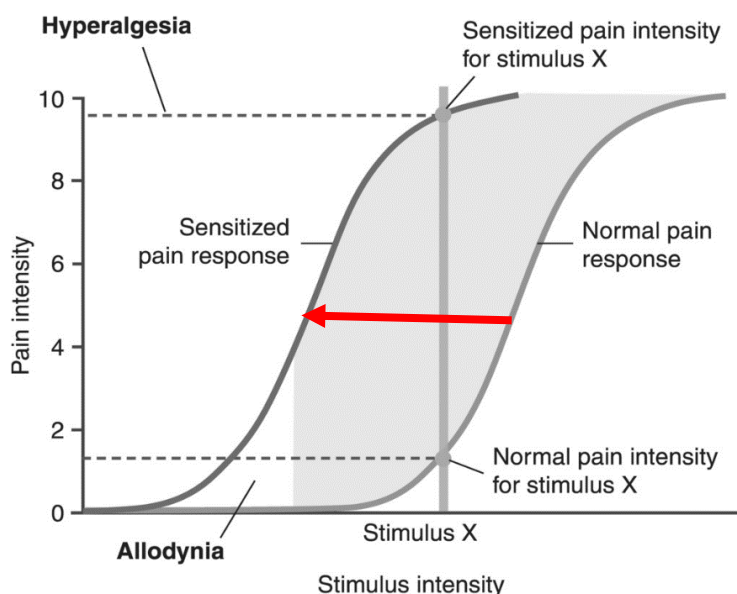
jsou diabetes či roztroušená skleróza. Změna ve funkci somatosenzorického systému bez přítomnosti léze, jako je tomu u fibromyalgie, migrén nebo syndromu dráždivého tračnicku, by se však za neuropatickou bolest neměla označovat (Woolf and Mannion 1999).

5.2. Mechanismy vzniku neuropatické bolesti

Patologické bolestivé stavy lze dělit na periferní a centrální, podle toho, kde došlo k poškození nervového systému (Scholz and Woolf 2002). Mezi nejvýznamnější patologické bolestivé stavy periferního NS řadíme hyperalgesii a alodynii:

Hyperalgesie – stav, kdy dochází ke zvýšené citlivosti vůči škodlivým či potencionálně škodlivým podnětům na mechanické a tepelné podněty (Obrázek 8). Často se vyskytuje například po poranění kůže následkem poškození C vláken (Millan 1999). Rozlišujeme primární a sekundární hyperalgesii. Primární hyperalgesie se vyznačuje zvýšenou citlivostí tkáně přímo v místě poranění, zatímco u sekundární hyperalgesie dochází ke zvýšené citlivosti nepoškozené tkáně v okolí rány (Kilo et al. 1994).

Allodynie – stav, kdy dochází ke snížení prahu bolesti, která je tak vyvolávaná i jinak nebolestivými podněty, a na rozdíl od hyperalgezie zde dochází ke změně v kvalitě cití (Obrázek 8). K alodynii dochází následkem aktivace A β vláken (Millan 1999).



Obrázek 8 Poranění tkáně senzitivizuje/zvyšuje reakce nociceptorů na periferní podnět. Za normálních podmínek slabé nebo neškodné podněty nevyvolávají pocit bolesti. Po poškození tkáně (červená šipka) jsou reakce na podněty senzitivizovány, čímž se funkce odezvy posune doleva. Mírný bolestivý stimul je nyní vnímán jako intenzivní (Hyperalgezie) a dříve neškodný stimul může být vnímán jako bolestivý (Alodynie) Převzato a upraveno (Vacanti et al. 2011)

Existuje celá řada způsobů, jak následkem poranění periferních nervových vláken vznikne neuropatická bolest. Periferní zakončení C a A δ vláken může podnítit vznik neuropatické bolesti

následkem metabolické poruchy, působením toxinů, léčiv, cytokinů a pro-inflamačních mediátorů, vedoucí ke změnám v hustotě vláken a nervové hyperexcitabilitě (Latremoliere and Woolf 2009). Zranění samotného axonu (trauma, zánět, komprese, chemické popálení, hypoxie) může indukovat degeneraci vláken a změny v stavbě a expresi kanálů, mající za následek chybový přenos signálu. Těla neuronů PAF v DRG a trigeminovém gangliu mohou být také vystavena chemickému, mechanickému nebo excitotoxickému poranění, následkem kterých u nich dojde k maladaptivním změnám ve složení jejich membrány nebo vlastnostech a umístění synapsí. Pravděpodobnost, že dojde k poranění nervového systému nebo že se stav vyvine v neuropatickou bolest, může být umocněna dědičnými predispozicemi (Meacham et al. 2017).

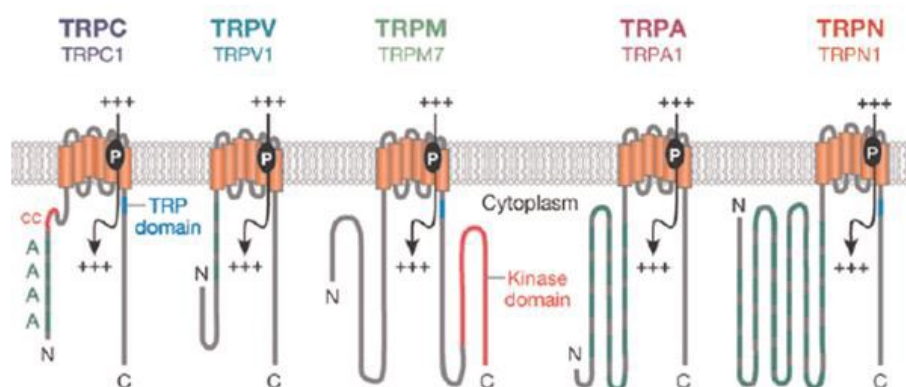
Ke studiu periferních mechanismů se využívá řady hlodavčích modelů. Jedná se zejména o spared nerve injury (SNI), chronickou konstrikci (chronic constriction injury (CCI)), ligaci míšního nervu (spinal nerve ligation (SNL)), ale také o modely diabetes, chemoterapie, *herpes zoster* a periferní neuropatie indukované HIV (Colleoni and Sacerdote 2010). U SNI a CCI modelů dochází ke zvýšení ektopických signálů na myelinizovaných A vláknech během několika hodin a následně na nemyelinizovaných vláknech typu C v průběhu několika dní až týdnů. Tyto změny v signalizaci nervových vláken vedou u pokusných zvířat k různým reflexivním změnám v chování (Latremoliere and Woolf 2009).

Po poranění nervu jsou z přilehlých buněk imunitního systému i ze samotného vlákna uvolňovány zánětlivé mediátory – cytokiny, chemokiny, prostaglandiny, histamin, serotonin, bradykinin a růstové faktory. Tyto látky mohou působit přímo na axon i tělo nervové buňky v DRG, což vede k periferní senitizaci. (Gao and Ji 2010)

Na molekulární úrovni byla identifikována řada iontových kanálů zodpovědných za zvýšenou/trvalou signalizaci v jednotlivých typech senzoričkových vláken. Jedná se především o napěťově řízené sodíkové a draselné kanály (NaV, Kv) a TRP kanály.

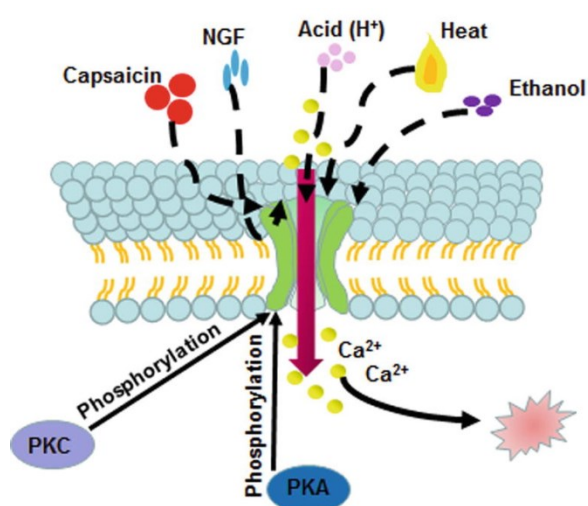
U několika neuropatických modelů hlodavců byla prokázána zvýšená exprese několika isoform **NaV kanálů**. Na myelinizovaných axonech se jedná především o NaV1.3 a NaV1.6, u nemyelinizovaných to jsou kanály NaV1.7 a NaV1.8. Modifikace těchto kanálů způsobující rychlou aktivaci kanálu a zvýšenou denzitu signalizace dále vedou v odpovědi na neuropatii k hyperexcitaci PAF. (Meacham et al. 2017)

TRP (transient receptor potential) kanály tvoří významnou skupinu iontových kanálů, které jsou aktivovány řadou chemicko-fyzikálních nociceptivních stimulů, čímž dále umožňují aktivaci NaV kanálů a vznik akčního potenciálu. TRP receptory mohou být aktivovány kyselým pH, nadměrným teplem (TRPV1) nebo chladem (TRPA1, TRPM8). TRPA1 může být aktivován následkem poranění nervu/neuropatie pomocí mediátorů spojených s poškozením buňky (ROS/RNS), což vede ke zvýšené excitaci nervových vláken a projevům mechanické a chladové hypersenzitivity u hlodavčích modelů. Obdobně u TRPV4 kanálu dochází po podání paklitaxelových chemoterapeutik k periferní neuropatii následkem mechanické aktivace kanálu (Meacham et al. 2017).



Obrázek 9. Schematické znázornění TRP kanálů. Převzato z (Venkatachalam and Montell 2007).

TRPV1 je neselektivní kationtový kanál, který je exprimován zejména primárními sensorickými nociceptory a účastní se detekce bolestivých podnětů (Obrázek 10). Jedná se o vaniloidní receptor, jehož agonistou je kapsaicin – rostlinný alkaloid izolovaný z chilli papriček.



Obrázek 10. Aktivace TRPV1 kanálu. TRPV1 může být aktivován kapsaicinem, teplem, acidózou, NGF, fosforylací PKA a PKC. Aktivace TRPV1 indukuje příliv extracelulárního Ca^{2+} , což vede ke zvýšení intracelulárního vápníku, a odpovídající fyziologické a patologické funkci. Převzato a upraveno (Du et al. 2019).

Většina míšních TRPV1 receptorů se nachází na centrálních koncích malých a středně velkých DRG neuronů (Cavanaugh et al. 2011). Studie TRPV1 knock-out myši ukazují na jeho nezbytnou roli v modulaci nociceptivního přenosu, zejména v patologických podmínkách. Poškození nervu i přítomnost prozánětlivých mediátorů zvyšují expresi TRPV1, což vede k funkčním změnám a zvýšení magnitudy i doby trvání hyperexcitability nervových vláken. Aktivace TRPV1 vede ke zvýšení hladiny Ca^{2+} v cytosolu, následné depolarizaci a uvolnění zánětlivých peptidů ze zakončení PAF. Dlouhodobá nebo opakovaná aktivace TRPV1 způsobuje desenzitizaci receptoru a necitlivost k následným stimulům. Desenzitizace TRPV1 je proces alespoň částečně závislý na vápenatých kationtech (Mohapatra and Nau 2003).

Narozdíl od sodných nebo TRP kanálů vede aktivace **draselných kanálů** k repolarizaci membrány a potlačení elektrického signálu. Jedná se o nejpočetnější skupinu iontových kanálů

v neuronech, u člověka kódovaných 78 geny. Snížení exprese těchto kanálů v modelech neuropatické bolesti u hlodavců vede ke snížení K^+ proudů a hyperexcitaci senzoričných nervů. S výjimkou kanálu Kv7 zůstávají konkrétní funkce a mechanismy draselných kanálů v neuropatické bolesti neobjasněny. (Tsantoulas and McMahon 2014)

Z preklinických studií neuropatické bolesti vyplývá, že existuje řada mechanismů excitace a senitizace periferních vláken při poranění nervu nebo neuropatických stavech. Tyto mechanismy vedou ke vzniku trvalých elektrických signálů vedoucích do CNS a pravděpodobně jsou zodpovědné za trvalé vzestupné bolestivé signály vedoucí do mozku. Farmakologické zásahy zaměřené na redukci nebo úplnou blokaci excitace PAF u modelů neuropatické bolesti uvádí značný pokles neuropatického bolestivého chování u hlodavčích modelů a poukazují na význam hyperexcitace jako nezbytného mechanismu neuropatických bolestivých stavů. (Dray 2008)

5.3. Synaptické mechanismy neuropatické bolesti

Zvýšení aktivity a excitability nociceptivních neuronů v míše a mozku v reakci na normální nebo podprahové podněty a vedoucí k vývoji neuropatické bolesti se označuje jako centrální senitizace (Julius and Basbaum 2001, Ji et al. 2003). Průběh centrální senitizace má dvě hlavní fáze, přičemž každou charakterizují specifické mechanismy. První je fáze závislá na fosforylaci, která nastává v důsledku rapidních změn ve vlastnostech glutamátových a iontových kanálů. Následuje dlouhotrvající fáze závislá na transkripci, ve které dochází k produkci řady proteinů zodpovědných za její udržování (Latremoliere and Woolf 2009). Na synapsi neuronů druhého řádu v dorzálním rohu míchy může docházet ke změnám v propustnosti pro Ca^{2+} . Vzrůst intracelulární koncentrace Ca^{2+} nad určitou hladinu je klíčový pro iniciaci centrální senitizace. Jedná se zejména o tok vápenatých iontů přes NMDAR v počáteční fázi, ale také přes AMPAR, napěťově ovládané vápenaté kanály nebo uvolněním z intracelulárních zásob následkem aktivace metabotropních kanálů (Latremoliere and Woolf 2009).

Při rozvoji neuropatických bolestivých stavů následkem poranění nervu je zvýšení aktivity neuronů na úrovni míchy připisováno zvýšené efektivitě synaptických přenosů v dorzálním rohu. U řady modelů byla pozorována aktivace protein-kináz (PKA, PKC, p38 MAPK, Src, ERK a CaMKII), které mohou dále fosforylovat glutamátové receptory a tím zvyšovat frekvenci a amplitudu EPSC (Meacham et al. 2017). NMDA i AMPA receptory mohou být fosforylovány na několika zbytcích umístěných na jejich C-konci. Tyto posttranslační modifikace vedou ke změně aktivity receptorů i ke změnám v jejich umístění na membráně. Obdobně dochází k posttranslačním modifikacím i u dalších iontových kanálů a všechny tyto funkční změny se souhrnně manifestují jako centrální senitizace. (Latremoliere and Woolf 2009)

Snížení produkce GABA a glycinových receptorů nebo porucha inhibice na synapsích může také přispívat k centrální senitizaci (Woolf and Mannion 1999). Presynaptické GABA_A receptory mohou být inhibovány pomocí BDNF (brain derived neurotrophic factor), čímž dojde k redukci presynaptické

inhibice a spontánní aktivitě v neuronech laminy I. Zároveň se tyto neurony stávají citlivějšími vůči nociceptivním podnětům (Keller et al. 2007). Efekt disinhibice byl dále pozorován u radiálních neuronů (morfologická skupina excitačních interneuronů laminy II DH) nebo při redukcii presynaptických draselných kanálů (GIRK) (Meacham et al. 2017).

V rozvoji chronických bolestivých stavů dále hrají nezbytnou roli mikroglie, jejichž aktivace spouští uvolnění nociceptivních mediátorů (cytokiny, chemokiny, růstové faktory) v supraspinálních oblastech, čímž narušují rovnováhu mezi descendentní fascilitací a inhibicí (Ji, Berta and Nedergaard 2013).

5.4. Neuroinflamace

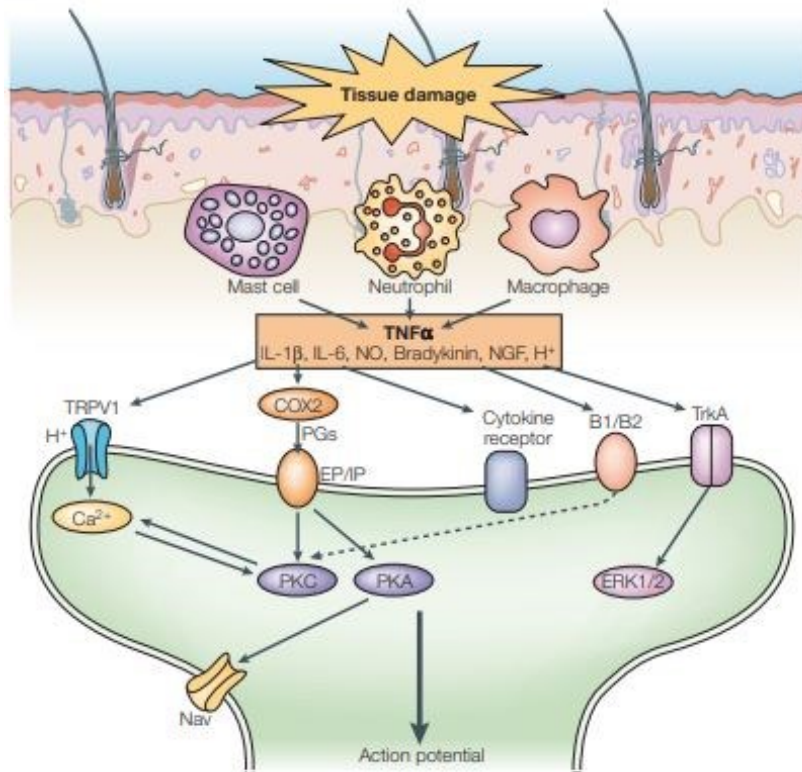
Následkem poranění tkání spouští organismus imunitní reakci, jejímž úkolem je ochrana před patogeny a podpora hojení. Dochází k aktivaci imunitních buněk a jejich migraci do místa zranění, kde jednak zajišťují imunitní ochranu, ale také senitizují periferní nociceptory k ochraně organismu před dalším poraněním. Buňky IS, gliové buňky a také neurony zahajují následkem poranění syntézu a uvolnění prozánětlivých mediátorů, a tvoří tak integrovanou síť koordinující imunitní odpověď a modulující excitabilitu signálních drah bolesti. (Ren and Dubner 2010)

Zánětlivá reakce má dvě hlavní fáze: první je **fáze pro-zánětlivá**, následuje **fáze hojení**, během které zánět ustupuje, aby se předešlo jeho z dlouhodobého hlediska negativním účinkům. V první fázi jsou odstraněny patogeny, zničené buňky a debris a je obnovena homeostáza (Ellis and Bennett 2013). Zánět je spuštěn aktivací receptorů jako jsou TLR (Toll-like receptors), které rozpoznávají a vážou se na patogeny a endogenní molekuly uvolněné z poškozené tkáně (např. Heat-shock proteiny). TLR jsou exprimovány v monocitech, makrofázích, dendritických buňkách, ale také v buňkách asociovaných s imunitním systémem, jako jsou např. keratinocyty. Vazba na TLR aktivuje transkripční faktory NF- κ B a následné uvolnění prozánětlivých cytokinů. Během několika minut od zranění jsou aktivovány rezidentní buňky IS, makrofágy a žírné buňky uvolňující různorodé spektrum mediátorů (Ren and Dubner 2010). Tyto mediátory imunitní odpovědi můžeme klasifikovat do sedmi skupin: vazoaktivní aminy (histamin, 5-HT), vazoaktivní peptidy (substance P, bradykinin), fragmenty komplementu (C3a, C5a), lipidy (prostaglandiny), cytokiny (IL-1 β , TNF- α , IL-6), chemokiny (CCL2) a proteolytické enzymy (cathepsin S) (Ellis and Bennett 2013).

Bylo identifikováno několik buněk imunitního systému a gliových buněk, které hrají roli v patogenezi zánětlivé a neuropatické bolesti. Jedná se o žírné buňky, makrofágy, neutrofilly a T-lymfocyty v PNS a mikroglie a astrocyty v CNS.

Žírné buňky se nacházejí zejména v pojivové tkáni a obsahují zrnité váčky (granuly) bohaté na histamin, bradykinin a další mediátory způsobující vasodilataci. Přestože jsou nejvíce známé díky své účasti v alergických reakcích, hrají také svou roli v nociceptivním přenosu. Žírné buňky se nacházejí v blízkosti primárních nociceptivních neuronů a přispívají k jejich senitizaci množstvím způsobů (Ren and Dubner 2010). Histamin, je schopen senitizovat viscerální nociceptory (Koda and Mizumura 2002)

a u pacientů s neuropatickou bolestí způsobuje namísto obvyklého svědění spontánní nárůst pálivé bolesti (Baron et al. 2001). Degranulace žírných buněk také přispívá k rychlému nástupu termální hyperalgesie prostřednictvím nervového růstového faktoru (Ren and Dubner 2010). Jak přesně jsou žírné buňky aktivovány následkem poranění nervu zůstává neobjasněno, ale mohlo by se jednat například o aktivaci pomocí zvýšené hladiny adenosinu nebo bradykininu (Moalem and Tracey 2006).



Obrázek 11 Zánětlivá bolest. Po poškození tkáně se aktivují žírné buňky, makrofágy a některé imunitní buňky přenášené krví včetně neutrofilů. Začínají se vyplavovat různé mediátory nervového, a hlavně imunitního systému, jako například tumor nekrotizující faktor- α ($TNF\alpha$), interleukin- 1β ($IL-1\beta$), interleukin-6 ($IL-6$), oxid dusnatý (NO), bradykinin, nervový růstový faktor (NGF) a protony), které poté uplatňují své prozánětlivé a pronociceptivní účinky přímým působením na nociceptory nebo nepřímo uvolňováním dalších mediátorů (zejména prostanoidy). Dochází k zapojení dalších prvků signálních kaskád jako jsou $COX2$, $B1/B2$, bradykininový receptor; EP/IP ; $ERK1/2$ dále také Nav kanály; PG ; PKA/PKC ; $TrkA$; $TRPV1$. Převzato z (Marchand, Perretti and McMahon 2005).

Neutrofil jsou granulocyty spadající do buněčné složky přirozené imunity. Jejich granula můžeme dělit do čtyř kategorií – primární, sekundární a terciární granula a sekreční vakuoly, přičemž primární neboli azurofilní granula jsou hlavním zdrojem nejtoxičtějších mediátorů, jakými jsou elastáza, myeloperoxidáza, kathepsiny a defenziny (Marchand et al. 2005). Neutrofilové migrují do místa zánětu pomocí gradientu chemoatraktantů uvolněných z bakterií nebo mrtvých buněk. V přítomnosti zdravých nervů nebyly neutrofilové pozorovány, ale nacházejí se ve značném množství v místě poranění periferních nervů (Zuo et al. 2003). Mohou přispívat zánětlivé hyperalgesii uvolněním lipoxygenázy či cytokinů

(TNF) (Moalem and Tracey 2006, Witko-Sarsat et al. 2000). Nervová zakončení ovlivňují neutrofilny prostřednictvím neurogenního zánětu, během kterého generují PAF impulsy vedoucí k uvolnění vasoaktivních neuropeptidů SP a CGRP, které mohou mimo jiné způsobit degranulaci žírných buněk (Ren and Dubner 2010). Je ale třeba také zmínit, že neutrofilny mají i protizánětlivou a antinociceptivní roli. Značnou část cytoplazmatických proteinů neutrofilů tvoří Ca^{2+} vazebný protein MRP-14, který *in vitro* deaktivuje makrofágy a potlačuje zánětlivou bolest u myši. Dále mohou neutrofilny syntetizovat opioidní peptidy, které se vážou na opioidní receptory periferních nervů, podporující anti-nociceptivní účinek (Moalem and Tracey 2006, Stein, Schäfer and Machelska 2003).

Makrofágy jsou profesionální fagocyty odvozené od monocytů. Makrofágy přítomné v poškozené tkáni začínají fagocytovat téměř okamžitě po poranění, migrující monocyty jsou poté přitahovány do místa zranění během několika hodin, čímž zde zvyšují množství makrofágů v průběhu několika dalších dní a jejich navýšení koreluje s rozvojem mechanické alodynii (Ren and Dubner 2010). Aktivované makrofágy přispívají senitizaci nociceptorů uvolněním několika mediátorů. Jedním z nich je macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), jehož exprese, stejně tak jako exprese jeho receptorů CCR1 a CCR5 je navýšena v makrofázích a Schwannových buňkách u modelů částečné ligace sedacího nervu (Kiguchi et al. 2010). Makrofágy dále uvolňují mediátory jako jsou ROS (reactive oxygen species), cytokiny a interleukiny IL-1 β a IL-6, které také s největší pravděpodobností přispívají k rozvoji neuropatické bolesti (Moalem and Tracey 2006).

T-lymfocyty jsou bílé krvinky, které během prenatálního vývoje cestují z kostní dřeně do brzlíku, kde dozrávají a můžeme je dělit na CD4⁺ (helper, T_H) a CD8⁺ (cytotoxické, T_{CYT}). T_H-buňky dále dělíme na T_{H1} a T_{H2}, přičemž T_{H1} buňky myši produkují interleukin 2 (IL-2), interferon γ (IFN- γ) a lymphotoxin. Th2 buňky produkují IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 a IL-13. U lidských T_H-buněk je situace obdobná (Mosmann and Sad 1996). T_{H1}-buňky přispívají ke vzniku neuropatické bolesti uvolňováním zánětlivých cytokinů, zatímco T_{H2}-buňky ji potlačují uvolněním protizánětlivých cytokinů (IL-4, IL-10, IL-13) (Dubner and Ren 1999). Přestože se bílé krvinky díky přítomnosti BBB typicky nenachází v CNS, bylo pozorováno zvýšené množství lymfocytů v DRG i míše po lézi periferního nervu až tři měsíce po transekcii sedacího nervu nebo míchy. Jelikož mají T-lymfocyty schopnost uvolňovat excitační cytokiny, mohou generovat ektopickou aktivitu v senzických neuronech po zranění, a tím pádem se mohou podílet na vzniku chronické neuropatické bolesti (Hu and McLachlan 2002).

6. Chemokiny a jejich role v neuropatická bolest

V řadě nedávných výzkumů se ukazuje se, že pro vznik neuropatické bolesti je zásadní zvýšená hladina cytokinů a chemokinů ovlivňující nociceptivní signalizaci na míšní úrovni. Bylo prokázáno, že některé chemokiny mohou regulovat synaptický přenos na míšní úrovni, ale přesné modulační mechanismy dosud známy nejsou.

6.1. Chemokiny v míše

Chemokiny jsou malé, silně zásadité proteiny (10-20 kDa), které byly původně popsány jako cytokiny indukující chemotaxi, avšak dnes už je zřejmé, že v imunitním systému plní celou řadu funkcí (Biber and Boddeke 2014). U člověka se jedná o skupinu asi 50 příbuzných molekul s blízkými homology u dalších savců (Charo and Ransohoff 2006). Přestože má většina chemokinů podobné funkční vlastnosti, jsou klasifikovány výhradně na základě strukturních kritérií. Chemokiny jsou tvořeny jedním polypeptidovým řetězcem o délce 70-100 aminokyselin. Sdílejí 20-95% sekvenční identity, včetně konzervovaných N-koncových cysteinových zbytků, které byly také použity k jejich klasifikaci. Podle počtu cysteinů a jejich uspořádání byly identifikovány čtyři rodiny chemokinů: CC, CXC, C a CX3C (Bonecchi et al. 2009).

Chemokiny a jejich receptory jsou široce exprimovány buňkami imunitního a nervového systému. Změny exprese chemokinů a jejich receptorů v nociceptivním systému byla prokázána u řady poranění nebo onemocnění. Ukázalo se, že za těchto okolností dokáží chemokiny velmi výrazně modulovat aktivitu neuronů, a to hned několika regulačními cestami, včetně zvýšení uvolňování neurotransmiterů prostřednictvím mechanismů závislých na vstupu Ca^{2+} do buňky a senitizace TRP receptorů, které tak přispívají k zvýšené excitabilitě primárních i sekundárních neuronů v míše. Chemokiny mají také schopnost ovlivňovat neuronální excitabilitu tím, že samy fungují jako excitační neurotransmitery, a to jak v PNS, tak CNS. A stejně jako neurotransmitery se i chemokiny nacházejí v synaptických váčcích. Takto uvolněné chemokiny pak mohou působit na další neurony a gliové nebo imunitní buňky nesoucí chemokinové receptory (Abbadie 2005, Bajetto et al. 2002).

Protože up-regulace chemokinů a jejich receptorů může být jedním z mechanismů, přispívajících k rozvoji a udržování bolesti, mohou tyto molekuly představovat nové cíle pro terapeutický zásah.

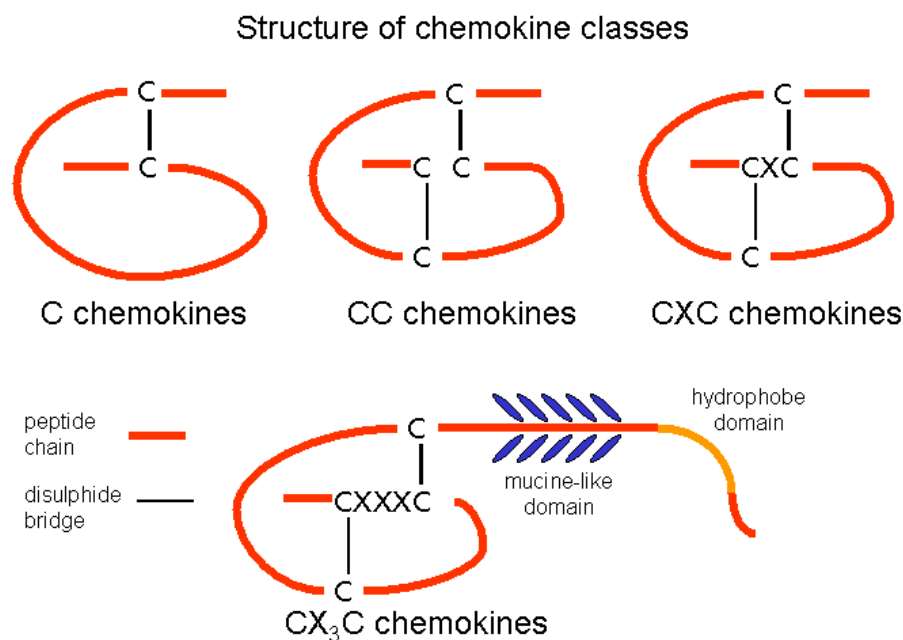
6.2. Struktura chemokinů

Největší skupinu tvoří **CC chemokiny**, kterou tvoří 28 členů s širokým spektrem působnosti (Gao and Ji 2010). Mají čtyři N-koncové cysteiny z nichž první dva mezi sebou nemají vymezenou žádnou další AK. Chemokiny této skupiny jsou schopny přitahovat monocyty, bazofily, eozinofily a T-lymfocyty, ale mají malý nebo žádný vliv na neutrofile (Bajetto et al. 2002).

Druhou největší skupinu tvoří **CXC chemokiny** (Obrázek 12), které mají mezi prvními dvěma kanonickými cysteiny vmezeřenou jednu AK a dále se dělí podle přítomnosti tripeptidového motivu Glu-Leu-Arg (E-L-R) na N-konci na ELR pozitivní a negativní (Gao and Ji 2010). CXC-ELR-negativní chemokiny přitahují lymfocyty a monocyty, ale mají slabý účinek na neutrofile, zatímco CXC-ELR-pozitivní působí výhradně na neutrofile (Bajetto et al. 2002). Další skupinou jsou **C chemokiny**, které mají pouze 2 konzervované N-koncové cysteiny namísto čtyř. Tvoří ji dva zástupci, XCL1 (lymfotaktin-a) a XCL2 (lymfotaktin-b) (Bajetto et al. 2002), kteří působí na lymfocyty, ale nikoliv na monocyty či neutrofile (Gao and Ji 2010).

Poslední skupinou je **CX₃C**, která má pouze jednoho zástupce - CX₃CL1, neboli fraktalkin, jehož první dva cysteiny jsou odděleny třemi AK. Fraktalkin existuje v rozpustné formě i vázaný na membránu, kde funguje jako chemoatraktant T- a NK buněk (Gao and Ji 2010). Na chemokinovou doménu fraktalkinu je připojena mucinová stopka, která ho váže k membráně cévních buněk přes transmembránovou doménu. Tím může být zajištěna efektivní interakce mezi fraktalkinem a leukocyty, které exprimují jeho receptor CX₃CR (Haskell, Cleary and Charo 1999). CX₃CL1 může být od membrány odštěpen pomocí TNF- α -converting enzyme a dále fungovat v rozpustné formě (Charo and Ransohoff 2006).

Většina chemokinů je produkována množstvím různých typů buněk (mikroglie, astrocyty, neurony, endoteliální buňky), ale existují výjimky – fraktalkin, který je produkován zejména neurony a CXCL12, který je produkován astrocyty (Gao and Ji 2010).



Obrázek 12. Struktura různých typů Chemokinů. Schematické znázornění vztahů mezi konzervovanými cysteinovými zbytky (C) spolu s disulfidovými můstky uvnitř řetězce. Jsou znázorněny C-, CC-, CXC- a CX₃C- (fraktalkin) třídy chemokiny. převzato z: Kohidai, Laszlo <https://cs.wikipedia.org/wiki/Chemokin#/media/Soubor:ChtxChemokineStruct.png>

Zdroje, cíle i způsob regulace chemokinů je rozličný, zřejmě proto, aby poskytovali dostatečnou flexibilitu a funkční specifitu imunitnímu systému. Některé chemokiny jsou produkovány konstitutivně, jiné musí být indukovány (Bonecchi et al. 2009). Během zánětlivé reakce produkují různé tkáně různé spektrum chemokinů. Těmto chemokinům se pak říká „zánětlivé chemokiny“, které následně lákají granulocyty, monocyty, nezralé dendritické buňky a aktivované T-buňky do místa zánětu (Cyster 1999). Inducibilní chemokiny jsou regulovány na transkripční úrovni, ale některé mohou být uloženy pro okamžité použití. Dále se liší v závislosti na tom, co způsobilo jejich upregulaci. Může se jednat o prozánětlivé cytokiny, jako např. TNF- α a IL-1, nebo přímo IFN- γ . Exprese většiny cytokinů je, až na jednu výjimku, down-regulovaná protizánětlivým cytokinem IL-10. CCL16/HCC4 je pomocí IL-10 upregulován a je možné, že slouží jako „off“ signál zánětlivé reakce (Bonecchi et al. 2009).

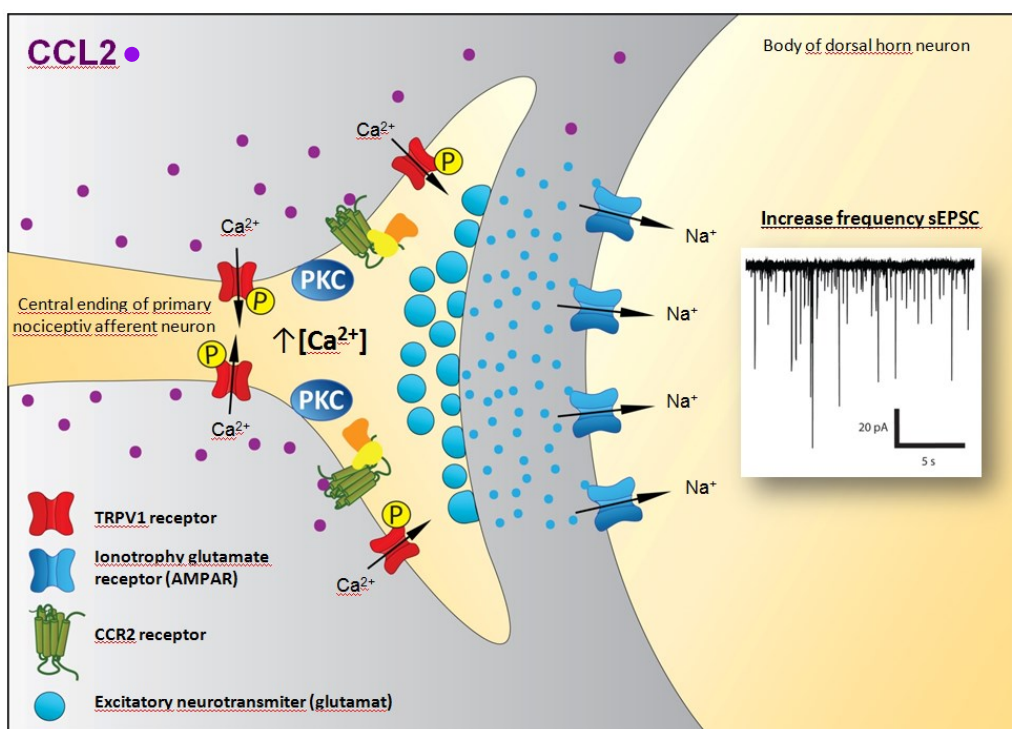
Chemokiny působí na buňky aktivací receptorů spřažených s G-proteiny. (Charo and Ransohoff 2006). Na jeden receptor se může vázat několik chemokinů a zároveň téměř každý chemokin je schopen vazby na několik různých receptorů, ale téměř vždy jsou tyto interakce omezeny na jednu rodinu chemokinů. Názvosloví chemokinových receptorů je proto založeno na rodině, do které patří jejich ligandy. Existují však i výlučné dvojice ligand-receptor – knock-out studie potvrdily CXCL12–CXCR4 a CX3CL1 (fraktalkin)–CX3CR1 (Bajetto et al. 2002).

Chemokiny jsou důležité signální molekuly v normálním i patologickém stavu, kontrolující mnoho aspektů IS (Biber and Boddeke 2014). Jsou uvolňovány lokálně v místech zánětu a jsou nezbytné pro zánětlivou odpověď, zejména chemotaxe leukocytů do zasaženého místa. Přestože se dříve výzkum chemokinů zabýval zejména jejich expresí v gliových buňkách mozku, bylo v posledních letech popsáno několik chemokinů (CCL2, CCL21, CXCL10, CXCL12 a CX3CL1) exprimovaných v neuronech, zejména v podmínkách nervového zranění a stresu. Funkce chemokinů jako signálních molekul mikroglíí je významná pro neuropatickou bolest, kde se uplatňují minimálně tři chemokiny (CX3CL1, CCL2 a CCL21), každý pomocí jiných mechanismů (Biber and Boddeke 2014). Další způsob, jakým mohou chemokiny podporovat nociceptivní přenos, je jejich schopnost indukovat migraci nejen buněk IS, ale i astrocytů a proliferaci mikroglíí (Abbadie 2005). Byla popsána řada chemokinů, které se uplatňují v neuropatické bolesti, v této práci se ale dále budu věnovat pouze chemokinu CCL2/MCP-1 a jeho receptoru CCR2.

6.3. CCL2 v neuropatické bolesti

CCL2, také nazývaný MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) patří mezi nejlépe charakterizované chemokiny CC rodiny a je potentním agonistou monocytů, dendritických buněk, T-buněk a basofilů (Charo and Ransohoff 2006). Přestože CCL2 rozpoznává receptory CCR1, CCR2 i CCR4, váže se preferenčně na CCR2. Lidský CCL2 je 76 AA dlouhý protein s N-koncovou kyselinou pyroglutamovou, jehož gen leží v klastru spolu s dalšími CC chemokiny na dlouhé nožičce 17. chromosomu (Gu, Tseng and Rollins 1999).

CCL2 hraje nezanedbatelnou roli ve vývoji neuropatické bolesti, což bylo demonstrováno na řadě modelů za posledních několik let (Gao et al. 2009, Abbadie et al. 2009, Spicarova et al. 2014). Je exprimován v primárních senzoryckých vláknech DRG a po poranění nervu dochází ke zvýšení jeho exprese (Jung et al. 2008, Gao et al. 2009). Dosud byly navrženy dva možné mechanismy, jakými může CCL2 způsobovat zvýšenou citlivost k bolestivým podnětům: CCL2 je uvolněn z malých a středně velkých senzoryckých neuronů v DRG (Abbadie et al. 2009), kde stimuluje okolní senzorycké neurony, které se stávají hyperaktivními. Druhý způsob je uvolnění CCL2 z centrálních zakončení DRG neuronů v míše, kde dále aktivuje mikroglie (Gao et al. 2009), které mohou přispívat ke vzniku hyperalgesie (Bradesi 2010).



Obrázek 13. Účinek CCL2 na synaptický přenos může být částečně zprostředkován spinálními receptory TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1). Převzato Adámek 2014 <https://www.fgu.cas.cz/en/articles/217-the-role-of-spinal-trpv1-receptors-in-ccl2-induced-hyperalgesia>

CCL2 však není produkován jen v DRG. Několik studií ukázalo, že aktivované astrocyty *in vitro* exprimují CCL2. Dále byl nalezen v astrocytech mozku po mechanickém zranění, fokální mozkové ischemii, nebo po demyelinizačních lézích. K upregulaci CCL2 došlo i u astrocytů stimulovaných v kultuře pomocí TNF- α a u astrocytů v míše po spinální ligaci, přičemž u obou byla potřeba c-jun-N-terminalní kináza (JNK). Ligace míchy u pokusných zvířat také vyvolala mechanickou alodynii a termální hyperalgesii, přičemž podání CCL2 neutralizující protilátky bolestivé projevy zmírnilo (Gao et al. 2009). Pomocí imunohistochemických metod bylo ukázáno, že CCL2 je

konstitutivně tvořen PAF v dorzálním rohu míchy a je exprimován společně s SP, CGRP a kapsaicinovým receptorem VR1. Draslík nebo kapsaicin mohou způsobit uvolnění CCL2 závislé na Ca^{2+} (Dansereau et al. 2008). Intratekální podání CCL2 zdravým krysám dále vyvolává termální hyperalgesii i mechanickou alodynii (Dansereau et al. 2008, Gao et al. 2009, Spicarova et al. 2014), ale těmto pronociceptivním účinkům lze zabránit pomocí selektivního agonisty CCL2 (Dansereau et al. 2008).

Stejně jako CCL2 je i jeho receptor CCR2 upregulován v DRG neuronech a mikroglíích míchy v modelech neuropatické bolesti. Lokalizace buněk produkujících CCR2 částečně odpovídá lokalizaci buněk produkujících CCL2, což naznačuje jistou aktivní komunikaci CCL2 a jeho receptoru, která může být jedním z možných mechanismů vzniku chronické bolesti. Dále také podání léků blokujících CCR2 může inhibovat již vzniklou hypersenzitivitu vůči bolesti. (Jung et al. 2009). Jak přesně funguje signalizace mezi CCL2-CCR2 při vzniku bolesti není zatím známo, ale výsledky (Jung et al. 2009) ukázaly, že aktivace CCR2 na periferních zakončeních stačí ke vzniku chronické bolesti a naznačuje, že by antagonisté CCR2 působící na periférii mohli zmírnit bolest inhibicí těchto mechanismů.

Význam CCR2 v nociceptivním přenosu také dokazují CCR2-knockout modely. U modelu neuropatické bolesti došlo k úplnému potlačení vzniku mechanické alodynii a v modelu zánětlivé bolesti k 70% redukcii bolestivé odpovědi u CCR2-knockout myší, avšak pouze k mírnému snížení (20-30 %) mechanické alodynii po intraplantárním podání CFA (Abbadie et al. 2003).

7. Závěr

Neuropatická bolest se nejčastěji objevuje při poškození nervové tkáně, ale doprovází také řadu závažných onemocnění a je dokonce jedním z nežádoucích vedlejších účinků některých cytostatických léčiv. V současné době je neuropatická bolest jen velmi špatně zvládnutelná a představuje významný klinický problém, na nějž většina dostupných analgetik nemá uspokojivý efekt. Přesné informace o procesech, které se podílejí na vývoji a udržování neuropatické bolesti však stále schází. Proto je pro vývoj nových účinných léčebných metod neuropatické bolesti velmi důležité pokračovat ve výzkumu a detailně odhalit mechanismy jejího vzniku.

Cílem této bakalářské práce bylo podat souhrn základních informací o nocicepci a jejím přenosu, se zaměřením na stavy neuroinflamace a neuropatické bolesti. Výzkumy ukázaly, že zánětlivé procesy jsou rozhodující pro vývoj chronické bolesti a pro změny v aktivitě nociceptivních neuronů, které ji doprovázejí. Rozvoj neuropatické bolesti zahrnuje vzájemné signalizační interakce mezi neurony a gliovými buňkami centrálního i periferního nervového systému.

V posledních letech došlo k významnému nárůstu výzkumu právě v této oblasti molekulárních mechanismů detekce, transdukce, modulace a zpracovávání nociceptivní informace a vlivu chemokinů na tyto procesy. Ukazuje se, že chemokiny hrají jednu z klíčových rolí při koordinaci nociceptivních událostí a slouží k regulaci zánětlivých odpovědí. Důležité je, že chemokiny v neuronech DRG zřejmě působí jako up-regulovatelné neurotransmitery s excitačními účinky na míšní neurony. Bylo prokázáno, že antagonisté receptorů, jako CCR2 a CXCR4, mírní přecitlivělost k perzistujícím bolestivým podnětům na zvířecích modelech, což jasně ukazuje na význam chemokinové signalizace za patologických bolestivých stavů.

Přestože je bolest komplexní jev zahrnující aktivaci různých částí celého nervového systému může právě tento nárůst informací představovat naději v účinné léčbě neuropatické bolesti a vývoji nových, vysoce selektivních a efektivních analgetik bez vedlejších účinků, které bude možné využít k léčbě pacientů s chronickými bolestivými stavy.

8. Seznam použité literatury

- Abbadie, C. (2005) Chemokines, chemokine receptors and pain. *Trends Immunol*, 26, 529-34.
- Abbadie, C., S. Bhangoo, Y. De Koninck, M. Malcangio, S. Melik-Parsadaniantz & F. A. White (2009) Chemokines and pain mechanisms. *Brain Res Rev*, 60, 125-34.
- Abbadie, C., J. A. Lindia, A. M. Cumiskey, L. B. Peterson, J. S. Mudgett, E. K. Bayne, J. A. DeMartino, D. E. MacIntyre & M. J. Forrest (2003) Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 7947-52.
- Apkarian & Ayrapetian. 1997. *Pain Mechanisms and Management*.*
- Apkarian, A. V. & T. Shi (1994) Squirrel monkey lateral thalamus. I. Somatic nociceptive neurons and their relation to spinothalamic terminals. *J Neurosci*, 14, 6779-95.
- Bajetto, A., R. Bonavia, S. Barbero & G. Schettini (2002) Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. *J Neurochem*, 82, 1311-29.*
- Baron, R., A. Binder & G. Wasner (2010) Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol*, 9, 807-19.
- Baron, R., K. Schwarz, A. Kleinert, J. Schattschneider & G. Wasner (2001) Histamine-induced itch converts into pain in neuropathic hyperalgesia. *Neuroreport*, 12, 3475-8.
- Basbaum, A. I., D. M. Bautista, G. Scherrer & D. Julius (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139, 267-84.*
- Baumann, N. & D. Pham-Dinh (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev*, 81, 871-927.
- Bentley, G. N. & J. P. Gent (1995) Neurokinin actions on substantia gelatinosa neurones in an adult longitudinal spinal cord preparation. *Brain Res*, 673, 101-11.
- Bessou, P. & E. R. Perl (1969) Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J Neurophysiol*, 32, 1025-43.
- Bettler, B., K. Kaupmann, J. Mosbacher & M. Gassmann (2004) Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev*, 84, 835-67.
- Bettler, B. & C. Mülle (1995) Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*, 34, 123-39.*
- Biber, K. & E. Boddeke (2014) Neuronal CC chemokines: the distinct roles of CCL21 and CCL2 in neuropathic pain. *Front Cell Neurosci*, 8, 210.
- Bonecchi, R., E. Galliera, E. M. Borroni, M. M. Corsi, M. Locati & A. Mantovani (2009) Chemokines and chemokine receptors: an overview. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14, 540-51.*
- Bradesi, S. (2010) Role of spinal cord glia in the central processing of peripheral pain perception. *Neurogastroenterol Motil*, 22, 499-511.
- Cai, Z., M. D. Hussain & L. J. Yan (2014) Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci*, 124, 307-21.
- Cavanaugh, D. J., A. T. Chesler, J. M. Bráz, N. M. Shah, D. Julius & A. I. Basbaum (2011) Restriction of transient receptor potential vanilloid-1 to the peptidergic subset of primary afferent neurons follows its developmental downregulation in nonpeptidergic neurons. *J Neurosci*, 31, 10119-27.
- Cervero, F. & J. M. Laird (1999) Visceral pain. *Lancet*, 353, 2145-8.
- Charo, I. F. & R. M. Ransohoff (2006) The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*, 354, 610-21.*
- Cioffi, C. L. (2018) Modulation of Glycine-Mediated Spinal Neurotransmission for the Treatment of Chronic Pain. *J Med Chem*, 61, 2652-2679.
- Coggeshall, R. E. & S. M. Carlton (1997) Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. *Brain Res Brain Res Rev*, 24, 28-66.
- Colleoni, M. & P. Sacerdote (2010) Murine models of human neuropathic pain. *Biochim Biophys Acta*, 1802, 924-33.

- Craig, A. D., M. C. Bushnell, E. T. Zhang & A. Blomqvist (1994) A thalamic nucleus specific for pain and temperature sensation. *Nature*, 372, 770-3.
- Curtis, D. R., A. W. Duggan, D. Felix & G. A. Johnston (1971) Bicuculline, an antagonist of GABA and synaptic inhibition in the spinal cord of the cat. *Brain Res*, 32, 69-96.
- Cyster, J. G. (1999) Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science*, 286, 2098-102.
- Dansereau, M. A., R. D. Gosselin, M. Pohl, B. Pommier, P. Mechighel, A. Mauborgne, W. Rostene, P. Kitabgi, N. Beaudet, P. Sarret & S. Melik-Parsadaniantz (2008) Spinal CCL2 pronociceptive action is no longer effective in CCR2 receptor antagonist-treated rats. *J Neurochem*, 106, 757-69.
- Dray, A. (2008) Neuropathic pain: emerging treatments. *Br J Anaesth*, 101, 48-58.*
- Du, Q., Q. Liao, C. Chen, X. Yang, R. Xie & J. Xu (2019) The Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Common Diseases of the Digestive Tract and the Cardiovascular and Respiratory System. *Front Physiol*, 10, 1064.
- Dubner, R. & K. Ren (1999) Endogenous mechanisms of sensory modulation. *Pain*, Suppl 6, S45-53.*
- Ellis, A. & D. L. Bennett (2013) Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *Br J Anaesth*, 111, 26-37.
- Ferraguti, F. & R. Shigemoto (2006) Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res*, 326, 483-504.
- Finnerup, N. B., S. H. Sindrup & T. S. Jensen (2010) The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain*, 150, 573-581.
- Gao, Y. J. & R. R. Ji (2010) Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain. *Pharmacol Ther*, 126, 56-68.
- Gao, Y. J., L. Zhang, O. A. Samad, M. R. Suter, K. Yasuhiko, Z. Z. Xu, J. Y. Park, A. L. Lind, Q. Ma & R. R. Ji (2009) JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. *J Neurosci*, 29, 4096-108.
- Garrison, C. J., P. M. Dougherty, K. C. Kajander & S. M. Carlton (1991) Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res*, 565, 1-7.
- Gosselin, R. D., M. R. Suter, R. R. Ji & I. Decosterd (2010) Glial cells and chronic pain. *Neuroscientist*, 16, 519-31.*
- Grace, P. M., M. R. Hutchinson, S. F. Maier & L. R. Watkins (2014) Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nat Rev Immunol*, 14, 217-31.
- Gu, L., S. C. Tseng & B. J. Rollins (1999) Monocyte chemoattractant protein-1. *Chem Immunol*, 72, 7-29.
- Hanani, M. (2005) Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res Brain Res Rev*, 48, 457-76.
- Hansen, R. R. & M. Malcangio (2013) Astrocytes--multitaskers in chronic pain. *Eur J Pharmacol*, 716, 120-8.*
- Haskell, C. A., M. D. Cleary & I. F. Charo (1999) Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation. *J Biol Chem*, 274, 10053-8.
- Heinricher, M. M., I. Tavares, J. L. Leith & B. M. Lumb (2009) Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev*, 60, 214-25.
- Hu, P. & E. M. McLachlan (2002) Macrophage and lymphocyte invasion of dorsal root ganglia after peripheral nerve lesions in the rat. *Neuroscience*, 112, 23-38.
- Hwang, I. K., K. Y. Yoo, D. S. Kim, W. S. Eum, J. K. Park, J. Park, O. S. Kwon, T. C. Kang, S. Y. Choi & M. H. Won (2004) Changes of pyridoxal kinase expression and activity in the gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neuroscience*, 128, 511-8.
- Jensen, T. S., R. Baron, M. Haanpää, E. Kalso, J. D. Loeser, A. S. C. Rice & R. D. Treede (2011) A new definition of neuropathic pain. *Pain*, 152, 2204-2205.*
- Ji, R. R., T. Berta & M. Nedergaard (2013) Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain*, 154 Suppl 1, S10-S28.*

- Ji, R. R., T. Kohno, K. A. Moore & C. J. Woolf (2003) Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci*, 26, 696-705.
- Julius, D. & A. I. Basbaum (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413, 203-10.*
- Jung, H., S. Bhangoo, G. Banisadr, C. Freitag, D. Ren, F. A. White & R. J. Miller (2009) Visualization of chemokine receptor activation in transgenic mice reveals peripheral activation of CCR2 receptors in states of neuropathic pain. *J Neurosci*, 29, 8051-62.
- Jung, H., P. T. Toth, F. A. White & R. J. Miller (2008) Monocyte chemoattractant protein-1 functions as a neuromodulator in dorsal root ganglia neurons. *J Neurochem*, 104, 254-63.
- Keller, A. F., S. Beggs, M. W. Salter & Y. De Koninck (2007) Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Mol Pain*, 3, 27.
- Khawaja, A. M. & D. F. Rogers (1996) Tachykinins: receptor to effector. *Int J Biochem Cell Biol*, 28, 721-38.*
- Kiguchi, N., T. Maeda, Y. Kobayashi, Y. Fukazawa & S. Kishioka (2010) Macrophage inflammatory protein-1alpha mediates the development of neuropathic pain following peripheral nerve injury through interleukin-1beta up-regulation. *Pain*, 149, 305-315.
- Kilo, S., M. Schmelz, M. Koltzenburg & H. O. Handwerker (1994) Different patterns of hyperalgesia induced by experimental inflammation in human skin. *Brain*, 117 (Pt 2), 385-96.
- Koda, H. & K. Mizumura (2002) Sensitization to mechanical stimulation by inflammatory mediators and by mild burn in canine visceral nociceptors in vitro. *J Neurophysiol*, 87, 2043-51.
- Krames, E. S. (2014) The role of the dorsal root ganglion in the development of neuropathic pain. *Pain Med*, 15, 1669-85.
- Latremoliere, A. & C. J. Woolf (2009) Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain*, 10, 895-926.*
- Li, P., T. J. Wilding, S. J. Kim, A. A. Calejesan, J. E. Huettner & M. Zhuo (1999) Kainate-receptor-mediated sensory synaptic transmission in mammalian spinal cord. *Nature*, 397, 161-4.
- Marchand, F., M. Perretti & S. B. McMahon (2005) Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*, 6, 521-32.*
- Meacham, K., A. Shepherd, D. P. Mohapatra & S. Haroutounian (2017) Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. *Curr Pain Headache Rep*, 21, 28.
- Millan, M. J. (1999) The induction of pain: An integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57, 1-164.*
- (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, 66, 355-474.
- Moalem, G. & D. J. Tracey (2006) Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev*, 51, 240-64.*
- Mohapatra, D. P. & C. Nau (2003) Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J Biol Chem*, 278, 50080-90.
- Mosmann, T. R. & S. Sad (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*, 17, 138-46.
- Ohara, P. T., J. P. Vit, A. Bhargava, M. Romero, C. Sundberg, A. C. Charles & L. Jasmin (2009) Gliopathic pain: when satellite glial cells go bad. *Neuroscientist*, 15, 450-63.*
- Portenoy, R. K. (1996) Opioid therapy for chronic nonmalignant pain: a review of the critical issues. *J Pain Symptom Manage*, 11, 203-17.*
- Rees, J. M. (1987) Endogenous opioids. *Baillieres Clin Rheumatol*, 1, 27-56.
- Ren, K. & R. Dubner (2010) Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med*, 16, 1267-76.*
- Scholz, J. & C. J. Woolf (2002) Can we conquer pain? *Nat Neurosci*, 5 Suppl, 1062-7.*
- Smith, B. H. & N. Torrance (2012) Epidemiology of neuropathic pain and its impact on quality of life. *Curr Pain Headache Rep*, 16, 191-8.
- Spicarova, D., P. Adamek, N. Kalynovska, P. Mrozkova & J. Palecek (2014) TRPV1 receptor inhibition decreases CCL2-induced hyperalgesia. *Neuropharmacology*, 81, 75-84.

- Steeds (2016) The anatomy and physiology of pain. *BASIC SCIENCE* Published: January 28, 2016 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2015.11.005>, VOLUME 34, ISSUE 2, P55-59, FEBRUARY 01, 2016.*
- Stein, C., M. Schäfer & H. Machelska (2003) Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med*, 9, 1003-8.
- Todd, A. J. (2010) Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci*, 11, 823-36.
- Tracey, I. & P. W. Mantyh (2007) The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron*, 55, 377-91.
- Treede, R. D. (2018) The International Association for the Study of Pain definition of pain: as valid in 2018 as in 1979, but in need of regularly updated footnotes. *Pain Rep*, 3, e643.
- Tsantoulas, C. & S. B. McMahon (2014) Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends Neurosci*, 37, 146-58.
- Ueda, H. (2008) Peripheral mechanisms of neuropathic pain - involvement of lysophosphatidic acid receptor-mediated demyelination. *Mol Pain*, 4, 11.
- Venkatachalam, K. & C. Montell (2007) TRP channels. *Annu Rev Biochem*, 76, 387-417.*
- Willis, W. D. (1991) Role of the forebrain in nociception. *Prog Brain Res*, 87, 1-12.
- Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre & L. Halbwachs-Mecarelli (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest*, 80, 617-53.
- Woolf, C. J. (2004) Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. *Life Sci*, 74, 2605-10.*
- (2010) What is this thing called pain? *J Clin Invest*, 120, 3742-4.*
- Woolf, C. J. & Q. Ma (2007) Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron*, 55, 353-64.*
- Woolf, C. J. & R. J. Mannion (1999) Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet*, 353, 1959-64.
- Zeilhofer, H. U., B. Studler, D. Arabadzisz, C. Schweizer, S. Ahmadi, B. Layh, M. R. Bösl & J. M. Fritschy (2005) Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice. *J Comp Neurol*, 482, 123-41.
- Zimmermann, M. (2001) Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*, 429, 23-37.
- Zuo, Y., N. M. Perkins, D. J. Tracey & C. L. Geczy (2003) Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells. *Pain*, 105, 467-479.

* značí sekundární citace

Ostatní zdroje:

- Adámek, 2014: <https://www.fgu.cas.cz/en/articles/217-the-role-of-spinal-trpv1-receptors-in-ccl2-induced-hyperalgesia>
- Čihák. 2004. Anatomie 3. Praha: Grada Publishing.
- Kandel, E. R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. 2013. *Principles of Neural Science, Fifth Edition*
- Obrázek 1: <http://knowingneurons.com>
- Obrázek 4: Vlastní tvorba Adámek, 2014
- Obrázek 12: Vlastní tvorba Kohidai, Laszlo <https://cs.wikipedia.org/wiki/Chemokin#/media/Soubor:ChtxChemokineStruct.png>
- Vacanti, C., S. Segal, P. Sikka & U. R. 2011. Essential clinical anesthesia. Cambridge University Press.

