

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

**Charles University
Faculty of Science**



Autoreferát disertační práce
Summary of the doctoral thesis

Úloha modulace nociceptivního synaptického přenosu

The role of nociceptive synaptic transmission modulation

Mgr. Mário Heleš

Praha, 2022

Doktorské studijní programy v biomedicině

Doctoral study programmes in biomedicine

*Univerzita Karlova
a Akademie věd České republiky*

*Charles University
and Czech Academy of Sciences*

Program: Fyziologie živočichů
Study programme: Animal physiology

Předseda oborové rady/Committee chairman: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Školící pracoviště/Workplace: Oddělení výzkumu bolesti, Fyziologický ústav v.v.i.,
Akademie věd České republiky,

Autor/Author: Mgr. Mário Heleš

Školitel/Supervisor: MUDr. Jiří Paleček, CSc.

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

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

Abstrakt

Bolest je hlavním příznakem mnoha onemocnění a často se může stát hlavním negativním faktorem nízké kvality života pacienta. Komplexní problematiku léčby bolesti dále podtrhuje snížená účinnost konvenčních analgetik např. u neuropatické bolesti. Neuropatická bolest na rozdíl od akutní nociceptivní bolesti vzniká v důsledku poškození periferního nebo centrálního nervového systému a často přechází v syndrom chronické bolesti. Většina dnes dostupných analgetik poskytuje u chronické neuropatické bolesti pouze omezenou a neuspokojivou analgezii, která je často spojena se závažnými nežádoucími účinky.

Modulace nociceptivního přenosu v zadním rohu míchy (SCDH) je považována za klíčový mechanismus při vzniku a udržování zejména chronické bolesti. Hlavním cílem této disertační práce bylo studovat, jak modulační procesy synaptického přenosu v zadním rohu míšním ovlivňují analgezii navozenou opioidy. Práce byla zaměřena zejména na interakci mezi CCL2 (z angl. chemokine (C-C motif) ligand 2), TRPV1 (z angl. transient receptor potential vanilloid type 1) a μ -opioidním receptorem (MOR). Pro pochopení modulačních vlivů opioidní signalizace v SCDH jsme si položili následující otázky: (I.) Jak CCL2 moduluje účinky aktivace MOR na nociceptivní synaptický přenos v neuronech SCDH *in vitro* a *in vivo* během opioidy zprostředkované analgezie? (II.) Jsou účinky zprostředkované CCL2 závislé na aktivaci mikroglíí? (III.) Jaká je role receptorů TRPV1 při vzniku opioidy indukované hyperalgezie (OIH) a jak může aktivace TRPV1 endogenním agonistou N-oleoyldopaminem (OLDA) modulovat desenzitizaci MOR? Druhým cílem práce bylo studovat úlohu fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K) v rozvoji neuropatické bolesti vyvolané chemoterapií paclitaxelem (PAC).

Jako primární metoda pro zkoumání modulace nociceptivního přenosu v SCDH byla použita metoda terčíkového zámku (patch-clamp) snímání excitačních postsynaptických proudů (EPSCs) z nociceptivních neuronů zadního rohu v akutních míšních řezech. Elektrofyzilogická data byla doplněna behaviorálními experimenty a imunohistochemickou analýzou tkání.

Naše výsledky ukázaly, že aplikace MOR specifického agonisty [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkefalin (DAMGO) vede k silné inhibici excitačního nociceptivního přenosu a snížení citlivosti na tepelné podněty (analgezii). Dále jsme ukázali, že analgezie zprostředkovaná DAMGO je výrazně oslabena po aplikaci CCL2, a tento efekt je závislý na aktivaci mikroglíí. Dále jsme ukázali nutnost aktivace receptoru TRPV1 pro rozvoj opioidy navozené hyperalgezie (OIH), v našich experimentech sledované jako opožděná potenciace evokovaných EPSC v neuronech SCDH. Naše dosud nepublikované výsledky z experimentů zaměřených na interakci TRPV1-MOR naznačují, že aktivace TRPV1 endogenním agonistou může snížit jak DAMGO, tak CCL2 indukovanou desenzitizaci MOR. Výsledky dvou studií zaměřených na periferní neuropatii vyvolanou PAC (PIP) potvrzují významné zvýšení aktivity PI3K a známek neuroinflammace ve spinálních gangliích (DRG). Důležité je zejména zjištění, že lék schválený ke klinickému použití Duvelisib, specifický inhibitor PI3K, může snížením aktivity PI3K výrazně omezit infiltraci/proliferaci makrofágů v DRG.

Výsledky tohoto doktorského projektu odhalují nové potenciální cesty ve výzkumu léčby bolesti a zdůrazňují ústřední roli TRPV1, CCL2 a PI3K v modulaci nociceptivního přenosu. Další výzkum těchto základních mechanismů modulace nociceptivní signalizace by mohl přispět ke zlepšení analgetické léčby pacientů.

Klíčová slova: bolest, nocicepce, neuropatická bolest, CCL2, opioidy, TRPV1, paclitaxel, PI3K

Abstract

Pain represents a major symptom in a multitude of medical conditions and can often become the main negative factor in a patient's low quality of life. The complex issue of pain management is further underscored by the reduced efficacy of conventional analgesics in conditions such as neuropathic pain. Neuropathic pain, unlike acute nociceptive pain, originates from damage to the peripheral or central nervous system and often develops into chronic pain syndrome. Most analgesics available today provide only limited and unsatisfactory analgesia in chronic neuropathic pain and are often associated with severe adverse effects.

Modulation of nociceptive transmission in spinal cord dorsal horn (SCDH) stands out in recent research as a pivotal mechanism, especially in chronic pain development and maintenance. The major aim of this doctoral thesis was to investigate how pain-associated processes interfere with opioid-induced analgesia, with the main focus on the interaction between chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1), and μ -opioid receptor (MOR). To achieve a better insight into opioid signaling in SCDH we studied the following issues: (I.) How does CCL2 modulate MOR-mediated effects on nociceptive synaptic transmission in SCDH neurons and *in vivo* during opioid-mediated analgesia? (II.) Are CCL2-mediated effects dependent on microglia activation? (III.) What is the role of TRPV1 receptors in the development of opioid-induced hyperalgesia (OIH) and how can the activation of TRPV1 by endogenous agonist N-Oleoyldopamine (OLDA) modulate MOR desensitization? The second part of the thesis aimed to study the role of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) in the development of neuropathic pain induced by paclitaxel (PAC) chemotherapy.

Whole-cell patch-clamp recordings of excitatory postsynaptic currents (EPSCs) recorded from superficial dorsal horn neurons in acute spinal cord slices were used as a primary method to investigate nociceptive transmission. Electrophysiological data were supplemented by behavioral experiments and immunohistochemistry.

Our results demonstrate that the application of MOR-specific agonist [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin (DAMGO) exhibits potent inhibitory control of excitatory nociceptive transmission and robust hyposensitivity to thermal stimuli (thermal analgesia). We showed that DAMGO-mediated analgesia is severely attenuated after the application of CCL2 in a microglia-dependent manner. Furthermore, we showed that TRPV1 receptor activation is required for the OIH development, evident in our experiments as a delayed potentiation of electrically evoked EPSCs. Our unpublished data from experiments aimed at TRPV1-MOR interaction suggest that activation of TRPV1 can diminish both agonist- and CCL2-induced MOR desensitization. Results from two studies aimed at PAC-induced peripheral neuropathy (PIPNe) confirm a significant PAC-induced increase in PI3K activity and neuroinflammatory factors in dorsal root ganglia (DRG). Most importantly, these results demonstrate that clinically approved PI3K inhibitor Duvelisib can attenuate PI3K activity as well as macrophage infiltration/proliferation in DRGs.

Taken together, the results of this Ph.D. project reveal new potential avenues in pain management research by highlighting the central role of TRPV1, CCL2, and PI3K in the nociceptive transmission modulation. Further research of the underlying mechanisms of nociceptive transmission modulation could contribute to improved opioid-mediated analgesia.

List of keywords: pain, nociception, neuropathic pain, CCL2, opioids, TRPV1, paclitaxel, PI3K

Obsah / Table of Contents

Abstrakt	1
Abstract	2
Obsah / List of Contents	3
Seznam zkratk / List of abbreviations.....	4
1. Úvod	5
2. Cíle práce	7
3. Materiál a metodika	8
4. Výsledky.....	10
5. Diskuze.....	12
6. Závěr	14
1. Introduction.....	16
2. Aims of the thesis	18
3. Materials and methods	19
4. Results	21
5. Discussion	23
6. Conclusion	26
Seznam použité literatury / References	28
List of publications related to the doctoral thesis:.....	31

Seznam zkratek / List of abbreviations

ANOVA	Analysis of variance
CCI	Chronic constriction injury
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CCR2	C-C motif chemokine receptor 2
CD68	Cluster of differentiation 68
CNS	Central nervous system
DAMGO	[D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly-ol]-enkephalin
DIC	Differential interference contrast
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DRG	Dorsal root ganglia
DUV	Duvelisib
eEPSC	Evoked excitatory postsynaptic current
IASP	International Association for the Study of Pain
IR	Immunoreactive
i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intrathecal
LTP	Long term potentiation
mEPSC	Miniature excitatory postsynaptic current
MOR	μ-opioid receptor
NDS	Normal donkey serum
OIH	Opioid-induced hyperalgesia
OLDA	N-Oleoyldopamine
PAC	Paclitaxel
pAkt	Phosphorylated Akt kinase
PBS	Phosphate-buffer solution
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PNS	Peripheral nervous system
PWL	Paw withdrawal latency
ROI	Region of interest
SCDH	Spinal cord dorsal horn
TTX	Tetrodotoxin
WMN	Wortmannin

1. Úvod

Mezinárodní asociace pro studium bolesti (International Association for the Study of Pain, IASP) definuje nociceptivní bolest jako "bolest, která vzniká v důsledku skutečného nebo hrozícího poškození jiné než nervové tkáně a je způsobena aktivací nociceptorů" (Merskey et al., 1994). Nociceptivní bolest má jasnou fyziologickou funkci v ochraně organismu a nejčastěji ji pociťujeme při poškození kůže a svalového aparátu. Somatosenzorické informace z periferních a viscerálních orgánů vstupují do centrálního nervového systému (CNS) v oblasti šedé hmoty v zadním rohu míšním (SCDH). Správný přenos a modulace periferního vstupu závisí na komplexní organizaci neuronových spojení mezi periferií a CNS (Todd, 2010).

Naproti tomu neuropatická bolest vzniká poškozením periferního nervového systému (PNS) nebo CNS a vede k abnormálním bolestivým pocitům bez fyziologického významu (McMahon et al., 2006). Složitost a odlišnost mechanismů podílejících se na vzniku neuropatické bolesti značně komplikuje léčbu neuropatické bolesti běžnými analgetiky (Woolf, 2011).

Neuropatická bolest může být dále zesílena nebo dokonce vyvolána jinými než nervovými buňkami (Watkins et al., 2002), a to prostřednictvím produkce a uvolňování chemokinů, které jsou přímo spojeny se senzitivací nociceptorů (Gao et al., 2010). Pro tento přehled je nejzajímavější přímá potenciace primárních nociceptivních neuronů chemokinovým (C-C motiv) ligandem 2 (CCL2) (Spicarova et al., 2014). V CNS a PNS může být chemokin CCL2 exprimován neurony, mikroglie a astrocyty v různých anatomických oblastech, často jako marker probíhajícího neurogenního zánětu (Conductier et al., 2010; Komiya et al., 2020). Četné studie pozorovaly zvýšené hladiny CCL2 u zvířecích modelů neuropatické bolesti, jako je model chronické konstriktce sedacího nervu (CCI) (Zhang et al., 2006; Piotrowska et al., 2016; Kwiatkowski et al., 2019; Zajaczkowska et al., 2020) a periferní neuropatie vyvolaná paclitaxelem (PIP) (Zhang et al., 2013).

Nejnovější studie ukazují zapojení chemokinů do desenzitizace opioidních receptorů. Podávání morfinu v kombinaci s antagonistou CCR2 podstatně zvýšilo analgetickou účinnost morfinu na chronickou bolest vyvolanou CCI (Kwiatkowski et al., 2017). Jiná studie prokázala, že protilátka neutralizující CCL2 tlumí morfinem navozenou aktivaci mikroglie a morfinovou toleranci (Zhao et al., 2012). *In vitro* studie také prokázala přímé inhibiční působení několika chemokinů prostřednictvím heterologní desenzitizace μ -opioidního receptoru (MOR) (Zhang et al., 2004). Z tohoto důvodu bylo jedním z cílů tohoto projektu prozkoumat roli CCL2 ve snížené účinnosti analgezie zprostředkované MOR u neuropatické bolesti na míšní úrovni.

MOR je dominantním opioidním receptorem aktivovaným při opioidní analgesii a zároveň receptorem s nejvyšší afinitou k morfinu, nejdůležitějšímu a nejčastěji používanému opioidu v medicíně (Ding et al., 1996). Zároveň je MOR zodpovědný za většinu nežádoucích vedlejších účinků opioidů, jako je tolerance, závislost, respirační deprese a zácpa.

Cirkulace receptorů je důležitým mechanismem v regulaci signalizace. Internalizace MOR je závislá na β -arrestinech, které podporují odpojení G-proteinu a endocytózu receptoru (Pierce et al., 2002). Signalizace β -arrestinů se může podílet na rozvoji tolerance k opioidům, protože u myši s delecí β -arrestinu 2 byla pozorována úplná absence opioidní tolerance (Raehal et al., 2005). Nedávný výzkum se zaměřil na interakci TRPV1-MOR, s důrazem na β -arrestin 2, který je ústředním uzlem v komunikaci mezi těmito receptory. Aktivace TRPV1 v

buňkách exprimujících TRPV1, β -arrestin 2 a MOR vede k akutnímu přesunu β -arrestinu 2 do jádra, čímž se omezuje dostupnost β -arrestinu 2 v cytosolu (Basso et al., 2019). TRPV1 indukovaný jaderný transport tak brání schopnosti β -arrestinu 2 zprostředkovat desenzitizaci MOR. Toto zjištění naznačuje, že TRPV1 může modulovat signalizaci MOR a pomáhat zachovat citlivost MOR na endogenní i exogenní agonisty (Basso et al., 2019). Protože tyto studie zkoumají pouze desenzitizaci MOR *in vitro* a omezují se na použití exogenních agonistů TRPV1, jako je kapsaicin, cílem tohoto projektu bylo prozkoumat roli endogenního agonisty TRPV1 N-oleoyldopaminu (OLDA) v desenzitizaci MOR.

Hyperalgezie vyvolaná opioidy (OIH) je zvýšená citlivost k bolestivým podnětům navozená akutním podáním opioidů nebo jejich vysazením (Roeckel et al., 2016). Nedávné studie naznačují zapojení TRPV1 do OIH (Chen et al., 2008; Scherer et al., 2017; Wang et al., 2022). Tepelnou i taktilní OIH vyvolanou opakovanou léčbou morfinem u myši a potkanů lze zvrátit perorálním podáním antagonisty TRPV1, AMG0374, přičemž subkutánní morfinové pelety nevyvolaly tepelnou ani taktilní OIH u TRPV1 knock-out myši (Vardanyan et al., 2009). Tyto výsledky naznačují, že receptor TRPV1 hraje důležitou roli v toleranci a hyperalgezi vyvolané opioidy a lze se na něj zaměřit v boji proti těmto vedlejším účinkům léčby opioidy. V rámci tohoto projektu byla proto zkoumána potenciální role TRPV1 v OIH.

Druhá část doktorského projektu byla zaměřena na zkoumání signalizace fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) v neuropatické bolesti spojené s PIPN. Paclitaxel (PAC) je běžně používané chemoterapeutikum, účinné při léčbě rakoviny prsu, vaječníků, jícnu a dalších typů rakoviny. Riziko vzniku PIPN a chronické bolesti, která PIPN doprovází, však představuje významný limitující faktor v dávkování chemoterapeutické léčby PAC (Boyette-Davis et al., 2018). Uvádí se, že PIPN vyvolává významnou senzickou neuropatii, která se projevuje především v distálních končetinách a jejíž příznaky zahrnují mechanickou alodynii, spontánní pálivou bolest a pocit brnění a necitlivosti (Dougherty et al., 2004). PAC vede k přímé aktivaci toll-like receptoru 4 (TLR4) na periferních senzických i míšních neuronech a následné senzitivaci TRPV1, což bylo demonstrováno jako zvýšení odpovědi na kapsaicin v akutních míšních řezech potkana a myši a v kulturách neuronů disociovaných DRG potkana a člověka (Li et al., 2015). Senzitivace TRPV1 vyvolaná aktivací TLR4 je závislá na fosforylaci receptoru TRPV1 serin/treoninovými kinázami, zejména PI3K. Aktivace TLR4 vyvolaná PAC může navíc podporovat aktivaci makrofágů (Kawasaki et al., 2000; Byrd-Leifer et al., 2001; Guha et al., 2001). Proto jsme studovali, jak cílené ovlivnění aktivity PI3K v modelu PIPN může potlačit projevy spojené s neuropatickou bolestí, jako je infiltrace/proliferační makrofágů do DRG.

2. Cíle práce

Cílem mého doktorského projektu a experimentů prezentovaných v této práci bylo studovat různé mechanismy, které se podílejí na modulaci neuropatické bolesti. Hlavní část projektu byla zaměřena na interakci mezi chemokinem CCL2, opioidními receptory a receptory TRPV1 v dorzálním rohu míchy. Druhá část experimentů se zabývala úlohou PI3K v PIPN.

Opioidy za normálních podmínek působí na nociceptivní přenos silným inhibičním účinkem. Neuropatická bolest je spojena s abnormální aktivitou nociceptivního přenosu v SCDH a je často doprovázena sníženým analgetickým účinkem opioidů. Důležitou roli v internalizaci opioidních receptorů, ale také v pronociceptivních účincích chemokinu CCL2, hrají TRPV1 receptory.

Aplikace PAC vede k PIPN projevující se syndromy akutní a chronické bolesti. Ačkoli byla prokázána úloha DRG neuronů v tomto patologickém procesu, molekulární mechanismy jsou dosud neznámé.

Na základě těchto skutečností jsme zkoumali následující experimentální otázky:

1. Jak chemokin CCL2 moduluje účinky aktivace MOR na nociceptivní synaptický přenos v zadním rohu míšním a *in vivo* během opioidy zprostředkované analgezie?
2. Jsou účinky zprostředkované CCL2 závislé na aktivaci mikroglíí?
3. Jaká je úloha receptorů TRPV1 při vzniku OIH a jak může aktivace TRPV1 endogenním agonistou OLDA modulovat desenzitizaci opioidních receptorů?
4. Které intracelulární signální dráhy se podílejí na PIPN a jak mohou jejich inhibitory oslabit změny v DRG související s rozvojem neuropatické bolesti, jako je infiltrace makrofágy?

3. Materiál a metodika

Používaná pokusná zvířata: V pokusech byli použiti samci potkana kmene Wistar stáří P19-P21, nebo dospělí jedinci (180-300 g). Zvířata byla umístěna v oddělených průhledných plastových klecích s měkkou podestýlkou, s volným přístupem k potravě a vodě a byla chována v cyklu 12/12 h světlo/tma při pokojové teplotě. Pokusy byly prováděny během světelné fáze cyklu. Všechny experimenty byly schváleny Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat Fyziologického ústavu AV ČR v souladu s platnou legislativou.

Příprava míšních řezů: Zvířata byla anestetizována isofluranem (3 %) a bederní mícha byla vyjmuta a ponořena do okysličeného ledového disekčního roztoku obsahujícího (v mM) 95 NaCl, 1,8 KCl, 7 MgSO₄, 0,5 CaCl₂, 1,2 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 25 D-glukózy a 50 sacharózy. Zvířata byla usmrcena následným přerušením krční míchy. Akutní transverzální míšní řezy ze segmentu L4-L5 o tloušťce 300–350 μm byly připraveny použitím vibratomu (VT 1200S, Leica, Německo). Řezy byly inkubovány v disekčním roztoku po dobu 30 min při 33 °C a následně přemístěny do snímacího roztoku o pokojové teplotě, kde byly ponechány 1 h k zotavení. Snímací roztok obsahoval (v mM) 127 NaCl, 1,8 KCl, 1,2 KH₂PO₄, 2,4 CaCl₂, 1,3 MgSO₄, 26 NaHCO₃ a 25 D-glukózy. Následně byly řezy umístěny do snímací komory, která byla nepřetržitě perfundována snímacím roztokem (pokojová teplota) rychlostí ~ 2 ml.min⁻¹. Všechny extracelulární roztoky byly po celou dobu nasyceny karbogenem (95 % O₂, 5 % CO₂).

Elektrofyzilogické snímání metodou patch-clamp: Snímání v míšních řezech probíhalo z neuronů povrchových lamin zadního rohu. Jednotlivé neurony byly vizualizovány pomocí mikroskopu s diferenciálním interferenčním kontrastem (DIC) (Leica, DM LFS A, Německo) vybaveného kamerou citlivou na infračervené záření (Hitachi KP-200P, Japonsko) se standardním TV/video monitorem. Snímací elektrody z borosilikátového skla měli při naplnění intracelulárním roztokem odpor 3,5-6,0 MΩ. Intracelulární roztok obsahoval (v mM): 125 laktonu kyseliny glukonové, 15 CsCl, 10 EGTA, 10 HEPES, 1 CaCl₂, 2 MgATP, 0,5 NaGTP a byl upraven na pH 7,2 pomocí CsOH. Měření v konfiguraci snímání z celé buňky bylo prováděno pomocí zesilovače Axopatch 200B a digitálního převodníku Digidata 1440A (Molecular Devices, USA) při pokojové teplotě (~ 23 °C). Záznamy byly filtrovány při 2 kHz a digitálně vzorkovány při 10 kHz. Sériový odpor neuronů byl rutinně kompenzován na 80 % a byl sledován během celého experimentu. Miniaturní a evokované excitační postsynaptické proudy (mEPSC/eEPSC) zprostředkované AMPA receptory byly zaznamenány z neuronů při membránovém napětí -70 mV v přítomnosti 10 μM bikukulinu a 5 μM strychninu. Miniaturní EPSC byly rozlišeny přidáním 0,5 μM tetrodotoxinu (TTX) do snímacího roztoku. Pro snímání eEPSC byl dorzální kořen stimulován pomocí sací elektrody s elektrodou naplněnou extracelulárním roztokem pomocí izolovaného stimulatoru s konstantním proudem (Digitimer DS3, Anglie). Intenzita stimulace byla nastavena tak, aby vyvolala stabilní EPSC s trváním stimulu 0,5 ms a alespoň 3× minimálním stimulačním proudem při frekvenci 0,033 Hz.

Implantace intratekálního katétru: Přibližně 4 cm dlouhá PE-5 hadička byla vložena do ohnutého konce PE-10 hadičky a zafixována epoxidovým lepidlem. Hadička byla naplněna sterilním fyziologickým roztokem pomocí Hamiltonovy stříkačky. Dospělí samci potkanů kmene Wistar (250-300 g) byli anestetizováni isofluranem (3%) a hřbet zvířete byl ostříhán elektrickým strojkem. Operace byla provedena sterilním způsobem. Obratle L4-L5

byly chirurgicky odkryty a do subarachnoidálního prostoru bylo umístěno přibližně 0,5 cm PE-5 konce katétru, který byl fixován dentálním cementem (Duracryl, Spofa, Česká republika). Konec PE-10 katétru byl vyveden na zadní straně krku a otevřený konec katétru byl utěsněn. Zvířata byla ponechána v kleci k zotavení po dobu nejméně 7 dní. Poloha katétrů byla ověřena injekcí barviva na konci každého pokusu.

Test tepelné citlivosti: Latence odtažení tlapky k tepelným podnětům (PWL) byla testována pomocí plantárního testovacího přístroje (Ugo Basile, Itálie) se sálavým teplem aplikovaným na plantární povrch zadní tlapky. Potkani byli umístěni do průhledných plastových klecí na průhlednou skleněnou desku, pod kterou byl umístěn zdroj tepla. Adaptace na testovací prostředí probíhala nejméně 15 min před každým pokusem. Každá tlapka byla testována čtyřikrát v každém časovém bodě experimentu s nejméně 5 minutovým odstupem mezi jednotlivými podněty. Data byla analyzována pomocí jednosměrné analýzy ANOVA s následným postupem vícenásobného porovnání s kontrolou (Bonferroniho post hoc test). Kritériem statistické významnosti byla hodnota $P < 0,05$.

Model PIPN s paklitaxelem, léčba duvelisibem a wortmanninem: PAC Mylan (Oncotec Pharma Produktion) byl použit k vyvolání bolestivé periferní neuropatie. PAC (6 mg/ml) byl těsně před injekcí zředěn 0,9% sterilním fyziologickým roztokem na 2 mg/ml. Zásobní roztok vehikula byl připraven z makrogolglycerol ricinoleátu (Kolliphor EL, Sigma-Aldrich) a ethanolu (Penta) v poměru 1:1. Tři po sobě jdoucí dávky 8 mg/kg PAC byly podány intraperitoneálně ve dnech 0, 3 a 6. Podání wortmanninu (0,6 mg/kg, i.p.) proběhlo 1 h před podáním PAC. Zásobní roztok wortmanninu (WMN) (12,5 mM v dimetylsulfoxidu (DMSO)) byl zředěn ve sterilním fyziologickém roztoku. Zvířata léčená pouze PAC v pokusech s wortmanninem dostala 1 h před PAC falešnou injekci (DMSO jako vehikulum). Zásobní roztok duvelisibu (DUV) (LC Laboratories) (až 200 mM) byl připraven čerstvě v DMSO (Sigma-Aldrich) těsně před léčbou. Příslušná dávka DUV byla smíchána s vehikulem (jedlý slunečnicový olej; 500 μ l na potkana) a podána perorálním podáním do žaludku. Byly použity plastové krmné trubice (Instech Laboratories) 15 G x 78 mm. DUV (10 mg/kg) byl podán jako předléčba 30 minut před PAC.

Imunohistochemická analýza: Zvířata byla hluboce anestetizována kombinací ketaminu (100 mg/kg, Narketan, Zentiva) a xylazinu (25 mg/kg, Xylapan, Zentiva), intrakardiálně perfundována fyziologickým roztokem a následně ledovým 4% paraformaldehydem. Obě DRG L5 byly vyjmuty a postfixovány ve 4% paraformaldehydu při 4 °C po dobu 2 hodin, přes noc kryoprotekovány 30% sacharózou a nakrájeny v kryostatu Leica CM3000 na 16 μ m silné řezy. Každý třetí řez DRG byl poté zpracován pro imunohistochemii. Krátce, řezy byly 3 \times promyty po dobu 10 min ve fosfátovém pufovacím roztoku (PBS), blokovány 3% normálním oslím sérem (NDS) po dobu 30 min při pokojové teplotě a inkubovány přes noc při 4 °C s králičí anti-pAkt (Ser473) (1:200; Cell Signaling Technology, #4060S, Nizozemsko) nebo myší primární protilátkou anti-CD68 [ED1] (1:100, Abcam, #ab31630) v 1% NDS s 0,3% Triton X-100. Po promytí v 1% NDS (3 \times po dobu 10 min) byly řezy vystaveny působení sekundární protilátky konjugované s Cy2 (1:400, Jackson ImmunoResearch Lab. Inc, USA) nebo sekundární protilátkou proti oslí protilátce AlexaFluor-488 (1:400, Jackson ImmunoResearch Laboratories, #715-545-151) po dobu 2 h. Pro vizualizaci buněčného jádra byla použita inkubace v bisbenzimidu (Hoechst 33342, Sigma-Aldrich) po dobu 3 min. Snímky z řezů obarvených proti pAkt byly pořízeny pomocí digitální kamery na fluorescenčním mikroskopu (Olympus BX53) nebo konfokálním mikroskopu (Leica Microsystems, SP8) vybaveném multiimerzním objektivem HC PL APO

(20x/0,75 NA), Ar multiline laserem (488 nm; 65 mW) a HyD spektrálními detektory v případě barvení CD68ig. Všechny řezy byly analyzovány offline pomocí softwaru ImageJ (NIH, USA). Pro každý řez DRG byla vytyčena oblast zájmu (ROI) obsahující pouze těla neuronálních buněk a v ROI byla pomocí funkce Threshold identifikována imunoreaktivní (IR) oblast pAkt nebo CD68. V každém gangliu bylo hodnoceno minimálně 5 řezů. Poměry IR/ROI byly vypočteny a vyjádřeny v procentech. Pro analýzu počtu buněk DRG s pAkt IR byla všechna buněčná těla v DRG řezu ručně obkreslena a byla změřena intenzita pAkt IR a plocha jednotlivých buněčných těl. Buněčná těla byla na základě intenzity signálu rozdělena do skupin pAkt IR a pAkt nonIR. Do analýzy byly zahrnuty pouze buňky s viditelným jádrem.

4. Výsledky

Chemokin CCL2 inhibuje opioidy navozenou depresi nociceptivního synaptického přenosu v zadním rohu míšním. Záznamy ze snímání neuronální aktivity metodou patch-clamp v této studii byly získány z nociceptivních neuronů lokalizovaných převážně v lamina I a II(vnější). Krátká aplikace selektivního MOR agonisty [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkefalinu (DAMGO, 1 μM, 3 min) na akutní míšní řezy snížila frekvenci mEPSC na $60,8 \pm 4,0$ % ve 2. a 3. minutě aplikace. Po preinkubaci řezů v extracelulárním roztoku s CCL2 (10 nM, 2 h) akutní aplikace DAMGO snížila frekvenci mEPSC pouze na $82,4 \pm 3,9$ %. Následně zůstala frekvence mEPSC stabilní až do konce záznamu. CCL2 robustně snížil inhibiční účinek DAMGO na frekvenci mEPSC v neuronech SCDH.

Pro studium úlohy mikroglíí v inhibici MOR signalizace vyvolané CCL2 byly míšní řezy předem inkubovány po dobu 2 h s CCL2 a minocyklinem, blokátorem aktivace mikroglíí. Přidání minocyklinu (100 μM) 15 min před CCL2 (10 nM) nemělo vliv na supresivní účinek CCL2 na inhibici vyvolanou DAMGO. Akutní aplikace DAMGO vyvolala za uvedených podmínek snížení frekvence mEPSC na $77,4 \pm 4,1$ %.

Následující experimenty byly zaměřeny na studium účinků DAMGO a CCL2 na nociceptivní synaptický přenos evokovaný elektrickou stimulací zadního kořene při snímání eEPSC. Aplikace DAMGO (1 μM, 3 min) vyvolala výrazný pokles amplitudy eEPSC u všech snímaných neuronů. U 9/15 snímaných neuronů jsme pozorovali opožděné zvýšení amplitudy eEPSC na $166,6 \pm 21,5$ % v 17. min vymývání DAMGO. Akutní aplikace DAMGO (1 μM, 3 min) nevyvolala pokles amplitudy eEPSC v řezech inkubovaných s CCL2. Chemokin CCL2 zabránil nejen depresi amplitudy eEPSC vyvolané DAMGO, ale i opožděné potenciaci.

Když byl minocyklin (100 μM) přidán do inkubační komory 15 min před CCL2 (10 nM), akutní aplikace DAMGO vyvolala významnou depresi amplitudy eEPSC ($56,4 \pm 8,4$ %). Opožděná potenciace vyvolaná DAMGO nebyla pozorována u žádného ze snímaných neuronů. Naše výsledky naznačují, že inhibice mikroglíí může významně oslabit inhibiční účinek CCL2 na depresi amplitudy eEPSC navozenou aplikací DAMGO, zatímco zvýšení amplitudy eEPSC během vymývací periody nebylo přítomno.

Opioidy vyvolaná opožděná potenciace eEPSC byla potlačena inhibicí TRPV1. Antagonista TRPV1, SB366791 (10 μM, 4 min), byl aplikován před DAMGO a ponechán v extracelulárním roztoku po zbytek snímání. Po aplikaci DAMGO/SB366791 došlo k rychlému poklesu amplitudy eEPSC ($39,0 \pm 9,8$ %). Během 18. min vymývání dosáhla amplituda eEPSC kontrolní hodnoty ($98,8 \pm 16,3$ %). V přítomnosti SB366791 nebyla zaznamenána opožděná potenciace amplitudy eEPSC u žádného ze snímaných neuronů.

CCL2 potlačuje opioidy vyvolanou hyposenzitivitu na tepelné podněty *in vivo*. K podání DAMGO (0,01 μg) a CCL2 (1,4 μg) do míchy byl použit i.t. katétr. Akutní i.t. injekce DAMGO významně prodloužila PWL na tepelné podněty ($196,9 \pm 12,5 \%$). Tepelná hyposenzitivita se v průběhu experimentu postupně vrátila k normálu. V experimentální skupině CCL2 + DAMGO byl nejprve aplikován CCL2 (1,4 μg) a 30 minut poté DAMGO (0,01 μg). Aplikace DAMGO po CCL2 neprodloužila PWL na tepelné podněty v žádném z hodnocených časových bodů. Aplikace CCL2 zcela potlačila analgetický účinek zprostředkovaný aktivací míšních MOR.

Ke studiu úlohy mikroglíí v CCL2 vyvolaném útlumu analgetického účinku zprostředkovaného DAMGO byl použit blokátor aktivace mikroglíí, minocyklin, v jednorázové i.p. dávce (45 mg/kg) podané 1 h před CCL2. Intratekální podání DAMGO po minocyklinu a CCL2 významně prodloužilo PWL na tepelné podněty u všech testovaných zvířat. Tento výsledek ukazuje, že inhibice MOR zprostředkované tepelné analgezie navozená podáním CCL2 je závislá na aktivaci mikroglíí.

OLDA potlačil opioidy vyvolanou desenzitizaci MOR v míše. Agonistou indukovaná desenzitizace MOR byla studována v akutních míšních řezech, které byly 2 h inkubovány s 1 μM DAMGO. Krátká akutní aplikace DAMGO (1 μM , 3 min) snížila frekvenci mEPSC na $60,8 \pm 4,0 \%$. Akutní aplikace DAMGO však nedokázala snížit frekvenci mEPSC u neuronů snímaných z řezů předem inkubovaných s DAMGO (1 μM , 2 h). Úplná absence typické odpovědi na selektivního agonistu MOR DAMGO v našich záznamech naznačuje funkční desenzitizaci MOR.

Abychom mohli studovat roli endogenního agonisty TRPV1 v agonistou vyvolané desenzitizaci MOR, koinkubovali jsme akutní míšní řezy s DAMGO a endogenním agonistou TRPV1, OLDA. Na základě našich předchozích studií jsme použili dvě koncentrace OLDA (0,2 a 10 μM) (Spicarova et al., 2009, 2010). Akutní aplikace DAMGO (1 μM , 3 min) snížila frekvenci mEPSC v řezech koinkubovaných s 10 μM OLDA + 1 μM DAMGO na $55,48 \pm 6,07 \%$ a po preinkubaci s 0,2 μM OLDA + 1 μM DAMGO na $63,44 \pm 7,65 \%$. Významná deprese vyvolaná DAMGO v řezech inkubovaných s 0,2 μM OLDA byla patrná pouze během aplikace DAMGO a frekvence se rychle vrátila na kontrolní úroveň, což ukazuje, že OLDA snižuje agonistou vyvolanou desenzitizaci MOR v závislosti na koncentraci.

OLDA blokuje CCL2 navozenou inhibici analgezie zprostředkované aktivací MOR. Pro navození desenzitizace MOR jsme zopakovali dříve publikovaný experimentální protokol, ve kterém CCL2 inhiboval tepelnou analgezii zprostředkovanou MOR (Heles et al., 2021). Potkanům byl i.t. aplikován CCL2 (1,4 μg), po 30 min následovala aplikace DAMGO (0,01 μg). CCL2 potlačil tepelnou hyposenzitivitu vyvolanou DAMGO. Abychom otestovali účinek aktivace TRPV1 endogenním agonistou, podali jsme CCL2 (1,4 μg) současně s OLDA (0,42 μg) 30 min před podáním DAMGO (0,01 μg). V tomto případě vyvolala aplikace DAMGO rychlou a silnou hypoalgezii na tepelnou stimulaci. Aktivace TRPV1 pomocí OLDA tedy potlačila inhibici opioidní analgezie vyvolanou CCL2.

Aplikace paclitaxelu *in vivo* zvýšila expresi pAkt v neuronech DRG. Pro studium aktivity PI3K jsme sledovali úroveň fosforylace kinázy Akt, která odráží aktivaci signální dráhy PI3K (Zhuang et al., 2004; Pezet et al., 2008). PAC významně zvýšil plochu pAkt pozitivních buněk a procento pAkt pozitivních buněk v řezech L5 DRG, zejména v neuronech s malým průměrem (< 25 μm). WMN, inhibitor PI3K, zabránil zvýšení pAkt pozitivní plochy i počtu pAkt pozitivních neuronů vyvolané PAC.

DUV potlačil fosforylaci Akt po podání PAC. Úroveň fosforylace Akt byla stanovena 1 h po podání PAC (8 mg/kg, i.p.) v časových bodech relevantních pro pozorovanou behaviorální hypersenzitivitu 7. a 21. den (7D a 21D). Akutní aplikace PAC zvýšila pAkt IR, převážně v neuronech s malým průměrem (20-25 μ m). Toto zvýšení bylo významně sníženo aplikací 10 mg/kg DUV + PAC. V DRG odebraných 7. den PAC významně zvýšil procento pAkt⁺ neuronů a DUV tento nárůst zmírnil. Plocha pAkt IR v DRG byla robustně zvýšena ve skupině 7D PAC ($37,6 \pm 1,1$ %) ve srovnání se skupinou 7D CTRL ($24,7 \pm 1$ %). DUV významně potlačil nárůst pAkt IR ve skupině 7D DUV + PAC ($27,5 \pm 1,3$ %). Počet pAkt⁺ buněk ve skupině 21D DUV + PAC se ve srovnání s 21D PAC snížil ($27,3 \pm 1,9$ %). Ve 21. dni nebyly pozorovány žádné významné změny v oblasti pAkt IR. Naše výsledky ukazují, že DUV zabránil PAC indukované zvýšené aktivitě PI3K v sensorických neuronech DRG. Tato zvýšená aktivita PI3K může být jedna z příčin senzitivace sensorických neuronů na míšní úrovni.

**Podání DUV zabránilo PAC vyvolané infiltraci/proliferaci CD68-
imunoreaktivních makrofágů v DRG potkana.** K analýze distribuce makrofágů v řezech L5 DRG jsme použili imunofluorescenční barvení lysozomálního membránového proteinu CD68, který je exprimován převážně v membránách fagocytujících makrofágů (M C Damoiseaux et al., 1994). Kvantifikovali jsme plochu CD68 IR v řezech L5 DRG dospělých potkanů u tří skupin zvířat, u kterých byla provedena i.p. injekce vehikula (CTRL), PAC (3 x 8 mg/kg, i.p.) a DUV + PAC (DUV 3 x 10 mg/kg, 30 min před PAC). DRG L5 ve všech skupinách byly odebrány 24 hodin po poslední léčbě (7. den protokolu PIPN). PAC významně zvýšil CD68 IR ($2,0 \pm 0,1$ % DRG) ve srovnání s CTRL ($1,4 \pm 0,1$ % DRG), zatímco předlčení DUV zabránilo zvýšení CD68 IR vyvolanému PAC ($1,5 \pm 0,1$ % DRG).

5. Diskuze

Deprese synaptického přenosu a analgezie vyvolaná DAMGO.

Naše výsledky z elektrofyziologického snímání z neuronů povrchového zadního rohu odhalují výraznou DAMGO indukovanou depresi frekvence mEPSC a amplitudy eEPSC. Inhibiční účinek opioidů byl v našich experimentech převážně presynaptický, zprostředkovaný receptory na centrálním zakončení primárních aferentních vláken typu A δ a C. Vliv opioidů byl patrný i v dalších experimentech. Opioidy v těchto excitačních presynaptických zakončeních po aktivaci svých receptorů inhibují napěťově závislé Ca²⁺ kanály typu N a P/Q a mechanismus uvolňování neurotransmiterů (Zhou et al., 2010).

U 60 % snímaných neuronů byla pozorována potenciace excitačního synaptického přenosu, amplituda eEPSC dosáhla během vymývání výrazně vyšší hodnoty v porovnání s kontrolou. Bylo prokázáno, že opioidy indukovaná dlouhodobá potenciace (LTP) v míše, která je částečně zodpovědná za OIH a toleranci k opioidům, je omezena na primární aferenty exprimující TRPV1 (Zhou et al., 2010). Antagonista TRPV1 zcela zabránil opožděné potenciaci vyvolané aplikací DAMGO, což naznačuje, že aktivace TRPV1 je klíčovým mechanismem v synaptické potenciaci vyvolané DAMGO.

Chemokin CCL2 v analgezii vyvolané opioidy.

Naše výsledky ukazují významnou funkční modulaci signalizace MOR chemkinem CCL2. Ukázali jsme, že selektivní agonista MOR, DAMGO, vyvolává rychlou a silnou analgezi *in vivo* a významnou inhibici excitačního synaptického přenosu, která se projevuje

snížením frekvence mEPSCs a amplitudy eEPSCs snímaných z neuronů SCDH. Chemokin CCL2 zabránil jak analgezii vyvolané DAMGO *in vivo*, tak inhibici excitačního synaptického přenosu *in vitro* procesem závislým na aktivaci mikroglíí, pravděpodobně prostřednictvím desenzitizace nebo internalizace MOR (Zhang et al., 2004).

Naše předchozí studie prokázala, že CCL2 může zvýšit spontánní uvolňování glutamátu z centrálních zakončení nociceptivních aferentních vláken a vyvolat tepelnou hyperalgezii a mechanickou alodynii (Spicarova et al., 2014). Naše výsledky rozšiřují toto zjištění o úlohu CCL2 v dysregulaci analgezie navozené opioidy. Senzitizace neuronů nociceptivních drah a současná inhibice opioidní signalizace by mohly mít synergický účinek na rozvoj hypersenzitivity.

Naše zjištění jsou v souladu s předchozími studiemi, které ukazují chemokiny indukovanou internalizaci MOR v buněčných kulturách (Zhang et al., 2004). Tyto experimenty ukazují, jak CCL2 a další chemokiny narušují vápníkovou odpověď indukovanou DAMGO a vyvolávají heterologní desenzitizaci MOR.

Mikroglie jsou klíčové pro desenzitizaci MOR navozenou CCL2.

Zablokování aktivace mikroglíí minocyklinem zabránilo inhibičnímu účinku CCL2 na MOR indukovanou depresi amplitudy eEPSC a analgezii *in vivo*. Navzdory nejistotě ohledně distribuce CCL2 a CCR2 v typech míšních buněk pramenící z rozporupných výsledků ve starší literatuře naše výsledky naznačují, že aktivace mikroglíí je klíčovou událostí v desenzitizaci MOR navozené CCL2.

Aktivace mikroglíí může zesilovat desenzitizaci MOR vyvolanou CCL2 uvolňováním pronociceptivních mediátorů (Kwiatkowski et al., 2017). Minocyklin ale nezabránil účinku CCL2 na DAMGO indukovanou depresi frekvence mEPSC. Na základě tohoto zjištění předpokládáme, že CCL2 může přímým působením na presynaptické neurony tlumit depresi spontánního uvolňování glutamátu vyvolanou podáním DAMGO, zaznamenanou v našem případě jako frekvence mEPSC.

OLDA potlačuje agonistou i CCL2 indukovanou depresi navozenou aktivací MOR.

MOR jsou exprimovány společně s TRPV1 na centrálních zakončeních primárních aferentních neuronů v dorzálním rohu míchy. Aktivace TRPV1 na těchto presynaptických zakončeních aktivuje signální dráhu MAPK, která vede k přesunu β -arrestinu 2 do buněčného jádra. Toto vyloučení β -arrestinu 2 z cytosolu brání jeho vazbě na MOR a oslabuje desenzitizaci MOR (Basso et al., 2019).

Naše výsledky naznačují, že aktivace TRPV1 pomocí OLDA může snížit jak agonisty, tak chemokiny indukovanou desenzitizaci MOR. CCL2 indukovaná desenzitizace MOR je patrná jako absence tepelné analgezie po i.t. aplikaci DAMGO. Na základě předchozích *in vitro* studií zkoumajících signální dráhy aktivované chemokinovými receptory, které vedou k internalizaci MOR, předpokládáme, že tento útlum analgezie je způsoben heterologní desenzitizací MOR (Kwiatkowski et al., 2019). OLDA podávaný společně s CCL2 zabránil desenzitizaci MOR, protože následné i.t. podání DAMGO vyvolalo analgezii srovnatelnou s kontrolní situací. To potvrzuje, že aktivace TRPV1 jeho endogenním agonistou může podporovat opioidní analgezii ve stavech, které vedou ke zvýšené hladině chemokinů v míše, jako je chronická neuropatická bolest. Naše výsledky odhalují, jak může signalizace navozená endogenními agonisty TRPV1 interagovat s funkcí MOR, snižovat desenzitizaci MOR a následně podporovat účinnost opioidů v chronické bolesti.

PI3K v neuropatické bolesti vyvolané paclitaxelem

Výsledky uvedené v této práci jsou součástí studie, která identifikovala signalizaci PI3K jako klíčovou dráhu při rozvoji PIPN doprovázené chronickou neuropatickou bolestí (Adamek et al., 2022). Nejdůležitějším zjištěním této studie je, že perorální podávání inhibitoru specifického pro izoformu PI3K δ/γ DUV zabránilo rozvoji chronické bolesti a oslabilo pronociceptivní signalizaci a dezinhibici v modelu PIPN. Výsledky našich studií prokazují senzitivizaci TRPV1 v SCDH jako ztrátu tachyfylaxe zprostředkované kapsaicinem po akutní i 7 denní léčbě PAC (Adamek et al., 2019, 2022). Senzitivizaci TRPV1 zaznamenané *in vitro* i mechanické alodynii *in vivo* zabránily inhibitory PI3K LY-294002 a WMN (Adamek et al., 2019) a inhibitor specifický pro izoformu PI3K δ/γ DUV (Adamek et al., 2022).

Imunohistologická analýza distribuce pAkt v řezech získaných z lumbálních DRG podporuje naše zjištění a ukazuje, že inhibitory PI3K, WMN a DUV zabránily zvýšení fosforylace Akt zprostředkované PAC. Zvýšení pAkt vyvolané PAC bylo nejvýraznější u neuronů s malým průměrem mezi 15 a 25 μm . Tento výsledek je v souladu s aktivací TLR4 a potenciací TRPV1 zprostředkovanou PAC, protože TLR4 i TRPV1 jsou v DRG exprimovány převážně v neuronech malého průměru.

Analýza fosforylace Akt v řezech DRG odebraných 7. a 21. den ukazuje zvýšení pAkt vyvolané PAC v 7. den léčby a žádnou významnou změnu v 21. den. DUV zabránil zvýšení pAkt v 7. den, což je patrné z hladin pAkt IR oblasti srovnatelných se skupinou CTRL. Tyto údaje naznačují, že DUV může účinně potlačit účinek PAC na aktivitu PI3K nejen přechodně, ale po celou dobu vývoje PIPN v časových bodech, kdy jsme pozorovali účinky vyvolané PAC na senzitivizaci TRPV1 a mechanickou alodynii.

Účinek DUV na infiltraci/proliferaci makrofágů v DRG vyvolanou PAC

Naše výsledky ukazují, že DUV může zabránit zvýšení infiltrace/proliferace makrofágů v DRG vyvolané PAC. Infiltrace makrofágů do DRG po podání PAC je indukována zvýšením chemoatraktantů vyvolaným PAC, zejména CCL2 a CX3CL1 (Huang et al., 2014; Zhang et al., 2016). Infiltrace cirkulujících makrofágů a aktivace rezidentních makrofágů vede ke zvýšené produkci a uvolňování prozánětlivých cytokinů a chemokinů, jako jsou TNF α a IL-1 β , které následně zvyšují excitabilitu neuronů DRG (Spicarova et al., 2011; Ji et al., 2016) a podporují senzitivizaci TRPV1 (Spicarova et al., 2014).

Aktivní makrofágy lze rozdělit na fenotypy M1 a M2, přitom PAC, stejně jako DUV, podporují změnu fenotypu makrofágů na M1, pravděpodobně prostřednictvím signalizace PI3K (Malyshev et al., 2015; Horwitz et al., 2018; Wanderley et al., 2018). Ačkoli je fenotyp makrofágů M1 považován za prozánětlivý a pronociceptivní, bylo také prokázáno, že DUV inhibuje faktor stimulující kolonie 1 (CSF1), signální faktor důležitý pro infiltraci makrofágů. Bylo prokázáno, že CSF1 zvyšuje neuropatickou bolest (Guan et al., 2016) a přitahuje cirkulující monocyty do míchy a DRG (Peng et al., 2016). Naše tvrzení o inhibici infiltrace/proliferace makrofágů je založeno na DUV navozeném snížení imunoreaktivity CD68 v DRG, což by mohlo přispívat k antinociceptivnímu účinku DUV potlačením makrofágů aktivovaných PAC.

6. Závěr

Modulace synaptického přenosu v neuronech povrchových lamin dorzálního rohu míšního hraje klíčovou roli v nociceptivní signalizaci. Během akutních, chronických a

neuropatických bolestivých stavů mohou různé mechanismy vyvolat změny v SCDH a DRG, které podporují nejen zvýšení účinnosti první nociceptivní synapse, ale mohou také snížit efektivitu opioidní analgezie. Mezi takové faktory se zvláštním významem pro rozvoj neuropatické bolesti patří chemokin CCL2 a receptory TRPV1. Modulace nociceptivní signalizace těmito faktory byla proto zvolena hlavním cílem první části výsledků prezentovaných v této práci. Druhá část prezentovaných výsledků se zaměřila na změny v DRG vedoucí k bolestivé neuropatii v modelu chemoterapií indukované neuropatické bolesti. Dalším cílem bylo také zjistit možné využití klinicky schváleného inhibitoru PI3K (Duvelisib) pro léčbu bolesti spojené s PIPN.

Naše experimenty jasně ukázaly, že aktivace MOR specifickým agonistou DAMGO vyvolává robustní analgezii *in vivo* a inhibici excitačního nociceptivního přenosu *in vitro*. Toto analgetické a inhibiční působení DAMGO bylo silně sníženo aplikací chemokinů CCL2 a tento účinek byl vysoce závislý na aktivaci mikroglie. Již dříve bylo prokázáno, že hladiny CCL2 se zvyšují při různých, zejména neuropatických bolestivých stavech. Naše výsledky tedy naznačují, že modulace nociceptivního synaptického přenosu v SCDH pomocí CCL2 může být jednou z příčin snížené analgetické účinnosti opioidů během těchto patologických stavů (Heles et al., 2021). V tomto ohledu jsou neméně důležitá naše zjištění, že v modelové situaci byly příznaky OIH sníženy antagonistou receptorů TRPV1. Již dříve bylo naznačeno, že TRPV1 může hrát klíčovou roli v desenzitizaci MOR, a to prostřednictvím regulace translokace β -arrestinu 2 (Basso et al., 2019; Melkes et al., 2020). Naše nepublikovaná data prezentovaná v této práci ukazují, že aktivace receptorů TRPV1 jeho endogenním agonistou OLDA zabránila snížení účinků DAMGO po agonisty indukované a CCL2 indukované desenzitizaci MOR.

Chemoterapií vyvolané chronické neuropatické bolesti jsou stále velmi obtížně léčitelné a představují pro pacienty velkou zátěž, která často vede k přerušení chemoterapeutické léčby. V našich experimentech jsme prokázali významnou roli aktivace PI3K v bolesti spojené s PIPN. Na modelu PIPN jsme prokázali významné zvýšení aktivity PI3K i infiltrace/proliferace makrofágů v DRG (Adamek et al., 2019). Naše výsledky také jasně ukazují, že specifický inhibitor PI3K DUV významně oslabil, jak aktivitu PI3K, tak infiltraci/proliferaci makrofágů. Výsledky prezentované v této práci jsou v souladu s ostatními experimenty včetně behaviorálního testování a záznamů aktivity SCDH neuronů, což silně naznačuje, že tento klinicky dostupný antagonist PI3K DUV by mohl být dobrým potenciálním cílem pro léčbu bolesti spojené s PIPN (Adamek et al., 2022).

Celkově výsledky prezentované v této doktorské práci ukazují nové mechanismy vzniku stavů neuropatické bolesti a zdůrazňují TRPV1 jako důležitý cíl pro potenciální vývoj účinnějších opioidních analgetik a dokládají klíčovou roli chemokinů v omezené účinnosti opioidů u neuropatické bolesti. Publikace zveřejněné na základě této práce poskytují základ pro další výzkum a nové způsoby léčby neuropatické bolesti, které by mohli pomoci pacientům.

1. Introduction

Nociceptive pain is defined by the International Association for the Study of Pain (IASP) as “pain that arises from actual or threatened damage to non-neuronal tissue and is due to activation of nociceptors” (Merskey et al., 1994). Nociceptive pain has a clear protective physiological function and is most commonly experienced in the musculoskeletal system. Somatosensory information from peripheral and visceral organs enters CNS through spinal cord dorsal horn (SCDH) grey matter. Proper transmission and modulation of the peripheral input rely on a high organization of the circuits forming a connection between the periphery and the CNS (Todd, 2010).

In contrast, neuropathic pain originates from damage to the peripheral nervous system (PNS) or central nervous system (CNS) and leads to abnormal painful sensations without physiological significance (McMahon et al., 2006). The complexity of mechanisms involved in neuropathic pain development greatly complicates pain management by conventional analgesics (Woolf, 2011).

Neuropathic pain can be further enhanced or even triggered by non-neuronal cells (Watkins et al., 2002), through the production and release of chemokines, which have been directly linked to nociceptor sensitization (Gao et al., 2010). Most interesting for this review is the direct potentiation of the primary nociceptive neurons by chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) (Spicarova et al., 2014). In CNS and PNS the CCL2 chemokine can be expressed by neurons, microglia, and astrocytes in various anatomical regions, often as a marker of ongoing neuroinflammation (Conductier et al., 2010; Komiya et al., 2020). Numerous studies observed increased CCL2 levels in animal models of neuropathic pain, such as chronic constriction injury (CCI) (Zhang et al., 2006; Piotrowska et al., 2016; Kwiatkowski et al., 2019; Zajaczkowska et al., 2020) and paclitaxel-induced peripheral neuropathy (PIPN) (Zhang et al., 2013).

Recent studies demonstrate the involvement of chemokines in opioid receptor desensitization. While opioids exert an analgesic effect in the CCI model of neuropathic pain, administration of morphine in combination with a CCR2 antagonist substantially enhanced its analgesic potency (Kwiatkowski et al., 2017). Another study demonstrated that the CCL2 neutralizing antibody attenuates morphine-induced microglial activation and morphine tolerance (Zhao et al., 2012). Direct inhibitory action of several chemokines through heterologous desensitization of μ -opioid receptor (MOR) has been demonstrated (Zhang et al., 2004). For this reason, one of the aims of this project was to investigate the role of CCL2 in the reduced efficacy of MOR-mediated analgesia in neuropathic pain.

MOR is the dominant opioid receptor in pain-relieving effects as well as a receptor with the highest affinity for morphine, the most important and frequently used opioid in medicine (Ding et al., 1996). At the same time, MORs are responsible for most of the adverse side effects of opioids, such as tolerance, addiction, dependence, respiratory depression, and constipation.

Receptor trafficking is an important mechanism in the regulation of receptor signaling. MOR internalization is dependent on β -arrestins, which promote the G protein uncoupling and endocytosis of the receptor (Pierce et al., 2002). β -arrestin signaling can be involved in the development of opioid tolerance, as a complete lack of tolerance was observed in β -arrestin 2 knock-out mice (Raehal et al., 2005). Recent research focused on TRPV1-MOR interaction, with β -arrestin 2 as a central hub in communication between these receptors.

Activation of TRPV1 in cells expressing TRPV1, β -arrestin 2, and MOR, leads to acute trafficking of β -arrestin 2 to the nucleus, thereby restricting the availability of β -arrestin 2 in the cytosol (Basso et al., 2019). TRPV1-induced trafficking thus hinders the ability of β -arrestin 2 to mediate the desensitization of MOR. This finding suggests that TRPV1 can bias MOR signaling and maintain the sensitivity of MOR to both endogenous and exogenous agonists (Basso et al., 2019). Because these studies provide evidence for *in vitro* MOR desensitization only and are restricted to the use of exogenous TRPV1 agonists such as capsaicin, this project aimed to investigate the role of endogenous TRPV1 agonist N-Oleoyldopamine (OLDA) in MOR-desensitization.

Opioid-induced hyperalgesia (OIH) is an increased pain sensitivity following acute opioid administration or opioid withdrawal (Roeckel et al., 2016). Recent studies indicate the involvement of TRPV1 in OIH (Chen et al., 2008; Scherer et al., 2017; Wang et al., 2022). Both thermal and tactile OIH induced by a repetitive morphine treatment in mice and rats can be reversed by oral administration of TRPV1 antagonist AMG0374, while subcutaneous morphine pellets failed to induce thermal and tactile OIH in TRPV1 knock-out mice (Vardanyan et al., 2009). Taken together, the TRPV1 receptor seems to exert a high level of control over opioid-induced tolerance and hyperalgesia and can be targeted to combat these side effects of opioid treatment. The potential role of TRPV1 in OIH was thus investigated as a part of this project.

The second part of the Ph.D. project aimed to investigate phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling in PIPN-associated neuropathic pain. Paclitaxel (PAC) is a commonly used chemotherapeutic, effective in the treatment of breast, ovarian, esophageal, and other types of cancer. However, the risk of the development of PIPN and the chronic pain that accompanies PIPN represents a major drawback and a dose-limiting factor of PAC chemotherapeutic therapy (Boyette-Davis et al., 2018). PIPN has been reported to induce significant sensory neuropathy, manifested mostly in the distal extremities, with symptoms that include mechanical allodynia, spontaneous burning pain, and feeling of tingling and numbness (Dougherty et al., 2004). PAC leads to direct activation of toll-like receptor 4 (TLR4) on peripheral sensory and spinal neurons and subsequent sensitization of TRPV1, which was demonstrated as an increase in the capsaicin-mediated response in acute spinal cord slices of rats and mice and neuronal cultures of dissociated rat and human DRGs (Li et al., 2015). TLR4-induced sensitization of TRPV1 is dependent on phosphorylation of TRPV1 receptor by serine/threonine kinases, especially the PI3K and PAC-induced activation of TLR4 can promote macrophage activation (Kawasaki et al., 2000; Byrd-Leifer et al., 2001; Guha et al., 2001). Therefore, we looked at how targeting the PI3K activity in the model of PIPN can improve factors associated with neuropathic pain in PIPN such as macrophage infiltration/proliferation into DRGs.

2. Aims of the thesis

The aim of my Ph.D. project and the experiments presented in this thesis was to study various mechanisms implicated in the modulation of neuropathic pain. The main part of the project focused on the interaction between neuropathic pain-related chemokine CCL2, opioid receptors, and TRPV1 receptors in the spinal cord dorsal horn. The second part of the experiments studied the role of PI3K in PIPN.

Opioids under normal conditions exert potent inhibitory control over the nociceptive transmission. Neuropathic pain is associated with abnormal activity of nociceptive transmission in the SCDH and often does not respond to opioid-mediated analgesia. TRPV1 receptors are involved in the pro-nociceptive effects of CCL2, and play a role in the trafficking of opioid receptors.

PAC application leads to PIPN, acute and chronic pain syndromes. While the role of DRG neurons in this pathological process was demonstrated, the molecular mechanisms are still unknown.

Based on these facts, we investigated the following experimental questions:

1. How chemokine CCL2 modulates MOR-mediated effects on nociceptive synaptic transmission in SCDH neurons and *in vivo* during opioid-mediated analgesia?
2. Are CCL2-mediated effects dependent on microglia activation?
3. What is the role of TRPV1 receptors in the development of OIH and how can the activation of TRPV1 by endogenous agonist OLDA modulate the opioid receptor desensitization?
4. Which intracellular signaling pathways are involved in PIPN and how can their inhibitors attenuate changes in DRG related to the development of neuropathic pain, such as macrophage infiltration?

3. Materials and methods

Experimental animals: Male adult and P19–P21 Wistar rats were used in all experiments. The animals were housed in separate clear plastic cages with soft bedding, free access to food and water, and maintained on 12/12 h light/dark cycle at room temperature-controlled conditions. The experiments were carried out during the light phase of the cycle. All experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of the Institute of Physiology CAS.

Spinal cord slice preparation: Animals were anesthetized with isoflurane (3%), and the lumbar spinal cord was removed and immersed in an oxygenated ice-cold dissection solution containing (in mM) 95 NaCl, 1.8 KCl, 7 MgSO₄, 0.5 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 25 D-glucose, and 50 sucrose. Animals were sacrificed by medulla interruption. Acute transverse slices 300–350 μm thick were cut from L4 to L5 segments using vibratome (VT 1200S, Leica, Germany). Slices were incubated in the dissection solution for 30 min at 33 °C, stored in a recording solution at room temperature, and allowed to recover for 1 h. Recording solution contained (in mM) 127 NaCl, 1.8 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 2.4 CaCl₂, 1.3 MgSO₄, 26 NaHCO₃, and 25 D-glucose. Slices were transferred into a recording chamber that was perfused continuously with a recording solution (room temperature) at a rate of ~2 ml·min⁻¹. All extracellular solutions were saturated with carbogen (95% O₂, 5% CO₂) during the whole process.

Patch-clamp recording: Patch-clamp recordings in spinal cord slices were made from superficial dorsal horn neurons in lamina I and II(outer). Individual neurons were visualized using a differential interference contrast (DIC) microscope (Leica, DM LFSA, Germany) equipped with a near-infrared-sensitive camera (Hitachi KP-200P, Japan) with a standard TV/video monitor. Patch pipettes were pulled from borosilicate glass tubing with resistances of 3.5–6.0 MΩ when filled with intracellular solution. The intracellular pipette solution contained (in mM): 125 gluconic acid lactone, 15 CsCl, 10 EGTA, 10 HEPES, 1 CaCl₂, 2 MgATP, 0.5 NaGTP and was adjusted to pH 7.2 with CsOH. Voltage-clamp recordings in the whole-cell configuration were performed with an Axopatch 200B amplifier and Digidata 1440A digitizer (Molecular Devices, USA) at room temperature (~23 °C). Whole-cell recordings were low-pass filtered at 2 kHz and digitally sampled at 10 kHz. The series resistance of neurons was routinely compensated by 80% and was monitored during the whole experiment. AMPA receptor-mediated miniature and evoked excitatory postsynaptic currents (mEPSC/eEPSC) were recorded from neurons clamped at -70 mV in the presence of 10 μM bicuculline and 5 μM strychnine. mEPSC were distinguished by the addition of 0.5 μM tetrodotoxin (TTX) to the bath solution. To record eEPSC, a dorsal root was stimulated using a suction electrode with a glass pipette filled with an extracellular solution using a constant current isolated stimulator (Digitimer DS3, England). The intensity of the stimulation was adjusted to evoke stable EPSC with 0.5 ms stimulus duration and at least 3 × the minimal stimulus current at a frequency of 0.033 Hz.

Intrathecal (i.t.) catheter implantation: Approximately 4 cm long PE-5 tube was inserted inside bent end of PE-10 tube and fixed using epoxy-glue. Tubing was filled with a sterile saline solution using a Hamilton syringe. Adult male Wistar rats (250–300 g) were anesthetized with isoflurane (3%), and the back of the animal was clipped with an electric razor. The surgery was performed in a sterile manner. L4-L5 vertebrae were surgically exposed and approximately 0.5 cm of PE-5 end of the catheter was placed into the

subarachnoid space and fixed in place with dental cement (Duracryl, Spofa, Czech Republic). The PE-10 end of the catheter was exposed on the back of the neck and the open end of the catheter was sealed. Animals were left to recover in their cages for at least 7 days. The position of the catheters was verified by a dye injection at the end of each experiment.

Paw withdrawal latency to thermal stimulation: The paw withdrawal latency (PWL) to thermal stimulation was tested using a plantar test apparatus (Ugo Basile, Italy) with radiant heat applied to the plantar surface of each hind paw. Rats were placed in nonbinding, clear plastic cages on a clear glass plate, with a heat source underneath. Rats were left to adapt to the testing environment for at least 15 min prior to any stimulation. Each paw was tested 4 times at each time point of the experiment with at least 5 min between the trials. Data were analyzed by One Way analysis of variance (ANOVA) followed by multiple comparison procedure versus control (Bonferroni post hoc test). The criterion for statistical significance was a $P < 0.05$.

Paclitaxel CIPN model, Duvelisib and wortmannin treatment: PAC Mylan (Oncotec Pharma Produktion) was used to induce painful peripheral neuropathy in rats. PAC (6 mg/ml) was diluted with 0.9% sterile saline to 2 mg/ml, just before injection. A vehicle stock solution was made using 1:1 macrogolglycerol ricinoleate (Kolliphor EL, Sigma-Aldrich) and ethanol (Penta). Three successive doses of 8 mg/kg PAC were intraperitoneally administered on days 0, 3, and 6. Pre-treatment with wortmannin (WMN) (0.6 mg/kg, intraperitoneal (i.p.)) had preceded 1 h before the PAC treatment. The stock solution of WMN (12.5 mM in dimethyl sulfoxide (DMSO)) was diluted in sterile saline. The PAC-only treated animals in experiments with WMN received a sham injection (DMSO as a vehicle) 1 h before the PAC. Duvelisib (DUV) (LC Laboratories) stock solution (up to 200 mM) was prepared freshly in DMSO (Sigma-Aldrich) just before the treatment. An appropriate dose of DUV was mixed with the vehicle (edible sunflower oil; 500 μ l per rat) and administered via oral gavage into the stomach. Plastic feeding tubes (Instech Laboratories) 15 G x 78 mm were used. DUV (10 mg/kg) was administered as a pre-treatment 30 min before the PAC.

Immunohistochemical analysis: Animals were deeply anesthetized with a combination of ketamine (100 mg/kg, Narketan, Zentiva) and xylazine (25 mg/kg, Xylapan, Zentiva), perfused intracardially with saline followed by ice-cold 4% paraformaldehyde. Both L5 DRGs were removed and post-fixed in 4% paraformaldehyde at 4° C for 2 h, cryoprotected with 30% sucrose overnight, and cut in cryostat Leica CM3000 to 16 μ m thick slices. Every 3rd DRG section was then processed for immunohistochemistry. Briefly, sections were washed 3 \times for 10 min in phosphate-buffer solution (PBS), blocked with 3% normal donkey serum (NDS) for 30 min at room temperature, and incubated overnight at 4° C with rabbit anti-pAkt (phosphorylated Akt kinase; Ser473) (1:200; Cell Signaling Technology, #4060S, Netherlands) or mouse anti-CD68 (cluster of differentiation 68) primary antibody [ED1] (1:100, Abcam, #ab31630) in 1% NDS with 0.3% Triton X-100. After washing in 1% NDS (3 \times for 10 min), the sections were incubated in a donkey anti-rabbit Cy2-conjugated secondary antibody (1:400, Jackson ImmunoResearch Lab. Inc, USA) or a donkey anti-mouse AlexaFluor-488 secondary antibody (1:400, Jackson ImmunoResearch Laboratories, #715-545-151) for 2 h. For visualization of the cell nucleus, incubation in bisbenzimidazole (Hoechst 33342, Sigma-Aldrich) for 3 min was used. Pictures from sections stained against pAkt were captured using a digital camera on a fluorescence microscope (Olympus BX53); confocal microscope (Leica Microsystems, SP8) equipped with multi-immersion objective HC PL APO (20x/0.75 NA), Ar multiline laser (488 nm; 65 mW), and

HyD spectral detectors was used for CD68 staining. All sections were analyzed offline using ImageJ software (NIH, USA) by an investigator blinded to the treatment. Region of interest (ROI) containing only neuronal cell bodies was outlined for each DRG section and the immunoreactive (IR) area of pAkt or CD68 was identified in ROI using the Threshold function. A minimum of 5 sections were evaluated in each ganglion. IR/ROI ratios were calculated and expressed as a percentage. To analyze the number of pAkt IR DRG cells, all cell bodies in the DRG section were manually outlined and the pAkt IR intensity and area of individual cell bodies were measured. Cell bodies were divided into pAkt IR and pAkt nonIR groups based on the signal intensity. Only cells with visible nucleus were included in the analysis.

4. Results

Chemokine CCL2 prevents opioid-induced inhibition of nociceptive synaptic transmission in spinal cord dorsal horn. Patch-clamp recordings in this study were obtained from nociceptive neurons predominantly localized in lamina I and II(outer). Short application of selective MOR agonist [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin (DAMGO) (1 μ M, 3 min) on acute spinal cord slices reduced mEPSC frequency to $60.8 \pm 4.0\%$ at the 2nd and 3rd minutes of application. After CCL2 pre-incubation (10 nM, 2 h) DAMGO depressed the mEPSC frequency only to $82.4 \pm 3.9\%$. The frequency of mEPSC remained stable until the end of the recording. CCL2 pre-treatment robustly attenuated the inhibitory effect of the DAMGO on the mEPSC frequency in the SCDH neurons.

To study the contribution of microglia to the CCL2-induced inhibition of MOR signaling in SCDH neurons, spinal cord slices were pre-incubated with CCL2 and minocycline, a blocker of microglia activation, for 2 h before the recording. The addition of minocycline (100 μ M) 15 min before the CCL2 (10 nM) did not have any influence on the suppressive effect of CCL2 on the DAMGO-induced inhibition. Acute application of DAMGO elicited the mEPSCs frequency depression to $77.4 \pm 4.1\%$.

Following experiments aimed to study the effects of DAMGO and CCL2 on the nociceptive transmission using dorsal root electrical stimulation-evoked EPSCs. DAMGO (1 μ M, 3 min) induced a significant eEPSC amplitude decrease in all of the recorded neurons. We observed a delayed increase in eEPSC amplitude to $166.6 \pm 21.5\%$ in the 17th min of the washout in 9/15 recorded neurons. Acute application of DAMGO (1 μ M, 3 min) failed to induce a decrease of the eEPSCs amplitude in slices pre-incubated with the CCL2. CCL2 prevented DAMGO-induced eEPSC amplitude depression as well as delayed potentiation.

When minocycline (100 μ M) was added to the incubation chamber 15 min before the CCL2 (10 nM), acute application of DAMGO elicited significant depression of the eEPSC amplitude ($56.4 \pm 8.4\%$). DAMGO-induced delayed potentiation was not observed in any of the recorded neurons. Our results suggest that microglial activation can significantly attenuate the inhibitory effect of CCL2 on the DAMGO-induced eEPSC amplitude depression, while the increase of the eEPSCs amplitude during the washout period was absent.

DAMGO-induced delayed potentiation of eEPSC amplitude was modulated by TRPV1 inhibition. We applied SB366791 (10 μ M, 4 min) as a pre-treatment before DAMGO and continuously for the rest of the recording. Following DAMGO/SB366791 application elicited a rapid decrease of the eEPSC amplitude ($39.0 \pm 9.8\%$). The amplitude of the eEPSC reached the control value in the 18th min of the washout ($98.8 \pm 16.3\%$). In contrast

to the neurons recorded without SB366791, the delayed potentiation of the eEPSC amplitude was not present in any of the recorded neurons.

CCL2 attenuates DAMGO-induced hyposensitivity to thermal stimuli *in vivo*. An i.t. catheter was used for the delivery of DAMGO (0.01 μg) and CCL2 (1.4 μg) to the spinal cord. Acute i.t. DAMGO injection significantly prolonged PWL to thermal stimuli ($196.9 \pm 12.5\%$). Thermal hyposensitivity returned to normal gradually in course of the experiment. CCL2 + DAMGO experimental group received CCL2 (1.4 μg) first, followed by DAMGO (0.01 μg) 30 min after. DAMGO after CCL2 failed to significantly prolong PWL to the thermal stimuli in any of the assessed time points. Pre-treatment with CCL2 was able to completely diminish the analgesic effect mediated by spinal MOR activation.

Microglial blocker minocycline in a single i.p. dose (45 mg/kg) administered 1 h before the CCL2 was used to study the possible role of the microglial activation on the CCL2-induced attenuation of the DAMGO-mediated analgesic effect. DAMGO application after minocycline and CCL2 pre-treatment was able to significantly prolong the PWL to thermal stimuli in all of the tested animals up to 1 h after the DAMGO. This result demonstrates how blocking the microglial activation can prevent the CCL2-induced attenuation of MOR-mediated thermal analgesia.

OLDA prevented DAMGO-induced desensitization of MOR in the spinal cord. Agonist-induced desensitization of MOR was studied using acute spinal cord slices pre-incubated with 1 μM DAMGO for 2 h before the recording. Short application of DAMGO (1 μM , 3 min) on naïve acute spinal cord slices reduced mEPSC frequency to $60.8 \pm 4.0\%$. However, acute application of DAMGO failed to depress the mEPSC frequency in neurons recorded from the slices pre-incubated with DAMGO (1 μM , 2 h). The complete lack of typical response to selective MOR agonist DAMGO in our recordings indicates functional desensitization of MOR.

To study the role of endogenous agonist-induced TRPV1 activation in agonist-induced MOR desensitization, we co-incubated the acute spinal cord slices with DAMGO and endogenous TRPV1 agonist OLDA in two concentrations (0.2 and 10 μM), based on our previous studies (Spicarova et al., 2009, 2010). Short application of DAMGO (1 μM , 3 min) depressed the mEPSC frequency in slices co-incubated with the 10 μM OLDA + 1 μM DAMGO to $55.48 \pm 6.07\%$ and $63.44 \pm 7.65\%$ after pre-incubation with 0.2 μM OLDA + 1 μM DAMGO. Significant DAMGO-induced depression in slices incubated with 0.2 μM OLDA was evident only during the DAMGO application and frequency quickly returned to control levels, showing that OLDA prevents agonist-induced MOR desensitization in a concentration-dependent manner.

OLDA prevented CCL2-induced inhibition of MOR-mediated analgesia. To induce MOR desensitization, we have repeated the previously published experimental protocol of i.t. CCL2-induced inhibition of MOR-mediated thermal analgesia (Heles et al., 2021). Rats in the CCL2 group received a single i.t. injection of CCL2 (1.4 μg) followed by a single application of DAMGO (0.01 μg) 30 min after CCL2. CCL2 prevented DAMGO-induced thermal hyposensitivity. To test the effect of TRPV1 activation, we co-administered CCL2 (1.4 μg) with OLDA (0.42 μg) 30 min before DAMGO (0.01 μg). Here, DAMGO induced rapid and potent hypoalgesia to thermal stimulation. Thus, activation of TRPV1 by OLDA prevented CCL2-induced inhibition of MOR-mediated analgesia.

Paclitaxel *in vivo* treatment increased the expression of pAkt in DRG neurons. To study PI3K activity, we looked at the level of Akt kinase phosphorylation, which reflects the

PI3K signaling pathway activation (Zhuang et al., 2004; Pezet et al., 2008). PAC significantly increased the pAkt positive area and the percentage of pAkt positive cells in L5 DRG slices, especially in the small-diameter neurons (< 25 μ m). PAC-induced increase of both pAkt positive area and the number of pAkt positive neurons was prevented by a PI3K inhibitor WMN pre-treatment.

DUV pre-treatment prevented PAC-induced Akt phosphorylation. Levels of pAkt were determined 1 h after the PAC (8 mg/kg, i.p.) administration and in timepoints relevant to observed behavioral hypersensitivity on days 7 and 21. Acute PAC increased the pAkt IR, predominantly in small-diameter neurons (20-25 μ m). This increase was significantly reduced in the DUV + PAC group. Similarly, the pAkt IR area was significantly increased by the acute PAC compared with the CTRL, while DUV pre-treatment was able to prevent PAC-induced increase. In DRGs collected on day 7, PAC significantly increased the percentage of pAkt⁺ neurons and DUV pre-treatment attenuated this increase. pAkt IR area in DRGs was robustly increased in the 7D PAC group ($37.6 \pm 1.1\%$), compared with the 7D CTRL group ($24.7 \pm 1\%$). DUV significantly reduced the increase of pAkt IR in the 7D DUV + PAC group ($27.5 \pm 1.3\%$). The number of pAkt⁺ cells in the 21D DUV + PAC decreased ($27.3 \pm 1.9\%$) in comparison with the 21D PAC. No significant changes in the pAkt IR area were observed on day 21. Our results show that DUV prevented PAC-induced increased activity of PI3K signaling in sensory DRG neurons, which can serve as one of the causes of sensory neuron sensitization at the spinal cord level.

DUV pre-treatment prevented PAC-induced infiltration/proliferation of CD68-immunoreactive macrophages in the rat DRGs. We have used immunofluorescent staining of CD68 lysosomal membrane protein, expressed predominantly in membranes of phagocytic macrophages (Damoiseaux et al., 1994), to analyze the distribution of macrophages in L5 DRG slices. We quantified CD68 IR area in adult rat L5 DRG sections from CTRL (vehicle-treated), PAC (3 x 8 mg/kg, i.p.), and DUV + PAC-treated animals (30 min pre-treatment with DUV, 3 x 10 mg/kg, before PAC). L5 DRGs in all groups were collected 24 h after the last treatment (day 7 of the PIPN protocol). PAC significantly increased the CD68 IR ($2.0 \pm 0.1\%$ of DRG) in comparison with the CTRL group ($1.4 \pm 0.1\%$ of DRG), while the DUV pre-treatment prevented PAC-induced increase of the CD68 IR ($1.5 \pm 0.1\%$ of DRG).

5. Discussion

DAMGO-induced depression of synaptic transmission and analgesia

Our results from patch-clamp recordings from superficial dorsal horn neurons reveal a significant DAMGO-induced depression of mEPSC's frequency and eEPSC amplitude. The inhibitory effect of opioids in our experiments was mainly presynaptic, mediated by the terminals of A δ - and C-type fibers. Opioids in these excitatory presynaptic terminals inhibit N-type and P/Q-type voltage-dependent Ca²⁺ channels and neurotransmitter release machinery (Zhou et al., 2010).

Overall 60% of the neurons in eEPSC recordings reached amplitude significantly higher than their respective control amplitudes during the washout period. Opioid-induced long-term potentiation (LTP) in the spinal cord, in part responsible for OIH and opioid tolerance, has been shown to be restricted to a TRPV1 expressing primary afferents (Zhou et al., 2010). The TRPV1 antagonist completely prevented DAMGO-induced delayed

potentiation, suggesting that TRPV1 activation is a crucial mechanism in the DAMGO-induced synaptic potentiation.

Chemokine CCL2 in opioid-induced analgesia.

Our results demonstrate a significant functional modulation of MOR signaling by a chemokine CCL2. We showed that the selective MOR agonist DAMGO induced fast and potent analgesia *in vivo* and significant inhibition of the excitatory synapse reflected as a decreased frequency of mEPSCs and amplitude of eEPSCs recorded from the SCDH neurons. Chemokine CCL2 prevented both DAMGO-induced analgesia *in vivo* and inhibition of excitatory synapse *in vitro* in a microglia-dependent manner, presumably through a MOR desensitization or internalization (Zhang et al., 2004).

Our previous study demonstrated how CCL2 can potentiate spontaneous glutamate release from the central endings of the nociceptive afferent fibers and induce thermal hyperalgesia and mechanical allodynia (Spicarova et al., 2014). Our results expand these findings by providing evidence for the role of CCL2 in the dysregulation of opioid-induced analgesia. Sensitization of nociceptive pathways and inhibition of opioid signaling at the same time might have a synergistic effect on the development of hypersensitivity.

Our findings are in alignment with the previous studies, showing chemokine-induced MOR internalization in cell cultures (Zhang et al., 2004). Cell culture experiments show how CCL2 as well as other chemokines impair DAMGO-elicited calcium response and induce heterologous desensitization of MOR.

Microglia are crucial for CCL2-induced desensitization of MOR.

Blocking the activation of microglia by minocycline prevented the inhibitory effect of CCL2 on MOR in eEPSC recordings and *in vivo* analgesia. Despite the uncertainty regarding the distribution of CCL2 and CCR2 in spinal cord cell types stemming from contradictory results in older literature, our results suggest that activation of microglia is a crucial event in the CCL2-induced desensitization of MOR.

Microglia may amplify the CCL2-induced desensitization of MOR by the release of pronociceptive mediators (Kwiatkowski et al., 2017). In addition, minocycline failed to prevent the CCL2-induced effect on DAMGO-induced depression of mEPSC frequency. Based on this finding we assume that CCL2 can attenuate DAMGO-induced depression of spontaneous glutamate release, recorded in our case as the frequency of mEPSC, directly by acting on presynaptic neurons.

OLDA prevents both agonist-induced and chemokine-induced inhibition of MOR-mediated opioid effects.

MORs are co-expressed with TRPV1 on central terminals of primary afferent neurons in the spinal cord dorsal horn. Activation of TRPV1 at these presynaptic endings promotes MAPK signaling pathway, leading to the β -arrestin2 trafficking to the cell nucleus. This exclusion of β -arrestin2 from cytosol prevents its binding to the MOR and thus leads to attenuated MOR desensitization (Basso et al., 2019).

Our results indicate that activation of TRPV1 by OLDA can attenuate both agonist-induced and chemokine-induced desensitization of MOR in a concentration-dependent manner. CCL2-induced MOR desensitization, evident as a lack of thermal analgesia after i.t. DAMGO application. Based on previous *in vitro* studies exploring pathways activated by chemokine receptors that lead to MOR internalization, we assume that this attenuation of analgesia is caused by heterologous desensitization of MORs (Kwiatkowski et al., 2019). OLDA administered together with CCL2 prevented MOR desensitization as subsequent i.t.

DAMGO administration evoked thermal analgesia comparable to the control situation, and thus confirmed that the activation of TRPV1 by its endogenous agonist can promote opioid analgesia in conditions that lead to elevated levels of chemokines in the spinal cord, such as chronic neuropathic pain. In summary, our data reveal how endogenous TRPV1-mediated pathways may interact with MOR function, reduce MOR desensitization, and in turn promote the efficacy of opioids in chronic pain.

PI3K in paclitaxel-induced neuropathic pain

Results reported in this thesis are a part of the study which identified PI3K signaling as a crucial pathway in PIPN development and the accompanying chronic neuropathic pain (Adamek et al., 2022). The most important finding of the study is that the oral administration of PI3K δ/γ isoform-specific inhibitor DUV prevented chronic pain development and attenuated pro-nociceptive signaling and disinhibition in the PIPN model. Results from our studies demonstrate sensitization of TRPV1 in SCDH as a loss of capsaicin-mediated tachyphylaxis after both acute as well as 7 day PAC treatment (Adamek et al., 2019, 2022). Both TRPV1 sensitization recorded *in vitro* and mechanical allodynia *in vivo* were prevented by PI3K inhibitors LY-294002 and WMN (Adamek et al., 2019) and by PI3K δ/γ isoform-specific inhibitor DUV (Adamek et al., 2022).

Immunohistological analysis of pAkt distribution in slices obtained from lumbar DRGs supports our findings and demonstrates that PI3K inhibitors WMN and DUV prevented PAC-mediated increase in pAkt distribution. PAC-induced increase of pAkt was most prominent in small diameter neurons, in categories of neuron soma diameters between 15 to 25 μm . This result is in alignment with the PAC-mediated activation of TLR4 and potentiation of TRPV1, as both TLR4 and TRPV1 are in DRGs expressed mostly in small diameter neurons.

Analysis of Akt phosphorylation in DRG slices collected on day 7 and day 21 show PAC-induced pAkt increase on day 7 of the treatment and no significant change on day 21. DUV prevented pAkt increase on day 7, evident by levels of pAkt IR area comparable to the CTRL group. These data imply that DUV can effectively suppress the effect of PAC on PI3K activity not only transiently, but throughout the development of PIPN at the timepoints where we observed the PAC-induced effects on TRPV1 sensitization and mechanical allodynia.

Effect of Duvelisib on PAC-induced infiltration/proliferation of macrophages in DRG

Our results show that DUV can prevent the PAC-induced increase of macrophage infiltration/proliferation in rat DRGs. Infiltration of macrophages to DRGs after the PAC treatment is induced by a PAC-induced increase of chemoattractants, especially CCL2 and CX3CL1 (Huang et al., 2014; Zhang et al., 2016). Infiltration of circulating macrophages and activation of resident macrophages leads to increased production and release of proinflammatory cytokines and chemokines, such as TNF α and IL-1 β , which in turn increase the excitability of DRG neurons (Spicarova et al., 2011; Ji et al., 2016) and promote sensitization of TRPV1 (Spicarova et al., 2014).

Active macrophages can be classified into M1 and M2 phenotypes and PAC, as well as DUV, promote a switch toward the M1 macrophage phenotype, possibly through PI3K signaling (Malyshev et al., 2015; Horwitz et al., 2018; Wanderley et al., 2018). Although the M1 macrophage phenotype is considered pro-inflammatory and pro-nociceptive, DUV was also shown to inhibit colony-stimulating factor 1 (CSF1), an important signaling factor for macrophage infiltration. CSF1 was shown to be increased neuropathic pain (Guan et al., 2016) and to attract circulating monocytes to the spinal cord and DRGs (Peng et al., 2016).

Our claim on macrophage infiltration/proliferation inhibition is based on a decrease of CD68 immunoreactivity in DRGs and could contribute to the DUV-mediated antinociceptive effect by suppressing PAC-activated macrophages.

6. Conclusion

Modulation of synaptic transmission in superficial dorsal horn neurons has a crucial role in nociceptive signalization. During acute, chronic, and neuropathic pain conditions different mechanisms can induce changes in the SCDH and DRG that promote not only pro-nociceptive sensitization of the first nociceptive synapse but can also impair opioid-induced analgesia. Among such factors with particular importance in the development of neuropathic pain are chemokine CCL2 and TRPV1 receptors. Modulation of nociceptive signaling by these factors was therefore selected as the main focus of the first part of the results presented in this thesis. The second part of the presented results focused on changes in DRG leading to painful neuropathy in a model of chemotherapy-induced neuropathic pain. The goal was also to determine the possible use of a clinically approved inhibitor of PI3K inhibitor (Duvelisib) for PIPN treatment.

Our experiments clearly showed that MOR activation by the specific agonist DAMGO induced robust analgesia *in vivo* and inhibition of excitatory nociceptive transmission *in vitro*. This analgesic and inhibitory actions of DAMGO were potently diminished by treatment with chemokine CCL2 and this effect was highly dependent on microglia activation. It was shown before that the levels of CCL2 are increased during various, especially neuropathic pain conditions. Our results thus suggest that modulation of nociceptive synaptic transmission in the SCDH by CCL2 may be one of the reasons for decreased analgesic efficacy of opioids during these pathological states (Heles et al 2021). In this respect, equally important are our findings that in a model situation the signs of OIH were reduced by TRPV1 receptors antagonist. It was suggested before that TRPV1 may play a crucial role in MOR desensitization, through the regulation of β -arrestin 2 translocation (Basso et al., 2019; Melkes et al., 2020). Our unpublished data presented in this thesis show that activation of TRPV1 receptors with its endogenous agonist OLDA prevented the reduction of DAMGO effects after agonist-induced and CCL2-induced MOR desensitization.

Chemotherapy-induced chronic neuropathic pain states are still very difficult to treat and represent a severe burden for the patients, often leading to interruption of the chemotherapy treatment. In our experiments, we have demonstrated a significant role of PI3K activation in the process of PIPN development. We have shown in a PIPN model of CIPN a significant increase in PI3K activity as well as macrophage infiltration/proliferation in the DRG (Adamek et al., 2019). Our results also clearly demonstrate that specific PI3K inhibitor DUV significantly attenuated both the PI3K activity and macrophage infiltration/proliferation. Results presented in the thesis are aligned with the rest of the experiments including behavioral testing and recordings of SCDH neurons activity, strongly suggesting that this clinically available PI3K antagonist DUV could be a good potential target for PIPN treatment (Adamek et al., 2022).

Overall, the results presented in this doctoral thesis show new potential mechanisms of neuropathic pain states development and highlight TRPV1 as an important target for the potential development of improved opioid analgesics and substantiate the key role of the chemokines in the limited efficacy of opioids in neuropathic pain. Hopefully, data published

based on this work will provide a basis for future research and novel treatments of neuropathic pain that would help the patients.

Seznam použité literatury / References

- Adamek, P.; Heles, M.; Palecek, J., 2019: Mechanical allodynia and enhanced responses to capsaicin are mediated by PI3K in a paclitaxel model of peripheral neuropathy. *Neuropharmacology*, **146**, 163–174.
- Adamek, P.; Heles, M.; Bhattacharyya, A.; Pontearso, M.; Slepicka, J.; Palecek, J., 2022: Dual PI3K δ/γ Inhibitor Duvelisib Prevents Development of Neuropathic Pain in Model of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, JN-RM-1324-21.
- Basso, L.; Aboushousha, R.; Fan, C. Y.; Iftinca, M.; Melo, H.; Flynn, R.; Agosti, F.; Hollenberg, M. D.; Thompson, R.; Bourinet, E.; Trang, T.; Altier, C., 2019: TRPV1 promotes opioid analgesia during inflammation. *Sci. Signal.*, **12**, 711.
- Boyette-Davis, J. A.; Hou, S.; Abdi, S.; Dougherty, P. M., 2018: An updated understanding of the mechanisms involved in chemotherapy-induced neuropathy. *Pain management*, **8**, 363–375.
- Byrd-Leifer, C. A.; Block, E. F.; Takeda, K.; Akira, S.; Ding, A., 2001: The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. *European Journal of Immunology*, **31**, 2448–2457.
- Chen, Y.; Geis, C.; Sommer, C., 2008: Activation of TRPV1 contributes to morphine tolerance: involvement of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **28**, 5836–5845.
- Conductier, G.; Blondeau, N.; Guyon, A.; Nahon, J. L.; Rovère, C., 2010: The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. *Journal of Neuroimmunology*, **224**, 93–100.
- Damoiseaux, J. G.; Dopp, E. A.; Calame, W.; Chao, D.; MacPHERSONT, G. G.; Dijkstra, C. D.; William, S., 1994: Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology*, **83**, 140.
- Ding, Y. Q.; Kaneko, T.; Nomura, S.; Mizuno, N., 1996: Immunohistochemical localization of μ -opioid receptors in the central nervous system of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, **367**, 375–402.
- Dougherty, P. M.; Cata, J. P.; Cordella, J. V.; Burton, A.; Weng, H. R., 2004: Taxol-induced sensory disturbance is characterized by preferential impairment of myelinated fiber function in cancer patients. *Pain*, **109**, 132–142.
- Gao, Y. J.; Ji, R. R., 2010: Chemokines, neuronal–glial interactions, and central processing of neuropathic pain. *Pharmacology & Therapeutics*, **126**, 56–68.
- Guan, Z.; Kuhn, J. A.; Wang, X.; Colquitt, B.; Solorzano, C.; Vaman, S.; Guan, A. K.; Evans-Reinsch, Z.; Braz, J.; Devor, M.; Abboud-Werner, S. L.; Lanier, L. L.; Lomvardas, S.; Basbaum, A. I., 2016: Injured sensory neuron-derived CSF1 induces microglial proliferation and DAP12-dependent pain. *Nature neuroscience*, **19**, 94–101.
- Guha, M.; Mackman, N., 2001: LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular signalling*, **13**, 85–94.
- Heles, M.; Mrozkova, P.; Sulcova, D.; Adamek, P.; Spicarova, D.; Palecek, J., 2021: Chemokine CCL2 prevents opioid-induced inhibition of nociceptive synaptic transmission in spinal cord dorsal horn. *Journal of neuroinflammation*, **18**.
- Horwitz, S. M.; Koch, R.; Porcu, P.; Oki, Y.; Moskowitz, A.; Perez, M.; Myskowski, P.; Officer, A.; Jaffe, J. D.; Morrow, S. N.; Allen, K.; Douglas, M.; Stern, H.; Sweeney, J.; Kelly, P.; Kelly, V.; Aster, J. C.; Weaver, D.; Foss, F. M. et al., 2018: Activity of the PI3K- δ,γ inhibitor duvelisib in a phase 1 trial and preclinical models of T-cell lymphoma. *Blood*, **131**, 888.
- Huang, Z. Z.; Li, D.; Liu, C. C.; Cui, Y.; Zhu, H. Q.; Zhang, W. W.; Li, Y. Y.; Xin, W. J., 2014: CX3CL1-mediated macrophage activation contributed to paclitaxel-induced DRG neuronal apoptosis and painful peripheral neuropathy. *Brain, Behavior, and Immunity*, **40**, 155–165.
- Ji, R. R.; Chamesian, A.; Zhang, Y. Q., 2016: Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science (New York, N.Y.)*, **354**, 572–577.

- Kawasaki, K.; Akashi, S.; Shimazu, R.; Yoshida, T.; Miyake, K.; Nishijima, M., 2000: Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *The Journal of biological chemistry.*, **275**, 2251–2254.
- Komiya, H.; Takeuchi, H.; Ogawa, Y.; Hatooka, Y.; Takahashi, K.; Katsumoto, A.; Kubota, S.; Nakamura, H.; Kunii, M.; Tada, M.; Doi, H.; Tanaka, F., 2020: CCR2 is localized in microglia and neurons, as well as infiltrating monocytes, in the lumbar spinal cord of ALS mice. *Molecular Brain.*, **13**.
- Kwiatkowski, K.; Piotrowska, A.; Rojewska, E.; Makuch, W.; Mika, J., 2017: The RS504393 Influences the Level of Nociceptive Factors and Enhances Opioid Analgesic Potency in Neuropathic Rats. *Journal of Neuroimmune Pharmacology.*, **12**, 402–419.
- Kwiatkowski, K.; Popiolek-Barczyk, K.; Piotrowska, A.; Rojewska, E.; Ciapała, K.; Makuch, W.; Mika, J., 2019: Chemokines CCL2 and CCL7, but not CCL12, play a significant role in the development of pain-related behavior and opioid-induced analgesia. *Cytokine.*, **119**, 202–213.
- Li, Y.; Adamek, P.; Zhang, H.; Tatsui, C. E.; Rhines, L. D.; Mrozkova, P.; Li, Q.; Kosturakis, A. K.; Cassidy, R. M.; Harrison, D. S.; Cata, J. P.; Sapire, K.; Zhang, H.; Kennamer-Chapman, R. M.; Jawad, A. B.; Ghetti, A.; Yan, J.; Palecek, J.; Dougherty, P. M., 2015: The Cancer Chemotherapeutic Paclitaxel Increases Human and Rodent Sensory Neuron Responses to TRPV1 by Activation of TLR4. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.*, **35**, 13487–13500.
- Malyshev, I.; Malyshev, Y., 2015: Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage “Switch” Phenotype. *BioMed Research International.*, **2015**.
- McMahon, S.; Koltzenburg, M., 2006: *Wall and Melzack’s textbook of pain*. Elsevier. 5th ed. Elsevier/Churchill Livingstone, Philadelphia, Vol. 5th editio.
- Melkes, B.; Markova, V.; Hejnova, L.; Novotny, J., 2020: β -Arrestin 2 and ERK1/2 Are Important Mediators Engaged in Close Cooperation between TRPV1 and μ -Opioid Receptors in the Plasma Membrane. *International Journal of Molecular Sciences.*, **21**, 1–16.
- Merskey, H.; Bogduk, N., 1994: Merskey, H. and Bogduk, N. (1994) Classification of Chronic Pain. 2nd Edition, IASP Task Force on Taxonomy. IASP Press, Seattle. *Classification of Chronic Pain. 2nd Edition, IASP Task Force on Taxonomy*.
- Peng, J.; Gu, N.; Zhou, L.; B Eyo, U.; Murugan, M.; Gan, W. B.; Wu, L. J., 2016: Microglia and monocytes synergistically promote the transition from acute to chronic pain after nerve injury. *Nature communications.*, **7**.
- Pezet, S.; Marchand, F.; D’Mello, R.; Grist, J.; Clark, A. K.; Malcangio, M.; Dickenson, A. H.; Williams, R. J.; McMahon, S. B., 2008: Phosphatidylinositol 3-Kinase Is a Key Mediator of Central Sensitization in Painful Inflammatory Conditions. *The Journal of Neuroscience.*, **28**, 4261.
- Pierce, K. L.; Premont, R. T.; Lefkowitz, R. J., 2002: Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2002 3:9., **3**, 639–650.
- Piotrowska, A.; Kwiatkowski, K.; Rojewska, E.; Slusarczyk, J.; Makuch, W.; Basta-Kaim, A.; Przewlocka, B.; Mika, J., 2016: Direct and indirect pharmacological modulation of CCL2/CCR2 pathway results in attenuation of neuropathic pain — In vivo and in vitro evidence. *Journal of Neuroimmunology.*, **297**, 9–19.
- Raehal, K. M.; Walker, J. K. L.; Bohn, L. M., 2005: Morphine side effects in β -arrestin 2 knockout mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.*, **314**, 1195–1201.
- Roeckel, L. A.; Le Coz, G. M.; Gavériaux-Ruff, C.; Simonin, F., 2016: Opioid-induced hyperalgesia: Cellular and molecular mechanisms. *Neuroscience*.
- Scherer, P. C.; Zaccor, N. W.; Neumann, N. M.; Vasavda, C.; Barrow, R.; Ewald, A. J.; Rao, F.; Sumner, C. J.; Snyder, S. H., 2017: TRPV1 is a physiological regulator of μ -opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **114**, 13561–13566.

- Spicarova, D.; Palecek, J., 2009: The role of the TRPV1 endogenous agonist N-oleoyldopamine in modulation of nociceptive signaling at the spinal cord level. *Journal of Neurophysiology.*, **102**, 234–243.
- Spicarova, D.; Palecek, J., 2010: Tumor necrosis factor α sensitizes spinal cord TRPV1 receptors to the endogenous agonist N-oleoyldopamine. *Journal of Neuroinflammation.*, **7**, 49.
- Spicarova, D.; Nerandzic, V.; Palecek, J., 2011: Modulation of spinal cord synaptic activity by tumor necrosis factor α in a model of peripheral neuropathy. *Journal of Neuroinflammation.*, **8**, 177.
- Spicarova, D.; Adamek, P.; Kalynovska, N.; Mrozkova, P.; Palecek, J., 2014: TRPV1 receptor inhibition decreases CCL2-induced hyperalgesia. *Neuropharmacology.*, **81**, 75–84.
- Todd, A. J., 2010: Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature Reviews Neuroscience 2010 11:12.*, **11**, 823–836.
- Vardanyan, A.; Wang, R.; Vanderah, T. W.; Ossipov, M. H.; Lai, J.; Porreca, F.; King, T., 2009: TRPV1 Receptor in Expression of Opioid-Induced Hyperalgesia. *The Journal of Pain.*, **10**, 243–252.
- Wanderley, C. W.; Colón, D. F.; Luiz, J. P. M.; Oliveira, F. F.; Viacava, P. R.; Leite, C. A.; Pereira, J. A.; Silva, C. M.; Silva, C. R.; Silva, R. L.; Speck-Hernandez, C. A.; Mota, J. M.; Alves-Filho, J. C.; Lima-Junior, R. C.; Cunha, T. M.; Cunha, F. Q., 2018: Paclitaxel reduces tumor growth by reprogramming tumor-associated macrophages to an M1 profile in a TLR4-dependent manner. *Cancer Research.*, **78**, 5891–5900.
- Wang, X.; Bao, C.; Li, Z.; Yue, L.; Hu, L., 2022: Side Effects of Opioids Are Ameliorated by Regulating TRPV1 Receptors. *International journal of environmental research and public health.*, **19**.
- Watkins, L. R.; Maier, S. F., 2002: Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiological reviews.*, **82**, 981–1011.
- Woolf, C. J., 2011: Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain.*, **152**, S2.
- Zajaczkowska, R.; Kwiatkowski, K.; Pawlik, K.; Piotrowska, A.; Rojewska, E.; Makuch, W.; Wordliczek, J.; Mika, J., 2020: Metamizole relieves pain by influencing cytokine levels in dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain. *Pharmacological reports : PR.*, **72**, 1310–1322.
- Zhang, H.; Boyette-Davis, J. A.; Kosturakis, A. K.; Li, Y.; Yoon, S. Y.; Walters, E. T.; Dougherty, P. M., 2013: Induction of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and its receptor CCR2 in primary sensory neurons contributes to paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *The journal of pain.*, **14**, 1031–1044.
- Zhang, H.; Li, Y.; De Carvalho-Barbosa, M.; Kavelaars, A.; Heijnen, C. J.; Albrecht, P. J.; Dougherty, P. M., 2016: Dorsal Root Ganglion Infiltration by Macrophages Contributes to Paclitaxel Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *The journal of pain.*, **17**, 775–786.
- Zhang, J.; De Koninck, Y., 2006: Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *Journal of neurochemistry.*, **97**, 772–783.
- Zhang, N.; Rogers, T. J.; Caterina, M.; Oppenheim, J. J., 2004: Proinflammatory chemokines, such as C-C chemokine ligand 3, desensitize mu-opioid receptors on dorsal root ganglia neurons. *The Journal of Immunology.*, **173**, 594–599.
- Zhao, C. mei; Guo, R. xian; Hu, F.; Meng, J. lan; Mo, L. qiu; Chen, P. xi; Liao, X. xue; Cui, Y.; Feng, J. qiang, 2012: Spinal MCP-1 contributes to the development of morphine antinociceptive tolerance in rats. *The American journal of the medical sciences.*, **344**, 473–479.
- Zhou, H. Y.; Chen, S. R.; Chen, H.; Pan, H. L., 2010: Opioid-induced long-term potentiation in the spinal cord is a presynaptic event. *Journal of Neuroscience.*, **30**, 4460–4466.
- Zhuang, Z. Y.; Xu, H.; Clapham, D. E.; Ji, R. R., 2004: Phosphatidylinositol 3-kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization. *The Journal of*

List of publications related to the doctoral thesis:

Heles M, Mrozkova P, Sulcova D, Adamek P, Spicarova D, Palecek J. Chemokine CCL2 prevents opioid-induced inhibition of nociceptive synaptic transmission in spinal cord dorsal horn. *Journal of Neuroinflammation*. 2021 Dec 2;18(1):279. doi: 10.1186/s12974-021-02335-4.

(**IF = 9,587**, Quartile 1, Times Cited: 1, 8/2022 from WoS)

Adamek P, **Heles M**, Bhattacharyya A, Pontearso M, Slepicka J, Palecek J. Dual PI3K δ/γ Inhibitor Duvelisib Prevents Development of Neuropathic Pain in Model of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. *Journal of Neuroscience*. 2022 Mar 2;42(9):1864-1881. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1324-21.2021.

(**IF = 6,709**, Quartile 1, Times Cited: 1, 8/2022 from WoS)

Adamek P, **Heles M**, Palecek J. Mechanical allodynia and enhanced responses to capsaicin are mediated by PI3K in a paclitaxel model of peripheral neuropathy. *Neuropharmacology*. 2019 Mar 1;146:163-174. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.11.027.

(**IF = 4,249**, Quartile 1, Times Cited: 15, 8/2022 from WoS)