

transient induced by control dorsal root stimulation. Using this model together with transgenic labeling of specific neuronal populations could be useful in the future, especially for pharmacological testing of new analgesic drugs.

## SOUHRN PRÁCE

Předkládaná disertační práce má za cíl přispět k objasnění míšních mechanismů nocicepce. Jedním z důležitých mechanismů podílejících se na vzniku a průběhu řady chronických bolestivých stavů je tzv. centrální sensitizace. Jedná se o formu dlouhodobé modulace synaptického přenosu na míšní úrovni, neboli synaptické plasticity.

Tato studie se ve své hlavní části zabývá vývojem metody, která by s využitím techniky Ca imagingu umožnila studovat mechanismy centrální sensitizace *in vitro* na populaci neuronů zadního míšního rohu. V pokusech provedených na akutních míšních řezech jsme snímali změny fluorescence u Ca-senzitivní sondy FLUO-4 v neuronech zadního míšního rohu. Analýza změn intracelulární koncentrace Ca, ke kterým docházelo během synaptického přenosu vyvolaného stimulací zadního kořene míšního, odhalila dva odlišné typy Ca odpovědí. První typ odpovědi byl synchronizovaný s elektrickou stimulací, zatímco druhý typ, odpovídající uvolnění Ca z vnitřních Ca zdrojů, následoval po určité časové prodlevě po stimulaci. Tyto pozdní Ca odpovědi, nezávislé na aktivaci ionotropních glutamátových receptorů, naznačují zapojení metabotropních drah při jejich aktivaci a nebyly doposud u tohoto typu neuronů zaznamenány. Je možné usuzovat, že takto uvolněný vápník, o kterém se uvažuje jako o klíčovém spouštěcím signálu neuronální sensitizace v míše, se může významným způsobem podílet i na vzniku některých typů chronických bolestivých syndromů.

Významnou roli v udržování neuronální Ca homeostázy mají Ca pufry. V dalších experimentech jsme proto zkoumali změny v expresi parvalbuminu (PV) v míše a PV, calbindinu (CB) a calretininu (CR) u míšních retrográdně značených spinothalamických (STT) neuronů u modelu arthritidy. Zánět indukoval významné snížení exprese PV v neuropilu v ipsilaterální části zadního rohu míšního. U retrográdně značených STT neuronů byl zjištěn významný nárůst PV a CB, zatímco počet CR pozitivních neuronů se u tohoto experimentálního modelu nezměnil. Získaná data naznačují, že změna v expresi Ca vázajících proteinů může mít významný vliv na Ca homeostázu a modulaci synaptického přenosu.

S využitím Ca imagingu jsme vyvinuli *in vitro* model centrální sensitizace neuronů zadního míšního rohu. Tato metoda, narozdíl od techniky patch clamp, umožňuje snímání intracelulárních

Ca změn současně v početné populaci neuronů zadního rohu. Centrální sensitizaci jsme v našem modelu navodili aplikací capsaicinu, který aktivuje TRPV1 receptory na primárních aferentech v míše a vede k sensitizaci neuronů zadního míšního rohu. Míra sensitizace byla měřena jako zvýšení intracelulární koncentrace Ca v odpovědi na kontrolní stimulaci zadního míšního kořene. Využití *in vitro* modelu centrální sensitizace, spolu s genetickým značením určitých neuronálních populace, by mohlo v budoucnu přinést výsledky při hledání nových látek s analgetickým účinkem.

## INTRODUCTION

The information conveyed during neuronal communication is at subcellular level coded into finely tuned calcium signals operating on broad temporal and spatial scales (Berridge, 1997, 1998). The neuronal Ca concentration change due to synaptic transmission is known to trigger multiple intracellular events. The process of special importance unique to the nervous system is synaptic plasticity. Various forms of positive and negative feedback reactions modulate synaptic transmission either directly by interacting with plasma membrane receptors (short-term synaptic plasticity) or by changing membrane receptors' composition by activating the neuron's proteosynthetic machinery (long-term synaptic plasticity). There are two principal sources elevating cytoplasmic Ca concentration during neuronal excitation: the extracellular Ca pool, accessible mainly through voltage-gated calcium channels (VGCC) and NMDA receptors/channels (Mayer et al., 1987). The second are intracellular Ca stores (endoplasmic reticulum, ER and mitochondria) releasing Ca into cytoplasm by activating IP3 and ryanodine receptors. ER is an important component of Ca homeostasis, which can be demonstrated by the fact that its impairment is a key factor in induction of multiple pathological states (Verkhratsky, 2005) including various chronic pain-related pathological states like diabetic sensory polyneuropathy-induced allodynia and hyperalgesia (Voitenko et al., 1999; Kruglikov et al., 2004; Li et al., 2005).

Another critical component of the Ca homeostatic system are cytoplasmic protein molecules binding free Ca ions, thus serving as mobile endogenous buffers, decreasing free Ca concentration about 95% and Ca binding/activation of other molecules (Neher and Augustine, 1992). These proteins can substantially affect the spatiotemporal characteristics of any intracellular Ca concentration change depending on their respective biophysical Ca-binding characteristics. One of these Ca buffers, present in the spinal cord dorsal horn, is protein parvalbumin (PV), which is a slow buffer involved in modulation of synaptic transmission. It accelerates initial decay of the Ca transient and ensures residual calcium clearance (Müller et al.,