

SUMMARY OF THE THESIS

This study was designed to improve our knowledge regarding mechanisms of nociceptive signaling at spinal cord level. One of the forms of spinal cord synaptic transmission modulation is central sensitization, a manifestation of synaptic plasticity at spinal cord level, which was found to be present at many chronic pain syndromes. This study deals mainly with a development of calcium imaging technique with a final goal to study mechanisms of central sensitization *in vitro* on population of dorsal horn neurons.

We have analyzed synaptically evoked intracellular Ca changes as a result of dorsal root stimulation in a superficial dorsal horn area in spinal cord slices and found two types of Ca responses: one synchronized with electrical stimulation and a second one, delayed response due to Ca release from internal stores. The delayed Ca release was not previously shown to be present in these neurons and it was not dependent on activation of ionotropic glutamatergic receptors, suggesting involvement of metabotropic receptor pathway. The presence of this delayed type of Ca response could have a significant role in the induction of some types of chronic pain syndromes since intracellular calcium increase is thought to be a key trigger point in spinal cord neurons sensitization.

An important role in neuronal calcium homeostasis play calcium buffers. We have focused on their possible role in pathological pain states using experimental model of arthritis to study changes in expression of Ca buffer parvalbumin (PV) in the spinal cord and Ca buffers PV, calbindin (CB), and calretinin (CR) in retrogradely labeled spinothalamic tract (STT) neurons. In our experiments, arthritis induced significant PV downregulation in the ipsilateral dorsal horn neuropil. Some of the results also suggested that these changes could occur in GABAergic neurons located in this dorsal horn area. In retrogradely labeled STT neurons, PV and CB were significantly upregulated, while the number of CR positive neurons did not differ. These results suggest that change in Ca binding proteins (CBP) expression could have a significant effect on Ca homeostasis and possibly on modulation of synaptic activity.

Using the spinal cord slices Ca imaging we have developed an *in vitro* model of dorsal horn neurons sensitization. Bulk loading of the slice with fluorescent probe enabled us to study intracellular Ca changes in a population of dorsal horn neurons. This was of great advantage compared to the patch clamp technique that enables to study just one or two neurons simultaneously. Capsaicin was used to activate TRPV1 receptors present on primary afferent fibers and to induce sensitization of dorsal horn neurons, recorded as an increase of intracellular Ca

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