Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Mechanizmy bolestivých stavů

Petra Mrózková

Bakalářská práce

Praha, 2009
Školitel: MUDr. Jiří Paleček CSc

Anotace

Bolest je odnepaměti vnímána jako nepříjemný pocit ztrpčující život. Způsoby tišení bolesti byly v popředí zájmu před tisíci lety a dodnes jsou předmětem intenzivního výzkumu. Bolest je smyslový a emocionální zážitek, který vnímáme jako nebezpečí, ohrožení nebo poškození. Za normálních okolností je hlavni úlohou bolesti signalizace možného poškozeni organizmu. Naproti tomu, patologické bolestivé stavy ztrácejí tuto fyziologickou signalizační funkci a naopak samy organizmus poškozují.

Na vzniku bolesti se podílí řada nociceptivních mechanismů které mohou modulovat vnímání daného podnětu a to od vzniku akčního potenciálu v periferním nervovém zakončení až po jeho zpracování v CNS. Mechanismy patologických bolestivých stavů charakterizovaných zvýšenou citlivosti k podnětům jsou zejména periferní a centrální. Periferní představují především snížení prahu aktivace nociceptorů, centrální pak zejména modulaci na míšní úrovni, kde působí celá řada presynaptických i postsynaptických faktorů.

V poslední době byly charakterizovány TRPV1 receptory, plnící funkci polymodálního senzoru se základním významem při přenosu a modulaci bolesti. Aktivace TRPV1 receptorů na periferních nociceptorech vyvolává bolest, zatímco jejich aktivace na míšní úrovni vede k modulaci nociceptivní signalizace. Také cytokiny jako TNF-alfa mají výrazné pronociceptivní účinky jak na periferii tak na míšní úrovni. Výzkum mechanismů patologických bolestivých stavů nám umožní najít nové cíle pro jejich léčbu s minimem vedlejších účinků.

Annotation

The pain has always been perceived as the unpleasant feeling. Ways of pain relief were in the center of interest a thousand years ago and are subject of intensive research until nowadays. Pain is the sensual and emotional experience, which is perceived by humans as a possible danger or damage. Under normal conditions its major function is to signal potential damage of the tissue. Under pathological pain states, pain looses the protective signaling function, and it damages the organism itself.

Number of nociceptive mechanisms which can modulate the perception of the given stimulus from the generation of the action potential in the peripheral nociceptor, up to its processing in the CNS, participate in the pain perception. Mechanisms of pathological pain states, characterized by increased sensitivity to peripheral stimuli are mainly of peripheral and central origin. The peripheral ones include decrease of the nociceptor activation threshold. The central mechanisms represent among others, modulation of nociceptive signaling at the spinal cord level, where the whole range of presynaptic and also postsynaptic factors are in play.

Recently, there have been characterized TRPV1 receptors, polymodal sensor with the basic importance in the transmission and modulation of pain. The activation of TRPV1 receptors on the peripheral nociceptors induces pain, while their activation at the spinal level leads to the modulation of the nociceptive signaling. Also cytokines, such as TNF-alfa, have significant pronociceptive effects, both on the periphery and in the spinal cord. The research of the pathological pain states mechanisms will enable us to find new targets for their therapy with minimum of side effects.

Klíčová slova: bolest, nocicepce, nociceptor, spinální ganglia, mícha, TRPV1, TNFα

Keywords: pain, nocicepce, nociceptor,spinal ganglion, spinal cord, TRPV1, TNFα

Prohlášení o samostatném vypracování práce

Předkládám tímto k posouzení a obhajobě bakalářskou práci, zpracovanou na závěr bakalářského studia na Přírodovědecké fakultě, Univerzity Karlovy v Praze. Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, s použitím odborné literatury a pramenů, uvedených v seznamu, který je součástí této bakalářské práce, pod vedením MUDr. Jiřího Palečka CSc.

Poděkování

Děkuji vedoucímu mé bakalářské práce MUDr. Jiřímu Palečkovi CSc za vedení, rady a vstřícný přístup, které mi v průběhu psaní bakalářské práce poskytoval.

Osnova:

strana

1. Úvod……6
2. Anatomické a fyziologické podklady nociceptivního systému……..7
2.1. Mechanismy nocicepce……7
2.2 Primární aferentní vlákna ……8
2.3. Spinální ganglia……..10
2.4. Mícha……..11
2.5. Gliové buňky a jejich význam v nocicepci……..……..13
2.6. Vzestupné a sestupné dráhy míšní…… ……15
2.7. Centrální nervový systém……..17
3. Neurotransmitery a Modulátory nociceptivních signálů……..18
3.1. Excitační aminokyseliny a jejich receptory ……..18
3.2. Neuropeptidy modulující nocicepci……...20
3.3. Další pronociceptivní mediatory……...20
3.4. Inhibiční neuromediátory……..……21
3.5. Opioidní receptory a mediatory……..……...21
4. Patofyziologické mechanismy bolesti……..……22
4.1. Klasifikace bolesti……..22
4.2. Patologické bolestivé stavy……22
4.3. Příčiny patologické bolesti……23
5. TRPV1 receptory a jejich funkce……..25
5.1. Molekulární stavba TRPV1 receptoru……....26
5.2. Aktivace TRPV1 receptoru……....27
5.3. Senzitizace TRPV1 receptoru ……...……....28
5.4. Antagonisté- desenzitizace TRPV1 receptoru……..…..29
6. Tumor nekrotizující faktor (TNFα)……..……30
7. FOS protein……..……31
8.Závěr……..……32
9. Vlastní práce……33
10. Seznam použité literatury……35

Zkratky

AMPA	DL-alfa-NH2-2,3-dihydro-5-methyl-3-oxo-4-isoxazolpropanová kyselina
ATP	adenosin trifosfát
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CNS	centrální nervový systém
DH	Dorsal horn - zadní roh míšní
DRG	dorsal root ganglion – zadní spinální ganglion
EAA	excitační aminokyseliny
EXIN	excitační intrasegmentální neuron
GABA	kyselina γ-amino-máselná
Glu	glutamát
IN	intrasegmentální neuron
ININ	inhibiční intrasegmentální neuron
KA	kainát
LTP	long-term potentiation - dlouhodobá potenciace
NGF	nerve growth factor – neurofrofní růstový faktor
NK	neurokinin
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NO	oxid dusnatý
NS	nervový systém
PGE2	prostaglandin E2
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PLC	fosfolipáza C
PN	projekční neuron
SP	substance P
STT	tractus spinothalamicus
TNF	Tumor necrosis factor-tumor nekrotizující faktor
TRP	transient receptor potential
TRPV	Transient receptor potential vaniloid
WDR	wide dynamic range
5-HT	Serotonin

1. Úvod

Mezinárodní asociace pro studium bolesti IASP - International Association for the Study of Pain definuje bolest takto: „Bolest je nepříjemný smyslový a emociální zážitek, který vnímáme jako skutečné nebo potenciální poškození tkání, orgánů a organismu. Bolest je vždy subjektivní.“

Bolest je fyziologický děj. Fyzický či psychický pocit který je vždy subjektivně nepříjemně vnímán, většinou spojený s poškozením tkáně organismu. Má velký význam pro ochranu organizmu před poškozením, je stimulem pro obranné reakce odstraňující ohrožující podněty. Reakce na bolest je nejvnitřnější a nejsilnější reakcí organismu. Práh bolesti je pro každého člověka individuální a z větší části závislý na psychických pochodech, určitým ,,tréninkem,, ho lze dokonce do určité míry posunout. Intenzita bolestivého podnětu tedy nemusí odpovídat pociťované bolesti. Bolest obvykle vyvolává silný podnět aktivující nociceptory, ale může ji způsobit i přímé poranění senzorických vláken nebo poranění CNS. Fyziologická bolest je tedy pro organismus prospěšná, na rozdíl od chronické nebo neuropatické bolesti která je patologickým znakem. Individuální rozdíly ve vnímání bolesti jsou závislé na subjektivním zpracování podnětů. Řadu dějů podílejících se na vzniku bolesti však lze objektivně rozpoznat.

Nocicepce je proces detekce a signalizace přítomnosti bolestivého podnětu. Vzniká podrážděním nociceptorů. Nociceptivní znamená vyvolávající bolest. Nejlépe prostudovanou oblastí vzniku a modulace přenosu bolestivé informace jsou periferní aferentní vlákna a oblast zadního rohu míchy. Tam také dochází k prvotnímu zpracování nociceptivních podnětů. Naproti tomu ale samotnou aktivitu nociceptorů ještě za bolest považovat nelze, bolest má vždy i psychologickou složku. Bolest vzniká jako interakce mnoha složek a jde o složitý komplexní mechanismus dějů.

Je možné dělit bolest na fyziologickou a patologickou. Fyziologická bolest je tělu přirozená a prospěšná. Umožňuje odlišit potencionálně poškozující podnět od neškodného. U patologické bolesti tomu tak není. Bolest je velmi plastický mechanizmus nejen z pohledu psychického ale i anatomického a fyziologického. Různými vlivy může docházet ke změnám funkce i struktury drah vedoucí bolest. Informace o bolestivém podnětu je zpracovávána a modulována na všech úrovních svého přenosu. Poškozením nebo ovlivněním jediné složky může dojít k útlumu nebo zvýšení pocitu bolesti, nebo i také k rozvoji patologické bolesti.

Cílem této práce je předložit základní poznatky o přenosu a zpracovávání nociceptivních podnětů a jejich modulaci na míšní úrovni. Dále bych se zde chtěla věnovat roli těchto mechanizmů v patologických bolestivých stavech. Hlavní pozornost je věnována

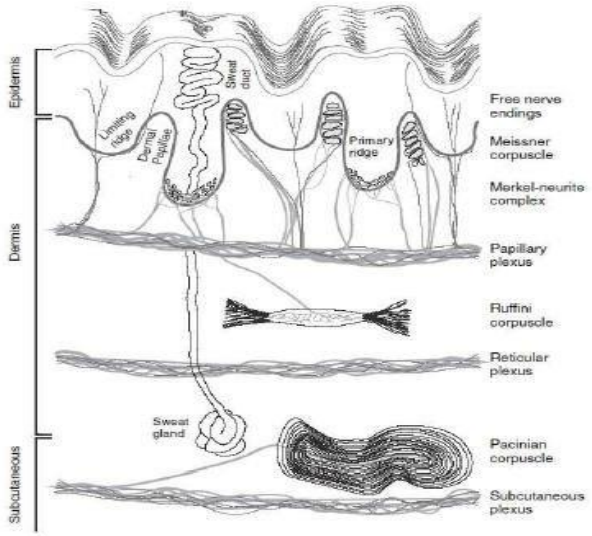
funkci TRPV1 receptorů a TNF-α při modulaci nociceptivních signálů na míšní úrovni. Tomuto tématu se věnuji experimentálně v laboratoři MUDr. Jiřího Palečka a získané výsledky budou podkladem mojí diplomové práce.

2. Anatomické a fyziologické mechanismy nocicepce

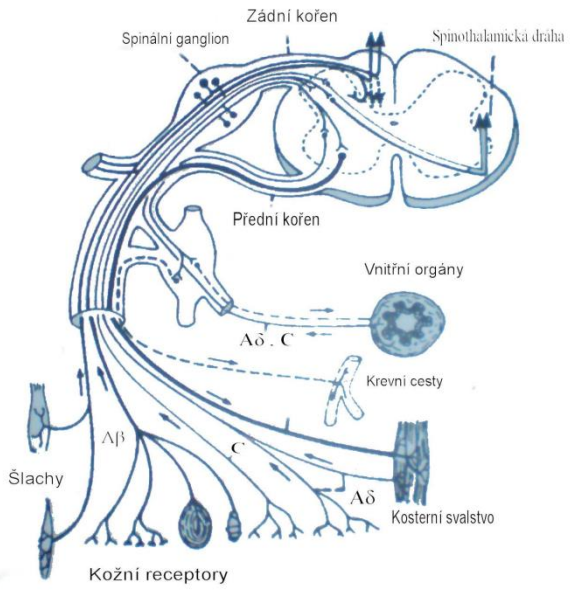
Bolest je za normálních okolností způsobena přímou aktivací nociceptorů nadprahovým bolestivým podmětem. Tato aktivace vede ke vzniku akčního potenciálu na periferních aferentních vláknech (PAF), jenž pak předávají informaci o nociceptivním podnětu přes míchu, mozkový kmen, thalamus až do kortikolimbických center. V mozku je senzorická informace zpracovávána a vyhodnocována. Informace může být modulována ve volných nervových zakončeních na periferii, v míše i v mozku, tedy na všech úrovních nociceptivního systému. (Scholz 2002)

2.1. Mechanismy nocicepce

Procesu kdy vnější podněty aktivují nociceptory v periferních zakončeních senzorických neuronů se říká transdukce. Pro vznik nociceptivních signálů jsou nejdůležitější volná nervová zakončení. Při transdukci se uplatňují volná zakončení polymodálních neuronů která projikují až do povrchové vrstvy epidermis(Obrázek 1), vnitřních orgánů, hladkých a kosterních svalů, kloubů i šlach(Obrázek 2). (Dubner 1999)



Obrázek 1. Příčný průřez kůží - Volná nervová zakončení v kůži (upraveno podle Neuroscience, Fourth edition, Sinauer Associatec Inc p.214)



Obrázek 2. Schéma periferní inervace senzorickými nociceptivními vlákny (Upraveno podle Priciples of Neuroscience, 2001)

Volná nervová zakončení reagují na širokou škálu podnětů, chemických i fyzikálních (tepelných i mechanických) díky přítomnosti specifických receptorů. Aktivace těchto receptorů vede k depolarizaci buněčné membrány a následně vzniku akčního potenciálu. Podněty však musí dosáhnout jisté intenzity - prahu, aby dostatečně depolarizovaly membránu nervových zakončení a došlo k aktivaci napěťově závislých iontových kanálů a vzniku akčního potenciálu. Nociceptory za normálních okolností na podněty nízké intenzity nereagují. Šířící se akční potenciál je pak dále veden po nervovém vlákně. Biochemické a elektrické procesy kterými je nervová aktivita dále vedena do centrálního nervového systému CNS jsou nazývány transmise. (Stucky 2001)

2.2 Primární aferentní vlákna

Primární aferentní vlákna jsou to výběžky neuronů, jejichž těla jsou uložena v dorzálních spinálních gangliích (DRG). Dělíme je podle průměru, struktury (myelinová pochva) a rychlosti vedení vzruchu.

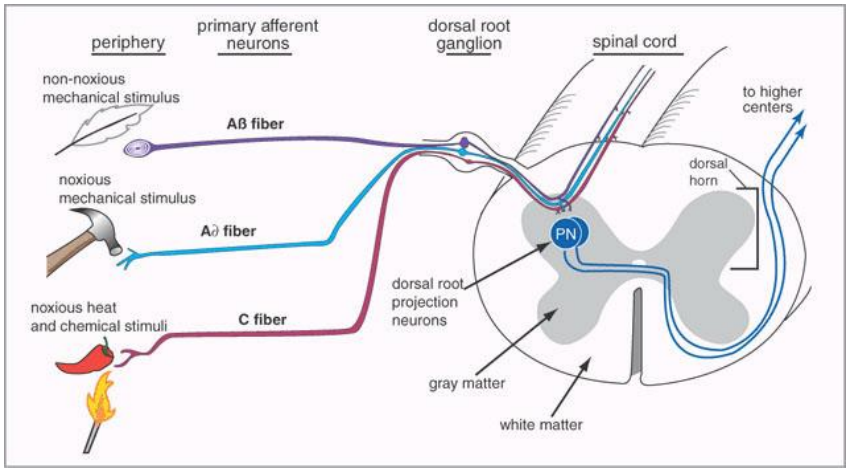
Rozlišujeme vlákna →

- Aβ - silná s průměrem> 10 μm, jsou myelinizovaná, velmi rychle vedoucí 30-120 m/s
- Aδ - středně silná o průměru 2-6 μm, myelinizovaná se střední rychlostí vedení 12-30m/s
- C - tenká o průměru 0,4-1,2 μm, nemyelizovaná, s pomalým vedením vzruchu 0,5-2 m/s

Rychlost vedení vzruchu a průměr nervových vláken se liší u člověka a různých živočišných druhů. Uvedené údaje jsou pro člověka. Za fyziologických podmínek přenášejí nociceptivní podněty pouze C a Aδ vlákna. Aβ vlákna odpovídají na dotek, vibrace a tlak.

Po vystavení kůže nociceptivnímu podnětu jsou aktivována rychle vedoucí vlákna Aδ které odpovídají za prvotní ostrou, rychlou a palčivou bolest a C vlákna odpovědné za tupou a pomalou bolest. Vlákna Aδ se dají ještě rozdělit na dva typy, typI.a typII. Aδ vlákna prvního typu reagují na mechanické podněty o vysoké intenzitě, ale jsou málo citlivé k podnětům tepelným a chemickým. Druhý typAδ vláken je naopak k těmto podnětům citlivější a reaguje na ně i při nízké intenzitě. C vlákna jsou polymodální a reagují na chemické, tepelné a mechanické podněty. (Obrázek 3). (Dubner 1999)

Některá z C vláken jsou nazývána takzvanými spícími-tichými (silent) nociceptory které za fyziologických podmínek neodpovídají na nociceptivní podněty. Při poškození nebo zánětu tkáně jsou tyto vlákna senzitizována a aktivována různými chemickými mediatory vylučovanými z postižených buněk. Po aktivaci pak většinou velmi intenzivně reagují na mechanické podněty. Aktivace těchto tzv. spících nociceptorů přispívá k sumaci signálů z periferie tím, že zvyšuje aferentaci C-vláken do zadních rohů míšních. (Belmonte 1996, Handwerker 1993, Treed 1990)



Obrázek 3. Typy periferních aferentních vláken (podle Stephen M. Stahl,: Stahl's Essential Psychopharmacology 3rd Edition, Cambridge University Press 2008)

Akutní bolest je nejčastěji způsobena poškozením celistvosti organismu.Vzniká přímým působením fyzikálních, chemických látek na nociceptory. Z poraněných buněk se vylévá obsah bohatý na kationy a zdroje energie. Vyplavování kationů vyvolá pokles pH

v mezibuněčném prostoru, což k nocicepci výrazně přispívá. Do místa poškození je také přiváděna řada buněk nesených krevním oběhem, např. makrofágy, žírné buňky, T buňky a další krevní elementy které působí pronociceptivně. Poraněné buňky i buňky v okolí také produkují látky jako cytokiny, růstové faktory a prostaglandiny, působí jako přímé aktivátory nociceptorů nebo jako mediatory zvyšující citlivost nociceptorů. Nejvýznamnějšími jsou prostaglandin E2 (PGE2), bradikinin a NGF (nerve grou faktor).

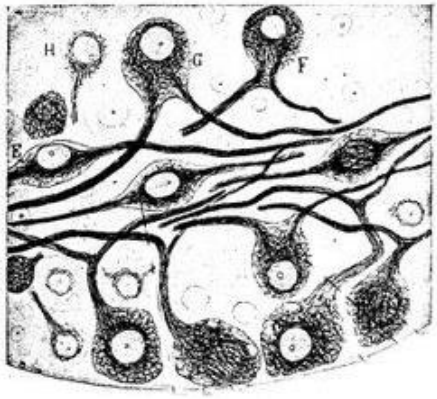
Dlouhotrvající a intenzivní bolestivá stimulace a dlouhodobé působení pronociceptivních látek může způsobit změny v NS a vést až k rozvoji patologických bolestivých stavů. Vlastnosti a citlivost senzorických neuronů je dána zejména typem a počtem nociceptivních receptorů exprimovaných na jejich povrchu a jejich funkčními vlastnostmi. Změna počtu, typu nebo vlastností těchto receptorů může vést ke změně funkce celého nervového zakončení. Chemické látky vedoucí k senzitizaci nociceptorů a k zvýšení jejich odpovědi na nadprahové podměty se většinou váží na receptory spřažené s G proteiny, které pak mohou působit prostřednictvím druhých poslů, jak na funkční vlastnosti receptorů (např. fosforylace), tak na expresi proteinů v buňce. (Julius 2001)

2.3. Spinální ganglia

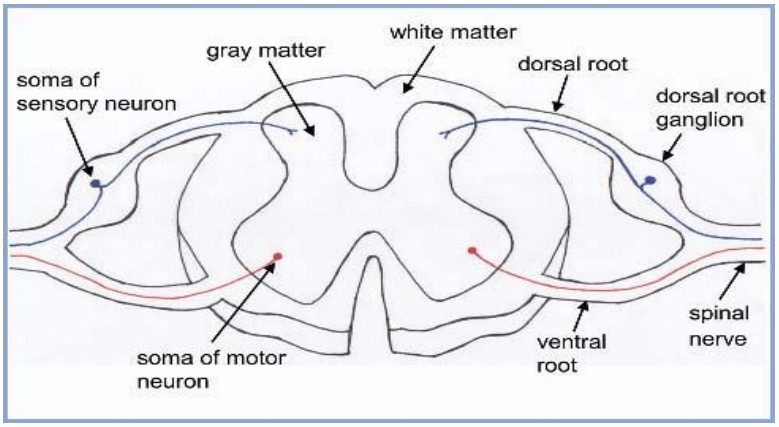
Těla neuronů periferních aferentních vláken jsou uložena ve spinálních gangliích (Obrázek 4). Prostřednictvím jejich dendritů jsou přijímány senzorické i nociceptivní informace a jejich axony - centrální výběžky, tvoří synapse s neurony zadních rohů míšních (DH), které předávají informaci dále. (Obrázek 5) Některá PAFs projikují až přímo do jader prodloužené míchy (gracilis a cuneatus).

Ve spinálních gangliích se neurony nejprve vyvíjejí jako bipolární neurony, poté se jejich hlavní výběžek rozdělí a stávají se z nich pseudounipolární neurony. Neurony spinálních ganglií mají funkci přijímat a zprostředkovávat informace z vnějšího světa a předávat je centrálnímu systému. Neurony spinálních ganglií mají různý průměr těla. Velikost těla neuronu obvykle odpovídá velikosti periferního nervového vlákna, které z něj vychází. Periferní C vlákna jsou tedy výběžky neuronů s malým průměrem.

Neurony spinálních ganglií můžeme také dělit podle obsahu různých neurotransmiterů a neuromodulátorů. Neurony dávající vznik nociceptorům jsou většinou charakterizovány přítomností velkého obsahu různých peptidů.(Millan 1999)



Obrázek 4. Histologický řez spinálním gangliem – uložení těl neuronů (podle Ramon, Cajal, Fernan-Nunez: Histology 1933)



Obrázek 5. Uložení spinálních ganglii vzhledem k míše (podle Janifer Tobin: Neuroanatomy book 2006)

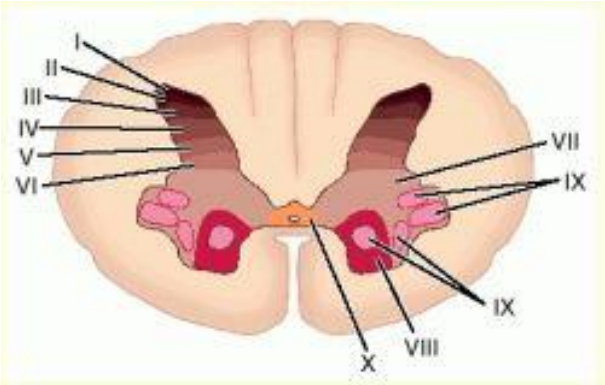
2.4. Mícha

Mícha vyplňuje celý páteřní kanál, je obalena míšními obaly. Na příčném řezu míchou je dobře vidět její organizace. Centrálně je uložena šedá hmota, periferně pak bílá hmota. Mícha je obalená třemi vrstvami ochranných membrán - tvrdou plenou, pavučnicí a měkkou plenou. Středem probíhá míšní kanálek vystlaný ependymem naplněný likvorem a obklopený vrstvou gliových buněk.

Šedá hmota míšní má charakteristický tvar motýlích křídel. V předních rozích míšních se nachází velké multipolární motorické neurony, v zadních rozích dochází k přepojení senzorických vláken ze spinálních ganglií na míšní neurony – první synapse a nalézají se zde zakončení descendentních drah ze supraspinálních oblastí.

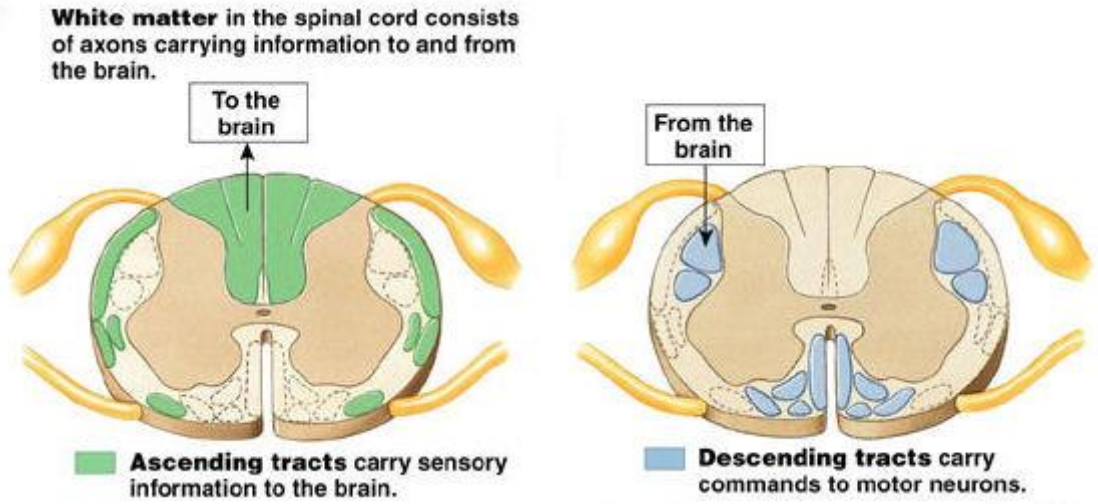
Šedá hmota je organizována do 10 vrstev, takzvaných Rexedovych lamin (Obrázek 6). Zadní roh je tvořen laminou I.(marginální zóna), laminou II. (substantia gelatinosa), laminami

III a IV (nucleus proprius), dále pak V a VI laminou (hluboké vrstvy). Laminy VII. až IX. představují přední rohy míšní. Lamina X. obkružuje centrální kanál. Do příjmu, zpracování a transmise nociceptivní informace se přednostně zapojují laminy I, vnější část laminy II, dále pak i lamina V. VI. a X. (Swett a Woolf 1985, Todd 1993).



Obrázek 6. Organizace lamin šedé hmoty na příčném řezu míchou (podle Saunders: Dorland's Medical Dictionary for Health Consumers, Elsevier Inc 2007)

Bílá hmota v míše obklopuje ze všech stran hmotu šedou, která ji svými rohy rozděluje na tři základní provazce přední, zadní a boční - funiculus anterior, posterior, lateralis. V bílé hmotě probíhají míšní vzestupné a sestupné dráhy (Obrázek 7). Bílá hmota je seskupena do svazků (drah, traktů), přední provazce míšní vedou zejména vlákna motorická, zadní provazce míšní vedou vlákna senzitivní, postranní provazce - oba typy vláken. Vlákna v blízkosti šedé hmoty tvoří převážně krátké intersegmentální neurony spojují různé horizonty šedé hmoty mezi sebou.



Obrázek 7. Organizace bílé hmoty na příčném řezu míchou (upraveno podle Benjamin Cummings: Get Ready for Biology, Pearson Education Inc. 2006)

Vstup nociceptivních vláken do míchy je přesně prostudován. Nociceptivní PAF vlákna vstupují zadními (dorzálními) kořeny do zadních rohů míšních (DH). Experimentálně byla také prokázána existence nociceptivních vláken (velmi malá část) vstupujících předními (ventrálními) kořeny. Tyto vlákna se ale poté buďto vrací do zadních rohů nebo se ztrácejí. Vlákna nesoucí informace o nociceptivních podnětech jsou v míše vedena do zadních rohů zejména do I. a II. laminy. C a Aδ vlákna vstupují hlavně do I. laminy a do povrchové vrstvy II. laminy zadního rohu míchy. Vlákna Aβ projikují převážně do III. a IV. laminy.

Neurony zadních rohů míchy rozdělujeme podle jejich odpovědi na periferní podněty, na 3 základní typy, nociceptivně specifické neurony (odpovídají pouze na silné poškozující podněty), neurony se širokým dynamickým rozsahem (wide-dynamic range - WDR) odpovídají na celou škálu podnětů od slabých po silné a neurony odpovídající s největší intenzitou na slabé podněty (low threshold - LT).

První typ - nociceptivně specifické neurony, jsou aktivovány výhradně nociceptivními podněty a vedeny C a Aδ aferentními vlákny. Druhý typ - WDR neurony odpovídají na širokou škálu podnětů, dochází v nich k sbíhání řady signálů a to nejen z kůže, ale i z vnitřních orgánů a kloubů. Jsou excitovány podněty mechanickými, tepelnými i chemickými. Za normálních okolností kódují intenzitu podnětu frekvencí svých akčních potenciálů. Třetím typ jsou LT neurony reagující zejména na lehké tlakové podněty a přímo se neúčastní vedení bolesti.

Neurony v míše se také dají rozdělit na supraspinální (projekční neurony) a propriospinální interneurony. Supraspinální vedou nociceptivní informace supraspinálně do vyšších mozkových center. Propriospinální intersegmentální a intrasegmentální neurony hrají důležitou roli v propojení, komunikaci, modulaci a integraci informací. Propriospinální neurony se rozdělují na excitační a inhibiční. Významnou úlohu v modulaci nociceptivní signalizace v míše hrají i gliové a imunokompetentní buňky. Jejich interakce jak s neurony tak s ostatními buňkami hraje velkou roli v adaptaci nociceptivního systému. (Cervero 1995A, 1995B, Dubner 1983A a 1983B, Mense 1993, Millan 1999, Swett a Woolf 1985)

2.5.Gliové buňky

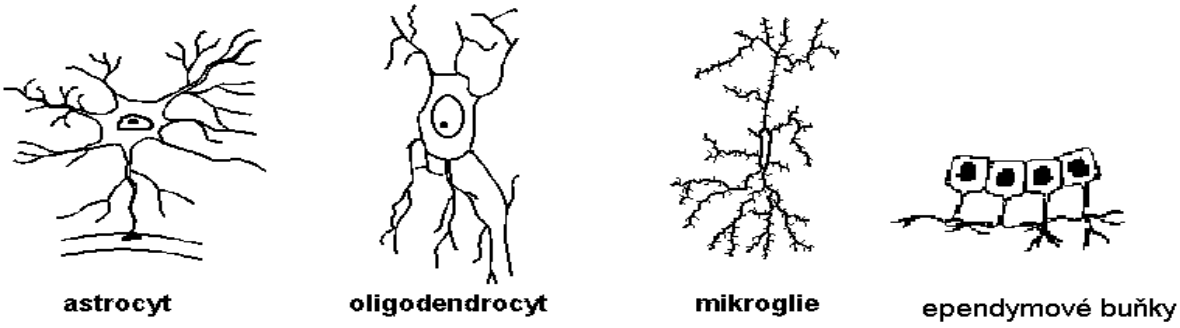
Kromě neuronů se na udržení správného chodu nervového systému podílí i gliové buňky, které tvoří druhou složkou nervového systému. Zajišťují výživu, ochranu a vytvářejí podpůrný systém pro neuronální růst. Udržují stálé prostředí, nezbytné pro funkci neuronů a plní také funkci nervového imunitního systému. Jsou zásobárnou energie, kterou neuronům dodávají. Neurony dokáží přijímat energii jen ve formě glukosy, případě pyruvát, gliové

buňky dokáží zpracovat i jiné zdroje energie. Imunitní pochody zprostředkované gliovými buňkami se uplatňují při zánětech nervu na periferii i v CNS, také u bakteriálních, virových, autoimunitních i neurodegenerativních onemocněních. Při těchto dějích vylučují gliové buňky řadu antigenů, cytokinů a enzymů.

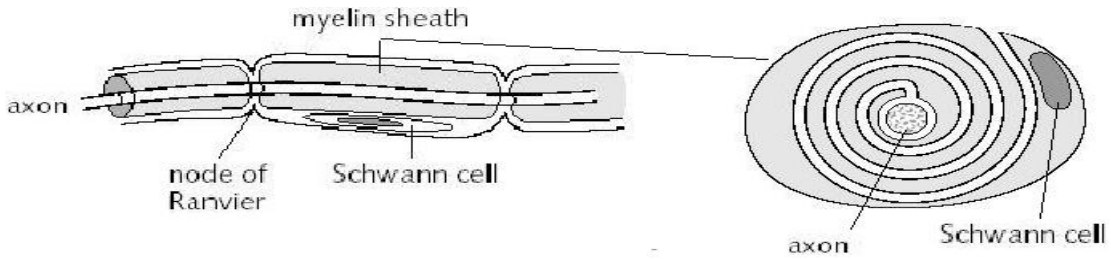
Podle původu můžeme rozdělit gliové buňky na neuroglie z neuroektodermu a mikroglie z mezodermu. Také se dají rozdělit podle svého umístěni v nervovém systému na ty vyskytující se v centrálním a periferním nervovém systému.

V CNS jsou přítomny **oligodendrocyty** s málo výběžky tvořícími myelinové pochvy více neuritů vyskytující se v šedé i bílé hmotě mající i metabolické aktivity. Dále pak **ependymové buňky** tvořící výstelky dutin připomínající řasinky a napomáhající pohybu likvoru, **astrocyty** (nacházejí se v bílé i šedé hmotě) vytvářející hemoencefalickou barieru a oddělující neurony od pia mater a **mikroglie** pohyblivé fagocytující neuroimunitní buňky (Obrázek 8).

V periferním nervovém systému jsou to zejména Schwannovy buňky obtáčející se a vytvářející myelinovou pochvu kolem jediného neuritu (Obrázek 9) a satelitní buňky, které sice také vytvářejí myelinové pochvy ale mají spíše metabolickou funkci. (Millan 1999)



Obrázek 8. Gliové buňky v CNC (upraveno podle Němeček S. a kol.: Neurobiologie, Avicenum, Praha 1972)



Obrázek 9. Myelinový obal axonů - Schwannova buňka (upraveno podle Ransom, B. R. and Kettenham, H. (ed.):Neuroglia, Oxford University Press1995)

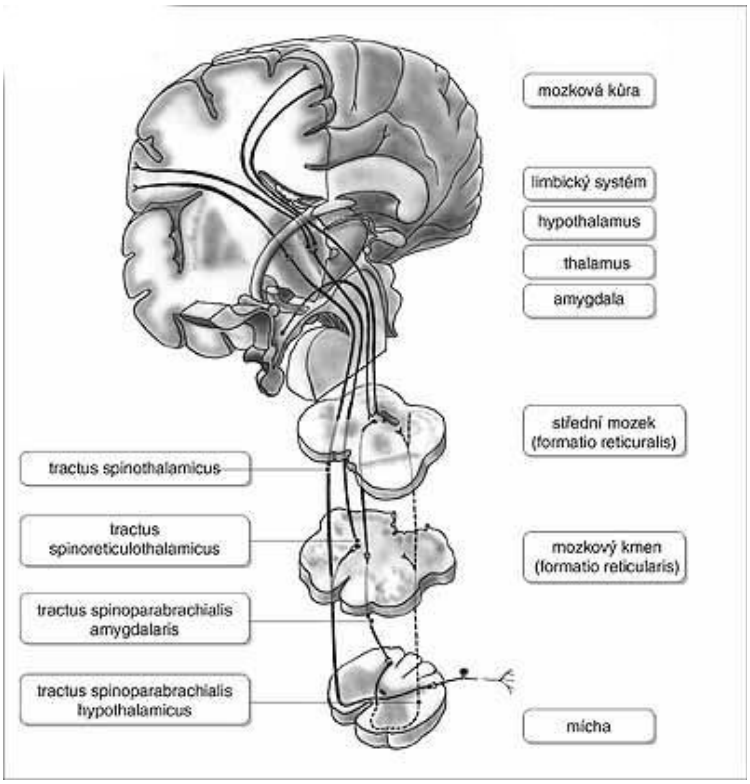
Význam gliových buněk v nocicepci

Na povrchu gliových buněk se vyskytuje řada iontových kanálů i receptorů, samy o sobě sice nejsou schopny vytvářet vzruch ani ho vést ale vytvářejí prostření nezbytné pro neuronální aktivitu, vytvářejí prostředí pro vedení akčního potenciálu. Gliové buňky jsou charakteristické svou vysokou lineární propustností pro K+ ionty. Glie obsahují i jiné K+ kanály, a to napěťově závislé, dále pak také Na+ CA++ Cl- napěťově závislé, dokonce i K+ mechanické kanály. Na svém povrchu nesou i celou řadu receptorů (GABA receptory, glutamátové receptory, glycinové receptory, i receptory spřažené s G-proteiny).

Při poranění a vedení bolesti nastávají v gliových buňkách stejně jako v neuronech změny- při fyziologické bolesti se po určité době zase vracejí k normálu, při patologické bolesti se může stát, že změny přetrvávají i na gliových buňkách, které se nyní stávají dalším přispěvateli bolesti a navíc neurony v tomto stavu udržují. Stav gliových buněk je výrazným přispěvatelem patologické bolesti.

2.6. Vzestupné a sestupné dráhy míšní

Ascendentní dráhy. Po integraci nociceptivní informace v zadních rozích míchy je informace dále přenášena projekčními neurony do CNS. Axony projekčních neuronů jsou uloženy v vzestupných (ascendentních) drahách. Můžeme je rozdělit na přímé a nepřímé. Přímé dráhy projikují přímo, do mozkových struktur, kde se nociceptivní informace zpracovává. (Obrázek 10.) Nejdůležitější přímou dráhou v přenosu bolesti je spinothalamická dráha (STT), účastní se také dráha spinomesencefanická a spinoretikulární. Nepřímé dráhy jsou takové, kde dochází cestou do CNS k přepojení na další neurony, mezi ně patří významná spinocervikální dráha. Pro vjem bolesti je mimo aktivity řady podkorových center v CNS také důležitá i projekce do mozkové kůry. (Besson 1987, Willis 1991)

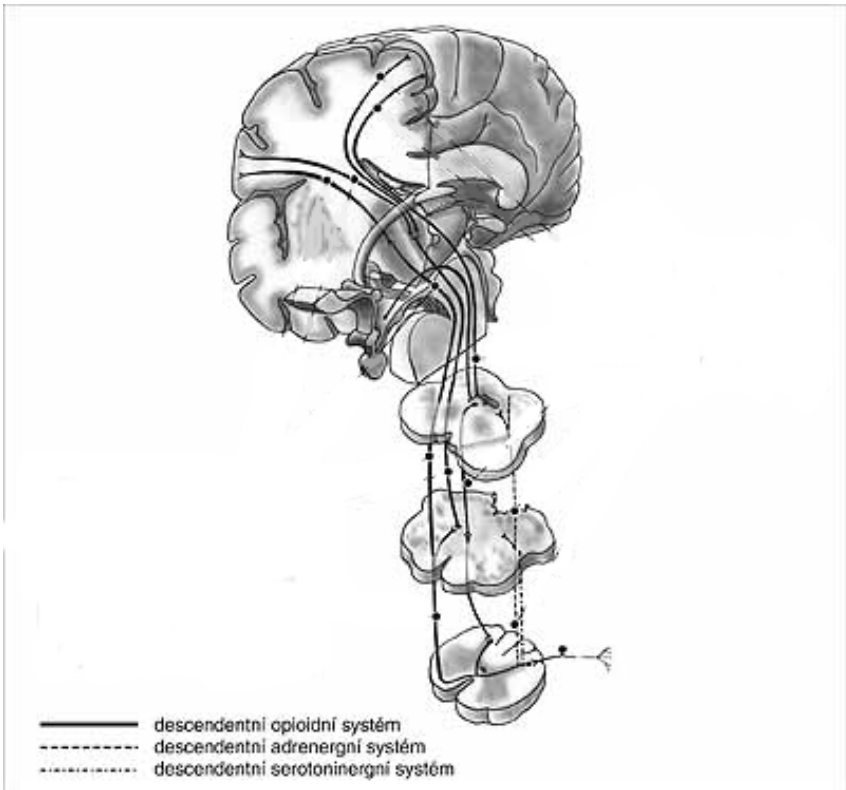


Obrázek 10. Schéma ascendentních drah (upraveno podle Porodnická encyklopedie 2006)

Descendentní dráhy vedoucí z mozkových struktur hrají mimo jiné důležitou úlohu v modulaci a integraci nociceptivních signálů v DH (Obrázek 11). Systém descendentních drah – kortikospinální, tlumivý, byl objeven v letech 1974–1975. Hlavními složkami jsou **serotogení, noradregení a dopaminergní systém**.(Willis 1991)

• **descendentní inhibice** - Antinociceptivní modulační úloha descendentních drah spočívá v redukci výlevu neurotransmiterů z nociceptivních PAF. (Millan 1997) Aktivovaná descendentní dráha tedy inhibuje PN vedoucí nociceptivní informaci. Na descendentní inhibiční míšní systém působí aktivačně řada látek endorfíny, enkefaliny, estrogeny i další, při masivním výlevu může vznikat i analgezie a to blokací NMDA receptorů v míše.
V descendentním systému jsou dále důležité endogenní opioidy mající také analgetický efekt. Mozková kůra má značný tlumivý vliv, odtud zřejmě pramení psychologická možnost ovlivňování bolesti. Descendentní dráhy přednostně inhibují excitaci WDR neuronů.

• **descendentní facilitace** – Descendentní facilitační mechanismy vyvolávají excitaci na zakončeních nociceptivních PAF i na neuronech DH. (Millan 1997) Mají zesilující efekt při modulaci nociceptivní signalizace.



Obrázek 11. Schéma descendentních drah (upraveno podle Porodnická encyklopedie 2006)

2.7. Centrální nervový systém

Hlavní mozková centra přijímající a zpracovávající nociceptivní informace a podílející se na vjemu bolesti jsou thalamus a mozková kůra. Thalamus je vzhledem k bolesti nejdůležitější mozkovou strukturou, zpracovává informace o intenzitě, lokalizaci, a časovém průběhu bolesti. Thalamus je také spojen s limbickým systémem a kortikálními strukturami, tudíž je odpovědný i za psychickou nejen diskriminační složku vnímání bolesti. Hlavními oblastmi zpracování bolesti v thalamu jsou jádra ventrobasálního komplexu, oblast laterálního thalamu a komplex jader zadního thalamu. Z thalamu jsou informace předávány dále do mozkové kůry nebo dalších struktur. Korové oblasti podílející se na zpracování nociceptivní informace mají také velké množství spojení s limbickým a motorickým. Jsou však spojeny i s dalšími strukturami jako je amygdala, hypothalamus, hippocampus a kromě nociceptivního přenosu mají i jiné funkce včetně řízení emocí. (Apkarian 1995, Craig 1994)

3. Neurotransmitery a modulátory nociceptivních signálů

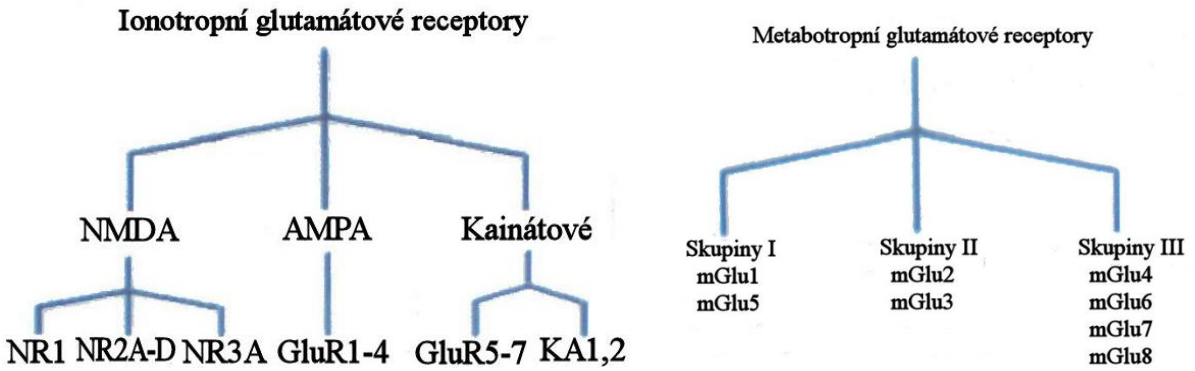
V přenosu nociceptivních signálu jsou důležité jak aktivující (excitační), tak tlumící (inhibiční) neurotransmitery a neuromodulátory. Z aktivujících jsou nejdůležitější excitační aminokyseliny (glutamát a aspartát) a neuropeptidy (substance P, neurokinin A), které jsou silně pronociceptivní. Dalšími pronociceptivní mediatory jsou například ATP, NO, prostaglandiny, bradykinin, cytokiny a neurotrophiny. Z inhibičních hrají roli v přenosu nociceptivní informace zejména inhibiční aminokyseliny (GABA a glycin) a opioidy.

3.1. Excitační aminokyseliny a jejich receptory

Glutamát jako jeden z nejvýznamnějších neuropřenašečů, působí na přibližně polovině všech synapsí v mozku. Poslední výzkumy ukázaly, že může hrát úlohu i v periferní aktivaci a senzitizaci nociceptorů, vzhledem k přítomnosti jeho receptorů na periferních nervových zakončeních.

Aspartát Kyselina asparagová (Asp) je biogenní aminokyselina. Obsahuje karboxylovou skupinu, je tudíž kyselá, polární a hydrofilní. V organismu se vyskytuje ve formě své konjugované zásady, která se nazývá aspartát. Aspartát je, společně s glutamátem, hlavní excitační neurotransmiter mozku a míchy. Glutamát i aspartát se vážou na glutamátové receptory ionotropního a metabotropního typu, což z těchto receptorů dělá jedny z nejdůležitějších receptorů pro přenos nociceptivní signalizace. Glutamátové receptory se vyskytují na synapsích v CNS, v HD, na membránách PAF i v kožních zakončeních neuronů.

Glutámátové receptory rozdělujeme podle hlavních agonistů na 3 typy ionotropních receptorů: NMDA, AMPA a Kainátové receptory které jsou přímo spojeny s kationtovými kanály a dále na metabotropní receptory spojené s G-proteiny, které také rozdělujeme do tří skupin.



Tabulka1. Rozdělení glutamátových receptorů

NMDA receptory jsou heterotetraméry, tvořené kombinací podjednotek NR1a NR2A-D, zastoupení podjednotek je v receptorech v různých neuronech různé. NMDA receptory v neuronech mají pomalou kinetiku a jsou charakteristické napěťově závislou blokaci kanálu Mg 2+ ionty. Kanál NMDA receptorů propouští výrazně Ca2+ ionty, dále také Na+ K+ ionty. NMDA receptory mají modulační vazebné místo pro glycin, jenž je esenciální pro funkci kanálu. Jsou přítomny jak presynapticky tak postsynapticky. (Millan 1999)

AMPA receptory mají rychlou kinetiku, nízkou afinitu ke glutamátu a rychle desenzitizují. Jsou selektivně aktivovatelné α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxasole propionovou kyselinou. AMPA receptory jsou tetramery složeny z podjednotek (GluR1-GluR4). GluR2 podjednotka je důležitá pro propustnost Ca2+ a vodivost. Obsazení allosterického místa na AMPA receptoru není bezpodmínečně nutné pro aktivaci iontového kanálu. (Bettler 1995)

Kainátové receptory jsou aktivovány kainátem. Jsou tvořeny různými kombinacemi podjednotek GluR5-GluR7, KA1 a KA2. Jsou funkčně podobné AMPA receptorům. Bylo ukázáno, že mohou mít úlohu také v indukci dlouhodobé potenciace (LTP). (Hollmann 1994)

Metabotropní Glu receptory se rozdělují do 3 skupin. Receptory I. skupiny se na míšní úrovni nalézají v neuronech povrchových vrstev DH a jsou pozitivně spojeny s fosfolipázou C (PLC) a pravděpodobně i s NO syntétázou (NOS). Metabotropní GLU receptory skupiny II a III jsou negativně spojeny s adenylcyklázou. Specifické typy mGlu receptorů se podílí na modifikaci intracelulární koncentrace Ca2+ iontu a modulaci aktivity proteinkináz, které hrají důležitou roli v regulaci receptorů spojených s iontovými kanály a v modulaci genové transkripce. (Millan 1999)

Glutamátové receptory a jejich úloha v nocicepci

Glutamátové receptory v míše a supraspinálních strukturách CNS jsou endogenně aktivovány excitačními aminokyselinami, nebo exogenně N-metyl-D-aspartátem (NMDA receptory). Aktivace centrálních glutamátových receptorů indukuje řadu molekulárních mechanismů vedoucích k syntéze dalších mediátorů. Tím je například Oxid dusnatý (NO), který aktivuje gvanylátcyklázu, zvýšením hladiny intracelulárního cyklického gvanozinmonofosfátu (cGMP). (Conn 1997)

NMDAergní stimulace aktivuje proteinkinázu C (PKC), která – kromě jiného – facilituje synaptický přenos, a adenylátcyklázu, která je odpovědná za tvorbu intracelulárního druhého posla (cyklického adenozinmonofosfátu - cAMP). Dojde také ke zvýšení biosyntézy prostaglandinů PGE2 a PGF2, které facilitují nociceptivní transmisi na periferii i centrálně. Patofyziologické změny po aktivaci glutamátových receptorů (NMDA a non-NMDA receptorů) se projeví aktivací a facilitací transmise bolesti, zejména v pozdní fázi, indukcí behaviorálních reakcí na bolest a k rozvoji "wind-up" fenoménu -dráždění 1. neuronu vede k nárůstu potenciálů ve 2. neuronu, až začne sám generovat nociceptivní potenciály.
(Ferreira, 1994)

3.2. Neuropeptidy modulující nocicepci

Nejvýznamnějším zástupcem jsou tachykininy - **Substance P a Neurokinin A**. Váží se na neurokininové receptory (NK1, NK2) a jsou pozitivně spojené s PLC. Substance P přispívá k axonálním reflexům, účastní se periferních zánětlivých reakcí a podílí se na modulaci nociceptivní signalizace na míšní úrovni. Substance P a její receptory jsou v lidském mozku široce zastoupené, včetně mnoha míst v limbickém systému (amygdala, hypothalamus, septum) a mozkovém kmeni (locus coeruleus, nukleus raphe).
(Bantley 1995, Coggeshall 1997)

3.3. Další pronociceptivní mediatory

Bradykinin je uvolňován z poškozené tkáně a přispívá k časným „zánětlivým" procesům. Má vliv na PAF buď přímo stimulací senzorických zakončení nebo přispívá k tvorbě prostaglandinů, dalších mediatorů zánětu. Existují 2 bradykininové receptory B1 a B2. B1 receptory podporují rozvoj nocicepce během poškození tkáně. Exprese těchto receptorů na periferních zakončeních je důležitá pro nocicepci. Účast bradykininu byla prokázána na modulaci nociceptivního synaptického přenosu na míšní úrovni, zejména za patologických situací.

Cytokiny hrají významnou roli v iniciaci a udržování „zánětlivého" stavu. Mají potenciační i inhibiční účinky na imunitní a zánětlivé buňky, výrazně také ovlivňují senzorické neurony. Mohou působit přímo na nociceptory nebo stimulovat výlev jiných látek např. prostaglandinů. Během akutní fáze zánětu, cytokiny způsobují senzitizaci nervových zakončení přes kinázy spojené s receptory nebo fosforylaci iontových kanálů. Mezi cytokininy podporující zánět patří tumor necrosis faktor alfa (TNFalfa), interleukin-1 (IL-1), IL-6 a chemokinin IL-8. (Coggeshall 1997, Conn 1997, Fletcher 1996)

3.4. Inhibiční mediatory

GABA - Kyselina gama-aminomáselná (kyselina γ-aminomáselná) je hlavním inhibičním neurotransmiterem v nervovém systému. GABA byla poprvé syntetizována v roce 1883 a byla nejdříve známa jako metabolický produkt rostlin a mikrobů. V roce 1950 však byla objevena jako integrální součást CNS savců.(Roth 2003) GABA hraje důležitou roli při regulaci excitability neuronů, působí na inhibičních synapsích vazbou na specifické receptory uložené pre- i postsynapticky. Jsou známy tři třídy GABA receptorů: ionotropní receptory GABAA a GABAC, které jsou samy o sobě iontovými kanály, a metabotropní receptory GABAB, což jsou receptory spojené s Gproteiny, otevírající iontové kanály prostřednictvím svých G proteinů. Vazba na ionotropní GABA receptor způsobí otevření chloridových kanálů výlev Cl- iontů a hyperpolarizaci neuronu.

Glycin je inhibiční neuropřenašeč v CNS, míše, mozkovém kmeni a na sítnici. Aktivace glycinových ionotropních receptorů umožní vztup Cl- do neuronu a hyperpolarizaci membrány. Strychnin je antagonista ionotropních glycinových receptorů, blokáda strychninem vyvolává křeče. Glycin je společně s glutamátem ligandem NMDA receptorů.

3.5. Opioidy

Jako opioid je označena látka schopná vázat se na opioidový receptor. Nacházejí se zejména v centrálním nervovém systému a trávícím traktu. Existují čtyři hlavní skupiny opioidů. Endogenní opioidy, produkované v těle. Opiové alkaloidy (např. morfin a kodein). Polosyntetické opioidy jako heroin a oxycodon a syntetické opioidy jako metadon a pethidin. Endogenní opioidy - endorfíny a enkefaliny jsou látky přirozeně tlumící bolest.V lidském organismu působí opioidy především v CNS. Na míšní úrovni je významná přítomnost opioidních receptorů na presynaptických zakončeních některých PAF, kde jejich aktivace vede k inhibici nociceptivního synaptického přenosu.

4. Patofyziologie bolesti

4.1. Klasifikace bolesti

Bolest se dá rozdělit na dvě odlišné formy a to na bolest akutní a chronickou. Je s výhodou nahlížet na tyto dva druhy bolesti samostatně, vzhledem k tomu, že se odlišují i svými patofyziologickými mechanismy.

Akutní bolest - je intenzivní a trvá po omezenou dobu. Je způsobena přímým poškozením tkání a lze ji považovat za symptom. Z lékařského hlediska je charakterizovaná dobou kratší než 3-6 měsíců. Je snáze léčitelná.

Chronická bolest - vyžaduje jiný přístup, nemusí být příznakem žádného akutního poškození a často ovlivňuje ostatní aspekty života. Je charakterizována dobou trvání delší než 3-6 měsíců. Nemá biologický informativní význam.

Neuropatická bolest - vyvolaná v důsledku dysfunkce nebo poškození části periferního nebo centrálního nervového sytému. (Wolf 2004)

4.2. Patologické bolestivé stavy

Patologická bolest je dynamický proces, který se vyvíjí v čase. Neuropatická bolest která vzniká jako důsledek poškození nervového systému nevzniká hned a najednou v plné intenzitě po poškození jak je tomu u akutní bolesti, ale vyvíjí se postupně. Znakem neuropatické bolesti je to, že nevyžaduje stimulaci nociceptorů volných zakončení PAF.

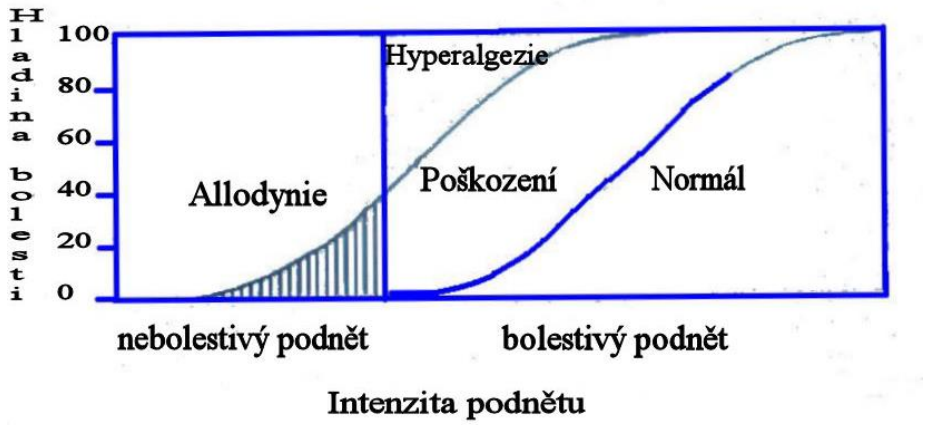
Patologické bolestivé stavy lze rozdělit na ty které jsou vyvolané stimulací a na spontánní, také je lze rozdělit dle původu na periferní a centrální.

- **závisející na stimulaci**

Představují zvýšení citlivosti na periferní podnět. Mezi patologické bolestivé stavy, které jsou vyvolány stimulací, patří allodynie a hyperalgezie. Allodynie je bolest vyvolaná podnětem, který normálně bolest nevyvolá (např. dotykem, teplem). Hyperalgezie označuje zvýšenou citlivost a snížený práh k bolestivým stimulům nadprahové intenzity: bolestivý stimulus vyvolá bolest vyšší intenzity, než je obvyklé (Obrázek 12).

Allodynie - bolest vyvolaná normálně nebolestivým podnětem. Nepoškozující podnět vyvolá takovou odpověď která za fyziologických podmínek vzniká pouze při poškozujícím podnětu. Zahrnuje změnu v kvalitě čití, nepoškozující termické, mechanické a chemické podněty nejsou rozlišovány v původní podobě (kvalitě) a jsou popisovány jako bolestivé. K allodynii dochází v důsledku aktivace Aβ-vláken.

Hyperalgesie - zvýšená citlivost k bolestivým podnětům a zvýšená bolestivá odpověď na ně. Nezahrnuje změny v kvalitě čití jako alodynie. Vzniká následkem poškození nebo zánětu tkání, a aktivaci C-nervových vláken.



Obrázek 12. Vnímání hladiny bolesti za kontrolní situace a po poškození (upraveno podle Textbook of Pain 2004)

• nezávisející na stimulaci

Spontánní bolest může být jak kontinuální, tak intermitentní, někdy i paroxysmální. Objevuje se v důsledku ektopické aktivity, neurální disbalance nebo hyperaktivity, v periferním nebo centrálním nervovém systému.

4.3. Příčiny patologické bolesti

Patologickou bolest je možné považovat za nemoc. Patofyziologie patologické bolesti je složitá a někde dosud nejasná, k jejímu rozvoji přispívá více mechanismů (změny excitability, abnormální senzitivita myelinizovaných a nemyelinizovaných vláken, generování spontánní aktivity, abnormální nervové výboje a změny topologie Na+ kanálů). Hlavní příčiny patologických bolestivých stavů je však možno rozdělit na periferní a centrální.

• periferní mechanismy

Hlavním periferním mechanismem zvýšené citlivosti je senzitizace periferního nervového zakončení. To je způsobeno několika faktory, zejména výlevem mediatorů zánětu způsobující zvýšenou dráždivost nervových vláken i nociceptorů – neuronální hyperexcitabilitu. Podkladem periferní senzitizace a snížení prahu dráždivosti je hlavně aktivace kináz v nervovém zakončení a následná fosofrylace kanálů, která vede k jejich zvýšené citlivosti na agonisty.

• centrální mechanismy

V centrálním nervovém systému se jedná zejména o modulaci nociceptivní signalizace. Na míšní úrovni se na tom podílejí jak presynaptické, tak popstsynaptické mechanizmy. Postsynaptické mechanizmy - senzitizace míšních neuronů, ty poté reagují na původně slabé, neefektivní synaptické vstupy generováním akčních potenciálů a signalizují dále do CNS. Na modulaci nociceptivní signalizace na míšní úrovni se podílí celá řada molekul neurotransmiterů, neuromodulátorů a jejich receptorů. Zejména se jedná o glutamátové NMDA receptory a NK1 receptory pro substanci P. V poslední době se ukazuje, že velký význam mohou mít i presynapticky uložené TRPV1 receptory, jejichž funkce je rozebrána níže. (Ji 2003, Scholz 2002)

5. TRPV1 receptory a jejich funkce

Senzorický systém živých organizmů je vybaven přesnými a důmyslnými mechanizmy, umožňující mu rozpoznávat podněty přicházející z prostředí, odlišit ohrožující podněty od neškodných a předat informaci o nich do centrálního nervového systému. Tato schopnost je dána především vlastnostmi iontových kanálů, exprimovaných na periferních zakončeních primárních senzorických neuronů. Aktivace těchto iontových kanálů umožňuje převod (transdukci) podnětů (specifických a nadprahových) na depolarizaci buněčné membrány, a k vzniku akčního potenciálu – signalizace, jenž je poté vedena do CNS. Významnou skupinou transdukčních iontových kanálů exprimovaných na senzorických neuronech jsou TRP kanály (transient receptor potential channels). Savci pomocí TRP kanálů rozeznávají teplotní změny v rozsahu fyziologickém a patologickém a chemické látky vyvolávající bolest. (Caterina 2000). Významný je zejména TRPV1 receptor z vaniloidní rodiny TRP receptoru. Poznání struktury a funkce tohoto receptoru vedlo k mnohem hlubšímu pochopení řady nociceptivních mechanismů.

TRPV1 receptory jsou exprimovány na periferních i centrálních zakončeních senzitivních neuronů a hrají významnou úlohu v transmisi a modulaci nociceptivní informace. Jsou to molekulární integrátory fyzikálních a chemických bolestivých podnětů. TRPV1 jsou významně senzitizovány mediatory zánětu uvolněnými z poškozené tkáně.

TRPV1 receptor byl naklonován teprve v roce 1997 (Caterina et al.1997), což umožnilo mimo jiné jeho transfekci do různých expresních systémů buněčných linií. Tyto experimenty pomohly zpřesnit informace o struktuře a funkci těchto receptorů. TRPV1 receptory mají vazebné místo pro látky z chemické skupiny homovanilinů, jsou to rostlinné extrakty a velmi dráždivé látky. Jsou exogenními agonisty TRPV receptorů a celá skupina od nich odvozuje svůj název - vaniloidní. Nejvýznamnější z těchto látek je kapsaicin - látka izolovaná z paprik rodu Capsicum (Tresh 1846). Citlivost na kapsaicin vykazují C i Aδ vlákna, pro TRPV1 je kapsaicin zvláště důležitým agonistou proto se mu také někdy říká kapsaicinový receptor (Bandell 2004).

Objev kapsaicinového TRPV1 receptoru představoval zlom ve výzkumu percepce tepelných a chemických bolestivých podnětů. V míše se kapsaicinové receptory nacházejí zejména na primárních aferentních neuronech. Některé studie uvádí i jejich přítomnost na postsynaptických neuronech, především v I. a II. lamině. Nacházejí se také na neuronech spinálních gangliích. TRPV1 receptory byly také prokázány v některých centrech v mozku, v epitelech, mukosách, hladkých svalech a předpokládá se, že hrají roli i v neurogenních zánětech a viscerální bolesti (Ferreira 2002).

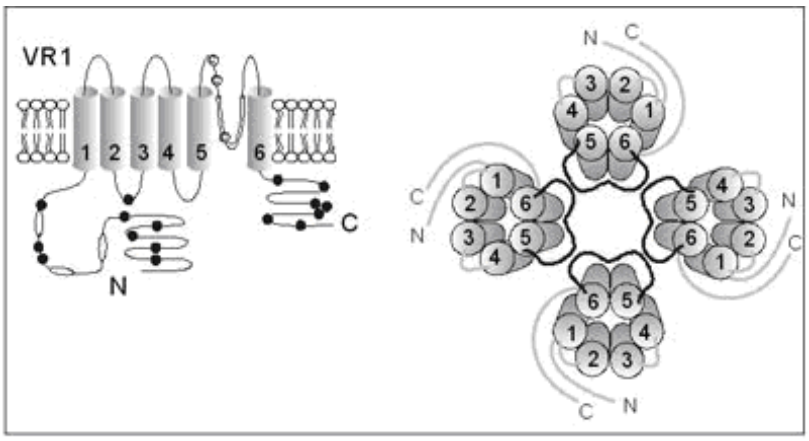
5.1. Molekulární stavba TRPV1 receptoru

TRPV1 je hlavním zástupcem rodiny TRPV proteinů kterou můžeme rozdělit do 6 skupin (TRPV1-TRPV6). Naklonováním TRP lokusu bylo zjištěno že všechny podjednotky TRPV kanálu mají podobnou strukturu (Montell a Rubin 1989).

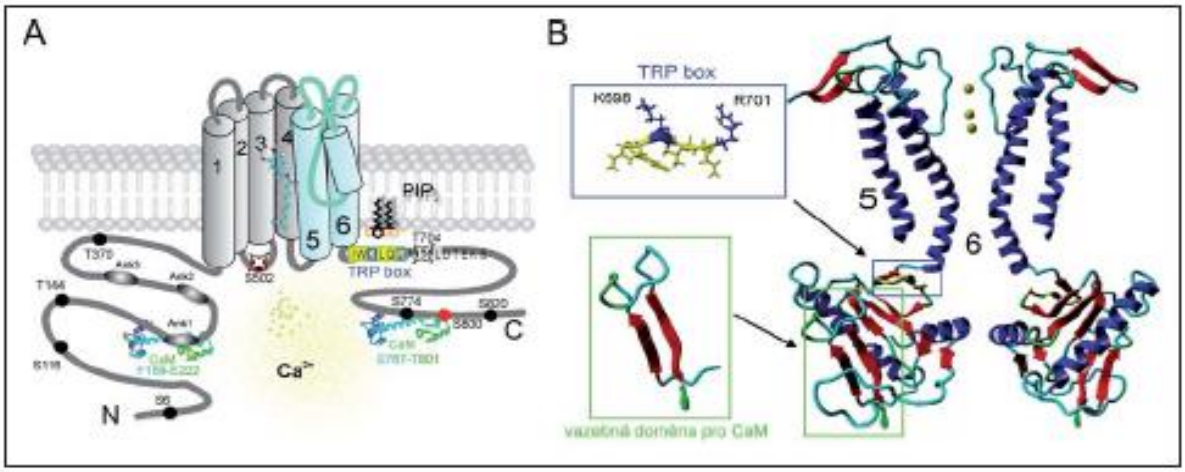
Podjednotka TRPV1 receptoru se skládá z 6 transmembránových domén (S1-S6), mezi transmembránovými úseky 5. a 6. se nachází krátký hydrofobní řetězec tvořící tzv. P kličku, a N a C konce jsou orientované intracelulárně. 5.a 6. transmembránová doména tvoří také vlastní oblast póru. (Obrázek 13.) Kapsaicinový receptor TRPV1 je protein o délce 838 aminokyselin a mol. hmotnosti 95kDa (Caterina 1997).

TRPV1 receptory se skládají do tetrametrů s centrálním hydrofilním pórem - vytvářejí tak neselektivní kationtové kanály pro Na+ K+ a Ca+.Existují 3 homologní podjednotky TRP kanálů tvořící různé homotetramery, které mohou heteromerizovat s ostatními. (Smith 2002)

Hydrofilní N koncová cytoplazmatická doména tvoří více než polovinu proteinu (432 aminokyselin), obsahuje oblasti bohaté na prolin a tri ankyrinové domény interagující s cytoskeletem a jinými proteiny. (Obrázek 14.) Druhá také intracelulární C koncová doména je důležitá pro fosforylaci proteinkinás a nese vazebná místa pro kalmodulín, PIP2 a ATP. Vazebné místo pro homovaniloidy je orientováno ven z buňky. (Montell a Rubin 1989).



Obrázek 13. A- Schéma transmembránové domény VR1– 6podjednotek, B- prostorové uložení v membráně (podle Vlachová, Vyklický :Bolest ,Tigris 2006 p.46)



Obrázek 14. Molekulární struktura vaniloidního receptoru TRPV1, A- podjednotka TRPV1 B-model molekulární struktury (podle Toušová K. a kol.:Analgetické účinky kapsaicinu:tisíce let nepoznaný mechanismus 2007)

5.2. Aktivace TRPV1 receptoru

- tepelnými podněty- Teplota ovlivňuje funkci téměř všech iontových kanálů, a však jen u několika způsobí aktivaci. Proteinová struktura TRPV1 receptoru je schopna přesně reagovat na teplotu prostředí, a vyvoláním konformační změny při teplotách nad 43°C otevřít iontový kanál. Právě tato teplota představuje počátek vnímání bolestivé reakce na tepelné podněty. Tento práh pro aktivaci je velmi přesně regulován v distální části C koncového řetězce. Jestliže je TRPV1 vystaven teplotám vyšším než 53°C dochází k částečné denaturaci (trvalé konfirmační změně) a k snížení teplotního prahu pro aktivaci receptoru. (Caterina 1997, Prescott 2003).

Přítomnost zánětlivých mediatorů jako prostaglandin, bradikinin, zvýšena koncentrace ATP nebo protonů také snižuje práh pro aktivaci TRPV1 což je zřejmě podstatou zesílení bolestivých vjemů – hyperalgesie. (Ferrer-Montiel 2004, Jordt 1997, Smith 2002)

-kapsaicinem- Kapsaicin je silně lipofilní látka (8-methyl-N-vanillyl-6-monoamid) a jeho analogem je další agonista resiniferatoxin (RTX). Na aktivaci TRPV1 receptoru kapsaicinem se podílejí i intracelulární domény jako je hydrofobní klička mezi 4. a 5. segmentem a obě koncové domény (C i N) (Jordt 1997). Kapsaicin je však schopný se účinně vázat pouze z extracelulární strany.

-acidosou- při zánětech, poraněních, infekcích i při ischémii se pH extracelulárního prostředí snižuje ze své fyziologické hodnoty (7,3) v důsledku výlevu protonů. Místní snížení pH (6,8-acidosa) je přirozeným aktivátorem TRPV1(Handwerker 1993). Protony fungují nejen jako přímé aktivátory TRPV1 receptorů ale i jako jejich modulátory. Mírně snížené pH

zesiluje aktivitu receptorů po navázaní kapsaicinu a rovněž i po tepelném podnětu. Protony primárně zvyšují pravděpodobnost otevření iontového kanálu, pH nižší 6,3 dokonce způsobí aktivaci TRPV1 receptorů už při 35°C. (Jordt 1997) Snížení pH pod 6,0 pak způsobí trvalé otevření TRPV1 kanálu. (Tominaga 1998) Protony svým kladným nábojem neutralizují záporně nabité aminokyseliny v oblasti póru z extracelulární strany čímž jej otevírají. (Caterina 1997)

-lipidovými sloučeninami- Mezi endogenní vanilioidy aktivující TRPV1 receptory patří tři skupiny látek vznikající z kyseliny arachidonové, a jsou produkovány především v prostředí poraněné a zanícené tkáně. Do první skupiny patří anandamid, nejdůležitější endokannabinoid vznikající štěpením N-arachidonoylfostatidylethanolaminu fosfolipázou D. Do druhé skupiny patří N-arachidonoyldopamin (NADA). Další skupinou látek jsou produkty působení lipoxygenázy na kyselinu arachidonovou, tj. kyselina 12-(S)-hydroperoxyeikosatetraenová a 15-(S)-hydroperoxyeikosatetraenová. Také další látky jako jsou omega-3-polynenasycené mastné kyseliny -dokosahexaenová kyselina (DHA), -linoleová (LNA) a -eikosapentaenová (EPA), ve koncentracích 1–10 μM, přímo aktivují TRPV1 (Matta, 2006).

TRPV1 receptory jsou tedy aktivovány chemickými látkami(kapsaicin), kationy = snížením pH vnějšího prostření pod 6.5, lipidovými mediatory a zvýšením teploty nad 43°C.

5.3. Senzitizace TRPV1 receptoru

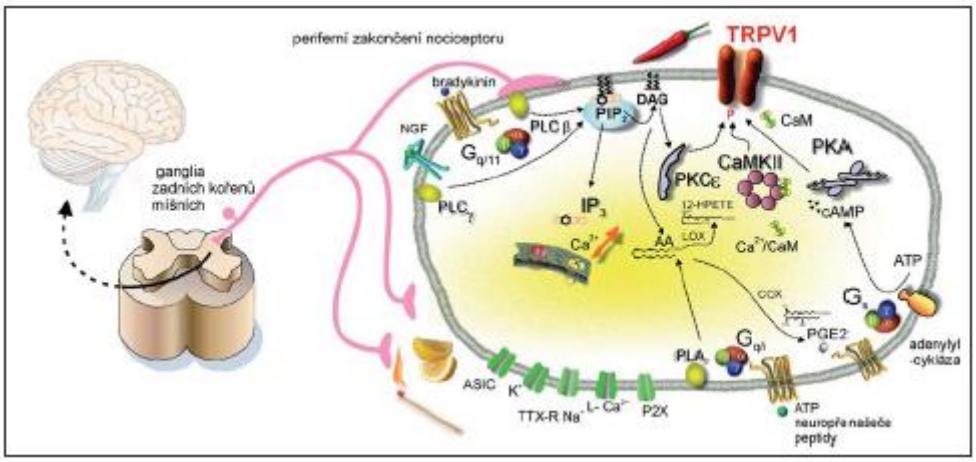
Hlavním mechanismem senzitizace TRPV1 nociceptorů bolestivým teplem, chemickými látkami nebo mediatory zánětu je fosforylace. C koncová doména je bohatá na fosforylační místa, proto výrazně ovlivňuje míru afinity k agonistům i vlastní otevírání kanálu. Mezi nejdůležitější fosforylační místa patří Ser800, Thr704 pro proteinkinázu C (PKC), Ser 774 a Ser820 pro cAMP závislou proteinkinazu A (PAK) a Thr704 pro kalmodulín závislou kinázu II (CaMK II) (Mohapatra 2003). PIP2 interaguje s TRPV1 a způsobuje konstitutivní inhibici, protože fosforylační místo PKC Ser800 se nachází přímo uprostřed vazebného místa pro PIP2, aktivací působením PKC se PIP2 vyváže.

TRPV1 kanál podléhá senzitizaci v prostření zánětu vlivem tkáňových mediatorů a jiných látek, např zvýšené hladiny NGF, GDNF a aktivita MAPkináz v DRG nastávající během zánětu zvyšují expresi TRPV1 receptorů a přispívají tak k hyperalgesii (Amaya 2004). Vaniloidní receptor TRPV1 je v plazmatické membráně nervových buněk ovlivňován řadou adapterových a signálních molekul, dokonce i proteiny cytoskeletu modulují jeho aktivitu. TRPV1 receptor je zodpovědný za nociceptivní, zánětlivé, hypotermické reakce, jako je

akutní nociceptivní odpověď na tepelné podněty a hyperalgesie při zánětu (Caterina 2000) Senzitizace vaniloidního receptoru je jedním z hlavních mechanizmů modulace jeho aktivity.

5.4. Antagonisté- desenzitizace TRPV1 receptoru

Ze skutečnosti, že TRPV1 receptory hrají tak významnou roli v přenosu bolestivých podnětů, vychází i snaha o nalezení látek které by účinně a selektivně blokovaly jejich aktivitu. Při aktivaci TRPV1 receptoru dochází zároveň k desenzitizaci, tj. snížení odpovědí receptoru za stálé přítomnosti agonisty, tento stav receptoru souvisí s konfirmační změnou proteinu, která vede k zavření iontového kanálu a přechodné nebo trvalé ztrátě jeho funkce. Přetrvávající přítomnost agonisty také dokáže TRPV1 desenzitizovat. Desenzitizace má ochrannou funkci. Míra desenzitizace TRPV1 receptoru je závislá na koncentraci Ca++ vápníkových iontů, poměr mezi rychlosti desenzitizace a resenzitizace, souvisí s procesy fosforylace a defosforylace (Obrázek 15). (Mandadi 2004) Nejlépe prokazatelný mechanizmus desenzitizace závislé na vtoku Ca++ do buňky je aktivace kalcium-dependentní fosfatázy 2B (kalcineurin), která defosforyluje TRPV1 a tím sníží jeho aktivitu (Docherty 1996). Dalším Ca++ závislý mechanizmem je desenzitizace prostřednictvím Ca++ vazebného proteinu kalmodulinu (CaM). Kalmodulin se váže na oblast karboxylového konce TRPV1 receptoru (Numazaki 2003). Konfirmační změny TRPV1 receptoru, vznikající důsledkem desenzitizace, jsou dlouhotrvající (> 20 min)(Mohapatra 2003).



Obrázek 15. Modulační dráhy uplatňující se v desenzitizaci vaniloidního receptoru TRPV1 na periferním zakončení nociceptivního vlákna. (podle Toušová K. a kol.:Analgetické účinky kapsaicinu:tisíce let nepoznaný mechanismus 2007)

Kapsazepin syntetický analog kapsaicinu byl dlouho jediným kompetitivním antagonistou TRPV1. Výzkum se nyní zaměřuje na využití látek s podobnou chemickou strukturou, jakou mají tyto desenzitizující látky (hlavně kapsaicin), ale které buď vůbec nevyvolávají u člověka bolest nebo oproti kapsaicinu mají rychlejší kinetiku aktivace/desenzitizace TRPV1 receptoru (piperin). Se stejným cílem jsou testovány nově syntetizované vaniloidní látky (např. olvanil a nuvanil) a řada specifických antagonistů TRPV1 receptoru získaná metodami kombinatorické chemie (Rami 2004).

Nekompetitivní blokátory TRPV1 receptorů jsou většinou peptiny s 6 kladně nabitými aminokyselinami a od nich odvozené peptidy. Tyto peptidy jsou vysoko afinní.

Aktivita TRPV1 je také výrazně snižována oxidačními činidly. V oblasti centrálního póru na P kličce mezi 5 a 6 transmembránovým segmenten sedí cysteinové zbytky – ty se mohou oxidovat a interagovat za vzniku disulfidyckých můstků a napomáhat tak udržení nativní struktury a neaktivního stavu kanálu. V redukovaném stavu setrvávají cysteinové zbytky s volnými SH skupinami. Poměr mezi oxidovaným a redukovaným cysteinem rozhoduje o pravděpodobnosti otevření kanálu. Oxidační látka jako Cu(II)-phenantrolin s úspěchem kanál blokují, řadí se tak mezi nekompetitivní antagonisty (Krause 2005).

6. Tumor nekrotizující faktor (TNFα)

TNFα (tumor necrosis factor- alfa) patří mezi zánětlivé cytokiny a nachází se v mnoha typech buněk, především v imunitních buňkách, neuronech a gliových buňkách (Mannel 1986). TNFα hraje roli v proti-nádorové ochraně, imunitní modulaci a zánětech.

Je cytotoxický pro změněné nebo poškozené buňky, normální buňky však může stimulovat k proliferaci (fibroblasty), diferenciaci (myeloidní buňky) nebo aktivaci (neutrofily). TNFα a jeho příbuzná molekula TNFβ mají podobnou strukturu a obě aktivují receptory TNFR1 a TNFR2. V modulaci nocicepce TNFα hraje důležitou úlohu v modulaci patologické bolesti a je také přítomen při vzniku zánětlivé a neuropatické bolesti (Schafers 2003). Exogenní TNFα aplikovaný intraneurálně způsobuje hyperalgesii a allodynii u potkanů a myší. Mechanizmy jeho působení nejsou zatím zcela vysvětleny.

Cytokiny mohou působit i přímo a zvyšovat neuronální odpověď tím, že zvýší výlev mediatorů z gliových buněk, např. glutamátu a NO tedy látek schopných modulace nocicepce. TNFα také zvyšuje syntézu ekosanoidů, speciálně prostaglandinu E2 (PGE2). Prostaglandiny stejně jako v místě periferního zánětu, tak i v míše hrají podstatnou roli v rozvoji hyperalgezie a allodynie. Jak potvrzují studie PGE2 senzitizuje buňky a zvyšuje jejich odpovědi na podněty a zánětlivá agens jako je bradykinin. Aplikace PGE2 do zadní nohy

potkana zvyšuje odpovědi na poškozující stimuly a zesiluje pocity pálení po podání bradykininu .

Bylo ukázáno, že spinální aplikace TNFα je schopna vyvolat spinální dlouhodobou potenciaci (LTP). Výsledky studii ukazují, že tepelná hyperalgezie vyvolaná periferní aplikací TNFα vyžaduje modulaci TRPV1 receptoru. Tepelná hypersenzitivita se neobjevuje u myší, u nichž byl gen kódující proteiny TRPV1 receptoru vyřazen genovou manipulací. Tepelná hyperalgezie vyvolaná TNFα **vyžaduje** expresi TRPV1 receptorů. Mechanická hyperalgezie vyvolaná TNFα expresi TRPV1 **nevyžaduje**, může však zahrnovat modulaci tetrodoxin-rezistentních Na+ kanálů. (Grassi 1994)

7. FOS protein

Geny skupiny c-FOS a c-JUN jsou geny časné odpovědi buňky, exprimované v jádře. C Fos kóduje jaderný protein Fos, který v komplexu s jinými proteiny ovlivňuje expresi řady dalších genů. C –fos propojuje přes kaskádu poslů děje z vnějšího prostředí buňky na genovou úroveň buňky, což vede k adaptaci neuronu a expresi potřebných proteinů. Změna exprese genů v jádře vyvolaná Fos proteinem v neuronech zadního rohu míchy mění také expresi neuropeptidů. Změny mohou vést až k modulaci synoptického přenosu nebo i k funkčním a strukturním změnám na míšních synapsích a k zvýšení citlivosti pro nociceptivní podněty. (Munglani 1995)

V nervovém systému dochází k expresi Fos při reakci na určitý specifický podnět. Na míšní úrovni je za normálních (kontrolních) podmínek exprese Fos proteinu velmi nízká. Po aplikaci nociceptivního podnětu ale velmi rychle dochází k zvýšení exprese. Je tedy možné využít expresi Fos jako markeru po zvýšenou nociceptivní aktivaci neuronů míchy.
(Munglani 1995, Harris 1998)

8.Závěr

Bolest je plastický, komplexní, integrující sled dějů, začínající aktivací nervových zakončení periferních aferentních vláken, modulována na míšní úrovni a vyhodnocována v mozku. Mechanizmy patologických bolestivých stavů se od fyziologických někdy liší pouze změnou v jediné části tohoto komplexního systému. Některé z těchto patologických dějů ještě nejsou zcela uspokojivě objasněny. Úplné prostudování mechanismu a dějů nám pomůže bolest lépe pochopit a přispěje i k jejímu odstraňování a předcházení. Bolest je úzce spjata s psychickým stavem, a ten může představovat i její největší složku.

V periferních mechanizmech patologické bolesti se nejvíce uplatňují přímá senzitizace periferního nervového zakončení vyvolaná chemickými látkami vyplavenými při poškození buněk nebo buňkami imunitního systému. Dále pak změny funkce a zastoupení receptorů na membráně nervového zakončení vedoucí k zvýšení citlivosti na periferní podněty a snížení prahu pro nociceptivní aktivaci, nebo také aktivace nociceptorů signalizujících bolest nebolestivým podnětem - hyperalgezie.

V centrálních mechanizmech se na vzniku patologických bolestivých stavů podílí zejména modulace synaptického přenosu, která vede k aktivaci mechanoreceptorů i slabým taktilním podnětem a bolestivému vjemu – allodynii.

V posledních letech je velká pozornost věnována funkci TRPV1 receptorů, které se rozhodujícím způsobem podílí na vzniku a modulaci nociceptivní signalizace. Poznávaní principů aktivace a modulace těchto receptorů, které plní roli buněčných senzorů, vede k hlubšímu porozumění procesů nocicepce a ukazuje nové cíle pro analgetickou terapii.

Vnímání bolesti je výsledkem integrace senzorických, kognitivních a psychodynamických podnětů. Bolesti se člověk vždy instinktivně brání a vyvolá v něm obranné a únikové reakce. Už od počátku dějin můžeme nalézt snahy o zmírnění, potlačení nebo o úplné vyléčení se bolesti. Čím hlubší budou naše vědomosti o mechanismech vzniku bolesti, tím lépe se nám podaří bolest zvládnout a léčit.

9. Vlastní práce

V laboratořích oddělení Funkční morfologie na Fyziologickém ústavu Akademie věd ČR pod vedením MUDr. Jiřího Palečka CSc. pracuji na projektu zaměřeném na objasnění úlohy TRPV1 receptorů při modulaci nociceptivní signalizace na míšní úrovni. Cílem je zjistit jak TRPV1 receptory modulují synaptický přenos a jestli se podílí na vzniku hyperlagezie po intratekálně podaném TNF-α. Po podání TNF-alfa dochází k výrazné tepelné hyperalgesii, která se projeví zkrácením reakční doby na tepelný podnět aplikovaný na zadní tlapku. Mechanismy vzniku této hyperlagezie nejsou dosud zcela jasné. V našich pokusech sledujeme vliv podání antagonisty TRPV1 receptorů na rozvoj hyperlagezie. Současně sledujeme expresi proteinu Fos, který je produktem aktivace ranných genů c-Fos a na míšní úrovni je využíván jako marker zvýšené aktivace nociceptivních neuronů.

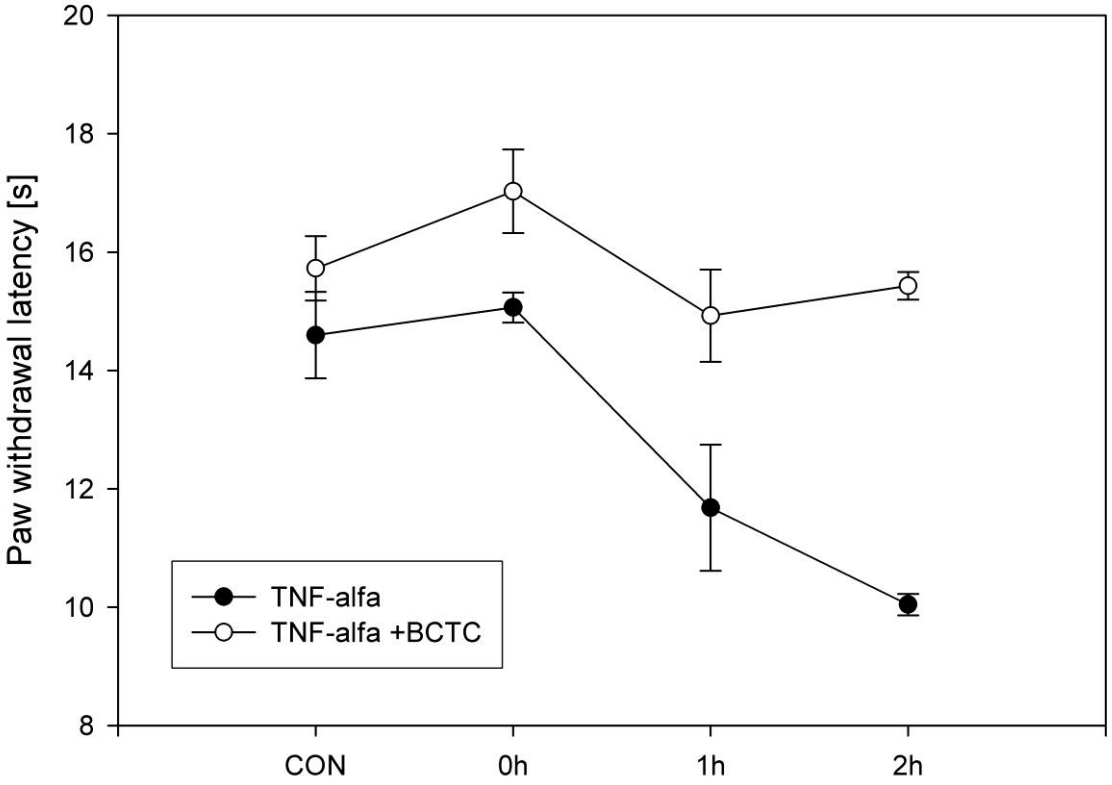
Má práce spočívá v provádění operací - zavádění intrathekálních katétrů, provádění behaviorálních měření (reakce na tepelný podnět) a zpracování dat z immunohistochemických pokusů sledujících expresi Fos proteinu v neuronech zadního rohu míchy (laminy I. a II.).

•Během operací jsem aplikovala intratekální katétr mezi obratle L3 a L4 tak aby konec katedru dosahoval od oblasti L3-L5 míšních segmentů, kde je hlavní projekce senzorických vláken ze zadní končetiny do míchy.

Katétrem byl aplikován TNF-α.a antagonista TRPV1 receptorů (BCTC a SB366791).

•V behaviorálních studiích sleduji reakci na tepelný podnět aplikovaný na plantu pedis potkanů kmene Wistar. Reakce se měří jako reakční doba odtažení zadní tlapky od podložky.

•V immunohistochemických studiích hodnotím expresi Fos v neuronech zadního rohu míchy. Po podání TNF- α. dochází k navýšení počtu neuronů exprimujících Fos protein v jádře.



Obrázek 16. Graf reakční doby na tepelný podnět. Předběžné výsledky ukázaly, že aplikace TNF-alfa intratekálně vedla k rozvoji výrazné tepelné hyperlagezie. To se projevilo snížením reakční doby z kontrolních hodnot (con, 0h) až na 10s (plné symboly) dvě hodiny po aplikaci. U druhé skupiny zvířat byl před podáním TNF-alfa podán antagonista TRPV1 receptorů BCTC. Jak je patrné z grafu (prázdné symboly), aplikace BCTC vedla k výraznému oslabení vzniku tepelné hyperlagezie a tedy omezenému zkrácení reakční doby na tepelný podnět. Tyto výsledky naznačují možné zapojení míšních TRPV1 receptorů při modulaci nociceptivní signalizace za patologických bolestivých stavů.

10. Seznam použité literatury

1. **Amaya F, Shimosato G, Nagano M, Ueda M, Hashimoto S, Tanaka Y, Suzuki H, Tanaka M.** NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia. Eur J Neurosci. 2004 Nov;20(9):2303-10
2. **Apkarian A.V**. Functional imaging of pain: new insights regarding the role of the cerebral cortex in human pain perception THE NEUROSCIENCES, Vol 7, 1995: pp 279–293
3. **Bandell, M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J., Earley, T.J., and Patapoutian, A.** (2004) Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin: Neuron 41, pp. 849-857
4. **Bentley GN, Gent JP.** Neurokinin actions on substantia gelatinosa neurones in an adult longitudinal spinal cord preparation. Brain Res. 1995 Feb 27;673(1):101-11
5. **Belmonte C., Cervero F.** Neurobiology of Nociceptors p. 531. Oxford University Press 1996 Oxford.
6. **Besson JM**, **Chaouch A**. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. Physiol Rev. 1987 Jan;67(1):67-186.
7. **Bettler B, Mulle C.** Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. Neuropharmacology. 1995 Feb;34(2):123-39.
8. **Caterina MJ**, **Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D**. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature. 1997 Oct 23;389(6653):816-24.
9. **Caterina MJ**, **Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D**. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. Science. 2000 Apr 14;288(5464):306-13. Science. 2000 Apr 14;288(5464):241-2.
10. **Cervero F.** Visceral pain: mechanisms of peripheral and central sensitization. Ann Med. 1995 Apr;27(2):235-9 **A**
11. **Cervero F**. Pain.What is a nociceptor-specific(class 3)cell?Pain.1995Jul;62(1):1235.**B**
12. **Coggeshall RE, Carlton SM.** Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. Brain Res Brain Res Rev. 1997 Jun;24(1):28-66.
13. **Conn PJ**, **Pin JP**. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1997;37:205-37.

14. **Craig AD**, **Bushnell MC, Zhang ET, Blomqvist A**. A thalamic nucleus specific for pain and temperature sensation. Nature. 1994 Dec 22-29;372(6508):770-3.

15. **Docherty RJ, Yeats JC, Bevan S, Boddeke HW**. Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. Pflugers Arch. 1996 Apr;431(6):828-37

16. **Dubner R**, **Bennett GJ**. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception Annu Rev Neurosci. 1983;6:381-418. **A**

17. **Dubner R**. Pain research in animals. Ann N Y Acad Sci. 1983;406:128-32. **B**

18. **Dubner R, Gold M.** The neurobiology of pain. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jul 6;96(14):7627-30**.**

19. **Ferreira SH, Lorenzetti BB.** Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. Neuropharmacology. 1994 Nov;33(11):1479-85.

20. **Ferreira J, Campos MM, Araújo R, Bader M, Pesquero JB, Calixto JB.** The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. Neuropharmacology. 2002 Dec;43(7):1188-97.

21. **Ferrer-Montiel A, García-Martínez C, Morenilla-Palao C, García-Sanz N, Fernández-Carvajal A, Fernández-Ballester G, Planells-Cases R.** Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design.Eur J Biochem. 2004 May;271(10):1820-6.

22. **Fletcher EJ**, **Lodge D.** New developments in the molecular pharmacology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate and kainate receptors. Pharmacol Ther. 1996;70(1):65-89.

23. **Grassi F, Mileo AM, Monaco L, Punturieri A, Santoni A, Eusebi F.** TNF-alpha increases the frequency of spontaneous miniature synaptic currents in cultured rat hippocampal neurons. Brain Res. 1994 Oct 3;659(1-2):226-30.

24. **Handwerker HO**, **Kobal G.** Psychophysiology of experimentally induced pain. Physiol Rev. 1993 Jul;73(3):639-71.

25. **Harris JA**. Using c-fos as a neural marker of pain.Brain Res Bull. 1998;45(1):1-8.

26. **Hollmann M, Boulter J, Maron C, Heinemann S.** Molecular biology of glutamate receptors. Potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor splice variants by zinc. Ren Physiol Biochem. 1994 May-Aug;17(3-4):182-3.

27. **Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ**. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms?Trends Neurosci. 2003 Dec;26(12):696-705

28. **Jordt SE, Julius D.** Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. Cell. 2002 Feb 8;108(3):421-30

29. **Julius D, Basbaum AI**. Molecular mechanisms of nociception. Nature. 2001 Sep 13;413(6852):203-10.

30. **Krause JE, Chenard BL, Cortright DN**. Transient receptor potential ion channels as targets for the discovery of pain therapeutics. Curr Opin Investig Drugs. 2005 Jan;6(1):48-57

31. **Mandadi S, Numazaki M, Tominaga M, Bhat MB, Armati PJ, Roufogalis BD.** Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV1 ion channels. Cell Calcium. 2004 May;35(5):471-8.

32. **Männel DN.** Biological aspects of tumor necrosis factor. Immunobiology. 1986 Sep;172(3-5):283-90.

33. **Matta JA, Miyares RL, Ahern GP.** TRPV1 is a novel target for omega-3 polyunsaturated fatty acids. J Physiol.2007 Jan15;578(Pt 2):397-411.Epub2006 Oct12.

34. **Mense S.** Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. Pain. 1993 Sep;54(3):241-89

35. **Millan M.J.** The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: focus on receptor multiplicity. In The Pharmacology of pain. Handbook of Experimental Pharmacology.1997 Vol 130 p.385-446.

36. **Millan M.J**. The induction of pain: an integrative review. Prog Neurobiol. 1999 Jan;57(1):1-164.

37. **Mohapatra DP, Nau C.** Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. J Biol Chem. 2003 Dec 12;278(50):50080-90. Epub 2003 Sep 23.

38. **Montell C, Rubin GM**. Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. Neuron. 1989 Apr;2(4):1313-23.

39. **Munglani R, Hunt SP**. Molecular biology of pain. Br J Anaesth. 1995 Aug;75(2):186-92.

40. **Numazaki M, Tominaga T, Takeuchi K, Murayama N, Toyooka H, Tominaga M.** Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jun 24;100(13):8002-6. Epub 2003 Jun 13.

41. **Prescott ED, Julius D.** A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. Science. 2003 May 23;300(5623):1284-8.

42. **Rami HK and Gunthorpe MJ** The terapeutic potential of TRPV1 (VR1) antagonists: clinical answers await. Drug Discovery Today: Therapeutic Strategie. 2004,(1):97-104

43. **Roth, Robert J.; Cooper, Jack R.; Bloom, Floyd E.** (2003). The Biochemical Basis of Neuropharmacology. Oxford [Oxfordshire]: Oxford University Press, 416 pages. ISBN 0-19-514008-7.

44. **Schäfers M, Sorkin LS, Sommer C.** Pain. 2003 Aug;104(3):579-88. Intramuscular injection of tumor necrosis factor-alpha induces muscle hyperalgesia in rats. Pain. 2003 Aug;104(3):579-88.

45. **Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P, Davis JB.** TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. Nature. 2002 Jul 11;418(6894):186-90. Epub 2002 Jun 23.

46. **Scholz J, Woolf CJ.** Can we conquer pain? Nat Neurosci. 2002 Nov;5 Suppl:1062-7.

47. **Stucky CL, Gold MS, Zhang X.** Mechanisms of pain. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Oct 9;98(21):11845-6. Epub 2001 Sep 18. Review

48. **Swett, J.E. and Wolf, C.** The somatotopic organization of primary afferent terminals in the superficial laminae of the dorsal horn of the rat spinal cord. J. Comp.Neurol.231, 66-71. (1985)

49. **Todd AJ, Spike RC**. The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. Prog Neurobiol. 1993 Nov;41(5):609-45.

50. **Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D.** The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. Neuron. 1998 Sep;21(3):531-43.

51. **Treede RD, Meyer RA, Campbell JN**. Comparison of heat and mechanical receptive fields of cutaneous C-fiber nociceptors in monkey. J Neurophysiol. 1990 Nov;64(5):1502-13.

52. **Willis, W.D. and Coggeshall, R.E.** (1991) Sensory Mechanisms of the Spinal Cord, p. 595

53. **Woolf CJ.** Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy.Life Sci. 2004 Apr 9;74(21):2605-10