

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

**Periferní a centrální mechanismy
hyperalgesie jako podklad patologických
bolestivých stavů**

Martina Růžičková

Bakalářská práce

Praha, 2006
Školitel: MUDr. Jiří Paleček CSc

OBSAH:

1. Úvod	4
2. Mechanismy vzniku bolesti	5
2. 1. Spinální ganglia	6
2. 2. Periferní aferentní vlákna s nociceptivní funkcí	7
2. 3. Role neurotransmiterů a neuromodulátorů	8
2. 4. Základní morfologie šedé hmoty míchy	10
3. Bolestivé patologické stavy	10
3. 1. Hyperalgesie	10
3. 2. Centrální sensitizace míšních neuronů	11
3. 3. Procesy na úrovni periferních nociceptorů při sensitizaci	12
3. 3. 1. Zánětlivé mediátory na periférii	12
4. Vápníkové pufry	15
4. 1. Regulační funkce vápníku	15
4. 2. Proteiny vázající vápník	15
4. 2. 1. Parvalbumin (PV)	16
5. TRPV receptory	17
6. Změny exprese TRPV1 receptorů a parvalbuminu v neuronech spinálních ganglií po navození periferního zánětu	19
6. 1. Cíl práce	19
6. 2. Materiál a metodiky pokusu	20
6. 3. Výsledky	28
7. Závěr	28

ZKRATKY:

5-HT	Serotonin	serotonin
AC	Adenyl cyclase	adenyl cykláza
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid	
ATP	Adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	
CaM	Calmodulin	kalmodulin
CaMKII	Calmodulin-dependent kinase II	kináza II závislá na kalmodulinu
CGRP	Calcitonin gene related peptide	peptid odvozený od calcitoninu
COX	Cyclooxygenase	cyklooxygenáza
DH	Dorsal horn	zadní roh míšni
DRG	Dorsal root ganglia	ganglia zadního kořene míšního
EAA	Excitatory amino acid	excitační aminokyseliny
IL	Interleukin	interleukin
NGF	Nerve growth factor	nervový růstový faktor
NK	Neurokinin	neurokinin
NMDA	N-methyl-D-aspartate	N-methyl-D-aspartát
NOS	NO synthase	NO syntáza
PAF	Peripheral afferent fibre	periferní aferentní vlákno
PG	Prostaglandin	prostaglandin
PK	Protein kinase	proteinkináza
PLC	Phospholipase C	fosfolipáza C
PV	Parvalbumin	parvalbumin
SP	Substance P	substance P
TNF	Tumor necrosis faktor	tumor nekrotizující faktor
TRPV	Transient receptor potential vanilloid	

1. Úvod

Bolest je definována jako nepříjemný smyslový a emoční prožitek, spojený se skutečným nebo potenciálním poškozením tkáně. Bolest chrání organismus před nebezpečným poškozením. Např. reflexní odtážení končetiny vyvolané bolestivým podnětem může zabránit poranění, také pacientův popis bolesti usnadní lékaři diagnózu. Existují i výjimečné případy, kdy se lidé narodí bez schopnosti pociťovat bolest. Na této indispozici můžeme dokumentovat význam vnímání bolesti. Tito lidé si mohou způsobit závažná poranění a to, že necítí varovné signály jim může způsobit až smrt. V protikladu k nim stojí lidé trpící krutými bolestmi bez zjevné příčiny. Například poškození periferních nervů vede někdy k dlouhotrvajícím bolestivým stavům, které jsou vyvolány nebolestivými podněty jako je jemný dotyk. Přitom příčina těchto patologických bolestí může být banální, například drobné poranění.

Vjem bolesti a nocicepce probíhá od aktivace nociceptorů na periferii, přes zadní rohy míšni, až po nervové struktury v centrálním nervovém systému. Obvykle je bolest vyvolána aktivací nociceptorů na periferii poškozujícím podnětem, ale může také pocházet z přímého poranění sensorických vláken či oblastí v centrální nervové soustavě (CNS) a nebo změnou prahu aktivace periferních aferentních vláken (PAF).

Krátkodobá, akutní a subchronická bolest plní fyziologickou funkci, varuje organismus před poškozením. U chronické a neuropatické bolesti, která pacienta poškozuje, se objevují rysy patofyziologické, je tudíž nežádoucí. Zatímco akutní bolestivé stavy lze většinou snadno zmírnit odstraněním vyvolávající příčiny nebo farmakologicky, v případě patologické chronické bolesti je často léčení obtížné. Studium mechanismů vzniku těchto patologických stavů je tak nutné pro možnost jejich lepší terapie. Bolest je tedy na jednu stranu obranná reakce a slouží jako varovný signál,

na druhou stranu ještě přitěžuje nemocnému. Proto je organismus vybaven jak mechanismy vytvářejícími pocit bolesti, tak i mechanismy, které tento pocit potlačují.

Chronické bolestivé stavy jsou často charakterizovány zvýšenou citlivostí, kdy nebolestivé podněty mohou vyvolávat bolest (allodynie) a bolestivé podněty vyvolávají intenzivnější bolestivé vjemy, než za normálních podmínek (hyperalgesie). Patofyziologickým podkladem chronických bolestivých stavů jsou zejména změny na periferních nervových zakončeních a modulace synaptického přenosu na míšní úrovni.

Tato práce shrnuje pouze velmi základní poznatky o některých mechanismech vznikajících při chronických patologických stavech, zejména na úrovni periferních nociceptorů a neuronů spinálních ganglií. Experimentální část je zaměřena na studium změn exprese receptorů aktivovaných kapsaicinem - TRPV1 (transient receptor potential vaniloid) a parvalbuminu (protein vázající vápník) v neuronech spinálních ganglií po navození experimentální artritidy.

2. Mechanismy vzniku bolesti

Na poškozující nebo potenciálně poškozující podněty reagují zejména nociceptory, což jsou volná nervová zakončení, která představují periferní část aferentního neuronu. Při dostatečném (nadprahovém) podráždění chemickými, mechanickými či tepelnými stimuly vzniká na nervovém zakončení akční potenciál. Ten je přenášen periferním nervem, který je tvořen primárními aferentními vlákny (PAF). Ta mají těla neuronů v gangliích zadního kořene míšního (DRG) a jejich centrální výběžek tvoří synapsi s neurony zadních rohů míšních (DH).

PAF mají tři hlavní funkce vzhledem k úloze v nocicepci: detekce poškozujících podnětů (transdukce), vedení sensorického vstupu z periferních zakončení do míchy (kondukce), a předání informace neuronu v zadním rohu míšním (trasmise) (Almeida a kol., 2004). Některá PAF také projikují přímo do nukleus gracilis a cuneatus v prodloužené míše.

Nociceptivní informaci vedou do supraspinálních center projekční neurony. Tyto neurony jejichž těla jsou uložena v míše mají buď přímou projekci, monosynaptickou do supraspinálních center nebo na své cestě tvoří synapse se sekundárními neurony a daná dráha je pak polysynaptická. Mezi nejdůležitější monosynaptické nociceptivní dráhy patří spinothalamická, spinoretikulární a spinomesencephalická. Pro vjem bolesti je mimo aktivace řady podkorových center v CNS také důležitá projekce do kůry.

2. 1. Spinální ganglia

Spinální ganglion - **ganglion spinale** - je vřetenovité ztlustění na zadních míšních kořenech. Ganglia krčních, hrudních a bederních zadních kořenů jsou uložena ve foramina intervertebralia, sakrální ganglia pak v kanálu křížové kosti.

Na povrchu spinálního ganglia je vazivové pouzdro. Centrální oblast ganglia obsahuje nervová vlákna, v periferní oblasti jsou uložena těla neuronů. Neurony spinálních ganglií se označují jako T-pseudounipolární neurony. Mají okrouhlá až oválná buněčná těla (20-100 μm) a jejich cytoplazma obsahuje mohutné endoplazmatické retikulum. Z buněčného těla vystupuje jeden (často zvlněný) výběžek, který se po 40-60 μm dělí na dva divergující výběžky ve tvaru písmene T (odtud označení těchto buněk). Centrální výběžek (axon) vstupuje do míchy cestou zadního míšního kořene, zatímco periferní výběžek (dendrit) vstupuje do míšního nervu a inervuje periferních tkáň a orgány. Periferní a centrální výběžek se od sebe morfologicky neliší.

2. 2. Primární aferentní vlákna (PAF) s nociceptivní funkcí

PAF můžeme podle průměru a rychlosti vedení vzruchu rozdělit na tři základní typy: A β , A δ , a C vlákna.

A β jsou silná vlákna, >10 μm , myelinizovaná s vysokou rychlostí vedení akčního potenciálu 30-100 m/s

A δ jsou středně silná vlákna 2-6 μm , myelinizovaná s rychlostí vedení 12-30 m/s

C vlákna jsou tenká 0,4-1,2 μm , nemyelinizovaná s nízkou rychlostí vedení 0,5-2 m/s

Kůže člověka je těmito druhy periferních vláken inervována v přibližném poměru 70, 10 a 20% (C: A δ : A β). Vlákna jsou různě citlivá k poškozujícím a nepoškozujícím podnětům. Všechny tři typy vláken mohou vést i informaci o nebolestivých podnětech. Nociceptivní informaci vedou za normálních podmínek pouze C a A δ vlákna, ale ne A β . Při poškození periferní tkáně je aktivace A δ vláken pocíťována jako první fáze bodavé bolesti, zatímco aktivace C vláken je pocíťována jako druhá fáze tupé bolesti.

Byly popsány dva hlavní typy A δ vláken. Typ I. A δ vláken je aktivován mechanickými podněty o vysoké intenzitě na poškozující úrovni. Jsou to vysokoprahové mechanoreceptory zřídka reagující na intenzivní teplotu, chlad a chemické podněty. A δ vlákna typu II. jsou méně častá a jsou charakteristická nižším prahem pro nociceptivní tepelné podněty (Beydoun, 1996).

Zakončení PAF lze rozdělit také podle toho, na jaké podněty reagují: na mechanoreceptory, termoreceptory a chemoreceptory. Zvláštní skupinu představují polymodální zakončení, které se vyznačují tím, že odpovídají na teplotu, mechanické i dráždivé chemické podněty .

2. 3. Role neurotransmiterů a neuromodulátorů

PAF mohou být rozdělena také podle povahy látek, které obsahují a uvolňují. Druh těchto látek (mediátorů), které jsou uvolňovány z PAF se liší:

1. mezi PAF inervujícími různé typy tkání: kůže, sval, kloub a viscerální orgán
2. mezi PAF inervující nepoškozenou nebo poškozenou tkáň
3. mezi různými morfologicky odlišnými skupinami PAF např. C a A δ vlákna.

C vlákna můžeme rozdělit na dvě hlavní subpopulace, první obsahuje peptid odvozený od kalcitoninu (CGRP) a substanci P (SP) a je vývojově závislá na nervovém růstovém faktoru (NGF). Druhá subpopulace je definovaná přítomností lektinu- IB4 a exprimuje na povrchu svých periferních zakončení receptor pro ATP s excitační funkcí a je závislá na gliovém neurotrofickém faktoru (GDNF) (Willis a Coggeshall, 1991).

Podstatná část C vláken reaguje na pálivou složku papriky – kapsaicin patřící mezi vaniloidy. Na kapsaicin reagují vaniloidní receptory TRPV tvořící iontový kanál propustný pro kationty, který je aktivován změnami teplot a zánětlivými mediátory. O TRPV receptorech se zmíním podrobněji v jiné kapitole.

Hlavními mediátory, které přenášejí nociceptivní informaci z PAF do neuronů DH, jsou glutamát (Glu) a další excitační aminokyseliny (EAA). Glutamát spolu s aspartátem se váže v DH na glutamátové receptory ionotropního i metabotropního typu. **Ionotropní** receptory dělíme na tři typy podle agonistů: NMDA, AMPA a kainátové receptory.

NMDA receptory selektivně vážící N-methyl-D-aspartát tvoří tetrametr složený z podjednotek: NR1 a NR2. Kanál propouští Ca²⁺, Na⁺ a K⁺ ionty.

Při klidovém membránovém potenciálu brání otevření iontového kanálu ionty Mg²⁺. Receptor má také modulační vazebné místo pro glycin, jehož obsazení je nezbytné pro otevření kanálu.

AMPA receptory jsou selektivně aktivovatelné α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxasole propionovou kyselinou. Skládají se ze čtyř podjednotek GluR1 až GluR4. Podjednotka GluR2 udává, zda bude kanál propustný pro vápník. Na rozdíl od NMDA jsou AMPA receptory propustné především pro ionty Na^+ a K^+ než Ca^{2+} . Dalším rozdílem je nižší afinita ke glutamátu. Obsazení allosterického místa na AMPA receptoru není bezpodmínečně nutné pro aktivaci iontového kanálu (Bettler a Mulle, 1995).

Kainátové receptory reagují na kainát. Jsou tvořeny různými kombinacemi podjednotek GluR5-GluR7, KA1 a KA2. Mají podobné vlastnosti jako AMPA receptory.

Metabotropní Glu receptory jsou rozděleny do tří skupin. I. skupina aktivuje fosfolipázu C (PLC) a pravděpodobně NO syntázu (NOS). II. a III. skupina je negativně spojena s adenylcyklázou (AC). Metabotropní Glu receptory se podílejí na modifikaci hladiny intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů a aktivitě proteinkináz, které hrají důležitou roli v regulaci receptorů spojených s iontovými kanály a v modulaci genové transkripce.

Z PAF se uvolňuje mnoho neuropeptidů modulujících nocicepci v DH, např. somatostatin, galanin, CGRP (peptid odvozený od kalcitoninu), cholecystokinin. Dále pronociceptivní tachikininy, SP a neurokinin A (NKA), které se váží na NK1 a NK2 receptory. Oba receptory jsou pozitivně spojeny s PLC (Bentley a Gen, 1997).

Další pronociceptivní mediátory jsou např. ATP, NO a PG. Tyto mediátory ovlivňují funkci neuronů a sousedních gliových buněk.

2.4. Základní morfologie šedé hmoty míchy

Šedá hmota míšní se většinou dělí do 10 lamin. Zadní roh je tvořen laminou I (marginální zóna), laminou II (substantia gelatinosa), laminami III a IV (nucleus proprius) a V a VI (hluboké vrstvy). Laminy VI až IX představují přední roh míšní. Lamina X obkružuje centrální kanál. Do příjmu, zpracování a transmise nociceptivní informace se přednostně zapojují laminy I, vnější část laminy II, lamina V, VI a X (Swett a Woolf, 1985).

3. Bolestivé patologické stavy

Pokud dojde k poranění tkáně, dochází většinou ke zvýšení citlivosti nociceptorů. Do daného místa se dostávají imunitní buňky, které jsou kromě nervových a gliových buněk také potenciálním zdrojem zánětlivých mediátorů. V poraněné tkáni je akumulován důležitý pro-nociceptivní mediátor bradykinin, který se váže na dva typy receptorů – B1 a B2, oba jsou pozitivně spojeny s PLC. Bradykinin nepůsobí pouze přímo, ale i přes endoteliální buňky, fibroblasty, makrofágy a žírné buňky, které jsou zdrojem glutamátu, NO, prostaglandinů, ATP, histaminu a dalších pronociceptivních mediátorů. Následkem snížení prahu pro aktivaci nociceptoru dochází k hyperalgesii nebo allodynii.

3. 1. Hyperalgesie

Po poškození kůže, například chemickými, tepelnými a mechanickými stimuly dochází ke zvýšené citlivosti nociceptorů, tedy snížení jejich prahu pro aktivaci. Ačkoli poškozující - bolestivý podnět je přerušeno, poškozená tkáň může dále reagovat na

tepelné, mechanické a chemické podněty zvýšenou citlivostí. Tento jev je znám jako primární hyperalgesie. V okolí poškozené tkáně se často objeví oblast označovaná jako oblast sekundární hyperalgesie, kterou tvoří tkáň nepoškozená. V této oblasti mohou být vnímány nebolestivé podněty jako bolestivé a bolestivé podněty jako více intenzivní (Kilo, 1994).

Primární hyperalgesie je především důsledkem procesů probíhajících na úrovni periferních nociceptorů, ale může zahrnovat i modulační procesy v CNS. Na druhé straně se předpokládá, že sekundární hyperalgesie a mechanická allodynie jsou přednostně způsobeny centrálními mechanismy (Millan, 1999). Mezi hlavní mechanismus sekundární hyperalgesie patří modulace somatosenzorické informace v zadních rožích míšních. Ta vede ke zvyšování a facilitaci odpovědí neuronů na periferní podněty. Existují tedy dva hlavní mechanismy přispívající ke vzniku bolesti - fenomén periferní sensitizace, zahrnující snížení prahu a zvýšení citlivosti periferních zakončení nociceptorů a centrální sensitizace způsobená změnami synaptického přenosu v míše.

3. 2. Centrální sensitizace míšních neuronů

Většina PAF končí v zadním rohu míšním, kde dochází k různým formám regulace na postsynaptické a presynaptické membráně. Za fyziologických podmínek hraje hlavní úlohu zejména glutamát uvolňovaný z primárních aferentních vláken. Kromě glutamátu jsou uvolňovány z centrálních zakončení PAF také řada molekul jiných látek – neuromodulátorů. Mezi hlavní patří neuropeptidy jako je substance P a neurotrofní faktory. Ty zejména indukují dlouhodobé změny v synaptickém přenosu na míšní úrovni, což v případě jeho posílení je známé jako centrální sensitizace (McMahon, 2004).

Zvýšení výlevu peptidových přenašečů z PAF aktivuje v neuronech DH systém druhých posílů a má za následek zvýšení intracelulární hladiny vápenatých iontů a fosforylaci proteinů. Během dlouhotrvající nociceptivní aktivace může docházet k aktivaci kináz, což může vést také k transkripčním změnám. Následkem je modulace funkce receptorů na neuronech v DH. Dochází tak ke zvýšené aktivaci těchto neuronů, což vede ke snížení prahu bolesti a ke zvýšení odpovědi na normální podněty a k rozšíření periferního receptivního pole. Na modulaci synaptického přenosu na míšní úrovni se podílí celá řada dalších mediátorů a modulátorů jako např. prostaglandiny, NO, opioidy a adrenergní agonisté.

3. 3 Procesy na úrovni periferních nociceptorů při sensitizaci

Z buněk poškozené tkáně jsou uvolňovány tzv. mediátory zánětu, mezi které mimo jiné patří ionty (K^+ , H^+), bradykinin, histamin, serotonin (5-HT), ATP a NO. Z arachidonové kyseliny jsou produkovány prostaglandiny a leukotrieny. Aktivované imunitní buňky uvolňují mediátory jako jsou cytokininy a růstové faktory. Některé z těchto mediátorů aktivují periferní nociceptory přímo a mohou vést ke spontánní bolesti, jiné stimulují výlev dalších algogenních látek. Zánětlivé mediátory vedou k modulaci transdukce daných podnětů, např. ovlivněním napětově řízených kanálů. Důsledkem může být vznik periferní sensitizace.

3. 3. 1. Zánětlivé mediátory na periférii

Bradykinin

Bradykinin je uvolňován z poškozené tkáně a přispívá k časným „zánětlivým“ procesům. Má vliv na PAF zahrnující jejich aktivaci a sensitizaci, buď přímou stimulací senzorických zakončení nebo přispívá k tvorbě prostaglandinů, což jsou další mediátory

zánětu. Byly popsány dva receptory pro bradykinin B1 a B2. Jejich význam byl například prokázán při použití selektivního a vysoko afinního antagonisty B2 receptorů, Bradyzidu, který blokuje zánětlivou hyperalgesii u zvířat. Některé studie naznačují, že B1 receptor podporuje nocicepci pouze během poškození tkáně. Z toho vyplývá, že exprese těchto receptorů na periferních zakončeních je důležitá pro nocicepci (Dray, 1993).

Cytokininy

Cytokininy hrají významnou roli v iniciaci a udržování „zánětlivého“ stavu. Kromě toho mají zesilující a inhibiční účinky na imunitní a zánětlivé buňky a výrazně ovlivňují senzorycké neurony. Podobně jako jiné látky mohou cytokininy působit přímo na nociceptory, běžnější je nepřímá stimulace výlevu látek jako jsou prostaglandiny. Během akutní fáze zánětu cytokininy indukují sensitizaci nervových zakončení přes kinázy spojené s receptory nebo přes fosforylaci iontových kanálů, zatímco při chronickém zánětu je důležitější zvýšení exprese receptorů a sekundární signalizace. Mezi cytokininy podporující zánět patří (TNF α), interleukin-1 (IL-1), IL-6 a chemokinin IL-8. Intradermální injekce těchto látek způsobuje mechanickou a teplotní hyperalgesii. Protilátky proti TNF α snižují hyperalgesii a jsou používány k redukci bolesti u revmatické artritidy (Woolf a kol., 1997).

Prostaglandiny

Prostaglandiny jsou důležité mediátory zánětu a bolesti. Jejich syntézu z kyseliny arachidonové katalyzuje enzym cyklooxygenasa (COX). Existuje více isoform tohoto enzymu. Základní konstitutivní aktivita COX 1 generuje fyziologické množství PG potřebné pro normální funkci buněk. Isoforma COX 2 je indukována v periferní tkáni

cytokininy, růstovými faktory a jinými zánětlivými stimuly. Prostaglandiny mohou také přímo působit na nociceptory, ale častější je funkce nepřímé sensitizace. Zvyšují hladinu cyklického ATP a mohou zvyšovat citlivost nervových zakončení snížením aktivačního prahu pro sodné kanály přes protein kinázu A. Zvyšují citlivost primárních aferentních neuronů k bradykininu a jiným mediátorům. COX-1 a COX-2 jsou hojně exprimovány v mozku a míše. Zatímco deficiencie COX-1 u myši snižuje nociceptivní aktivitu k poškozujícím podnětům, u deficiencie COX-2 nejsou sledovány tak zřetelné změny. Navíc při deficienci COX-2 je zvyšována exprese COX-1 enzymu, zatímco deficiencie COX-1 nemá za následek zvyšování COX-2 (Ballou, 2000).

Růstový faktor

Nervový růstový faktor (NGF) dlouhodobě přispívá ke změnám v citlivosti nociceptorů během „zánětu“. NGF se nachází v buňkách typu fibroblastů, keratinocytů a Schwannových buněk. Velká škála zánětlivých mediátorů, zejména IL-1 a TNF α , zvyšuje produkci NGF. Význam NGF pro zprostředkování hyperalgesie ukazuje výrazná redukce bolestivé odpovědi po podání protilátek proti NGF. Injikovaný růstový faktor způsobuje hyperalgesii kůže a hlubší bolest, která trvá několik dní. Tyto sensitizační důsledky jsou pravděpodobně zprostředkovány přímým vlivem na nociceptory a zároveň přes mediátory produkované aktivovanými žírnými a jinými zánětlivými buňkami (Kidd a Urban, 2001).

4. Vápníkové pufry

4.1. Regulační funkce vápníku

Ca^{2+} funguje jako univerzální nitrobuněčný signál, který může regulovat mnoho odlišných buněčných procesů. Aktivuje signální systémy s velmi odlišnou prostorovou a časovou dynamikou. Vysoké zvýšení Ca^{2+} na jednom místě v buňce zajišťuje rychlé odpovědi, zatímco pomalé odpovědi jsou kontrolovány nižším opakovaným krátkodobým zvýšením hladiny vápníku. Hladina vnitrobuněčného Ca^{2+} je určena rovnováhou mezi procesy, které umožňují vtok Ca^{2+} do cytoplazmy a procesy, které zajišťují odstranění Ca^{2+} z cytosolu. Koncentrace Ca^{2+} v buňce je ovlivňována společným působením pufřů, pump a vápenatých kanálů. Ca^{2+} se dostává do cytoplazmy z extracelulárního prostoru nebo buněčných zásobáren, což je obvykle endoplasmatické retikulum (ER). Uvolňování vápenatých iontů z ER je kontrolováno samotným Ca^{2+} nebo jinými druhými posly jako je inositol-1,4,5-trifosfát, cyklická ADP ribóza a sfingosin-1 fosfát, které stimulují nebo modulují otevírání vápníkových kanálů buněčných zásobáren (Berridge, 2003).

Ukazuje se, že změny koncentrace intracelulárního vápníku v neuronech zadního rohu míšního a spinálních ganglií jsou podstatné pro přenos bolesti .

4. 2. Proteiny vázající vápník

Ca^{2+} vstupující do cytosolu se zde téměř nevyskytuje volně, ale je vázán na vápníkové pufry a v menší míře na efekторы. Efekторы jako jsou troponin C, synaptotagmin, S100 proteiny a kalmodulin jsou odpovědné za různé procesy v buňce. Ovlivňují rychle probíhající události např. na pre-synaptické a post-synaptické

membráně neuronů nebo procesy probíhající po delší časový úsek např. buněčná proliferace.

Vápníkové pufrы upravují prostorové a časové vlastnosti vápníkové signalizace a zvyšují pohyblivost Ca^{2+} . Strukturálně jsou tyto proteiny charakterizovány přítomností různých motivů helixových smyček, které váží s vysokou afinitou Ca^{2+} ionty. Pufrы mají odlišné některé vlastnosti, např. calbindin D-28 (CB) a calretinin (CR) patří mezi tzv. rychlé pufrы, zatímco parvalbumin (PV) váže vápník pomaleji (Hontanila, 1998).

4. 2. 1. parvalbumin (PV)

Parvalbumin je protein, který hraje důležitou roli v udržování stálé hladiny Ca^{2+} , ke kterému má vysokou afinitu. PV patří mezi proteiny s motivy „EF hand“ vázající vápník. Tyto proteiny zahrnují více než 200 členů. Uspořádání „EF hand“ je odvozeno od prostorové orientace pátého (E) a šestého (F) α helixu parvalbuminu, který dohromady tvoří pomocí kovové vazby spojenou smyčku z 12 aminokyselin. Kovovou vazbu EF-hand proteinů ovlivňuje přítomnost iontů vápníku v oblasti smyčky. PV obsahuje tři EF-hand domény, z nichž dvě jsou spojeny kovovou vazbou. Velikost afinity pro Ca^{2+} leží od nanomolárního do mikromolárního rozmezí, podle koncentrace navázaného substrátu (Eyles, 2002).

PV je kromě Ca^{2+} schopný interagovat s Mg^{2+} . V klidovém stavu je uvnitř buňky ($\{\text{Ca}^{2+}\}_i < 100\text{nM}$, $\{\text{Mg}^{2+}\}_i \sim 0,3-0,6\text{mM}$). Za těchto okolností jsou na parvalbuminu navázány převážně hořečnaté ionty, které jsou nahrazovány ionty vápníku, pokud se jejich nitrobuněčná koncentrace zvýší. Disociace Mg^{2+} z PV je relativně pomalá.

PV je exprimován v nervovém systému a v periferních orgánech. Vnitrobuněčná distribuce PV je zejména cytosolická, ačkoliv jeho velikost zřejmě umožňuje difúzi do buněčného jádra.

Zvyšování vtoku Ca^{2+} do cytosolu je jeden z klíčů mechanismů sensitizace nervových zakončení. Naše předběžné výsledky ukazují, že periferní zánětlivé procesy mohou indukovat zvýšení exprese PV v neuronech DRG. Toto zvýšení vápníkových pufrů může měnit homeostázu vápenatých iontů v neuronech a ovlivňuje procesy závislé na Ca^{2+} , jako je synaptická plasticita – neuronální sensitizace (Greffrath, 2001).

Důležitost pufrů ve vápníkové signalizaci vyplývá ze studií s transgenními zvířaty, u kterých je gen pro příslušný pufr odstraněn. Když je gen kodující PV odstraněn, dochází např. k poškození buněk při svalové relaxaci a svaly se stávají odolné proti únavě, což je způsobeno deregulací mitochondrií. Zvířata s odstraněným genem pro PV mají defekty v krátkodobé synaptické plasticitě, která je způsobena chybami ve vápníkové signalizaci (Schwaller 2002).

5. TRPV1 receptory

TRPV1 (transient receptor potential vanilloid) receptory patří do skupiny TRP receptorů. Tyto receptory mají šest transmembránových domén tvořících neselektivní kationtový kanál propouštějící ionty Na^+ , K^+ a Ca^{2+} . Tepelné, chemické a mechanické podněty vedou ke změně propustnosti tohoto kanálu pro ionty. Přesná regulace exprese, lokalizace a funkce TRPV1 kanálů je rozhodující pro jejich senzickou roli v nociceptivních zakončeních. Zejména po zánětu, kdy přispívají k bolestivé hypersenzitivitě, prodělávají změny v translaci a dochází k odlišné posttranslační modifikaci (Clapham, 2001).

Na základě sekvenční homologie jsou TRP receptory rozděleny do šesti skupin. Mnoho jich je exprimováno v nervovém systému, pravděpodobně ve vysokoprahových

nociceptorech sensorických neuronů, kde hrají klíčovou roli při vnímání chemických a teplotních podnětů. TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4 a TRPM8 jsou termoreceptory (Bandell a kol. 2004). Tyto receptory jsou dokonale uzpůsobeny, aby pokrývaly široké rozmezí teplotní citlivosti, která zahrnuje vnímání tepla a chladu stejně tak jako bolestivého tepla a chladu. Dalším znakem mnoha TRP kanálů je chemosensitivita, např. ke kapsaicinu (pálivá složka chili paprik), protonům a endogenním cannabiodům u TRPV1.

TRPV1 je exprimován v subpopulaci malých spinálních ganglií. Má hlavní roli v periferní sensitizaci. Zvýšení exprese TRPV1 receptorů se objevuje v neuronech DRG po periferním zánětu a vyžaduje retrográdní transport nervového růstového faktoru (NGF) a aktivaci protein kinázy (MAPK). Toto přispívá ke zvýšené přepravě TRPV1 receptorů k periférii, kde jejich zvýšené množství může přispívat k „zánětlivé“ bolestivé hypersensitivitě (Ji a kol. 2002).

Počáteční fáze „zánětu“ zvyšuje citlivost nociceptorů převážně jako následek výlevu mediátorů ze zánětlivých buněk. Mnoho z těchto zánětlivých mediátorů neaktivuje nociceptory přímo, ale snižují práh pro jejich aktivaci. Na nociceptorních zakončeních dochází například k fosforylaci TRPV1 receptorů. Fosforylace a defosforylace značně mění funkci TRPV1 iontového kanálu a reprezentují hlavní způsob rychlých a dynamických změn v citlivosti na nociceptivní podněty.

Ačkoli aktivace TRPV1 způsobuje akutní stimulaci nociceptorů, jejich dlouhotrvající aktivace například aplikací kapsaicinu, indukuje desensitizaci TRPV1 receptorů, která vede k analgesii, případně až k morfologické destrukci nociceptoru díky nadměrnému vtoku vápenatých iontů přes TRPV1 receptory. TRPV1 desensitizace je závislá na Ca^{2+} a může být zprostředkována kalmodulinem (CaM), který přímo interaguje s receptorem (Lambers 2004). Předpokládá se, že sensitizace a

densensitizace TRPV1 receptorů je funkční odraz balancování mezi fosforylací a defosforylací. Fosforylace TRPV1 receptoru kinázou II závislou na calmodulinu (CaMKII) se jeví jako rozhodující pro jejich sensitizaci a defosforylace kalcineurinem (na calmodulinu závislá protein fosfatáza) se zdá být zásadní pro jejich desensitizaci (Jung 2004, Woolf 2005) .

6. Změny exprese TRPV1 receptorů a parvalbuminu v neuronech spinálních ganglií po navození experimentální artritidy

6. 1. Cíl práce

Cílem naší experimentální práce bylo charakterizovat populaci neuronů spinálních ganglií, které exprimují parvalbumin a receptory TRPV1. Jak bylo popsáno v předchozích kapitolách, jak parvalbumin, tak kapsaicinové receptory se mohou velmi významně podílet na přenosu nociceptivní informace v periferním nervovém systému. Naše hypotéza předpokládá, že po navození zánětu kolenního kloubu by mohlo dojít ke změně exprese těchto proteinů. Dalším cílem naší práce je proto porovnat expresi těchto proteinů ve spinálních gangliích inervujících kontrolní končetinu, popřípadě u zvířete bez zánětu, a v gangliích po navození experimentální artritidy.

6. 2. Materiál a metoda pokusu

Navození experimentální artritidy

Artritida byla u zvířat navozena v krátké etherové anestezii jednostranně nitrokloubní injekcí kolenního kloubu zadní pravé končetiny 0,1ml 3% směsí kaolinu a carrageenanu ve fyziologickém roztoku.

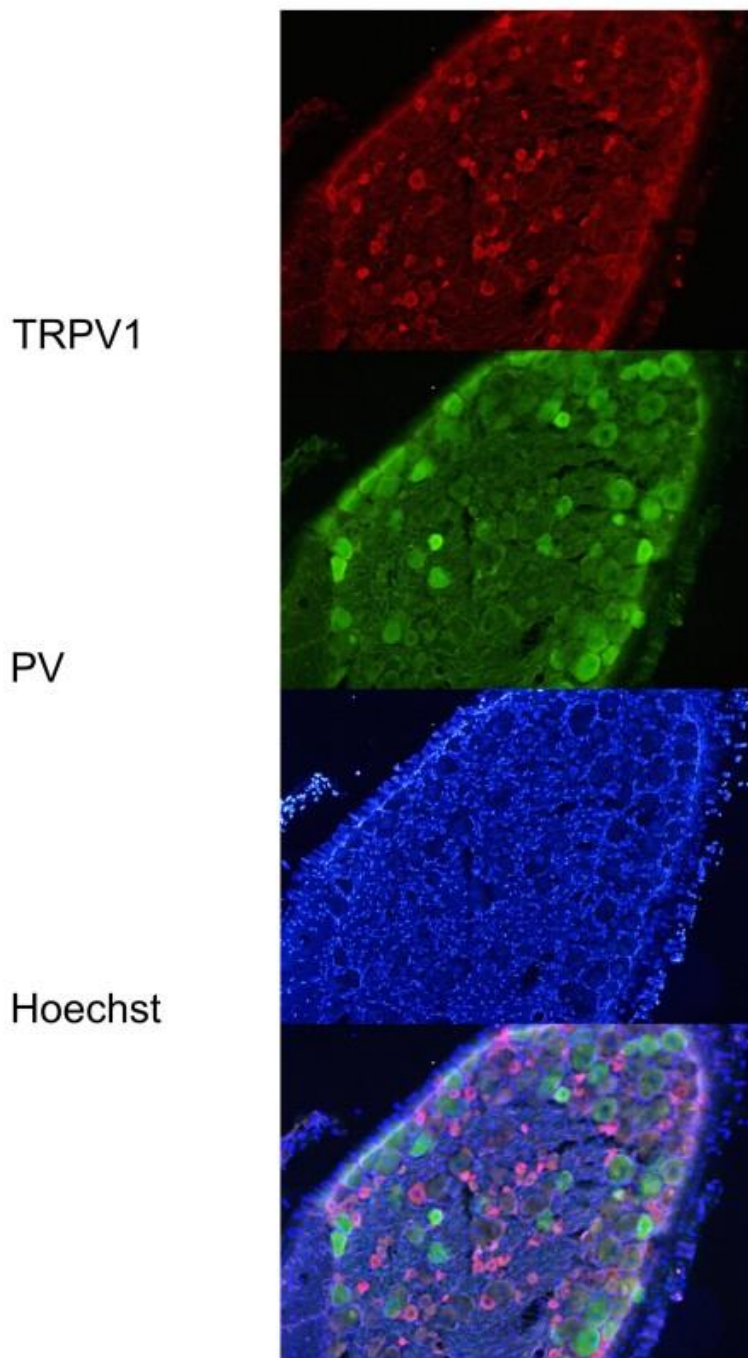
Histologie

24 hodin po navození experimentální artritidy byli potkani hluboce anestetizováni pentobarbiturátem sodným (70 mg/kg) a následně transkardiálně perfundováni fyziologickým roztokem s heparinem, po kterém následoval vychlazený roztok 4% paraformaldehydu. Nafixovaná spinální ganglia byla vyjmuta a přes noc umístěna v postfixačním 4% roztoku paraformaldehydu. Ganglia z míšních segmentů L3-5 byla nasycena roztokem 30% sacharózy a poté nakrájena na kryostatu na řezy o tloušťce 15 μ m. Jednotlivé řezy byly uspořádány na sklíčku.

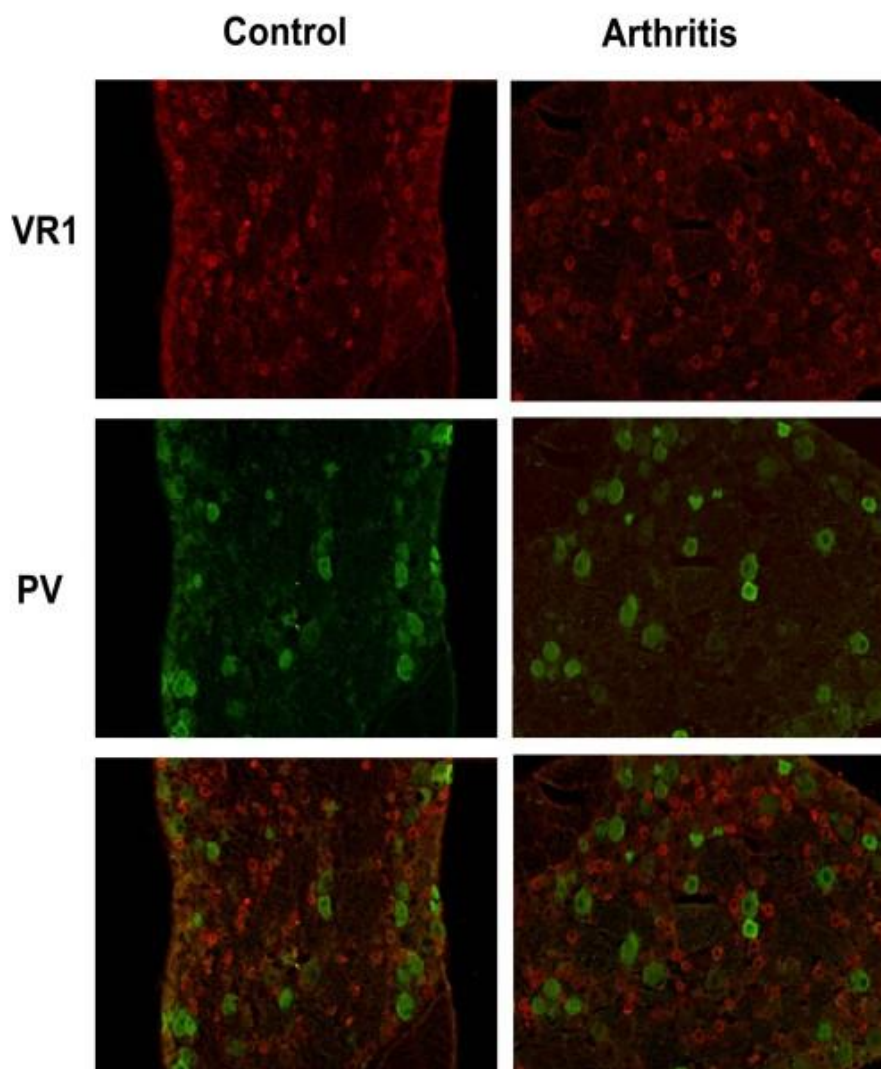
Po blokování nespecifických vazeb v 2% roztoku oslího séra byly řezy inkubovány přes noc s TRPV1 protilátkou (1:1000; Chemicon, CA) a se specifickou protilátkou proti parvalbuminu (monoklonální, sigma). Řezy byly dále promyty ve fosfátovém pufru (PBS) a inkubovány 2 hodiny v pokojové teplotě s odpovídajícími sekundárními protilátkami (Texas Red, CY2, Jackson Immuno). Po opláchnutí byla sklíčka s řezy vysušena. Barvení jader ve tkáňových řezech na sklíčku se provádělo pomocí fluorescenční barvy aktivované v UV světle (Hoechst). Histologické řezy byly pozorovány na fluorescenčním mikroskopu (Olympus BX-80) s filtry pro fluorescenci (FITC a Texas red) a dále nafoceny ve vysokém rozlišení digitální kamerou pro další analýzu off-line.

Vyhodnocovací analýza

Nasnímané obrázky řezů z lumbálních ganglií byly vyhodnocovány v programu ellipse. Obrysy těl pozitivních neuronů pro parvalbumin a TRPV1 byly obkreslovány za pomoci elektronického pera a tabulátoru. Jednotlivé neurony byly řazeny do jednotlivých tříd podle toho, zda byly pozitivně označeny pro parvalbumin, TRPV1 a nebo obojí. Pro analýzu byly použity pouze neurony s viditelným jádrem. Za pomoci programu ellipse byl spočítán obsah, obvod a průměr jednotlivých pozitivních buněk.



Obr. 1. Příklad fluorescenčního barvení řezu spinálního ganglia L3. Buňky exprimující TRPV1 jsou obarveny červeně a buňky exprimující PV se jeví jako zelené. Modře jsou značená jádra.



Obr. 2. Expres TRPV1 receptorů a parvalbuminu na kontrolní straně a na straně, kde byla navozena artritida

Tabulka průměrných hodnot rozměrů buněčných těl neuronů pozitivních pro PV (jednotky jsou uváděny v μm)

V horní tabulce jsou uvedeny hodnoty pro pravou stranu, v dolní pro levou stranu.

154-L3-P	obsah	obvod	okrouhlost	průměr	% z celkového počtu pozitivních buněk na pravé straně
součet	482935,99	35242,14	174,37	10682,30	
průměr	2515,29	183,55	0,91	55,64	
STD	942,43	33,78	0,06	10,38	
počet	192	192	192	192	27,51

154-L3-L	obsah	obvod	okrouhlost	průměr	% z celkového počtu pozitivních buněk na pravé straně
součet	320996,46	23700,79	119,20	7197,07	
průměr	2450,35	180,92	0,91	54,94	
STD	917,87	31,75	0,07	10,12	
počet	131	131	131	131	26,68

Hodnoty buněk pozitivních pro PV i TRPV1

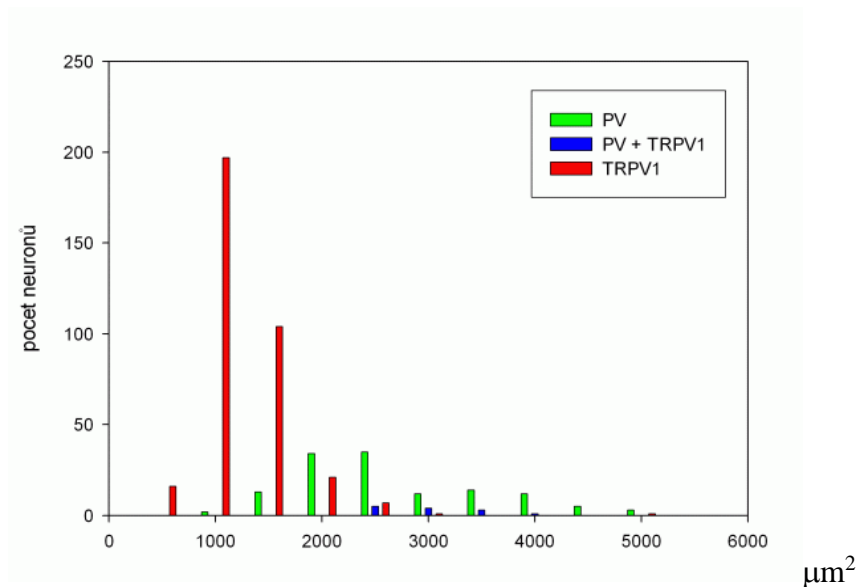
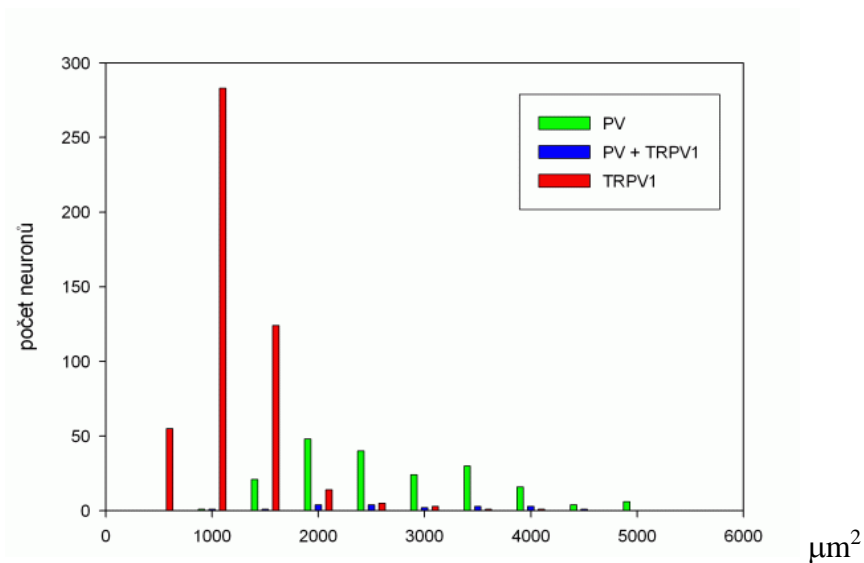
154-L3-P	obsah	obvod	okrouhlost	průměr	
součet	54281,86	3819,28	18,13	1157,37	
průměr	2741,09	190,96	0,91	57,87	
STD	1114,64	39,41	0,05	12,20	
počet	20	20	20	20	2,87

154-L3-L	obsah	obvod	okrouhlost	průměr	
součet	35537,40	2480,56	12,16		
průměr	2733,65	190,81	0,94	58,76	
STD	521,09	17,32	0,04	5,49	
počet	13	13	13	13	2,65

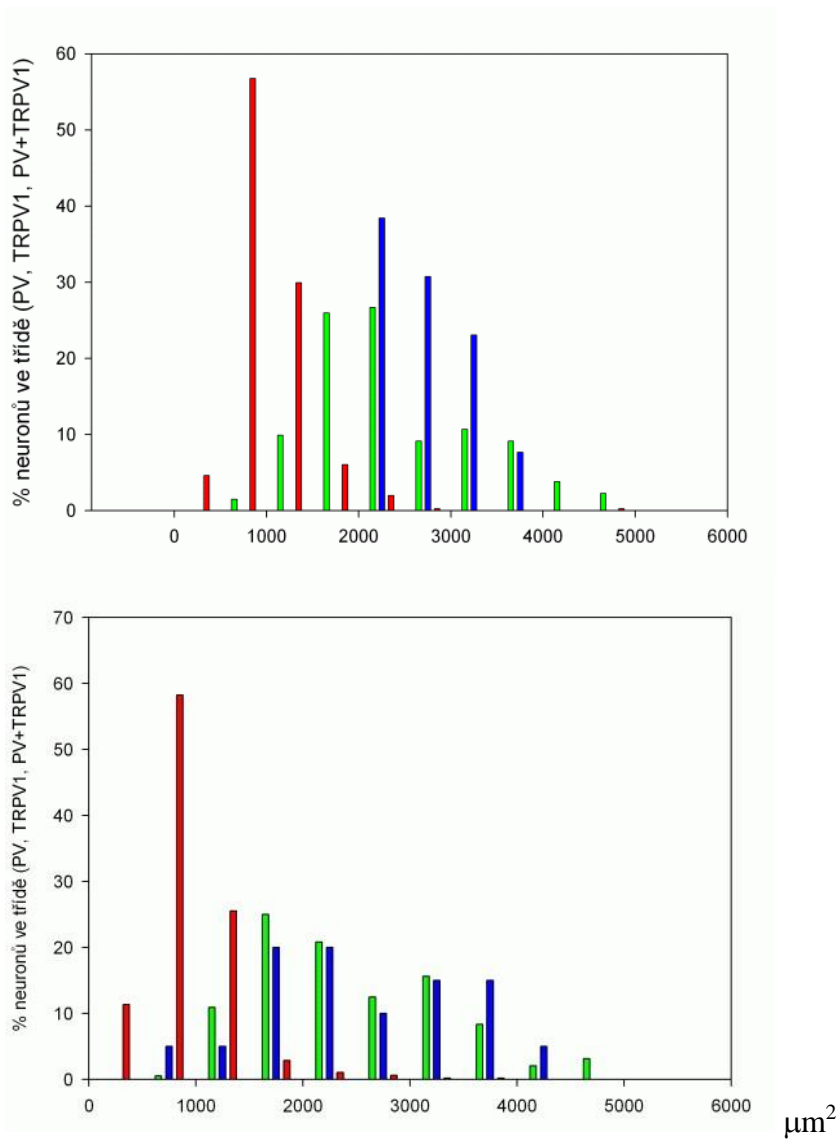
Hodnoty buněk pozitivních pro TRPV1

154-L3-P	obsah	obvod	okrouhlost	průměr	
součet	432469,92	52654,76	442,30	15996,52	
průměr	889,86	108,34	0,91	32,91	
STD	415,15	22,18	0,06	7,05	
počet	486	486	486	486	69,63

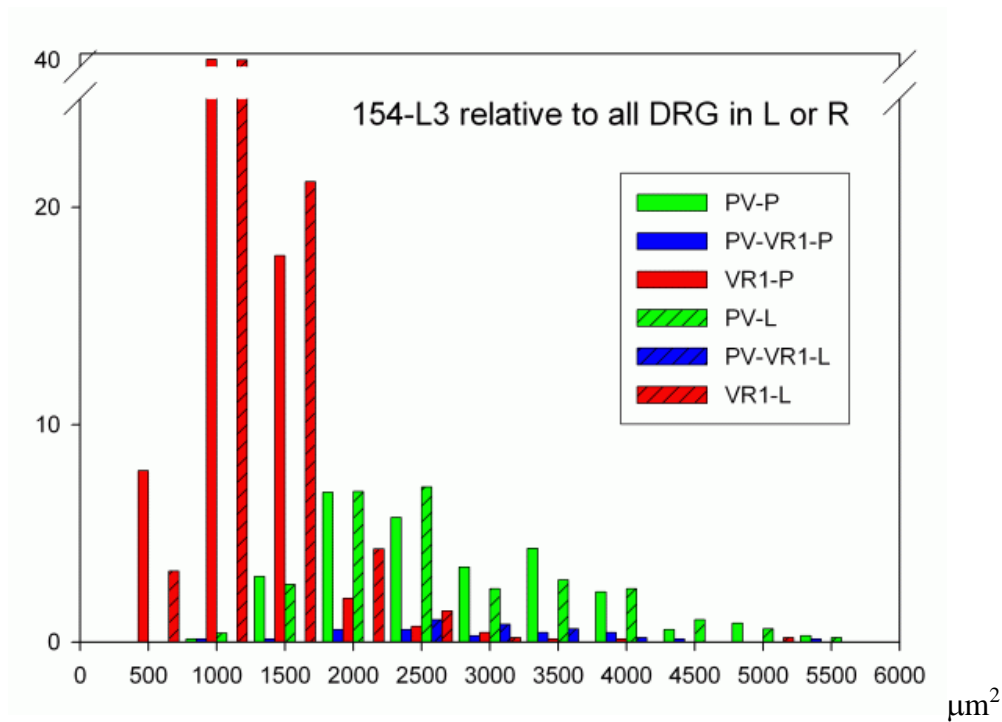
154-L3-L	obsah	obvod	okrouhlost	průměr	
součet	343480,80	40176,88	315,59	12099,91	
průměr	989,86	115,78	0,91	34,87	
STD	421,50	33,54	0,07	6,67	
počet	347	347	347	347	70,67



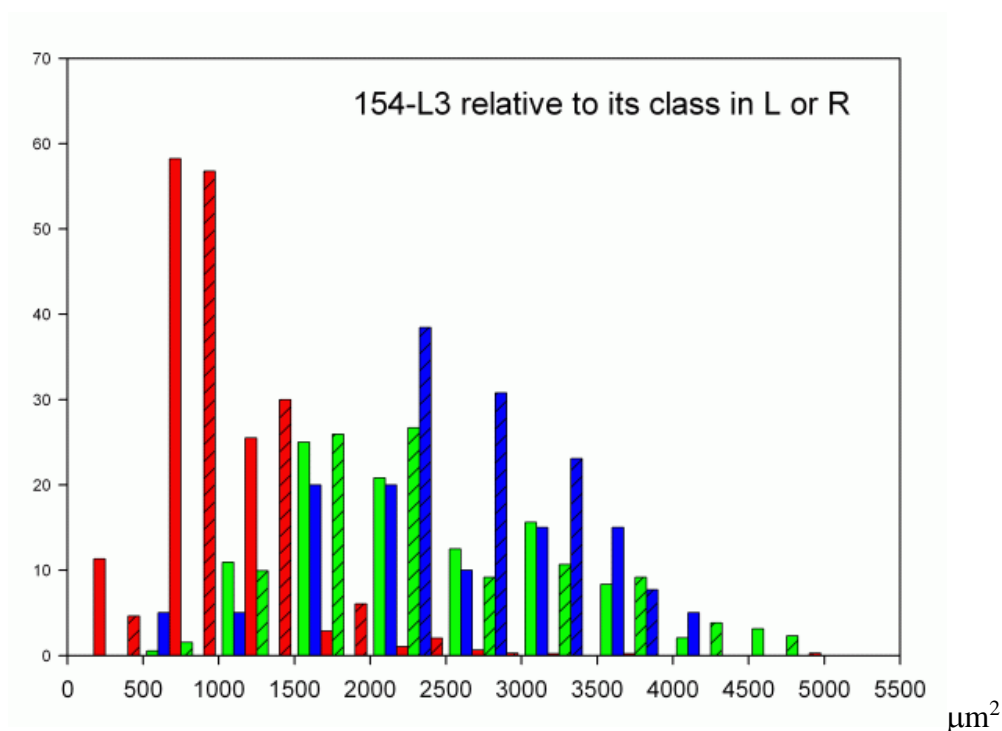
V histogramech jsou pozitivní neurony rozděleny do skupin podle exprese parvalbuminu a TRPV1 (na ose x jsou jednotky v μm^2). Horní graf představuje hodnoty z pravostranného ganglia L3, kde byla navozena artritida a dole je znázorněna levá, kontrolní strana. Zeleně jsou označeny neurony pozitivní na PV, červeně TRPV1 a sloupec představující neurony exprimující PV a současně TRPV1 je modrý.



V těchto histogramech je vidět procentuální zastoupení neuronů v jednotlivých třídách rozdělených podle přítomnosti sledovaných proteinů. Horní graf představuje hodnoty z pravostranného ganglia L3, kde byl navozen a artritida a dole je znázorněna levá, kontrolní strana. Na ose x je vynesena plocha těla neuronů v μm^2



Procentuální zastoupení z celkového počtu neuronů v pravém a levém (šrafované) DRG. Levá strana je kontrolní



Procentuální zastoupení neuronů v jednotlivých třídách rozdělených podle přítomnosti sledovaných proteinů v pravém i levém DRG. Z tohoto histogramu je vidět, že po navození artritidy dochází ke změně exprese TRPV1 a PV zejména v neuronech menších průměrů, které za kontrolní situace neexprimují současně TRPV1 a PV.

6. 3. Výsledky

Předběžné výsledky našich experimentů ukazují, že neurony exprimující TRPV1 jsou buňky převážně menších průměrů s pravděpodobně nemyelinizovanými axony, zatímco těla neuronů produkující parvalbumin mají větší průměr. Po navození artritidy dochází ke změně exprese TRPV1 a PV zejména v neuronech menších průměrů, které za kontrolní situace neexprimují současně TRPV1 a PV. Naše předběžné výsledky tak naznačují, že malé neurony produkující za normálních podmínek pouze TRPV1 začnou po navození zánětu exprimovat i parvalbumin. Zvýšená produkce parvalbuminu by tak mohla modulovat excitabilitu těchto neuronů a jejich zakončení díky zvýšené pufovací kapacitě pro vápenaté ionty.

7. Závěr

Bolest vzniká vzájemným působením komplexních periferních a centrálních mechanismů, které se mohou měnit za patologických podmínek, kdy dochází k poškození organismu. Během působení dlouhotrvajících poškozujících podnětů, zejména při chronické bolesti, tak může docházet k velkým změnám modulace nociceptivních signálů díky změnám na periférii i v centrálních mozkových strukturách. Změny v sensitivitě nociceptivních neuronů jsou základem rozvoje zvýšené citlivosti periferní tkáně na podněty. Tyto změny v citlivosti periferních zakončení neuronů spinálních ganglií jsou podloženy celou řadou změn odehrávajících se jak přímo v periferním nervovém zakončení, tak v těle neuronu. Zvýšená exprese TRPV1 a

parvalbuminu, ke které dochází v těle neuronů v gangliích zadního kořene míšního je jeden z příkladů změn, které mohou být podkladem změněného vnímání periferních podnětů a excitability periferních nervových zakončení.

Výzkum nociceptivních mechanismů a charakterizace specifických patofyziologických změn při stavech chronické bolesti vede k možnosti vývoje nových léčebných postupů s co nejnižšími vedlejšími účinky.

REFERENCE:

- Almeida, T.F., Roizenblatt, S. and Tufik, S.** (2004) Afferent pain pathways: a neuroanatomical review: *Brain Research*, Vol. 1000, pp. 40-56
- Ballou, L.R., Botting, R.M., Goorha, S., Zhang, J., Vane, J.R.** (2000) Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice: *Proc Natl Acad Sci* 97, pp. 10272–6
- 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
- Bentley, G.N. and Gent, J.P.** (1995) Neurokinin actions on substantia gelatinosa neurones in adult longitudinalspinal cord preparation. *Brain Research* 673, 101-111
- Bettler, B. and Mülle, C.** (1995) Neurotransmitter receptors II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 34, 123-139
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. and Roderick, H.L.** (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling: *Molecular cell biology* Vol. 4
- Beydoun, A., Dyke, D.B.S., Morrow, T.J. and Casey, K.L.** (1996) Topical capsaicin selectively attenuates heat pain and A δ fiber-mediated laser-evoked potentials. *Pain* 65, 189-196
- Clapham, D.E., Runnels, L.W. and Strübing, C.** (2001) The TRP channel family: *Macmillan Magazines*, Vol. 2,
- Dray, A., Perkins, M.** (1993) Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Pharmacol Sci* 16, pp. 99–104
- Eyles, D.W., McGrath, J.J. and Reynolds, G.P.** (2002) Neuronal calcium-binding proteins and schizophrenia: *Schizophrenia research*, Vol. 57, pp. 27-34
- Greffrath, W., Kirschstein, T., Nawrath, H. and Treede, R.D.** (2001) Changes in cytosolic calcium in response to noxious heat and their relationship to vanilloid receptors in rat dorsal root ganglion neurons: *Neuroscience* Vol. 104, PP. 539-550
- Hontanilla, B., Parent, A. and Giménez-Amaya, J.M.** (1998) Distribution of calbindin D-28k and parvalbumin neurons and fibers in the rat basal ganglia: *Brain Research Bulletin*, Vol. 47, pp. 107-116
- Ji, R.R., Samad, T.A., Jin, S.X., Schmoll, R., and Woolf, C.J.** (2002). p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia: *Neuron* 36, pp. 57-68
- Jung, J., Shin, J.S., Lee, S.Y., Hwang, S.W., Koo, J., Cho, H., and Oh, U.** (2004). Phosphorylation of Vanilloid Receptor 1 by Ca²⁺/Calmodulin-dependent Kinase II Regulates its Vanilloid Binding: *Journal of Biological Chemistry* 279, pp. 7048-7054
- Kidd, B.L. and Urban, L.A.** (2001) Mechanisms of inflammatory pain: *British Journal of Anaesthesia* Vol. 87, pp. 3-11
- Kilo, S., Schmelz, M., Kolzenburg, M., and Handwerker, H.O.** (1994) Different patterns of hyperalgesia induced by experimental inflammations in human skin: *Brain* 117, 385-396
- Lambers, T.T., Weidema, A.F., Nilius, B., Hoenderop, J.G., and Bindels, R.J.** (2004). Regulation of the mouse epithelial Ca²⁺ channel TRPV6 by the Ca²⁺-sensor calmodulin: *Journal of Biological Chemistry* 279, pp. 28855-28861
- McMahon, S.B. and Jones, N.G.** (2004) Plasticity of pain signaling: role of neurotrophic factors exemplified by acid-induced pain: *Weley Periodicals* Vol. 61, pp. 72-87
- Millan, M.J.** (1999) The induction of pain: an integrative review: *Progress in Neurobiology* Vol. 57, pp. 1-164

- Schwaller, B., Meyer, M. and Schiffmann, S.** (2002) New functions for old proteins: The role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice: *The Cerebellum* vol. 1, pp. 241-258
- Swett, J.E. and Wolf, C.J** (1985) Somatotopic organization of primary afferent terminals in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 231, 66-71.
- Willis, W.D. and Coggeshall, R.E.** (1991) *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord*, p. 595
- Woolf, C.J. and Wang, H.** (2005) Pain TRPs: *Neuron* Vol. 46, pp. 9-12
- Woolf, C.J., Allchorne, A., Safieh-Garabedian, B., Poole, S.** (1997) Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumor necrosis factor: *Br J Pharmacol*; **121**: 417–24