

Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta
Fyziologický ústav Akademie věd České Republiky
Oddělení funkční morfologie

Mechanismy vzniku patologických bolestivých stavů a úloha vaniloidních TRPV1 receptorů

autoreferát dizertační práce

MUDr. Eva Pospíšilová

Praha, 2007

Dizertační práce byla vypracována v rámci postgraduálního doktorského studia biomedicíny, studijní program Fyziologie a patologická fyziologie člověka, na Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky, oddělení Funkční morfologie.

Předkladatel: MUDr. Eva Pospíšilová
Fyziologický ústav AV ČR
Oddělení Funkční morfologie
Videňská 1083
142 20 Praha 4 – Krč

Školitel: MUDr. Jiří Paleček, CSc.
Fyziologický ústav AV ČR
Oddělení Funkční morfologie
Videňská 1083
142 20 Praha 4 – Krč

Oborová rada: Fyziologie a patologická fyziologie
člověka

Předseda: Prof. MUDr. Stanislav Trojan, DrSc.
Fyziologický ústav
Univerzita Karlova v Praze, I.LF
Albertov 5
128 00 Praha 2

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Hypotézy a cíle studie.....	9
2.1. Účinky lokálně aplikovaného kapsaicinu na bolest chirurgického původu.....	9
2.2. Senzitizace míšních neuronů chirurgickou incísi a její ovlivnění lokálně aplikovaným kapsaicinem.....	9
2.3. Úloha centrálních TRPV1 receptorů v mechanismech nocicepcce u bolesti chirurgického původu.....	9
2.4. Modulace nociceptivní signalizace míšními (centrálními) TRPV1 receptory.....	10
3. Metody.....	10
3.1. Behaviorální testování citlivosti zvířat na mechanické a tepelné podněty.....	10
3.2. Chirurgické procedury.....	11
3.3. Imunohistochemie.....	12
3.4. Experimentální postupy.....	13
3.4.1. Testování účinku lokálně aplikovaného kapsaicinu na pooperační mechanickou alodynii a mechanickou a tepelnou hyperalgézi.....	13
3.4.2. Expresce c – Fos v neuronech zadních rohů míchy po chirurgické incisi a její ovlivnění pomocí lokálně aplikovaného kapsaicinu.....	14
3.4.3. Zjišťování úlohy TRPV1 receptorů v rozvoji pooperační mechanické alodynii a mechanické a tepelné hyperalgezie.....	14
3.4.4. Mechanismus senzitizace centrálních TRPV1 receptorů.....	14
3.5. Analýza a statistické zpracování dat.....	15
4. Výsledky.....	16
4.1. Účinek lokálně aplikovaného kapsaicinu na behaviorální odpovědi zvířat na mechanické a tepelné podněty.....	16
4.2. Aktivace míšních neuronů chirurgickou incísi a její ovlivnění lokálně aplikovaným kapsaicinem.....	20
4.3. Úloha TRPV1 receptorů v rozvoji pooperační mechanické alodynii a mechanické a tepelné hyperalgezie.....	22
4.4. Úloha centrálních TRPV1 receptorů v nocicepci.....	26
5. Diskuse.....	33
5.1. Účinky lokálně aplikovaného kapsaicinu ve vysoké koncentraci na bolest chirurgického původu.....	33

<i>5.2. Senzitivace míšních neuronů chirurgickou incíí a její ovlivnění lokálně aplikovaným kapsaicinem</i>	35
<i>5.3. Úloha periferních a centrálních TRPV1 receptorů v mechanismech nocicepce u bolesti chirurgického původu</i>	36
<i>5.4. Úloha centrálních TRPV1 receptorů v nocicepci, mechanismy jejich aktivace a senzitivace</i>	39
6. Závěr	41
7. Seznam literatury	43
8. Seznam vlastních publikací	48

Seznam zkratek

AMPA	DL- α -NH ₂ -2,3-dihydro-5-methyl-3-oxo-4-isoxazolpropanová kyselina
ANOVA	analysis of variance (analýza rozptylu)
IASP	International Association for the Study of Pain
NDS	normal donkey serum
NMDA	N-methyl-D-aspartát
OLDA	N - oleoyldopamin
PKC	proteinkináza C
PLA ₂	fosfolipáza A ₂
PLC	fosfolipáza C
PSDC	postsynaptic dorsal column
SB 366791	N-(3-methoxyfenyl)-4-chlorocinnamid (antagonista TRPV1 receptorů)
STT	tractus spinothalamicus
TRPV 1	transient receptor potential vanilloid 1
WDR	wide dynamic range

1. Úvod

Bolest je senzorická zkušenost, subjektivně nepříjemně vnímaná. Akutní (tzv. fyziologická) bolest je vedena specifickým senzoryickým nociceptivním systémem z periferie přes míchu, mozkový kmen a thalamus do kortikolimbických center mozku. Neurálního přenosu nociceptivní informace se účastní řada neurotransmiterů a neuromodulátorů, informace může být během přenosu modulována na kterékoliv úrovni nociceptivního systému. Fyziologickou funkcí akutní bolesti je včasné varování organismu před možným ohrožením. (20)

Jestliže intenzivní nociceptivní podnět způsobí tkáňové poranění organismu, může se po iniciální fázi akutní bolesti rozvinout bolest chronická, která přetrvává i po skončení působení vnějšího inzultu a po zhojení poranění. V tomto případě dochází ke zvýšení citlivosti nociceptivního systému k podnětům v důsledku působení řady patofyziologických mechanismů uplatňujících se na periférii i na úrovni centrálního nervového systému. Tyto mechanismy mohou vést až k rozvoji patologických bolestivých stavů jako je hyperalgie, tj. zesílené vnímání bolestivých podnětů, alodynii, tj. bolestivé vnímání podnětů normálně nebolestivých, a spontánní bolest. V mechanismech periferní i centrální senzitivace nociceptivního neuronu se uplatňují nejen jeho funkční změny související se zvýšenou vzruchovou aktivitou, ale také změny na úrovni transkripce a posttranskripčních úprav v jádře ovlivňující genovou expresi. Chronická bolest a patologické bolestivé stavy přetrvávají dlouhodobě po zhojení tkáňového traumatu. Jejich podstatou jsou změny nociceptivního systému způsobené mechanismy senzitivace. (38)

Častou příčinou vzniku chronické bolesti nebo patologických bolestivých stavů je mechanické tkáňové poranění operačním zákrokem. Pooperační bolest dosahuje často značné intenzity, zvyšuje pooperační morbiditu a je terapeuticky obtížně ovlivnitelná. Základním přístupem v léčbě pooperační bolesti je její farmakologické ovlivnění, ale protože mají systémově podávaná analgetika mnoho závažných vedlejších nežádoucích účinků, je velmi účinnou alternativou lokální aplikace analgeticky působících léčiv. (18, 25)

V senzoricím přenosu nociceptivní informace hraje klíčovou úlohu TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) receptor, který je exprimován na membránách periferních i centrálních výběžků převážně většiny primárních aferentních neuronů s nociceptivní charakteristikou. TRPV1 receptor je aktivován chemickými i fyzikálními nociceptivními podněty. Mezi jeho chemické agonisty patří lokální pokles pH, lipidové sloučeniny jako polynenasycené mastné kyseliny a diacylglycerol, endogenním ligandem je například bioaktivní lipid anandamid nebo N-acyldopaminové substance. Fyzikálním aktivátorem TRPV1 receptoru je teplota nad 43 °C. TRPV1 receptor podléhá významnou měrou modulaci v prostředí zánětu nebo poranění a přispívá tudíž významnou měrou k mechanismům zodpovědným za zvýšení citlivosti nociceptoru k fyzikálním i chemickým podnětům, ke kterému za těchto okolností dochází, a tím i k rozvoji chronické bolesti. (5, 9)

Významným exogenním aktivátorem TRPV1 receptorů je chemická látka kapsaicin. Kapsaicin má v iniciální fázi excitační účinky na nociceptor, kdy po jeho navázání na TRPV1 receptor dojde k otevření iontového kanálu a vtoku iontů, depolarizaci membrány a vzniku akčního potenciálu. V případě, že kapsaicin působí prolongovaně nebo ve vysoké koncentraci, může dojít v důsledku mohutného vtoku iontů kalcia intracelulárně naopak k funkční desenzitizaci až úplné morfologické destrukci kapsaicin-senzitivního nociceptivního vlákna, a tudíž jeho vyřazení z funkce. Kapsaicin působící ve vysoké koncentraci může mít tedy analgetický účinek. (36) Analgetický efekt systémově i lokálně aplikovaného kapsaicinu na akutní bolest, bolest spojenou se zánětem i neuropatickou bolest byl testován v mnoha experimentálních studiích na zvířatech. (16, 24) Možnost využití kapsaicinu jako lokálně aplikovaného analgetika byla předmětem i řady klinických studií na lidech. (3, 8, 22)

Předmětem této studie jsou neurální mechanismy nocicepce a vzniku patologických bolestivých stavů se zaměřením na bolest chirurgického původu, tedy stav, kdy je primárním nociceptivním podnětem operační zákrok. Pooperační bolest je stále aktuálním problémem klinické medicíny a tato studie představuje některé z možných způsobů jejího ovlivnění farmakou. Protože hraje TRPV1 receptor klíčovou úlohu v transdukcii nociceptivní informace a v

senzitivizaci nociceptoru, bylo hlavním úkolem této práce ověřit úlohu právě TRPV1 receptorů v přenosu bolesti způsobené chirurgickým zákrokem a případnou možností léčby tohoto druhu bolesti jejich farmakologickým ovlivněním. Zvláštní pozornost je věnována centrálním TRPV1 receptorům exprimovaným na centrálních výběžcích primárních nociceptivních neuronů, neboť jejich funkce v nocicepci a možné mechanismy jejich aktivace a senzitivizace nejsou dosud zcela objasněny.

2. Hypotézy a cíle studie

2.1. Účinky lokálně aplikovaného kapsaicinu na bolest chirurgického původu

Cílem první části studie bylo zjistit úlohu kapsaicin-senzitivních nociceptorů v mechanismech pooperační alodynie a hyperalgie a účinek lokálně aplikovaného kapsaicinu na rozvoj pooperační bolesti. Předpokládali jsme, že po lokální aplikaci kapsaicinu ve vysoké koncentraci před chirurgickým zákrokem, dojde v důsledku vyřazení kapsaicin-senzitivních nervových vláken z jejich funkce k selektivnímuablokování nociceptivní aferentace z místa incise a následnémuablokování rozvoje pooperační tepelné hyperalgie a mechanické alodynie i hyperalgie.

2.2. Senzitivizace míšních neuronů chirurgickou incízí a její ovlivnění lokálně aplikovaným kapsaicinem

Protein Fos je možné použít jako funkční marker sloužící k identifikaci neuronů centrálního nervového systému senzitivizovaných intenzivním nociceptivním podnětem. Cílem následující části studie bylo prokázat centrální senzitivizaci míšních neuronů chirurgickou incízí pomocí exprese c – Fos v zadních rožích míchy imunohistochemickou metodou aablokování rozvoje centrální senzitivizace míšních neuronů působením lokálně aplikovaného kapsaicinu ve vysoké koncentraci do místa incise.

2.3. Úloha centrálních TRPV1 receptorů v mechanismech nocicepce u bolesti chirurgického původu

Kapsaicinové TRPV1 receptory jsou exprimovány na periferních i centrálních zakončeních kapsaicin – senzitivních neuronů a hrají významnou roli v transmissi nociceptivní informace i v její modulaci. Cílem následujících pokusů bylo potvrdit úlohu periferních TRPV1 receptorů, otestovat efekt specifického antagonisty na TRPV1 receptorech v ovlivnění pooperační bolesti, a dále zjistit případnou úlohu centrálních TRPV1 receptorů v neurálních mechanismech rozvoje tohoto bolestivého stavu. Předpokládali jsme, že blokáda periferních TRPV1 receptorů pomocí lokálně aplikovaného antagonisty i centrálních TRPV1 receptorů pomocí intratekálně aplikovaného antagonisty účinně zablokuje rozvoj pooperační hypersenzitivity na mechanické a tepelné podněty.

2.4. Modulace nociceptivní signalizace míšními (centrálními) TRPV1 receptory

Úloha TRPV1 receptorů v míše není dosud úplně objasněna, jednou z nevyřešených otázek zůstává způsob jejich aktivace. Cílem této části studie bylo ověřit, že jsou centrální TRPV1 receptory senzitivované plantární incísi aktivovány působením endogenních agonistů a podílí se tak na přenosu nociceptivní informace z místa poranění. Předpokládali jsme, že specifický TRPV1 antagonista zablokuje hypersenzitivitu na tepelné a mechanické podněty způsobenou aktivací senzitivovaných centrálních TRPV1 receptorů.

3. Metody

Ve studii bylo použito celkem 173 samců laboratorních potkanů kmene Wistar (200 – 250 g). Všechny postupy a procedury byly schváleny komisí pro práci se zvířaty Fyziologického Ústavu Akademie věd České Republiky a byly v souladu s pravidly IASP (International Association for the Study of Pain) pro práci s laboratorními zvířaty.

3.1. Behaviorální testování citlivosti zvířat na mechanické a tepelné podněty

Odpovědi zvířat na mechanické podněty byly testovány pomocí nylonových Von Freyových vláken. K mechanické stimulaci kůže planty pedis zvířete byla použita vlákna o silách 10, 20, 35, 59, 80, 140, 290 a 370 mN, každý stimul byl aplikován šestkrát a zaznamenán byl počet vyvolaných elevací končetin od podložky pro každý podnět.

Odpovědi zvířat na stimulaci teplem byly testovány pomocí tepelného stimulatoru (50 W, Dittel, Praha). Zaznamenávány byly časové intervaly, za které zvířata reflexně odtahovala končetinu od zdroje tepla od okamžiku začátku působení podnětu na kůži planty pedis. Tepelný stimulus byl aplikován vždy třikrát po sobě s pětiminutovým časovým odstupem mezi jednotlivými stimulacemi. Kontrolní odpovědi na tepelné i mechanické podněty byly zaznamenány pro každé zvíře před zahájením jakékoliv experimentální procedury.

3.2. Chirurgické procedury

Intradermální injekce kapsaicinu, TRPV1 antagonisty (SB 366791) nebo rozpouštědla (objem injikované látky 0,1 ml) byla provedena 27G injekční jehlou v krátkodobé celkové anestézii etherem, v místě injekce byla později provedena chirurgická incise. Roztok kapsaicinu (49 mM) byl připraven ze zásobního roztoku (490 mM, 65% HPLC natural capsaicin, Fluka rozpuštěný v ethanolu) rozředěním 0,9% roztokem NaCl. Roztok SB 366791 (100 μ M) byl připraven rozpuštěním SB 366791 (SB 366791, Tocris) v ethanolu s 0,9% roztokem NaCl 1:9.

V celkové anestézii etherem byla za sterilních podmínek provedena 7 cm dlouhá longitudinální incise plantární kůže a plantárního svalu, s proximálním začátkem 3 mm od okraje paty a probíhající distálním směrem rovnoběžně s dlouhou osou planty pedis a uzavřena dvěma stehy z nevstřebatelného monofilu 4-0 na chirurgické jehle DS19. Rány se kompletně hojily během 5 – 6 dnů *ad integrum*.

Intratekální katetry byly vyrobeny ze dvou polyethylenových hadiček o velikostech PE – 5 a PE – 10. Implantace byla provedena v celkové anestézii ketaminem (100 mg/kg i. p., Narkamon, Zentiva) a xylazinem (10 mg/kg i. m., Rometar, Zentiva) za sterilních podmínek. Pomocí longitudinální incise kůže nad trnovými výběžky

obratlů a rozpreparování páteřních svalů byly exponovány lumbální obratle, do intervertebrálního prostoru L1 – L2 byl subarachnoideálně zasunut vlastní katétr a fixován k páteři pomocí dentálního cementu (Duracryl, Spofa). Rána byla chirurgicky uzavřena po vrstvách, vnější konec katétru exponován na povrchu kůže hřbetu a zataven. Intratekální katétr sloužily k aplikaci 50 μ M roztoku N-oleoyldopaminu (OLDA, Tocris), připraveného z 50 mM zásobního roztoku (OLDA v dimethylsulfoxidu), 1 mM roztoku bradykininu (bradykinin acetate, Sigma) připraveného z 16 mM zásobního roztoku (bradykinin v destilované vodě) a 100 μ M roztoku SB 366791 připraveného ze 100 mM zásobního roztoku (SB 366791, Tocris, rozpuštěný v DMSO), ředěním 0,9% roztokem NaCl. Na konci každého pokusu byla zvířata utracena vysokou dávkou etheru, do katétrů injikována methylenová modř a jejich pozice vizuálně zkontrolována.

Retrogradní značení STT a PSDC neuronů bylo prováděno v celkové anestézii zvířat ketaminem (100 mg/kg i. p., Narkamon, Zentiva) a xylazinem (10 mg/kg i. m., Rometar, Zentiva) za sterilních podmínek. Pro stereotaktický přístup k thalamu byly do obou temenních kostí frézou vyvrtány obdélníkové otvory, skrz které bylo zvířatům do laterálních thalamických jader aplikováno fluorescenční barvivo (dextran značený Cy2, Molecular Probes) pomocí skleněné mikropipety připevněné na mikromanipulátor spojený s aplikačním systémem na stlačený vzduch. Pro přístup k nucleus gracilis bylo rozpreparováno šíjové svalstvo a identifikována atlantookcipitální membrána, do které byl prostřížen otvor. Pomocí stejného aplikačního systému bylo dextranové barvivo injikováno do oblasti nucleus gracilis za použití operačního mikroskopu. Místo aplikace fluorescenčního barviva v thalamu i v nucleus gracilis bylo vždy mikroskopicky ověřeno na histologickém řezu po skončení každého pokusu.

3.3. Imunohistochemie

Zvířata určená k detekci exprese c-Fos byla uvedena do hluboké anestézie pentobarbitalem (sodium pentobarbital, 80 mg/kg i. p.), pomocí kanyly zavedené do ascendentní aorty transkardiálně perfundována heparinizovaným fyziologickým roztokem (500 ml 0,9% NaCl se 100 IU heparinu) a 4 % roztokem paraformaldehydu

v 0,1 M fosfátovém pufru (500 ml; pH 7,4). Po perfúzi byla vypreparována mícha a mozek. Preparáty byly umístěny na 4 hodiny do stejného 4% fixačního roztoku paraformaldehydu a přes noc do 30% roztoku sacharosy ve fosfátovém pufru. Na kryostatů byly nakrájeny transversální tkáňové řezy z míšních segmentů L3, L4 a L5 o síle 30 μm a koronární řezy z mozků o síle 50 μm . Míšní řezy byly dále zpracovávány k imunohistochemické analýze, mozkové řezy byly pomocí xylenového média montovány na skla potažená želatinou k fluorescenční mikroskopii.

Míšní tkáň zvířat, u kterých nebyly retrográdně označeny STT nebo PSDC neurony, byla k detekci Fos imunohistochemicky obarvena metodou komplexu streptavidin – biotin – peroxidáza. Řezy byly promyty 0,1 M fosfátovým pufrům, inkubovány v 3% blokovacím roztoku normálního oslího séra (NDS, normal donkey serum) a následně v roztoku primární protilátky (1:2000, králičí polyklonální protilátka proti Fos; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) při 4 °C přes noc. Po inkubaci byly znovu promyty v 1% NDS, inkubovány v roztoku biotinylované sekundární protilátky (1:400; biotin – SP – conjugated donkey anti – rabbit IgG; Jackson Immuno Research Laboratories, in., West Grove, PA, USA), promyty fosfátovým pufrům a inkubovány se streptavidinem konjugovaným s peroxidázou (1:600; peroxidase – conjugated streptavidin; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) Produkt reakce byl vizualizován pomocí 0,01% peroxidu vodíku a 0,05% diaminobenzidinu jako chromogenu. Po opláchnutí v 0,1% fosfátovém pufru byly míšní řezy montovány na skla potažená želatinou.

Imunohistochemické zpracování tkání zvířat, kterým byly retrográdně označeny STT a PSDC neurony, proběhlo v zásadě stejným způsobem. K detekci exprese Fos byla v těchto pokusech použita sekundární protilátka konjugovaná s fluorescenčním barvivem Texas red (1:600; Texas - Red® dye – conjugated AffiniPure Donkey Anti-rabbit IgG; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA).

3.4. Experimentální postupy

3.4.1. Testování účinku lokálně aplikovaného kapsaicinu na pooperační mechanickou alodynii a mechanickou a tepelnou

hyperalgezií. První skupině zvířat ($n = 8$) byl nejprve intradermálně injikován kapsaicin nebo rozpouštěcí roztok do kůže planty pedis a 24 hodin poté provedena chirurgická incise v místě injekce. Citlivost na mechanické a tepelné podněty aplikované na kůži v blízkosti incise pak byla opakovaně testována po dobu několika dnů. Druhá skupina experimentálních zvířat podstoupila nejprve chirurgický zákrok, kapsaicin ($n = 7$) nebo rozpouštědlo ($n = 6$) byly injikovány 2 hodiny poté.

3.4.2. *Exprese c – Fos v neuronech zadních rohů míchy po chirurgické incisi a její ovlivnění pomocí lokálně aplikovaného kapsaicinu*. První skupině experimentálních zvířat této série pokusů ($n = 8$) byl nejprve intradermálně aplikován kapsaicin ($n = 4$) nebo rozpouštědlo ($n = 4$) do pravé planty pedis, 24 hodin po injekci vytvořena plantární incise a pomocí histochemické metody streptavidin – biotin – peroxidáza zjišťována exprese c-Fos v jádrech neuronů lumbální míchy 2 hodiny po tomto chirurgickém zákroku. U druhé a třetí skupiny zvířat ($n = 8$) byly nejprve retrogradně označeny STT nebo PSDC neurony a 7 – 10 dní poté provedena stejná experimentální procedura jako u první skupiny.

3.4.3. *Zjišťování úlohy TRPV1 receptorů v rozvoji pooperační mechanické alodynie a mechanické a tepelné hyperalgezie*. V této sérii pokusů byl zvířatům první skupiny intradermálně injikován TRPV1 antagonist SB 366791 (0,1 ml 100 μM roztoku) ($n = 8$) nebo roztok rozpouštědla ($n = 8$) do pravé planty penis a 30 minut poté byla na injikované končetině provedena plantární incise. Bezprostředně po sutuře rány byla aplikována druhá intradermální injekce SB 366791 nebo rozpouštědla, odpovědi na mechanické a tepelné podněty byly po zákroku opakovaně testovány po dobu několika dnů. Druhé skupině zvířat byly nejprve implantovány intratekální katétry, do katétru podáno 20 μl SB 366791 (100 μM u $n = 6$) nebo rozpouštědla ($n = 6$). 15 minut po intratekální injekci byla vytvořena plantární incise a následovalo behaviorální testování odpovědi zvířat na mechanické a tepelné podněty.

3.4.4. *Mechanismus senzitivace centrálních TRPV1 receptorů*. První skupině zvířat bylo do intratekálního katétru aplikováno 20 μl 50 μM roztoku OLDA ($n = 4$), zvířatům druhé skupiny bylo stejným

způsobem aplikováno 20 μl 1 mM roztoku bradykininu ($n = 6$), u třetí skupiny zvířat bylo intratekálně podáno 10 μl 2 mM roztoku bradykininu a 10 μl 100 μM roztoku OLDA ($n = 6$). Odpovědi na mechanické a tepelné podněty byly po injekci testovány opakovaně v několika časových intervalech. Zvířatům čtvrté skupiny ($n = 7$) byl do katétru nejprve podán TRPV1 antagonist (20 μl 100 μM roztoku SB 366791), 15 minut po jeho podání následovala intratekální aplikace 10 μl 2 mM roztoku bradykininu s 10 μl 100 μM roztoku OLDA a následovalo stejné behaviorální testování odpovědi na mechanické a tepelné podněty. Čtyřem zvířatům z poslední experimentální skupiny bylo 10 μl 2 mM roztoku bradykininu a 10 μl 100 μM roztoku OLDA intratekálně aplikováno znovu 24 hodin po první injekci bez TRPV1 antagonisty.

3.5. Analýza a statistické zpracování dat

Behaviorální data byla statisticky zpracovávána pomocí dvoufaktorové analýzy rozptylu, opakovaná měření v čase (two – way repeated – measures analysis of variance, ANOVA). Rozdíly mezi operovanými a intaktními končetinami zvířat různých experimentálních skupin byly dále hodnoceny pro každý testovací čas zvlášť pomocí neparametrické statistické metody (Mann – Whitney U – test). Výsledky behaviorálních pokusů poslední části studie (experiment 4, viz výše) byly statisticky zpracovány pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu, opakovaná měření v čase (one – way repeated – measures analysis of variance, ANOVA). Kontrolní odpovědi na mechanické a tepelné podněty zjištěné před aplikací farmak byly porovnávány s hodnotami zjištěnými v různých časových intervalech po aplikaci pomocí metody post – hoc Tukey test.

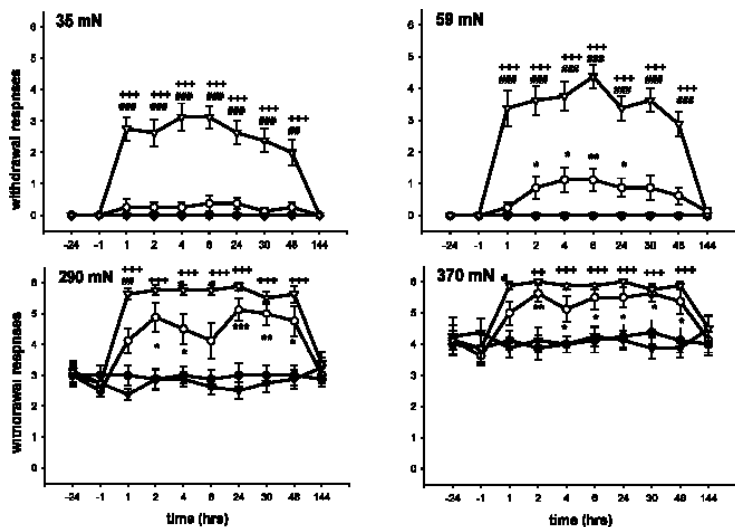
Přítomnost Fos imunopozitivních neuronů byla zjišťována na každém třetím tkáňovém řezu z L3, L4 a L5 segmentů lumbální míchy. Pro každý segment bylo vyhodnoceno celkem deset histologických řezů. Počty Fos imunopozitivních neuronů v zadních rozích míchy zvířat, kterým byl před provedením plantární incise podán kapsaicin, byly srovnávány se skupinou zvířat, kterým bylo předoperačně aplikováno pouze rozpouštědlo, pomocí jednofaktorové ANOVA a Student's Newman – Keul testu. Dále byly počítány profily označených STT a PSDC neuronů a hodnoceny

z hlediska přítomnosti červeně fluoreskujícího Fos v jejich jádrech, Fos imunopozitivní neurony byly vyjádřeny jako procento z celkového počtu nalezených profilů STT a PSDC neuronů. Tato proporce zjištěná u zvířat předoperačně ovlivněných kapsaicinem byla porovnávána se skupinou zvířat, kterým bylo před provedením plantární incise aplikováno rozpouštědlo pomocí statistické metody Mann – Whitney U – test.

4. Výsledky

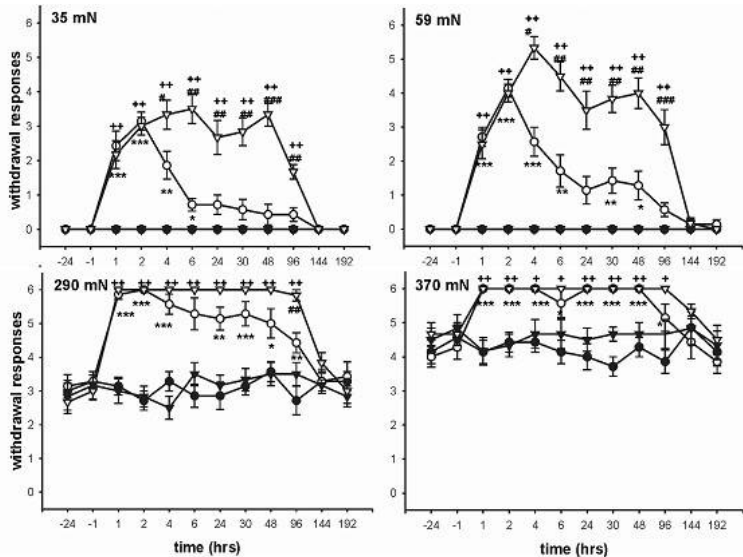
4.1. Účinek lokálně aplikovaného kapsaicinu na behaviorální odpovědi zvířat na mechanické a tepelné podněty

První série pokusů zkoumala pooperační změny reaktivity na mechanické podněty aplikované na kůži planty pedis u zvířat, kterým byl 24 hodin před provedením plantární incise intradermálně aplikován kapsaicin nebo rozpouštěcí roztok. Žádné experimentální zvíře neodpovídalo na stimulaci intaktní kůže planty tenkými Von Freyovými vlákny působícími silami nízkých intenzit (10, 20, 35 nebo 59 mN) před zákrokem, při stimulaci intaktní kůže Von Freyovými vlákny silnějších intenzit (80, 140, 290 a 370 mN) docházelo k vyvolání reflexních elevací stimulované končetiny. Po provedení incise se citlivost kontrolních zvířat na všechny testované podněty zvýšila, rozvinula se pooperační mechanická alodynie i hyperalgie. U zvířat, kterým byl předoperačně aplikován kapsaicin, byl pooperační nárůst odpovědi na mechanickou stimulaci operované končetiny jen velmi mírný, což bylo v ostrém kontrastu s výrazným zvýšením odpovědi kontrolních zvířat předoperačně ovlivněných pouze rozpouštědlem. (Obr. 1)



Obr. 1 Kapsaicin 24 h před provedením plantární incise. Počet reflexních odpovědí (průměr +/- standardní chyba průměru) vyvolaných při stimulaci Von Freyovými vlákny (35 – 370 mN) operovaných (po aplikaci kapsaicinu ○ nebo rozpouštěcího roztoku △) a intaktních končetin (kontrolních ▲ a experimentálních zvířat ●), před a po chirurgickém zákroku. Plantární incise byla provedena v čase 0. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 pro odpovědi operovaných končetin po injekci kapsaicinu versus kontralaterálních, +++ P < 0,001 pro odpovědi operovaných končetin po injekci rozpouštědla versus kontralaterálních, # P < 0,05; ## P < 0,01; ### P < 0,001 pro odpovědi operovaných končetin po injekci kapsaicinu versus odpovědi operovaných končetin po injekci rozpouštědla.

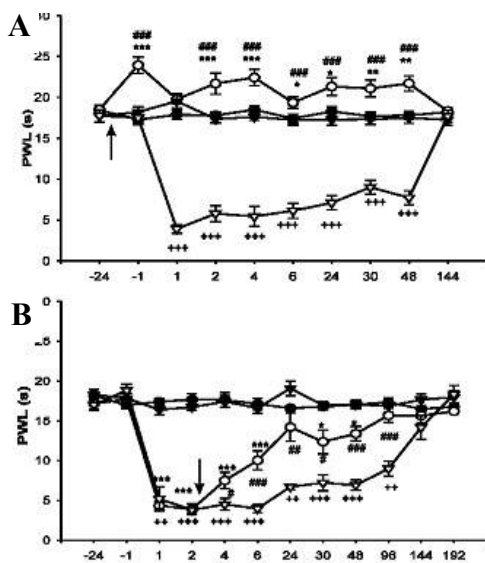
Za účelem ověření účasti mechanismů centrální senzitivace v rozvoji pooperační bolesti byla v další sérii pokusů zvířatům nejprve vytvořena plantární incise a 2 h po zákroku aplikována intradermální injekce kapsaicinu nebo rozpouštěcího roztoku. V prvních dvou hodinách po provedení incise (před intradermální injekcí) bylo zaznamenáno u kontrolních i experimentálních zvířat zvýšení reaktivity na mechanické podněty. V testovacím čase 4 h po zákroku (2 h po injekci kapsaicinu) bylo u experimentálních zvířat patrné významné snížení, i další průběh pooperační mechanické alodynie a hyperalgie byl v porovnání s kontrolní skupinou oslaben. (Obr. 2)



Obr. 2 Kapsaicin 2 h po provedení plantární incise. Počet reflexních odpovědí (průměr \pm standardní chyba průměru) vyvolaných při stimulaci Von Freyovými vlákny (35 – 370 mN) operovaných (po aplikaci kapsaicinu \circ nebo rozpouštěcího roztoku Δ) a intaktních končetin (kontrolních \blacktriangle a experimentálních zvířat \bullet), před a po chirurgickém zákroku. Plantární incise byla provedena v čase 0. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ pro odpovědi operovaných končetin po injekci kapsaicinu versus kontralaterálních, + $P < 0,05$; ++ $P < 0,01$ pro odpovědi operovaných končetin po injekci rozpouštědla versus kontralaterálních, # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ pro odpovědi operovaných končetin po injekci kapsaicinu versus odpovědi operovaných končetin po injekci rozpouštědla.

Dále byly zjišťovány změny odpovědi zvířat na tepelné podněty způsobené chirurgickým zákrokem a případný efekt lokálně aplikovaného kapsaicinu. Experimentálním zvířatům byl intradermálně aplikován kapsaicin, kontrolním rozpouštěcí roztok, a to 24 hodin před provedením incise (Obr. 3A) nebo 2 hodiny po zákroku (Obr. 3B). V pokusech, kdy byl zvířatům intradermálně aplikován rozpouštěcí roztok, způsobila chirurgická incise rychlé zkrácení časových intervalů, za které zvířata reagovala na tepelný podnět představující rozvoj pooperační tepelné hyperalgie. Intradermální aplikace kapsaicinu 24 h před provedením plantární

incise způsobila naopak výrazné prodloužení reakčních intervalů zvířat na tepelnou stimulaci experimentálních končetin, termální hypoalgií, patrnou 1 hodinu před vlastním chirurgickým zákrokem a přetrvávající ještě 48 hodin po zákroku. V pokusech, kdy byla intradermální injekce aplikována 2 h po provedení incise, nebyl v prvních dvou hodinách po zákroku zaznamenán výrazný rozdíl pooperačních odpovědí zvířat na tepelné podněty mezi kontrolní a experimentální skupinou. 2 h po intradermální injekci kapsaicinu (4 h po chirurgickém zákroku) už bylo zkrácení reakčních intervalů na tepelný podnět podstatně mírnější v porovnání s kontrolní skupinou zvířat po injekci rozpouštědla, a celý další průběh pooperační tepelné hyperalgie byl účinkem kapsaicinu oslaben.



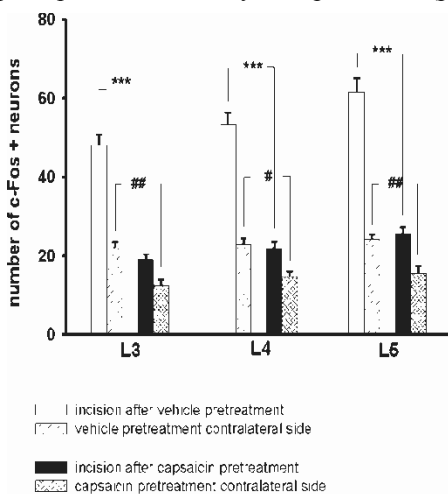
Obr. 3 Reakční časové intervaly (průměr +/- standardní chyba průměru) na tepelné podněty zvířat, kterým byl aplikován roztok kapsaicinu nebo rozpouštědla 24 h před provedením plantární incise (A) nebo 2 h po incisi (B). (A) Reakční intervaly končetin po injekci rozpouštědla (Δ) se po provedení chirurgického zákroku (v čase 0) výrazně zkrátily. Injekce kapsaicinu 24 h před zákrokem způsobila významné prodloužení reakčních časů na tepelné podněty (\circ). Reakční intervaly kontralaterálních intaktních končetin na tepelné podněty se u žádné z

experimentálních skupin zvířat významně neměnily (\bullet , \blacktriangle). (B) Incise měla za následek zkrácení reakčních intervalů na tepelné podněty u obou skupin zvířat. V případě, že byl 2 h po incisi aplikován roztok kapsaicinu, došlo k signifikantnímu nárůstu reakčních intervalů v porovnání s kontrolní skupinou už 2 h po injekci (testovací čas 4 h, \circ). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ pro odpovědi operovaných končetin po injekci kapsaicinu versus kontralaterálních, ++ $P < 0,01$; +++ $P < 0,001$ pro odpovědi operovaných končetin po injekci rozpouštědla versus kontralaterálních, # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ pro odpovědi operovaných končetin po injekci kapsaicinu versus odpovědi operovaných končetin po injekci rozpouštědla.

4.2. Aktivace míšních neuronů chirurgickou incisí a její ovlivnění lokálně aplikovaným kapsaicinem

V další části studie byla sledována aktivace a následná centrální senzitivace míšních nociceptivních neuronů chirurgickou incisí pomocí exprese c – Fos v jádrech neuronů zadních rohů lumbální míchy. Stejnou metodou byl zjišťován efekt intradermálně aplikovaného kapsaicinu 24 h před provedením zákroku na expresi c – Fos v lumbální míše a rozvoj centrální senzitivace.

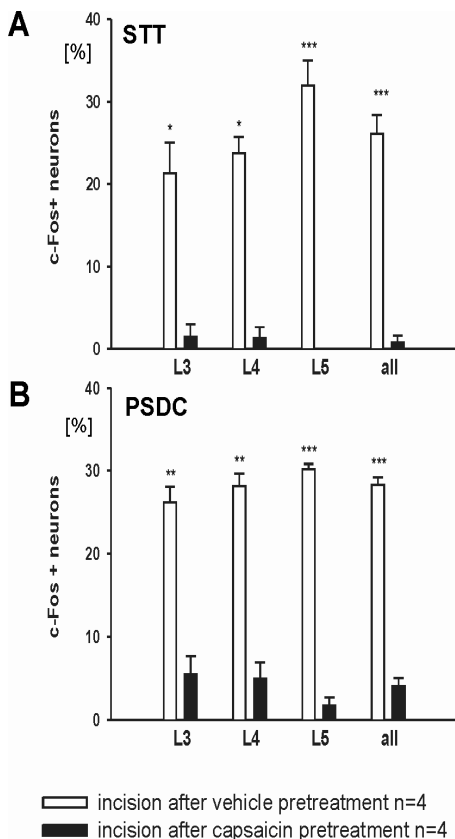
U kontrolních zvířat, kterým bylo předoperačně injikováno pouze rozpouštědlo, byl počet Fos-imunopozitivních neuronů nacházejících se v zadních rozích lumbální míchy na straně incise výrazně vyšší než v kontralaterálních zadních rozích. U zvířat předoperačně ovlivněných vysokou dávkou kapsaicinu byl počet pozitivně obarvených neuronů v zadních rozích míchy na straně incise sice poměrně nízký, avšak stále signifikantně zvýšený v porovnání s kontralaterální stranou. Zvýšení Fos imunopozitivity mezi neurony zadních míšních rohů na straně incise však bylo mnohem výrazněji vyjádřeno u kontrolních zvířat, kterým bylo před provedením plantární incise aplikováno rozpouštědlo, v porovnání se zvířaty předoperačně ovlivněnými kapsaicinem ($p \leq 0,001$). (Obr. 4)



Obr. 4 Počty neuronů obarvených na Fos v zadních rozích lumbální míchy po provedení plantární incise. Experimentální skupině zvířat byl 24 h před chirurgickým zákrokem aplikován roztok kapsaicinu, kontrolní skupině rozpouštěcí roztok. Počty Fos pozitivních neuronů byly vyšší u kontrolních zvířat. *** $P < 0,001$ zadní rohy míchy na straně incise kontrolní versus experimentální skupina zvířat, # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; zadní rohy míchy kontralaterálně od incise kontrolní versus experimentální skupina zvířat.

V další sérii pokusů byla zjišťována exprese c-Fos v retrogradně označených STT neuronech v zadních rozích míchy 2 h po provedení chirurgické incise na plantě pedis. Jedné skupině zvířat byl 24 před tímto zákrokem intradermálně aplikován kapsaicin, druhé pouze rozpouštěcí roztok. U zvířat, kterým bylo před provedením plantární incise aplikováno rozpouštědlo, byly počty STT neuronů exprimujících v jádrech c-Fos, nalezených v zadních rozích šedé hmoty míchy na straně operované končetiny výrazně vyšší v porovnání s kontralaterální stranou. Relativní počty STT neuronů vykazujících v jádrech Fos-imunopozitivitu v zadních rozích míchy na straně incise byly výrazně vyšší u zvířat, kterým bylo před provedením plantární incise injikováno rozpouštědlo, než u zvířat po injekci kapsaicinu. (Obr.5A)

Ověřována byla také úloha PSDC neuronů v pooperační bolesti. Počty PSDC neuronů vykazujících v jádrech Fos imunopozitivitu zjištěné v zadních rozích míchy na straně incise byly výrazně vyšší u zvířat, kterým bylo před provedením plantární incise injikováno rozpouštědlo, než u zvířat po injekci kapsaicinu, ve všech sledovaných segmentech lumbální míchy, což dokazuje jejich významnou roli v neuromechanismech tohoto bolestivého stavu a možnost jeho účinného ovlivnění intradermálně aplikovaným kapsaicinem. (Obr. 5B)

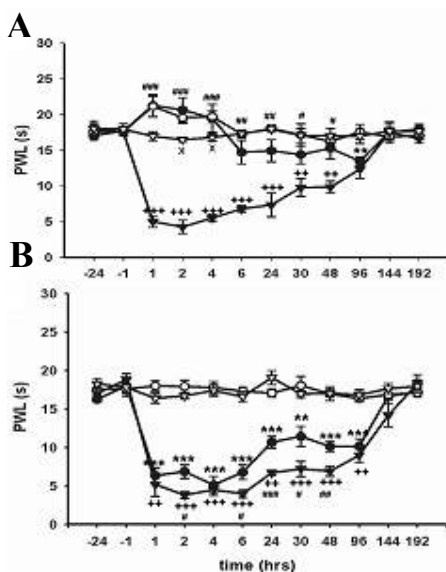


Obř. 5 (A) Expřese c – Fos v retrořrřdně označených STT neuronech v zadnřch rořzřch lumbřlnř mřchy 2 h po provedenř plantřrřnř incise. Kapsaicin snřžil expřesi c – Fos v STT neuronech na straně operovaně končetiny. * P < 0,05; *** P < 0,001 zadnř rohy lumbřlnř mřchy na straně operovaně končetiny experimentřlnř versus kontrolnř skupiny zvřřat. (B) Expřese c – Fos v retrořrřdně označených PSDC neuronech 2 h po provedenř plantřrřnř incise. Proporce Fos imunopozitivnřch PSDC neuronů byla vyřřř u kontrolnř skupiny zvřřat. ** P < 0,01, *** P < 0,001 zadnř rohy lumbřlnř mřchy na straně operovaně končetiny experimentřlnř versus kontrolnř skupiny zvřřat.

4.3. Úloha TRPV1 receptorů v rozvoji pooperační mechanické alodynie a mechanické a tepelné hyperalgie

Nřsledujřcř pokusy byly specificky zaměřeny na roli TRPV1 receptorů v rozvoji pooperační tepelně hyperalgie a mořnost ovlivnřnř tohoto bolestivěho stavu pomocí TRPV1 antagonisty. Pooperační změny odpovědř zvřřat na tepelně podnřty byly testovřny po intratekřlnř aplikaci 100 μ M roztoku SB 366791 15 minut před provedenř plantřrřnř incise. V prvnřch hodinřch po

zároku došlo účinkem TRPV1 antagonisty k úplnému zablokování pooperační tepelné hyperalgie, průměrné reakční časové intervaly na tepelný podnět operovaných končetin byly oproti předoperačním hodnotám významně prodlouženy. Intratekálně aplikovaný SB 366791 způsobil zároveň signifikantní prodloužení reakčních časů kontralaterálních, neoperovaných končetin těchto experimentálních zvířat. (Obr. 6A) U jiné skupiny zvířat byly zjišťovány pooperační změny odpovědi na tepelnou stimulaci planty pedis po intradermální aplikaci 100 μ M SB 366791 30 minut před a bezprostředně po provedení chirurgické incise. SB 366791 i v tomto případě významně oslabil průběh pooperační tepelné hyperalgie v porovnání s kontrolní skupinou zvířat. (Obr. 6B)

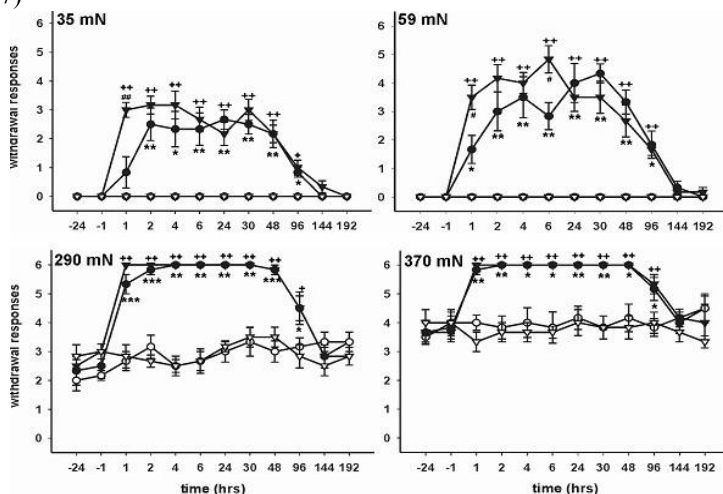


Obr. 6 Reakční intervaly (průměr +/- standardní chyba průměru) na tepelné podněty. (A) Reakční intervaly končetin po intratekální injekci rozpouštědla (▲) se po provedení chirurgického zákroku (v čase 0) výrazně zkrátily. Intratekální injekce 100 μ M SB 366791 způsobila jejich prodloužení (●), reakce intaktních končetin se rovněž prodloužily (○).

Reaktivita kontralaterálních končetin kontrolních zvířat zůstala na stejné úrovni (Δ). (B) U kontrolních zvířat došlo po incisi ke zkrácení reakčních intervalů operovaných končetin na tepelné podněty (▲), u zvířat po intradermální injekci 100 μ M SB 366791 taktéž (●), bylo však mírněji vyjádřeno.

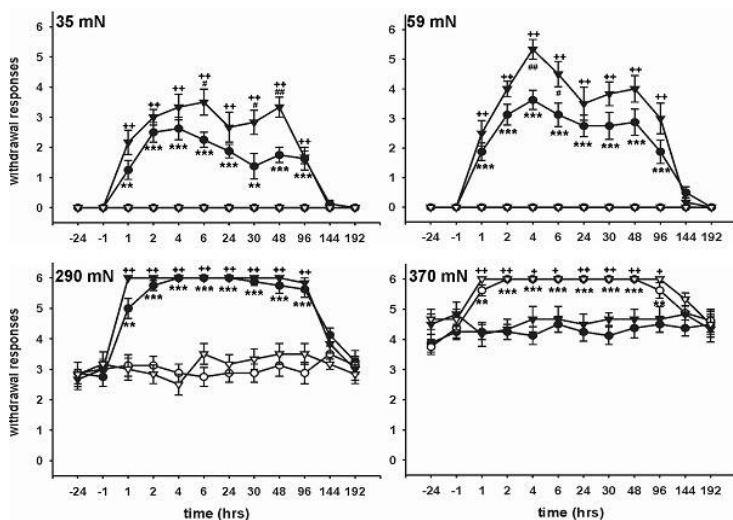
Reakční intervaly intaktních končetin se neměnily (○, Δ). ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ odpovědi pravých končetin zvířat po injekci SB 366791 versus korespondujících levých, ++ $P < 0,01$; +++ $P < 0,001$ odpovědi pravých končetin zvířat po injekci rozpouštědla versus levých, # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ odpovědi pravých končetin zvířat po injekci SB 366791 versus odpovědi pravých končetin zvířat po injekci rozpouštědla. x $P < 0,05$; odpovědi levých končetin zvířat po injekci SB 366791 versus odpovědi levých končetin zvířat po injekci rozpouštědla.

Dále byla zjišťována úloha TRPV1 receptorů v rozvoji pooperační mechanické alodynie a hyperalgie. Experimentální skupině zvířat byl 15 minut před provedením plantární incise intratekálně aplikován 100 μM roztok TRPV1 antagonisty SB 366791. U těchto zvířat byl po chirurgickém zákroku překvapivě zjištěn jen velmi mírný nárůst odpovědí na mechanické podněty slabých intenzit při stimulaci operovaných končetin v porovnání s pooperačním zvýšením reaktivity kontrolních zvířat. Pooperační zvýšení odpovědí na stimulaci silnými mechanické podněty účinkem intratekálně aplikovaného TRPV1 antagonisty významně ovlivněno nebylo. (Obr. 7)



Obr. 7 100 μM SB 366791 intratekálně před provedením plantární incise. Počet reflexních odpovědí (průměr \pm standardní chyba průměru) na stimulaci Von Freyovými vlákny (35 – 370 mN) planty pedis zvířat, kterým byl 100 μM SB 366791 nebo rozpouštěcí roztok aplikován intratekálně 15 min před chirurgickým zákrokem. Po provedení incise se u kontrolních zvířat počet vyvolaných odpovědí operovaných končetin zvýšil (\blacktriangle), odpovědi kontralaterálních končetin se neměnily (Δ). Tento nárůst reaktivity byl u skupiny zvířat ovlivněných SB 366791 mírně oslaben (\bullet), v porovnání s korespondujícími kontralaterálními končetinami však zůstal signifikantní (\circ). Plantární incise byla provedena v čase 0. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ odpovědi pravých končetin zvířat po injekci SB 366791 versus korespondujících levých, + $P < 0,05$; ++ $P < 0,01$; odpovědi pravých končetin zvířat po injekci rozpouštědla versus levých, # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ odpovědi pravých končetin zvířat po injekci SB 366791 versus odpovědi pravých končetin zvířat po injekci rozpouštědla.

V jiné sérii pokusů bylo sledováno ovlivnění pooperačních změn reaktivity experimentálních zvířat na mechanické podněty účinkem intradermálně aplikovaného 100 μM roztoku SB 366791. V porovnání s výrazným zvýšením počtu vyvolaných odpovědí slabými mechanickými podněty, zjištěném při stimulaci operovaných končetin kontrolních zvířat, byl nárůst reaktivity zvířat ovlivněných intradermální injekcí SB 366791 jen mírný. Naproti tomu pooperačně zvýšené odpovědi na mechanické podněty silnějších intenzit, pooperační mechanická hyperalgie, ovlivněna nebyla. (Obr. 8)

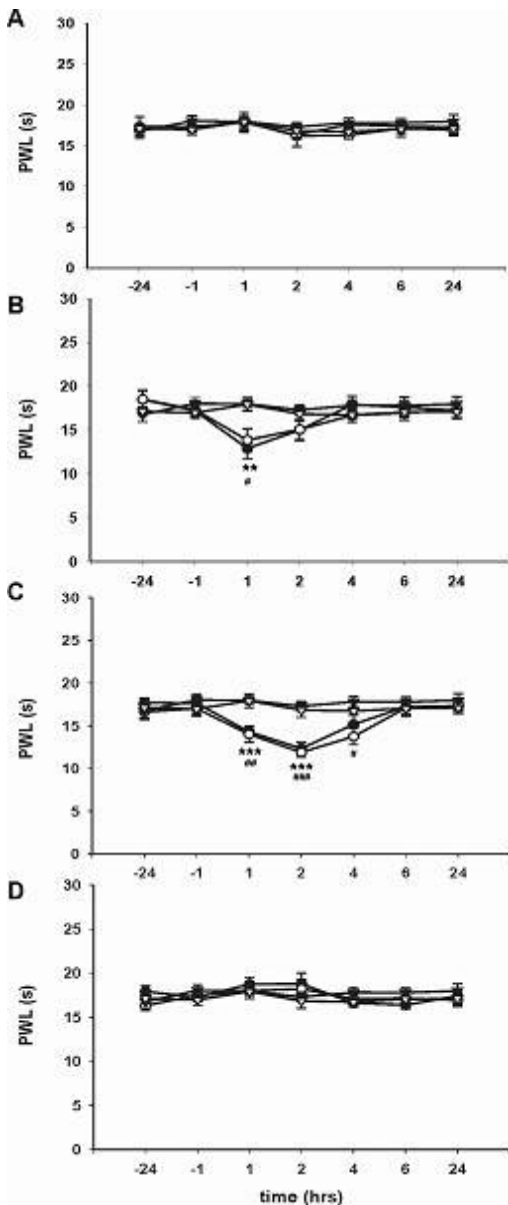


Obr. 8 100 μM SB 366791 intradermálně před a po provedení plantární incise. Po provedení incise se počet vyvolaných odpovědí operovaných končetin kontrolních zvířat výrazně zvýšil (▲), odpovědi kontralaterálních končetin se neměnily (Δ). Tento nárůst reaktivity byl u zvířat ovlivněných SB 366791 oslaben (●), v porovnání s korespondujícími kontralaterálními končetinami však zůstal signifikantní (○). Plantární incise byla provedena v čase 0. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ odpovědi pravých končetin zvířat po injekci SB 366791 versus korespondujícími levých, + $P < 0,05$; ++ $P < 0,01$; odpovědi pravých končetin zvířat po injekci rozpouštědla versus levých, # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ odpovědi pravých končetin zvířat po injekci SB 366791 versus odpovědi pravých končetin zvířat po injekci rozpouštědla.

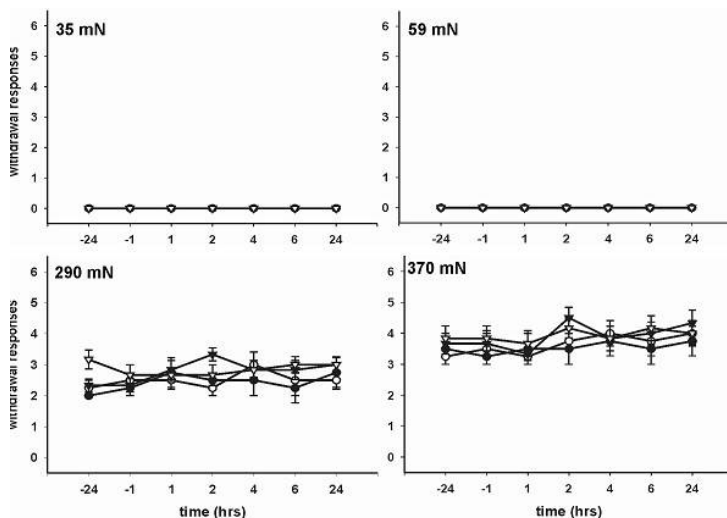
4.4. Úloha centrálních TRPV1 receptorů v nocicepci

Poslední část studie se zabývala úlohou centrálních TRPV1 receptorů v nocicepci. U experimentálních zvířat byly sledovány změny reaktivity na tepelné a mechanické podněty po aktivaci centrálních TRPV1 endogenním agonistou (OLDA), dále po senzitivizaci centrálních TRPV1 bradykininem, a dále po aktivaci senzitivizovaných TRPV1 endogenním agonistou. V poslední sérii pokusů byl testován účinek TRPV1 antagonisty na tyto změny.

V první sérii pokusů byly testovány odpovědi zvířat na tepelné podněty po intratekální aplikaci 50 μ M OLDA, nebyla zjištěna žádná změna reaktivity zvířat na tepelnou stimulaci v porovnání s kontrolními hodnotami zjištěnými před jeho aplikací. (Obr. 9A) Ve stejných časových intervalech byly testovány i odpovědi na mechanické podněty, u žádného z experimentálních zvířat této série pokusů však nebyla po intratekální injekci OLDA zaznamenána jakákoliv změna odpovědí, a to v celém průběhu pokusu. (Obr. 10)

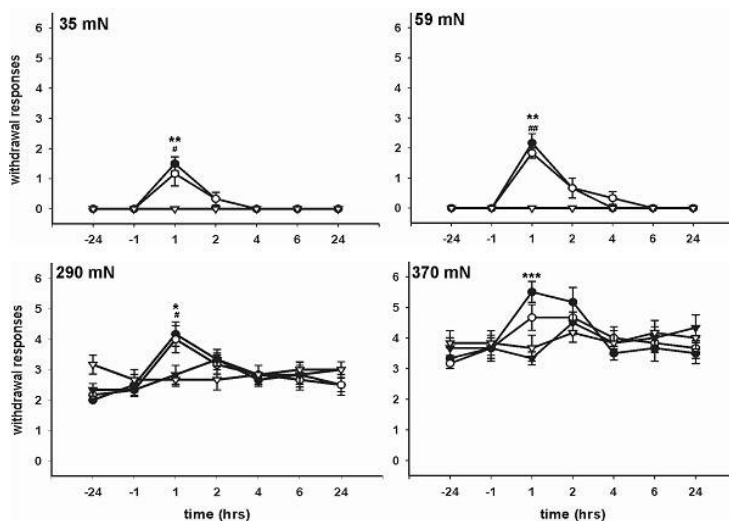


Obr. 9 Reakční intervaly (průměr +/- standardní chyba průměru) na tepelné podněty. První skupině zvířat byl intratekálně aplikován roztok OLDA (A), druhé skupině zvířat roztok bradykininu (B), třetí skupině zvířat roztok OLDA současně s bradykininem (C), zvířatům čtvrté skupiny roztok TRPV1 antagonisty a poté OLDA s bradykininem (D). Účinné látky byly aplikovány v čase 0. Intervaly jsou prezentovány v grafech společně s hodnotami kontrolních zvířat z předchozích sérií pokusů, kterým byl intratekálně aplikován rozpouštěcí roztok. (A) Po intratekální injekci OLDA nedošlo k žádné změně reaktivity na tepelné podněty obou končetin v celém průběhu pokusu (●,○). (B) Reakční intervaly obou končetin se po intratekální aplikaci bradykininu zkrátily. (●,○). (C) Po intratekální aplikaci roztoků bradykininu a OLDA se intervaly rovněž zkrátily, oproti předchozí experimentální skupině výrazněji. (●,○). (D) Po intratekální injekci SB 366791 následované bradykininem s OLDA nedošlo k žádné změně reaktivity na tepelné podněty končetin v celém průběhu pokusu (●,○). ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ odpovědi levých končetin zvířat po injekci účinné látky versus levých končetin zvířat po injekci rozpouštědla, # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ odpovědi pravých končetin zvířat po injekci účinné látky versus odpovědi pravých končetin zvířat po injekci rozpouštědla.



Obr. 10 OLDA aplikovaný intratekálně bez provedení plantární incise. Počet reflexních odpovědí (průměr \pm standardní chyba průměru) vyvolaných při stimulaci Von Freyovými vlákny (35 – 370 mN) planty pedis zvířat, kterým byl intratekálně aplikován roztok OLDA (v čase 0). Odpovědi na mechanické podněty se po injekci OLDA (●,○) nezměnily a zůstávaly na stejné úrovni v celém průběhu pokusu.

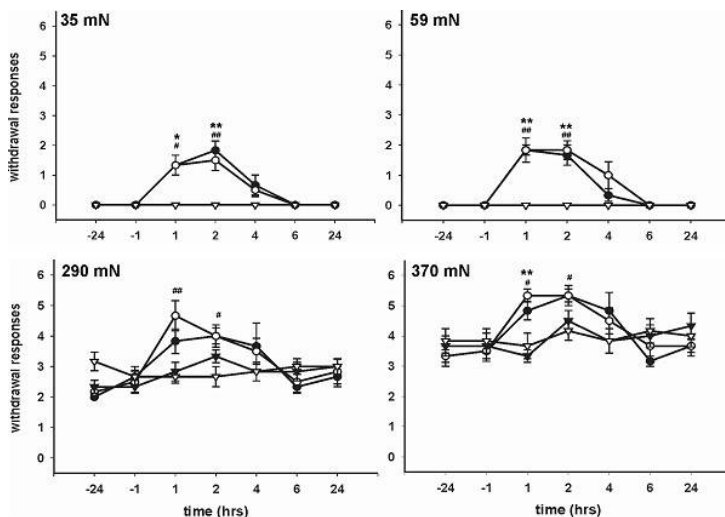
V další sérii pokusů byla testována reaktivita zvířat na tepelné a mechanické podněty po intratekální aplikaci substance senzitivující TRPV1 receptory, 1 mM roztoku bradykininu. V těchto pokusech bylo zjištěno významné zkrácení reakčních časů zvířat na tepelnou stimulaci v porovnání s kontrolními hodnotami, účinkem bradykininu došlo k rozvoji přechodné hypersenzitivity na tepelné podněty. (Obr. 9B, obr. 14A) Ve stejných časových intervalech byly testovány i odpovědi zvířat na mechanické podněty. Po aplikaci bradykininu začala zvířata odpovídat na stimulaci silami nízkých intenzit, které nevyvolaly reflexní elevace končetin kontrolních zvířat, účinkem intratekálně aplikovaného bradykininu došlo i k výraznému zvýšení odpovědi na silnější mechanické podněty. (Obr. 11, obr. 14B)



Obr. 11 Bradykinin aplikovaný intratekálně bez provedení plantární incise. Počet reflexních odpovědí (průměr +/- standardní chyba průměru) vyvolaných při stimulaci Von Freyovými vlákny (35 – 370 mN) planty pedis zvířat, kterým byl intratekálně aplikován roztok bradykininu (v čase 0). Počet odpovědí na mechanickou stimulaci obou končetin se v porovnání s kontrolní hodnotou po intratekální aplikaci bradykininu signifikantně zvýšil (●,○). * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 odpovědi levých končetin zvířat po injekci účinné látky versus levých končetin zvířat po injekci rozpouštědla, # P < 0,05; ## P < 0,01 odpovědi pravých končetin zvířat po injekci účinné látky versus odpovědi pravých končetin zvířat po injekci rozpouštědla.

V jiné sérii pokusů bylo testováno ovlivnění reaktivity zvířat na tepelné a mechanické podněty účinkem intratekálně podaného roztoku bradykininu následovaného intratekálně aplikovaným roztokem OLDA ve stejných koncentracích jako předchozích pokusech. U této skupiny experimentálních zvířat bylo zjištěno významné zkrácení reakčních časů zvířat na tepelnou stimulaci v porovnání s kontrolními hodnotami. Oproti termální hyperalgezií způsobené účinkem samotného bradykininu byla v tomto případě hypersenzitivita na tepelné podněty zřetelně výrazněji vyjádřena a přetrvávala delší dobu. (Obr. 9C, obr. 14A) Stejným způsobem byly testovány i odpovědi zvířat na mechanické podněty. Po aplikaci bradykininu s OLDA začala zvířata reagovat na slabé mechanické podněty, nevyvolávající reflexní odpovědi za kontrolních podmínek.

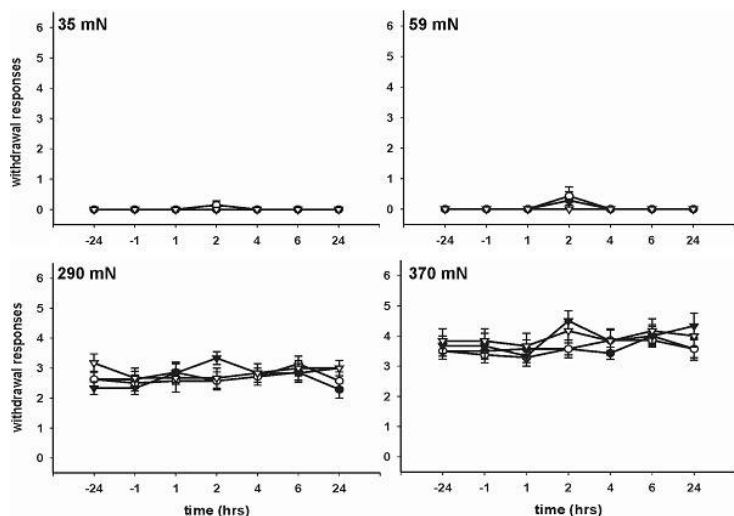
Oproti předešlému pokusu s aplikací samotného bradykininu přetrvávala v tomto případě mechanická alodynie déle. Došlo rovněž k výraznému zvýšení odpovědí zvířat na stimulaci intenzivnějšími mechanickými silami. (Obr. 12, obr. 14B)



Obr. 12 Bradykinin s OLDA aplikovaný intratekálně bez provedení plantární incise. Počet reflexních odpovědí (průměr +/- standardní chyba průměru) vyvolaných při stimulaci Von Freyovými vlákny (35 – 370 mN) planty pedis zvířat, kterým byl intratekálně aplikován roztok bradykininu a OLDA (v čase 0). Počet odpovědí na mechanickou stimulaci obou končetin se v porovnání s kontrolní hodnotou po intratekální aplikaci bradykininu signifikantně zvýšil (●,○), oproti předchozí experimentální skupině výrazněji. * P < 0,05; ** P < 0,01 odpovědi levých končetin zvířat po injekci účinné látky versus levých končetin zvířat po injekci rozpouštědla, # P < 0,05; ## P < 0,01 odpovědi pravých končetin zvířat po injekci účinné látky versus odpovědi pravých končetin zvířat po injekci rozpouštědla.

V poslední sérii pokusů byla testována reaktivita zvířat na tepelné a mechanické podněty po intratekálně podaném 100 μ M roztoku SB 366791 před intratekální injekcí roztoku bradykininu současně s roztokem OLDA. Odpovědi těchto zvířat na tepelné podněty zůstávaly na stejné úrovni v celém časovém průběhu pokusu, účinkem intratekálně aplikovaného TRPV1 antagonisty došlo k úplnému zablokování hypersenzitivity na tepelné podněty vyvolané intratekální injekcí bradykininu s OLDA. (Obr. 9D)

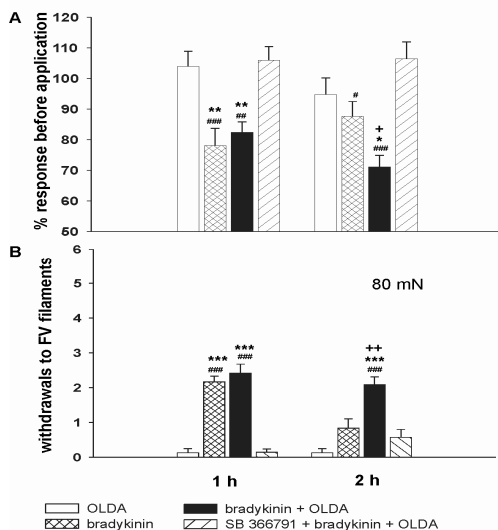
V těchto pokusech zvířata nezačala reflexně odpovídat na slabé mechanické podněty, nevyvolávající elevace končetin za kontrolních podmínek, nebyla zaznamenána ani změna reflexních odpovědí při stimulaci silnějšími mechanickými silami. Působením 100 μ M roztoku TRPV1 antagonisty došlo k úplnému zablokování mechanické alodynie a hyperalgie vznikajících účinkem intratekálně podaného bradykininu s OLDA. (Obr. 13)



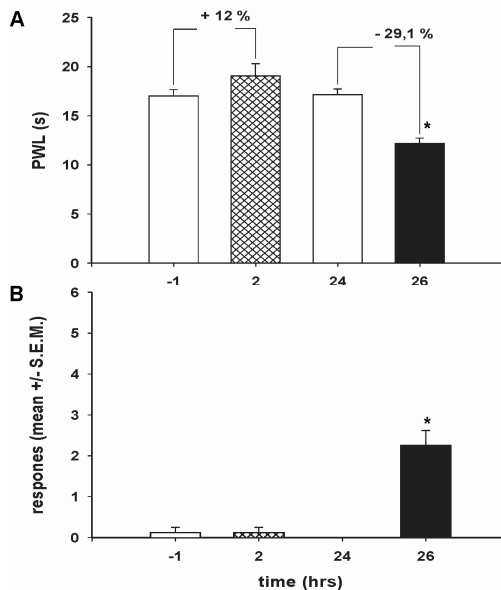
Obr. 13 Bradykinin s OLDA aplikované intratekálně po intratekální injekci SB 66791, bez provedení plantární incise. Počet reflexních odpovědí (průměr +/- standardní chyba průměru) vyvolaných při stimulaci Von Freyovými vlákny (35 – 370 mN) planty pedis zvířat, kterým byl intratekálně aplikován nejprve roztok SB 366791 a poté bradykinin s OLDA (v čase 0). Odpovědi na mechanické podněty se po injekcích roztoků těchto látek (●,○) zůstávaly na stejné úrovni v celém průběhu pokusu. SB 366791 účinně zablokoval nárůst reaktivity na mechanické podněty způsobené OLDA a bradykininem.

Aby byl jasně prokázán specifický účinek SB 366791 na průběh hyperalgie a alodynie vyvolané intratekálně podaným bradykininem s OLDA, byl čtyřem zvířatům této experimentální skupiny roztok bradykininu s roztokem OLDA intratekálně aplikován znovu 24 hodin po první injekci, a to bez TRPV1 antagonisty. Po této druhé intratekální aplikaci bradykininu a OLDA

bylo zjištěno významné zkrácení reakčních časů na tepelnou stimulaci a nárůst odpovědí na stimulaci mechanickou. Tyto výsledky potvrzují roli centrálních TRPV1 receptorů v rozvoji hypersenzitivity na tepelné i mechanické podněty vyvolané intratekálně podaným bradykininem s OLDA. (Obr. 15A, B)



Obr. 14 Reakční intervaly na tepelné podněty v časech 1 h a 2 h po intratekální injekci OLDA, bradykininu, bradykininu s OLDA a SB 366791 + bradykininu s OLDA vyjádřené relativně jako procento z kontrolních hodnot naměřených před injekcí (průměr +/- standardní chyba průměru, 100% = kontrolní reakční intervaly) (A) a počet reflexních odpovědí (průměr +/- standardní chyba průměru) vyvolaných při stimulaci Von Freyovým vláknem 80 mN planty pedis 1 h a 2 h po intratekální injekci (B). 1 i 2 h po aplikaci bradykininu se reakční intervaly na tepelné podněty výrazně zkrátily oproti reaktivitě zvířat po injekci OLDA, tento rozdíl byl statisticky významný v obou testovacích časech. V případě intratekální aplikace bradykininu s OLDA bylo zkrácení ještě výraznější, zejména 2 h po injekci, kdy i rozdíl mezi skupinami zvířat po aplikaci bradykininu a bradykininu s OLDA dosáhl statistické signifikance. SB 366791 zabránil zkrácení reakčních intervalů na tepelné podněty vyvolané intratekální injekcí bradykininu s OLDA. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 odpovědi zvířat po aplikaci bradykininu, bradykininu s OLDA nebo SB 366791 + bradykininu s OLDA versus skupina po aplikaci OLDA, # P < 0,05; ## P < 0,01; ### P < 0,001 odpovědi zvířat po aplikaci OLDA, bradykininu nebo bradykininu s OLDA versus skupina po aplikaci SB 366791 + bradykininu s OLDA, + P < 0,05; ++ P < 0,01; skupina zvířat po aplikaci bradykininu versus skupina po injekci bradykininu s OLDA.



Obr. 15 Intratekální aplikace bradykininu s OLDA 24 h po injekcích roztoků SB 366791 a bradykininu s OLDA. Reakční časové intervaly (průměr +/- standardní chyba průměru) na tepelné podněty (A) a počet reflexních odpovědí (průměr +/- standardní chyba průměru) vyvolaných při stimulaci Von Freyovým vláknem 80 mN planty pedis zvířat (B), kterým byly intratekálně aplikovány nejprve roztoky SB 366791 a bradykininu s OLDA (v čase 0), a 24 h poté pak opět bradykinin s OLDA. (A) Po intratekální injekci SB 366791 následované bradykininem s OLDA nedošlo k žádné změně reaktivity na tepelné podněty jejich končetin. Po další aplikaci roztoku bradykininu s OLDA 24 h poté se reakční intervaly na tepelné podněty této skupiny zvířat zkrátily. (B) Odpovědi na mechanický podnět 80 mN se po intratekální injekci SB 366791 následované bradykininem s OLDA nezměnily. Po další aplikaci roztoku bradykininu s OLDA 24 h poté se jejich počet zvýšil. * $P < 0,05$ odpovědi zvířat 1 h před versus 2 h po intratekální injekci.

5. Diskuse

5.1. Účinky lokálně aplikovaného kapsaicinu ve vysoké koncentraci na bolest chirurgického původu

Při stimulaci senzorického nervového vlákna kapsaicinem dochází k otevření membránového kationtového kanálu a influxu kalciových

a sodných iontů do intracelulárního prostoru kapsaicin-senzitivního neuronu, který je tímto mechanismem depolarizován. Fáze aktivace je pak následována periodou desenzitizace nociceptoru, jejímž podkladem je vzestup intracelulární koncentrace kalcia, který aktivuje enzym kalcineurin. Kalcineurin katalyzuje defosforylaci kapsaicinového iontového kanálu, jehož aktivita se tím výrazně sníží. (6, 17, 39) Vysokokoncentrovaný kapsaicin má v konečném důsledku svého působení neurotoxické účinky. Po systémovém podání vysoké dávky kapsaicinu novorozentým myším nebo krysám dojde k úplné selektivní degeneraci kapsaicin senzitivních nervových zakončení a k trvalé ztrátě více než 80% těl senzoricých neuronů o malém průměru. (14) Po lokální aplikaci jsou poškozené axony schopny regenerace z jejich z proximálních částí, protože somata jejich neuronů v tomto případě přežívají. (36)

Senzitizace primárních aferentních vláken chirurgickou incísi způsobila zvýšení reaktivity zvířat na mechanické a tepelné podněty. V důsledku inaktivace kapsaicin – senzitivních aferentních neuronů předoperačně aplikovaným kapsaicinem byl rozvoj pooperační hyperalgie účinně zablokovan. U skupiny zvířat, kterým byl kapsaicin aplikován 2 h po provedení plantární incise, nedosáhl jeho analgetický efekt takové úrovně. Časový interval od provedení chirurgického zákroku do funkční eliminace kapsaicin – senzitivních zakončení byl dostatečný k tomu, aby mohlo dojít k centrální senzitivaci na úrovni míchy. Význam iniciální aktivace periferních zakončení nociceptorů intenzivním bolestivým podnětem pro centrální změny byl experimentálně prokázán, intenzivní aferentace z místa traumatu hraje v jejich rozvoji rozhodující roli. (28)

Lokálně aplikovaný kapsaicin ve vysoké koncentraci je velmi účinný k indukci degenerace epidermálních nervových zakončení a následné hypoalgie i u lidí. (19, 22, 26) Jeho efekt je přímo závislý na koncentraci, které dosáhne po aplikaci v bezprostřední blízkosti kapsaicin – senzitivního vlákna exprimujícího TRPV1 receptory. (26) Vysoká koncentrace kapsaicinu v bolusu injekčního roztoku zvětší vzdálenost difúze kapsaicinu v efektivní koncentraci z místa aplikace do okolních tkání. Účinek kapsaicinu ve formě masti je ovlivněn nosnou substancí a tudíž různou mírou penetrace do kůže. (4) Lokálně aplikovaný kapsaicin by mohl být účinnou látkou k ovlivnění pooperační bolesti. Jeho účinek se v našich pokusech projevil jako velmi potentní, vysoce selektivní a přetrvávající

dostatečně dlouhou dobu. Lokální aplikace kapsaicinu je však v klinické praxi pacienti špatně tolerována z důvodu bolestivosti v iniciační fázi jeho účinku. (23) Anestézie kůže místním anestetikem před aplikací vysoké dávky kapsaicinu by mohlo být účinným řešením tohoto problému.

5.2. Senzitizace míšních neuronů chirurgickou incízí a její ovlivnění lokálně aplikovaným kapsaicinem

Zvýšená vzruchová aktivita nociceptorů může způsobit i změny na úrovni transkripce genů kódujících proteiny zodpovědné za příjem, vedení a synaptický přenos vzruchu, jejichž výsledkem jsou změny excitability a vodivých vlastností těchto neuronů. (37) Touto cestou je indukován například gen kódující transkripční faktor c-Fos. (13) Exprese c – Fos je funkční marker sloužící k identifikaci neuronů centrálního nervového systému aktivovaných nociceptivním podnětem. Stejně jako několik dalších studií, například na experimentálním zvířecím modelu pooperační bolesti (28) nebo artritidy (1, 2), prokázaly i naše výsledky nárůst exprese c-Fos v neuronech zadních rohů míchy po provedení plantární incise, který časově koreloval s rozvojem pooperační hyperalgie a alodynie. V případě vyřazení nociceptivní aferentace z místa poranění intradermálně aplikovaným kapsaicinem před provedením zákroku, byl tento nárůst výrazně oslaben, což dokazuje zablokování procesů centrální senzitizace v míšních neuronech účinkem kapsaicinu. Toto zjištění plně koresponduje s výsledky behaviorálních pokusů první části naší studie, kdy kapsaicin aplikovaný intradermálně před provedením plantární incise zcela zabránil rozvoji pooperační tepelné hyperalgie a výrazně oslabil průběh pooperační mechanické alodynie i hyperalgie.

Akumulace proteinu Fos je v jádře neuronu nejvyšší asi 2 hodiny po indukci transkripce. (13) Na podkladě těchto zjištění byla v našich pokusech sledována exprese c – Fos právě 2 h po působení nociceptivního podnětu. Nárůst exprese 2 h po provedení incise potvrzuje centrální senzitizaci a facilitaci synaptického přenosu v zadních rozích míchy, která se evidentně rozvine rychleji, než se uplatní analgetický efekt kapsaicinu aplikovaného až po zákroku. Předoperační ovlivnění nociceptivních neuronů kapsaicinem je tudíž účinnější. Nárůst exprese c – Fos byl zjištěn nejen v zadních rozích

lumbální míchy na straně operované končetiny, ale i v zadních rozích kontralaterálních. Toto zjištění lze vysvětlit anatomickým uspořádáním centrálních zakončení primárních aferentních neuronů, které na kontralaterální stranu mohou vysílat své kolaterály. (35)

Centrální senzitivizaci nociceptivního systému operačním zákrokem a následnému rozvoji patologických bolestivých stavů lze účinně zabránit plánovanou předoperační aplikací farmak. Nejčastěji jsou k tomuto účelu používána lokální anestetika, která krátkodobě zablokují veškerý neurální přenos periferními aferentními vlákny. Vysoká dávka kapsaicinu účinkuje selektivně na vlákna exprimující kapsaicinové TRPV1 receptory a jeho efekt přetrvává několik dní, než dojde opět k regeneraci těchto epidermálních zakončení a obnovení jejich funkce. (27) Výsledky našich pokusů prokázaly rozhodující úlohu právě primárních aferentních vláken exprimujících TRPV1 receptory v rozvoji pooperační bolesti, selektivní ovlivnění jejich funkce vysokou dávkou kapsaicinu představuje účinnější způsob pooperační analgesie než aplikace lokálních anestetik.

Abychom ověřili, že se exprese c – Fos v lumbální míše skutečně týká neuronů účastnících se nocicepce, byly v několika pokusech retrogradně značeny neurony spinothalamického traktu (STT), tj. hlavní dráhy nocicepce, a „postsynaptické dráhy zadních provazců“ (PSDC), jejíž úloha v nocicepci byla rovněž prokázána. V jejich jádrech byla sledována přítomnost Fos. Plantární incise indukovala zcela jednoznačně expresi c – Fos v jádrech jak STT, tak i PSDC neuronů zadních rohů lumbální míchy. Kapsaicin aplikovaný intradermálně do místa incise 24 h před provedením zákroku pak expresi c – Fos v STT i PSDC neuronech účinně zablokoval, tedy zabránil rozvoji jejich senzitivizace. Celkový počet retrogradně označených PSDC neuronů nalezených v lumbální míše byl podstatně vyšší než počet označených STT neuronů. Nelze vyloučit, že došlo k určitému ovlivnění těchto výsledků z technických důvodů, neboť retrogradní značení PSDC neuronů pomocí injekce barviva do nucleus gracilis se ukázalo jako technicky snáze proveditelné, než značení spinálních STT neuronů injekcí barviva do laterálního thalamu.

5.3. Úloha periferních a centrálních TRPV1 receptorů v mechanismech nocicepce u bolesti chirurgického původu

Řada preklinických studií prokázala vysokou efektivitu různých TRPV1 antagonistů na termální i mechanickou hyperalgiu u zvířecích modelů bolesti zánětlivého nebo neuropatického původu. (10, 33) Tento přístup by mohl přinést určité výhody i v léčbě pooperační bolesti oproti kapsaicinu, neboť je jeho topická aplikace špatně tolerována z důvodu bolestivosti v iniciální fázi jeho účinku a dostatečného efektu je dosaženo pouze při opakované aplikaci po dobu několika týdnů. (23) Nedávno byla podrobně charakterizována látka N-(3-methoxyphenyl)-4-chlorocinnamid (SB 366791), vysoce potentní a selektivní TRPV1 antagonist. Působí kompetitivním mechanismem při aktivaci TRPV1 podněty různých modalit (kapsaicinem, acidosou i vysokou teplotou). (12) Vazebné místo pro kapsaicin se však nachází na intracelulární straně TRPV1 receptoru (15, 32), naopak protony působí svým aktivacím účinkem na extracelulární stranu receptorového proteinu (30), aktivace působením tepla je způsobena mechanismem destabilizace póru TRPV1 receptoru představujícího iontový kanál. (9, 11) Mechanismus antagonismu SB 366791 lze vysvětlit dvěma způsoby. SB 366791 může jednak jako fyzicky blokovat vazebné místo TRPV1 pro kapsaicin, což brání aktivaci TRPV1 jinými podněty, protože dojde k ovlivnění mechanismu otevírání iontového kanálu, další možností může být vazba SB 366791 na allosterické místo TRPV1 receptoru a inhibice funkce celého TRPV1 receptoru jeho allosterickou modifikací nezávisle na způsobu aktivace. (12)

Periferní TRPV1 receptory slouží *in vivo* především k detekci tepelných podnětů (43 – 52 °C) (9) a snížení hodnoty pH (<6,8). (30) Také endogenní látky vaniloidní povahy produkované zejména v prostředí poraněné nebo zanícené tkáně (např. kyselina arachidonová nebo kyselina linolenová, diacylglycerol, aj.) aktivují periferní TRPV1 receptory nebo modulují jejich citlivost na jiné podněty. (30, 40) Protože jsou tkáňová poranění spojená se zanícením, infekcí a hypoxií provázená výlevem mediátorů zánětu i lokálním zvýšením kyselosti a teploty, přispívá TRPV1 receptor k periferním a pravděpodobně i k centrálním mechanismům zodpovědným za senzitivaci nociceptoru v důsledku tkáňového poranění. (9) V našich experimentech lokálně aplikovaný SB 366791 výrazně oslabil průběh pooperační tepelné hyperalgie, jeho účinek na mechanickou pooperační alodynii a hyperalgiu byl jen mírný. Analgetický efekt lokálně aplikovaného kapsaicinu byl podstatně

výraznější. TRPV1 antagonistista sice zablokuje periferní TRPV1 receptory, ale nociceptivní nervové zakončení zůstává po jeho aplikaci intaktní, ostatní receptory exprimované na jeho membráně jsou i nadále funkční a účastní se příjmu a detekce podnětů. Vysoká dávka kapsaicinu naopak aktivuje TRPV1 receptory a způsobí tím masivní influx kalcia intracelulárně do výběžku primárního aferentního neuronu. V jeho důsledku pak dojde k funkční inaktivaci, případně úplně morfologické destrukci nociceptivního nervového zakončení, tedy k jeho úplnému vyřazení z funkce.

Úloha centrálních TRPV1 je stále velkou neznámou. Jsou aktivovány endogenními látkami vaniloidní povahy, které jsou velmi slabými agonisty, a otázkou zůstává, jestli je v tkáních za fyziologických podmínek dosaženo jejich dostatečné koncentrace. V poraněné nebo zanícené tkáni se efekt endogenních vaniloidů uplatňuje v kombinaci se zvýšenou teplotou nebo zvýšenou koncentrací protonů, které jejich účinek facilitují. (30, 40) V našich pokusech došlo účinkem intratekálně aplikovaného SB 36679 k úplnému zablokování rozvoje pooperační tepelné hyperalgie, lokálně aplikovaný SB 366791 rozvoji tohoto bolestivého stavu nezabránil. Po lokální aplikaci obsadí SB 366791 periferní TRPV1 receptory a vyřadí je z jejich funkce reagovat na tepelné podněty. Ostatní receptory exprimované na membránách periferních zakončení primárních aferentních neuronů schopné detekce tepelných podnětů (např. TRPV2, TRPV3, aj.) tímto specifickým antagonistou ovlivněny nejsou, v prostředí tkáňového poranění podléhají senzitivizaci a mohou se podílet na rozvoji hypersenzitivity na tepelné podněty i bez účasti TRPV1 receptorů. Naproti tomu účinek SB 366791 na míšní TRPV1 receptory je zcela nezávislý na typu periferního receptoru, kterým byl tepelný podnět detekován na periférii. Působením intratekálně aplikovaného SB 366791 je nespecificky blokována veškerá aferentace přicházející daným kapsaicin – senzitivním aferentním neuronem. Proto je analgetický efekt intratekálně aplikovaného TRPV1 antagonisty na pooperační tepelnou hyperalgiu výraznější.

Pooperační hypersenzitivita na mechanické podněty byla v případě lokální i intratekální aplikace TRPV1 antagonisty ovlivněna jen minimálně. Slabý analgetický účinek lokálně aplikovaného SB 366791 lze vysvětlit stejným způsobem, jako jeho omezený efekt na pooperační hyperalgiu termální. V případě

intratekálního podání jsou pravděpodobně rozhodující mechanismy sumace na neuronálních synapsích v zadních rožích míchy. Při periferní stimulaci mechanickým podnětem dochází k aktivaci nejen nociceptivních A δ a C – vláken, z nichž převážná většina exprimuje TRPV1 receptory, ale i velkého množství sensorických vláken citlivých např. na dotyk nebo jiné nebolestivé mechanické podněty (zejména skupiny A β – vláken), které na svých membránách kapsaicinové TRPV1 receptory neexprimují, ale jsou rovněž v terénu poraněné tkáně senzitivovány. Na míšních WDR neuronech dochází ke konvergenci aferentace z těchto primárních sensorických neuronů a časové i prostorové sumaci elektrických impulsů, které přivádějí.

5.4. Úloha centrálních TRPV1 receptorů v nocicepci, mechanismy jejich aktivace a senzitivace

N-oleolyldopamin (OLDA) je jedním ze selektivních endogenních agonistů na TRPV1 receptorech a svým působením na periferní TRPV1 receptory indukuje v *in vivo* experimentech výraznou termální hyperalgezi. (7, 29) Nicméně, intratekálně aplikovaný OLDA v příslušné koncentraci neměl významný efekt na termosenzitivitu ani mechanosenzitivitu našich pokusných zvířat. V *in vivo* studii, která prokázala rozvoj hypersenzitivity zvířat na tepelné podněty účinkem OLDA, byl však tento roztok zvířatům aplikován subkutánně, ne intratekálně (7), tento rozdíl může být způsoben jeho různou biologickou dostupností při dvou různých způsobech aplikace. Pomocí subkutánní injekce se OLDA pravděpodobně dostane do přímého kontaktu s TRPV1 receptory v efektivní koncentraci snáze, než při aplikaci intratekální, kdy dochází k jeho naředění likvorem a většímu úniku do systémového krevního řečiště. V případě subkutánní aplikace působí navíc OLDA především na periferní TRPV1 receptory, které se nacházejí v úplně jiném tkáňovém prostředí než centrální TRPV1 receptory, jehož charakter může citlivost k agonistům významně ovlivnit.

Senzitivace proudových odpovědí vaniloidního receptoru v přítomnosti některých mediátorů zánětu (bradykinin, serotonin, prostagladin) je jedním z hlavních mechanismů modulace jeho aktivity. (21) Kininové peptidy (zejména bradykinin) jsou v tomto ohledu jedny z nejdůležitějších. Aktivuje B₂ a B₁ bradykininové receptory spřažené s G – proteiny na membránách sensorických

neuronů, které jsou spojeny s aktivitou PLC β , v jejímž důsledku dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace kalcia a aktivaci na kalcium závislé PKC. Aktivovaná PKC pak katalyzuje fosforylaci C – terminální domény TRPV1 receptoru, což je klíčová posttranslační úprava měnící jeho biologické vlastnosti ve smyslu senzitivace. V jejím důsledku se TRPV1 receptor stává citlivější k endogenním vaniloidním substancím, a ty se pak mohou uplatnit jako jeho aktivátory. Ačkoliv je bradykinin považován primárně za periferně působící zánětlivý mediátor, je evidentní, že se významně uplatňuje i v centrální transmissi nociceptivní informace. Expresce B₂ receptorů byla spolehlivě prokázána na membránách neuronů spinálních ganglií i v zadních rožích míchy a ukázalo se, že intenzivní nociceptivní aferentace indukuje výraznou produkci bradykininu v míše. (34)

Nedávno byla prokázána napěťová závislost TRPV1 iontového kanálu. Změny okolní teploty mají rovněž za následek výrazné posuny křivky závislosti proudu tímto iontovým kanálem na transmembránovém napětí, zvýšení teploty vede ke zvýšení frekvence otevírání TRPV1 iontového kanálu a změně membránového potenciálu směrem k aktivační úrovni. (31) Centrální TRPV1 receptory se nacházejí v prostředí o teplotě 37 °C, kdy může být membránový potenciál změněn ve smyslu depolarizace a frekvence otevírání TRPV1 iontového kanálu zvýšená. Není vyloučené, že *in vivo* může dojít k aktivaci TRPV1 iontového kanálu slabším podnětem (jako například endogenními vaniloidy), než v *in vitro* pokusech prováděných při pokojové teplotě.

Po intratekální injekci bradykininu došlo u našich experimentálních zvířat k rozvoji tepelné i mechanické hyperalgie. Možných mechanismů facilitačního působení na synaptický přenos v zadních rožích míchy je několik. Bradykininový B₂ receptor je funkčně spřažen s aktivitou PKC a PLA₂. Prostřednictvím aktivované PKC dojde k fosforylaci AMPA a NMDA receptorů míšních neuronů a tím jejich senzitivaci, případně zvýšení jejich transportu na membránu neuronů. PLA₂ konvertuje membránové fosfolipidy na kyselinu arachidonovou. Z té pak vznikají prostanoidy, které jsou neméně důležitými modulátory synaptického přenosu v zadních rožích míchy uplatňujícími se v jeho facilitaci.

V případě, kdy byl pokusným zvířatům intratekálně aplikován nejprve roztok bradykininu, a poté agonista na TRPV1 receptorech

OLDA, se rovněž rozvinula jasně prokazatelná termální i mechanická hyperalgie, která přetrvávala v porovnání s hypersenzitivitou vyvolanou pouze bradykininem podstatně delší dobu a byla výrazněji vyjádřena. Účinkem bradykininu dochází pravděpodobně k senzitivaci centrálních TRPV1 receptorů mechanismem fosforylace C – koncové domény jejich proteinů, a tím ke zvýšení jejich citlivosti k působení agonistů. V této situaci se pak může uplatnit OLDA jako agonista na těchto receptorech a stává se jejich účinným aktivátorem. Aktivace centrálních TRPV1 receptorů významně ovlivní synaptický přenos nociceptivní informace na úrovni míchy a podílí se na jeho facilitaci. V našich experimentech byl rozvoj mechanické i termální hyperalgie indukované intratekální injekcí bradykininu s OLDA zablokovan pomocí intratekálně aplikovaného TRPV1 antagonisty, což přímo potvrzuje, že se OLDA uplatní jako endogenní aktivátor centrálních TRPV1 receptorů po jejich senzitivaci působením bradykininu a podílí se tak zásadním způsobem na rozvoji těchto bolestivých stavů. Intenzivní nociceptivní aferentace z operační rány způsobí zvýšení produkce bradykininu v míše (34), aktivace centrálních TRPV1 receptorů endogenními vanilloidy po jejich senzitivaci bradykininem je jedním z hlavních mechanismů pooperační hyperalgie.

6. Závěr

Naše pokusy jasně prokázaly klíčovou úlohu kapsaicin – senzitivních primárních aferentních vláken v rozvoji hypersenzitivity vznikající po poranění chirurgickým zákrokem. Lokálně aplikovaný kapsaicin ve vysoké koncentraci se ukázal jako vysoce analgeticky účinný na pooperační tepelnou i mechanickou hyperalgiu vhodný k léčbě pooperační bolesti i v klinické praxi. Na neurálním přenosu nociceptivní informace po poranění chirurgickým zákrokem i na následném rozvoji hypersenzitivity na mechanické a tepelné podněty se rozhodujícím způsobem podílí periferní i centrální TRPV1 receptory exprimované na membránách těchto kapsaicin – senzitivních neuronů. Intratekálně aplikovaný TRPV1 antagonist měl výrazný analgetický efekt na průběh pooperační tepelné hyperalgie a mechanické alodynii. Naše výsledky potvrdily klíčovou úlohu nejen periferních, ale zejména centrálních TRPV1

receptorů v synaptickém přenosu nociceptivní informace v zadních rožích míchy a v její modulaci, objasnily možný způsob jejich aktivace a senzitivace na úrovni míchy, a zároveň prokázaly jejich významnou roli v neurálních mechanismech rozvoje pooperační bolesti.

7. Seznam literatury

1. Abbadie, C and Besson, JM. C – fos expression in rat lumbar spinal cord during the development of adjuvant – induced arthritis. *Neuroscience*.1992;48:985-993
2. Abbadie, C and Besson, JM. C – fos expression in rat lumbar spinal cord following peripheral stimulation in adjuvant – induced arthritic and normal rats. *Brain Research*.1993;607:195-204
3. Bernstein JE, Korman NJ, Bickers DR, Dahl MV, Millikan LE. Topical capsaicin treatment of chronic postherpetic neuralgia. *Journal of the American Academy of Dermatology*.1989;21:265-270
4. Carlton SM, Du J, Zhou S, Coggeshall RE. Tonic control of peripheral cutaneous nociceptors by somatostatin receptors. *Journal of Neuroscience*.2001;21:4042-4049
5. 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;389:816-824
6. Cholewinski A, Burgess GM and Bevan S. The role of calcium in capsaicin-induced desensitization in rat cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*.1993;55:1015
7. Chu CJ, Huang SM, De Petrocellis L, Bisogno T, Ewing SA, Miller JD, Zipkin RE, Daddario N, Appendino G, Di Marzo V, Walker JM. N – oleoyldopamine, a Novel Endogenous Capsaicin – like Lipid That Produces Hyperalgesia. *The Journal of Biological Chemistry*.2003;278(16):13633-13639
8. Deal CL, Schnitzer TJ, Lipstein E, Seibold JR, Stevens RM, Levy MD, Albert D, Renold F. Treatment of arthritis with topical capsaicin: a double-blind trial. *Clinical Therapeutics*.1991;13:383-395
9. Ferrer-Montiel A, Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Garcia-Sanz N, Fernandez-Carvajal A, Fernandez-Ballester G, Planells-Cases R. Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design. *European Journal of Biochemistry*.2004;271:1820-1826

10. Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Merino JM, Ferrer-Montiel A. Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *Journal of Biological Chemistry*.2000;275:32552-32558
11. Garzia-Martinez C, Humet M, Planells-Cases R, Gomis A, Caprini M, Viana F, De La Pena E, Sanchez-Baeza F, Carbonell T, De Felipe C, Perez-Paya E, Belmonte C, Messeguer A, Ferrer-Montiel A. Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*.2002;99:2374-2379
12. Gunthorpe MJ, Rami HK, Jerman JC, Smart D, Gill CH, Soffin EM, Luis Hannan S, Lappin SC, Egerton J, Smith GD, Worby A, Howett L, Owen D, Nasir S, Davies CH, Thompson M, Wyman PA, Randall AD, Davis JB. Identification and characterisation of SB-366791, a potent and selective vanilloid receptor (VR1/TRPV1) antagonist. *Neuropharmacology*. 2004;46(1):133-49. Erratum in: *Neuropharmacology*. 2004 May;46(6):905.
13. Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c – fos – like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*.1987;328:632-634
14. Jancso G, Kiraly E and Jancso-Gabor A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature*.1977;270:741-743
15. Jung J, Lee SY, Hwang SW, Cho H, Shin J, Kang YS, Kim S, Oh U. Agonist recognition sites in the cytosolic tails of vanilloid receptor 1. *Journal of Biological Chemistry*.2002;277:44448-44454
16. Kim K-J, Jeon BH, Kim WS, Park KR, Choi SJ. Effect of capsaicin on causalgiform pain in the rat. *Korean Journal of Physiology*.1992;26:143-150
17. Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I and Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK 506 complexes. *Cell*. 1991;66:807-815
18. Macrae, WA. Chronic pain after surgery. *British Journal of Anesthesia*.2001;87(1):88-98

19. Malmberg AB, Mizisin AP, Calcutt NA, von Stein T, Robbins WR, Bley KR. Reduced heat sensitivity and epidermal nerve fiber immunostaining following single applications of a high – concentration capsaicin patch. *Pain*.2004;111:360-367
20. Millan, MJ. The Induction of Pain. *Progress in Neurobiology*.1999;57:1-164
21. Mohapatra, DP and Nau, C. Regulation of Ca²⁺ dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*.2005;280:13424-13432
22. Nolano M, Simone DA, Wendelschafer-Crabb G, Johnson T, Hazen E, Kennedy WR. Topical capsaicin in humans: parallel loss of epidermal nerve fibers and pain sensation. *Pain*.1999;81:135-145
23. Paice JA, Ferrans CE, Lashley FR, Shott S, Vizgirda V, Pitrak D. Topical capsaicin in the management of HIV – associated peripheral neuropathy. *Journal of Pain Symptom Management*.2000;19:45-52
24. Perkins, MN and Campbell, EA. Capsazepine reversal of the analgesic action of capsaicin in vivo. *British Journal of Pharmacology*.1992;107:329-333
25. Sawynok, J. Topical and Peripherally Acting Analgesics. *Pharmacological reviews*.2003;55(1):1-20
26. Simone DA, Nolano M, Johnson T, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR. Intradermal Injection of Capsaicin in Humans Produces Degeneration and Subsequent Reinnervation of Epidermal Nerve Fibers: Correlation with sensory function. *The Journal of Neuroscience*.1998;18(21):8947-8959
27. Steen KH, Reeh PW, Kreysel HW. Dose-dependent competitive block by topical acetylsalicylic and salicylic acid of low pH-induced cutaneous pain. *Pain*.1996;64:71-82
28. Sun X, Yokoyama M, Mizobuchi S, Kaku R, Nakatsuka H, Takahashi T, Morita K. The effects of pretreatment with lidocaine or bupivacaine on the spatial and temporal expression of c – Fos protein in the spinal cord caused by plantar incision in the rat. *Anesthesia Analgesia*.2004;98:1093-1098

29. Szallasi A, Cortright DN, Blum CA and Eid SR. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nature Reviews*.2007;6:357-372
30. 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;21:531-543
31. Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V and Nilius B. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat- sensitive TRP channels. *Nature*.2004;430:748-754
32. Vyklíček L, Lyfenko A, Kuffler DP, Vlachova V. Vanilloid receptor TRPV1 is not activated by vanilloids applied intracellularly. *Neuroreport*.2003;14:1061-1065
33. Walker KM, Urban L, Medhurst SJ, Patel S, Panesar M, Fox AJ, McIntyre P. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther*.2003;304:56-62
34. Wang H, Kohno T, Amaya F, Brenner GJ, Ito N, Allchorne A, Ji RR, Woolf CJ. Bradykinin Produces Pain Hypersensitivity by Potentiating Spinal Cord Glutamatergic Synaptic Transmission. *The Journal of Neuroscience*.2005;25(35):7986-7992
35. Willis, WD and Coggeshall, RE. (1991) *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord*. 2nd edn. p. 595. Plenum Press, New York.
36. Winter J, Bevan S, Campbell EA. Capsaicin and pain mechanisms. *British Journal of Anesthesia*. 1995;75:157-168
37. Woolf, CJ. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: Implications for diagnosis and therapy. *Life Sciences*.2004;74:2605-2610
38. Woolf, CJ. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. *Annals of Internal Medicine*.2004;140:441-451
39. Yeats JC, Docherty RJ and Bevan S. Calcium-dependent and independent desensitization of capsaicin-evoked

response in voltage-clamped adult rat dorsal root ganglion (DRG) neurones in culture. *Journal of Physiology*.1992;446:390P

40. Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*.1999;400:452-457

8. Seznam vlastních publikací

1. Duarte AM, **Pospisilova E.** Reilly E, Mujenda F, Hamaya Y, Strichartz GR: Reduction of Postincisional Allodynia by Subcutaneous Bupivacaine. *Anesthesiology* 2005; 103: 113-25 IF 4,055
2. **Pospisilova E.** and Palecek J. Post-operative pain behavior in rats is reduced after single high-concentration capsaicin application. *Pain* 2006; 125: 233-43 IF=4.5

