

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

MUDr. Eva Pospíšilová

Praha, 2007

Poděkování

Děkuji svému školiteli, MUDr. Jiřímu Palečkovi, CSc., za odborné vedení mojí vědecké práce na oddělení Funkční morfologie, za jeho cenné rady a připomínky při sledování experimentálních cílů, a obětavou pomoc.

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 Akademie věd České republiky
Oddělení Funkční morfologie
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4 – Krč

Oborová rada: Fyziologie a patologická fyziologie člověka

Školitel: MUDr. Jiří Paleček, CSc.

Fyziologický ústav Akademie věd České republiky
Oddělení Funkční morfologie
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4 – Krč

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Stanislav Trojan, DrSc.

Fyziologický ústav
Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta
Albertov 5
128 00 Praha 2

Obsah

1. Úvod	10
1.1. Bolest jako senzorický vjem	11
1.1.1. Obecné mechanismy vnímání bolesti.....	11
1.2. Mechanismy vzniku patologických bolestivých stavů	20
1.2.1. Periferní senzitivace.....	20
1.2.2. Centrální senzitivace.....	22
1.2.3. C – Fos jako neuronální marker nocicepce.....	24
1.3. Bolest chirurgického původu	26
1.3.1. Možnosti léčby pooperační bolesti.....	27
1.3.2. Analgetika působící na periférii a jejich klinický význam.....	28
1.3.3. Přehled analgetik působících na periférii.....	29
1.4. Vaniloidní TRPV1 receptor a jeho úloha v nocicepci	37
1.4.1. Účinky kapsaicinu na senzorické neurony.....	37
1.4.2. Vaniloidní receptory a jejich charakteristika.....	39
1.4.3. TRPV1 je polymodální detektor bolestivých fyzikálních a chemických podnětů.....	42
1.4.4. Genetická analýza funkce TRPV1 receptoru.....	45
1.5. Účinky kapsaicinu a experimentální studie na zvířatech in vivo...	45
1.5.1. Akutní bolest.....	46
1.5.2. Bolest spojená se zánětem.....	47
1.5.3. Neuropatická bolest.....	47
1.6. Účinky kapsaicinu a klinické studie na lidech	48
1.6.1. Lokální aplikace kapsaicinu.....	48
1.6.2. Bolest spojená se zánětem.....	49
1.6.3. Neuropatická bolest.....	50
1.6.4. Některé další klinické indikace.....	52
1.7. Shrnutí	54
2. Hypotézy a cíle studie	56
2.1. Účinky lokálních anestetik na bolest chirurgického původu	56
2.2. Účinky lokálně aplikovaného kapsaicinu ve vysoké koncentraci na bolest chirurgického původu	56
2.3. Senzitivace míšních neuronů chirurgickou incízí a její ovlivnění lokálně aplikovaným kapsaicinem ve vysoké koncentraci	56
2.4. Úloha periferních a centrálních TRPV1 receptorů v mechanismech nocicepce u bolesti chirurgického původu	57
2.5. Úloha centrálních TRPV1 receptorů v nocicepci, mechanismy jejich aktivace a senzitivace	57

3. Metody	59
3.1. Behaviorální metody	59
3.1.1. Testování citlivosti zvířat na mechanické podněty.....	59
3.1.2. Testování citlivosti zvířat na tepelné podněty.....	59
3.2. Chirurgické procedury	60
3.2.1. Intradermální injekce.....	60
3.2.2. Plantární incise.....	60
3.2.3. Implantace intratekálního katétru.....	60
3.2.4. Retrográdní značení spinothalamických neuronů (STT) a postsynaptických neuronů zadních provazců (PSDC).....	61
3.3. Imunohistochemie	62
3.4. Pilotní studie	62
3.4.1. Účinek lokálně aplikovaného bupivakainu na pooperační mechanickou alodynii a hyperalgézii.....	63
3.5. Experiment 1	63
3.5.1. Testování účinku lokálně aplikovaného kapsaicinu na pooperační mechanickou alodynii a mechanickou a tepelnou hyperalgézii.....	63
3.6. Experiment 2	64
3.6.1. Ovlivnění exprese c-Fos chirurgickou incisí pomocí lokálně aplikovaného kapsaicinu.....	64
3.7. Experiment 3	64
3.7.1. Zjišťování úlohy periferních a centrálních TRPV1 receptorů v rozvoji pooperační mechanické alodynii a mechanické a tepelné hyperalgie.....	64
3.8. Experiment 4	65
3.8.1. Mechanismus aktivace centrálních TRPV1 receptorů endogenními agonisty.....	65
3.9. Analýza a statistické zpracování dat	65
3.9.1. Behaviorální testování odpovědí zvířat na mechanické a tepelné podněty.....	65
3.9.2. Imunohistochemie, retrográdní značení STT a PSDC neuronů a exprese c-Fos v neuronech lumbální míchy.....	66
4. Výsledky	68
4.1. Ovlivnění pooperační mechanické alodynii účinkem lokálně aplikovaného bupivakainu	68
4.1.1. Účinek jednorázově aplikované dávky lokálního anestetika na pooperační změny odpovědí zvířat na mechanické podněty.....	68
4.2. Účinek lokálně aplikovaného kapsaicinu ve vysoké koncentraci na behaviorální odpovědi zvířat na mechanické a tepelné podněty	73

4.2.1. Účinek jednorázové lokálně aplikované dávky kapsaicinu ve vysoké koncentraci na pooperační změny odpovědi zvířat na mechanické podněty.....	73
4.2.2. Účinek jednorázové lokálně aplikované dávky kapsaicinu ve vysoké koncentraci na pooperační změny odpovědi zvířat na tepelné podněty.....	81
4.3. Aktivace míšních neuronů chirurgickou incizí a její ovlivnění lokálně aplikovaným kapsaicinem ve vysoké koncentraci.....	84
4.3.1. Exprese c-Fos v neuronech zadních rohů lumbální míchy po plantární incizi.....	84
4.3.2. Exprese c-Fos v neuronech zadních rohů lumbální míchy po intradermální injekci kapsaicinu.....	86
4.3.3. Exprese c-Fos v jádrech retrográdně označených STT neuronů v zadních rozích lumbální míchy po provedení plantární incise.....	86
4.3.4. Exprese c-Fos v jádrech retrográdně označených PSDC neuronů v zadních rozích lumbální míchy po provedení plantární incise.....	88
4.4. Úloha periferních a centrálních TRPV1 receptorů v rozvoji pooperační mechanické alodynie a mechanické a tepelné hyperalgie.....	90
4.4.1. Účinek specifického antagonisty (SB 366791) TRPV1 receptorů na pooperační tepelnou hyperalgi.....	90
4.4.2. Účinek intratekálně aplikovaného 100 μ M TRPV1 antagonisty SB 366791 na pooperační citlivost na mechanické podněty.....	93
4.4.3. Účinek intratekálně aplikovaného 10 μ M TRPV1 antagonisty SB 366791 na pooperační citlivost na mechanické podněty.....	95
4.4.4. Účinek intradermálně aplikovaného 100 μ M TRPV1 antagonisty SB 366791 na pooperační citlivost na mechanické podněty.....	97
4.4.5. Ovlivnění citlivosti na mechanické podněty různých intenzit aplikovaných na intaktní kůži planty pedis účinkem TRPV1 antagonisty SB 366791.....	99
4.5. Úloha centrálních TRPV1 receptorů v nocicepci, možné mechanismy jejich aktivace a senzitivace.....	101
4.5.1. Ovlivnění citlivosti na tepelné a mechanické podněty různých intenzit aplikované na intaktní kůži planty pedis účinkem intratekálně podaného endogenního TRPV1 agonisty (OLDA).....	101
4.5.2. Ovlivnění citlivosti na tepelné a mechanické podněty různých intenzit aplikované na intaktní kůži planty pedis účinkem intratekálně podaného bradykininu.....	105
4.5.3. Ovlivnění citlivosti na tepelné a mechanické podněty různých intenzit aplikované na intaktní kůži planty pedis účinkem současné intratekální aplikace bradykininu a OLDA.....	107
4.5.4. Ovlivnění citlivosti na tepelné a mechanické podněty aplikované na intaktní kůži planty pedis po intratekální injekci 100 μ M roztoku TRPV1 antagonisty následované současnou intratekální aplikací roztoků bradykininu a OLDA.....	110
5. Diskuse.....	115
5.1. Celkový přehled výsledků.....	115
5.2. Účinky lokálních anestetik na bolest chirurgického původu.....	116
5.3. Účinky lokálně aplikovaného kapsaicinu ve vysoké koncentraci na bolest chirurgického původu.....	117

5.4. Senzitizace míšních neuronů chirurgickou incisí a její ovlivnění lokálně aplikovaným kapsaicinem ve vysoké koncentraci	119
5.5. Úloha periferních a centrálních TRPV1 receptorů v mechanismech nocicepce u bolesti chirurgického původu	123
5.6. Úloha centrálních TRPV1 receptorů v nocicepci, mechanismy jejich aktivace a senzitizace	128
6. Závěr	134
7. Shrnutí	138
8. Summary	139
9. Seznam literatury	140
10. Seznam vlastních publikací	160

Seznam zkratek

AC	adenylyl cykláza
ACh	acetylcholin
AMPA	DL- α -NH ₂ -2,3-dihydro-5-methyl-3-oxo-4-isoxazolpropanová kyselina
ANOVA	analysis of variance (analýza rozptylu)
Arg	arginin
ASIC	acid sensing ion channel
Asp	aspartát
ATP	adenosin trifosfát
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
CaMKII	Ca ²⁺ /kalmodulin-dependentní proteinkináza
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CB	cannabinoid (kanabinoidní)
CCK	cholecystokinin
cGMP	cyklický guanosin monofosfát
CGRP	calcitonin gene related peptide
CNS	centrální nervový systém
COX	cyklooxygenáza
CRE	cAMP-response element
CREB	cAMP-response-element-binding-protein
CTMR	cutaneus trunci muscle reflex
DAG	diacylglycerol
DMSO	dimethylsulfoxid
DRG	dorsal root ganglion (spinální ganglion)
DYN	dynorphin
EAA	excitační aminokyseliny
EPSP	excitační postsynaptické proudy
ERK	extracellular signal regulated kinase (kináza regulovaná extracelulárním signálem)
EXIN	excitační intrasegmentální neuron
GABA	kyselina γ -amino-máselná
GAP	glial acidic protein
GDNF	glial cell derived nerve growth factor (gliální neurální růstový faktor)
Glu	glutamát
HIV	human immunodeficiency virus (virus lidského imunodeficitu)
CHE	cholinesteráza
IB4	isolektin B4
IL-1 β	interleukin 1 β
IN	intrasegmentální neuron
ININ	inhibiční intrasegmentální neuron
IP ₃	inositol trifosfát
KA	kainát
LTP	long term potentiation (dlouhodobá potenciace)
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
Met	methionin
mGlu	metabotropní glutamátový
NA	noradrenalin
NADA	N - arachidonoyldopamin
NGF	nerve growth factor (neurotrofní růstový faktor)

NK	neurokinin
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NO	oxid dusnatý
NS	nociceptivní specifický
NSAID	nesteroidní antiflogistika
OLDA	N - oleoyldopamin
PAG	periaqueductal grey (periaqueduktální šed')
PALDA	N - palmitoyldopamin
PBN	nucleus parabrachialis
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PG	prostaglandiny
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PGP	protein gene product
PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PK	proteinkináza
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PLC	fosfolipáza C
PN	projekční neuron
PSDC	postsynaptic dorsal column
SB 366791	N-(3-methoxyfenyl)-4-chlorocinnamid (antagonista TRPV1 receptorů)
Ser	serin
SP	substance P
STEARDA	N - stearyldopamin
STT	tractus spinothalamicus
Thr	threonin
TRP	transient receptor potential
Tyr	tyrosin
VGSCs	voltage gated sodium channels (napětově řízené sodíkové kanály)
VMpo	nucleus ventromedialis
VPI	nucleus ventroposteroinferior
VPL	nucleus posterolateralis
VPM	nucleus posteromedialis
VR	vaniloidní receptor
VRL	vanilloid receptor like
WDR	wide dynamic range
5-HT	5-hydroxy-tryptamin

1. Úvod

Bolest je senzorká zkušenost, subjektivně nepříjemně vnímaná. Může se lišit svojí intenzitou, kvalitou, lokalizací nebo dobou trvání. Je to senzorký vjem, který má silnou kognitivní a emoční složku, je spojený s behaviorálními stereotypy vedoucími k vyhýbání se bolestivému podnětu a rovněž s vegetativní odezvou. Ačkoliv je bolest považována za jedinou senzorkou modalitu, existuje několik různých typů bolesti.

Akutní (tzv. fyziologická) bolest způsobená přímou aktivací nociceptoru bolestivým podnětem je vedena specifickým senzorkým nociceptivním systémem z periferie přes míchu, mozkový kmen a thalamus do kortikolimbických center mozku. Mezi iniciální expozicí podnětu a finálním kortikálním vjemem leží velmi komplexní a interaktivní série mechanismů, kdy je stimulus nejprve zakódován prostřednictvím nervových impulsů, přenášen jako senzorká informace a zpracováván ve vyšších nervových centrech. Informace může být různými způsoby modulována, a to jednak v periférii, v zadním rohu míchy, ale i v supraspinálních centrech jako je thalamus nebo samotná kortikolimbická centra, tedy na všech úrovních nociceptivního systému. Tento systém je „varovným zařízením“ organismu registrujícím vnější podněty, které mohou způsobit jeho poškození, fyziologickou funkcí akutní bolesti je včasné varování organismu před možným ohrožením těmito podněty. Ztráta této protektivní funkce nociceptivního systému může mít za následek vznik mnohočetných tkáňových poškození a vést tak k ohrožení integrity organismu.

Jestliže je působící stimulus natolik intenzivní, že způsobí tkáňové poranění (mechanické, tepelné, chemické, atd.), může se po iniciální fázi akutní bolesti rozvinout bolest chronická, která přetrvává i po skončení působení vnějšího inzultu. Zdrojem nociceptivních podnětů se v tomto případě stává poraněná tkáň. Chronická bolest může vzniknout v případě tkáňového poškození zánětem, může být rovněž jedním ze symptomů onemocnění periferního nebo centrálního nervového systému. Ve všech těchto případech 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 dále vést až k rozvoji patologických bolestivých stavů jako je hyperalgie, tj. zesílené vnímání bolestivých podnětů, alodynie, tj. bolestivé vnímání podnětů normálně nebolestivých, a spontánní bolest. Chronická bolest a patologické bolestivé stavy přetrvávají dlouhodobě i po zhojení tkáňového traumatu, které periferní a centrální senzitivizaci nociceptivního systému primárně vyvolalo. Jejich podstatou jsou změny nociceptivního systému způsobené mechanismy senzitivizace. (321)

Mechanické tkáňové poranění operačním zákrokem aktivuje velké množství periferních nociceptorů a způsobí v první fázi akutní „fyziologickou“ bolest, která je pacienty vnímána bezprostředně po operaci. Zároveň je však jednou z možných příčin vzniku chronické bolesti nebo patologických bolestivých stavů. Tato chronická pooperační bolest dosahuje často značné intenzity, může být příčinou zvýšené pooperační morbidity, fyzické invalidity, stresu a úzkosti a je v mnoha případech velmi obtížně terapeuticky ovlivnitelná. Ve farmakologickém přístupu k ovlivnění pooperační bolesti jsou používána běžná analgetika jako nesteroidní antiflogistika (NSAID), slabší opiátové preparáty (tramadol, aj.), případně klasické opiáty, nebo kombinace těchto farmak. NSAID i opiáty však vykazují při systémovém podávání celou řadu závažných vedlejších nežádoucích účinků, které jsou pro účinný terapeutický zásah limitující. Alternativním přístupem v léčbě bolesti je tudíž lokální aplikace analgeticky působících léčiv na periferní tkáň, přímo do místa původu bolesti.

V senzorkém přenosu nociceptivní informace hraje mezi transdukčními molekulami klíčovou úlohu TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) receptor, který je exprimován na membránách převážně většiny primárních aferentních nervových vláken s nociceptivní

charakteristikou, tj. nemyelinizovaných a slabě myelinizovaných. Protože je TRPV1 aktivován nejen chemickými látkami, jako jsou kapsaicin, extracelulární acidosa a různé algogenní mediátory lipidové povahy vznikající v místě poranění nebo zánětu, ale také zvýšením okolní teploty nad 43°C, slouží TRPV1 jako molekulární integrátor fyzikálních a chemických bolestivých podnětů. Navíc podléhá TRPV1 kanál významnou měrou modulaci v prostředí zánětu nebo poranění pod vlivem působení tkáňových mediátorů, přispívá tudíž významně 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. Tento receptor je jednou z klíčových bran pro přenos bolesti a molekuly ovlivňující jeho funkci jsou v popředí zájmu při snaze ovlivnit vnímání bolesti.

Předmětem této studie jsou neurální mechanismy nocicepce a vzniku patologických bolestivých stavů. Studie je zaměřena především na bolest chirurgického původu, tedy stav, kdy je primárním nociceptivním podnětem operační zákrok. Protože je mechanické tkáňové poranění chirurgickým zákrokem častou příčinou rozvoje chronické bolesti i patologických bolestivých stavů, bylo cílem této práce blíže objasnit neurální mechanismy jejich vzniku. Pooperační bolest je stále obtížně řešitelným problémem klinické medicíny, tato studie představuje některé z možných způsobů jejího ovlivnění farmaky. Protože hraje TRPV1 receptor klíčovou úlohu v transdukcii nociceptivní informace a v senzitivaci nociceptoru v důsledku poranění, bylo hlavním úkolem této práce ověřit úlohu právě TRPV1 receptorů v přenosu bolesti způsobené chirurgickým zákrokem a případnou možnost léčby tohoto druhu bolesti jejich farmakologickým ovlivněním. Systémová analgetická terapie je zatížena celou řadou nežádoucích účinků. TRPV1 receptory jsou však exprimovány na periferních zakončeních primárních aferentních neuronů, a tudíž vhodným cílem pro lokálně aplikovatelná farmaka. Přítomnost TRPV1 kanálů byla také prokázána na centrálních výběžcích aferentních neuronů, jejich funkce v této lokalizaci však není dosud plně objasněna. Část této studie je proto zaměřena na tyto centrální TRPV1 kanály a jejich funkci v nocicepci, možné mechanismy jejich aktivace a senzitivace. Identifikace cílových struktur pro periferně působící analgetika a vývoj analgetických preparátů k topické nebo lokální aplikaci jsou velmi užitečným terapeutickým přístupem. Vzhledem k nižšímu výskytu systémových nežádoucích účinků a lékových interakcí představují topické i lokální lékové formy analgetik k léčbě akutních i chronických bolestivých stavů velmi slibnou cestu. Účinná pooperační analgésie má velký význam pro celkový pooperační vývoj pacientova stavu.

1.1. Bolest jako sensorický vjem

1.1.1. Obecné mechanismy vnímání bolesti

Příjem, kódování a přenos bolestivé informace z primárních aferentních vláken do zadních rohů míchy. Periferní kožní nociceptory jsou volná zakončení polymodálních sensorických neuronů zasahující až do povrchových vrstev epidermis. Odpovídají na širokou škálu fyzikálních a chemických podnětů, ale pouze vysoké intenzity. Tato primární aferentní vlákna mohou být rozdělena do třech skupin podle průměru, struktury a rychlosti vedení vzruchu. C-vlákna jsou tenká, nemyelinizovaná, pomalu vedoucí (0,5 – 2 m/s), A δ -vlákna středně silná, myelinizovaná, vedoucí středně rychle (12 – 30 m/s) a A β -vlákna jsou silná, myelinizovaná, rychle vedoucí nervová vlákna (30 – 100 m/s). Všechny tři typy kožních primárních aferentních vláken mohou přenášet sensorické informace různých modalit, avšak pouze C a A δ -vlákna vedou za fyziologických podmínek nociceptivní vzruch. A β -vlákna odpovídají pouze na dotyk, vibrace, tlak a jiné mechanické podněty slabé intenzity. Po expozici nociceptivnímu podnětu tepelné, mechanické nebo chemické povahy je nejprve

vyvolána první fáze vjemu, tzv. rychlá bolest, za kterou jsou zodpovědná rychle vedoucí A δ -vlákna. Druhá fáze, vlna pomalé, tupé bolesti je způsobena pomalu vedoucími C-vláčky. (19)

V rámci skupiny A δ -vláček rozlišujeme dále dva podtypy. Typ I A δ -vláček je aktivován mechanickými podněty vysoké intenzity, k podnětům tepelným a chemickým je tento typ vláček málo citlivý. Opakovaná tepelná stimulace nebo tkáňové poranění může tato vlákna k termálním podnětům senzitivizovat, a ta se pak stávají termosenzitivními. (122) V porovnání s typem I má typ II A δ -vláček pro tepelné podněty nižší práh. C-vláčky jsou chemoreceptory, termoreceptory a zároveň nízkoprahové mechanoreceptory. Opakovaná stimulace C-vláček termálními podněty vede na rozdíl od A δ -vláček typu I ke snížení jejich senzitivity k těmto podnětům. (203, 286) Tzv. „tiché“ neboli „spící“ nociceptory patří do skupiny C a neodpovídají za fyziologických podmínek na akutní bolestivé podněty. V podmínkách zánětu nebo tkáňového poškození jsou však senzitivizovány a aktivovány řadou chemických mediátorů, což významně přispívá do prostorové i časové sumace signalizace z periferie. Zvyšuje se tak aferentace C-vláčky do zadního rohu míchy, která dále přispívá senzitivizaci míšních neuronů.

Tepelnými podněty je aktivováno asi 45% tenkých až středně silných nociceptivních vláček. Prahový podnět pro aktivaci jedné skupiny z nich je přibližně 45 °C (odpovídá C a A δ -vláčkům typu II), 5 – 10% vláček tohoto typu má práh pro tepelný podnět 52°C (A δ -vlákna typu I). Za příjem a detekci tepelného podnětu nad 43 °C je zodpovědný v první řadě TRPV1 receptor (dřív VR1), polymodální receptor aktivovaný rovněž kapsaicinem a dalšími vaniloidními chemickými látkami. Dále se na detekci tepelných podnětů podílí TRPV2 receptor, který je z 50% identický s TRPV1 a je aktivován tepelným podnětem nad 52°C, TRPV3 receptor aktivovaný při teplotách překračujících hodnoty 33 °C a osmoreceptor TRPV4 odpovídající na teploty nad 24°C. Za aktivaci A δ -vláček typu I tepelným podnětem je zodpovědný pravděpodobně VRL-1 iontový kanál (vanilloid receptor-like), který má z 50% stejnou aminokyselinovou sekvenci jako TRPV1 a je aktivovaný tepelnými podněty nad 52°C. Chladový podnět kolem 4°C vyvolá odpověď u 10-15% aferentních vláček, na 0°C a nižší teploty pak reaguje převážná většina C a A δ -vláček. Mechanismus aktivace nociceptoru bolestivým chladovým podnětem není zcela objasněn, za detekci tohoto stimulu je zodpovědný TRPM8 receptor exprimovaný na aferentních vláknech. V detekci mechanických podnětů nociceptivními vláčky se například uplatňují kanály MDEG (neboli BCN1) ze skupiny degenerinových iontových kanálů nebo ASIC2 (acid-sensing ion channel), svůj význam v mechanocepci má i osmoreceptor TRPV4. Mechanická stimulace způsobuje rovněž uvolnění ATP z neuronu, a protože exprimují nociceptivní neurony ATP purinergní P_{2X} a P_{2Y} receptory spřažené s G-proteiny, může ATP autokrinním nebo parakrinním mechanismem aktivovat tyto receptory na membráně nociceptoru, a ty se pak mohou podílet na detekci mechanického podnětu. (150)

Odpověď nociceptorů je závislá na intenzitě působícího bolestivého podnětu a díky uspořádání receptivních polí a zejména jejich překrývání jsou nociceptory schopny kódovat i informaci týkající se prostorové lokalizace působícího podnětu. Jediný vzruch šířící se po jednom nociceptivním vláčkě není většinou vnímán jako bolestivý. Vlastní práh bolesti organismu je vyšší, než práh aktivace individuálních nociceptorů, a proto je zřejmé, že je pro vznik vjemu bolesti nezbytné působení mechanismů časové i prostorové sumace.

Buňky spinálních ganglií a jejich výběžky. Primární aferentní vlákna jsou nedílnou součástí spinálních sensorických mechanismů, neboť jejich prostřednictvím jsou sensorické informace přijímané na periférii přenášeny do míchy. Somata jejich neuronů jsou umístěna ve spinálních gangliích (případně gangliích hlavových nervů) a nazývají se tudíž neurony spinálních ganglií (DRG). Z morfologického hlediska jsou tyto buňky unipolární, někdy nazývané pseudounipolárními. Vyuvíjejí se totiž nejprve jako bipolární, jejich hlavní výběžek

se rozdělí až během vývoje na periferní a centrální část. Centrální výběžky probíhají zadními kořeny do míchy a nazývají se axony zadních kořenů.

Buňky spinálních ganglií mají některé společné charakteristiky, jako je například lokalizace jejich somat nebo podobná topografická organizaci výběžků. Mají i společnou funkci, kterou je příjem podnětu z vnějšího prostředí a následná transmise výsledné sensorické informace centrálně. Nicméně, je možné rozlišit různé typy buněk spinálních ganglií, a to z několika hledisek. Z cytologického hlediska rozlišujeme dvě kategorie, a to malé tmavé a velké světlé buňky spinálních ganglií. Tento rozdíl je daný přítomností velkého množství neurofilament ve světlých buňkách, které se špatně barví běžnými histologickými barvivami. V malých buňkách je těchto neurofilament obsaženo podstatně méně, barví se tudíž intenzivněji a jeví se jako tmavé. Podle rychlosti vedení vzruchu periferními axony těchto buněk rozlišujeme kategorie A β , A δ a C (viz. výše). Z velkých světlých buněk vystupují A β – vlákna, z malých tmavých C – vlákna, z obou typů buněk pak odstupují vlákna patřící do skupiny A δ . Z elektrofyziologického hlediska existují mezi buňkami spinálních ganglií rozdíly v šířce a tvaru akčního potenciálu. Vysokoprahové nociceptivní neurony spinálních ganglií mají širší akční potenciál s výraznou hyperpolarizací, zatímco akční potenciály neuronů neúčastnících se nocicepce jsou úzké bez větší následné hyperpolarizace. Podle neurochemických charakteristik rozlišujeme v rámci malých tmavých buněk spinálních ganglií dvě podskupiny. Neurony první subpopulace obsahují peptidy jako CGRP (calcitonin gene related peptide) a SP (substance P), jsou vývojově závislé na NGF (nerve derived growth factor), exprimují na svých membránách tyrosinkinázový receptor trkA pro NGF a projikují svými výběžky do lamina I - II₀ zadního rohu míchy. Druhá subpopulace je definována přítomností lektinu (IB-4), dále BDNF (brain derived nerve growth factor) a expresí receptoru pro ATP P_{2X3} na svých periferních zakončeních. Je závislá na růstovém faktoru GDNF (glial cell derived nerve growth factor) a projikuje svými výběžky do lamina II₁ míchy. (196, 313)

Na somatech neuronů spinálních ganglií byla elektronmikroskopicky prokázána také přítomnost synaptických zakončení. Existují nervová vlákna vstupující do ganglií, která svými zakončeními kontaktují buňky spinálních ganglií a vytváří v jejich bezprostředním okolí pericelulární košíky. Většina z nich je adrenergních, některá obsahují peptidy jako SP nebo CGRP. Mají tudíž původ v neuronech sympatiku nebo sensorického systému.

Periferní i centrální výběžky neuronů spinálních ganglií se mohou větvit, a to většinou v nejbližším okolí ganglia. Důkazem tohoto větvení je fakt, že je možné zaznamenat elektrickou aktivitu na jedné buňce spinálního ganglia při stimulaci různých nervů nebo orgánů. Počet takto odstupujících větví z výběžku neuronu spinálního ganglia je však většinou malý.

Určitá malá část aferentních vláken je připojena také ventrálními míšními kořeny, experimentální stimulace ventrálních kořenů vyvolává bolestivý vjem stejně jako stimulace míšních kořenů dorsálních. Jen velmi malá část z nich však cestou ventrálních kořenů vstupuje do míchy, tato malá skupinka vláken vstupuje přímo do zadního rohu nebo do intermediolaterálního míšního provazce. Většina aferentních vláken probíhajících ventrálními míšními kořeny zde slepě končí nebo se kličkovitě stáčí do zadních kořenů. Sensorická informace, kterou převážná většina aferentních vláken ventrálních kořenů přenáší, se tedy do vyšších center dostává rovněž prostřednictvím kořenů zadních. (313)

Úloha neurotransmiterů a neuromodulátorů v přenosu nociceptivní informace primárními aferentními vlákny do zadních rohů míchy. Po chemické stránce se primární aferentní vlákna liší kvantitativně i kvalitativně. Existují rozdíly v syntéze a produkci neurotransmiterů a modulátorů v nociceptorech mezi různými tkáněmi, za fyziologických podmínek versus v prostředí tkáňového poranění nebo zánětu, a rovněž mezi jednotlivými typy primárních aferentních vláken. Neurochemické rozdíly byly zjištěny i mezi nociceptory v rámci jednoho

typu nociceptivních vláken. Nejdůležitějšími neurotransmitery podílejícími se na centrálním přenosu nociceptivní informace z primárních aferentních neuronů na neurony zadních rohů míchy jsou excitační aminokyseliny (glutamát, aspartát), neuropeptidy jako SP a CGRP.

Excitační aminokyseliny (EAA) glutamát a aspartát působí na ionotropních receptorech (spojených přímo s kationtovým kanálem) a na metabotropních (mGlu) receptorech spřažených s G-proteiny. Mezi ionotropní receptory uplatňující se v přenosu bolestivého vzruchu na neurony zadních rohů míchy patří AMPA, NMDA a kainátové receptory. NMDA receptory se skládají z heteromultimerních podjednotek, podle podjednotkového složení rozlišujeme několik tříd NMDA receptorů. Jejich zastoupení je různé na různých místech CNS, přičemž v zadních rozích míchy je dominantní NMDA NR1 podjednotka. NMDA receptory mají pomalou kinetiku, napětově závislý blok Mg^{2+} a výraznou propustnost pro vápník. Nesou modulační vazebné místo pro glycin, jehož obsazení je esenciální pro funkci spřaženého iontového kanálu. NMDA receptory jsou přítomny jak postsynapticky na neuronech zadních rohů míchy, tak presynapticky na centrálních výběžcích buněk spinálních ganglií. Kromě přímých postsynaptických účinků mohou tedy EAA aktivovat zpětně i presynaptické NMDA receptory, tím dále zvyšovat prostřednictvím pozitivní zpětné vazby presynaptické uvolňování EAA a dále zesilovat synaptickou transmissi. AMPA receptory jsou rovněž složeny z několika podjednotek, z nichž Glu R-B (neboli Glu R2) doména hraje klíčovou roli pro jejich propustnost pro vápník a vodivost. Vodivost AMPA receptorů lokalizovaných v zadních rozích míchy je dána převážně permeabilitou pro Na^+ , ne pro Ca^{2+} , AMPA receptory jsou méně závislé na napětí a mají rychlou kinetiku. Mají nízkou afinitu ke glutamátu a po stimulaci rapidně desenzitizují. Nesou rovněž několik allosterických vazebných míst, jejich obsazení však není obligatorní pro aktivaci spřaženého iontového kanálu. Kainátové ionotropní receptory mají podobné funkční vlastnosti jako AMPA. Přítomnost AMPA a kainátových receptorů na centrálních výběžcích neuronů spinálních ganglií nebyla spolehlivě prokázána. (64, 99)

Podle farmakologických vlastností a spojení s intracelulárními signálními mechanismy rozlišujeme tři hlavní skupiny mGlu receptorů a nejméně osm subtypů. Skupina I mGlu receptorů je zastoupena především v zadním rohu míchy a je prostřednictvím G-proteinu pozitivně spřažena s aktivitou fosfolipázy C (PLC) a NO-syntázy, skupiny II a III mGlu receptorů jsou negativně spřaženy s aktivitou AC. Specifické typy mGlu receptorů tedy různým způsobem ovlivňují neuronální aktivitu, a to prostřednictvím regulace intracelulární koncentrace kalcia nebo regulace aktivity některých intracelulárních signálních mechanismů včetně proteinkináz (PK), které ovlivňují neuronální excitabilitu funkční regulací (fosforylací) membránových receptorů, iontových kanálů a transkripce genů. Aktivace různých podtypů mGlu receptorů lokalizovaných presynapticky na centrálních zakončeních nociceptorů může tedy buď zpětně inhibovat, nebo zesilovat presynaptické uvolňování mediátorů, v závislosti na intracelulárním signálním mechanismu, na který je daný receptor napojen. I a III skupina mGlu receptorů je převážně inhibiční v důsledku inhibice vtoku Ca^{2+} a zvýšení permeability pro K^+ , II skupina je excitační. (65)

Pronociceptivní tachykininy SP a neurokinin A (NK A) působí na NK1 a NK2 receptory, jejichž aktivace je spřažena s aktivitou fosfolipázy PLC. (21) SP stejně jako EAA nevykazuje pouze přímé postsynaptické účinky na neurony zadních rohů míchy, mechanismem zpětné aktivace presynaptických NK1 receptorů a následné pozitivní zpětné vazby může zvyšovat své vlastní uvolňování z presynaptických zakončení. Navíc, SP i EAA mohou potencovat své vlastní uvolňování i nepřímo, prostřednictvím signálních molekul z postsynaptických neuronů působících retrogradně na presynaptická zakončení neuronů spinálních ganglií (např. NO). Neuropeptid CGRP existuje ve dvou izoformách (α a β) a působí na své specifické receptory CGRP 1 a CGRP 2 napojené na aktivaci adenylylcyklázy (AC). (31)

Při transmisi nociceptivní informace depolarizují EAA, tachykininy a CGRP synergicky neurony zadních rohů míchy. Iniciálním spouštěčem je pravděpodobně aktivace AMPA receptorů, které mají rychlou kinetiku a jejich stimulace způsobí rapidní depolarizaci. Následuje zapojení NMDA, mGlu skupiny I, NK 1, NK 2, CGRP a řady dalších receptorů, jejichž kinetika je mnohem pomalejší. (215)

Spinální projekce primárních aferentních nociceptivních neuronů. Kožní nociceptivní C-vlákna vstupují zejména do lamina II₀ (vnější části lamina II) a lamina I zadního rohu míchy, částečně pak do lamina V a X. Vysokoprahová A δ -vlákna terminují převážně v lamina I, z menší části v lamina II₀ i lamina X. A β -vlákna se větví v lamina III a IV, v menší míře potom v lamina V a VI, neinervují laminu II₀. Do jednotlivých zadních rohů přichází aferentace z různých zdrojů a mezi aferentními nociceptivními vlákny z různých tkání dochází ve významné míře ke konvergenci. (206)

V zadních rozích míchy rozlišujeme tři hlavní typy neuronů. Prvním typem jsou nociceptivní specifické neurony (NS), které jsou aktivovány výhradně intenzivními bolestivými podněty vedenými C a A δ -vlákny. Nachází se zejména v lamina I a II₀, ale také např. v lamina V a VI. Druhým typem jsou multireceptorové neboli „wide-dynamic range“ (WDR) neurony, na kterých dochází k významné konvergenci aferentace z kožních, svalových a viscerálních nociceptorů. Vytvářejí dynamickou odpověď na širokou škálu podnětů a vykazují výraznou závislost velikosti jejich odpovědi na intenzitě stimulu, od nebolestivého až po bolestivý. Nachází se většinou v lamina V, rovněž i v lamina IV a VI, v malé míře v lamina I, II₀ a X a jsou excitovány tepelnými, mechanickými i chemickými podněty z C, A δ i A β -vláken. Třetím typem jsou neurony, které nejsou přímou součástí nociceptivní nervové dráhy (NON-N), nacházející se v lamina II, III a IV, částečně i v lamina I. Každý neuron dorsálního rohu má své receptivní pole, při současné stimulaci několika primárních aferentních vláken v rámci tohoto receptivního pole se uplatní mechanismy sumace. (53, 88, 312)

Neurony zadních rohů míchy mohou být dále klasifikovány podle cíle inervace. Rozlišujeme supraspinální tj. projekční neurony (PN), dále propriospinální intersegmentální neurony a intrasegmentální neurony inter- a intralaminární (IN). Primárními nociceptivními aferenty jsou aktivovány PN i IN. PN přenášející nociceptivní informaci supraspinálně se nacházejí zejména v lamina I a V, VI, částečně v lamina II a X. Propriospinální neurony hrají v míše integrační roli v komunikaci mezi jednotlivými segmenty a mezi ipsilaterálním a kontralaterálním zadním rohem. IN, zejména v lamina II, se podílí na intra- a interlaminárním přenosu, modulaci a integraci nociceptivní informace. Rozlišujeme excitační IN (EXIN) a inhibiční IN (ININ). (312)

PN (NS i WDR) v superficiálních laminách zadních rohů jsou aktivovány přímo (monosynapticky) A δ - (lamina I) a C-vlákny (lamina II₀), nebo nepřímo (polysynapticky) prostřednictvím EXIN v lamina II₀ napojených na nociceptivní specifické PN v lamina I. Rovněž některé PN (NS i WDR) v hlubších laminách (např. lamina V) jsou přímo napojeny na nociceptivní C-vlákna, většina PN v hlubších laminách je však polysynapticky aktivována C-vlákny prostřednictvím EXIN. (31, 64, 88) ININ regulují nocicepci přímým synaptickým spojením s PN (NS i WDR) i s primárními nociceptory. Toto uspořádání umožňuje pre- i postsynaptický mechanismus inhibice bolestivé aferentace z primárních nociceptivních vláken. Z neurochemického hlediska bylo identifikováno mnoho různých typů ININ. Cholinergní ININ působí prostřednictvím inhibičního mediátoru acetylcholinu na muskarinové a pravděpodobně i nikotinové receptory lokalizované na primárních nociceptivních neuronech i postsynaptických neuronech v zadních rozích míchy. Opioidergní ININ obsahují enkefaliny a dynorphin, které aktivují μ -, δ - nebo κ -receptory. GABAergní

ININ účinkují prostřednictvím GABA na GABA_A a GABA_B receptory. Dalším typem ININ jsou glycinergní neurony, jejichž mediátor glycin aktivuje glycin_A receptory. (20, 64)

Významnou úlohu v nociceptivním přenosu na úrovni zadního rohu míchy hrají i gliové a imunokompetentní buňky prostřednictvím sekrece různých substancí jako je glutamát, cytokiny, neurotrofní látky, NO, PG (prostaglandiny) a ATP. Jejich interakce jak s neurony, tak s non-neurálními buňkami mají velký význam pro funkční, adaptační a organizační změny v nociceptivním systému způsobené bolestivou aferentací, zejména pak pro indukci neuropatické bolesti. (206)

Přenos nociceptivní informace do supraspinálních center, ascendentní dráhy bolesti a jejich organizace. Po integraci v zadních rožích míchy je nociceptivní informace přenášena projekčními neurony do vyšších center CNS. Z neuroanatomického hlediska rozlišujeme dva hlavní typy ascendentních drah bolesti, a to dráhy přímé a nepřímé. Přímé dráhy projikují přímo do vyšších cerebrálních struktur a patří mezi ně tractus spinothalamicus (STT), spinomesencephalicus, tractus spinoreticularis a spinoparabrachiální trakty. V nepřímých dráhách dochází během cesty k vyšším centrům CNS k přepojení na neurony druhého řádu, dvěma hlavními nepřímými drahami jsou tractus spinocervicalis, kde axony interpolují v nucleus cervicalis lateralis na úrovni C1-C3, a lemniscus medialis, který projikuje do nucleus cuneatus (z cervikálních a hrudních segmentů) a nucleus gracilis (z lumbosakrálních segmentů). (26, 312)

STT je jednou z nejdůležitějších nervových drah účastnících se nocicepce vůbec. Axony specifických projekčních neuronů tohoto traktu tvoří jednak ventrální a jednak dorsální část STT. Ventrální neurony projikující supraspinálně jsou koncentrovány především v marginální zóně (lamina I), v nucleus proprius, ale také v oblasti baze zadních rohů a v lamina VII šedé hmoty míchy, a probíhá ascendentně cestou ventrolaterálního provazce umístěného v anterolaterálním kvadrantu bílé hmoty míchy společně s axony spinomesencephalického a spinoretikulárního traktu. STT neurony probíhající ventrálním provazcem vstupují do jader mediálního thalamu (nucleus centralis lateralis a nucleus submedius) a axony laterálního provazce do laterálního thalamu (nucleus ventralis posterolateralis a skupina zadních jader). Ve ventrolaterálním provazci jsou ascendentní nervové dráhy laterálně somatotopicky uspořádány, neurony z cervikálních a hrudních segmentů obsazují jeho mediální, neurony z lumbálních a sakrálních segmentů pak laterální část. Dorsálně segregované STT neurony, především z lamina I, tvoří dorsální část STT a využívají dorsolaterální provazec bílé hmoty míchy společně s ascendentními spinobrachiálními a spinoparabrachiálními drahami. STT vysílá kolaterály k různým dalším strukturám CNS, které mohou hrát roli v motivačně-afektivní složce bolesti nebo být součástí endogenního analgetického systému. Byly objeveny kolaterály STT do retikulární formace a periaqueduktální šedi mesencephala. (22, 23, 26, 312)

Neurony spinomesencephalického traktu mají svůj původ v marginální zóně, tj. lamina I, dále v lamina V a X zadního rohu míchy. Hlavním cílem této nervové dráhy, taktéž umístěné ve ventrolaterálním provazci, je nucleus parabrachialis (PBN) pontu. Některé neurony PBN dále vysílají své axony k thalamu, což je důležité pro integrační funkci PBN v senzoryckém přenosu, je to místo hrající důležitou úlohu v integraci kardiovaskulární, autonomní a motivační odpovědi na bolestivý podnět. (7, 23) Z PBN může být nociceptivní informace dále předávána do amygdaly, nebo cestou descendentních inhibičních drah zpět k neuronům míchy. Kromě PBN projikují axony spinomesencephalického traktu do nucleus cuneiformis, intercollicularis, periaqueduktální šedi, hlubokých vrstev horních kolikulů, nucleus pretectalis, nucleus ruber, a dalších jader mesencephala. Limbické terče této nervové dráhy jsou úzce propojeny s hypothalamem a označovány jako spinotelencephalická projekce. (313)

Neurony spinoretikulárního traktu jsou koncentrovány v lamina V, VII, VIII a X zadních rohů míchy, buňky lamina I k tomuto traktu nepřispívají. Jejich axony vstupují do mozkového

kmene ventrolaterální částí bílé hmoty míchy a projikují do jader retikulární formace, včetně dorsálního retikulárního jádra, kam vstupuje část axonů spinoretikulárních neuronů z lamina X a z dalších hlubokých lamin separátně spolu s axony neuronů lamina I. Důležitá komponenta spinoretikulárního traktu projikuje do pericerebellárního jádra laterální retikulární formace, které se účastní regulace motoriky. (312)

Projekce klasických monosynaptických drah, STT, spinoretikulárního a spinomesencephalického traktu je převážně kontralaterální. Jejich projekční neurony kříží napříč střední čáru na úrovni stejného nebo sousedního segmentu, kde vstupují do míchy a poté vystupují k vyšším centrům. (109)

Dráha lemniskárního systému je lokalizována v dorsomediální oblasti bílé hmoty míchy, tento ascendentní kanál je označován jako zadní provazec. Neurony patřící k lemniskárnímu systému se nacházejí převážně v nucleus proprius šedé hmoty míchy. I v dorsomediálním provazci jsou ascendentní dráhy laterálně somatotopicky uspořádány. Neurony z cervikálních a hrudních segmentů obsazují jeho laterální, neurony z lumbálních a sakrálních segmentů pak mediální část, tedy opačně, než je tomu v provazci ventrolaterálním. Projekce z jader zadních provazců jde dále cestou lemniscus medialis do zadních a zadních ventrálních jader thalamu a do horních kolikulů. Tato jádra dostávají navíc přímou ascendentní inervaci z primárních aferentů vedoucích proprioceptivní a mechanoceptivní (ne nociceptivní) informace a je tudíž možné, že se účastní vedení mechanické alodynie. (5, 22)

Zadní míšní provazce obsahují nejen vzestupné větve primárních aferentních vláken, ale také ascendentní projekce postsynaptických neuronů nacházejících se v zadním rohu šedé hmoty míchy. Primární aferentní axony stoupají společně s výběžky těchto postsynaptických neuronů zadního rohu cestou zadních míšních provazců k vyšším centrům nervového systému. Tato „postsynaptická dráha zadních provazců“ (PSDC) má původ v neuronech lokalizovaných v nucleus proprius (lamina III nebo IV, ventrálně od substantia gelatinosa) a v lamina V a VI šedé hmoty míchy. Je tvořena výběžky obrovského počtu neuronů, své axony vysílá touto cestou velké procento neuronů lokalizovaných v lamina III – VI šedé hmoty. Dendrity těchto PSDC neuronů se větví většinou v transversální rovině, zasahují dorsálně do lamina II nebo dokonce do lamina I a jsou zakončeny drobnými terminálními butony se sférickými nebo oválnými synaptickými vezikulami. V neurálních zakončeních synapticky kontaktujících PSDC neurony byla prokázána přítomnost glutamátu a GABA, což dokazuje možnost jejich postsynaptické excitace i inhibice. Axony většiny PSDC neuronů vysílají lokální kolaterály větvcí se ventrálně od somat, podle rychlosti vedení vzruchu (20 – 55 m/s v průměru) se jedná o středně silná myelinizovaná vlákna. Část senzoričkových neuronů tvořících PSDC dráhu odpovídá výhradně na nebolestivou mechanickou stimulaci, jako je dotyk, tlak nebo deformace vlasového folikulu, druhá část pak na nebolestivou a zároveň i bolestivou stimulaci kůže mechanickým podnětem. Jen malé procento z nich je z hlediska mechanické stimulace pouze nociceptivních. Řada PSDC neuronů odpovídá na nociceptivní tepelné podněty, některé PSDC neurony jsou aktivovány nociceptivními podněty viscerálními. V případě senzitivizace kůže poraněním se PSDC neurony původně nereagující na tepelný podnět mohou stát termosenzitivními. Na distálních částech končetin jsou receptivní pole PSDC neuronů poměrně malá, proximálním směrem se zvětšují. PSDC neurony se zásadně liší od jiných neuronů (např. spinocervikálního traktu) tím, že svými receptivními poli inervují i neochlupenou kůži a mohou být aktivovány při stimulaci Paciniho receptorových tělísek. PSDC dráha projikuje do jader zadních provazců a vykazuje somatotopické uspořádání. Výběžky postsynaptických neuronů lokalizovaných v cervikální míšní intumescenci terminují v nucleus cuneatus, výběžky PSDC neuronů hrudní míchy v mediálním nucleus cuneatus a laterálním nucleus gracilis. Neurony lumbální intumescence projikují do nucleus gracilis a výběžky PSDC neuronů sakrální míchy terminují v mediální části nucleus gracilis. PSDC je jednou z hlavních senzoričkových drah vůbec a významně

přispívá k mechanické a termální nocicepci. Význam v přenosu somatosenzorické informace mají rovněž postsynaptické neurony vysílající své axony k nucleus cuneatus a gracilis cestou dorsolaterálních míšních provazců, dorsolaterálními provazci probíhají i některé větve axonů PSDC neuronů zadních provazců. (314)

Neurony tractus spinocervicalis mají původ v nucleus proprius, probíhají dorsolaterálním míšním provazcem a interpolují v nucleus cervicalis lateralis. Z laterálních cervikálních jader se pak nociceptivní informace dostává cestou cervikothalamické dráhy do thalamu (zejména do zadních ventrálních jader) a cervikomesencephalickou drahou do mesencephalu, periaqueductální šedi (PAG) a horních kolikulů. (206, 312)

Nepřímé nociceptivní dráhy jsou na míšní úrovni ipsilaterální, nicméně, některé axony vystupující z jader zadních provazců se kříží do kontralaterálního mozkové hemisféry. Inervace thalamu a hypothalamu je tedy bilaterální, naopak inervace limbických struktur je převážně ipsilaterální. (Ascendentní projekce k limbickým strukturám se kříží jednak po vstupu do míchy před vstupem do ventrolaterálního provazce, a potom na supraoptické úrovni.) Lze shrnout, že ačkoliv je supraspinální příjem nociceptivní informace převážně kontralaterální, existuje i významná složka ipsilaterální bolestivé aferentace do cerebrálních struktur. (109, 110, 111)

V supraspinálním přenosu nociceptivní informace je zapojeno velké množství neurotransmiterů a modulátorů. V přenosu bolestivé informace spinothalamickým traktem do thalamu a spinomesencephalickým traktem do PAG hrají klíčovou roli glutamát a další EAA prostřednictvím jejich účinku jak na ionotropní tak mGlu receptory. (142) V přenosu informace lemniskárním systémem do jader zadních provazců (nucleus cuneatus a gracilis) se uplatňují rovněž glutamát a zejména AMPA receptory. (90, 91) Důležitou úlohu v supraspinálním přenosu bolesti hraje i několik dalších excitačních neuropeptidů včetně SP a CCK (cholecystokinin). V ascendentních drahách bolesti byla prokázána přítomnost dynorphinu (DYN), který účinkuje převážně jako inhibiční transmitter přes κ -opioidní receptory. (205)

Mozková centra ascendentních nociceptivních drah a jejich funkční role. Hlavní strukturou pro příjem a zpracování nociceptivní informace na cestě do mozkové kůry je thalamus. Thalamus kóduje informace týkající se sensoricko-diskriminační komponenty bolestivého vjemu, tj. typu, časových vlastností, intenzity i topografické lokalizace bolesti a navíc je svým spojením s kortikálními a limbickými strukturami zodpovědný také za emoční komponentu bolestivého vjemu. Thalamus má zároveň aktivní adaptivní roli při zpracování nociceptivní informace. Existuje několik hlavních skupin thalamických jader, které se účastní příjmu, zpracování a dalšího přenosu informace, všechny dostávají intenzivní aferentaci z neuronů zadních rohů míchy převážně z lamina I a V, VI. (12, 13, 14)

Hlavními oblastmi pro příjem a zpracování nociceptivní informace jsou jádra ventrobazálního komplexu thalamu, v rámci něhož rozlišujeme nucleus posterolateralis (VPL), nucleus posteromedialis (VPM) a oblast laterálního thalamu (nucleus ventroposteroinferior VPI). Ventrální STT vstupuje primárně do VPL/VPM a dorsální STT inervuje zejména VPI. VPL a VPM se skládají z neuronů (NS i WDR) schopných velmi citlivě kódovat a rozlišovat intenzitu působícího stimulu. Receptivní pole těchto neuronů jsou navíc malá, a proto kódují velmi přesně i somatotopickou lokalizaci působícího bolestivého stimulu. Ventrobazální komplex je tudíž oblastí zodpovědnou za sensoricko-diskriminační komponentu bolestivého vnímání. (13, 27, 90) Další skupinou je komplex jader zadního thalamu, který zahrnuje pulvinar oralis, nucleus posterior a zadní část nucleus ventromedialis (VMpo). Je to hlavní oblast thalamu, kde dochází k integraci nociceptivních a termosenzorických informací, inervovaná především dorsálním STT. (67) Nucleus parafascicularis patří do mediální oblasti thalamu, přičemž důležitou roli v nocicepci hraje

zejména jeho ventrokaudální oblast, která dostává aferentní informace od neuronů lamina I dorsální částí STT. S ní úzce anatomicky souvisí nucleus centralis lateralis ze skupiny intralaminárních jader, kam rovněž přichází aferentace z dorsálního STT, a který je dále propojen se striatem a oblastmi zodpovědnými za pozornost a motorické funkce. (38) Částí thalamu pravděpodobně zodpovědnou za emočně-kognitivní aspekty bolesti je nucleus ventralis caudalis, a to jeho zadní část. Hraje roli nejen v afektivní komponentě bolestivého vjemu, ale i v jeho memorizaci. Neurony VPI, zadního komplexu a dalších oblastí jsou tudíž důležité pro pozornost, kognitivní a emočně-afektivní aspekty vnímání bolesti. (167, 168)

Z excitačních mediátorů jsou důležité pro aktivitu nociceptivních neuronů v thalamu především EAA. Ve VPL, VPM a v jádrech zadního komplexu thalamu mají pro přenos nociceptivní informace dominantní význam NMDA a mGlu receptory, které navzájem kooperují, nociceptivní přenos je v těchto jádrech navíc modulován působením NO. (76, 90) Thalamus je rovněž vybaven inhibičním modulačním mechanismem, jehož podstatou je aktivita GABAergních ININ. EAA a jejich účinek na NMDA, AMPA a mGlu receptory skupiny I mají klíčový význam také pro kortikální přenos nociceptivní informace z thalamu, modulační funkci mají v sensorické kůře především GABAergní ININ napojené na thalamokortikální aferentní vlákna a účinkující přes GABA_A a GABA_B receptory. (234, 290)

Mezi kortikální oblasti, které obsahují nociceptivní NS a WDR neurony a jsou konsistentně aktivovány bolestivými podněty, patří primární somatosenzorická kůra S I gyrus postcentralis, sekundární somatosenzorická kůra S II v oblasti sulcus Sylvii laterálního parietálního kortexu, několik regionů ve spodní a přední části parietálního kortexu, insulární kortex, přední cingulum a mediální prefrontální kortex. Tyto kortikální struktury jsou komplexně propojeny mezi sebou, a to buď přímo nebo přes thalamus a limbické struktury, v přenosu informace se na těchto intrakortikálních neuronálních spojích uplatňují především EAA a NMDA (i non-NMDA) receptory. (47, 48) Primární somatosenzorická kůra je aktivována výhradně kontralaterálně v souladu s její sensoricko-diskriminační a somatotopicky lokalizační funkcí. V některých oblastech kortexu však byla prokázána i ipsilaterální aktivace, například v prefrontální kůře, v cingulu, také v cerebellu nebo v thalamu. Některé kortikální neurony mají totiž bilaterální receptivní pole a tím přispívají k ipsilaterální bolestivé aferentaci (168), je možný také interhemisferický transfer nociceptivní informace komisurálními drahami nebo přes thalamus. (39) Také intenzita stimulu se zdá být důležitým faktorem pro kortikální aktivaci, intenzivní, prolongovaná a opakovaná stimulace nociceptivním podnětem může vyvolat bilaterální aktivaci kůry. (47, 48, 77)

VPL, VPM a komplex zadních thalamických jader poskytuje intenzivní aferentaci primární somatosenzorické kůře S I. V souladu s účastí v sensoricko-diskriminační složce bolestivého vjemu obsahuje S I kůra velké množství NS a WDR s malými (kontralaterálními) receptivními poli přesně kódujících lokalizaci i intenzitu působícího stimulu. Tato skutečnost plně koresponduje s inervací S I převážně ventrálním STT a VPL/VPM, tj. hlavními thalamickými jádry podílejícími se na této sensoricko-diskriminační funkci. Analogicky jako neurony VPL, mnoho S I neuronů odpovídá současně na kožní i viscerální bolestivé podněty, což poukazuje na pravděpodobnou existenci konvergence na kortikální úrovni. Bylo také zjištěno, že se odpověď WDR neuronů v S I při opakované bolestivé tepelné stimulaci kůře zvyšuje, což dokazuje možnost uplatnění mechanismů senzitivace i na kortikální úrovni. (13, 38, 68, 168)

Projekce z ventrokaudálních jader mediálního thalamu vstupuje do S II a insulárního kortexu, neurony ostatních mediálních thalamických jader inervují především gyrus cinguli. VPI a intralaminární jádra projikují do S II. (167) I na kortikální úrovni lze tedy rozlišit ventrální STT – VPL/VPM – SI a dorsální STT – VPI/VMpo – SII část spinothalamické ascendentní nociceptivní dráhy. Neurony kortikálních oblastí S II, parietální oblasti, předního

cingulu, prefrontálního a insulárního kortexu účastníci se nocicepce mají velká receptivní pole, a tudíž nevykazují tak výraznou schopnost přesného kódování intenzity a somatotopické lokalizace nociceptivního podnětu. Ani oblasti thalamu, ze kterých přijímají aferentní nociceptivní informace, se nepodílí na senzorio – diskriminační složce nocicepce. Tyto kortikální struktury se uplatňují především v afektivní složce bolestivého vjemu. (13)

Kortikální struktury obsahující nociceptivní neurony vykazují velké množství recipročních spojení nejen s thalamem, ale i s limbickými a motorickými oblastmi jako je amygdala, striatum - nucleus lenticularis, hypothalamus, nucleus accumbens, PBN, PAG a hippocampus, které jsou kromě nociceptivního přenosu zodpovědné za různé kognitivní funkce a náladu. (47, 49) V extensivním množství těchto neuronálních spojů má význam zejména insulární a přední cingulární kortex. Insulární kortex hraje důležitou roli v endogenní analgetické aktivitě μ -opioidů (36), přední cingulum je zodpovědné za pozornost, náladu a některé kognitivní funkce (189, 269), svůj význam v nocicepci má i striatum (nucleus lenticularis), který je kontralaterálně aktivován somatickými i viscerálními nociceptivními podněty. (47) Důležitou strukturou je PAG, která dostává bolestivé informace z vnitřních orgánů a současně z předního cingulu, a má tudíž pivotní roli v integraci behaviorální a autonomní odpovědi na bolestivou stimulaci. (63)

1.2. Mechanismy vzniku patologických bolestivých stavů

Akutní (tzv. fyziologická) bolest vzniká přímým působením stimulu na nociceptor, vyznačuje se vysokým prahem pro vyvolávající podněty a má typicky přechodný ráz. V případě kdy je působící stimulus natolik intenzivní, že poruší integritu organismu, se může v návaznosti na akutní bolest rozvinout bolest chronická, která přetrvává i po skončení expozici tomuto stimulu. Intenzivním nociceptivním podnětem způsobující tkáňové poranění může být například chirurgický zákrok. Zvýšená a dlouhotrvající bolestivá aferentace z místa poranění a působení algogenních substancí uvolněných z buněk poškozené tkáně mohou vést k aktivaci mechanismů způsobujících změny nociceptivního systému jak na periférii (periferní senzitivace), tak na úrovni centrálního nervového systému (centrální senzitivace). Tyto změny pak mohou mít za následek rozvoj patologických bolestivých stavů a fenoménů jako hyperalgie, vyznačující se zvýšenou intenzitou vnímání bolestivých vjemů a alodynii, která představuje takové snížení prahu pro vyvolání bolestivého vjemu, že podněty za normálních podmínek nebolestivé způsobí bolestivý vjem. (145, 260, 320, 321)

1.2.1. Periferní senzitivace

Mechanismy periferní senzitivace. V prostředí tkáňového poranění nebo zánětu se výrazně mění chemické prostředí periferních zakončení nociceptorů. Z poraněných buněk je uvolňován jejich intracelulární obsah bohatý na ATP a K^+ ionty, poklesne pH. Do místa traumatu jsou přitahovány zánětlivé buňky, které syntetizují mediátory jako cytokiny, růstové faktory, kininy, puriny, aminy a prostanoidy. Klíčový význam mají zejména prostaglandin E_2 (PGE_2), bradykinin a NGF (nerve growth factor). Některé z těchto mediátorů přímo aktivují nociceptory a vyvolají nociceptivní vjem (tzv. aktivátory nociceptorů), jiné ovlivňují citlivost somatosenzorických nervových vláken, který se pak stává k dalším podnětům zvýšeně citlivý (mediátory senzitivující nociceptory). (321)

Chemické látky vedoucí k senzitivaci nociceptivních zakončení a zvyšují intenzitu jejich odpovědi na nadprahové podněty navázáním na specifické receptory exprimované na membránách těchto nociceptorů. Tyto receptory (spojené s G-proteiny, tyrosinkinázové, aj.)

jsou funkčně spřažené s intracelulárními kinázami obsaženými v cytoplazmě a tedy napojené na řadu intracelulárních signálních kaskád.

Produkce prostanoidů, hlavní součásti tkáňové reakce na poranění (např. chirurgickým zákrokem), začíná vznikem kyseliny arachidonové z membránových fosfolipidů působením fosfolipázy A₂. Cyklooxygenáza 2 (COX-2) mění kyselinu arachidonovou na prostaglandin H, který je dále přeměňován na specifické prostanoidy, jako např. PGE₂, pomocí prostaglandin syntáz. PGE₂ aktivuje po navázání na své receptory adenylylcyklázu (AC) a způsobí tak zvýšení hladiny cAMP v senzorigickém neuronu, který dále aktivuje proteinkinázu A (PKA). Uvolnění kalciových iontů z mikrosomů periferního zakončení nebo vstup kalcia do nociceptoru iontovými kanály aktivuje zároveň na kalcium závislou proteinkinázu C (PKC). PKA a PKC fosforylují aminokyseliny serin a threonin celé řady proteinů, včetně proteinů membránových receptorů a iontových kanálů nociceptoru. Taková změna jejich chemických vlastností může výrazně ovlivnit aktivitu receptorů a iontových kanálů na nociceptivním vlákně, změnit jejich práh pro podnět a kinetiku. (145, 150, 222, 294)

ATP uvolňovaný v milimolárních koncentracích z poškozených buněk v místě traumatu rychle obsazuje své ligandem řízené P_{2x3} purinoreceptory na nociceptorech v poraněné tkáni, které jsou tímto způsobem přímo aktivovány. (194) Protony, jejichž koncentrace se v místě poranění zvyšuje pozvolna, aktivují ASIC3 (acid sensitive ion channel) iontové kanály a TRPV1 receptory exprimované nociceptivními vlákny, ale s delším časovým odstupem po poranění. (299) NGF se váže na trkA tyrosinkinázové receptory a rovněž ovlivňuje senzitivitu nociceptivního zakončení, bez jeho přímé aktivace. (262) Naproti tomu, bradykinin vznikající v místě poranění působením kallikerinu z kininogenových prekurzorů jednak přímo aktivuje, ale také senzitivizuje nociceptivní nervová zakončení přes B₂ a B₁ bradykininové receptory spřažené s aktivací PKC, která katalyzuje důležité fosforylační procesy, včetně fosforylace aminokyselin proteinů membránových receptorů a iontových kanálů nociceptoru. V důsledku změny chemické struktury těchto proteinů fosforylací se změni i jejich funkční vlastnosti, jako jejich práh pro působící podněty nebo kinetika, a to ve smyslu senzitivizace. PKC navíc aktivuje řadu intracelulárních transportních proteinů, dalším mechanismem uplatňujícím se v periferní senzitivizaci nociceptoru je rovněž zvýšený transport proteinových podjednotek receptorů a iontových kanálů na jeho membránu. (300) Zánětlivé mediátory rovněž způsobují fosforylaci napětově řízených Na⁺ kanálů Na_v1.8, specifických pro senzorigické neurony. V důsledku periferní senzitivizace dochází k aktivaci i tzv. „tichých nociceptorů“, což rovněž přispívá ke zvýšení citlivosti na bolestivé podněty v oblasti tkáňového poranění nebo zánětu. (115)

Mechanismy periferní senzitivizace se uplatňují pouze v místě tkáňového poranění (mechanického, tepelného, chemického) nebo zánětu. (145)

Regulace transkripce a posttranskripčních úprav v senzorigických neuronech. Funkční vlastnosti, vnitřní excitabilita a citlivost k farmakologickým prostředkům senzorigických neuronů je dána množstvím a typem proteinů exprimovaných na jejich membránách. Proteinové složení membrány je výsledkem procesu transkripce v jádře neuronu, a tak kromě post-translačních regulací mohou být vlastnosti senzorigického neuronu ovlivněny i přímou regulací transkripce. Regulace proteinové transkripce a translace může tedy přispívat i ke změně funkce nociceptoru.

V prostředí poraněné tkáně je na nociceptivních zakončeních ve zvýšené míře exprimován například TRPV1 receptor, zvyšující jejich citlivost na tepelné podněty. Tento fenomén je důsledkem produkce NGF v poraněné tkáni. NGF je transportován z periferie do těla senzorigického neuronu ve spinálním gangliu, kde aktivuje intracelulární signální děje včetně mitogenem-aktivované proteinkinázy p38 (MAPK). Důsledkem aktivace MAPK p38 v primárních senzorigických neuronech se pak zvýší exprese a transport TRPV1 receptorů do

periferních zakončení a tím je zvyšována citlivost nociceptivního nervového vlákna na tepelné podněty. (148, 187)

Regulace transkripce a translace může mít za následek i změny neuronální exprese a distribuce různých typů sodných a draselných iontových kanálů, a to zejména v případě poranění periferního nervu. V důsledku těchto změn se zvýší excitabilita neuronální membrány natolik, že jsou generovány ektopické akční potenciály i bez působení jakéhokoliv stimulu. To je hlavní příčinou spontánní neuropatické bolesti. (173, 178)

1.2.2. Centrální senzitivace

Původní definice označovala centrální senzitivaci jako na vzruchové aktivitě závislé zvýšení excitability nociceptivních neuronů v zadních rožích míchy vznikající důsledkem intenzivní krátkodobé bolestivé aferentace, po které přetrvává. Je charakterizované snížením prahu pro působící podněty a zvýšením nadprahových odpovědí neuronů zadních rohů míchy a zároveň zvětšením jejich receptivních polí. (66) Kromě centrálních synapsí nociceptorů se centrální senzitivace týká i synapsí nízkoprahových mechanosenzitivních A β -vláken na neuronech zadních rohů míchy. Dochází zde k heterosynaptické facilitaci, v důsledku které pak mohou tato nízkoprahová senzoričká vlákna aktivovaná nebolestivým podnětem jako je dotyk nebo tlak aktivovat vysokoprahové nociceptivní neurony. (266, 318)

V současné době je rozlišováno několik forem centrální senzitivace. Do první skupiny patří mechanismy nezávislé na transkripci, uplatňující se okamžitě po působení stimulu a závislé na neuronální vzruchové aktivitě. Patří mezi ně wind-up (homosynaptický mechanismus), dále na aktivitě závislá heterosynaptická senzitivace, a dlouhodobá potenciace (LTP, long term potentiation) v zadních rožích míchy. Druhou velkou skupinu pak tvoří mechanismy s pozdním nástupem účinku, závislé na transkripci. Některé z nich závisí na neuronální aktivitě a ovlivňují transkripci pouze lokálně v aktivních neuronech (např. transkripce genů pro DYN, NK₁), jiné ovlivňují transkripci na globální úrovni (např. indukce genů pro COX-2 v neuronech míchy, mozkového kmene a thalamu). (145)

Mechanismy centrální senzitivace nezávislé na transkripci. Wind-up je formou homosynaptické plasticity charakterizované progresivním nárůstem počtu vyvolaných akčních potenciálů na neuronech zadních rohů míchy po sérii opakovaných stimulů C-vláken o nízké frekvenci. (201) Aktivace C-vláken nízkofrekvenčními stimuly vyvolá pomalé synaptické potenciály trvající až několik set milisekund, wind-up je výsledkem časové sumace těchto pomalých potenciálů. Sumace pak může způsobit kumulativní depolarizaci postsynaptického neuronu, která má za následek odstranění na napětí závislé Mg²⁺ blokady NMDA receptorů na jeho membráně a tím zvýšení jejich citlivosti na glutamát. (267, 283)

Asynchronická aktivace velkého množství periferních zakončení nociceptorů intenzivním bolestivým podnětem nebo tkáňovým poraněním způsobí facilitaci synaptického přenosu velkého množství různých neuronů zadních rohů míchy. Tento na aktivitě závislý heterosynaptický mechanismus centrální senzitivace je důsledkem aktivace celé řady intracelulárních signálních drah v míšních neuronech působením neurotransmiterů jako jsou glutamát, SP, BDNF (brain-derived neurotrophic factor) a ephrin-B ligandy. Receptory pro tyto neurotransmitery (ionotropní i metabotropní glutamátové receptory spřažené s G-proteiny, NK₁ receptory a tyrosinkinázové receptory trkB a Eph) jsou napojeny na intracelulární signální kaskády, ve kterých hraje klíčovou úlohu aktivace adenylylcyklázy (AC), proteinkináz (PKA a PKC), tyrozináz aj. enzymů. Ke zvýšení efektivity synaptického přenosu přispívají v případě aktivace těchto intracelulárních kaskád dva hlavní mechanismy, a to změna aktivity iontových kanálů a receptorů v důsledku posttranslačních úprav (zejména fosforylace intracelulárními kinázami) a zvýšený transport receptorů na membránu. (319)

Po aktivaci PKA, PKC a AC se zvýší efektivita synaptického přenosu zejména na ionotropních glutamátových receptorech v důsledku fosforylace jejich proteinů (jedná se především o fosforylaci NR1, NR2A a NR2B podjednotek NMDA receptoru). Ta má za následek změnu otevíracího času tohoto iontového kanálu, odstranění blokády Mg^{2+} ionty, zvýšení transportu cytosolické frakce těchto receptorů na neuronální membránu, atd. (120, 144, 319, 334) Dalším mediátorem fosforylace tyrosinových zbytků proteinů těchto receptorových podjednotek se zdá být tyrosinkináza Src spojená s aktivací trkB a EphB receptorů. Dosud není přesně objasněno, jakým mechanismem jsou tyto tyrosin/serin kinázy fosforylující ionotropní glutamátové receptory aktivovány a regulovány v jejich odpovědích na nociceptivní podněty. Jedním z modulátorů jejich funkce může být ERK (kináza regulovaná extracelulárním signálem), která je v neuronech zadních rohů míchy aktivovaná nociceptivní aferentní vzruchovou aktivitou. (147, 329) Důležitou regulační roli ve zvýšení efektivit synaptického přenosu hraje rovněž navázání Ca^{2+} /kaldmodulin-dependentní proteinkinázy (CaMKII) na NMDA receptor a fosforylace GluR1 podjednotky AMPA receptoru. (96, 107) Excitabilita neuronů zadních rohů míchy může být regulována i přímo prostřednictvím modulace $K_v4.2$ kaliových iontových kanálů působením ERK. (127)

Ačkoliv je bradykinin považován primárně za periferně působící zánětlivý mediátor uplatňující se v místě tkáňového poranění, je evidentní, že se významně uplatňuje i v centrální transmisi nociceptivní informace. Exprese B_2 receptorů byla spolehlivě prokázána na membránách neuronů spinálních ganglií a v zadních rozích míchy. B_2 receptory se nacházejí na membránách nejen primárních senzoričkových, ale i postsynaptických neuronů zadních rohů míchy a bradykinin tak může v zadních rozích míchy ovlivňovat neurální přenos presynapticky i postsynapticky. Ukázalo se, že intenzivní nociceptivní aferentace z poraněné tkáně indukuje výraznou produkci bradykininu v míše. Obsazením svého B_2 receptoru na membráně neuronu v zadním rohu míchy aktivuje bradykinin kaskádu intracelulárních dějů funkčním spřažením s G – proteiny. Jejich prostřednictvím pak může být pomocí PLC β aktivována na kalcium závislá PKC, která indukuje fosforylaci AMPA a NMDA receptorů míšních neuronů a tím ovlivní jejich aktivitu ve smyslu senzitivace, případně zvýší jejich transport na membránu neuronů. Bradykinin způsobí aktivaci intracelulární signální kaskády také zvýšené uvolňování glutamátu z centrálních zakončení primárních aferentních neuronů, což rovněž přispívá k facilitaci synaptického přenosu nociceptivní informace v zadních rozích míchy. (304) Bradykininový B_2 receptor je navíc funkčně spřažen s aktivitou PLA_2 konvertující membránové fosfolipidy na kyselinu arachidonovou. Z kyseliny arachidonové pak vznikají prostanoidy, které jsou neméně důležitými modulátory synaptického přenosu v zadních rozích míchy významně se uplatňujícími v jeho facilitaci. Stejně jako receptory pro bradykinin, jsou i prostanoidové receptory exprimovány nejen na membránách centrálních zakončení primárních nociceptorů, ale i na membránách postsynaptických neuronů v zadních rozích míchy. Prostanoidy mohou tedy prostřednictvím svých receptorů buď přímo aktivovat postsynaptické neurony, a nebo působit retrográdně, kdy způsobí v důsledku zvýšení vodivosti pro Ca^{2+} a/nebo Na^+ a syntézy cAMP facilitaci uvolňování SP a glutamátu z presynaptických zakončení primárních nociceptivních neuronů. (206)

LTP je jedním z mechanismů homosynaptické facilitace excitačních postsynaptických potenciálů závislý na neuronální vzruchové aktivitě, vyvolaný krátkodobou vysokofrekvenční stimulací. (252) Ačkoliv byla LTP studována podrobně na neuronech hippocampu, uplatňuje se i v zadních rozích míchy zejména na spinoparabrachiálních neuronech lamina I exprimujících NK_1 receptory. Indukce LTP v těchto neuronech vyžaduje synergickou interakci mezi NMDA a NK_1 receptory a zároveň nízkoprahový Ca^{2+} proud kanály typu T. Klíčovou úlohu pro indukci LTP má v těchto neuronech pravděpodobně elevace intracelulární hladiny Ca^{2+} . (135, 175, 236, 251)

Mechanismy centrální senzitivace ovlivňující transkripci a genovou expresi. Zvýšená vzruchová aktivita nociceptorů v terénu tkáňového poranění nebo zánětu může způsobit i dlouhodobé změny efektivit synaptického přenosu v zadních rožích míchy, a to mechanismem aktivace některých transkripčních faktorů a změnami na úrovni transkripce genů kódujících zejména proteiny zodpovědné za příjem, vedení a synaptický přenos vzruchu. Výsledkem jsou potom změny excitability a vodivých vlastností, v některých případech až změna fenotypu neuronu. (320) Tyto změny mají pozdní nástup a mohou být vyvolány zvýšenou vzruchovou aktivitou nebo humorálními zánětlivými faktory. V případě neuronální aktivity jako vyvolávajícího faktoru jsou tyto změny synapsí omezeny na vzruchově aktivní oblast míchy, která dostává aferentní nociceptivní informace z poraněné tkáně, v případě působení humorálních faktorů jsou tyto změny globální. (146, 249)

V důsledku intenzivní bolestivé aferentace z poškozené tkáně dochází k aktivaci ERK, která může vstupovat do jádra neuronu a vést k fosforylaci CREB (cAMP-response-element-binding-protein). Tato ERK-CREB signální kaskáda pak indukuje geny obsahující ve svých promotorových regionech sekvenci CRE (cAMP-response element). (143, 134, 247) V časné fázi jsou touto cestou indukovány například geny kódující transkripční faktor c-Fos nebo enzym COX-2 (128, 249), mezi takto aktivované geny pozdní odpovědi patří geny pro preprodynorphin, NK₁, trkB, a další v jádrech neuronů zadních rohů míchy. (87, 146, 177, 187, 191) Tyto transkripční změny míšních neuronů závislé na vzruchové aktivitě jsou doprovázeny transkripčními změnami také na primárních sensorických neuronech, které mění jejich excitabilitu a vodivé vlastnosti. Dochází nejen ke zvýšení hladiny mediátorů jako např. BDNF a SP, agonistů na trkB a NK₁ receptorech (187, 217), ale i ke změnám fenotypu některých neuronů spinálních ganglií. Například některé velké neurony spinálních ganglií ze skupiny A-vláken, které se za fyziologických podmínek neúčastní přenosu bolestivé informace, mohou v terénu zánětu nebo po poranění exprimovat SP a BDNF a tím získají schopnost indukovat centrální senzitivaci. (182, 187, 216)

Tkáňové poranění spouští celkovou humorální cytokinovou odpověď organismu a tyto cirkulující humorální faktory produkované zánětlivými buňkami aktivují endoteliální buňky cerebrovaskulárního systému a mikroglie k produkci interleukinu 1 β (IL-1 β). (73, 250) IL-1 β působí na své receptory exprimované mnoha míšními neurony a vede k rozsáhlé indukci transkripce genů pro COX-2 v centrálních neuronech, zvýšená produkce prostaglandinů účinkem COX-2 pak zvyšuje neuronální excitabilitu v somatosenzorických drahách. (249)

1.2.3. C-Fos jako neuronální marker nocicepce

Obecná charakteristika. C – Fos a c – Jun byly původně popsány jako geny časné odpovědi, které jsou v buněčných jádrech exprimovány okamžitě po působení nejrůznějších podnětů. V buňkách centrálního nervového systému jsou c – Fos a c – Jun exprimovány jako odpověď na stimulaci specifickým typem podnětu pro daný neuron, indukce genů časné odpovědi c-Fos a c-Jun je okamžitou reakcí neuronu na jeho aktivaci tímto specifickým podnětem. Transkripce c-Fos je v neuronálním jádře zahájena již několik minut po stimulaci, hladina c-Fos mRNA dosahuje maxima přibližně za 30 – 40 minut. Gen c-Fos kóduje jaderný protein Fos. Akumulace Fos proteinu je v jádře neuronu nejvyšší asi 2 hodiny po indukci transkripce. Protein Fos tvoří heterodimerní komplexy s dalšími jadernými proteiny, patřícími do rodiny Jun (kódovanými geny c-Jun). Tento komplex Fos-Jun (tzv. proteinový komplex AP – 1, komplex transkripčních faktorů AP - 1) se pak v jádře neuronu váže na specifickou sekvenci DNA (vazebné místo AP - 1) a reguluje tak zpětně transkripci a expresi dalších genů, v jejichž sekvenci je vazebné místo pro AP – 1 komplex obsaženo. C – Fos je tedy součástí signální kaskády, která propojuje extracelulárně působící vnější podnět se změnami

na intracelulární, genetické úrovni neuronu. Tyto změny jsou reakcí na působící podnět, a protože se týkají genové exprese, vedou k dlouhodobé adaptaci nervové buňky. (124, 213)

C – Fos je v neuronech centrálního nervového systému exprimován jako odpověď na působení určitého typu podnětu. Bylo spolehlivě prokázáno (128), že v míše a v mozku je indukován zejména nociceptivními podněty, a to tepelnými, mechanickými i chemickými. V neuronech zadních rohů míchy bylo prokázáno výrazné zvýšení c – Fos mRNA několik minut po periferní stimulaci nociceptivním podnětem, po 1 – 2 h transkripce lze v těchto neuronech detekovat proteinový produkt Fos. (128) Exprese c – Fos je tedy využívána ke studiu nocicepce, je to funkční marker sloužící k identifikaci neuronů centrálního nervového systému aktivovaných nociceptivním podnětem. Mnoho studií prokázalo těsnou souvislost mezi nocicepcí a expresí c – Fos a potvrdilo tím validitu c – Fos jako markeru k identifikaci neuronálních korelátů nocicepce. (124)

Úloha Fos v nocicepci. Fos je součástí intracelulární signální kaskády, která je zodpovědná za dlouhodobé změny na intracelulární úrovni neuronu jako odpověď na působení vnějšího nociceptivního podnětu. Fyziologické děje probíhající mezi působením vnějšího podnětu a jadernou expresí Fos jsou velmi komplexní a účastní se jich celá řada „druhých poslů“. Obecně lze shrnout, že neurotransmitery jako glutamát a substance P, které jsou uvolňovány primárními nociceptory a účastní se transmise nociceptivní informace, vedou k nárůstu intracelulární koncentrace Ca^{2+} v postsynaptických neuronech, což je pro aktivaci c – Fos rozhodující. Nociceptivní stimulace vede prostřednictvím exprese Fos a jeho následné vazby na jadernou DNA k dalším rapidním změnám v genové expresi neuronů zadních rohů míchy, které se týkají především transkripce a neuronální exprese řady neuropeptidů a proteinů, a jsou zároveň přímým obrazem aktivace těchto neuronu přicházející nociceptivní aferetací. Ve svém důsledku mohou vést od modulace synaptického přenosu až po strukturální změny synapsí na úrovni míchy nebo v jiných místech centrálního nervového systému, které mohou znamenat zvýšení citlivosti nociceptivního systému na působící podněty. Bylo prokázáno, že při stavech provázených hyperalgií nebo alodynii dochází ke zvýšení exprese c – Fos spinálními neurony. (128, 181)

Vazebná sekvence pro komplex transkripčních faktorů AP – 1 je však také součástí celé řady genů kódujících opioidní a jiné fyziologicky významné neuropeptidy, které mají opačné, analgetické účinky. Jedná se například o geny pro endogenní opioidy preprodynorphin, preproenkefalin, ale také NGF, cholecystokinin a neuropeptid Y. Je tedy zřejmé, že Fos rovněž reguluje syntézu opioidních peptidů v míšních neuronech, a hraje tak významnou roli v endogenních analgetických mechanismech. Při stavech provázených hyperalgií a alodynii, kdy je exprese Fos výrazně zvýšená, dochází v neuronech zadního rohu míchy k indukcii exprese dynorphinu, opioidního peptidu s analgetickými účinky účinkujícího na κ - receptor. (129, 133) Zvýšení exprese dynorphinu spinálními neurony bylo prokázáno na experimentálních modelech zánětlivé (134, 204) i neuropatické bolesti (153), a to jak v neuronech projekčních, tak i v lokálních interneuronech účastnících se transmise nociceptivní informace. (214) Exprese dynorphinu v zadních rozích míchy významně kolokalizuje s expresí c – Fos, ukázalo se, že po experimentální indukci zánětu vykazuje až 80% spinálních neuronů exprimujících dynorphin současně pozitivní imunohistochemickou reakci na Fos. (218) Protože obsahuje gen pro preprodynorphin několik vazebných míst pro komplex transkripčních faktorů AP – 1, může se Fos jako součást AP - 1 komplexu na tuto sekvenci navázat, a přímo tak regulovat expresi tohoto genu. Také časový průběh neuronální exprese dynorphinu naznačuje, že Fos pravděpodobně přímo indukuje transkripci genu pro preprodynorphin. (81) Exprese Fos je tedy nejen markerem neuronální aktivace, tento protein zároveň indukuje syntézu endogenních opioidů a dalších peptidů s analgetickými účinky a je tudíž nedílnou součástí neurálních mechanismů antinocicepce. (213)

Význam exprese Fos jako dlouhodobého neuronálního markeru nocicepce na experimentálních modelech chronické bolesti. Expresí Fos v neuronech zadních rohů míchy byla podrobně popsána například u experimentálního zvířecího modelu artritidy. Počet neuronů exprimujících Fos byl u těchto zvířat nejvyšší v míšních segmentech inervujících zanícený kloub, nárůst exprese Fos přímo koreloval svým časovým průběhem s rozvojem klinických symptomů zánětu. (2, 3) Na rozdíl od experimentálních modelů akutní bolesti, kde je exprese Fos patrná zejména v neuronech lamina I a II, byla většina Fos pozitivních neuronů v tomto případě detekována v lamina V a VI šedé hmoty míchy. Akutní nociceptivní podnět však indukoval expresi Fos v neuronech lamina I a II i na tomto modelu chronické bolesti. (202, 233) Je tedy zřejmé, že exprese Fos v superficiálních laminách šedé hmoty míchy souvisí s akutní bolestí, v hlubších laminách pak s bolestí chronickou. Morfin podaný zvířatům s artritidou zablokoval nárůst exprese Fos v neuronech lamina I a II po akutním nociceptivním podnětu. Na druhou stranu, opakovaná aplikace naloxonu vedla u těchto zvířat k dalšímu zvýšení exprese Fos v neuronech lamina V a VI. Je tedy pravděpodobné, že jsou při chronické zánětlivé bolesti aktivovány endogenní analgetické mechanismy, které jsou účinkem naloxonu zablokovány. (1) Nesteroidní antiflogistika rovněž snižují počet neuronů exprimujících Fos u tohoto modelu, při intratekální aplikaci zablokují i nárůst exprese Fos v lamina I a II po akutní nociceptivní stimulaci. (4, 184)

1.3. Bolest chirurgického původu

I když je mechanické tkáňové poranění způsobené operačním zákrokem častou příčinou vzniku chronické bolesti nebo patologických bolestivých stavů, byla chronická pooperační bolest donedávna opomíjeným problémem. Závažnost této problematiky vyšla na světlo až v 90. letech, kdy byl v severní Anglii a Skotsku proveden průzkum mezi pacienty navštěvujícími kliniky bolesti. Ukázalo se, že přibližně u 20% z těchto pacientů trpících chronickou bolestí byl jednou z příčin této bolesti chirurgický zákrok, u poloviny z nich byla pak operace jedinou příčinou jejich bolesti.

Definovat situaci, kdy se bolest stává chronickou, je často obtížné. Bolest je někdy označována jako chronická, jestliže přetrvává i po zhojení vyvolávajícího traumatu. Jindy je chronická bolest definována uměle jako stav přetrvávající tři nebo šest měsíců po traumatu, atd. Definice chronické pooperační bolesti je ještě obtížnější, neboť mnoho pacientů prodělá operaci z důvodu právě chronického bolestivého stavu jako je například vertebrogenní syndrom, a tento preexistující bolestivý stav může dále ovlivnit i pooperační vývoj. Není jednoduché odlišit, jestli je pooperační bolest pouze pokračováním původního onemocnění nebo jestli se jedná o *de novo* vzniklý problém způsobený chirurgickým zákrokem, nebo jestli je jeho příčinou úplně jiná etiologie. Aby bylo možné bolest označit jako chronickou pooperační bolest, musí tento stav splňovat podle Macrae (2001) následující kritéria. 1. Je to bolest, která se rozvine po chirurgickém zákroku. 2. Přetrvává minimálně dva měsíce. 3. Musí být vyloučeny jiné příčiny bolesti jako například infekce. 4. Musí být vyloučena možnost, že vyvolávající příčinou je pokračující původní onemocnění. Definice chronické pooperační bolesti se však liší od jedné studie k druhé, velmi často není „přesná“ definice ve studiích používána vůbec. (183)

Z množství existujících studií je zřejmé, že chronická pooperační bolest dosahuje značné intenzity a může být příčinou zvýšené pooperační morbidity, fyzické invalidity, stresu a úzkosti. Za příčinu tohoto typu bolestivého stavu nelze považovat chybu operatéra. Někteří pacienti jsou ke vzniku tohoto stavu více náchylní nebo dokonce predisponovaní, v jejich případě je pak chronická pooperační bolest nevyhnutelným výsledkem operačního zákroku. Zvýšené riziko chronické pooperační bolesti je například u pacientů s Raynaudovým

syndromem, zejména bipolárním Raynaudovým syndromem s erythromeralgií, syndromem dráždivého tračníku, migrenózními bolestmi hlavy, fibromyalgií, a jinými stavy. Všechny tyto syndromy se vyznačují změnami v nervovém systému, neurální plasticita u těchto pacientů může zvyšovat tím pádem i nociceptivní vnímání a být tak příčinou somatické nebo viscerální hyperalgie. Je proto nutné, aby o incidenci chronické pooperační bolesti byli pacienti přesně informováni, indikace operačního zákroku by měla být u predisponovaných nemocných velmi pečlivě zvažována.

Pro studium mechanismů uplatňujících se v rozvoji pooperační bolesti byla vyvinuta řada experimentálních modelů zvířecích i lidských. Ve výzkumu je kladen důraz zejména na objasnění mechanismů vzniku mechanické alodynii a hyperalgie, které jsou běžnou a velmi významnou součástí pooperačního bolestivého stavu, a příčinou zhoršení pooperační bolesti například při pohybu, kašli nebo ošetřování operační rány. Je zřejmé, že v těchto bolestivých stavech hraje roli jak periferní, tak centrální senzitivizace nociceptivního systému. Jako jeden z prvních experimentálních modelů byl vytvořen zvířecí model plantární incise na laboratorní kryse, který vyvinul T. Brennan et al. v roce 1996. (32) Spočívá v provedení chirurgické incise na plantě pedis krysy a byl použit v mnoha experimentálních studiích behaviorálních i elektrofyziologických zabývajících se pooperační bolestí. Tento zákrok způsobí u experimentálního zvířete mechanickou alodynii a hyperalgií na podněty aplikované do místa traumatu (primární hyperalgie) i na okolní intaktní kůži ve vzdálenosti až 1 cm od incise (sekundární hyperalgie). (331) Jiným modelem, vhodným zejména ke studiu sekundární hypersenzitivity na podněty aplikované na neporušenou tkáň vzdálenou od traumatu, je zvířecí model incise musculus gastrocnemius. Tento chirurgický zákrok vyvolá hypersenzitivitu při mechanické stimulaci kůže planty pedis, tedy místa vzdáleného od incise několik centimetrů. (229) Beitz et al. (2004) vytvořil zvířecí model pronikajícího bodného poranění ke studiu patofyziologických mechanismů primární i sekundární hyperalgie, které tento typ traumatu vyvolá. (18) Na klinických i preklinických modelech je testována účinnost nových analgetik a jsou objasňovány farmakologické mechanismy jejich působení. Jejich účinnost je porovnávána při předoperačním podání, pooperační aplikaci s účinností v případě aplikace po operačním zákroku, atd.

1.3.1. Možnosti léčby pooperační bolesti

Diagnostický a terapeutický přístup k chronické pooperační bolesti by měl být zaměřen na patofyziologické mechanismy jejího vzniku. Například jestliže je příčinou této bolesti poranění nervu, měla by být léčba zaměřena na specifické mechanismy zodpovědné za neuropatickou bolest. Na druhu operačního výkonu, který tento typ bolesti způsobil, přitom prakticky nezáleží. V běžné klinické praxi je však tento přístup stále obtížně realizovatelný. Velký význam má pacientova anamnéza, zejména týkající se bolesti předcházející operační výkon, důležité jsou i jeho předchozí zkušenosti s pooperační bolestí atd. Charakteristika bolesti jako pálivé, vystřelující, doprovázené brněním napovídá o neurogenním původu, naproti tomu ostrá, stálá bolest spojená se zvýšenou místní citlivostí na dotyk svědčí spíše o zánětlivém původu. Asi nejdůležitějším aspektem zvládnutí tohoto stavu je profesionální komunikace s pacientem, a to pečlivé vyléčení anamnézy a podrobné vysvětlení podstaty stavu. Tento přístup často pomůže sám o sobě.

Základem farmakologické léčby akutních a chronických bolestivých stavů jsou v současné době tři hlavní skupiny léčiv: nesteroidní antiflogistika (NSAID), opioidy (tramadol, aj., případně opiáty), a skupina léčiv s rozličnými farmakologickými účinky souhrnně nazývaných doplňkovými léčivy, kam řadíme například antidepresiva (tricyklická, např. amitriptylin), antikonvulziva (gabapentin, valproát, aj.), místní anestetika, agonisty α_2 -adrenoreceptorů, atd. Skutečností je, že NSAID i opioidy vykazují při systémovém podávání

celou řadu závažných vedlejších nežádoucích účinků a mnoho chronických bolestivých stavů, zejména způsobených neurálním poraněním, není těmito látkami adekvátně ovlivněno. Systémové dávky NSAID a opioidů je nezbytné titrovat v kombinaci s adjuvancii tak, aby bylo dosaženo maximálního analgetického efektu a zároveň nedošlo k rozvoji nežádoucích účinků. Nežádoucím účinkům však v řadě případů nelze zabránit a léčba bolesti těmito látkami je často i přes veškerou snahu nedostačující, obzvláště v případech neuropatických bolestivých stavů.

1.3.2. Analgetika působící na periferii a jejich klinický význam

Alternativním přístupem v léčbě bolesti je lokální aplikace analgeticky působících léčiv na periferní tkáň, přímo do místa původu bolesti. Toho je dosaženo prostřednictvím topické aplikace účinné látky ve formě krému, masti, gelu, aerosolu nebo v náplasti na postižené místo, případně pomocí lokální injekce analgetika, například přímo do kloubní dutiny. V případě bolestivých stavů v orofaciální oblasti lze použít analgetikum obsažené v ústní vodě nebo dražé. Lokální způsob aplikace umožňuje dosažení vyšší koncentrace analgetika v místě iniciace bolesti a zároveň jeho nižší až zanedbatelnou systémovou koncentraci, což má za následek výrazně méně nežádoucích účinků. Další velkou výhodou lokální aplikace je zabránění lékovým interakcím, kdy není nutná složitá titrace dávky až k hranici tolerance. Lokální aplikace je navíc pro pacienty snadno zvládnutelná. V určitém rozsahu však stejně dochází k systémové resorpci lokálně aplikovaného analgetika, a to zejména v případě liposolubilních léčiv, což je nutné brát v úvahu při vývoji jejich lékových forem. Je nezbytné sledovat i případné místní nežádoucí účinky po topické aplikaci analgetika nebo po lokální injekční aplikaci.

Topicky aplikovaná léčiva používaná k ovlivnění bolesti mají působit lokálně na poškozené, dysfunkční tkáň nebo na periferní nervy na rozdíl od transdermálních lékových forem, kdy kůže představuje vstupní bránu pro systémové vstřebání léčiva. Každá akutní, zánětlivá i neuropatická bolest závisí do určité míry na periferní aktivaci primárních sensorických aferentních neuronů. Lokálně působící analgetika mohou přímo ovlivňovat sensorická nervová zakončení, a to například snížením jejich vzruchové aktivity působením na up-regulované sodíkové iontové kanály. Dalším možným mechanismem účinku těchto analgetik je modulace probíhajícího zánětu v tkáni, například snížením produkce zánětlivých mediátorů nebo bloádou jejich receptorů. Periferní nervová zakončení rovněž exprimují různé inhibiční neuroreceptory (např. opioidní, α -adrenergní, cholinergní, adenosinové nebo kanabinooidní), lokální aplikace agonistů na těchto receptorech pak představuje další ze způsobů modulace jejich aktivity. Při chronických bolestivých stavech však dochází k rozvoji změn na úrovni jak periferní, tak centrální komponenty sensorického systému vnímání bolesti a účinnost léčebného přístupu místně působícími analgetiky závisí nejen na míře alterace periferního sensorického zpracování bolestivé informace, ale i na stupni centrální senzitivace, která se při těchto stavech rozvíjí. Lokální analgetická léčba je výrazně účinnější v případech, kdy v patofyziologii bolestivého stavu dominuje periferní komponenta, tedy změny na úrovni primárních aferentních vláken vedoucích bolest.

V současné době je k dispozici jen velmi omezené množství analgetických přípravků k topické aplikaci. V těchto lékových formách jsou běžně užívána jen NSAID, lidokain a kapsaicin. Lokální injekce (např. intraartikulární) morfinu nebo klonidinu mají velmi slibný účinek v preklinických studiích. Existují klinické studie, kde byla lokálně použita antidepressiva nebo antagonisté glutamátových receptorů s velmi slibným účinkem. Výsledky několika preklinických studií ukazují na možný analgetický potenciál lokálně aplikovaných agonistů na adenosinových a kanabinooidních receptorech, cholinergních ligandů i antagonistů různých neuropeptidů. V současné době je středem zájmu spíše identifikace nových cílových

struktur pro periferně působící analgetika a vývoj dokonalejších lékových forem, které by mohly být účinnou alternativou systémové analgetické terapie. (255)

1.3.3. Přehled analgetik působících na periférii

Nesteroidní antiflogistika. NSAID působí periferně na produkci prostaglandinů senzitivizujících nervová zakončení v místě poranění mechanismem inhibice enzymu cyklooxygenázy. Bylo prokázáno, že obě známé izoformy COX přispívají také ke spinální i supraspinální produkci prostanooidů způsobené tkáňovým poraněním nebo zánětem. NSAID se tedy mohou uplatňovat i na úrovni míchy a na supraspinální úrovni, kde mohou být zodpovědné za inhibici centrálního zpracování bolestivé informace.

Při použití lokálně aplikovatelné formy těchto léků zůstává systémová koncentrace a biologická dostupnost NSAID zanedbatelně nízká (dosahuje přibližně 5 – 15% hodnot dosažených při systémové aplikaci), což snižuje možnost vzniku nežádoucích účinků na minimum. Ve studiích na lidských dobrovolnících působí topicky aplikované NSAID analgeticky na modelu kožní (195, 259, 271, 272) i svalové bolesti. (270) Rovněž výsledky klinických studií popisují dobrou účinnost topicky aplikovaných NSAID, přinesly přesvědčivý důkaz analgetické efektivity NSAID aplikovaných ve formě gelu, spreje i náplasti. (125, 211, 291) Jedna z nich se týká jejich analgetického účinku na bolest při muskuloskeletálních poraněních a poraněních měkkých tkání jako jsou distenze, distorze a tendinitidy a při revmatologických onemocněních (291), druhá je zaměřena na jejich účinnost a bezpečnost u chronických revmatologických onemocnění. (125)

Nežádoucí účinky topicky aplikovaných NSAID se dají obecně rozdělit na lokální a systémové reakce a objevují se přibližně v 10 – 15% případů. Většinou se jedná o lokální kožní reakce, jako je vyrážka a svědění v místě aplikace. Systémové reakce, například gastrointestinální, jsou podstatně méně časté a vyskytují se s větší pravděpodobností u těch pacientů, kteří měli v anamnéze systémovou reakci na orální preparáty.

Opioidy. Přítomnost opioidních receptorů byla prokázána nejen na úrovni centrálního nervového systému, ale i na periferních zakončeních slabě myelinizovaných a nemyelinizovaných kožních sensorických vláken. I když periferní účinky opioidů nejsou příliš výrazné za normálních okolností, uplatňují se významně zejména krátce po indukci zánětu. Analgetické působení opioidních agonistů je důsledkem ovlivnění především μ -, δ - a κ -opioidních receptorů sensorických neuronů. Jejich aktivace má za následek interakci s G-proteiny (G_i a/nebo G_o), pokles koncentrace cAMP v neuronu, zvýšený eflux kaliových a snížený influx kalciových iontů. Tyto změny snižují excitabilitu periferního zakončení, propagaci akčního potenciálu i uvolňování mediátorů. Zánět sice způsobí zvýšenou expresi opioidních receptorů a potencuje jejich transport z neuronálního somatu na periferní zakončení, ale tento proces trvá relativně dlouho (řádově dny). Časný analgetický efekt opioidů na bolest indukovanou zánětem, který se projeví během minut až hodin, je způsoben poškozením perineurální bariery probíhajícím zánětem, která má protektivní funkci a za normálních okolností brání kontaktu nervového zakončení a exogenních látek. Po narušení této bariery pak mají opioidy přístup k nervovému vláknu a receptorům exprimovaných na jeho membráně. Snížené pH v místě zánětu může rovněž usnadňovat párování opioidních receptorů s G-proteiny.

Periferní analgetický účinek opioidů je přibližně stejný jako při použití běžných lokálních anestetik a přetrvává až 48 hodin od aplikace, lze ho antagonistovat naloxonem. (154, 273, 275) Nejúčinnějšími látkami k vyvolání analgesie na periférii se obecně jeví agonisté μ -opioidních receptorů. Možnostmi klinického využití se zabývala řada studií. Jedna z nich popisuje například analgesii po periferní aplikaci morfinu na modelu poranění periferního

nervu bez přítomnosti tkáňového zánětu. Tento účinek morfinu může být důkazem účasti neuronů sympatiku, neboť chemická sympatektomie potencuje tento druh analgesie. (228) Jiné studie se zabývaly účinností morfinu (0,5 – 10 mg) aplikovaného intraartikulárně během operačního zákroku na kolenním kloubu. Většinou byl zjištěn výrazný analgetický efekt opioidů alespoň jedním z použitých způsobů kvantifikace intenzity bolesti (vizuální analogová stupnice, numerická stupnice, slovní hodnocení, sledování současné konzumace dalších analgetik, atd.). Periferní analgesie morfinem byla prokázána i v oblasti dentální chirurgie (172), periferní analgetické účinky opioidů byly testovány také u artritid, tedy stavů s chronickým zánětem. V těchto studiích vyvolala intraartikulární injekce morfinu (1-3 mg) dlouhodobou analgesii trvající až šest dní (171, 274) a morfin v těchto případech snížil i počet leukocytů v synoviální tekutině. Ke snížení intenzity bolesti může tudíž přispívat i možný protizánětlivý efekt.

Kromě periferní aplikace opioidů pomocní lokálních injekcí se jeví účinná i jejich topická aplikace k místu bolesti. V preklinických studiích, na modelu kožní hyperalgie vyvolané termálním poraněním, byl prokázán analgetický efekt loperamidu. Loperamid je opioid systémově nevstřebatelný při orálním podání a při topické aplikaci na kůži planty pedis krysy výrazně oslabil hyperalgiu způsobenou tepelným traumatem. (220) Na jiném modelu, kdy byl na ocas experimentálních myší aplikován roztok dimethylsulfoxidu s morfinem nebo DAMGO (agonista μ -opioidních receptorů), se rovněž projevil periferní analgetický efekt těchto látek. (161) Je zajímavé, že opakovaná topická aplikace opioidů způsobila toleranci k jejich perifernímu analgetickému účinku, obojí bylo možné zablokovat pomocí antagonistů NMDA receptorů. Vznik tolerance byl prokázán i po opakovaných lokálních injekcích morfinu (6) a je tedy zřejmé, že periferní analgesie působením lokálně aplikovaných opioidů vykazuje vznik tolerance úplně stejně jako v případě jiného způsobu jejich podání.

Topická aplikace opioidů se začíná uplatňovat i v běžné klinické praxi. Má dobrý analgetický účinek při aplikaci k bolestivým vředům a jiným kožním lézím (16, 289), na popáleniny a jiné bolestivé stavy kůže spojené například s malignitami.

Lokální anestetika. Napětově řízené sodíkové kanály (VGSCs) hrají fundamentální roli v řízení neuronální excitability. Na membránách neuronů jsou exprimovány jednak klasické VGSCs, které jsou citlivé na tetrodotoxin a mohou být působením tetrodotoxinu zablokovány, a jednak atypické VGSCs relativně resistentní k tetrodotoxinu. Sodíkový kanál je tvořen glykoproteidem, který je součástí neuronální membrány a je složen z několika podjednotek (α , β_1 a β_2). Stav kanálu (otevření, zavření) je ovládán změnou elektrického membránového potenciálu. Lze rozeznat tři možné stavy sodíkového kanálu: aktivovaný a otevřený, inaktivovaný a uzavřený, klidový a uzavřený. Otevření sodíkových kanálů závisí na membránovém napětí. Depolarizace membrány změní tvar (konfiguraci) molekuly a kanál, dosud ve stavu klidu, se otevře a sodíkové ionty proudí podle koncentračního gradientu (kanál je aktivován a otevřený). Během depolarizace nastane jiná krátkodobá změna konfigurace proteinu, kanál je inaktivován a přestává být průchodný pro sodíkové ionty (stav kanálu inaktivovaný a uzavřený); jde o přechodnou fázi mezi stavem „aktivovaný a otevřený“ a „v klidu a uzavřený“. Poté se bílkovinné složky kanálu rekonfigurují do klidového stavu, pro sodíkové ionty uzavřeného. Změny v expresi, distribuci a funkci VGSCs, ke kterým dochází po neurálním poranění nebo při chronickém zánětu, mají rozhodující vliv na vzruchovou aktivitu primárního aferentního neuronu a tedy i vnímání bolesti. Membrána nervové buňky je primární místo účinnosti lokálních anestetik, na této úrovni přerušují lokální anestetika tvorbu a propagaci vzruchů přímou blokádou sodíkových kanálů. Akční potenciál stoupá v důsledku jejich působení pomaleji, má stále menší amplitudu, práh podráždění roste, refrakterní fáze se prodlužuje, až membrána neuronu zcela ztratí schopnost podráždění, nastane úplná blokáda činnosti nervového vlákna. Jakmile lokální anestetikum dosáhne na vnitřní straně membrány

axoplazmatického ústí sodíkového kanálu, vyvolá v něm elektrochemické změny, jimiž je kanál blokován. Bazické neionizované lokální anestetikum difunduje buněčnou membránou do axoplazmatu, tam disociuje v ionizovanou (kationtovou formu), která se váže na vazebné místo sodíkového kanálu a stabilizuje jeho inaktivní a uzavřený stav. Účinnost blokády vlivem lokálního anestetika závisí na stavu předchozí stimulace nervového vlákna a jeho klidovém potenciálu. Vlákně v klidu reaguje na účinek lokálního anestetika podstatně méně než vlákně, jež bylo opakovaně stimulováno. Vyšší frekvence stimulace a vyvolaných akčních potenciálů vyvolá účinnější blokádu lokálním anestetikem, protože ionizovaná forma lokálního anestetika může dosáhnout vazebného místa v sodíkovém kanálu jen tehdy, pokud je kanál otevřen. (165)

Lékové formy místních anestetik určené k topické aplikaci by mohly být účinnou alternativou systémové léčby těmito léčivy, která je sice velmi efektivní například v případě diabetické neuropatie (15, 72), neuralgií (248), poranění periferních nervů (54) a reflexní sympatické dystrofie (92), ale limitována vedlejšími účinky na centrální nervový systém (nausea, závratě, somnolence) a srdce. Lokální anestetika jsou v lokálních formách široce používána k místní anestézii u drobných chirurgických zákroků, méně často pak k ovlivnění chronické bolesti, dobrý efekt těchto forem byl popsán u postherpetické neuralgie. (276) Pozornost klinické medicíny je v poslední době zaměřena především na topickou aplikaci lidokainu. Lidokain je pro topickou aplikaci k dispozici ve formě 5% gelu nebo náplasti a poskytuje výborný analgetický efekt u postherpetické neuralgie bez systémových vedlejších nežádoucích účinků. Klinická studie Deverse a Galera (75) prokázala účinnost lidokainové náplasti v léčbě různých bolestivých stavů neuropatického původu. Topicky aplikovaný lidokain se jeví jako velmi efektivní, bezpečný a výhodný a byl navržen jako metoda první volby v léčbě postherpetické neuralgie zejména u starších nemocných, kteří jsou náchylnější k systémovým vedlejšími nežádoucím účinkům.

Kromě VGSCs hrají důležitou roli pro funkci primárních aferentních vláken i napětově řízené kalciové kanály. Důležitá je jejich úloha v regulaci uvolňování transmitterů, ovlivnění přenosu signálu pomocí druhých poslušů a regulaci genové exprese. Na modelu neuropatické bolesti způsobené traumatem periferního nervu byl prokázán analgetický efekt lokálně aplikovaného blokátoru kalciových kanálů typu N jednak k míše (55), dále do místa poranění nervu (322), a dokonce i na periferní oblast receptivního pole nervu. (311) Porušená funkce kalciových membránových proudů na senzoryckých neuronech přes kanály spřažené s G-proteiny je typická pro diabetickou neuropatii a kalciové kanály se tedy jeví jako další důležitý terč pro analgetickou terapii tohoto typu neuropatické bolesti.

Antidepresiva. Efektivita systémově podávaných antidepresiv v léčbě chronické bolesti byla zpočátku přičítána jejich centrálním účinkům na úrovni míchy a dalších supraspinálních center. Nedávno bylo prokázáno, že antidepresiva aplikovaná lokálně na periferní tkáň působí analgeticky na experimentálním modelu chronické zánětlivé bolesti (255) a neuropatické bolesti. (95) Periferní analgetická účinnost antidepresiv byla pozorována i na modelu bolesti viscerální. (277)

Mezi antidepresiva účinná periferně na zánětlivou bolest patří například desipramin, imipramin, nortriptylin, doxepin a fluoxetin. V účinku amitriptylinu hraje významnou roli místní uvolnění adenosinu a následná aktivace adenosinových A_1 receptorů, lokální aplikace amitriptylinu zvyšuje biologickou dostupnost adenosinu v periferní tkáni. (255) K periferní farmakologické aktivitě a analgetické účinnosti antidepresiv může přispívat řada dalších akutních farmakologických účinků, včetně inhibice re-uptaku noradrenalinu (NA) a serotoninu (5-HT), inhibice NMDA, nikotinových, histaminových a 5-HT receptorů a blokády iontových kanálů.

Antagonisté glutamátových receptorů. Iontotropní i metabotropní glutamátové receptory jsou přítomny na membránách periferních axonů a jejich kožních zakončeních a mohou tudíž přispívat k periferním mechanismům vnímání bolesti. (42) Zánět v periferní tkáni způsobí lokální uvolnění glutamátu, který aktivuje ionotropní i metabotropní receptory exprimované na membránách senzických nervových zakončení a hraje významnou roli v jejich periferní senzitivizaci. V dalším mechanismu přispívajícím k periferní senzitivizaci hraje roli aktivace glutamátových receptorů (NMDA, AMPA i KA) exprimovaných na sympatických eferentních vláknech, která má za následek uvolnění NA a dalších substancí (např. ATP, neuropeptid Y) z těchto postganglionárních sympatických neuronů. V důsledku periferního zánětu dochází rovněž ke zvýšení počtu nemyelinizovaných i myelinizovaných nervů exprimujících ionotropní glutamátové receptory. Lokální injekce NMDA nebo non-NMDA agonistů pod kůži planty pedis krysy (137) nebo do dutiny kolenního kloubu (166) způsobí bolest a rozvoj hyperalgie a alodynii, intraplantární injekce agonistů metabotropních glutamátových receptorů má podobný efekt. (301) Naproti tomu lokální aplikace antagonistů ionotropních i metabotropních glutamátových receptorů zablokuje zánětlivou bolest experimentálně vyvolanou intraplantární injekcí formalinu nebo hyperalgií způsobenou injekcí kaolinu a carrageenanu do kloubního pouzdra u krysy. (288)

Několik experimentálních studií na lidech prokázalo periferní analgetické účinky ketaminu, nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů. Ketamin má i lokálně anestetické účinky neboť blokuje také napětově řízené Ca^{2+} kanály, snižuje cholinergní a monoaminergní účinky a interaguje s opioidními mechanismy, k jeho analgetickému profilu přispívají všechny tyto účinky. Ve studii zabývající se akutní pooperační bolestí způsobil ketamin svým periferním působením potenciaci anestetických a analgetických účinků bupivakainu. (305) Na modelu termálního poranění u zdravých dobrovolníků měla subkutánní injekce ketaminu za následek výrazné oslabení vznikající hyperalgie. (117)

Zvýšená koncentrace glutamátu a aspartátu byla prokázána v synoviální tekutině při chronických artritických onemocněních (69), několik kazuistik popisuje analgetický efekt topicky aplikovaného ketaminu u bolesti reflexního sympatického původu (317) a bolesti u maligních onemocnění. (59)

Agonisté α -adrenoreceptorů. Sympatický nervový systém přispívá k rozvoji bolesti po poranění periferního nervu. V klinické medicíně lze bolest označit jako reflexní sympatickou v takovém případě, kdy jsou hyperalgie a alodynii způsobené traumatem nervu ovlivnitelné blokátory sympatiku (tedy blokátory adrenergních receptorů), tento stav se nazývá komplexní regionální bolestivý syndrom. Výsledky behaviorálních i elektrofyziologických studií ukázaly, že primárními mediátory sympatiko-aferentního párování po traumatu periferního nervu jsou α_2 -adrenoreceptory. Na neuronech spinálních ganglií krysy byla detekována přítomnost α_2 -adrenoreceptorů (zejména α_{2C} , méně často pak o α_{2A} nebo α_{2B}), podvaz nebo protnutí nervu pak vede k up-regulaci podtypu α_{2A} -adrenoreceptorů a poklesu počtu α_{2C} -adrenoreceptorů ve spinálních gangliích krysy. (29)

Sympatický nervový systém přispívá rovněž k hyperalgií vyvolané zánětem, ale jinými mechanismy než v případě neurálního poranění. (169) V tomto případě je senzitivizující účinek NA na primární aferentní neurony pravděpodobně zprostředkovan nepřímo prostřednictvím postganglionárních vláken sympatiku, v rozvoji hyperalgie hrají rozhodující úlohu α_{2B} -receptory lokalizované na sympatických postganglionárních neuronech. (158)

Klonidin je agonista α_2 -adrenoreceptorů běžně používaný k léčbě hypertenze. V preklinických studiích byl lokálně aplikován do kloubů postižených zánětem u laboratorních hlodavců, kde se ukázal jeho dobrý analgetický účinek, který byl navíc potencován probíhajícím zánětem. (280) Pro léčbu chronických bolestivých stavů u lidí je podáván transdermálně pomocí klonidinové náplasti. Klonidin v náplasti byl analgeticky

účinný při léčbě neuropatické bolesti u pacientů s diabetem (70), v některých případech reflexní sympatické bolesti, ale neměl žádný efekt na hyperalgezi v případě neuropatických bolestí nezávislých na sympatiku. (94) Podstatou účinku lokálně aplikovaného klonidinu na reflexní sympatickou bolest je pravděpodobně presynaptická inhibice NA uvolněného z vláken sympatiku, uplatňují se ale i jeho přímé účinky na primární aferentní senzická zakončení. Klonidin ve formě krému přináší úlevu při neuralgiích v orofaciální oblasti, na bolest způsobenou neuropatiemi v orofaciální oblasti je jeho účinek slabší. (108) Při intraartikulární injekční aplikaci po artroskopickém zákroku na kolenním kloubu vykazoval klonidin rovněž dobrou analgetickou účinnost (243), navíc potencoval analgesii vyvolanou bupivakainem (34) i morfinem. (35)

Adenosin. Lokálně aplikovaní agonisté adenosinových A_1 receptorů do tkáně planty pedis krysy působí analgeticky na akutní bolest (155), bolest související se zánětem (176) i neuropatickou bolest. (256) Podobně, lokální aplikace inhibitorů adenosin kinázy, která zvyšuje lokální koncentraci adenosinu v tkáni, způsobí analgesii v případě zánětlivé (225) i neuropatické bolesti. (256) Tento důkaz periferních účinků adenosinu nabízí možnost použití agonistů A_1 receptorů nebo inhibitorů adenosin kinázy v lékových formách k topické aplikaci jako účinných analgetik, neboť mohou mít tedy jednak přímý účinek na senzický přenos bolesti působením na senzická nervová zakončení přes A_1 receptory a zároveň nepřímý účinek na zánětlivý proces jako takový přes A_2 receptory, prostřednictvím kterých dochází k ovlivnění celé řady buněk imunitního systému.

Kanabinoidy. Kanabinoidy jsou analgeticky velmi účinné na mnoha experimentálních modelech bolestivých stavů. Na periférii mohou působit prostřednictvím kanabinoidních (CB) CB_1 nebo CB_2 receptorů. V behaviorálních pokusech vykazují lokálně aplikované látky selektivně působící na CB_1 receptory místní analgetické účinky ve formalinovém testu (245), na carrageenanovém modelu zánětlivé hyperalgezie (100) a na modelu nervového poranění. (243) Periferní účinky agonistů na CB_1 receptorech jsou přičítány přímému ovlivnění samotného senzického nervového zakončení ve smyslu inhibice uvolňování CGRP nebo inhibice senzizačního účinku NGF. Místní analgetické účinky agonistů na CB_2 receptorech, které jsou exprimovány mastocyty a inhibují jejich funkce, byly rovněž spolehlivě prokázány. Tento mechanismus zprostředkovaný CB_2 receptory hraje pravděpodobně významnou úlohu v zánětlivé bolesti. (74) Současná aplikace agonistů na CB_1 i CB_2 receptorech vede k výrazné potenciaci analgesie. Tato pozorování poukazují na možnost vývoje lokálně aplikovatelných forem kanabinoidů a jejich derivátů za účelem ovlivnění bolesti, a to bez hrozby centrálních nežádoucích účinků, které jsou v současné době u těchto látek velkým problémem. (273)

Agonisté cholinergních receptorů. I když bylo spolehlivě prokázáno, že je i acetylcholin (ACh) jednou z periferně působících algogenních substancí, byl jeho úloze v periferních mechanismech nocicepce málokdy přikládán větší význam, neboť nebyla histologicky nalezena souvislost možnými zdroji ACh a senzickými zakončeními. Periferním zdrojem ACh jsou nejspíš samotná senzická nervová zakončení nebo keratinocyty, případně fibroblasty, které mohou uvolňovat ACh po tkáňovém traumatu. Na senzických aferentních neuronech je přítomno několik podtypů nikotinových receptorů. ACh svým působením na nikotinové receptory aktivuje primární senzické aferenty, jejich agonisté vyvolají při lokální aplikaci na kůži nebo ústní sliznici dráždění a bolest a tyto účinky lze zablokovat pomocí specifických antagonistů. (24) Senzické neurony exprimují rovněž několik typů muskarinových receptorů, aktivace muskarinových receptorů (především typu M_2) vede k desenzitizaci těchto neuronů. (33)

Inhibitor CHE (cholinesterázy), neostigmin, byl experimentálně injikován přímo do dutiny kolenního kloubu. Částečně zablokoval mechanickou hyperalgezií na modelu artritidy u laboratorní křivy (325) a byl analgeticky účinný u pacientů po operačním zákroku na kolenním kloubu. (43) Tento přístup přinesl důkaz cholinergně zprostředkované periferní analgesie.

Agonisté GABA receptorů. Endogenním zdrojem GABA v periferních tkáních mohou být primární aferentní vlákna obsahující glutamát. Glutamát je v těchto neuronech přeměňován na GABA pomocí enzymu glutamát dekarboxylázy, na jejich axonech jsou navíc exprimovány GABA_A receptory. V behaviorálních pokusech bylo zjištěno, že periferně aplikovaný agonista GABA_A receptorů, muscimol, zpočátku oslabuje a následně ve vyšších dávkách potencuje zánětlivé účinky formalínu. (332) Je to pravděpodobně důsledek iniciální slabé depolarizace primárních aferentů, která snižuje počet periferních akčních potenciálů a snižuje uvolňování algogenních substancí, následně pak dochází k depolarizaci nervového zakončení v plném rozsahu a zvýšení počtu akčních potenciálů. Aktivace GABA_B receptorů lokálně aplikovaným baklofenem má za následek výrazné snížení intenzity bolesti vyvolané formalínem. (212)

Gabapentin byl původně nasyntetizován jako antikonvulzivum a byl považován za analog GABA, jeho antikonvulzivní účinky však nesouvisí s gabaergními mechanismy. Systémově podávaný gabapentin je v klinické praxi analgeticky účinný v ovlivnění chronické neuropatické bolesti. (41) Lokálně aplikovaný gabapentin ovlivňuje nocicepci na periferní úrovni v případě formalínového testu, podstatou těchto účinků je lokální působení na GABA_B receptory a na uvolňování glutamátu z periferních zakončení. (215)

Neuropeptidy. Substance P přispívá na periférii k místním axonálním reflexům, po uvolnění ze senzoričkových nervových zakončení a následném uvolnění mediátorů z mastocytů se účastní i zánětlivé reakce a má zásadní úlohu v mechanismech neurogenního zánětu. Receptory pro substanci P jsou přítomny na senzoričkových nervových zakončeních a lokální injekce substance P vyvolá hyperalgezií, alodynii a potenciaci pronociceptivních účinků glutamátu, což naznačuje spoluúčast substance P v mechanismech nocicepce na úrovni periferních nervových zakončení. (136) Substance P rovněž zvyšuje cévní permeabilitu, působí chemotakticky na buňky bílé krevní řady, aktivuje fagocyty a zvyšuje produkci i uvolňování zánětlivých mediátorů z neutrofilních granulocytů a makrofágů. Substance P by tedy mohla hrát v periferních tkáních významnou úlohu v zánětlivých procesech jako je například artritida, klinické experimenty s antagonisty neurokininů však neprokázaly jejich výrazný efekt na kloubní bolest při artritických onemocněních.

Významnou roli v periferních mechanismech nocicepce hrají i další peptidy, například somatostatin nebo neuropeptid Y. Receptory pro somatostatin, který je přítomen v některých aferentních senzoričkových neuronech, jsou exprimovány na jejich primárních senzoričkových zakončeních a lokální aplikace somatostatinu působí analgeticky při behaviorálním formalínovém testu i při elektrofyziologické aktivaci senzoričkových aferentů teplem nebo chemikáliemi. (44) Somatostatin vykazuje pravděpodobně tonický inhibiční efekt, lokální působení antagonistů somatostatinu potencuje intenzitu bolesti vyvolané formalínem a zvyšuje vzruchovou aktivitu nociceptorů. (285) Na druhou stranu neuropeptid Y, který je uvolňován současně s NA a ATP z nervových vláken sympatiku, potencuje po lokální aplikaci k periferním nervovým zakončením hyperalgezií na modelu nervového poranění. (238)

Antagonisté receptorů pro mediátory zánětu.

Antagonisté prostanoidových receptorů. Inhibice syntézy prostaglandinů je podstatou účinku celé skupiny analgetik nazývaných souhrnně NSAID. Další strategií, jejímž základem by bylo ovlivnění účinku prostaglandinů, by bylo použití specifických antagonistů jistých prostanoidových receptorů. Všechny z velké rodiny prostanoidových receptorů jsou spřaženy s G-proteiny, přičemž způsob tohoto spřažení rozhoduje o konečném důsledku aktivace těchto receptorů. Hlavním účinkem prostanoidů na sensorické aferenty je jejich senzitivizace k chemickým, tepelným i mechanickým podnětům, přičemž hlavní úlohu v tomto procesu hrají prostaglandin E₂, prostacyclin I₂, leukotrien B₄ a leukotrien D₄. (83)

Antagonisté bradykininových receptorů. Aktivace bradykininových B₂ receptorů na sensorických neuronech způsobí bolest a hyperalgezií mechanismem depolarizace a senzitivizace nervových vláken k fyzikálním podnětům (tepelným a mechanickým), v jiných tkáních (například na buňkách imunitního systému nebo nervových vláknech sympatiku) pak facilitaci produkce mediátorů zánětu, konkrétně prostanoidů a cytokinů. (82) B₁ receptor je exprimován zejména v podmínkách zánětu a hraje tedy klíčovou roli v zánětlivé hyperalgezií, jeho prostřednictvím však bradykinin účinkuje na jiné struktury, než jsou sensorické nervy, například na buňky imunitního systému. (121) Antagonisté B₁ i B₂ receptorů peptidické povahy jsou k dispozici již delší dobu (30), avšak vývoj klinicky účinné látky primárně zaměřen na syntézu antagonisty jiné než peptidické povahy, dobře účinného při orálním podání. Možnost topické aplikace B₁ a B₂ antagonistů však nelze opomenout, protože při použití těchto preparátů by nebezpečil rozvoj vedlejších nežádoucích účinků v centrálním nervovém systému ani v jiných tkáních.

Antagonisté receptorů pro ATP. Excitační účinky ATP na sensorické neurony jsou zprostředkovány P_{2X3} a P_{2X2} ligandově – řízenými kationtovými kanály, které jsou selektivně exprimovány na kapsaicin – senzitivních vláknech typu C. (37, 253) V behaviorálních studiích se ukázalo, že lokální podání ATP a jeho analogů způsobí výraznou bolestivou reakci, která je intenzivnější v prostředí zánětu (287), a rozvoj mechanické alodynzie. (244) Po neurálním poranění dochází k up-regulaci P_{2X3} receptorů na neuronech spinálních ganglií a v zadních rozích míchy, ATP zvyšuje vzruchovou aktivitu Aβ-aférentních vláken a také sensorických jednotek vykazujících ektopickou vzruchovou aktivitu. Periferní receptory pro ATP na kapsaicin – senzitivních neuronech i na neuronech na kapsaicin necitlivých se tedy pravděpodobně účastní přenosu zánětlivé a neuropatické bolesti.

Antagonisté receptorů pro biogenní aminy. Periferní aplikace serotoninu hlodavcům vyvolá bolestivé reakce a hyperalgezií, zejména pak v kombinaci s dalšími zánětlivými mediátory jako jsou prostaglandin E₂, bradykinin, NA a histamin, nebo v kombinaci s formálním o nízké koncentraci. (282) U lidí způsobí výraznou bolest při aplikaci na subepidermis odkrytou na spodině puchýře. (113) Periferní účinky serotoninu jsou důsledkem aktivace ligandově – řízených kationtových kanálů přes 5-HT₃ receptory, ale i 5-HT₁, 5-HT₂ a 5-HT₄ receptory, které jsou spřaženy s G-proteiny. Lokální aplikace antagonistů selektivních pro některé z těchto receptorů snižuje intenzitu bolesti vyvolanou zánětlivými mediátory a zánětem (114), místní nebo topické formy antagonistů 5-HT₃ receptorů by proto mohly představovat účinný přístup v léčbě zánětlivé bolesti. U lidí snižuje topicky aplikovaný odansetron, selektivní antagonist 5-HT₃ receptorů, bolest vyvolanou injekcí kapsaicinu. (254)

Hlavním místním účinkem histaminu aplikovaného na kůži je svědění, což dokazuje jeho přímé účinky na sensorické nervy, a vasodilatace s následným lokálním zarudnutím a extravazací krevní plazmy. Histamin je do jisté míry schopný přímo aktivovat sensorické aferenty, pravděpodobněji je však jen senzitivizuje k působení zánětlivých mediátorů. Tyto stimulační účinky jsou zprostředkovány aktivací histaminových H₁ na sensorických

nervových vlákních, která má za následek zvýšení membránové permeability pro ionty kalcia. Na zvířecích modelech má lokální aplikace antagonistů histaminových H₁ receptorů analgetické účinky při testu s formalínem. (80) U lidí jsou topické antihistaminové preparáty jako například doxepin (tricyklické antidepresivum s výraznými antihistaminovými účinky) používány především k ovlivnění svědění, topicky aplikovaný doxepin je rovněž účinný v léčbě neuropatické bolesti. (198)

Antagonisté receptorů pro nervový růstový faktor (NGF). NGF hraje důležitou úlohu nejen ve vývoji, významnou funkci v regulaci vlastností sensorických neuronů v podmínkách nejrůznějších zánětlivých a neuropatických stavů má i v dospělém věku. NGF rozhodujícím způsobem ovlivňuje expresi regulačních peptidů, iontových kanálů i růstových faktorů v těchto neuronech.

Během zánětu se hladina NGF v tkáni zvýší, jeho účinky na sensorické neurony, mastocyty a sympatická eferentní vlákna přispívají k rozvoji hyperalgie. Aplikace anti-NGF protilátek účinně snižuje vznikající hypersenzitivitu, (240) prostřednictvím topické nebo lokální aplikace těchto molekul je možné selektivně ovlivnit periferní součásti nervové dráhy bolesti a zároveň minimalizovat centrální účinky.

V případě neuropatické bolesti významně uplatní neuroprotektivní účinky NGF na sensorické neurony. Funkční studie na experimentálních zvířecích modelech prokázaly, že NGF svým působením redukuje například toxické účinky streptozocinu a cytostatik na neurální funkci (10) a působí protektivně v případě neurálního traumatu. (11) U lidí bylo dokázáno, že rekombinantní lidský NGF zlepšuje neuropatie indukované chemoterapií (190), diabetické neuropatie (235), i sensorické neuropatie způsobené infekcí virem lidského imunodeficitu (HIV). (333) Na druhou stranu stimuluje NGF větvení sympatických vláken ve spinálních gangliích a přispívá k reflexní sympatické bolesti (223), při experimentální aplikaci do spinálních ganglií vyvolá perzistující alodynii. (50)

Kapsaicin. Pro běžné užívání v klinické praxi jsou k dispozici kapsaicinové preparáty (0,025% a 0,075%), jejich účinnost byla dokázána v mnoha klinických studiích a popsána v řadě kazuistik. Topicky aplikovaný kapsaicin je účinný v léčbě postherpetické neuralgie, bolesti spojené s diabetickou neuropatií, bolestivého syndromu souvisejícího s mastektomií, orální neuropatické bolesti, neuralgie trigeminu i onemocnění temporomandibulárního kloubu, migrenózních bolestí hlavy, bolesti při osteoartróze a dalších dermatologických onemocnění. V klinické medicíně však není topicky aplikovaný kapsaicin sám o sobě považován za dostatečný léčebný prostředek chronických bolestivých stavů, je používán spíše jako doplňující prostředek k jiným terapeutickým přístupům.

Vedlejším nežádoucím účinkem kapsaicinu je pálivá bolest v místě aplikace, dalším faktorem negativně ovlivňujícím spolupráci pacientů je zpožděný nástup analgetického účinku od okamžiku zahájení léčby trvající několik týdnů. Jedním ze způsobů minimalizace nežádoucích účinků a urychlení nástupu analgetického účinku kapsaicinu je jeho aplikace ve vysoké koncentraci (5-10%) za použití regionální anestézie. Tento přístup byl velmi efektivní v léčbě neuropatické bolesti (246), analgetický účinek v tomto případě přetrvával až osm týdnů. Naopak, lokální anestetika aplikovaná topicky současně s 1% kapsaicinem nebyla schopná zablokovat kapsaicinem indukovanou bolest ve studii Fuchse et al. (101)

Tato studie se zabývá analgetickými účinky kapsaicinu na zvířecím modelu chirurgické bolesti, představuje lokální aplikaci kapsaicinu jako jednu z možností léčby pooperační bolesti. Dále je zaměřena na objasnění úlohy periferních i centrálních kapsaicinových TRPV1 receptorů u tohoto druhu bolestivého stavu a možnosti jeho ovlivnění pomocí specifických antagonistů na těchto receptorech. Přispívá také k objasnění mechanismů jejich senzitivace.

1.4. Vaniloidní TRPV1 receptor a jeho úloha v nocicepci

1.4.1. Účinky kapsaicinu na senzorycké neurony

V polovině 19. století izoloval Tresh pálivou substanci z paprik rodu *Capsicum*, kterou pojmenoval kapsaicin (Tresh, 1846). O několik desítek let později zjistil Hogenes, že kapsaicinové extrakty selektivně působí na senzorycké neurony a způsobují bolestivý vjem (Hogenes, 1878). Nelson objasnil chemickou strukturu kapsaicinu jako acylamid kyseliny homovanilové, 8-methyl-N-vanilyl-6-noneamid (Nelson, 1919). V 50. a 60. letech 20. století demonstroval Jancso, že kapsaicin nejen aktivuje senzorycké neurony, ale způsobuje zároveň i resistenci experimentálních zvířat na bolestivé podněty. (140) Citlivost na kapsaicin se ukázala být nesmírně užitečným funkčním markerem subpopulace senzoryckých neuronů specializovaných na detekci nepříjemných a bolestivých podnětů různých modalit, tepelných, mechanických i chemických, je to jedna z hlavních farmakologických vlastností převážné většiny nociceptivních senzoryckých neuronů patřících do skupiny C- i A δ -vláken. Kapsaicin – senzitivní senzorycká vlákna inervují nejen kůži a sliznice, ale i svaly a orgány kardiovaskulárního, respiračního i urogenitálního systému, citlivostí na kapsaicin se vyznačují i některé neurony preoptického hypothalamu. Studium účinků kapsaicinu přineslo náhled do mechanismů aktivace primárních aferentních nociceptivních vláken a ukázalo schopnost některých nociceptorů fungovat i eferentním způsobem po aktivaci kapsaicinem, například regulovat napětí hladké svaloviny nebo glandulární sekreci v tkáních. Objev schopnosti kapsaicinu desenzitizovat nociceptory poskytl teoretický podklad pro užívání kapsaicinu a příbuzných chemických sloučenin k léčbě bolestivých stavů.

Excitační účinky kapsaicinu. Stimulace senzoryckého nervového vlákna kapsaicinem vyvolá zvýšení jeho membránové permeability pro kationty. Tím je umožněn influx kalciových a sodných iontů do intracelulárního prostoru kapsaicin-senzitivního aferentního neuronu, který je tímto mechanismem depolarizován. Kapsaicin způsobuje tento kationtový proud otevřením membránového kationtového kanálu, preferujícího dvojmocné kationty a málo specifického pro jednomocné kationty. Tento kanál se vyznačuje zevně usměřující proudově napěťovou závislostí, takže při daném membránovém potenciálu je jeho vodivost směrem ven z buňky větší než směrem dovnitř. To slouží k potenciaci influxu kalcia v depolarizační fázi akčního potenciálu a tím k regulaci kinetiky akčního potenciálu, aktivity iontového kanálu nebo uvolňování neurotransmiteru či neuromodulátoru z nociceptoru. Kationtový kanál aktivovaný kapsaicinem není citlivý k běžným blokátorům kalciových a sodíkových kanálů jako dihydropyridiny nebo tetrodotoxin. Kapsaicin aktivuje řadu dalších intracelulárních biochemických dějů v senzoryckém neuronu, zvyšuje intracelulární koncentraci cGMP, DAG i NO, stimuluje resyntézu IP₃ a uvolňování kyseliny arachidonové. Všechny tyto děje jsou až sekundární vzhledem k otevření iontového kanálu a iniciaci influxu kalcia.

Aktivace nociceptoru kapsaicinem způsobí uvolnění glutamátu a neuropeptidů (substance P, CGRP, neurokinin A) z jeho periferních i centrálních výběžků a tím je umožněn přenos senzorycké nociceptivní informace. Je to přímý důsledek excitačního účinku kapsaicinu na jeho receptorech způsobený dvěma různými mechanismy. V prvním z nich způsobí vtok vápníkových iontů skrz kapsaicinem aktivované iontové kanály uvolnění mediátorů nezávisle na vzniku a šíření akčního potenciálu. Pro druhý mechanismus je rozhodující depolarizace membrány neuronu způsobená kapsaicinem, která má za následek vznik akčního potenciálu. Akční potenciál se šíří a aktivuje vzdálenější oblasti neuronu od místa působení kapsaicinu k uvolnění neuropeptidů a glutamátu. Tento mechanismus je na depolarizaci membrány závislý.

Kapsaicinová senzitivita nervového vlákna je závislá na přítomnosti NGF. NGF reguluje kromě senzitivity na Kapsaicin i další charakteristiky nociceptivních neuronů, jako například obsah neuropeptidu substance P a CGRP. (315)

Eferentní funkce kapsaicin-senzitivních neuronů. Stimulace kapsaicinem může vyvolat uvolnění neuropeptidů z periferních zakončení nociceptorů. Jedná se především o substanci P, která způsobuje extravazaci plazmy, a CGRP způsobující vasodilataci. Periferní uvolňování neuropeptidů může být iniciováno buď mechanismem přímé aktivace periferního kapsaicin-senzitivního vlákna, nebo prostřednictvím aktivace kolaterálního zakončení stejného nociceptoru, další možností je retrográdní aktivace kapsaicin-senzitivního aferentního neuronu antidromním elektrickým stimulem. Druhý a třetí mechanismus je možné zablokovat lokálními anestetiky účinkujícími na napětově řízené sodíkové kanály, první je k účinku těchto farmak resistantní, tedy nezávislý na aktivitě napětově řízených sodíkových kanálů. Fyziologický význam eferentních funkcí kapsaicin-senzitivních neuronů spočívá v usnadnění přisunu plazmatických faktorů a buněk imunitního systému působením neurogeně uvolněných peptidů do místa působení podnětu, což má význam pro urychlení procesu hojení. Další význam těchto funkcí spočívá v regulaci glandulární sekrece v tkáni a napětí hladné svaloviny.

Kapsaicinem evokovaná desenzitizace periferních sensorických nervů. Kapsaicin způsobí v první fázi účinku aktivaci nociceptoru, vzruchovou aktivitu a zvýšení jeho citlivosti k tepelným i mechanickým podnětům. Tato fáze je typicky následována refrakterní periodou, během které se nociceptor stává resistantní k dalšímu působení kapsaicinu a jiným bolestivým podnětům. V závislosti na dávce kapsaicinu (od malých akutních dávek 1-10 mg kg⁻¹ s.c. k vyšším, které způsobí depleci zakončení primárních aferentních neuronů - jednorázová dávka 50 mg kg⁻¹ až do kumulativní celkové 950 mg kg⁻¹), druhu organismu (laboratorní krysa versus člověk, atd.), délce expozice, způsobu podání (lokální versus systémové), a mnoha dalších faktorech trvá tato refrakterní perioda různě dlouho. V rámci této kapsaicinem evokované desenzitizace můžeme rozlišit dva různé fenomény. Jednak je to klasická farmakologická desenzitizace, kdy prodloužené působení nebo opakovaná aplikace kapsaicinu vede k progresivnímu snižování odpovědi neuronu na další stimulaci kapsaicinem. Nastává tehdy, jestliže na neuron působí kapsaicin o nízké koncentraci a je plně reverzibilní. Citlivost tohoto neuronu na podněty jiných modalit není v tomto případě ovlivněna. Druhým fenoménem je tzv. funkční desenzitizace primárního aferentního neuronu, kdy expozice nervového vlákna kapsaicinu vede ke snížení nebo ztrátě citlivosti nejen na kapsaicin, ale i na další podněty jiných modalit. Je způsobena kapsaicinem o vysoké koncentraci a představuje jeden z mechanismů analgetického účinku kapsaicinu.

Citlivost neuronu na kapsaicin je dána přítomností kapsaicinových TRPV1 receptorů a dále citlivě regulována fosforylací některých proteinů, zejména samotného iontového kanálu. Proces desenzitizace je kalcium-dependentní, vzestup intracelulární koncentrace kalcia způsobený kapsaicinem aktivuje kalcium- a kalmodulin-dependentní cytosolický enzym proteinfosfatázu 2B (kalcineurin) a tato kalcium-dependentní aktivace kalcineurinu vede k defosforylaci kapsaicinového iontového kanálu. V důsledku této kalcium-dependentní defosforylace se pak výrazně sníží jeho aktivita. Tento mechanismus inaktivace kapsaicinového kanálu působením fosfatázy a jiných intracelulárních proteinů (např. různých enzymů a jiných iontových kanálů) je nejspíš hlavním podkladem kapsaicinem evokované farmakologické i funkční desenzitizace neuronu k různým podnětům.

Podání kapsaicinu o vysoké koncentraci může mít v konečném důsledku svého působení až neurotoxické účinky na kapsaicin – senzitivní neuron. Neurotoxické působení kapsaicinu je provázeno morfológickými změnami různého rozsahu, od lehkého zduření axonálního

zakońčení a mitochondrií až ke kompletní morfologické destrukci nociceptivních zakončení případně degeneraci neuronu. Rozsah těchto účinků závisí *in vivo* na druhu a stáří organismu, době působení, způsobu aplikace a na celkové dávce kapsaicinu. V extrémním případě dojde u novorozentých myši nebo krys po systémovém podání kapsaicinu k úplné selektivní degeneraci kapsaicin-senzitivních nervových zakončení skupiny C i A δ -vláken a k více než 80% ztrátě těl sensorických neuronů o malém průměru. V dospělém věku nejsou pak tato zvířata citlivá na chemické podněty jako kapsaicin, xylen aj. a stimulace těmito látkami u nich nevyvolá neurogenní zánět. Podle některých studií reagují méně také na tepelné a mechanické podněty. Po lokální aplikaci vysoké dávky kapsaicinu regenerují poškozené axony z proximálních částí bohatě větvičimi se výrůstky, somata jejich neuronů v tomto případě přežívají. Neuronální destrukce vyvolaná působením kapsaicinu je částečně osmotického původu a částečně mechanismem kalcium-senzitivních proteáz aktivovaných intracelulárním influxem iontů kalcia.

Kalcium je aktivována ještě celá řada dalších procesů, které přispívají ke kapsaicinem způsobené desenzitizaci a morfologické neuronální degeneraci. Neurodegenerace je provázena akumulací kalcia v mitochondriích. Dochází k depleci substance P a CGRP z neuronálních vezikul i nespecifické blokádě napětově řízených iontových kanálů, včetně kalciových. Mechanismus této inhibice spočívá pravděpodobně v kalcium-dependentní metabolické modifikaci kanálů nebo jiného klíčového proteinu, inhibice napětově řízených kalciových kanálů přetrvává dobu účinku kapsaicinu na jeho receptorech. Protože jsou napětově řízené kalciové kanály zodpovědné za uvolnění transmiterů z centrálních a periferních zakončení sensorického neuronu při jeho aktivaci, má jejich inhibice působením kapsaicinu za následek zablokování uvolňování neurotransmiterů na synapsích a tím i blokádu synaptického přenosu vzruchu z kapsaicin-senzitivních primárních nociceptorů na postsynaptické neurony v zadních rozcích míchy.

1.4.2. Vaniloidní receptory a jejich charakteristika

K objasnění podstaty sensorického přenosu nociceptivní informace na úrovni molekulárních mechanismů přispěl významnou měrou objev a funkční charakteristika TRP iontových kanálů (transient receptor potential), které představují jednu z hlavních skupin transdukčních molekul. Všechny proteiny TRP rodiny mají do značné míry podobnou primární strukturu a byly poprvé identifikovány ve zrakové dráze *Drosophila melanogaster*. TRP iontové kanály odpovídají na fyzikální i chemické podněty a mají řadu různých funkcí. Uplatňují se v sensorických procesech v orgánech zraku, čichu, mechanické a osmotické citlivosti, chuti a nocicepci, mohou hrát roli i ve vazorelaxaci, řízení buněčného cyklu nebo kancerogenezi. (210) Tato rodina TRP proteinů, pro něž bylo u člověka zatím identifikováno 27 různých genů, je uspořádána podle podobnosti aminokyselinových sekvencí do sedmi podskupin: TRPC (canonical, classical), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPA (ankyrin), TRPN (podle prvního identifikovaného kanálu této skupiny NOMPC), TRPML (mucolipin) a TRPP (polycystin). Kapsaicinový TRPV1 receptor patří podle aminokyselinové sekvence do skupiny TRPV rodiny TRP iontových kanálů a zaujímá mezi nimi zvláštní místo. Objev molekulární struktury TRPV1 vaniloidního receptoru (51) představuje zlom v molekulární biologii percepce tepelných a chemických bolestivých podnětů, přineslo poznání jejich molekulárních základů. Protože je TRPV1 aktivován nejen chemickými látkami, jako jsou kapsaicin, extracelulární acidosa a různé algogenní mediátory lipidové povahy vznikající v místě poranění nebo zánětu, ale také zvýšením okolní teploty na 43°C, slouží TRPV1 jako molekulární integrátor fyzikálních a chemických bolestivých podnětů. TRPV1 kanál podléhá významnou měrou senzitivaci v prostředí zánětu pod vlivem působení tkáňových mediátorů. Díky těmto vlastnostem je TRPV1 jednou z klíčových bran pro přenos

bolesti a molekuly ovlivňující jeho funkci jsou v popředí zájmu při snaze ovlivnit vnímání bolesti. (98)

První myšlenka pravděpodobné existence specifického vazebného místa pro kapsaicin měla svůj původ ve zjištění, že ostatní látky, které mají na TRPV1 receptor aktivační účinky, jsou svojí chemickou strukturou kapsaicinu velmi podobné. Byla podpořena objevem derivátu forbol esteru resiniferatoxinu obsaženého v latexu afrického sukulentu *Euphorbia resinifera*, který je velmi potentním chemickým iritantem a vysoce účinným, exogenním agonistou TRPV1 receptoru. Tato látka je chemicky blízce příbuzná kapsaicinu, sdílí s ním stejnou chemickou skupinu homovanilyl, která dala vaniloidnímu receptoru svůj název. Resiniferatoxin má excitační a desenzitizační účinky podobné účinkům kapsaicinu, ale už v 1000-krát nižších koncentracích. Vysoce specifická účinnost a lipofobicita resiniferatoxinu umožnila používat [H^3]resiniferatoxin jako účinný radioligand k identifikaci kapsaicinových vazebných míst na membránách neuronů. Identifikace vazebných míst pro [H^3]resiniferatoxin na periferních nervových zakončeních, tělech neuronů a centrálních zakončeních senzoryckých neuronů potvrzuje výsledky funkčních studií, které prokázaly senzitivitu na vaniloidní sloučeniny ve všech těchto subcelulárních lokalizacích. V míše se kapsaicinové receptory nacházejí na primárních aferentech i postsynapticky, zejména v superficiálních laminách zadního rohu míchy (lamina I a II), což odpovídá centrální projekci většiny C-vlákén. (79, 130, 132, 157, 292) Nacházejí se i v zadních míšních kořenech a gangliích trigeminu, rovněž i v ncl. caudalis trigeminálního komplexu. Zajímavá je heterogenita v populaci IB4-pozitivních C-vlákén. kapsaicinové receptory byly objeveny pouze na skupině IB4-pozitivních vlákních terminujících v mediálních částech lamina IIi, ne v laterálních částech lamina III. Tento fakt může souviset se somatotopickým uspořádání těchto vláken v zadním rohu míchy. Vaniloidní receptory byly objeveny rovněž v některých jádrech mozku pomocí PCR, in situ hybridizace a imunohistochemického barvení. TRPV1 kanály se nachází i v jiných buňkách než nervových, jako například v epiteliích, mukose i submukose močového měchýře, v buňkách hladké svaloviny nebo v keratinocytech epidermis. Z tohoto pozorování vyplývá, že tyto receptory mohou hrát významnou roli i v neurogenním zánětu a viscerální bolesti. TRPV1 receptory byly lokalizovány nejen na buněčné membráně těchto buněk, ale i v Golgiho aparátu a malých vezikulách.

TRPV1 definuje rodinu TRPV proteinů, které můžeme dále rozdělit do šesti skupin (TRPV1 – TRPV6). Montell a Rubin po naklonování TRP lokusu zjistili, že podjednotky všech TRPV kanálů mají podobnou prostorovou strukturu, která se vyznačuje 6 transmembránovými doménami (S1 – S6) s krátkým hydrofobním řetězcem spojujícím transmembránové segmenty 5 a 6 (P – klička), oblastí póru nacházející se mezi pátým a šestým transmembránovým segmentem a cytoplazmatickými N- a C- konci. Podjednotka vaniloidního receptoru TRPV1 je protein o 838 aminokyselinách a předpokládané molekulové hmotnosti 92 – 95 kDa. Hydrofilní N-konec orientovaný intracelulárně tvoří více než polovinu tohoto proteinu (432 aminokyselin), obsahuje oblasti bohaté na prolin a tři ankyrinové domény, které pravděpodobně interagují s proteiny cytoskeletu. C-konec směřuje rovněž do nitra buňky, je podstatně kratší než N-konec (154 aminokyselin) a obsahuje důležitá fosforylační místa pro proteinkinázy a vazebné domény pro kalmodulin, fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) a ATP. (209) Proteinové podjednotky TRPV1 receptoru se skládají v plazmatické membráně do tetramerů s centrálním hydrofilním pórem uprostřed a vytvářejí tak neselektivní kationtové kanály. Existují tři homologní podjednotky TRP kanálů formující různé homotetramery a není vyloučeno, že se vaniloidní receptor může i heteromerizovat s podjednotkami kanálů příbuzných. Důležitými a specifickými funkčními strukturálními oblastmi vaniloidního receptoru jsou vazebná doména pro specifický ligand, oblast póru iontového kanálu včetně selektivního filtru a N- a C-koncové části receptoru. (138, 156, 268)

Vazba ligandu na TRPV1 receptor. Molekula kapsaicinu má tři funkční regiony. Aromatický A region představovaný homovanilovou skupinou, B region obsahující esterickou nebo amidovou spojovací vazbu a alifatický lipofilní C region reprezentovaný oktanylovým řetězcem. Aromatická část molekuly kapsaicinu a amidová vazba obsahují polární skupiny, které interagují vodíkovými můstky a jsou esenciální pro excitaci senzoryckých neuronů. Naopak lipofilní alifatický řetězec interaguje hydrofobně s dutinou receptoru a účastní se patrně interakce s vazebným místem vaniloidního receptoru.

Doména TRPV1 receptoru zodpovědná za interakci s vaniloidy byla identifikována na intracelulární části tohoto receptoru, a to v oblasti intracelulární klíčky spojující S2 a S3 segmenty. Také pomalý nástup kapsaicinem vyvolaných membránových proudů naznačuje, že k účinnému navázání na receptor je zapotřebí průchod kapsaicinu membránou z extracelulární na intracelulární stranu. (297) Klíčovou strukturní determinantou tohoto vazebného místa je aminokyselina Tyr511 na N-konci S3 domény. Thr550 a Met547, jež se nacházejí v místě čtvrté transmembránové domény S4 se rovněž podílejí na vazbě vaniloidních sloučenin. Bylo prokázáno, že citlivost ke kapsaicinu je určena i pozitivním aminokyselinovým zbytkem Arg114 na N-konci a negativním zbytkem Glu761 C-konce. (151) Lipofilní transmembránová oblast S3 - S4 se účastní hydrofobních interakcí s alifatickou částí molekuly kapsaicinu, kdežto nabitě aminokyselinové zbytky lokalizované na terminálách receptoru mohou tvořit hydrofilní část vazebné domény.

Oblast póru TRPV1 receptoru. Oblast póru TRPV1 kanálu je tvořena čtyřmi S5-P-S6 proteinovými úseky jednotlivých podjednotek. Segment S5 tvoří zevní šroubovici, segment S6 formuje vnitřní šroubovici póru, P-klička je zodpovědná za selektivitu kanálu. Negativně nabitě aminokyselinové zbytky lokalizované na P-kličce (zejména Glu636 a Asp646) vytvářejí na vnější části vestibulu póru tetramerního TRPV1 kanálu negativní prsteneц koordinující propustnost a představující selektivní filtr TRPV1 kanálu pro průchod kladně nabitých iontů. (98, 105) Kruh složený ze čtyř P-kliček tedy pravděpodobně tvoří vnitřní jádro kanálu v oblasti extracelulární domény, zatímco S6 šroubovice tvoří stěny póru na intracelulární straně.

C-koncová doména TRPV1 receptoru. Tato 154aminokyselinová sekvence se podílí nejen na tetramerizaci receptorů a tím vytváření iontových kanálů, ale účastní se také významných mechanismů, jakými jsou procesy aktivace/deaktivace, senzitivace/desenitivace a modulace citlivosti kanálu.

Hlavním mechanismem senzitivace proudových odpovědí vyvolaných na primárních nociceptorech bolestivým teplem či kapsaicinem v přítomnosti některých mediátorů zánětu (bradykinin, serotonin, prostagladin) je fosforylace vaniloidního receptoru. C-terminální doména TRPV1 receptoru je velmi bohatá na potenciální fosforylační místa, a proto rozhodujícím způsobem ovlivňuje míru afinity receptoru k agonistům i otevírání kanálu. Mezi zatím poznaná důležitá fosforylační místa patří Ser800 a Thr704, která jsou fosforylována proteinkinázou C (PKC) (186), seriny 774 a 820, jež představují fosforylační místa pro cAMP-závislou proteinkinázu A (PKA) (207) a Thr704, který je fosforylován kamodulin-závislou kinázou II (CaMK II). (152) Cytosolová C-koncová doména TRPV1 obsahuje rovněž vazebnou doménu pro fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) důležitou pro citlivost receptoru a mající inhibiční charakter (232), dále místo pro interakci s kalmodulinem, které hraje roli v desenzitivaci závislé na přítomnosti vápenatých iontů (221), vazebnou doménu pro ATP (163) a tzv. TRP box, asociační doménu zodpovědná za tetramerizaci receptoru. (106) Fosforylační místo PKC – S800 se nachází uprostřed vazebného místa pro PIP₂, aktivace

TRPV1 působením PKC je tedy pravděpodobně způsobena aspoň zčásti přerušením interakce TRPV1 a PIP₂. C-terminála i N-konec se účastní vazby receptoru s proteiny cytoskeletu. (116)

1.4.3. TRPV1 je polymodální detektor bolestivých fyzikálních a chemických podnětů

Slabě kyselé extracelulární prostředí potencuje aktivaci TRPV1 bolestivými tepelnými podněty a chemickými agonisty, silně kyselé podmínky tento kanál aktivují přímo. Vaniloidy a kyselé pH snižují práh TRPV1 pro tepelné podněty z bolestivých na nebolestivé teploty. TRPV1 je tedy integrátorem fyzikálních a chemických bolestivých podnětů v pravém slova smyslu. (52, 98)

Detekce tepelných podnětů. Mnoho proteinů, včetně receptorů a iontových kanálů, vykazuje změny struktury nebo funkční změny v závislosti na teplotě. TRPV1 receptor má sám o sobě velmi zvláštní tepelnou charakteristiku, jeho teplotní citlivost je v rozsahu teplot, které u experimentálních zvířat i lidí vyvolávají bolest (43 – 52 °C). Strukturálně-funkční studie prokázaly, že teplotní práh vaniloidního receptoru je regulován především distální částí jeho karboxylového řetězce. (51)

Citlivost TRPV1 receptoru na kapsaicin a tepelné podněty významně koreluje, a to *in vivo* i na buněčných kulturách, vykazuje rovněž zkříženou desenzitizaci. Aktivaci oběma typy podnětů lze zablokovat TRPV1 antagonisty, odpověď TRPV1 receptoru na kapsaicin i bolestivý tepelný podnět se vyznačuje vně usměrňující proudově napět'ovou závislostí a vysokou propustností pro ionty kalcia. Rozdíly v mechanismech aktivace i desenzitizace TRPV1 receptoru oběma typy podnětů však existují. Důkazem tohoto faktu je například pozorování, že pro desenzitizaci TRPV1 receptoru tepelným podnětem je potřeba jiná koncentrace extracelulárního kalcia než pro desenzitizaci působením kapsaicinu. (284) Existují i drobné rozdíly v odpovědích sensorických neuronů na chemické a tepelné podněty týkající se například relativní permeability pro sodné a kalciové ionty nebo citlivosti na různé antagonisty TRPV1 receptoru. Přítomnost zánětlivých mediátorů (prostaglandin, bradykinin, serotonin, histamin), ATP a zvýšené koncentrace protonů snižuje teplotní práh pro aktivaci TRPV1, což může být podstatou zesílení vjemu bolestivých podnětů (hyperalgie) typické při zánětu a anoxii. (98, 149, 284)

Aktivace TRPV1 acidosou. Protony snižující extracelulární pH na hodnoty nižší než fyziologické jsou významnou součástí tkáňové odpovědi na infekci, zánět nebo ischemii. Lokální snížení hodnoty pH (<6,8) vznikající v okolí poraněné, zanícené nebo ischemické tkáně je jedním z přirozeně se vyskytujících aktivátorů TRPV1 receptorů *in vivo*. (123) Protony jsou schopny modulovat aktivitu mnoha dalších receptorů a iontových kanálů exprimovaných na membránách primárních aferentních vláken, včetně degenerinových kanálů aktivovaných acidosou a kanálů aktivovaných ATP. (51, 57, 170)

Protony fungují nejen jako přímé aktivátory, ale i jako endogenní a exogenní modulátory TRPV1 receptorů. Mírně kyselé prostředí výrazně zesiluje elektrickou aktivitu neuronu vyvolanou navázáním kapsaicinu nebo jiného ligandu. Extracelulární protony rovněž potencují elektrické proudy na membráně neuronu vyvolané tepelným podnětem. Kyselé pH výrazně snižuje práh pro aktivaci TRPV1 receptoru tepelným podnětem až do takové míry, že extracelulární pH snižené na hodnotu 6,3 umožní aktivaci TRPV1 tepelným podnětem 35 °C, tedy podnětem, na který za fyziologických podmínek (pH 7,6) není tento receptor citlivý. Toto zvýšení citlivosti na tepelné podněty způsobené acidosou odpovídá tepelné hyperalgezií spojené se zánětem a jinými tkáňovými poškozeními. Dojde-li k poklesu pH pod 6,0, TRPV1 je přímo aktivován, otvírá se iontový kanál a je vyvolán trvalý transmembránový proud tímto iontovým kanálem. (51, 149, 284)

Protony primárně zvyšují pravděpodobnost otevření iontového kanálu. Kyselý roztok aktivuje TRPV1 receptor pouze pokud je aplikován z vnějšku membrány, což svědčí o tom, že protony ovlivňují jeho aktivitu prostřednictvím interakce se specifickými negativně nabitými aminokyselinovými zbytky lokalizovanými na extracelulární kličce mezi 5. a 6. transmembránovou doménou. Tím allostericky modulují jeho aktivitu. (284)

Aktivace TRPV1 působením lipidových sloučenin. Mezi endogenní vaniloidy aktivující TRPV1 receptor patří tři skupiny látek, které vznikají metabolismem kyseliny arachidonové. Řada těchto substancí lipidové povahy, často fungujících jako druhé posly v intracelulárních signálních kaskádách (např. polynenasycené mastné kyseliny a jejich deriváty, kyselina linolenová, diacylglycerol, aj.), je svojí chemickou strukturou příbuzná kapsaicinu. Tyto endogenní látky vaniloidní povahy jsou produkovány především v prostředí poraněné nebo zanícené tkáně a je více než pravděpodobné, že v tomto prostředí aktivují TRPV1 receptory nebo modulují jejich citlivost na jiné podněty. (28) Vyvolávají neselektivní kationtový proud působením specificky na TRPV1 receptory, avšak jsou výrazně slabšími agonisty na těchto receptorech než kapsaicin a vyvolávají odpovědi s o něco pomalejší kinetikou. Jejich účinky lze zablokovat pomocí TRPV1 antagonistů. K modulaci nebo aktivaci TRPV1 receptorů působením lipidových sloučenin je nutná jejich vysoká koncentrace. Otázkou zůstává, jestli je v tkáních za fyziologických nebo případně patologických podmínek *in vivo* tak vysoké koncentrace dosaženo. Polynenasycené mastné kyseliny a strukturně příbuzné metabolity jsou však produkovány za pomoci řady enzymů z membránových fosfolipidů, a tím je jejich přístup k receptorům na membráně té stejné nebo přilehlé buňky velmi snadný a efektivní. Navíc, v podmínkách tkáňové léze nebo zánětu mohou makrofágy a endotelie uvolňovat zvýšené množství těchto substancí do těsně omezeného mezibuněčného prostoru, takže jejich lokální koncentrace pravděpodobně může dosáhnout v těchto případech účinných hodnot. Jejich fyziologický význam se navíc v poraněné nebo zanícené tkáni uplatňuje v kombinaci s dalšími aktivátory TRPV1 receptorů, například zvýšenou teplotou nebo zvýšenou koncentrací protonů. (52)

Do první skupiny přirozených ligandů TRPV1 receptoru patří bioaktivní lipid anandamid, vznikající štěpením N-arachidonoylfosfatidylethanolaminu fosfolipázou D, který je současně hlavním endogenním aktivátorem kanabinoidových receptorů CB1 a CB2. (335) Tento strukturální analog kapsaicinu způsobuje v nanomolárních koncentracích analgesii a inhibuje uvolňování CGRP v tkáních účinkem na kanabinoidové receptory exprimované na membránách primárních sensorických neuronů. Ve vyšších koncentracích působí na TRPV1 receptory a jeho fyziologické účinky zprostředkované těmito receptory jsou zcela opačné než zprostředkované kanabinoidovými receptory. Hlavní účinek anandamidu na TRPV1 receptorech je potence jejich odpovědi na další podněty, zejména na tepelné a acidosu. V podmínkách zvýšené teploty nebo zvýšené koncentrace protonů je efekt anandamidu jako TRPV1 agonisty výrazně silnější. Zánětlivé substance jako ATP, bradykinin, serotonin, leukotrieny a prostaglandiny navíc stimulují produkci lipidových druhých poslů, které dále senzitivizují nociceptivní vlákno a tím zvyšují jeho excitabilitu. Anandamid produkováný non-neuronálními buňkami pak působí synergicky s těmito modulatory a ovlivňuje aktivitu TRPV1 kanálů na přilehlých nervových zakončeních. Anandamid je spolu s druhou skupinou endogenních TRPV1 agonistů, a to látek vznikajících z kyseliny arachidonové působením lipooxygenázy (např. kyselina 12- nebo 15-(S)-hydroperoxyeikosatetraenová, leukotrien LB4) (131), jedním z několika endogenních lipidů schopných i přímé aktivace TRPV1 receptorů v příslušných koncentracích. V nedávné době byla identifikována ještě třetí skupina těchto látek, do které patří NADA (N-arachidonyl dopamin), endogenní substance účinkující jako potentní agonsita na TRPV1 a CB1 receptorech v nanomolárních koncentracích. Zatímco je účinnost NADA na TRPV1 receptory srovnatelná s kapsaicinem,

anandamid a produkty lipooxygenázy jsou minimálně 20 – krát slabšími agonisty. Podstata jejich nízké afinity k TRPV1 receptorům oproti NADA nebo kapsaicinu je v chemické struktuře. Jejich molekula sice obsahuje dlouhý uhlíkový nenasycený řetězec, nutný k interakci s TRPV1 receptorem, ale nemá vanilylovou skupinu. Molekula NADA ve své struktuře kromě nenasyceného uhlíkového řetězce vanilylovou skupinu obsahuje, její vazba na TRPV1 receptor je tudíž efektivnější. Kromě NADA existují v nervové tkáni savců minimálně další tři N – acyldopaminové substance, jejichž katecholová funkční skupina se podobá struktuře kapsaicinu, a to OLDA (N-oleoyl dopamin), PALDA (N-palmitoyl dopamin) a STEARDA (N-stearyl dopamin). (61) Ke studiu funkce TRPV1 receptorů se zdá být nejvhodnější OLDA. Je přísně selektivním endogenním agonistou na TRPV1 receptorech bez prokazatelného účinku na CB1 receptory a svým působením na TRPV1 receptory indukuje v *in vivo* experimentech výraznou termální hyperalgezi s mnohem větší potencí než NADA. (61, 279)

Specifická vazebná místa těchto lipidových sloučenin na TRPV1 receptoru nebyla dosud stoprocentně identifikována a rovněž je málo známo o mechanismech aktivace TRPV1 těmito agonisty. Váží se pravděpodobně na intracelulární část TRPV1 receptoru jako kapsaicin, ale není zcela jisté, jestli se váží na stejné vazebné místo s kapsaicinem. I když je účinky obou těchto látek možné zablokovat TRPV1 antagonistou, vyplývá z výsledků některých elektrofyziologických a biochemických studií, že kapsaicin a agonisté na TRPV1 receptorech lipidové povahy účinkují odlišným mechanismem. Tento fakt podporuje pozorování, že mírně kyselé prostředí (pH 6,4) sice významně potencuje účinky kapsaicinu, ale ne anandamidu na TRPV1 receptorech.

Úloha TRPV1 v senzitivaci nociceptoru spojené s tkáňovým poraněním a zánětem. Poranění spojená se zánětem, infekcí a hypoxií jsou provázána výlevem mediátorů zánětu a lokálním zvýšením kyselosti a teploty usnadňujícím aktivaci nociceptorů a vznik bolesti. Díky schopnosti TRPV1 receptoru detekovat a integrovat chemické i fyzikální informace má tento kanál klíčový význam pro přínos informace o fyziologickém prostředí daného primárního aferentního vlákna, ve kterém se právě nachází, a pro ovlivnění jeho excitability. TRPV1 významně přispívá k periferním a pravděpodobně i k centrálním mechanismům zodpovědným za senzitivaci nociceptoru. Zdá se být zcela esenciální zejména pro rozvoj tepelné hyperalgie spojené se zánětem, zánětem vyvolaná hypersenzitivita na tepelné podněty je důsledkem konvergentního působení tepla, nízkého pH a zánětlivých mediátorů na TRPV1 receptor.

Aktivita vaniloidního receptoru TRPV1 je v plazmatické membráně nervových buněk ovlivňována řadou adaptorových a signálních molekul i proteiny cytoskeletu. Velmi významným regulátorem TRPV1 aktivity je například fosfolipáza C, která rozštěpením PIP₂ uvolňuje tento receptor z konstitutivní inhibice. (232) Na regulaci funkce TRPV1 kanálu se podílí i další buněčné enzymy (proteinkinázy, fosfolipázy, fosfatázy, atd.), které jsou odpovědné za různé posttranslační modifikace TRPV1 proteinu, které ovlivňují jeho chemické i biologické vlastnosti a tím mohou být příčinou jeho senzitivace. Jsou aktivovány metabotropními receptory tkáňových mediátorů zánětu exprimovaných na membráně nociceptoru prostřednictvím G-proteinů. Příkladem je bradykininový receptor B₂, TrkA receptor pro nervový růstový faktor (NGF) a P_{2Y1} receptor pro ATP. Senzitivace vaniloidního receptoru, jako jeden z hlavních mechanismů modulace jeho aktivity, je závislá především na míře fosforylace TRPV1 proteinu. Naproti tomu defosforylace fosfatázou 2B (kalcineurinem) je zodpovědná za desenzitivaci vaniloidního receptoru, při níž se v přítomnosti agonisty rychle ztrácí aktivita receptoru následkem jeho konformační změny. (208)

Amaya a spolupracovníci prokázali imunohistochemicky vzestup hladiny NGF a GDNF ve spinálních gangliích při zánětu a zároveň zvýšení exprese TRPV1 na membránách

peptidergních i non-peptidergních neuronů. Tato zvýšená exprese TRPV1 způsobená zánětem byla zablokována anti-NGF a anti-GDNF protilátkami, obě protilátky rovněž zablokovaly tepelnou hyperalgezií indukovanou zánětem. Zvýšené hladiny NGF i GDNF pravděpodobně při zánětu facilitují expresi TRPV1 na různých populacích neuronů a přispívají tak k rozvoji tepelné hyperalgezie spojené se zánětem. (9) K rozvoji hyperalgezie může tedy kromě různých posttranslačních modifikací proteinu TRPV1 přispívat i up-regulace exprese tohoto receptoru. (52)

1.4.4. Genetická analýza funkce TRPV1 receptoru

Ke studiu funkce kapsaicinových TRPV1 receptorů byl vyvinut speciální kmen experimentálních myší s delecí genu pro TRPV1. Tato zvířata vykazují normální vzhled i chování, jsou fertilní, vývoj sensorických spinálních ganglií je u nich i přes absenci TRPV1 neovlivněn. (50)

Deficit v akutní nocicepci TRPV1^{-/-} zvířat. Kultivované neurony spinálních ganglií těchto zvířat ani sensorická nervová vlákna na preparátu kůže-nerv neodpovídají elektrofyziologicky *in vitro* na stimulaci látkami vaniloidní povahy. *In vivo* se tento deficit projeví výrazným snížením bolestivé behaviorální reakce na intraplantární injekci kapsaicinu nebo resiniferatoxinu, u TRPV1 ^{-/-} myší se po subkutánní injekci kapsaicinu nerozvíjí neurogenní zánět ani hypotermie.

Na stimulaci acidosou odpovídá v elektrofyziologických pokusech méně než 7% neuronů spinálních ganglií TRPV1 ^{-/-} myší na rozdíl od 30% v případě kontrolních zvířat. Podobné výsledky přinesly pokusy na preparátu kůže-nerv, kdy má absence TRPV1 za následek snížení proporce sensorických vláken citlivých na acidosu až o 90%.

40% kultivovaných neuronů spinálních ganglií normálních zvířat odpovídá v *in vitro* elektrofyziologických pokusech na tepelné podněty 43°C a vyšší (tato část odpovídá kapsaicin-senzitivním neuronům), 10% má práh aktivace 52°C. Mezi neurony spinálních ganglií TRPV1 ^{-/-} zvířat je stejná proporce vysokoprahových termosenzitivních neuronů, neurony aktivované teplotami od 43°C však u těchto zvířat nenacházíme. Deficit v termosenzitivitě sensorických nervových vláken lze sledovat i na preparátu kůže-nerv, citlivost na mechanické podněty absencí TRPV1 ovlivněna není. Při elektrofyziologickém snímání neuronů zadních rohů míchy bylo u TRPV1 ^{-/-} zvířat zjištěno snížení aferentní nociceptivní vzruchové aktivity po stimulaci bolestivým tepelným podnětem, vzruchová aktivita vyvolaná mechanickou stimulací u těchto zvířat ovlivněna nebyla. *In vivo* lze u TRPV1 ^{-/-} zvířat pozorovat oslabení reflexních reakcí na akutní tepelné podněty oproti kontrolám pomocí různých behaviorálních testů, přičemž výrazné snížení se týká zejména odpovědi na vyšší teploty vnímané bolestivě.

Oslabení termální hyperalgezie indukované tkáňovým poraněním u TRPV1 ^{-/-} zvířat. Po indukci tkáňového zánětu nebo v případě neurálního poranění (např. při podvazu sedacího nervu) dochází u normálních myší ke zvýšení senzitivity na termální i mechanické podněty. TRPV1 ^{-/-} myší se po poranění periferního nervu stávají zvýšeně citlivé na teplené i mechanické podněty. Naopak, po indukci zánětu v periferní tkáni u nich k rozvoji termální hyperalgezie nedochází. TRPV1 se tedy jeví jako esenciální v rozvoji tepelné hyperalgezie spojené s periferním zánětem, ne však v rozvoji termální hyperalgezie způsobené neurálním traumatem. (52)

1.5. Účinky kapsaicinu a experimentální studie na zvířatech *in vivo*

1.5.1. Akutní bolest

Systémová aplikace kapsaicinu. U dospělých krys, kterým byl v neonatálním období podáván kapsaicin, byla několika studiemi prokázána analgesie k bolestivým mechanickým, chemickým podnětům, případně analgesie k bolestivým podnětům obou modalit v důsledku destrukce kapsaicin – senzitivních neuronů. Naproti tomu, odpovědi na stimulaci teplem nejsou konzistentní, některé studie prokázaly zvýšení prahu pro tepelné podněty, jiné neprokázaly žádnou změnu. Podobné výsledky přinesly studie na myších, po aplikaci kapsaicinu v neonatálním období byla pozorována výrazná analgesie k chemickým, ne však k tepelným podnětům. Variabilita ve zjištěných výsledcích mohla být důsledkem různých dávkovacích schémat použitých v těchto studiích (počet aplikací/ použité koncentrace kapsaicinu) nebo může být vysvětlena výraznými rozdíly v senzitivitě jednotlivých zvířat, které byly zjištěny po jednorázové aplikaci vysoké dávky kapsaicinu v neonatálním období.

Podobný efekt má i systémové podání kapsaicinu dospělým zvířatům (35 – 950 mg kg⁻¹ s.c.). Ačkoliv se zpočátku předpokládalo, že kapsaicin v této dávce způsobí poškození mitochondrií a depleci neuropeptidů ze sensorických nervových zakončení bez jejich úplné morfologické degenerace, byla i v těchto studiích jasně prokázána ztráta sensorických C-vlákén účinkem kapsaicinu. U těchto zvířat bylo zjištěno zřetelné snížení prahu pro chemické a mechanické podněty, a zároveň zvýšení, žádná změna nebo malé snížení prahu pro tepelné podněty. Dále byl pozorován krátkodobý analgetický a protizánětlivý účinek kapsaicinu trvající několik hodin u řady zvířecích modelů akutní i chronické bolesti. Nicméně, potencionální terapeutické využití analgetických účinků systémově aplikovaného kapsaicinu u lidí je omezeno jeho nízkou biologickou dostupností a úzkým terapeutickým oknem mezi dávkou potřebnou k analgetickému účinku a dávkou způsobující nežádoucí účinky jako například hypotermii. (315)

Lokální aplikace kapsaicinu. Intraplantární injekce kapsaicinu v dávkách 1, 10 a 30 µg (v 10 µl vehikulu) způsobí u experimentálních krys hyperalgie k termálním i mechanickým podnětům, přičemž tepelná hyperalgie přetrvává přibližně 45 minut, mechanická až 4 hodiny od okamžiku aplikace kapsaicinu, doba trvání a intenzita je přímo úměrná použité dávce kapsaicinu. (112) V další fázi jeho účinku následuje rozvoj hypoalgie charakterizované sníženou intenzitou vnímání bolesti v místě aplikace.

Topická aplikace 1% kapsaicinu na kůži krysy způsobí rovněž iniciální excitaci následovanou desenzitizací k bolestivým chemickým, mechanickým a tepelným podnětům, výsledky různých experimentálních studií testujících účinky topicky aplikovaného kapsaicinu jsou však velmi kontroverzní. Jejich variabilita může být dána různým počtem aplikací kapsaicinu v těchto studiích a také různým chemickým složením nosných substancí pro kapsaicin, které byly použity k jeho topické aplikaci na kůži. Chemické složení a vlastnosti těchto substancí je rozhodující pro rychlost a celkový rozsah penetrace kapsaicinu do kůže, míra účinků topicky aplikovaného kapsaicinu je výrazně závislá na použité nosné substancii.

Studie Cartera a Francise (46) neprokázala žádnou změnu prahu pro tepelné podněty po topické aplikaci 1% nebo 5% kapsaicinu třikrát denně po dobu čtyř dnů. Na konci této studie však intradermální injekce 0,1% kapsaicinu způsobila výrazné zvýšení prahu pro tepelné podněty, což naznačuje, že nevýrazný účinek topicky aplikovaného kapsaicinu na kůži byl v této studii způsoben jeho nízkou biologickou dostupností. Třikrát opakovaná topická aplikace 1% kapsaicinu během 24 hodin byla dostatečná k výrazné redukci extravazace plazmy vyvolané 5% kapsaicinem nebo antidromní nervovou stimulací. Po topické aplikaci kapsaicinu na kůži a snímání elektrické aktivity C-vlákén nervus saphenus byla pozorována ztráta citlivosti na tlak, zatímco citlivost na tepelné podněty byla zvýšená nebo snížená

v závislosti na použitém vehikulu. (179) Naproti tomu McMahon a spolupracovníci (200) nepozorovali analgesii k tepelným podnětům u experimentálních kryš ani po desetidenní aplikaci 1% kapsaicinové masti na kůži planty pedis, naopak, 0,75% kapsaicinová mast působila v prvních týdnech hyperalgie.

Perineurální aplikace kapsaicinu vede k selektivní redukci senzitivity, a to k bolestivým chemickým a tepelným podnětům, a k eliminaci neurogenní zánětlivé odpovědi na tyto podněty. Studie provedená Duxem a spolupracovníky (89) měla za cíl odlišit specifické populace kožních aferentních vláken, které jsou ovlivněny perineurální aplikací kapsaicinu. V oblasti kůže inervované sedacím nervem došlo tři dny po perineurální aplikaci kapsaicinu k tomuto perifernímu nervu k výrazné redukci počtu nervových zakončení barvicích se imunohistochemicky na neuronální markery PGP 9,5, GAP 43, substanci P i CGRP o 90%, 95%, 97% a 66%. Počet těchto nervových zakončení zůstal snížený minimálně 42 dní od aplikace kapsaicinu. Z výsledků této studie vyplývá, že převážná většina epidermálních axonů je kapsaicin-senzitivní a tvoří chemicky heterogenní populaci, redukce jejich počtu může být důsledkem degenerace sensorických axonů i deplece makromolekul specifických pro neurony.

1.5. 2. Bolest spojená se zánětem

Zvířecí model artritidy. Role kapsaicin-senzitivních primárních aferentních neuronů v neurogenním zánětu a hyperalgie asociované se zánětem v periferní tkáni je spolehlivě prokázána na nejrůznějších zvířecích experimentálních modelech periferního zánětu. Synoviální membrána kloubů je bohatě inervována peptidergními kapsaicin-senzitivními nervovými zakončeními obsahujícími substanci P, po indukci zánětu se hladina substance P v kloubu výrazně zvýší. Systémové podávání kapsaicinu zvířatům v neonatálním období nebo v dospělém věku (dávky, která způsobí depleci substance P) výrazně oslabuje průběh indukované artritidy.

Intraartikulární injekce substance P nebo kapsaicinu do intaktního kloubu způsobí mechanickou hyperalgie perzistující několik hodin, která může být blokována antagonistou substance P, injekce těchto látek do zaníceného kloubu známky zánětu ještě zvýrazní. (315) Jestliže je však při artritidě podán systémově kapsaicin v malé dávce, způsobí podle Perkinse a Campbella (227) krátkodobou analgesii. Byla demonstrována na několika experimentálních modelech artritidy u kryš, kdy kapsaicin (6 mg kg^{-1}) zablokoval mechanickou hyperalgie spojenou se zánětem na několik hodin, vzhledem ke krátké době trvání tohoto účinku nebyla analgesie v tomto případě pravděpodobně důsledkem neurotoxického působení kapsaicinu, ale kapsaicinem indukované deplece substance P.

Neurogenní zánět. Po opakované topické aplikaci 1% kapsaicinu ve formě masti dochází k výrazné redukci extravazace plazmy a uvolňování substance P způsobené antidromní elektrickou stimulací sedacího nervu, kterou lze prokázat už za 24 hodin od první aplikace. Studie rovněž prokázala rozvoj přechodné hyperalgie k tepelným podnětům u těchto zvířat, třetí den po opakované topické aplikaci 1% kapsaicinové masti se plně rozvíjí tepelná hypoalgie. (327, 328)

1.5.3. Neuropatická bolest

Studie na zvířecích modelech neuropatické bolesti. Je poměrně málo zvířecích experimentálních studií, které by spolehlivě prokazovaly analgetický efekt kapsaicinu na bolest neuropatického původu. Kingery a jeho spolupracovníci aplikovali novorozeným kryšám systémově kapsaicin v dávce 50 mg kg^{-1} s.c. a po osmi týdnech provedli i těchto

zvířat podvaz sedacího nervu. Ukázalo se, že kapsaicin zablokoval nejen neurogení extravazaci a edém končetiny zvířete na straně ligatury, ale i hypersenzitivitu k tepelným podnětům, která se po tomto typu traumatu rozvine. (160) Dospělé krysy, kterým byl v neonatálním období podán kapsaicin ($50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ s.c.}$), nejevily známky hyperalgie k tepelným podnětům v případě chronického stlačení nebo částečné ligace sedacího nervu na rozdíl od kontrolní skupiny. U těchto zvířat, kterým byl částečně podvázán sedací nerv, se však plně vyvinula mechanická hyperestésie a alodynies. (200, 261) Yamamoto a Yaksh (324) aplikovali kapsaicin intratekálně ($15 \text{ } \mu\text{g}/15 \text{ } \mu\text{l}$) dva dny po chronické kompresi sedacího nervu a za dalších pět dní testovali citlivost těchto zvířat na tepelné podněty. Zvířata nejevila známky tepelné hyperalgie na straně traumatizovaného nervu v porovnání s kontrolní skupinou. Kim a spolupracovníci (159) aplikovali kapsaicin (0,05 – 2%) přímo k perifernímu nervu týden po jeho ligatuře a sledovali citlivost na tepelné podněty po dobu osmi týdnů. Zvířata, kterým byl takto podán kapsaicin v koncentraci 0,1% a vyšší vykazovala výrazné známky hypoalgie k tepelným podnětům závislé na dávce na straně ligovaného nervu v porovnání s kontralaterální končetinou. Výsledky těchto studií sice dokazují roli kapsaicin-senzitivních nervových vláken v rozvoji hyperalgie k tepelným podnětům spojené s poraněním periferního nervu, nicméně, použité dávky kapsaicinu v těchto pokusech jsou výrazně vyšší než například 0,025 – 0,075% kapsaicinová mast používaná v klinické praxi. (315)

Yoshimura a Yonehara (327) zkoumali analgetický účinek topicky aplikovaného kapsaicinu na hyperalgiu k tepelným podnětům způsobenou volnou ligaturou sedacího nervu krysy. Kapsaicinová mast byla zvířatům aplikována na kůži planty pedis jednou denně po dobu dvou nebo čtyř týdnů a měla významný analgetický účinek na tento bolestivý stav závislý na dávce. Podle výsledků této studie má kapsaicinová mast aplikovaná opakovaně a dlouhodobě výrazný terapeutický účinek na bolestivou periferní neuropatii.

Jednou z častých příčin neuropatické bolesti je poškození periferních nervů při diabetes mellitus. Tři dny po indukci diabetu se u experimentálních myší rozvíjí tepelná i mechanická hyperalgie, která může být pomocí kapsaicinové masti účinně zablokována. Imunohistochemickými i behaviorálními metodami bylo prokázáno, že v důsledku diabetu dochází k up-regulaci exprese kapsaicinových TRPV1 receptorů na myelinizovaných primárních aferentních neuronech, což může přispívat k analgetickému účinku topicky aplikovaného kapsaicinu u neuropatické bolesti spojené s diabetem. (239)

1.6. Účinky kapsaicinu a klinické studie na lidech

1.6.1. Lokální aplikace kapsaicinu.

Topická aplikace kapsaicinové masti nebo lokální injekce kapsaicinu do zdravé lidské kůže vede v akutní fázi k intenzivnímu sensorickému vjemu pálení a bolesti v důsledku excitace a senzitivizace nociceptorů ze skupiny A- i C-vláken citlivých na bolestivé tepelné, mechanické a chemické podněty. Dochází rovněž k lokálnímu zarudnutí v místě aplikace v důsledku s neurogeního zánětu způsobeného kapsaicinem, provázeného vasodilatací a extravazací plazmy. V místě zarudnutí vzniká hyperalgie k tepelným i mechanickým podnětům (tzv. primární hyperalgie), mechanická hyperalgie se navíc vyvíjí i na intaktní kůži v okolí neurogeního zánětu způsobeného kapsaicinem (tzv. sekundární hyperalgie). (45, 263) V další fázi pak následuje rozvoj hypoalgie charakterizovaný sníženou intenzitou vnímání bolesti v místě aplikace v důsledku rapidní desenzitivizace nebo inaktivace nociceptorů. Po opakované aplikaci kapsaicinu dochází postupně ke snížení intenzity akutní bolesti i obou typů hyperalgie. (84, 163)

Prostřednictvím intradermální injekce může být kapsaicin aplikován přímo do kůže v přesně kvantifikovatelném množství. Elektrofyziologické studie ukázaly, že se už velmi krátce po intradermální injekci kapsaicinu mohou stát polymodální nociceptivní vlákna skupiny C insenzitivními k tepelným a mechanickým podnětům a tento účinek kapsaicinu je navíc přesně lokalizován v místě injekce. Desenzitizaci podléhá pouze skupina neuronů, jejichž receptivní pole zasahuje do místa aplikace kapsaicinu. (17)

Opakovaná topická aplikace 1% roztoku kapsaicinu po dobu několika dní na kůži předloktí má za následek redukcii až úplné vymizení zarudnutí v důsledku vasodilatace způsobeného bolestivým tepelným nebo chemickým podnětem. Práh pro tepelné i mechanické bolestivé podněty se v místě aplikace výrazně zvýší, zatímco práh pro dotyk a chladové podněty se nemění. Vasodilatační odpověď evokovaná injekcí substance P nebo histaminu do kůže po opakované aplikaci kapsaicinu je v porovnání s normální kůží rovněž výrazně snižena. Simone a spolupracovníci zkoumali účinek topicky aplikovaného 0,75% kapsaicinového krému po dobu osmi týdnů u zdravých dobrovolníků. Práh pro bolestivý tepelný podnět se v iniciální fázi (první den aplikace) snížil, v dalších dnech potom došlo k jeho výraznému zvýšení. Práh pro mechanické podněty a chladové podněty se nezměnil, vasodilatační odpověď na intradermální injekci histaminu byla snižena. (264)

V jiné studii se tito autoři snažili zjistit, jestli intradermální injekce kapsaicinu způsobí i morfologické změny kožních nervových zakončení, které by odpovídaly jeho analgetickým účinkům, a porovnávali stav inervace kůže po lokální aplikaci kapsaicinu s mírou senzitivity k různým typům podnětů testovanou psychofyzikálními metodami. Po lokální aplikaci kapsaicinu byl pozorován výrazný pokles až úplné vymizení imunoreaktivity na PGP 9,5 a CGRP v epidermis, došlo tedy téměř k úplné degeneraci epidermálních nervových zakončení a subepidermálního plexu. Účinek kapsaicinu na kožní nervová zakončení barvicí se na substanci P byl méně výrazný. Lokálně aplikovaný kapsaicin snížil v této studii kožní citlivost na bolestivé ostré mechanické podněty a způsobil téměř úplnou anestezii k tepelným podnětům v místě aplikace. Částečná reinervace epidermis a částečný návrat senzitivity k normálnímu stavu byla patrná tři týdny po aplikaci kapsaicinu. Podle výsledků této studie je sensorická dysfunkce způsobená intradermálně aplikovaným kapsaicinem důsledkem rapidní morfologické degenerace kožních nervových zakončení. (265)

Nolano a spolupracovníci se snažili ověřit, jestli morfologické změny intradermálních nervových vláken přispívají k desenzitizaci a hypoalgezi i po topické aplikaci kapsaicinu v masti na kůži. (219) 0,075% kapsaicinová mast byla opakovaně aplikována na kůži předloktí čtyřikrát denně po dobu třech týdnů. V místě aplikace kapsaicinu došlo ke snížení senzitivity kůže ke všem typům podnětů, a to zejména k bolestivým mechanickým a tepelným. hypoalgezie byla i v tomto případě provázena degenerací epidermálních nervových zakončení, už tři dny po první aplikaci kapsaicinové masti byl patrný pokles imunoreaktivity na PGP 9,5 v kůži o 74% v porovnání s kontrolním vzorkem. Přerušeni aplikace kapsaicinové masti bylo následováno postupnou reinervací epidermis, během šesti týdnů pak rovněž došlo k návratu senzitivity k podnětům všech modalit do normálního stavu. Morfologická degenerace epidermálních nervových zakončení přispívá ke kapsaicinem indukované analgesii i v případě topické aplikace ve formě masti.

1.6.2. Bolest spojená se zánětem

Bolest při revmatoidní artritidě. I lidská synoviální membrána je za normálních okolností inervována sensorickými nervovými vlákny citlivými na kapsaicin pozitivně se barvicími imunohistochemickými metodami na substanci P, které buď přímo souvisejí s krevními cévami, nebo jsou volně zakončena, a zasahují až do intimy synoviální membrány.

Klinické studie zkoumající efekt topicky aplikovaného kapsaicinu na bolest artritického původu přinášejí nejednoznačné výsledky. Deal a spolupracovníci (71) zjistili sníženou intenzitu bolesti po 4 týdnech opakované aplikace kapsaicinové masti (0,025%) u 31 pacientů s postiženým kolenním kloubem revmatoidní artritidou. Naproti tomu, McCarthy a spolupracovníci použili 0,075% kapsaicinovou mast a hodnotili bolest pomocí vizuální analogové škály, funkční kapacitu kloubů, ranní ztuhlost, sílu a otok kloubů. V jejich studii nezjistili žádné významné zlepšení u žádného ze sedmi pacientů s postižením malých kloubů ruky revmatoidní artritidou. (192) Weisman a spolupracovníci zjistili, že topická aplikace 0,075% kapsaicinu po dobu šesti týdnů způsobila sníženou hladinu zánětlivých mediátorů včetně substance P v synoviální tekutině u pacientů s revmatoidní artritidou. (310)

Bolest při osteoartróze. Stejně jako v případě revmatoidní arthritidy hraje substance P klíčovou roli i v patofyziologii osteoartrózy. Několik studií prokázalo výrazné zlepšení a úlevu od bolesti po léčbě kapsaicinovou mastí u pacientů s osteoartrózou kolenního kloubu (0,025% kapsaicinová mast aplikovaná po dobu několika týdnů u 70 pacientů) a kloubů ruky (0,075% kapsaicinová mast u 14 pacientů). (76, 192) Jiná nedávná klinická studie zahrnovala 113 pacientů s osteoartrózou kolenního, hlezenního, loketního, ramenního kloubu a zápěstí. U 81% z nich, kterým byla čtyřikrát denně po dobu dvanácti týdnů aplikována 0,025% kapsaicinová mast, došlo k výraznému zlepšení v porovnání s kontrolní skupinou, výsledky hodnocení ošetřujícím lékařem byly shodné s hodnocením samotných pacientů pomocí vizuální analogové stupnice. (8)

1.6.3. Neuropatická bolest

I přes omezené množství přesvědčivých důkazů získaných v experimentálních studiích na zvířatech, je možný léčebný účinek topicky aplikovaného kapsaicinu v oblasti neuropatické bolesti předmětem mnoha klinických studií. Klinické stavy vyznačující se neuronálním poškozením a následným rozvojem neuropatické bolesti obecně odpovídají velmi málo na léčbu běžnými analgetiky a proto je v současné době soustředěna pozornost na úplně jiný, nový přístup k léčbě tohoto typu bolesti, přičemž topicky aplikovaný kapsaicin je považován za jednu z možností léčebné strategie tohoto typu bolesti.

Zpočátku byl prokázán výraznější léčebný efekt topicky aplikovaného kapsaicinu pouze u malého počtu pacientů s neuropatickou bolestí. Analgetický účinek kapsaicinové masti nastupoval vždy až po několikátýdenní léčbě a mnoho pacientů odstupovalo v prvních týdnech léčby z většiny klinických studií z důvodu dráždivých vlastností kapsaicinu, který po lokální aplikaci na kůži vyvolá sám o sobě pálivý bolestivý vjem. Tento nežádoucí účinek však po opakované aplikaci slábne, až úplně vymizí. Středem zájmu studií zabývajících se neuropatickou bolestí byli zpočátku pacienti s diabetickou neuropatií a postherpetickou neuralgií, u kterých byl zjištěn výrazný léčebný efekt kapsaicinové masti. Na podkladě jejich výsledků pak byly následně provedeny další velké multicentrické studie zaměřené na řadu dalších onemocnění provázených neuropatickou bolestí. Klinické studie prokázaly výrazné zlepšení po léčbě topicky aplikovaným kapsaicinem u pacientů s neuropatickou bolestí po mastektomii, amputacích končetin, s orální neuropatickou bolestí i neuralgií trigeminu.

V jedné ze studií bylo léčeno 32 starších pacientů s chronickou postherpetickou neuralgií 0,075% kapsaicinovou mastí po dobu šesti týdnů, intenzita bolesti pak byla hodnocena subjektivně pomocí vizuální analogové škály a objektivně ošetřujícím lékařem. Po šesti týdnech léčby došlo u více než 80% pacientů z této skupiny k výraznému zlepšení a úlevě od bolesti. (25) V jiné studii léčil Watson a spolupracovníci skupinu 33 nemocných s postherpetickou neuralgií, tentokrát 0,025% kapsaicinovou mastí a také zjistili velmi dobrý analgetický efekt kapsaicinu u těchto pacientů. (308) Peikert a spolupracovníci se ve své

studii zabývali nejen analgetickým účinkem topicky aplikovaného kapsaicinu na chronickou postherpetickou neuralgii, ale také časovým průběhem a dobou trvání tohoto efektu. 39 pacientů s tímto onemocněním bylo léčeno 0,025% kapsaicinovou masťou po dobu osmi týdnů a 72,2% z nich udávalo zlepšení a úlevu od bolesti ještě 10 – 12 měsíců od začátku léčby. Léčebný účinek kapsaicinu nebyl závislý na věku pacienta, lokalizaci nebo trvání postherpetické neuralgie, poruchách citlivosti nebo charakteru bolesti. (226) Efektem dlouhodobé léčby topicky aplikovaným 0,075% kapsaicinem a zejména její bezpečností se zabývala klinická studie Watsona a jeho spolupracovníků. Sledovali 77 pacientů s chronickou postherpetickou neuralgií a zjistili, že při prolongované léčbě 0,075% kapsaicinovou masťou po dobu dvou let dochází k potenciaci léčebného efektu, 86% nemocných pozorovalo po dvouleté terapii ještě výraznější zlepšení a úlevu od bolesti oproti stavu po šesti týdnech léčby. Nebyly zjištěny ani žádné závažné nežádoucí účinky topicky aplikovaného 0,075% kapsaicinu. (307)

Scheffler a spolupracovníci zkoumali účinek opakovaně aplikované 0,075% kapsaicinové masti po dobu osmi týdnů na neuropatickou bolest způsobenou diabetem. Do experimentální skupiny byli v této studii zařazeni pacienti s neuropatickou bolestí diabetického původu interferující se spánkem a běžnými denními aktivitami a neovlivnitelnou běžnými analgetiky. Po osmi týdnech došlo ke zlepšení u více než 90% nemocných. (258) Skupina kapsaicin study group sledovala 277 pacientů s neuropatickou bolestí diabetického původu (138 bylo léčeno 0,075% kapsaicinem po dobu osmi týdnů, 139 placebo). Všechny sledované parametry v této studii (spontánní bolest, schopnost chůze, běžných denních aktivit a práce, kvalita spánku) se u pacientů léčených kapsaicinovou masťou čtyřikrát denně po dobu osmi týdnů výrazně zlepšily v porovnání s nemocnými léčenými placebem. (40)

Řada studií se zabývá účinkem kapsaicinové masti na bolest po mastektomii. Po tomto operačním zákroku se v určitém procentu případů rozvine bolestivý syndrom, kdy bezprostředně nebo krátce po operaci nastoupí intenzivní bolest lokalizovaná v oblastech inervovaných kožními větvemi interkostálních a interkostobrachiálních nervů, která perzistuje a je obtížně ovlivnitelná analgetickou terapií. Ve studii Watsona došlo ke zlepšení u 12 ze 14 pacientek trpících tímto syndromem po čtyřtýdenní léčbě 0,025% kapsaicinovou masťou. Ještě po šesti měsících od ukončení léčby udávalo výraznou úlevu od bolesti 50% nemocných. (309) V jiné studii byla použita 0,075% kapsaicinová mast rovněž s dobrým léčebným efektem na tento bolestivý stav. (306) Dini a spolupracovníci sledovali 21 pacientek s rozvinutým bolestivým syndromem po mastektomii a léčebný efekt 0,025% kapsaicinové masti aplikované třikrát denně po dobu dvou měsíců těmto nemocným. V 10,5% případů došlo k úplnému vymizení příznaků a v 57,9% případů k výrazné úlevě od bolesti. Ještě tři měsíce po přerušení léčby přetrvával u velké většiny nemocných výrazný analgetický účinek kapsaicinu. Léčba kapsaicinovou masťou byla ve všech případech dobře tolerována, bez závažných vedlejších nežádoucích účinků. (78)

Topicky aplikovaný kapsaicin může být velmi účinný i v léčbě reflexní sympatické dystrofie. Cheshire a Snyder (58) popsali případ, kdy třítýdenní léčba topicky aplikovaným 0,025% kapsaicinem způsobila dočasnou, ale velmi výraznou úlevu od bolesti u pacientky s tímto onemocněním. Kapsaicin se tedy jeví jako účinný prostředek v léčbě reflexní sympatické dystrofie pravděpodobně mechanismem deplece substance P z primárních aferentních neuronů zodpovědných za alodynii typickou pro toto onemocnění a modulací eferentní aktivity neuronů sympatiku.

Fusco a spolupracovníci použili v jedné z klinických studií 0,05% kapsaicinovou mast, kterou aplikovali opakovaně po dobu 15 – 20 dní pacientům s neuralgií trigeminu, a prokázali velmi dobrý analgetický efekt kapsaicinu v léčbě tohoto onemocnění. (102) Neuralgie trigeminu se v některých případech může projevovat i jako intraorální bolest. Studie Epsteinova a Macroeho zahrnovala 24 pacientů s intraorální neuropatickou bolestí, kterým byl topicky

aplikován 0,025% kapsaicin po dobu několika měsíců. Kompletní remise nastala ve více než 30% případů, částečnou úlevu od bolesti udávalo rovněž více než 30% pacientů. (93)

1.6.4. Některé další klinické indikace

Existuje několik studií, které prokazují analgetický účinek kapsaicinu aplikovaného topicky na nosní sliznici při migrenózních bolestech hlavy. V jedné z nich byl kapsaicin pacientům aplikován denně po dobu sedmi dní s výrazným analgetickým efektem oproti placebo, v několika případech došlo dokonce ke kompletnímu vymizení příznaků. (188) Marks a spolupracovníci sledovali v této studii skupinu pacientů s bolestmi hlavy po dobu patnácti dnů, analgetický efekt kapsaicinu však nastoupil až po opakované aplikaci trvající minimálně jeden týden. Mechanismus, kterým kapsaicin způsobí úlevu od tohoto typu bolesti, není přesně objasněn, nicméně bylo prokázáno, že se trigeminální neurony obsahující substanci P podílí na patofyziologii migrenózní bolesti hlavy. Topicky aplikovaný kapsaicin pak může mít za následek opět depleci substance P ze zakončení těchto sensorických neuronů a tím jejich následnou desenzitizaci.

Dobrý léčebný efekt topicky aplikovaného kapsaicinu byl klinickou studií prokázán i v případě bolesti související s fibromyalgií. Po čtyřtýdenní léčbě 0,025% kapsaicinovou mastí pozorovali pacienti v jedné ze studií zlepšení zvýšené citlivosti na dotyk (mechanické alodynies), která je pro toto onemocnění typická, na druhou stranu k vymizení nebo snížení intenzity spontánní bolesti při tomto onemocnění po léčbě kapsaicinem nedošlo. (193) Analgetický účinek kapsaicinu nastupuje až během několika týdnů od započetí léčby, takže je velmi pravděpodobné, že by dlouhodobější léčba nebo použití 0,75% kapsaicinové masti přinesla lepší terapeutický účinek.

Další oblastí, která se stává předmětem zájmu pro léčebné využití topicky aplikovaného kapsaicinu, je léčba pruritu. Bylo prokázáno, že sensorický vjem svědění je veden určitou skupinou kapsaicin-senzitivních nociceptivních neuronů, experimentální blokáda přenosu C-vláknů snižuje intenzitu vnímání svědění. (180, 197) Ve studiích na lidských dobrovolnících zablokoval kapsaicin rozvoj pruritu po expozici histaminu a alergenům, dobrý léčebný účinek topicky aplikovaného kapsaicinu byl prokázán i v několika klinických studiích u pacientů s různými onemocněními provázenými svěděním jako je například psoriasis. (162, 315)

Ve snaze farmakologicky ovlivnit TRPV1 receptory za účelem analgésie existují obecně dva různé přístupy. První z nich spočívá ve využití TRPV1 agonistů, jejichž působením dochází k funkční desenzitizaci až morfológické destrukci kapsaicin-senzitivních nociceptivních nervových vláken, druhý z nich využívá účinku specifických TRPV1 antagonistů, které tyto receptory blokují. Alternativním přístupem je například využití funkčních protilátek proti TRPV1 receptoru nebo genová interference a ovlivnění exprese proteinů TRPV1 iontového kanálu na molekulárně genetické úrovni.

Terapeutický přístup v léčbě bolesti na principu desenzitizace kapsaicin-senzitivních nociceptorů působením TRPV1 agonistů je využíván podstatně déle než využití specifických TRPV1 antagonistů. Existuje řada přirozených chemických TRPV1 aktivátorů, které byly identifikovány a izolovány většinou z rostlin, což vedlo k získání důležitých informací o biologické funkci a farmakologii TRPV1 receptoru ještě před objevem přesných aminokyselinových sekvencí jeho proteinů a naklonováním. Byly charakterizovány společné znaky v chemické struktuře těchto látek a na základě předpokladu, že substance s podobnou chemickou strukturou mají i podobné farmakologické účinky, vyvinuly farmaceutické firmy řadu syntetických TRPV1 agonistů za účelem klinického použití. Protože dochází jejich účinkem k úplné funkční desenzitizaci až morfológické destrukci nociceptivních vláken exprimujících na svých membránách TRPV1 receptory, jeví se TRPV1 agonisté oproti

specifickým antagonistům jako analgeticky účinnější a jejich využití v léčbě bolesti jako výhodnější. Iniciální excitační účinek však způsobuje v první fázi silnou bolestivost v místě aplikace, která je pacienty často špatně tolerována, analgetického účinku je navíc např. při lokálním použití kapsaicinu dosaženo až po opakované aplikaci po dobu několika týdnů. Resiniferatoxin je oproti kapsaicinu lépe tolerován, neboť je v porovnání s kapsaicinem mnohokrát silnějším agonistou a bolestivost v místě aplikace při použití resiniferatoxinu v koncentraci dostatečné k desenzitizaci kapsaicin-senzitivního nociceptoru je tudíž podstatně menší. Lokálně aplikovaný resiniferatoxin je používán v léčbě hypersenzitivního močového měchýře. Z chemického hlediska je však molekula resiniferatoxinu velká a vysoce hydrofobní, náročná na syntézu a nestabilní ve formě roztoku. Jeho farmakologické účinky a případné další využití v klinické praxi je nutné podrobněji ověřit klinickými studiemi. Z důvodu výrazné bolestivosti v místě aplikace při lokální léčbě TRPV1 agonisty vyvinuly farmaceutické firmy i perorální formy těchto látek, jedná se například o látku olvanil aktivující TRPV1 receptory. Velkým problémem při systémové aplikaci perorálních lékových forem TRPV1 agonistů jsou však jejich závažné systémové vedlejší účinky. V klinické praxi jsou tudíž v léčbě bolesti i nadále nejčastěji využívány kapsaicinové preparáty k lokální aplikaci, například ve formě náplasti nebo masti, případně syntetické analogy kapsaicinu, jejichž iniciální dráždivý účinek je při lokální aplikaci méně výrazný. Léčebný efekt lokálně aplikovaného resiniferatoxinu v léčbě hypersenzitivity močového měchýře (hyperaktivity musculus detrusor) je v současné době testován řadou klinických studií. (236, 279)

Po detailní charakteristice strukturních proteinů TRPV1 iontového kanálu na molekulární úrovni se biotechnologický i farmakologický výzkum zaměřil na identifikaci a syntézu specifických antagonistů tohoto receptoru. Předpokládalo se totiž, že použití TRPV1 antagonistů v léčbě bolestivých stavů přinese v porovnání s agonisty řadu výhod. Antagonisté TRPV1 receptorů nevykazují iniciální aktivační účinek a nezpůsobí tudíž nepříjemný bolestivý vjem po jejich aplikaci, pouze s vysokou selektivitou zablokují TRPV1 receptory. Jejich efekt nastupuje okamžitě, inaktivace TRPV1 receptoru působením antagonistů nemá za následek kompletní destrukci kapsaicin-senzitivního nociceptivního vlákna. Jedním z prvních takto charakterizovaných kompetitivních TRPV1 antagonistů je capsazepin, strukturní analog kapsaicinu, který byl dlouhou dobu nejčastěji používaným TRPV1 antagonistou vůbec. Postupem času se však ukázalo, že účinek capsazepinu není úplně selektivní na TRPV1 receptory. V koncentraci, která je nutná k blokádě TRPV1 receptorů, inhibuje capsazepin zároveň acetylcholinové receptory a napěťově závislé kalciové kanály. V podmínkách *in vivo* navíc nejeví tento slabý antagonista výraznou efektivitu, jeho účinnost se liší u různých živočišných druhů a závisí na modalitě testovaného podnětu. Vzhledem k metabolické nestabilitě není capsazepin vhodnou látkou k případnému užití v klinické praxi. Omezenou účinnost má i další TRPV1 antagonista, ruthenium red, anorganické barvivo blokující vstup kalcia do buněk. Ruthenium red je neselektivním antagonistou všech TRPV kanálů, svým účinkem ovlivňuje celou řadu dalších receptorů a iontových kanálů a inhibuje uvolňování mediátorů jako acetylcholin nebo GABA. Modifikací molekuly resiniferatoxinu halogenací (např. 5-iodo-resiniferatoxin) se tento jinak potentní agonista stává TRPV1 antagonistou. Ani efektivita iodo-resiniferatoxinu jako TRPV1 antagonisty však nebyla *in vivo* dosud spolehlivě prokázána. Stejně jako v případě resiniferatoxinu je velkým problémem obtížná syntéza této hydrofobní molekuly, její nestabilita v roztoku a špatná biologická dostupnost.

V nedávné době byly nasyntetizovány nové TRPV1 antagonisté, z hlediska chemické struktury se jedná o deriváty urey nebo amidové sloučeniny. Do první skupiny patří například látky na bázi piperaziny-urey (látky BCTC, Purdue Pharma), thiourey, nebo pyrrolidin-urey (látky SB-452533, GalaxoSmithKline), velkou skupinu účinných TRPV1 antagonistů tvoří deriváty urey s 5-isochinolinovou skupinou. Protože v případě modifikace jinými izomery

isochinolinu nebo chinolinu ztrácí molekula urey účinnost jako TRPV1 antagonist, je pravděpodobné, že právě 5-isochinolinová skupina je klíčová pro interakci s vazebným místem na TRPV1 receptoru. Účinnou alternativou 5-isochinolinových derivátů urey jako antagonistů TRPV1 receptorů jsou také 4-aminoindolové a hydroxy-tetrahydronaftalenové deriváty. Druhou skupinu nově vyvíjených TRPV1 antagonistů představují amidové sloučeniny. Typickým příkladem je derivát cinnamidu SB-366791 (SB-366791, GalaxoSmithKline), vysoce potentní, kompetitivní antagonist lidských i potkaních TRPV1 receptorů s dobrou selektivitou účinku. Deriváty cinnamidu SB-705498 (SB-705498, GalaxoSmithKline) a AMG 517 (AMG 516, Amgen) jsou nyní ve fázi I a II klinického testování. Chemická struktura nejnovějších antagonistů TRPV1 receptorů, vyvíjených v současné době, má již málo společného s přírodními vaniloidními sloučeninami. Současný výzkum je zaměřen na deriváty pyrimidinu (například pyridol-2,3-d-pyrimidin nebo chinazolin-4-pyrimidin), piperazinové deriváty benzimidazolu, deriváty N-alkylglycinu a řadu jiných. (236, 279)

1.7. Shrnutí

V periferních mechanismech nocicepce se při chronických bolestivých stavech vyvolaných zánětem nebo poraněním periferního nervu uplatňují účinky mnoha chemických mediátorů, které spolu často interagují a způsobují tak zvýšení citlivosti a zesílení aktivace sensorických zakončení podnětem (senzitivace, facilitace). Jejich podstatou může být přímé působení na sensorické nervové zakončení nebo nepřímý účinek na tkáňové struktury v jeho bezprostředním okolí. Úspěch léčebné strategie, jejíž podstatou je působení na jistý mediátor, závisí na celkovém podílu tohoto mediátoru v přenosu bolestivé informace ve vztahu k ostatním tkáňovým působkům. Například úspěch léčebné strategie pomocí inhibice syntézy prostaglandinů, které jsou pouze jednou z mnoha skupin senzitivujících substancí, může tím pádem spočívat v ovlivnění nejen jejich přímých senzitivizačních účinků na sensorické nervové vlákno, ale i řady dalších, a to na různých úrovních komplexní kaskády dějů uplatňujících se v zánětlivé bolesti (například uvolňování jiných mediátorů z okolních struktur). V případě neuropatické bolesti je podíl periferních tkáňových mediátorů na jejich neurálních mechanismech jiný než u chronické zánětlivé bolesti, u neuropatické bolesti přispívají významnou měrou k periferním mechanismům nocicepce fenomény hyperexcitabilita a spontánní vzruchová aktivita primárních aferentů.

Ukázalo se, že zánětlivá bolest i bolest způsobená neurálním poraněním jsou přístupné k působení analgetik aplikovaných lokálně, takže je v léčbě obou těchto stavů možné využívat všech výhod lokální aplikace účinných látek k jejich ovlivnění. Úspěch léčebné strategie závisí na podílu zánětlivé a neurogenní komponenty. Ačkoliv se nejedná o dvě vzájemně se vylučující kategorie mechanismů, je zřejmé, že určité způsoby analgetické léčby jsou účinnější v některých stavech více než v jiných. Například léčba pomocí NSAID nebo jiných látek modulujících zánět může mít limitovaný účinek na bolest po neurálním poranění, tato neuropatická bolest je zase citlivější na látky působící přímo na sensorický nerv snižující jeho aferentní vzruchovou aktivitu.

Vzhledem k chemické složitosti a komplexnosti neurálních mechanismů bolesti je nutné si uvědomit, že optimální léčba bolestivých stavů často vyžaduje kombinaci několika různých analgetik. I když může i léčba jednou účinnou látkou přinést výraznou úlevu, jedná se většinou jenom o částečné terapeutické ovlivnění bolesti, vyžadující současné podání dalšího analgetika za účelem komplexnějšího efektu. V případě zánětlivé bolesti se jedná o kombinaci inhibitorů různých zánětlivých mediátorů, u neuropatické bolesti je to kombinace různých látek ovlivňujících přímo sensorická zakončení na periferní úrovni. V případě vzniku

tolerance k analgetickému účinku po opakované periferní aplikaci některých látek (například opioidů), bylo by možné pomocí kombinované terapie několika různými analgetiky inhibovat tyto mechanismy zodpovědné za vznik tolerance (například kombinace opioidů a antagonistů NMDA receptorů). Vývoj kombinovaných analgetických preparátů k lokální aplikaci je jistě jedním z velmi užitečných terapeutických přístupů a vzhledem k nižšímu výskytu systémových nežádoucích účinků a lékových interakcí, představují topické i lokální lékové formy analgetik k léčbě chronických bolestivých stavů velmi slibnou cestu.

I když existuje celá řada dalších nejen farmakologických terapeutických přístupů (např. transkutánní elektrická stimulace aj.), nelze někdy přes veškerou snahu chronickou bolest a doprovázející symptomy ovlivnit, v těchto případech je pak nutný citlivý psychologický a psychoterapeutický přístup. Účinná pooperační analgésie snižuje množství pooperačních komplikací, umožňuje časnou rehabilitaci, zkrátí dobu hospitalizace a celkové rekonvalescence.

2. Hypotézy a cíle studie

2.1. Účinky lokálních anestetik na bolest chirurgického původu

Alodynie a hyperalgie jsou patologické bolestivé stavy, které se mohou rozvinout jako důsledek periferní a centrální senzitivizace nociceptivních neuronů v podmínkách tkáňového poranění chirurgickým zákrokem. V pilotní fázi studie byla bolest chirurgického původu zkoumána na zvířecím modelu incise kůže hřbetu a cílem těchto pokusů bylo v první řadě prokázat a podrobně charakterizovat rozvoj pooperační mechanické alodynie i hyperalgie, primární i sekundární. Současná aktivace velkého množství periferních neurálních zakončení intenzivním nociceptivním podnětem způsobujícím tkáňové poranění a následná zvýšená aferentace z místa poranění způsobí facilitaci synaptického přenosu velkého množství různých neuronů zadních rohů míchy. Protože je tento fenomén podstatou heterosynaptického mechanismu centrální senzitivizace závislého na neuronální aktivitě, který může vést k rozvoji chronické bolesti a patologických bolestivých stavů, předpokládali jsme, že v případě kompletní blokady aferentace z místa poranění pomocí lokálního anestetika aplikovaného předoperačně do místa incise, dojde k zablokování rozvoje centrální senzitivizace a tudíž i rozvoje mechanické alodynie a hyperalgie na tomto zvířecím modelu. Předoperační aplikace lokálních anestetik by v takovém případě představovala účinnou strategii ve snaze ovlivnit bolest chirurgického původu.

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

Současná aktivace velkého množství periferních neurálních zakončení intenzivním nociceptivním podnětem způsobujícím tkáňové poranění je podstatou heterosynaptického mechanismu centrální senzitivizace závislého na neuronální aktivitě. Následující část studie byla selektivně zaměřena na určitou skupinu neurálních zakončení takto aktivovaných chirurgickou incisí a jejich úlohu v pooperační bolesti, a to na periferní zakončení neuronů specificky reagujících na nociceptivní podněty senzitivní na chemickou látku kapsaicin. Jejím cílem bylo zjistit úlohu těchto kapsaicin-senzitivních nociceptorů v mechanismech pooperační alodynie a hyperalgie a účinek lokálně aplikovaného kapsaicinu na rozvoj pooperační bolesti. Kapsaicin ve vysoké koncentraci způsobí desenzitizaci až úplnou morfologickou destrukci zakončení kapsaicin – senzitivních neuronů. Předpokládali jsme tedy, že po lokální aplikaci kapsaicinu ve vysoké koncentraci před chirurgickým zákrokem na zvířecím modelu plantární incise dojde k vyřazení kapsaicin-senzitivních nervových vláken, tudíž k selektivnímu zablokování nociceptivní aferentace z místa incise, a následnému zablokování rozvoje pooperační tepelné hyperalgie a mechanické alodynie i hyperalgie.

2.3. Senzitivizace míšních neuronů chirurgickou incisí a její ovlivnění lokálně aplikovaným kapsaicinem ve vysoké koncentraci

Zvýšená vzruchová aktivita nociceptorů v terénu tkáňového poranění může způsobit i dlouhodobé změny synaptického přenosu v zadních rožích míchy, a to mechanismem aktivace některých transkripčních faktorů a změnami na úrovni transkripce genů kódujících proteiny zodpovědné za synaptický přenos vzruchu. Výsledkem jsou změny excitability a vodivých vlastností, v některých případech až změna fenotypu neuronu ve smyslu senzitivizace. V časné fázi je touto cestou indukován například gen c - Fos kódující transkripční faktor Fos, jehož exprese je využívána ke studiu nocicepce. Protein Fos je funkční marker sloužící

k identifikaci neuronů centrálního nervového systému senzitivizovaných intenzivním nociceptivním podnětem. Cílem následující části studie bylo prokázat centrální senzitivizaci míšních neuronů chirurgickou incíí pomocí exprese c – Fos v zadních rožích míchy imunohistochemickou metodou a ověřit touto metodou efekt předoperačně aplikovaného kapsaicinu do místa incise na její rozvoj. Předpokládali jsme, že pomocí exprese c – Fos bude prokázáno zablokování rozvoje centrální senzitivizace míšních neuronů působením lokálně aplikovaného kapsaicinu ve vysoké koncentraci, a to v důsledku vyřazení kapsaicin-senzitivních nervových vláken a selektivnímu zablokování nociceptivní aferentace z místa incise, což bude v souladu s hypotézou předchozí, behaviorální části studie. V případě blokády centrální senzitivizace míšních neuronů chirurgickou incíí působením lokálně aplikovaného kapsaicinu pak nedojde k rozvoji pooperační alodynie a hyperalgie.

2.4. Úloha periferních a centrálních TRPV1 receptorů v mechanismech nocicepcce u bolesti chirurgického původu

Kapsaicinové TRPV1 receptory jsou exprimovány na periferních i centrálních zakončeních kapsaicin – senzitivních neuronů a hrají významnou roli v transmisi nociceptivní informace i v její modulaci. Jsou to molekulární integrátory fyzikálních a chemických bolestivých podnětů podléhající významnou měrou senzitivizaci v prostředí zánětu pod vlivem působení tkáňových mediátorů. Je velmi pravděpodobné, že se právě tyto kapsaicinové TRPV1 receptory díky svým biologickým vlastnostem významně podílí také na rozvoji pooperační tepelné a mechanické hyperalgie i mechanické alodynie na zvířecím modelu plantární incise. Cílem následujících pokusů bylo potvrdit úlohu periferních TRPV1 receptorů, otestovat efekt lokálně aplikovaného 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. Klíčová úloha periferních a centrálních TRPV1 receptorů v rozvoji tohoto bolestivého stavu by tak byla spolehlivě prokázána a blokáda TRPV1 receptorů specifickým antagonistou by představovala další z možných způsobů účinného farmakologického ovlivnění pooperační bolesti.

2.5. Úloha centrálních TRPV1 receptorů v nocicepci, mechanismy jejich aktivace a senzitivizace

TRPV1 receptory jsou exprimovány nejen na periferních, ale také na centrálních výběžcích kapsaicin – senzitivních nociceptorů. Jejich úloha v míše však není dosud úplně objasněna, jednou z nevyřešených otázek zůstává způsob jejich aktivace. Existují endogenní agonisté na TRPV1 receptorech, ale jsou to látky velmi málo účinné a jejich koncentrace v míše je za fyziologických podmínek téměř zanedbatelně nízká. V podmínkách zánětu nebo tkáňového poranění se však koncentrace endogenních agonistů výrazně zvýší a v důsledku působení různých zánětlivých mediátorů uvolněných v místě poranění (zejména bradykininu) dochází rovněž k výrazné senzitivizaci TRPV1 receptorů k působícím podnětům. Cílem této části studie bylo ověřit, že jsou centrální TRPV1 receptory senzitivizované v důsledku poranění chirurgickou plantární incíí aktivovány působením endogenních agonistů a podílí se tak na přenosu nociceptivní informace z místa poranění. K aktivaci centrálních TRPV1 receptorů byl v těchto pokusech použit intratekálně aplikovaný endogenní TRPV1 agonista, senzitivizace centrálních TRPV1 receptorů bylo dosaženo účinkem intratekálně aplikovaného bradykininu. Při současné aplikaci obou látek byl očekáván rozvoj hypersenzitivity experimentálních zvířat

na mechanické a tepelné podněty v důsledku aktivace senzitivovaných TRPV1 receptorů endogenním TRPV1 agonistou. Je velmi pravděpodobné, že po chirurgickém zákroku dochází jednak ke zvýšení syntézy endogenních agonistů na TRPV1 receptorech a zároveň jejich senzitivaci pod vlivem působení tkáňových mediátorů zánětu, a že se centrální TRPV1 receptory právě tímto mechanismem uplatňují v rozvoji pooperační bolesti. Experimentální blokáda hypersenzitivity na tepelné a mechanické podněty způsobené aktivací senzitivovaných TRPV1 receptorů účinkem specifického TRPV1 antagonisty měla přinést spolehlivý důkaz úlohy centrálních TRPV1 receptorů v nocicepci i v rozvoji bolesti chirurgického původu. Intratekální aplikace specifického TRPV1 antagonisty by v případě potvrzení této hypotézy znamenala efektivní přístup v léčbě tohoto bolestivého stavu.

3. Metody

K experimentům této studie byli použiti samci laboratorních potkanů kmene Wistar (200 – 250 g), chovaných v plastových klecích na měkké podestýlce s volným přístupem k vodě a potravě při dvanáctihodinovém cyklu světla a tmy. Celkem bylo použito 173 potkanů. Behaviorální pokusy byly prováděny na zvířatech seznámených s experimentálním prostředím a procedurami 4 – 5 dnů před zahájením vlastního experimentu. Všechny postupy a procedury použité v této studii 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 metody

3.1.1. Testování citlivosti zvířat na mechanické podněty

Odpovědi zvířat na mechanické podněty byly testovány pomocí Von Freyových vláken. Tato různě silná nylonová monofilamenta byla nejprve kalibrována na digitální váze, pomocí které byla zjištěna a zaznamenána síla nutná k jejich ohnutí. Měření bylo opakováno pro každé vlákno desetkrát, výslednou mechanickou sílu daného vlákna představovala průměrná hodnota z těchto deseti měření. Kalibrace byla provedena vždy před začátkem a po skončení každého pokusu abychom ověřili, že se intenzita použitého mechanického stimulu během experimentální procedury nezměnila.

Potkani byli nejprve umístěni na vyvýšený kovový rošt s otvory 4 x 4 mm pod průhledné plastové boxy a ponecháni v klidu 15 min za účelem adaptace na nové prostředí. K mechanické stimulaci byla použita Von Freyova vlákna o silách 10, 20, 35, 59, 80, 140, 290 a 370 mN. Tyto mechanické podněty různé intenzity byly aplikovány ze spodní strany roštu na kůži planty pedis zadních končetin zvířete. Každý stimul byl aplikován šestkrát s dvousekundovým časovým odstupem mezi jednotlivými stimulacemi, od nejnižší intenzity postupně k vyšším. Vlákem bylo vždy stimulováno přesně určené místo planty pedis, v bezprostřední blízkosti chirurgické incise (do 1 mm, viz. dále), stejné na obou zadních končetinách zvířete. Zaznamenán byl počet vyvolaných reflexních odpovědí (elevací končetin od podložky) pro každý podnět. Přenášení váhy nebo spontánní pohyby zvířete nebyly považovány za odpověď. Kontrolní odpovědi na mechanické podněty byly zjištěny u všech zvířat před provedením jakékoliv experimentální procedury.

3.1.2. Testování citlivosti zvířat na tepelné podněty

Odpovědi zvířat na stimulaci teplem byly testovány pomocí tepelného podnětu aplikovaného na oblast planty pedis zadních končetin. Potkani byli umístěni pod plastové průhledné boxy na vyvýšenou, 3 mm silnou skleněnou desku, umožňující manipulaci s kontrolovaným zdrojem sálavého tepla na její spodní straně.

Potkani byli ponecháni adaptovat se na experimentální prostředí nejméně 15 min před zahájením stimulace. Jako zdroj sálavého tepla sloužil tepelný stimulátor (50 W, Dittel, Praha). Tímto tepelným podnětem byla stimulována přesně vymezená oblast kůže planty pedis zadní končetiny, do které pak byla experimentálním zvířatům aplikována intradermální injekce a provedena chirurgická incise (viz. dále), stejné místo bylo stimulováno i na končetině kontralaterální. Zaznamenávány byly časové intervaly, za které zvířata reflexně odtahovala končetinu od zdroje tepla od okamžiku začátku působení podnětu. Maximální

doba stimulace byla omezena na 30 s, aby nedošlo k traumatizaci plantární kůže působením podnětu. Tepelný stimulus byl aplikován na danou končetinu vždy třikrát po sobě s pětiminutovým časovým odstupem mezi jednotlivými stimulacemi. Kontrolní odpovědi na tepelný podnět byly zaznamenány pro každé zvíře před zahájením jakékoliv experimentální procedury.

3.2. Chirurgické procedury

3.2.1. Intradermální injekce

Na plantární kůži experimentální končetiny byla nejprve vyznačena 1 cm dlouhá linie rovnoběžná s dlouhou osou planty pedis, probíhající přibližně uprostřed od okraje paty distálním směrem. Tato linie označovala místo injekce a/nebo incise. 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 průběhu injekce pronikla jehla kůží na distálním konci vyznačené linie. Injikovaný roztok se v kůži nepatrně rozšířil a vytvořil malý puchýř. V oblasti tohoto puchýře byla později provedena chirurgická incise. V pokusech, kdy byla intradermální injekce aplikována až po vytvoření incise, byl objem injikované látky rozdělen do dvou stejných bolusů, které byly injikovány v těsné blízkosti při obou okrajích 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 μM) byl připraven rozpuštěním SB 366791 (SB 366791, Tocris) v ethanolu s 0,9% roztokem NaCl 1:9. Rozpouštěcí 0,9% roztok NaCl s 10% ethanolom obsahoval stejnou koncentraci ethanolu jako roztok kapsaicinu nebo TRPV1 antagonisty. Po injekci byla zvířata ponechána v klecích, aby se zotavila z celkové narkózy.

3.2.2. Plantární incise

Pokusy byly prováděny na zvířecím modelu pooperační bolesti, který poprvé popsal Brennan et al., 1996. (32) V celkové anestézii etherem byla za sterilních podmínek provedena longitudinální incise plantární kůže a plantárního svalu potkanů. Tato 7 mm dlouhá incise, s proximálním začátkem 3 mm od okraje paty a probíhající distálním směrem rovnoběžně s dlouhou osou planty pedis, byla vytvořena protětním kůže a fascie planty pedis skalpelem s čepelkou 11. Musculus plantaris byl rovněž longitudinálně protnut, a to tím způsobem, že jeho začátek i úpon zůstaly intaktní. Po hemostáze mechanickým stlačením rány byla provedena sutura kůže dvěma stehy z nevstřebatelného monofilu 4-0 na chirurgické jehle DS19. Po operačním zákroku se zvířata zotavovala v klecích z celkové anestézie. Rány se kompletně hojily během 5 – 6 dnů *ad integrum*.

3.2.3. Implantace intratekálního katétru

Katétry byly vyrobeny ze dvou polyethylenových hadiček o velikostech PE – 5 a PE – 10. Hadička PE – 10 byla nejprve ohnuta nad kahanem do potřebného tvaru a poté připojena jedním koncem k PE – 5 hadičce pomocí epoxydového dvousložkového lepidla. Hotový katétr byl naplněn sterilním fyziologickým roztokem.

Vlastní implantace katétru 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. Srst na hřbetě potkana byla nejprve odstraněna elektrickým holicím strojkem. Po desinfekci

kůže ajatinovou tinkturou (Ajatin Plus, Profarma) byla skalpelem provedena longitudinální incise kůže a podkoží rovnoběžná s podélnou osou páteře nad trnovými výběžky obratlů. Rozpreparováním páteřních svalů byly exponovány lumbální obratle. Do intervertebrálního prostoru L1 – L2 byla zasunuta injekční jehla a perforována dura mater. PE – 5 konec katétru byl zasunut takto vytvořeným otvorem do subarachnoideálního prostoru a fixován k páteři pomocí dentálního cementu (Duracryl, Spofa). Rána byla chirurgicky uzavřena po vrstvách, PE – 10 konec katétru exponován na povrchu kůže hřbetu a zataven. Zvířata se zotavovala po zákroku 5 dní.

Intratekální katétrů sloužily k aplikaci N – oleoyldopaminu (OLDA), bradykininu a SB 366791. 50 μ M roztok OLDA (OLDA, Tocris) byl připraven z 50 mM zásobního roztoku (OLDA v dimethylsulfoxidu), tento 50 mM roztok OLDA v DMSO byl dále naředěn 0,9% roztokem NaCl na potřebnou 50 μ M koncentraci. 1 mM bradykinin (bradykinin acetate, Sigma) byl připraven ze 16 mM zásobního roztoku (bradykinin v destilované vodě) pomocí 0,9% roztoku NaCl. 100 μ M SB 366791 byl připraven ze 100 mM zásobního roztoku (SB 366791, Tocris, rozpuštěný v DMSO), tento zásobní roztok byl dále ředěn 0,9% roztokem NaCl na potřebnou 100 μ M koncentraci. V den pokusu byly tyto látky intratekálně aplikovány implantovanými katétrů pomocí Hamiltonovy injekční stříkačky v krátkodobé celkové anestézii etherem. Po injekci se zvířata ve svých klecích zotavovala z celkové anestézie, než bylo zahájeno behaviorální testování odpovědí na mechanické a tepelné podněty.

Na konci každého pokusu byla zvířata utracena vysokou dávkou etheru. Do všech katétrů pak byla injikována methylenová modř a jejich pozice vizuálně zkontrolována.

3.2.4. Retrográdní značení spinothalamických neuronů (STT) a postsynaptických neuronů zadních provazců (PSDC)

Retrográdní 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. U zvířat určených k označení STT neuronů byla elektrickým holicím strojkem odstraněna srst z temenní části hlavy, zvířatům určeným ke značení PSDC neuronů byla oholena srst v oblasti šíje. Kůže byla desinfikována ajatinovou tinkturou (Ajatin Plus, Profarma).

Pro stereotaktický přístup k thalamu byla vytvořena krátká incise na temeni hlavy přibližně v oblasti průběhu sagitálního lebečního švu. Kůže a měkké pokrývky lební byly odtaženy pomocí retraktoru a do obou temenních kostí byly frézou vyvrtány obdélníkové otvory po obou stranách sagitálního švu tak, aby nedošlo k poranění mozku ani jeho obalů. Do laterálních thalamických jader bylo zvířatům skrz tyto otvory aplikováno fluorescenční barvivo (dextran značený Cy2, Molecular Probes) pomocí skleněné mikropipety připevněné na mikromanipulátor spojený s aplikačním systémem na stlačený vzduch (celkem 6 injekcí na každou stranu, injikovaný objem barviva 0,5 μ l; 2 – 4 mm kaudálně a 3 mm laterálně od bregmatu, do hloubky 6 mm od povrchu mozkové hemisféry).

Pro přístup k nucleus gracilis byla incise vytvořena na šíji zvířete, proximodistálním směrem rovnoběžně s podélnou osou páteře. Poté bylo tupě rozpreparováno šíjové svalstvo a identifikována atlantookcipitální membrána. Za účelem vizualizace kraniálního konce míchy, konkrétně oblasti jader zadních provazců a části čtvrté mozkové komory, a k umožnění přístupu k nucleus gracilis, byl v atlantookcipitální membráně nůžkami prostřížen otvor. Skleněnou mikropipetou připevněnou na mikromanipulátor bylo pak pomocí aplikačního systému na stlačený vzduch stejným způsobem injikováno dextranové barvivo do oblasti nucleus gracilis na obou stranách (objem injekce 0,25 μ l) pod kontrolou zraku pomocí operačního mikroskopu.

Operační rána byla chirurgicky uzavřena po vrstvách a zvířata se zotavovala 7 – 10 dní po zákroku, než byla dále použita k vlastnímu experimentu. Místo aplikace fluorescenčního barviva v thalamu i v nucleus gracilis bylo vždy mikroskopicky ověřeno na histologickém řezu po skončení každého pokusu.

3.3. Imunohistochemie

V jádrech neuronů lumbální míchy byla pomocí imunohistochemických metod sledována exprese c-Fos dvě hodiny po provedení plantární incise u různých skupin experimentálních zvířat. Tato zvířata byla nejprve uvedena do hluboké anestézie pentobarbitalem (sodium pentobarbital, 80 mg/kg i.p.). Poté byla provedena thorakotomie a kanylace ascendentní aorty skrz stěnu levé srdeční komory. Zvířata byla pomocí této kanyly transkardiálně perfundována heparinizovaným fyziologickým roztokem (500 ml 0,9% NaCl se 100 IU heparinu). Po kompletní exsanguinaci následovala perfúze zvířete 4 % roztokem paraformaldehydu v 0,1 M fosfátovém pufru (500 ml; pH 7,4), po perfúzi byla vypreparována mícha a mozek. Vypreparované tkáně byly nejprve umístěny na 4 hodiny do stejného 4% fixačního roztoku paraformaldehydu, na noc pak byly přemístěny do 30% roztoku sacharosy ve fosfátovém pufru za účelem kryoprotekce. Na kryostatu 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 a shromažďovány do zkumavek s 0,1 M fosfátovým pufrem. 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. Tkáňové řezy byly nejprve třikrát promyty 0,1 M fosfátovým pufrem po dobu deseti minut a potom 30 minut inkubovány v 3% blokovacím roztoku normálního oslího séra (NDS, normal donkey serum) při pokojové teplotě. Poté proběhla inkubace 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 tkáňové řezy znovu třikrát promyty v 1% NDS po dobu deseti minut a následovala dvouhodinová inkubace v roztoku biotinylované sekundární protilátky (1:400; biotin – SP – conjugated donkey anti – rabbit IgG; Jackson Immuno Research Laboratories, in., West Grove, PA, USA) při pokojové teplotě. Dále byly řezy opět promyty fosfátovým pufrem dvakrát po deseti minutách a inkubovány se streptavidinem konjugovaným s peroxidázou (1:600; peroxidase – conjugated streptavidin; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) dvě hodiny při pokojové teplotě, produkt reakce byl vizualizován pomocí 0,01% peroxidu vodíku a 0,05% diaminobenzidinu jako chromogenu. Po desetiminutovém opláchnutí v 0,1% fosfátovém pufru byly takto zpracované míšní řezy montovány na skla potažená želatinou.

Imunohistochemické zpracování tkání zvířat, kterým byly retrográdně označeny STT a PSDC neurony, proběhlo stejným způsobem, s výjimkou sekundární protilátky použité k detekci exprese Fos. Po reakci s primární protilátkou a promytí v 1% NDS byly tyto míšní řezy dvě hodiny inkubovány v roztoku sekundární protilátky konjugované 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). Po inkubaci pak byly deset minut oplachovány v 0,1 M fosfátovém pufru a montovány na skla potažená želatinou.

3.4. Pilotní studie

3.4.1. Účinek lokálně aplikovaného bupivakainu na pooperační mechanickou alodynii a hyperalgií (86)

Chirurgická incise na kůži hřbetu potkana představuje jeden ze zvířecích modelů pooperační bolesti, který je velmi užitečný ke studiu neurofyzilogických mechanismů tohoto bolestivého stavu. Je vhodný k testování účinku farmak nejen na akutní bolest chirurgického původu, ale také na průběh pooperační alodynii a hyperalgie, umožňuje odlišit primární a sekundární alodynii a hyperalgií. Tento model byl použit v pilotních pokusech studie.

V krátkodobé celkové anestézii sevofluranem bylo pokusným zvířatům do vyznačené oblasti na oholené kůži hřbetu subkutánně aplikováno 0,6 ml roztoku bupivakainu (0,25%) nebo rozpouštědla (pozitivní kontrola). 30 minut po injekci pak byla na stejném místě provedena 1 cm dlouhá chirurgická incise kůže. Po zákroku byly v různých časových intervalech testovány behaviorální odpovědi zvířat na mechanickou stimulaci kůže hřbetu pomocí Von Freyových vláken o intenzitách 18 – 250 mN. Za odpověď signalizující nociceptivní vjem byla považována viditelná kontrakce podkožních svalů v místě stimulace, tzv. CTMR (cutaneus trunci muscle reflex). Kontrolní odpovědi zvířat na mechanické podněty aplikované na intaktní kůži hřbetu byly zaznamenávány 3 dny před zahájením vlastního experimentu. Po chirurgickém zákroku byla Von Freyova vlákna aplikována na kůži ve vzdálenosti jednak 0,5 cm od incise, za účelem sledování primární pooperační alodynii a hyperalgie, a dále 2 cm od incise na kontralaterální stranu od páteře k testování sekundární alodynii a hyperalgie. Odpovědi na mechanické podněty a jejich případné pooperační změny byly sledovány opakovaně v různých časových intervalech po dobu 7 dní po provedení chirurgického zákroku.

Pilotní pokusy poskytly mimo jiné důležité poznatky a zkušenosti s experimentální prací na zvířecím modelu pooperační bolesti. Přinesly základní informace o časovém průběhu tohoto bolestivého stavu, ověřily možnost ovlivnění jeho průběhu účinnou látkou a pomohly tak vytvořit zázemí pro experimenty hlavní části studie.

3.5. Experiment 1

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

U všech experimentálních zvířat byly před zahájením pokusu zjištěny kontrolní odpovědi na mechanické a tepelné podněty aplikované na intaktní kůži planty pedis. První skupině zvířat (n = 8) byl nejprve intradermálně injikován kapsaicin do kůže pravé planty pedis. 24 hodin poté byly znovu otestovány odpovědi na mechanické a tepelné podněty a provedena chirurgická incise na pravé končetině těchto zvířat v místě injekce. Citlivost na mechanické a tepelné podněty byla dále opakovaně testována 1, 2, 4, 6, 24, 30, 48 a 144 hodin po zákroku. Kontrolní zvířata (n = 8) podstoupila stejnou proceduru, místo roztoku kapsaicinu jim bylo aplikováno do kůže planty pedis pouze rozpouštědlo. Druhé skupině experimentálních zvířat byl roztok kapsaicinu (n = 8) nebo rozpouštědla (n = 8) intradermálně aplikován 6 dní před provedením plantární incise, zbývající část experimentu proběhla identicky jako u první skupiny. Třetí skupina zvířat podstoupila nejprve chirurgický zákrok, kapsaicin (n = 7) nebo rozpouštědlo (n = 6) byly injikovány 2 hodiny poté. Čtvrté skupině zvířat byl intradermálně aplikován kapsaicin (n = 8) nebo rozpouštědlo (n = 8) bez provedení plantární incise. Časové schéma testování odpovědí na mechanické a tepelné podněty bylo u všech experimentálních skupin stejné.

3.6. Experiment 2

3.6.1. Ovlivnění exprese c – Fos v neuronech zadních rohů míchy chirurgickou incíí pomocí lokálně aplikovaného kapsaicinu

První skupině experimentálních zvířat v této sérii pokusů ($n = 8$) byl nejprve intradermálně aplikován kapsaicin ($n = 4$) nebo rozpouštědlo ($n = 4$) do pravé planty pedis. 24 hodin po injekci byla vytvořena plantární incise a pomocí histochemické metody streptavidin – biotin – peroxidáza byla zjišťována exprese c-Fos v jádrech neuronů lumbální míchy 2 hodiny po tomto chirurgickém zákroku. U druhé skupiny zvířat ($n = 3$) byla sledována exprese c-Fos 24 hodin po intradermální injekci kapsaicinu stejnou metodou, bez provedení chirurgické incise na plantě pedis.

U třetí skupiny zvířat ($n = 8$) byly nejprve retrogradně označeny STT neurony. 7 – 10 dní poté jim byl intradermálně aplikován kapsaicin ($n = 4$) nebo rozpouštědlo ($n = 4$) do pravé planty pedis a 24 hodin po injekci provedena plantární incise. Expresse c-Fos v míšních neuronech těchto zvířat 2 hodiny po zákroku byla sledována pomocí imunohistochemické metody se sekundární protilátkou konjugovanou s fluorescenčním barvivem Texas – Red. U zvířat čtvrté skupiny ($n = 8$) byly retrogradně označeny PSDC neurony. Podle stejného schématu jim byl 7 – 10 dní po značení intradermálně injikován kapsaicin ($n = 4$) nebo rozpouštědlo ($n = 4$) do pravé planty pedis, 24 hodin po injekci vytvořena plantární incise a 2 hodiny po provedení incise stanovena exprese c-Fos v lumbální míše imunohistochemickou metodou s fluorescenčním barvivem Texas – Red.

3.7. Experiment 3

3.7.1. Zjišťování úlohy periferních a centrálních TRPV1 receptorů v rozvoji pooperační mechanické alodynie a mechanické a tepelné hyperalgie

V této sérii pokusů byl po testování kontrolních odpovědí na mechanickou a tepelnou stimulaci intaktní kůže planty pedis zvířatům první skupiny intradermálně injikován TRPV1 antagonist SB 366791 (0,1 ml 100 μ M roztoku) ($n = 8$) nebo roztok rozpouštědla ($n = 8$) bez SB 366791 do pravé planty pedis. Po 30 minutách byla na injikované končetině provedena plantární incise. Bezprostředně po sutuře rány byla aplikována druhá intradermální injekce SB 366791 nebo rozpouštědla, polovina objemu byla injikována podél okraje rány na jednu a polovina na druhou stranu od incise. Odpovědi na mechanické a tepelné podněty byly opakovaně testovány 1, 2, 4, 6, 24, 30, 48, 144 a 192 hodin po tomto zákroku. Zvířatům druhé skupiny byl pomocí intradermální injekce aplikován SB 366791 ($n = 4$) nebo rozpouštědlo ($n = 8$) do kůže pravé planty pedis, plantární incise u těchto zvířat vytvořena nebyla. Behaviorální testování odpovědí na mechanické a tepelné podněty probíhalo stejným způsobem, jako u první experimentální skupiny.

Třetí skupině zvířat byly nejprve implantovány intratekální katétry, 5 dní po implantaci byly zjištěny kontrolní odpovědi na mechanické a tepelné podněty. V den pokusu byly odpovědi otestovány znovu a do intratekálního katétru podáno 20 μ l SB 366791 (100 μ M u $n = 6$ a 10 μ M u $n = 4$) nebo rozpouštědla ($n = 6$). Následovala injekce 50 μ l sterilního fyziologického roztoku, 15 minut po intratekální injekci byla vytvořena chirurgická incise na pravé plantě pedis. Poté proběhlo behaviorální testování odpovědí zvířat na mechanické a tepelné podněty podle stejného experimentálního protokolu s předchozími skupinami. Čtvrtá

skupina zvířat podstoupila stejnou experimentální proceduru bez provedení plantární incise 5 dní po implantaci katétru. Po intratekální aplikaci TRPV1 antagonisty (100 μM u $n = 6$ a 10 μM u $n = 4$) nebo rozpouštědla ($n = 6$) nebyla vytvořena chirurgická incise na pravé plantě pedis, zvířata však prošla stejnou testovací procedurou odpovědi na mechanické a tepelné podněty jako předchozí skupina.

3.8. Experiment 4

3.8.1. Mechanismus senzitivace centrálních TRPV1 receptorů

Všem zvířatům použitým v této části studie byly implantovány intratekální katétrů a 5 dní po implantaci otestovány jejich odpovědi na mechanickou a tepelnou stimulaci planty pedis. V den pokusu byly tyto kontrolní odpovědi testovány znovu.

První skupině zvířat bylo do katétru aplikováno 20 μl 50 μM roztoku OLDA ($n = 4$), injekci následovalo intratekální podání 50 μl sterilního fyziologického roztoku. Odpovědi těchto zvířat na mechanické a tepelné podněty byly testovány 1, 2, 4, 6 a 24 hodin po injekci. Zvířatům druhé skupiny bylo stejným způsobem aplikováno 20 μl 1 mM roztoku bradykininu následovaného 50 μl sterilního fyziologického roztoku ($n = 6$). Behaviorální testování pak proběhlo podle stejného časového schématu jako u předchozí skupiny.

U třetí skupiny zvířat bylo v den pokusu intratekálně podáno 10 μl 2 mM roztoku bradykininu a 10 μl 100 μM roztoku OLDA ($n = 6$). Koncentrace těchto látek byly oproti předchozím experimentálním skupinám zvýšeny na dvojnásobek proto, aby bylo podáno stejné množství účinných látek a zároveň nebyl zvýšen objem intratekálně injikovaného roztoku. Následovalo 50 μl sterilního fyziologického roztoku a testování odpovědi na mechanické a tepelné podněty bylo provedeno stejným způsobem jako u dvou předchozích skupin zvířat této série pokusů. 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 a 10 μl 100 μM roztoku OLDA a 50 μl sterilního fyziologického roztoku. Skupina zvířat podstoupila identické 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 následovaných 50 μl sterilního fyziologického roztoku intratekálně aplikováno znovu 24 hodin po první injekci. Bradykinin a OLDA byly těmto zvířatům podruhé intratekálně podány bez TRPV1 antagonisty. Testování odpovědi na mechanické a tepelné podněty proběhlo 1 a 2 hodiny po druhé intratekální injekci a jeho výsledky sloužily jako pozitivní kontrola.

3.9. Analýza a statistické zpracování dat

3.9.1. Behaviorální testování odpovědi zvířat na mechanické a tepelné podněty

Odpověď zvířat na mechanickou stimulaci Von Freyovými vlákny byla hodnocena jako přítomná (1) nebo chybějící (0). Pro každé vlákno byl pak spočítán průměr z těchto hodnot získaných při šesti stimulacích, který představoval průměrný počet vyvolaných reflexních odpovědí tímto vláknem na šest stimulací. Z takto získaných počtů odpovědí jednotlivých zvířat dané experimentální skupiny byl znovu spočítán průměr, směrodatné odchylky a standardní chyby průměru pro každý čas testování. Při tepelné stimulaci byly zaznamenávány časové intervaly od začátku působení stimulu do okamžiku, kdy zvíře reflexně odtáhlo

končetinu od zdroje tepla a spočítána průměrná hodnota ze třech stimulací pro každou končetinu. Z takto získaných číselných hodnot od jednotlivých zvířat byl opět spočítán průměr, směrodatná odchylka a standardní chyba průměru pro každý testovací čas v dané experimentální situaci.

Data byla statisticky zpracovávána pomocí dvoufaktorové analýzy rozptylu, opakovaná měření v čase (two – way repeated – measures analysis of variance, ANOVA). Druh aplikované látky (kapsaicin, SB 366791 nebo rozpouštědlo) byl prvním faktorem, tímto parametrem se od sebe odlišovaly jednotlivé sledované subjekty, druhým faktorem byl čas. Pomocí dvoufaktorové ANOVA tak byly zjištěny případné rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami zvířat v čase. Rozdíly mezi operovanými a intaktními končetinami zvířat různých experimentálních skupin byly dále hodnoceny z hlediska statistické významnosti pro každý testovací čas zvlášť pomocí neparametrické statistické metody (Mann – Whitney U – test).

Výsledky behaviorálních pokusů poslední, čtvrté části studie (experiment 4, viz. výše) byly graficky vyjádřeny stejným způsobem, jako u předchozích pokusů. Tato data však byla statisticky zpracována pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu, opakovaná měření v čase (one – way repeated – measures analysis of variance, ANOVA). Faktorem byl v tomto případě čas, u zvířat byly sledovány změny odpovědi na mechanické a tepelné podněty v čase po jednorázovém farmakologickém zásahu. Kontrolní odpovědi na mechanické a tepelné podněty zjištěné před aplikací farmak byly dále porovnávány s hodnotami zjištěnými v různých časových intervalech po aplikaci, tyto rozdíly odpovědi mezi jednotlivými testovacími časy byly ověřovány z hlediska statistické signifikance pomocí metody post – hoc Tukey test.

3.9.2. Imunohistochemie, retrográdní znační STT a PSDC neuronů a exprese c-Fos v neuronech lumbální míchy

Přítomnost Fos imunopozitivních neuronů byla zjišťována na každém třetím tkáňovém řezu v pořadí získaném z L3, L4 a L5 segmentů lumbální míchy. Pro každý segment bylo vyhodnoceno celkem deset histologických řezů.

Na každém histologickém řezu z míšních segmentů L3 – L5 byl spočítán celkový počet Fos imunoreaktivních neuronů, zvlášť pro pravý a zvlášť pro levý zadní roh. Z těchto čísel byl spočítán průměr, byly tak zjištěny průměrné počty Fos pozitivních neuronů v zadních rozích míchy na každý segment u jednotlivých zvířat. Tyto počty Fos imunopozitivních neuronů v lumbálních míšních segmentech 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. V rámci experimentální skupiny zvířat, kterým nebyla vytvořena chirurgická incise na plantě pedis, byly porovnávány počty Fos imunopozitivních neuronů zjištěné v zadních rozích L 3 – 5 segmentů lumbální míchy mezi pravou a levou stranou pomocí t – testu.

Dále byly na histologických řezech z lumbální míchy počítány v zadních rozích šedé hmoty profily označených STT a PSDC neuronů a hodnoceny z hlediska přítomnosti červeně fluoreskujícího Fos v jejich jádrech. Přesná poloha těchto neuronů v šedé hmotě byla zakreslována na schématické obrázky. Z celkových počtů profilů nalezených na řezech z jednoho segmentu byl spočítán průměr, stejně tak i z počtů profilů označených neuronů vykazujících imunopozitivitu. Tím byly získány průměrné počty těchto neuronů na každý segment jednotlivých zvířat experimentální skupiny. Retrográdně označené neurony vykazující Fos imunopozitivitu ve svých jádrech byly vyjádřeny jako procento z celkového počtu nalezených profilů STT a PSDC neuronů, a to pro každý zkoumaný míšní segment zvlášť. Proporce retrográdně označených neuronů vykazující Fos imunopozitivitu zjištěná u

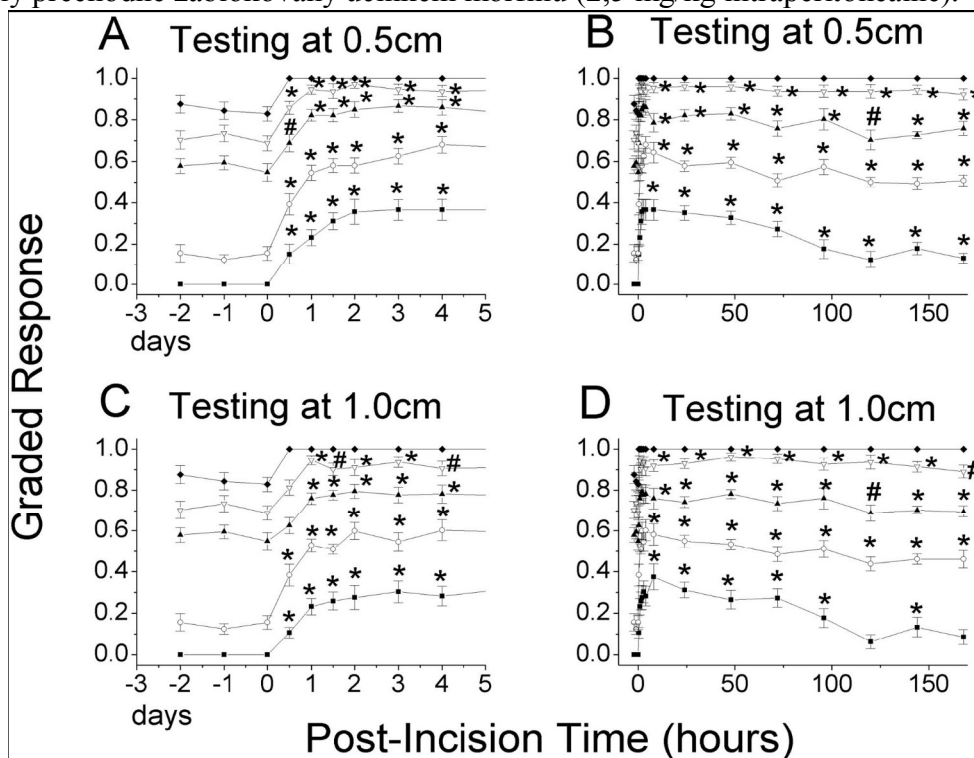
zvířat předoperačně ovlivněných kapsaicinem byla porovnávána se skupinou zvířat, kterým bylo před provedením plantární incise aplikováno rozpouštědlo, a to pomocí statistické metody Mann – Whitney U – test.

4. Výsledky

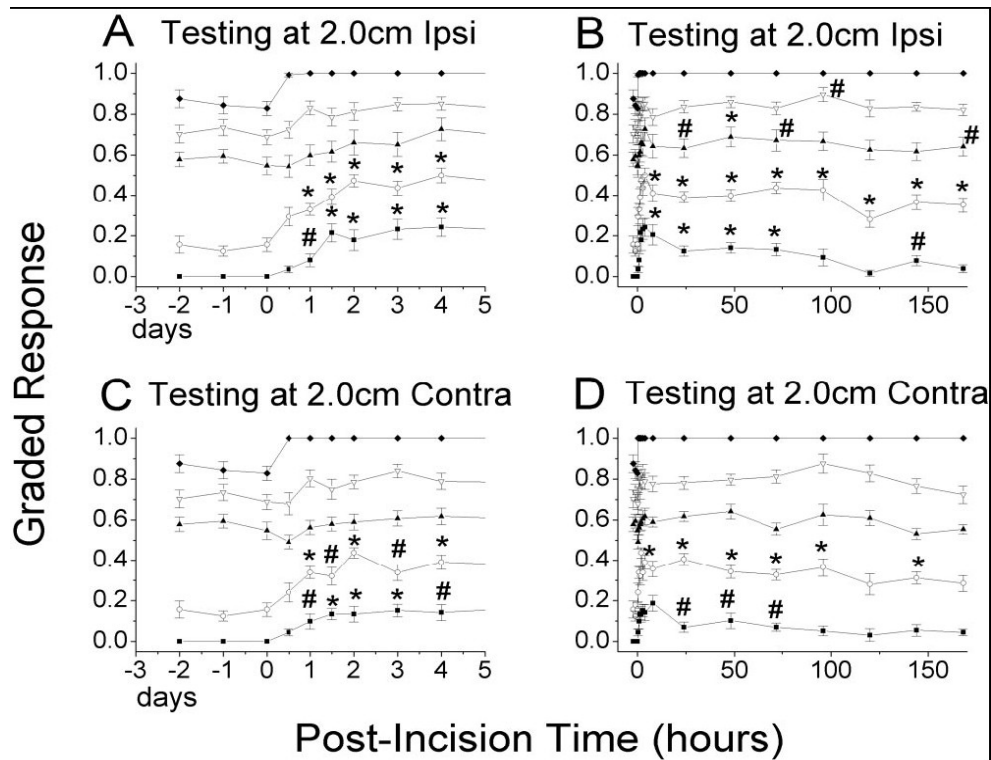
4.1. Ovlivnění pooperační mechanické alodynie účinkem lokálně aplikovaného bupivakainu (86)

4.1.1. Účinek jednorázově aplikované dávky lokálního anestetika na pooperační změny odpovědi zvířat na mechanické podněty

Pilotní studie zkoumala odpovědi experimentálních zvířat na mechanické podněty aplikované na kůži hřbetu a jejich změny způsobené chirurgickou incisí. Bupivakain je potentní lokální anestetikum, které kompletně blokuje veškerou neurální transmissi z místa aplikace. Na vytvořeném modelu pooperační bolesti byl v těchto pokusech testován účinek předoperačně aplikovaného bupivakainu na změny mechanosenzitivity zvířat způsobené chirurgickou incisí. Kontrolním skupinám byl aplikován rozpouštěcí roztok. Jestliže byla stimulována intaktní kůže hřbetu zvířat slabými mechanickými podněty nízkých intenzit, nedocházelo k vyvolání reflexní kontrakce zádočných svalů. Po provedení incise pak zvířata začala na tyto podněty reflexně odpovídat při stimulaci kůže ovlivněné chirurgickým zákrokem, rozvinula se pooperační mechanická alodynie. (Obr. 1, obr. 2) Došlo rovněž ke zvýšení odpovědi na silnější mechanické podněty (hyperalgie), tato pooperační mechanická hyperalgie nastoupila 30 minut po zákroku, dosahovala maxima po 3 – 6 hodinách a přetrvávala minimálně týden po operaci. (Obr. 1, obr. 2) Alodynie se rozvinula s přibližně stejným časovým průběhem, přetrvávala však kratší dobu než hyperalgie. Oba bolestivé stavy byly přechodně zablokovány účinkem morfinu (2,5 mg/kg intraperitoneálně).

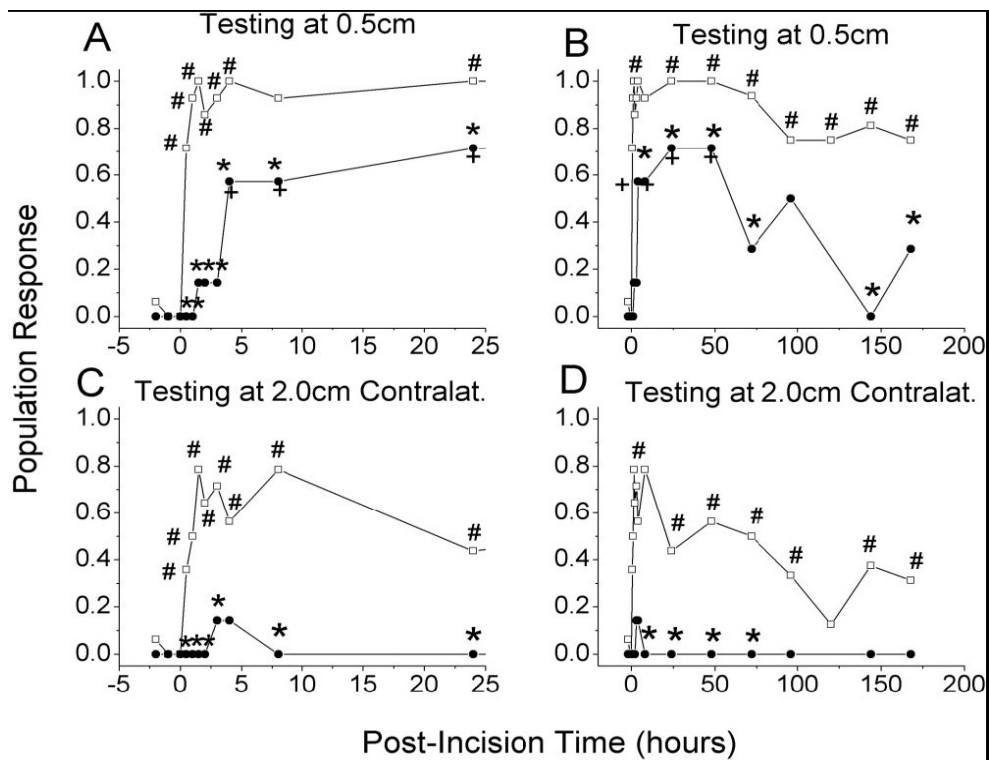


Obr. 1 Časový průběh primární alodynie a hyperalgie (průměr +/- směrodatná odchylka) po chirurgické incisí kůže hřbetu, vyjadřující kinetiku rozvoje v prvních 4 h (A a C) a v průběhu 7 dní (B a D) ve vzdálenostech 0,5 a 1 cm od místa incise u zvířat, kterým byl před provedením incise subkutánně injikován rozpouštěcí roztok, ale nebyla provedena chirurgická incise, pomocí Mann-Whitney U testu: * $P < 0.005$, # $P < 0.05$ (n = 16). Použity byly mechanické podněty o intenzitách 18 (■), 40 (○), 90 (▲), 150 (△) a 250 mN (◆).

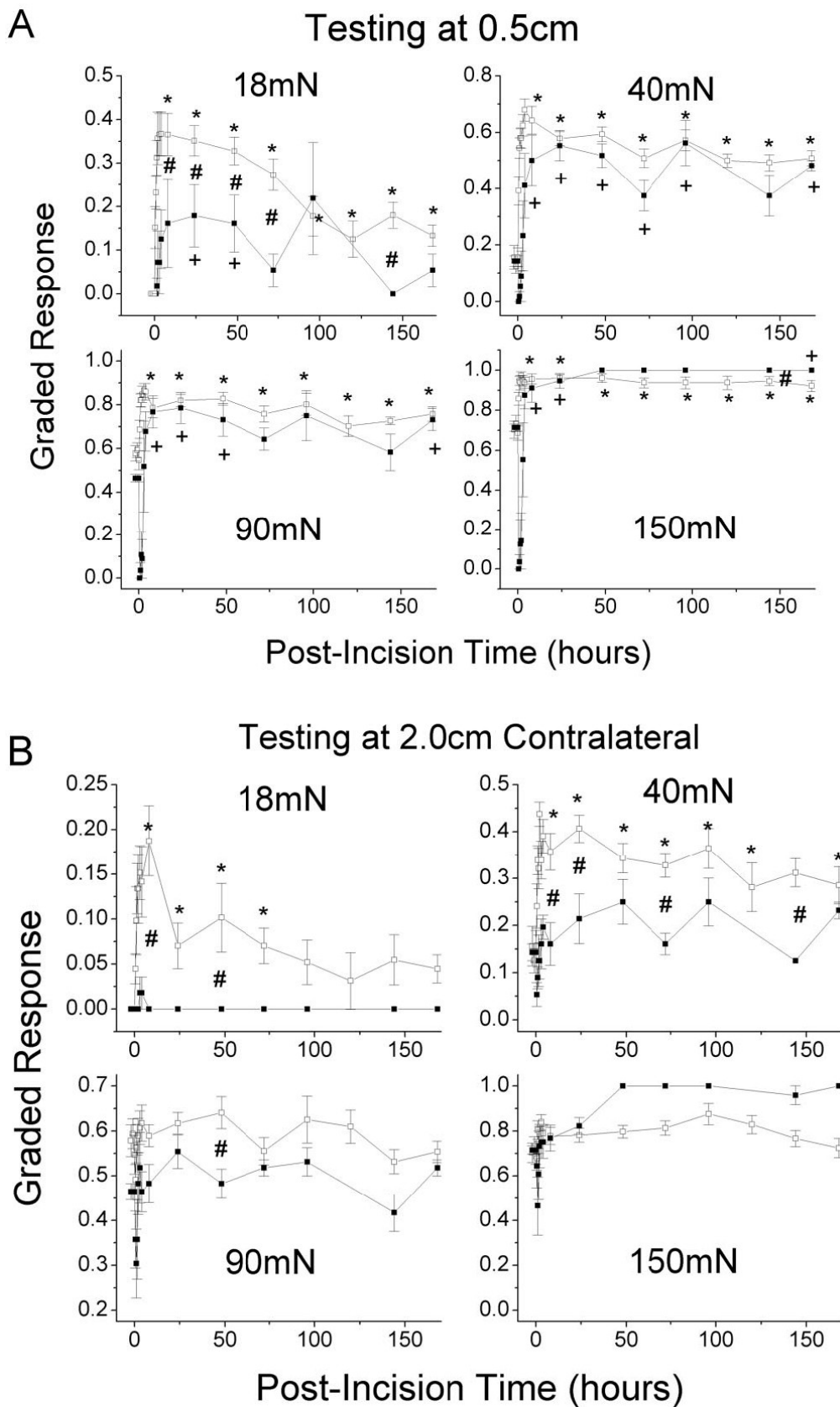


Obr. 2 Časový průběh sekundární alodynie a hyperalgie (průměr +/- směrodatná odchylka měřená ve vzdálenostech 2 cm ipsilaterálně (A a B) a 2 cm kontralaterálně (C a D) od místa incise po subkutánní injekci rozpouštědla. Časné změny odpovědi na mechanické podněty znázorňují grafy A a C, pozdní změny grafy B a D. Symboly vyjadřující statistickou významnost (*, #) a intenzitu použitého mechanického podnětu jsou stejné jako na obr. 1. (n=16)

Subkutánně injikovaný bupivakain (0,25 %) aplikovaný předoperačně do místa incise a způsobující kompletní anestézii kůže na 2 – 3 hodiny oslabil průběh primární mechanické alodynie, ale neměl vliv na průběh primární hyperalgie. Jeho účinkem došlo navíc k úplnému zablokování sekundární mechanické alodynie a oslabení sekundární hyperalgie. (Obr. 3, obr. 4) Bupivakain aplikovaný subkutánně do oblasti šíje zvířete, místa vzdáleného od incise, měl rovněž analgetický účinek na primární i sekundární pooperační alodynii, přičemž zvířata v tomto případě nejevila známky sedace, ataxie ani konvulsivního chování. (Obr. 5)

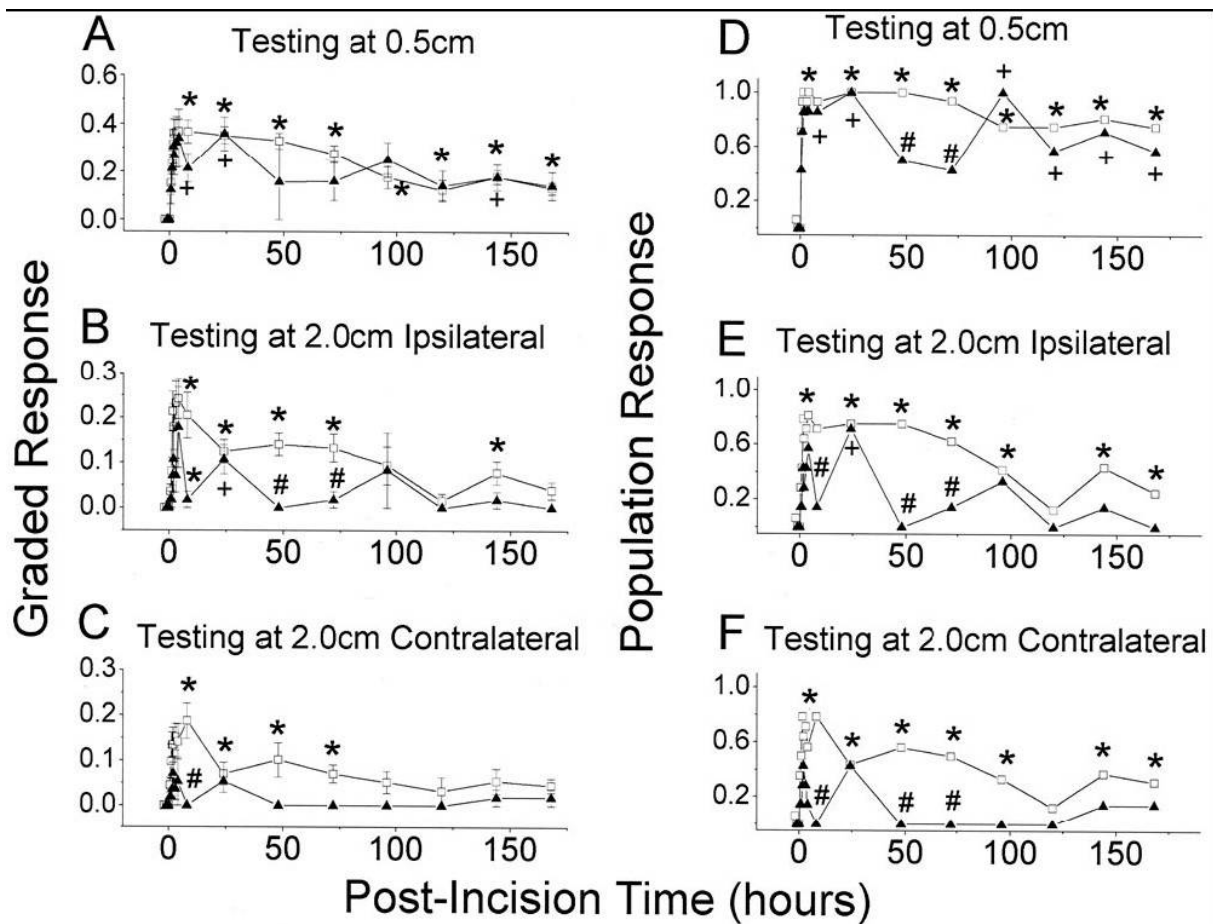


Obr. 3 Mechanická alodynie, detekovaná podle přítomnosti reflexní odpovědi zvířat na stimulaci podnětem o intenzitě 18 mN a hodnocená podle počtu zvířat reflexně odpovídajících na tento mechanický podnět v testované experimentální skupině. Počet primárních reflexních odpovědí první den (A) a první týden (B); sekundární reflexní odpovědi (C a D) ve stejných testovacích časech. □ = rozpouštěcí roztok (n = 16); ● = 0.25% bupivakain (n = 8). P < 0.05, # incise po subkutánní injekci rozpouštědla versus kontrolní hodnota pro intaktní kůži, + incise po subkutánní injekci bupivakainu versus kontrolní hodnota, * incise po injekci rozpouštědla versus incise po injekci bupivakainu.



Obr. 4

Reflexní odpovědi na stimulaci Von Freyovými vlákny 4 různých intenzit skupiny zvířat, kterým byl před provedením incise subkutánně injikován rozpouštěcí roztok (□, n = 16; data z obr. 1) nebo 0.25% bupivakain (■, n = 8). Odpovědi na stimulaci Von Freyovými vlákny ve vzdálenosti 0,5 cm (A) a 2 cm (B) kontralaterálně od incise vyjadřují primární a sekundární změny. Data jsou prezentována jako průměr +/- směrodatná odchylka. Statisticky jsou porovnány odpovědi zvířat, kterým byl před provedením incise subkutánně aplikován bupivakain, versus odpovědi zvířat předoperačně ovlivněných injekcí rozpouštědla (# $P < 0.05$). Reflexní odpovědi obou těchto experimentálních skupin jsou navíc srovnány se zvířaty, kterým byl subkutánně injikován rozpouštěcí roztok, ale nebyla provedena incise kůže hřbetu. (data nejsou znázorněna v grafu). *, + $P < 0.05$.



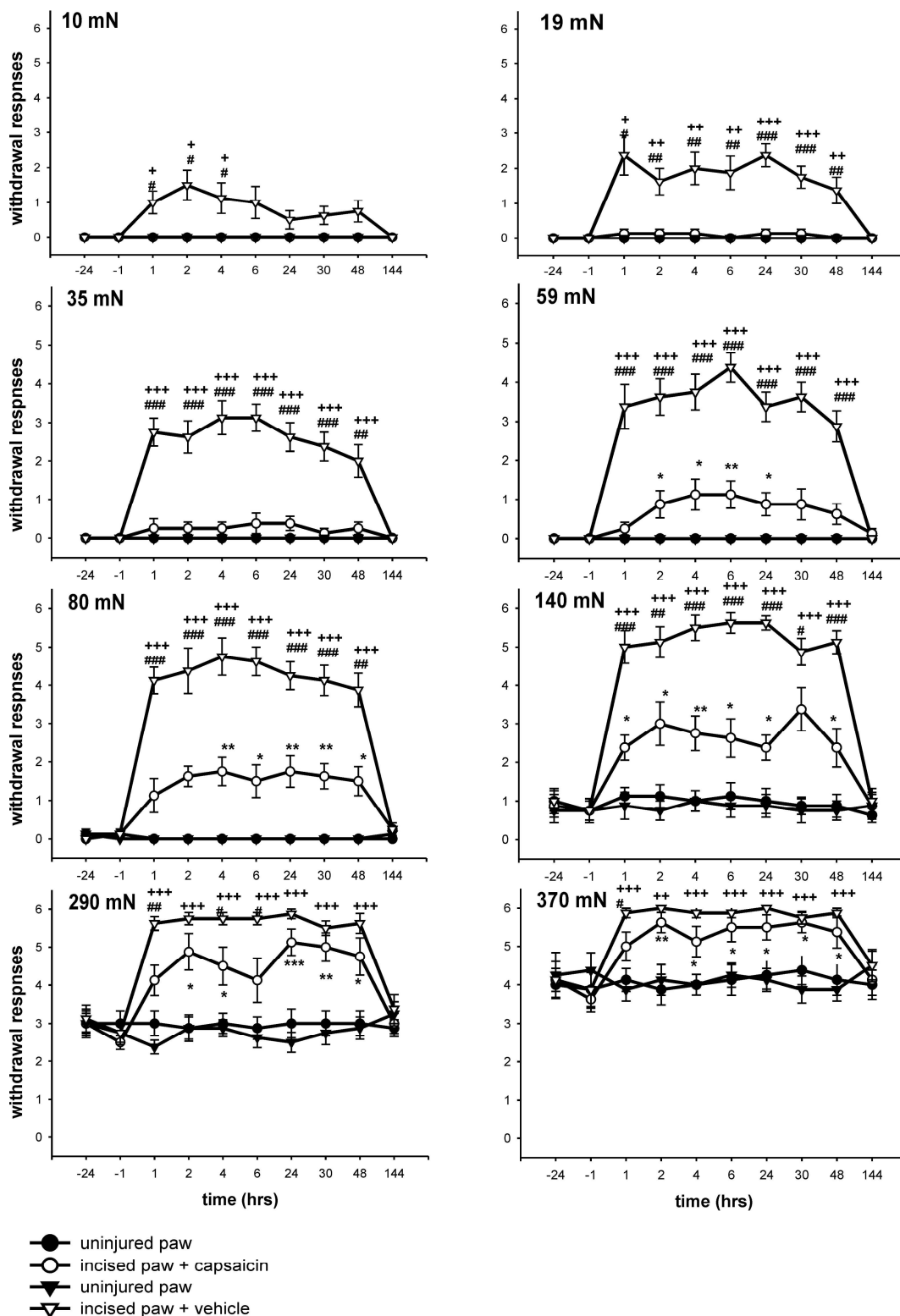
Obr. 5 Odpovědi na mechanický podnět 18 mN (A–C) skupiny zvířat po injekci rozpouštědla (□) do místa incise (n = 16, jako na obr. 1B) a zvířat po injekci 0,6 ml 0,25% roztoku bupivakainu (▲) do podkoží v oblasti šíje (n = 7), aplikovaný na kůži ve vzdálenosti 0,5 cm (A) a 2 cm (B) ipsilaterálně nebo 2 cm kontralaterálně od incise (C). Změny odpovědí na mechanický podnět 18 mN vyjadřující alodynii (D–F) po injekci rozpouštědla do místa incise (□; n = 16) a 0,25% roztoku bupivakainu do oblasti šíje (▲; n = 8). Změny odpovědí na mechanické podněty aplikované na kůži hřbetu ve vzdálenosti 0,5 cm od incise vyjadřují primární alodynii (A), odpovědi na mechanické podněty aplikované ve vzdálenostech 2 cm vyjadřují sekundární alodynii (B a C). Data jsou prezentována jako průměr +/- směrodatná odchylka. Statistická významnost stanovená pomocí Mann – Whitney U testu ukazuje $P < 0.05$, # pro skupinu zvířat ovlivněných injekcí bupivakainu před provedením incise versus skupina ovlivněných injekcí rozpouštědla před tímto chirurgickým zákrokem; * a pro skupinu zvířat ovlivněných injekcí bupivakainu před provedením incise versus skupina zvířat ovlivněných injekcí rozpouštědla bez incise (data nejsou prezentována).

4.2. Účinek lokálně aplikovaného kapsaicinu ve vysoké koncentraci na behaviorální odpovědi zvířat na mechanické a tepelné podněty

4.2.1. Účinek jednorázové lokálně aplikované dávky kapsaicinu ve vysoké koncentraci na pooperační změny odpovědi zvířat na mechanické podněty

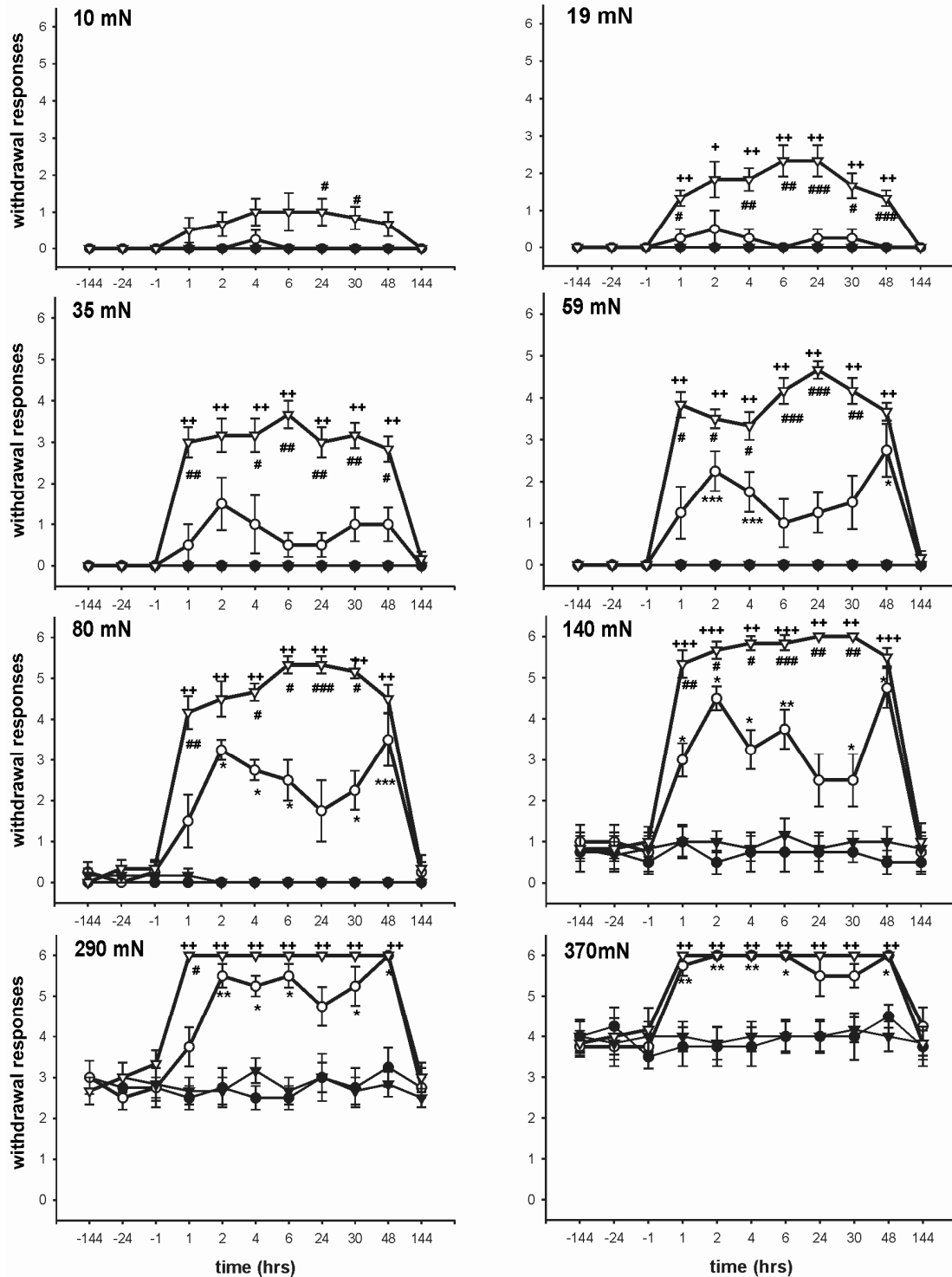
První série pokusů zkoumala změny odpovědí na mechanické podněty aplikované na hladkou kůži planty pedis způsobené chirurgickou incísi u zvířat, kterým byl 24 hodin před zákrokem intradermálně aplikován kapsaicin nebo jen rozpouštěcí roztok. Žádné experimentální zvíře neodpovídalo na stimulaci intaktní kůže planty tenkými Von Freyovými vlákny působícími silami nízkých intenzit (10, 20, 35 nebo 59 mN) před provedením chirurgické incise (24 h a 1 h předem). (Obr. 6) Po zákroku pak docházelo k výrazným reflexním elevacím operovaných končetin při stimulaci těmito podněty. Nárůst odpovědi byl statisticky významný 1h – 48 h po provedení incise a odpovídal rozvoji pooperační mechanické alodynie. Postupně klesal s časem, 144 hodin po incisi se odpovědi zvířat na tyto podněty vrátili na předoperační úroveň. Při stimulaci Von Freyovými vlákny silnějších intenzit (80, 140, 290 a 370 mN) docházelo k vyvolání reflexních elevací stimulované končetiny i před operací. Po provedení incise se citlivost zvířat i na tyto silnější podněty zvýšila, rozvinula se pooperační mechanická hyperalgie. Šest dní po zákroku se pak odpovědi operované končetiny na stimulaci mechanickými silami všech testovaných intenzit nelišily od kontralaterální intaktní končetiny.

Experimentální skupině zvířat byl intradermálně aplikován kapsaicin ve vysoké koncentraci 24 před zákrokem, zbytek experimentální procedury proběhl stejným způsobem jako u kontrolní skupiny. (Obr. 6) V porovnání s intaktní kontralaterální končetinou se předoperační odpovědi (24 hodin po injekci kapsaicinu, čas -1 h před provedením incise) na stimulaci slabými mechanickými podněty nezměnily, předoperační odpovědi na silné mechanické podněty byly účinkem kapsaicinu 1 h před zákrokem sniženy. V porovnání s kontralaterální intaktní končetinou však nebyl tento rozdíl statisticky významný. U těchto zvířat, kterým byl předoperačně aplikován kapsaicin, došlo pouze k mírnému pooperačnímu nárůstu odpovědi na mechanickou stimulaci operované končetiny Von Freyovými vlákny slabých intenzit, což bylo v ostrém kontrastu s výrazným zvýšením odpovědi kontrolních zvířat předoperačně ovlivněných pouze rozpouštědlem. Hypersenzitivita na tyto podněty byla oslabena v průběhu celého pokusu, ve všech sledovaných časových intervalech. Rovněž pooperační odpovědi na stimulaci operované končetiny silnějšími mechanickými podněty (80, 140, 290 a 370 mN) byly u této skupiny zvířat účinkem kapsaicinu významně sniženy v porovnání s operovanými končetinami po injekci rozpouštědla. 144 hodin po zákroku se pak odpovědi obou skupin zvířat na mechanické podněty nelišily.



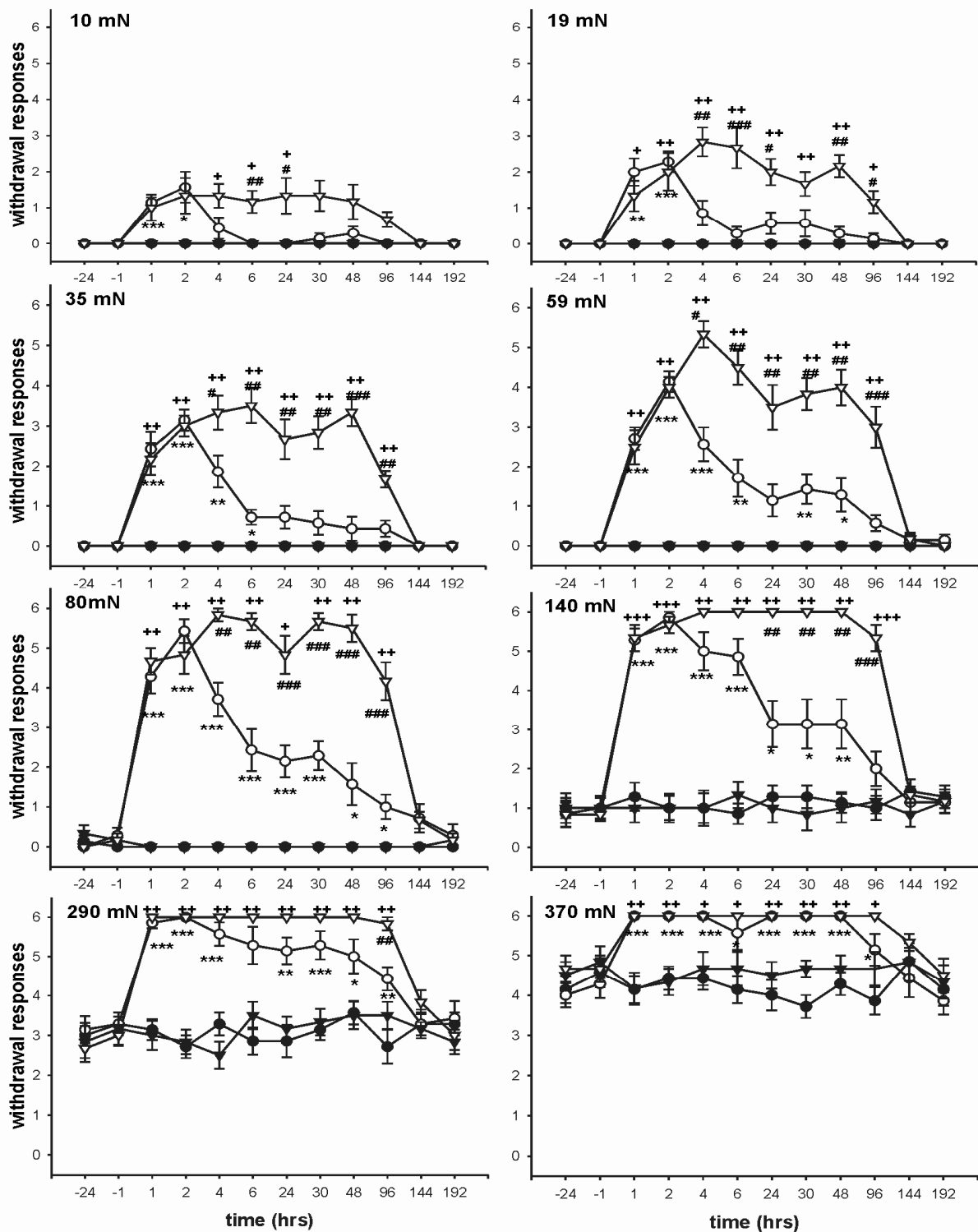
Obr. 6 Kapsaicin 24 h před provedením plantární incise. Počet reflexních odpovědí (průměr +/- standardní chyba průměru) vyvolaných při stimulaci Von Freyovými vlákny (10 – 370 mN) plantární kůže operovaných a intaktních končetin, před a po chirurgickém zákroku. Kapsaicin (○) nebo rozpouštěcí roztok (Δ) byl aplikován 24 h před provedením incise. Počet odpovědí na mechanickou stimulaci operované končetiny se v porovnání s kontralaterální intaktní končetinou (▲) po chirurgickém zákroku signifikantně zvýšil u skupiny zvířat, kterým bylo předoperačně injikováno rozpouštědlo (Δ), rozvinula se pooperační mechanická alodynie a hyperalgie. Injekce kapsaicinu 24 h před zákrokem (○) zabránila tomuto nárůstu mechanosenzitivity pozorovanému u zvířat po předoperační injekci rozpouštědla (Δ). Odpovědi korespondujících kontralaterálních intaktních končetin na mechanické podněty se neměnily (●). 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; +++ 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.

Experimentální procedura další série pokusů byla podobná, jen s tím rozdílem, že byla zvířatům intradermální injekce kapsaicinu nebo rozpouštědla aplikována do kůže planty pedis 6 dní před provedením chirurgické incise. (Obr. 7) Reflexní elevace končetin na stimulaci Von Freyovými vlákny byly testovány před injekcí kapsaicinu nebo rozpouštědla (- 144 hodin), dále 24 h a 1 h před operací a opakovaně po chirurgickém zákroku. Předoperační testování neprokázalo žádný rozdíl v mechanosenzitivitě experimentálních a kontrolních končetin. (Obr. 7) U zvířat, kterým byl 6 dní před zákrokem aplikován rozpouštěcí roztok bez kapsaicinu, došlo po provedení incise k výraznému nárůstu odpovědi na mechanické podněty všech testovaných intenzit. Časový průběh i míra tohoto nárůstu byla v tomto případě stejná jako u skupiny zvířat, kterým byl rozpouštěcí roztok aplikován 24 h před zákrokem. U skupiny zvířat, která byla 6 dní před provedením incise ovlivněna intradermálně aplikovaným kapsaicinem, rovněž nebyly prokázány předoperační změny senzitivity na žádný z testovaných mechanických podnětů. Po zákroku došlo účinkem kapsaicinu k oslabení pooperačního nárůstu odpovědi zvířat na mechanickou stimulaci operovaných končetin v porovnání se zvířaty po injekci rozpouštědla. Tento efekt kapsaicinu se výrazněji projevil při stimulaci podněty slabých intenzit, při testování odpovědi na silnější mechanické podněty byl mírnější. Šestý den po provedení plantární incise (144 h) už nebyl zaznamenán rozdíl odpovědi na mechanické podněty mezi operovanou a intaktní kontralaterální končetinou zvířat. (Obr. 7)



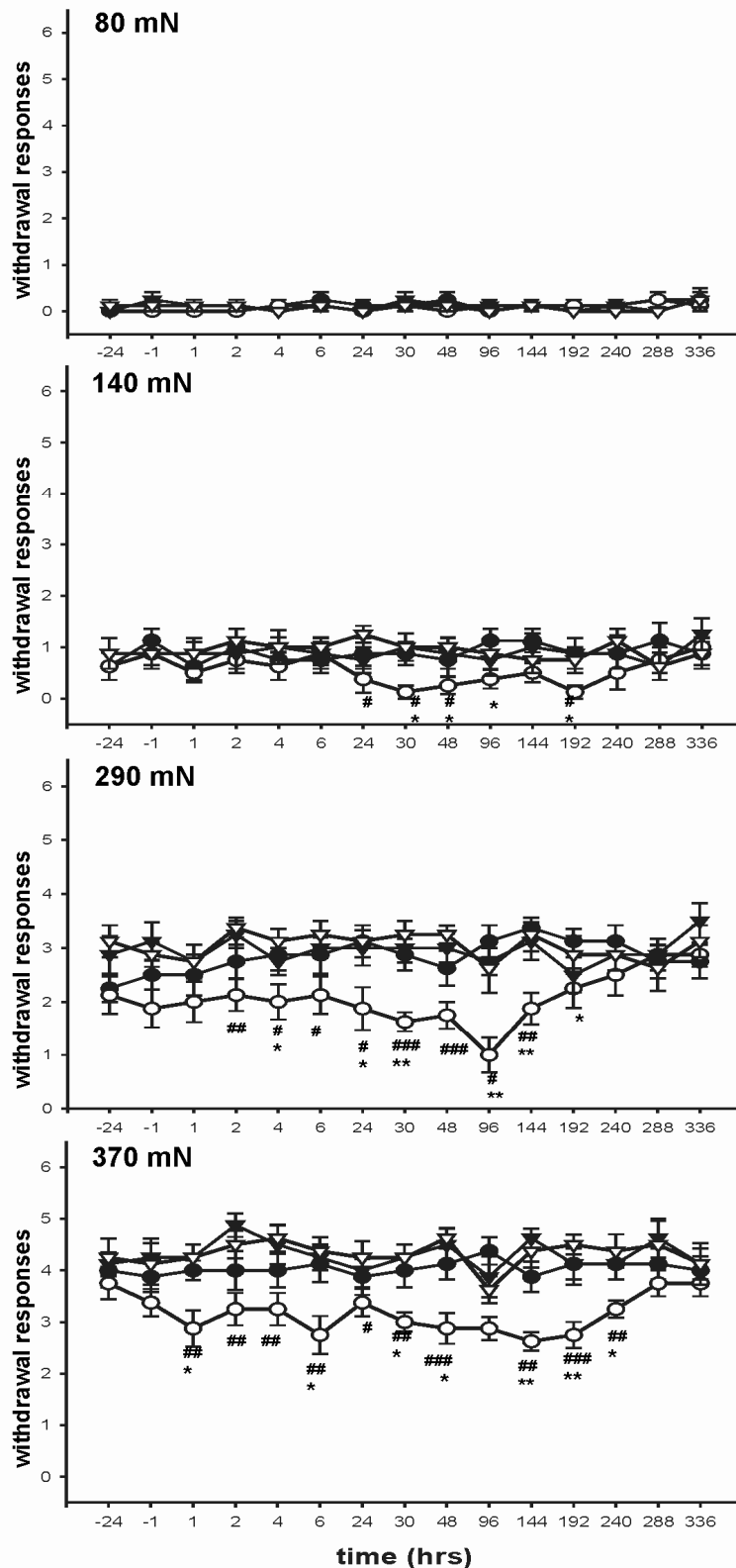
Obr. 7 Kapsaicin 6 dní před provedením plantární incise. Počet reflexních odpovědí (průměr +/- standardní chyba průměru) vyvolaných při stimulaci Von Freyovými vlákny (10 – 370 mN) planty pedis zvířat, kterým byl kapsaicin nebo rozpouštěcí roztok aplikován 6 dní před chirurgickým zákrokem. Po provedení incise se počet vyvolaných odpovědí operovaných končetin výrazně zvýšil u zvířat, kterým bylo předoperačně aplikováno rozpouštědlo (△), odpovědi korespondujících kontralaterálních končetin se neměnily (▲). Tento nárůst reaktivity operovaných končetin byl u skupiny zvířat ovlivněných kapaicinem výrazně oslaben (○) v porovnání s operovanými končetinami po injekci rozpouštědla (△). V porovnání s korespondujícími kontralaterálními končetinami zůstal nárůst odpovědí operovaných končetin i po injekci kapaicinu signifikantní (●), zejména pro mechanické podněty vyšších intenzit. Plantární incise byla provedena v čase 0. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 pro odpovědi operovaných končetin po injekci kapaicinu versus kontralaterálních, + P < 0,05; ++ P < 0,01; +++ P < 0,001 pro odpovědi operovaných končetin po injekci kapaicinu versus odpovědi operovaných končetin po injekci rozpouštědla.

Za účelem ověření účasti mechanismů periferní i centrální senzitivace v rozvoji pooperační bolesti byla v další sérii pokusů zvířatům nejprve vytvořena plantární incise a potom, 2 h po zákroku, aplikována intradermální injekce kapsaicinu nebo rozpouštěcího roztoku. (Obr. 8) Pooperační nárůst odpovědí kontrolních zvířat, kterým bylo 2 h po provedení incise injikováno rozpouštědlo, na stimulaci mechanickými podněty slabých i silnějších intenzit (Obr. 8) byl podobný jako u všech ostatních skupin zvířat ovlivněných injekcí rozpouštědla. (Obr. 7, 8) Stejný nárůst odpovědí na mechanické podněty byl v prvních dvou hodinách po provedení incise (před intradermální injekcí kapsaicinu) zaznamenán i u experimentálních zvířat. V testovacím čase 4 h po zákroku (2 h po injekci kapsaicinu) už pak bylo patrné významné snížení odpovědí na mechanické podněty slabších intenzit u těchto zvířat (Von Freyova vlákna 10 – 80 mN) a v následujících hodinách se odpovědi na tyto podněty dále snižovaly (Obr. 8). Pooperační mechanosenzitivita těchto experimentálních zvířat pak měla další průběh podobný pooperační mechanosenzitivitě v případě aplikace kapsaicinu 24 h před zákrokem. (Obr. 6) Odpovědi zvířat na mechanické podněty dvou nejsilnějších intenzit (290 a 370 mN) byly pooperačně aplikovaným kapsaicinem ovlivněny v menším rozsahu. (Obr. 8) Mezi jednotlivými experimentálními skupinami zvířat této části studie, kterým byla vytvořena chirurgická incise na plantě pedis a aplikována intradermální injekce kapsaicinu nebo rozpouštědla, nebyly zaznamenány žádné rozdíly v procesu hojení rány.



Obr. 8 Kapsaicin 2 h po provedení plantární incise. Počet reflexních odpovědí (průměr +/- standardní chyba průměru) vyvolaných při stimulaci Von Freyovými vlákny (10 – 370 mN) planty pedis zvířat, kterým byl kapsaicin (○) nebo rozpouštěcí roztok (Δ) aplikován 2 h po chirurgickém zákroku. Počet vyvolaných odpovědí se po provedení incise výrazně zvýšil u operovaných končetin obou skupin experimentálních zvířat. Zatímco injekce rozpouštědla neměla (Δ) neměla žádný efekt na pooperační zvýšení reaktivity na mechanické podněty, které přetrvávalo u těchto zvířat nejméně 4 dny (96 h), došlo po aplikaci kapsaicinu 2 h po zákroku k jejímu výraznému oslabení (○), a to již 2 h po této injekci (testovací čas 4 h). Počty odpovědí kotalaterálních intaktních končetin na mechanické podněty se u zvířat po injekci kapsaicinu (●) ani rozpouštědla (▲) nezměnily. 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, + $P < 0,05$; ++ $P < 0,01$; +++ $P < 0,001$ 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.

V dalších pokusech byl testován účinek intradermální injekce kapsaicinu na mechanosenzitivitu intaktní hladké kůže planty pedis experimentálních zvířat. (Obr. 9) U těchto zvířat nebyla vytvořena chirurgická incise na plantě pedis, kapsaicin nebo rozpouštěcí roztok byly intradermálně aplikovány stejným způsobem, jako v předchozích pokusech. Při stimulaci Von Freyovými vlákny slabých intenzit (10 – 80 mN) nebyl po celý časový průběh zjištěn žádný rozdíl ve vyvolaných odpovědích mezi kontrolní skupinou zvířat, kterým bylo aplikováno rozpouštědlo, a skupinou experimentální, které byl intradermálně aplikován kapsaicin. Při stimulaci silnějšími mechanickými podněty (Von Freyova vlákna 140, 290 a 370 mN) bylo zaznamenáno mírné přechodné snížení reaktivity zvířat na tyto podněty účinkem kapsaicinu. Nejvýrazněji se projevilo druhý a třetí den po injekci kapsaicinu, kdy dosáhlo statistické signifikance. Odpovědi na mechanické podněty se vrátily ke kontrolním hodnotám zjištěným před injekcí 12 dní po intradermální aplikaci roztoku kapsaicinu.



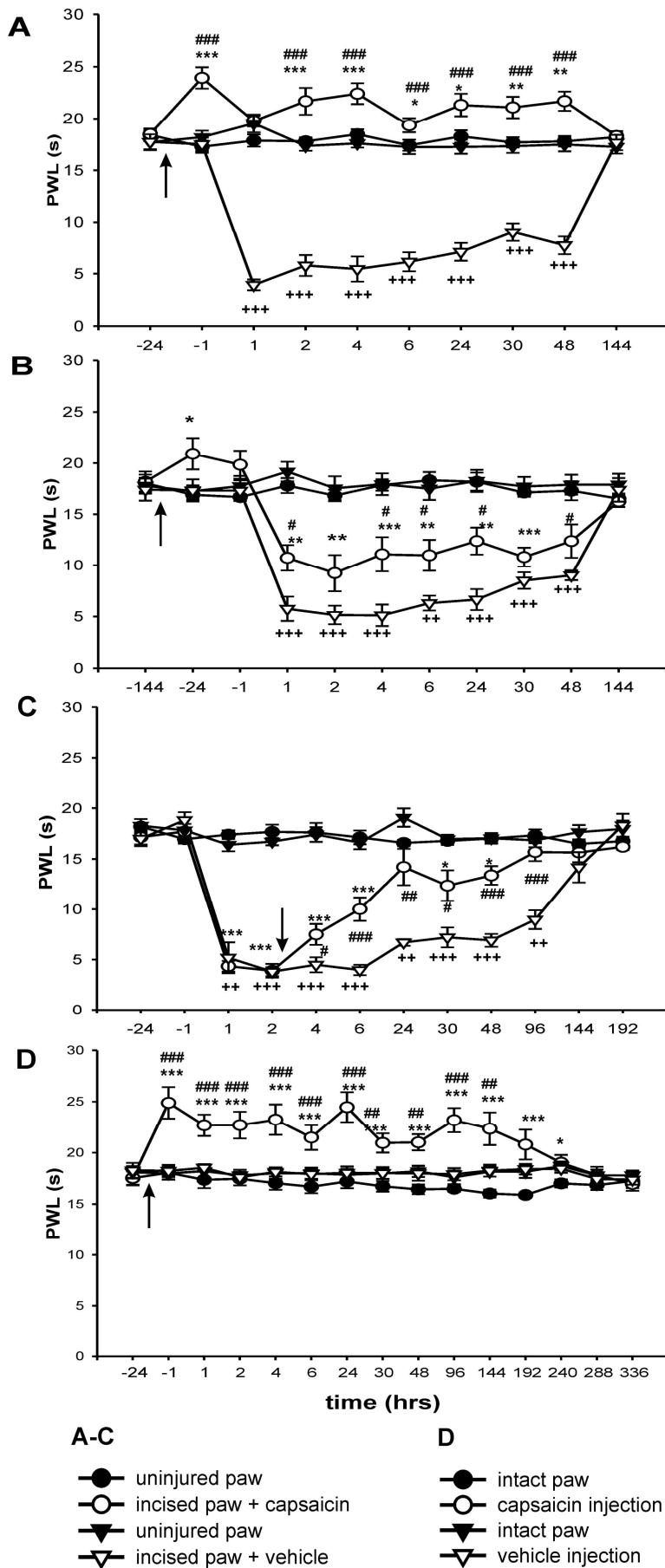
Obr. 9 Kapsaicin bez incise. Počet reflexních odpovědí (průměr +/- standardní chyba průměru) vyvolaných při stimulaci Von Freyovými vlákny (10 – 370 mN) planty pedis zvířat, kterým byl intradermálně aplikován kapsaicin (○) nebo rozpouštěcí roztok (Δ) bez provedení chirurgického zákroku. Rozpouštědlo nebo kapsaicin byly aplikovány v čase 0. Odpovědi na slabé mechanické podněty (Von Freyova vlákna 10 – 80 mN) se po injekci kapsaicinu ani rozpouštědla nezměnily. Reaktivita na podněty vyšších intenzit (140 – 370 mN) se účinkem intradermálně aplikovaného kapsaicinu výrazně snížila (○), a to v porovnání jak s korespondujícími kontralaterálními končetinami této skupiny zvířat (●), tak i s končetinami zvířat po injekci rozpouštědla (Δ). Odpovědi na silné mechanické podněty se vrátily na bazální úroveň 12 dní (288 h) po injekci kapsaicinu. * P < 0,05; ** P < 0,01 pro odpovědi operovaných končetin po injekci kapsaicinu 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.

4.2.2. Účinek jednorázové lokálně aplikované dávky kapsaicinu ve vysoké koncentraci na pooperační změny odpovědi zvířat na tepelné podněty

Za účelem zjišťování změn odpovědi zvířat na tepelné podněty způsobených chirurgickým zákrokem a případného efektu lokálně aplikovaného kapsaicinu na tyto změny byly zaznamenávány časové intervaly, za které zvířata reflexně odtahovala končetinu od zdroje tepla při tepelné stimulaci kůže planty pedis v okolí chirurgické incise. Reaktivita na tepelné podněty byla testována u stejných skupin zvířat jako reaktivita na podněty mechanické. V pokusech byly zkoumány změny odpovědi na tepelné podněty aplikované na hladkou kůži planty pedis způsobené chirurgickou incisí u experimentálních zvířat, kterým byl intradermálně aplikován kapsaicin nebo jen rozpouštěcí roztok. Roztok kapsaicinu nebo rozpouštědla byl intradermálně injikován 24 hodin před provedením incise (Obr. 10A), 6 dní před provedením incise (Obr. 10B) nebo 2 hodiny po zákroku (Obr. 10C), zvířatům poslední experimentální skupiny chirurgická rána vytvořena nebyla. (Obr. 10D) Při stimulaci intaktní kůže tepelným podnětem před začátkem vlastního pokusu nebyl zaznamenán žádný rozdíl v odpovědích na tepelné podněty mezi pravou a levou končetinou zvířat. (Obr. 10A – D) Samotná intradermální injekce rozpouštěcího roztoku rovněž neměla vliv na termosenzitivitu kůže planty pedis, po injekci rozpouštědla se odpovědi na tepelné podněty nelišily od kontrolních hodnot zjištěných při stimulaci intaktní kůže před začátkem pokusu. To je patrné z obr. 10A (prázdné trojúhelníky v časech – 24 h a – 1 h), obr. 10B (- 144 h, - 24 h a – 1h) a obr. 10D (- 24 h a – 1 h). V pokusech, kdy byl zvířatům intradermálně aplikován rozpouštěcí roztok, způsobila chirurgická incise rychlé zkrácení časových intervalů, za které zvířata reagovala na tepelný podnět, a to ze 17 s při stimulaci intaktní kůže na přibližně 5 s, patrné už v prvním testovacím čase 1 h po zákroku (Obr. 10A – C) a představující rozvoj pooperační tepelné hyperalgie. K nejvýraznějšímu zkrácení reakčních intervalů docházelo během prvních 24 h po provedení incise. Postupem času se tyto intervaly opět postupně prodlužovaly až na hodnoty shodné s předoperačními. 6 dní po chirurgickém zákroku (144 h) se odpovědi operovaných končetin na tepelné podněty výrazně nelišily od kontrolních. Intradermální aplikace kapsaicinu 24 h před provedením plantární incise způsobila výrazné prodloužení reakčních intervalů zvířat na tepelnou stimulaci experimentálních končetin, termální hypoalgie, patrnou 1 hodinu před vlastním chirurgickým zákrokem. (Obr. 10A, - 1 h) Dramatické zkrácení reakčních intervalů na tepelné podněty zjištěné po provedení plantární incise u zvířat, kterým bylo intradermálně aplikováno pouze rozpouštědlo, po intradermální injekci kapsaicinu zaznamenáno nebylo. V případě intradermální aplikace kapsaicinu 24 před provedením incise zůstaly reakční intervaly ještě 48 hodin po tomto chirurgickém zákroku prodloužené a teprve potom se postupně zkracovaly na úroveň kontrolních hodnot, které dosáhly 6. den po provedení incise. (Obr. 10A) U zvířat, kterým byl roztok kapsaicinu aplikován 6 dní před chirurgickým zákrokem (Obr. 10B), došlo rovněž k prodloužení reakčních intervalů patrné 24 h před operací (- 24 h). Nicméně, po provedení plantární incise došlo k jejich významnému zkrácení v porovnání s kontrolními hodnotami, i když méně výraznému než v případě zvířat, kterým bylo 6 dní před zákrokem intradermálně aplikováno rozpouštědlo. Stejně jako v předchozím pokusu se i v tomto případě vrátila termosenzitivita zvířat na úroveň kontrolních hodnot během 6 dnů po zákroku. V pokusech, kdy byla intradermální injekce aplikována 2 h po provedení incise, nebyl v prvních dvou hodinách po zákroku, tedy před aplikací injekce, zaznamenán výrazný rozdíl pooperačních odpovědí zvířat na tepelné podněty mezi kontrolní a experimentální skupinou. (Obr. 10C) Incise způsobila významné zkrácení reakčních intervalů zaznamenané v testovacích časech 1 h a 2 h po tomto zákroku. Nicméně, 2 h po intradermální injekci kapsaicinu (4 h po chirurgickém zákroku) bylo zjištěno mírnější zkrácení těchto intervalů v porovnání se skupinou zvířat, kterým bylo aplikováno rozpouštědlo. Tento rozdíl mezi oběma skupinami byl patrný několik dní po

provedení incise. V testovacím čase 96 h dosáhly reakční intervaly zvířat ovlivněných kapsaicinem kontrolních hodnot, zatímco odpovědi zvířat po injekci rozpouštědla zůstávaly stále výrazně snižené. V časech 144 h a 192 po chirurgickém zákroku se již odpovědi obou skupin zvířat na tepelné podněty významně nelišily. (Obr. 10C)

Jedna skupina zvířat byla použita k testování účinku intradermálně aplikovaného kapsaicinu na termální senzitivitu intaktní kůže planty pedis. Těmto zvířatům nebyla provedena chirurgická incise plantární kůže. (Obr. 10D) Reakční intervaly zvířat na tepelnou stimulaci experimentální končetiny ovlivněné kapsaicinem byly již 24 h (- 1 h) po injekci významně prodloužené v porovnání s kontralaterální končetinou, u zvířat došlo účinkem kapsaicinu k rozvoji hyposenzitivity na tepelné podněty experimentální končetiny. Toto prodloužení reakčních intervalů ze 17 s na přibližně 23 s trvalo 6 dní, poté se odpovědi na tepelné podněty vrátily postupně na kontrolní úroveň. Intradermální injekce rozpouštědla neměla žádný vliv na odpovědi zvířat na tepelnou stimulaci injikované končetiny po celou dobu pokusu. (Obr. 10D)

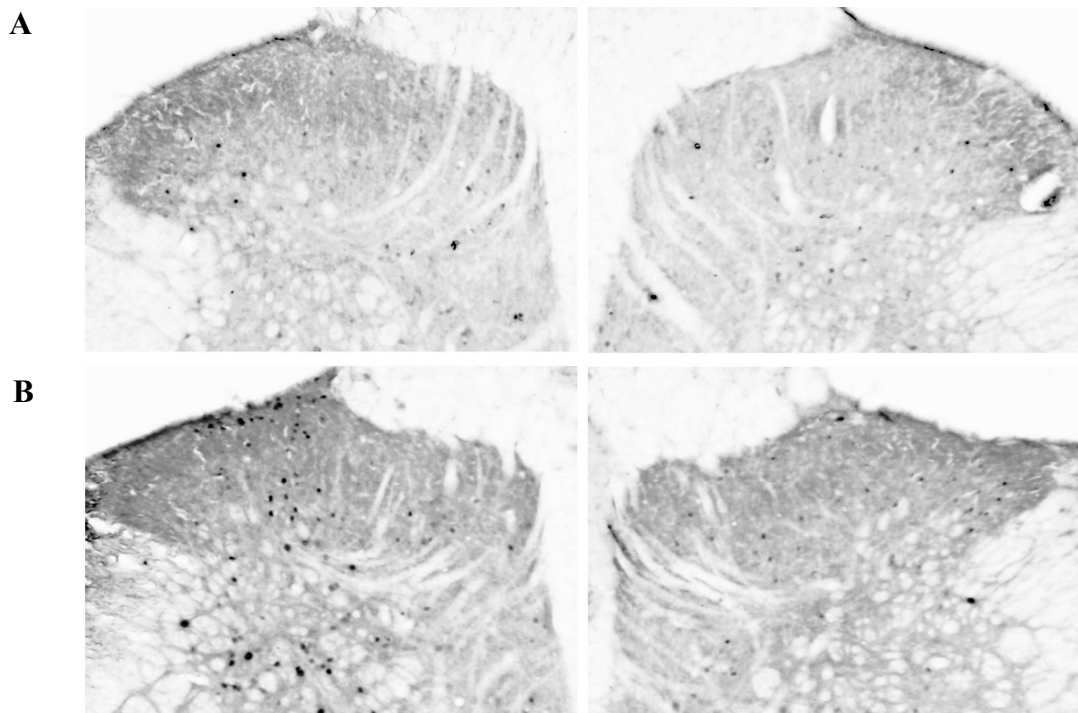


Obr. 10 Reakční časové intervaly (průměr +/- standardní chyba průměru) na tepelné podněty měřené u různých skupin zvířat, kterým byl aplikován roztok kapsaicinu nebo rozpouštědla 24 h před provedením plantární incise (A), 6 dní před provedením plantární incise (B), 2 h po incisi (C) nebo bez provedení chirurgického zákroku (D). (A) Reakční intervaly končetin po injekci rozpouštědla (Δ) se po provedení chirurgického zákroku (v čase 0) výrazně zkrátily. Zkrácení zůstávalo signifikantní minimálně v prvních 48 h po incisi, reaktivita na tepelné podněty se vrátila na bazální úroveň 144 h po provedení chirurgického zákroku. Injekce kapsaicinu 24 h před zákrokem způsobila významné prodloužení reakčních časů na tepelné podněty (\circ). Následná plantární incise neměla na toto prodloužení intervalů téměř žádný efekt, což bylo v ostrém kontrastu se zvýšenou reaktivitou operovaných končetin po injekci rozpouštědla (Δ). Reakční intervaly kontralaterálních intaktních končetin na tepelné podněty se u žádné z experimentálních skupin zvířat významně neměnily (\bullet , \blacktriangle). (B) U zvířat, kterým byl 6 dní před chirurgickým zákrokem injikován rozpouštěcí roztok, došlo po incisi k podobnému zkrácení reakčních intervalů operovaných končetin na tepelné podněty (Δ). 6 dní po intardermální injekci kapsaicinu byly reakční časové intervaly na tepelné podněty mírně prodloužené (\circ). Následná chirurgická incise pak způsobila jejich zkrácení, sice méně výrazné než v případě operovaných končetin po injekci rozpouštědla (Δ), ale v porovnání s korespondujícími kontralaterálními končetinami statisticky signifikantní (\bullet). (C) Incise měla za následek zkrácení reakčních intervalů na tepelné podněty u obou skupin zvířat, injekce rozpouštědla 2 h po chirurgické zákroku neměla žádný vliv na další rozvoj pooperační hypersenzitivity na termální podněty (Δ). Naproti tomu v případě, že byl 2 h po incisi aplikován roztok kapsaicinu, došlo k signifikantnímu nárůstu reakčních intervalů už 2 h po injekci (testovací čas 4 h, \circ). U zvířat, kterým byl po provedení plantární incise aplikován kapsaicin, bylo pooperační zkrácení reakčních intervalů na tepelné podněty méně výrazné než u zvířat po aplikaci rozpouštědla. (D) V pokusech, kdy nebyla vytvořena chirurgická incise na plantě pedis zvířat, nedošlo k žádné změně reaktivity na tepelné podněty končetin po injekci rozpouštědla a ani korespondujících kontralaterálních končetin (\bullet , \blacktriangle). Intradermální injekce kapsaicinu však reakční časy zvířat na tepelné podněty výrazně prodloužila (\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.

4.3. Aktivace míšních neuronů chirurgickou incisí a její ovlivnění lokálně aplikovaným kapsaicinem ve vysoké koncentraci

4.3.1. Exprese c-Fos v neuronech zadních rohů lumbální míchy po plantární incisí (Obr. 11)

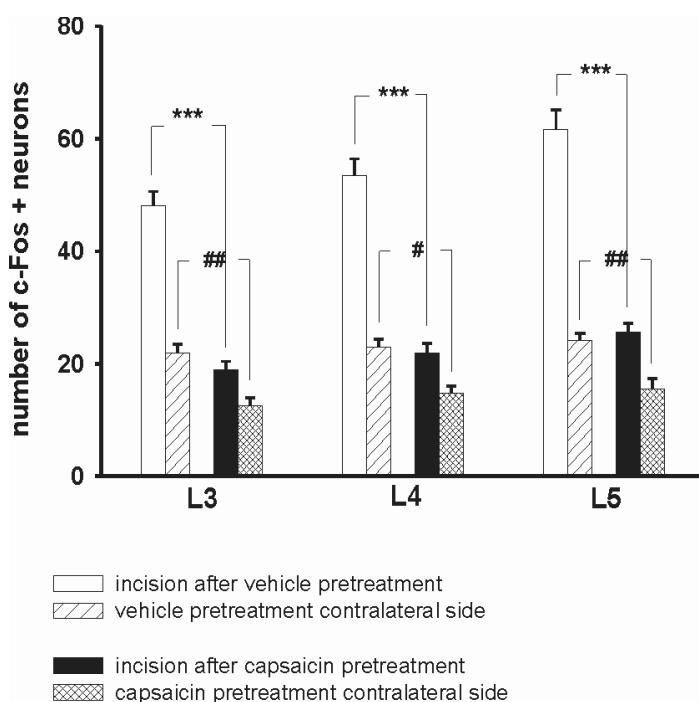
Za účelem ověření aktivace a následné centrální senzitivace míšních nociceptivních neuronů chirurgickou incisí byla pomocí imunohistochemických metod sledována exprese c – Fos v jádrech neuronů zadních rohů lumbální míchy 2 h po provedení plantární incise. Stejnou metodou byl v těchto pokusech zjišťován efekt intradermálně aplikovaného kapsaicinu 24 h před provedením zákroku na expresi c – Fos v lumbální míše a rozvoj centrální senzitivace. Na histologických řezech z míšních segmentů L3, L4 a L5 zvířat, kterým byl 24 h před provedením plantární incise intradermálně aplikován kapsaicin nebo rozpouštěcí roztok, byly v zadních rozích šedé hmoty zjišťovány počty neuronálních jader vykazujících Fos imunopozitivitu. Tato zvířata byla transkardiálně perfundována k imunohistochemické analýze 2 h po provedení incise na plantě pedis, exprese c – Fos byla tedy zjišťována 2 h po tomto zákroku. Pozitivně barvící se neuronální jádra na Fos byla detekovatelná v zadních rozích lumbální míchy vždy na obou stranách. Několik Fos - imunopozitivních neuronů se nacházelo rovněž ve ventrálních částech míšních řezů, tyto sporadicky se vyskytující pozitivně obarvené neurony v předních rozích nebyly kvantifikovány. Protože se výsledné počty Fos - imunopozitivních neuronů zjištěné v těchto pokusech bez retrográdního barvení významně nelišily od výsledků získaných u zvířat, kterým bylo provedeno retrográdní značení STT nebo PSDC neuronů, byla data od všech těchto experimentálních skupin vyjádřena společně. (Obr. 12)



Obr. 11 Histologický řez z lumbální míchy krysy, imunohistochemické barvení na Fos metodou streptavidin – biotin – peroxidáza. Příklad distribuce Fos imunopozitivních neuronů v zadních rozích míchy 2 h po provedení plantární incise; (A) u zvířete, kterému byl předoperačně intradermálně aplikován roztok kapsaicinu, (B) u zvířete, kterému byl předoperačně aplikován rozpouštěcí roztok.

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. Nárůst exprese c – Fos v ipsilaterálních zadních rozích byl oproti malému počtu Fos - pozitivních neuronů nacházejících se na kontralaterální straně patrný ve všech třech sledovaných lumbálních segmentech. V každém z nich dosáhl tento rozdíl statistické signifikance ($p \leq 0,001$). 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 ve všech sledovaných segmentech ($p \leq 0,05$). Podle těchto zjištěných výsledků lze soudit, že plantární incise způsobuje zvýšení exprese c-Fos mezi neurony zadních rohů lumbální míchy na ipsilaterální straně.

Zvýšení Fos imunopozitivity mezi neurony zadních míšních rohů na straně incise bylo mnohem výrazněji vyjádřeno u kontrolních zvířat, kterým bylo před provedením plantární incise aplikováno rozpouštědlo, v porovnání se zvířaty předoperačně ovlivněnými kapsaicinem ($p \leq 0,001$). Tento rozdíl byl patrný ve všech třech sledovaných segmentech lumbální míchy. Také rozdíl v počtu Fos - pozitivních neuronů nalezených v zadních míšních rozích na kontralaterální straně od incise byl mezi skupinami zvířat po injekci kapsaicinu nebo rozpouštědla signifikantní, Fos - imunopozitivita v kontralaterálních zadních rozích byla podstatně výraznější u kontrolní skupiny, tedy u zvířat po intradermální injekci rozpouštěcího roztoku, a to opět v každém ze sledovaných míšních segmentů. Lze shrnout, že chirurgická rána na plantě pedis experimentálního zvířete způsobí zvýšení exprese c-Fos nejen mezi neurony zadních míšních rohů na straně operované končetiny, ale rovněž mezi neurony na straně kontralaterální. Předoperační lokální aplikace kapsaicinu ve vysoké koncentraci významně sníží tento nárůst počtu Fos – imunopozitivních neuronů v zadních rozích míchy na obou stranách, ipsi – i kontralaterálně od incise. (Obr. 12)

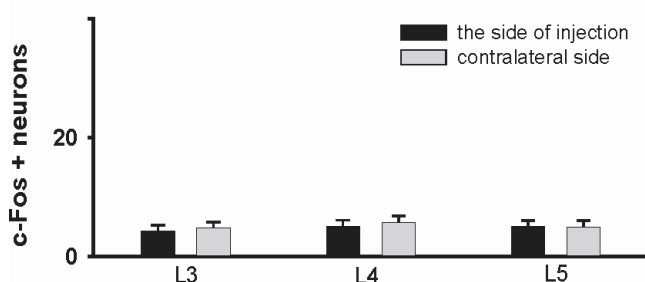


Obr. 12 Počty neuronů imunohistochemicky pozitivně obarvených na Fos v zadních rozích lumbální míchy, segmenty L3, L4 a L5, 2 h po provedení plantární incise. Experimentální skupině zvířat byl 24 h před chirurgickým zákrokem intradermálně aplikován roztok kapsaicinu, kontrolní skupině zvířat rozpouštěcí roztok. U kontrolní skupiny zvířat byly počty neuronů pozitivně obarvených na Fos v zadních rozích míchy na straně operované končetiny signifikantně vyšší, než v zadních rozích kontralaterálních, a to ve všech hodnocených míšních segmentech. U zvířat, kterým byl předoperačně aplikován roztok kapsaicinu, byly počty míšních neuronů exprimujících c – Fos v zadních rozích na straně plantární incise rovněž vyšší než na kontralaterální straně ve všech sledovaných segmentech. Tento nárůst počtu Fos imunopozitivních neuronů na straně incise byl podstatně výraznější u kontrolních zvířat, jimž bylo předoperačně aplikováno rozpouštědlo, v porovnání s experimentálními zvířaty po injekci kapsaicinu. *** $P < 0,001$ 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.

4.3.2. *Expresse c-Fos v neuronech zadních rohů lumbální míchy po intradermální injekci kapsaicinu*

Za účelem ověření efektu samotné intradermální injekce kapsaicinu do kůže planty pedis na Fos - imunoreaktivitu neuronů zadních míšních rohů, byly zjišťovány počty Fos - imunopozitivních neuronů v zadních rozích segmentů L3, L4 a L5 lumbální míchy 24 h po intradermální injekci kapsaicinu u zvířat, kterým nebyla provedena incise na plantě pedis. Fos - imunopozitivita v zadních míšních rozích na straně injekce pak byla porovnávána s Fos - pozitivitou zjištěnou v kontralaterálních zadních rozích těchto experimentálních zvířat. Expresse c - Fos byla pozorována v jádrech neuronů zadních rohů lumbální míchy na obou stranách, ipsi- i kontralaterálně od injikované končetiny. Ojedinele se vyskytující Fos pozitivní neurony ve ventrálních míšních rozích nebyly kvantifikovány. (Obr. 13)

U těchto experimentálních zvířat bylo pozorováno jen velmi málo neuronů pozitivně obarvených na Fos v zadních rozích lumbální míchy. Tento nízký počet neuronů vykazujících Fos - imunopozitivitu nalezený 24 h po intradermální injekci kapsaicinu v ipsilaterálních zadních rozích lumbální míchy se v žádném ze sledovaných segmentů významně nelišil od počtu pozitivně obarvených neuronů nalezených na straně kontralaterální. Podle těchto zjištění nezpůsobuje intradermálně aplikovaný kapsaicin sám o sobě zvýšení exprese c-Fos mezi neurony zadních rohů míchy 24 h po aplikaci.

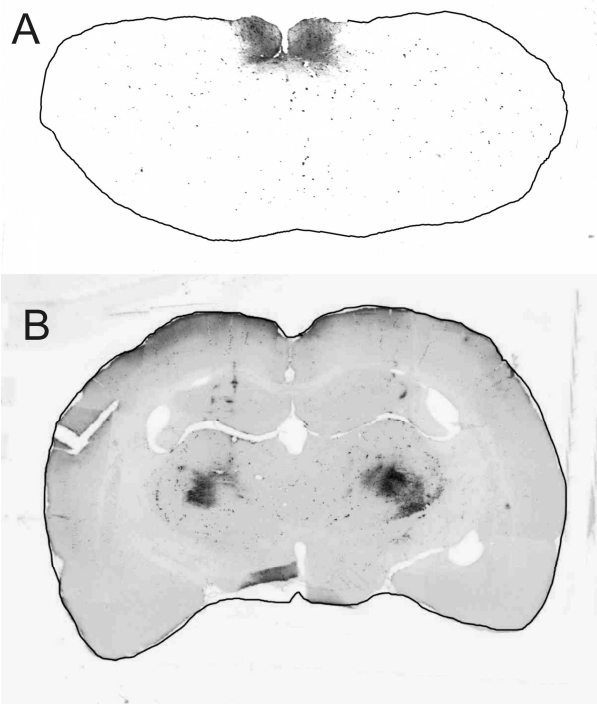


Obr. 13 Počty neuronů imunohistochemicky pozitivně obarvených na Fos v zadních rozích lumbální míchy (segmenty L3, L4 a L5) 24 h po intradermální injekci roztoku kapsaicinu do planty pedis bez chirurgické plantární incise. Počty neuronů pozitivně obarvených na Fos v zadních rozích míchy zjištěné na straně injikované končetiny byly u těchto zvířat velmi nízké, malý počet neuronů se pozitivně obarvil i v zadních rozích kontralaterálních. Tato čísla byla zanedbatelně nízká, rozdíl počtů Fos imunopozitivních neuronů mezi ipsilaterální a kontralaterální stranou od injikované končetiny nebyl významný v žádném z hodnocených míšních segmentů.

4.3.3. *Expresse c-Fos v jádrech retrográdně označených STT neuronů v zadních rozích lumbální míchy po provedení plantární incise*

Další série pokusů měla ověřit, že se zvýšení exprese c - Fos v zadních rozích lumbální míchy po chirurgické incisi planty pedis týká skutečně neuronů účastnících se nocicepce. Protože hlavní nervovou dráhou vedoucí nociceptivní informaci je spinothalamický trakt, byly v těchto pokusech experimentálním zvířatům retrográdně značeny STT neurony pomocí injekce fluorescenčního barviva do thalamických jader. Retrográdně označené STT neurony se nacházely v lamina I, IV – VII a rovněž v lamina X šedé hmoty na obou stranách lumbální míchy po injekcích fluorescenčního barviva bilaterálně do obou thalamů. Po 7 – 10 dnech pak byla zjišťována exprese c-Fos v takto označených neuronech v zadních rozích míchy 2 h po provedení chirurgické incise na plantě pedis těchto zvířat. Jedné skupině z nich byl 24 před tímto zákrokem intradermálně aplikován kapsaicin, druhé pouze rozpouštěcí roztok. V zadních rozích šedé hmoty míšních segmentů L3, L4 a L5 byl nejprve zjištěn celkový počet označených STT neuronů a celkový počet Fos imunopozitivních neuronů. Poté byl stanoven

počet STT neuronů vykazujících zároveň Fos imunopozitivitu v jádrech za pomoci fluorescenční mikroskopie a speciálního softwaru (MicroImage) a vyjádřen jako procento z celkového počtu nalezených STT neuronů. Fos – pozitivní STT neurony byly zadních míšních rozích všech zvířat podobně rozmístěny, s jasně obarvenými jádry specifickou protilátkou na Fos. (Obr. 14)

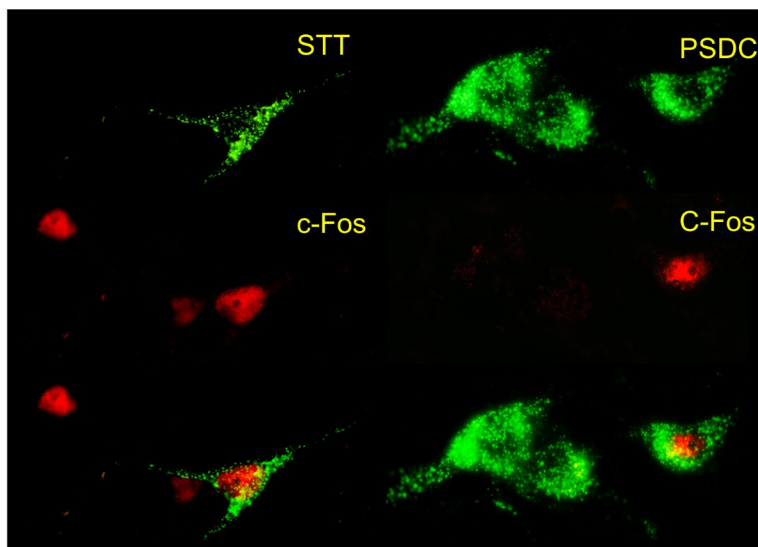


Obr. 14 Příklady histologických řezů z tkáně rostrální míchy a mozku ukazující distribuci fluorescenčního dextranového barviva po injekční aplikaci do ncl. gracilis (A) a jader laterálního thalamu. (B)

U zvířat, kterým bylo před provedením plantární incise aplikováno rozpouštědlo, bylo z hlediska přítomnosti Fos – imunopozitivity hodnoceno celkem 385 označených STT neuronů. 65 z nich bylo Fos – imunopozitivních a všechny se nacházely v zadních rozích lumbální míchy na straně operované končetiny. Procentuální vyjádření proporcí Fos – pozitivních STT neuronů nacházejících se v jednotlivých míšních segmentech zvlášť ukazuje graf na obr. 12., ze kterého je jasně patrné, že počty STT neuronů exprimujících v jádrech c-Fos, nalezených v zadních rozích šedé hmoty míchy na straně operované končetiny, jsou výrazně vyšší v porovnání s kontralaterální stranou, kde nebyl zjištěn ani jeden STT neuron pozitivně se barvící na Fos v žádném ze sledovaných segmentů. Rozdíl mezi oběma stranami dosahoval statistické signifikance v segmentech L4 a L5.

Intradermální aplikace kapsaicinu 24 h před provedením plantární incise výrazně snížila počty Fos – imunopozitivních STT neuronů v zadních rozích lumbální míchy. U těchto zvířat vykazovaly z celkového počtu 439 označených STT neuronů imunopozitivitu na Fos protein pouze dva. Protože v zadních rozích lumbální míchy kontralaterálně od incise nebyl detekován ani jeden STT neuron imunopozitivní na Fos, jsou prezentována pouze data týkající se ipsilaterální strany. Relativní počty STT neuronů vykazujících v jádrech Fos - imunopozitivitu zjištěné v zadních rozích míchy na straně incise byly tedy výrazně vyšší u zvířat, kterým bylo před provedením plantární incise injikováno rozpouštědlo, než u zvířat po injekci kapsaicinu, a to ve všech sledovaných segmentech lumbální míchy. Rozdíly mezi oběma skupinami zvířat jsou statisticky významné jak v případě hodnocení každého míšního segmentu zvlášť, tak v případě hodnocení dat ze všech tří segmentů daných dohromady.

Výsledky těchto pokusů potvrdily, že se STT neurony účastní neurální transmise nociceptivní informace z planty pedis. Prokázaly, že chirurgická incise vytvořená na plantě pedis indukuje zvýšení exprese c-Fos v jádrech STT neuronů v zadních rozích míchy na straně incise, což dokazuje aktivaci těchto neuronů chirurgickým inzultem. Předoperační lokální aplikace kapsaicinu pak významně omezí tento nárůst Fos imunopozitivity v STT neuronech zadních rohů míchy na straně incise. (Obr. 15, Obr. 16A)



Obr. 15 Příklad retrográdně označeného Fos imunopozitivního STT a PSDC neuronu. Vlevo označený STT neuron v zadním rohu lumbální míchy se zeleně fluoreskujícím barvivem patrným v perikaryon a proximálních dendritech. Fos imunopozitivita v jádře vizualizovaná pomocí sekundární protilátky konjugované s Texas – red. Superpozice předchozích dvou obrázků znázorňující značený STT neuron se zeleně obarveným perikaryon exprimující červeně fluoreskující c – Fos ve svém jádře. Vpravo označený PSDC neuron v zadním rohu lumbální míchy se zeleně fluoreskujícím barvivem patrným v perikaryon a proximálních dendritech. Fos imunopozitivita v jádře vizualizovaná pomocí sekundární protilátky konjugované s Texas – red. Superpozice předchozích dvou obrázků znázorňující značený PSDC neuron se zeleně obarveným perikaryon exprimující červeně fluoreskující c – Fos ve svém jádře.

4.3.4. Exprese c-Fos v jádrech retrográdně označených PSDC neuronů v zadních rozích lumbální míchy po provedení plantární incise

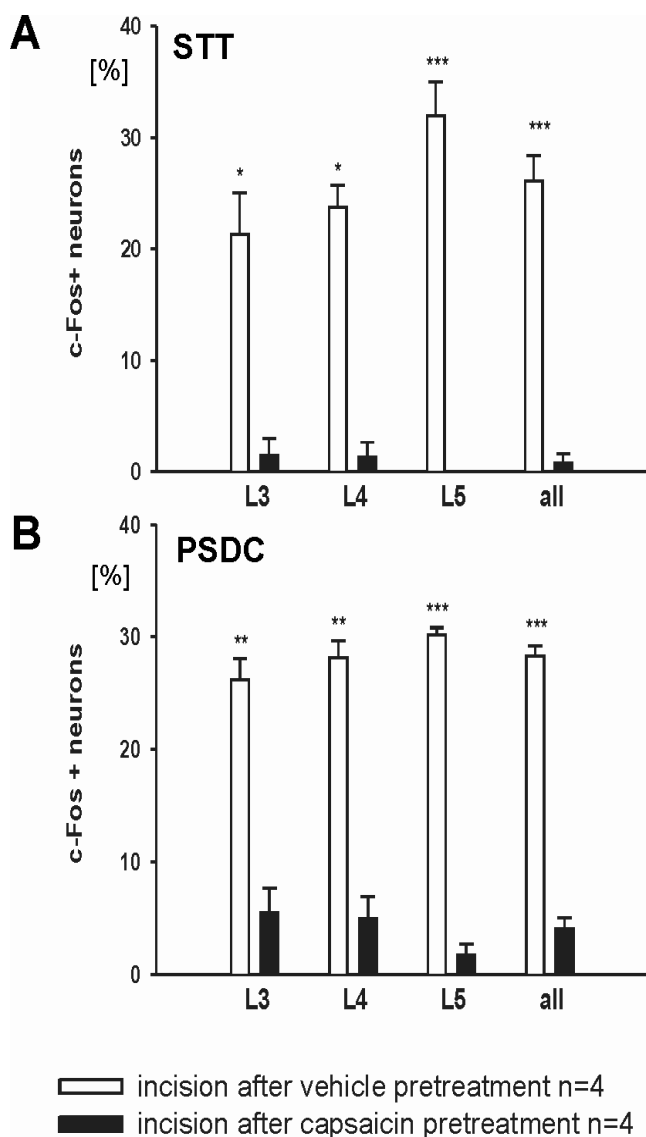
Důležitou roli v nocicepci hrají kromě STT neuronů také postsynaptické neurony zadních provazců. V poslední sérii pokusů této části studie byla proto ověřována úloha PSDC neuronů v pooperační bolesti. Pomocí exprese c- Fos byla zjišťována aktivace a senzitivace PSDC neuronů chirurgickou plantární incisí a možnost ovlivnění jejich rozvoje intradermální injekcí kapsaicinu. Experimentálním zvířatům byly retrográdně značeny PSDC neurony pomocí injekce fluorescenčního barviva do ncl. gracilis na obou stranách. V zadních rozích lumbální míchy se takto obarvené neurony nacházely především v lamina III – IV šedé hmoty, dále pak kolem centrálního kanálu v oblasti lamina X. Po 7 – 10 dnech byla zjišťována exprese c-Fos v jádrech označených PSDC neuronů v zadních rozích míchy 2 h po provedení plantární incise. Jedné skupině zvířat byl 24 před tímto zákrokem intradermálně aplikován kapsaicin, druhé pouze rozpouštěcí roztok. Fos imunopozitivita byla pozorována mezi značenými PSDC neurony v zadních rozích míchy na obou stranách. (Obr. 12, 13)

U kontrolní skupiny zvířat, kterým bylo před provedením plantární incise aplikováno rozpouštědlo, bylo z hlediska Fos – imunopozitivity v jádrech hodnoceno celkem 627 označených PSDC neuronů. V rámci třech hodnocených segmentů lumbální míchy se 327 z nich nacházelo na ipsilaterální straně vzhledem k plantární incisi, přičemž 92 bylo Fos – pozitivních, zatímco v zadních rozích míchy na kontralaterální straně od operované končetiny

vykazovalo Fos – imunopozitivitu pouze 15 ze 300 označených PSDC neuronů. U kontrolních zvířat byl tedy počet označených PSDC neuronů exprimujících v jádrech c-Fos zjištěný v zadních rozích šedé hmoty míchy na straně operované končetiny výrazně vyšší než v kontralaterálních zadních rozích, tento rozdíl mezi oběma stranami dosahoval statistické signifikance ve všech analyzovaných míšních segmentech. Procentuální zastoupení Fos – imunopozitivních neuronů v jednotlivých lumbálních segmentech zvláště je graficky prezentováno pouze pro zadní míšní rohy na straně operované končetiny, neboť přítomnost Fos – pozitivních PSDC neuronů na kontralaterální straně byla minimální.

U skupiny zvířat po intradermální aplikaci kapsaicinu 24 h před provedením plantární incise byla Fos – imunopozitivita sledována v jádrech celkem 324 označených PSDC neuronů zadních rohů lumbální míchy na straně incise. Oproti kontrolní skupině zvířat po injekci rozpouštědla vykazovalo v tomto případě Fos imunopozitivitu výrazně méně PSDC neuronů (13). V kontralaterálních zadních rozích lumbální míchy bylo z 291 označených PSDC neuronů 7 Fos – imunopozitivních. Tento rozdíl v počtech PSDC neuronů pozitivně obarvených na Fos mezi ipsi- a kontralaterální stranou lumbální míchy zvířat předoperačně ovlivněných intradermálně aplikovaným kapsaicinem nebyl statisticky významný. Relativní počty Fos – pozitivních PSDC neuronů v jednotlivých lumbálních segmentech zvláště ukazuje graf na obr. 9. Snížená exprese c – Fos v jádrech PSDC neuronů zadních rohů lumbální míchy účinkem kapsaicinu byla i v tomto případě v porovnání s kontrolní skupinou vysoce signifikantní. 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.

Výsledky těchto pokusů jasně prokazují, že se i PSDC neurony účastní neurálního přenosu nociceptivní informace z planty pedis. Chirurgický zákrok na plantě pedis způsobí zvýšení exprese c-Fos i v jádrech PSDC neuronů v zadních rozích lumbální míchy na straně incise, což poukazuje na aktivaci a senzitivizaci PSDC neuronů tímto inzultem a účast dráhy zadních provazců míšních v nocicepci. Předoperačně aplikovaný kapsaicin do kůže planty pedis významnou mírou omezí tento nárůst exprese c-Fos 2 h po chirurgickém zákroku v jádrech PSDC neuronů v zadních rozích míchy na straně incise a brání rozvoji jejich senzitivizace. (Obr. 15, obr. 16B)



Obr. 16 (A) Expresce c – Fos v retrográdně označených STT neuronech v zadních rozích lumbální míchy 2 h po provedení plantární incise. Experimentální skupině zvířat byl 24 před zákrokem intradermálně aplikován roztok kapsaicinu, kontrolní skupině rozpouštěcí roztok. U kontrolních zvířat bylo procentuální zastoupení Fos imunopozitivních STT neuronů v zadních rozích lumbální míchy na straně operované končetiny 21,3 +/- 3,7 % v L3; 23,7 +/- 2,0 % v L4 a 31,9 +/- 3,0 % v L5 z celkového počtu obarvených STT neuronů. U zvířat předoperačně ovlivněných kapsaicinem bylo v zadních rozích lumbální míchy na straně incise nalezeno jen několik málo STT neuronů vykazujících Fos imunopozitivitu, v L5 žádný Fos pozitivní STT neuron. Kapsaicin významně snížil expresi c – Fos v STT neuronech v zadních rozích lumbální míchy na straně operované končetiny. * P < 0,05; *** P < 0,001 zadní rohy lumbální míchy na straně operované končetiny experimentální versus kontrolní skupiny zvířat. (B) Expresce c – Fos v retrográdně označených PSDC neuronech v zadních rozích lumbální míchy 2 h po provedení plantární incise. Experimentální skupině zvířat byl 24 před zákrokem intradermálně aplikován roztok kapsaicinu, kontrolní skupině rozpouštěcí roztok. Proporce Fos imunopozitivních PSDC neuronů z celkového počtu označených PSDC neuronů nacházejících se v zadních rozích míchy na straně operované končetiny byla ve všech sledovaných segmentech L3, L4 i L5 významně vyšší u kontrolní skupiny zvířat v porovnání s experimentálními zvířaty předoperačně ovlivněnými kapsaicinem, tento rozdíl dosáhl statistické signifikance v každém z hodnocených míšních segmentů. ** P < 0,01; *** P < 0,001 zadní rohy lumbální míchy na straně operované končetiny experimentální versus kontrolní skupiny zvířat.

4.4. Úloha periferních a centrálních TRPV1 receptorů v rozvoji pooperační mechanické alodynie a mechanické a tepelné hyperalgie

4.4.1. Účinek specifického antagonisty na TRPV1 receptorech (SB 366791) na pooperační změny odpovědi zvířat na tepelné podněty

Následující pokusy byly specificky zaměřeny na roli TRPV1 receptorů v termosenzitivitě a v rozvoji pooperační tepelné hyperalgie. Byla při nich testována možnost ovlivnění tohoto bolestivého stavu pomocí TRPV1 antagonisty aplikovaného různými způsoby. Za účelem zjišťování změn odpovědi zvířat na tepelné podněty způsobených chirurgickým zákrokem a případného efektu SB 366791 na tyto změny byly stejně jako v první části studie (experiment 1) zaznamenávány časové intervaly, za které zvířata reflexně odtahovala končetinu od zdroje tepla při tepelné stimulaci kůže planty pedis v okolí chirurgické incise. Předoperační odpovědi zvířat na tepelnou stimulaci intaktní kůže se mezi oběma končetinami nelišily. Chirurgická incise způsobila výrazné zkrácení reakčních intervalů při stimulaci operovaných končetin u všech kontrolních zvířat, kterým byl intradermálně nebo intratekálně aplikován pouze rozpouštěcí roztok bez SB 366791, a to ve všech sériích pokusů. Tyto časové intervaly se zkrátily z předoperační průměrné hodnoty 17 s na přibližně 4 s už v první hodině po provedení plantární incise, což poukazovalo na rychlý rozvoj pooperační tepelné hyperalgie

u těchto zvířat. Minimálních hodnot dosáhly v prvních 24 h po zákroku a poté se začaly postupně prodlužovat a vracet se na předoperační úroveň. Šestý den po provedení chirurgické incise se pak odpovědi operované končetiny významně nelišily od předoperačních hodnot.

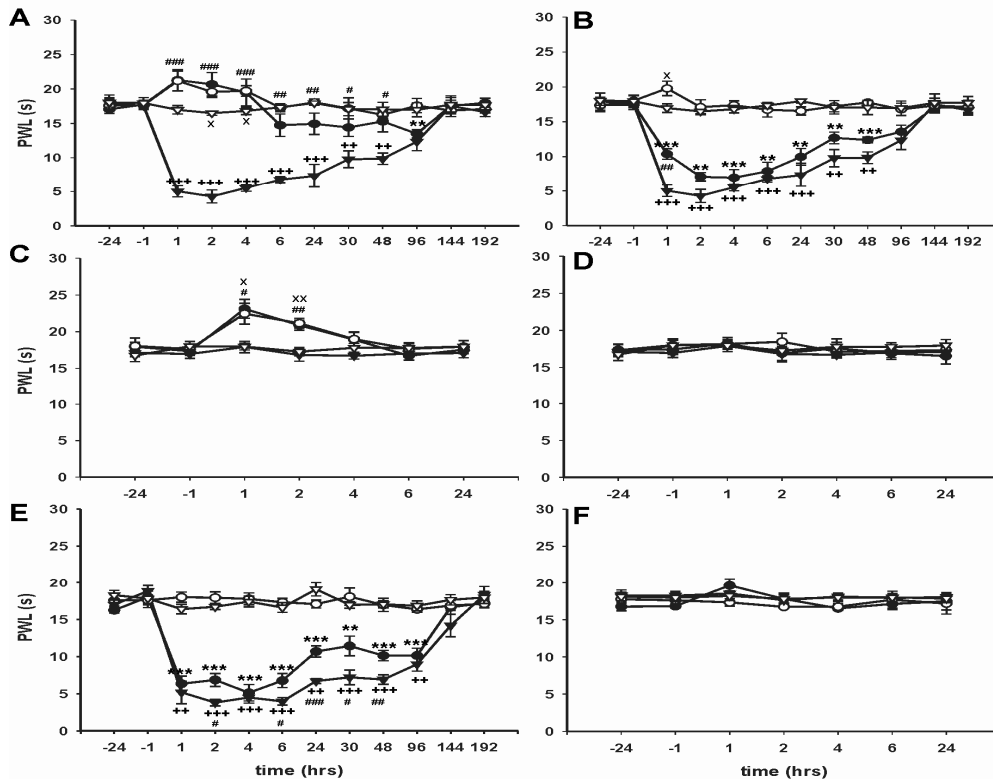
V první sérii pokusů byly zjišťovány pooperační změny odpovědi zvířat na tepelné podněty po intratekální aplikaci 100 μM roztoku SB 366791 15 minut před provedením plantární incise. (Obr. 17A) V prvních hodinách po zákroku bylo u těchto experimentálních zvířat pozorováno úplné zablokování pooperační tepelné hyperalgie, průměrné reakční časové intervaly na tepelný podnět operovaných končetin byly oproti předoperačním hodnotám významně prodlouženy minimálně 4 h po provedení chirurgického zákroku. V dalším průběhu pokusu se však postupně zkracovaly, 96 hodin po incisi už byly naopak výrazně kratší v porovnání s předoperační úrovní. intratekálně aplikovaný SB 366791 způsobil zároveň signifikantní prodloužení reakčních časů kontralaterálních, neoperovaných končetin těchto experimentálních zvířat, které přetrvávalo minimálně 4 h. V dalším časovém průběhu se tyto intervaly opět postupně zkracovaly, po šesti hodinách se už odpovědi neoperovaných končetin na tepelné podněty významně nelišily od kontrolních hodnot.

V další sérii pokusů byly testovány pooperační změny odpovědi zvířat na tepelné podněty po intratekální aplikaci 10 μM roztoku SB 366791 15 minut před provedením plantární incise. (Obr. 17B) U těchto experimentálních zvířat bylo pozorováno zkrácení reakčních časů operovaných končetin na tepelný podnět po provedení plantární incise. V porovnání s kontrolní skupinou zvířat, kterým bylo 15 min před zákrokem aplikováno rozpouštědlo, však došlo k jistému oslabení průběhu pooperační tepelné hyperalgie účinkem intratekálně aplikovaného 10 μM SB 366791. Rozdíl odpovědí na tepelné podněty mezi operovanými končetinami experimentální a kontrolní skupiny zvířat dosáhl statistické signifikance v čase 1 h po provedení chirurgické incise. Účinkem intratekálně aplikovaného 10 μM SB 366791 došlo rovněž k určitému prodloužení reakčních časů kontralaterálních, intaktních končetin experimentálních zvířat oproti předoperačním hodnotám, které bylo detekovatelné 1 h po operačním zákroku, také 10 μM SB 366791 aplikovaný intratekálně tedy způsobil přechodnou termální hyposenzitivitu intaktních končetin experimentálních zvířat. Šestý den po operaci se pak odpovědi na tepelné podněty obou končetin zvířat vrátily na předoperační úroveň.

V následující sérii pokusů byly testovány změny odpovědi zvířat na tepelnou stimulaci plantární kůže po intratekální aplikaci 100 μM SB 366791 (Obr. 17C) nebo 10 μM SB 366791 (Obr. 17D) bez chirurgického zákroku na plantě pedis. Průměrné časové intervaly, za které zvířata zareagovala na tepelný podnět reflexním odtažením končetiny, se po intratekální aplikaci 100 μM TRPV1 antagonisty výrazně prodloužily. Jeho účinkem došlo k rozvoji přechodné hyposenzitivity na termální podněty obou končetin u této skupiny zvířat, která přetrvávala minimálně 2 h po aplikaci. Po 2 hodinách se odpovědi obou končetin postupně vracely na kontrolní úroveň. intratekálně aplikovaný 10 μM TRPV1 antagonist nezpůsobil žádné významné změny odpovědi zvířat na tepelnou stimulaci intaktní kůže planty pedis bez chirurgické incise oproti kontrolním hodnotám, termosenzitivita plantární kůže nebyla účinkem intratekálně aplikovaného 10 μM TRPV1 antagonisty žádným způsobem ovlivněna.

U další skupiny experimentálních zvířat byly zjišťovány pooperační změny odpovědi na tepelnou stimulaci planty pedis po intradermální aplikaci 100 μM SB 366791. TRPV1 antagonist byl v těchto pokusech injikován intradermálně do plantární kůže 30 minut před a bezprostředně po provedení chirurgické incise. (Obr. 17E) Po chirurgickém zákroku došlo u těchto zvířat pouze k mírnému zkrácení reakčních intervalů operovaných končetin na tepelný podnět účinkem intradermálně aplikovaného 100 μM TRPV1 antagonisty. SB 366791 významně oslabil průběh pooperační tepelné hyperalgie v porovnání s kontrolní skupinou zvířat, kterým byl stejným způsobem aplikován pouze rozpouštěcí roztok bez účinné látky, a jeho efekt přetrvával minimálně dva dny po provedení plantární incise. Šestý den po zákroku už pak nebyl zjištěn rozdíl v odpovědích na tepelnou stimulaci operovaných a intaktních

končetin těchto zvířat. Série kontrolních experimentů dále ukázala, že intradermálně aplikovaný 100 μM SB 366791 nezpůsobil sám o sobě žádné změny termosenzitivity intaktní kůže planty pedis, na které nebyla vytvořena chirurgická incise. (Obr. 17F)



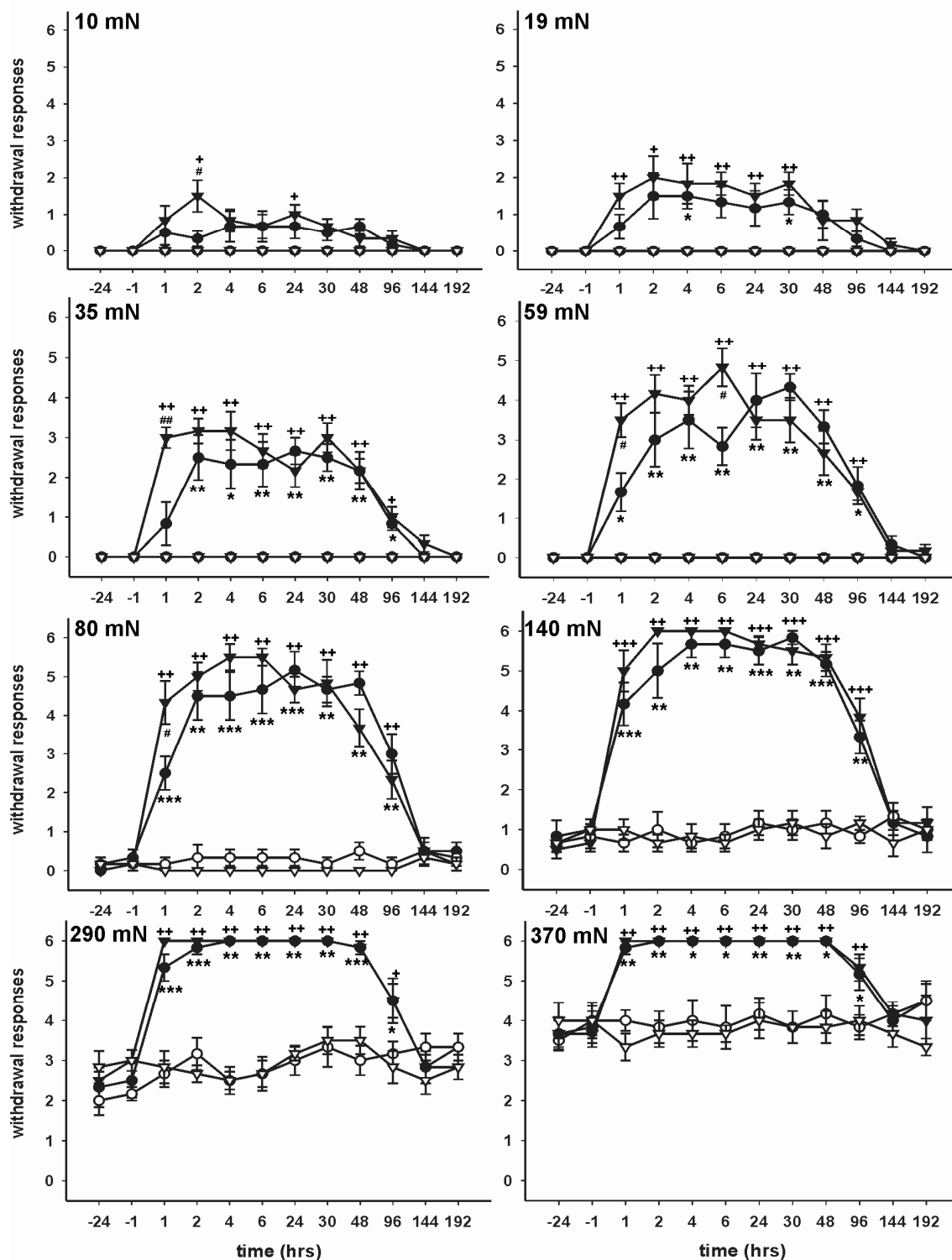
Obr. 17 Reakční časové intervaly (průměr \pm standardní chyba průměru) na tepelné podněty měřené na obou končetinách u různých skupin zvířat. První skupině zvířat byl 100 μM roztok TRPV1 antagonisty nebo rozpouštědla aplikován intratekálně 15 min před provedením plantární incise (A), druhé skupině byl 10 μM roztok TRPV1 antagonisty aplikován intratekálně 15 min před provedením plantární incise (B), třetí skupině byl 100 μM roztok TRPV1 antagonisty nebo rozpouštědla aplikován intratekálně bez provedení plantární incise (C), čtvrté skupině byl 10 μM roztok TRPV1 antagonisty aplikován intratekálně bez provedení plantární incise (D), páté skupině byl 100 μM roztok TRPV1 antagonisty nebo rozpouštědla aplikován intradermálně 30 min před a bezprostředně po provedení incise (E) a šesté skupině byl 100 μM roztok TRPV1 antagonisty intradermálně aplikován bez následné chirurgické incise (F). (A) Reakční intervaly končetin zvířat po intratekální injekci rozpouštědla (\blacktriangle) se po provedení chirurgického zákroku (v čase 0) výrazně zkrátily. Zkrácení zůstávalo signifikantní minimálně v prvních 48 h po incisi, reaktivita na tepelné podněty se vrátila na bazální úroveň 144 h po provedení chirurgického zákroku. Intratekální injekce 100 μM SB 366791 15 min před zákrokem způsobila významné prodloužení reakčních časů na tepelné podněty (\bullet) a následná plantární incise neměla na toto prodloužení intervalů téměř žádný efekt na rozdíl od zvýšení reaktivity operovaných končetin po injekci rozpouštědla (\blacktriangle). Reakční intervaly kontralaterálních intaktních končetin na tepelné podněty se u skupiny zvířat po injekci SB 366791 rovněž prodloužily (\circ), a to minimálně na 4 h, intervaly kontralaterálních končetin kontrolních zvířat zůstávaly na stejné úrovni (Δ). (B) Také u zvířat po intratekální injekci 10 μM SB 366791 způsobila chirurgická incise zkrácení reakčních intervalů na tepelné podněty (\bullet), i když méně výrazně než v případě operovaných končetin po injekci rozpouštědla (\blacktriangle). V porovnání s korespondujícími kontralaterálními intervaly kontralaterálních intaktních končetin (\circ), intervaly kontralaterálních končetin kontrolních zvířat se významně neměnily (Δ). (C) V pokusech, kdy nebyla vytvořena chirurgická incise na plantě pedis zvířat, nedošlo k žádné změně reaktivity na tepelné podněty končetin zvířat po intratekální injekci rozpouštědla (\blacktriangle , Δ). Intratekální injekce 100 μM SB 366791 však reakční časy zvířat na tepelné podněty výrazně prodloužila (\bullet , \circ), prodloužení bylo patrné na obou končetinách a přetrvávalo minimálně 2 h po injekci. (D) V pokusech, kdy nebyla vytvořena chirurgická incise na plantě pedis zvířat, nedošlo k žádné změně reaktivity na tepelné podněty končetin po intratekální injekci 10 μM SB 366791 v celém průběhu pokusu (\bullet , \circ , \blacktriangle , Δ). (E) U zvířat, kterým byl 30 min předem a po chirurgickém zákroku intradermálně injikován rozpouštěcí roztok, došlo po incisi ke zkrácení reakčních intervalů operovaných končetin na tepelné podněty (\blacktriangle). U zvířat po intradermální injekci 100 μM SB 366791 způsobila chirurgická incise také výrazné zkrácení reakčních intervalů na tepelné podněty (\bullet). Bylo mírněji vyjádřeno než v případě operovaných končetin po injekci rozpouštědla (\blacktriangle), v porovnání s korespondujícími kontralaterálními končetinami však dosahovalo statistické signifikance (\circ). Reakční intervaly kontralaterálních intaktních končetin se u této skupiny zvířat významně neměnily (\circ , Δ). (F) V pokusech, kdy nebyla vytvořena chirurgická incise na plantě pedis zvířat, nedošlo k žádné změně reaktivity na tepelné podněty končetin po intradermální injekci rozpouštědla ani 100 μM SB 366791 v celém průběhu pokusu (\bullet , \circ , \blacktriangle , 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 $P < 0,05$; xx $P < 0,01$; odpovědi levých končetin zvířat po injekci SB 366791 versus odpovědi levých končetin zvířat po injekci rozpouštědla.

4.4.2. Účinek intratekálně aplikovaného 100 μ M TRPV1 antagonisty SB 366791 na pooperační změny odpovědi zvířat na mechanické podněty

U stejných zvířat byla zjišťována také úloha TRPV1 receptorů v mechanosenzitivitě, v rozvoji pooperační mechanické alodynie a hyperalgie a možnost ovlivnění tohoto bolestivého stavu pomocí TRPV1 antagonisty aplikovaného různými způsoby. V této sérii pokusů byly testovány změny odpovědi zvířat na mechanické podněty aplikované na kůži planty pedis způsobené chirurgickou incisí plantární kůže a případné ovlivnění těchto změn intratekálně aplikovaným 100 μ M SB 366791 15 min před provedením chirurgického zákroku. Kontrolním zvířatům byl intratekálně aplikován rozpouštěcí roztok bez účinné látky, vlastní experimentální procedura pak u nich probíhala identicky jako u skupiny experimentální. (Obr. 18)

Stimulace intaktní plantární kůže mechanickými podněty slabých intenzit (10, 20, 35 a 59 mN) nevyvolala reflexní odpovědi u žádného z testovaných zvířat. U kontrolní skupiny, po intratekální aplikaci rozpouštěcího roztoku před provedením plantární incise, začaly už 1h po chirurgickém zákroku tyto slabé podněty vyvolávat výrazné odpovědi při stimulaci kůže v blízkosti chirurgické rány. Tento nárůst reaktivity dosáhl statistické signifikance v několika testovacích časech po zákroku v závislosti na intenzitě použitého stimulu. Maxima dosahoval 4 – 6 hodin po provedení incise a dokazoval rozvoj pooperační mechanické alodynie. Během 4 dnů se pak odpovědi postupně snižovaly až na předoperační úroveň. Odpovědi intaktních, kontralaterálních končetin na mechanické podněty slabých intenzit se po intratekální injekci rozpouštědla neměnily. Stimulace silnějšími Von Freyovými vlákny (80, 140, 290 a 370 mN) vyvolávala reflexní elevace končetin před operačním zákrokem, předoperační odpovědi se mezi pravými a levými končetinami zvířat nelišily. Po provedení plantární incise došlo k významnému zesílení odpovědi zvířat i na tyto silnější podněty aplikované na kůži v okolí rány, chirurgická incise způsobila zvýšení intenzity jejich vnímání přetrvávající několik dní. Zvýšení odpovědi dosahovalo maxima 6 h po zákroku. 6 dní po provedení incise se pak reaktivita na tyto podněty vrátila na předoperační úroveň a nelišila se významně od intaktních, kontralaterálních končetin, jejichž odpovědi na mechanické podněty silnějších intenzit se během experimentu neměnily.

Experimentální skupině zvířat byl 15 minut před provedením plantární incise intratekálně aplikován 100 μ M roztok TRPV1 antagonisty SB 366791. (Obr. 18) U těchto zvířat byl po chirurgickém zákroku překvapivě zjištěn jen velmi mírný nárůst odpovědi na mechanické podněty slabých intenzit při stimulaci operovaných končetin v porovnání s pooperačním zvýšením reaktivity kontrolních zvířat, rozdíly těchto odpovědi operovaných končetin mezi oběma skupinami zvířat dosahovaly statistické signifikance v několika testovacích časech. Hypersenzitivita na mechanické podněty nízkých intenzit, pooperační mechanická alodynie, byla účinkem intratekálně aplikovaného 100 μ M SB 366791 významně oslabena. Na druhou stranu pooperační zvýšení odpovědi na stimulaci silnými mechanickými podněty (Von Freyova vlákna o silách 140, 290 a 379 mN) účinkem intratekálně aplikovaného TRPV1 antagonisty významně ovlivněno nebylo. V porovnání s reaktivitou operovaných končetin kontrolních zvířat na tyto podněty, ovlivněných intratekální injekcí rozpouštědla, nebyly zjištěny významné rozdíly.

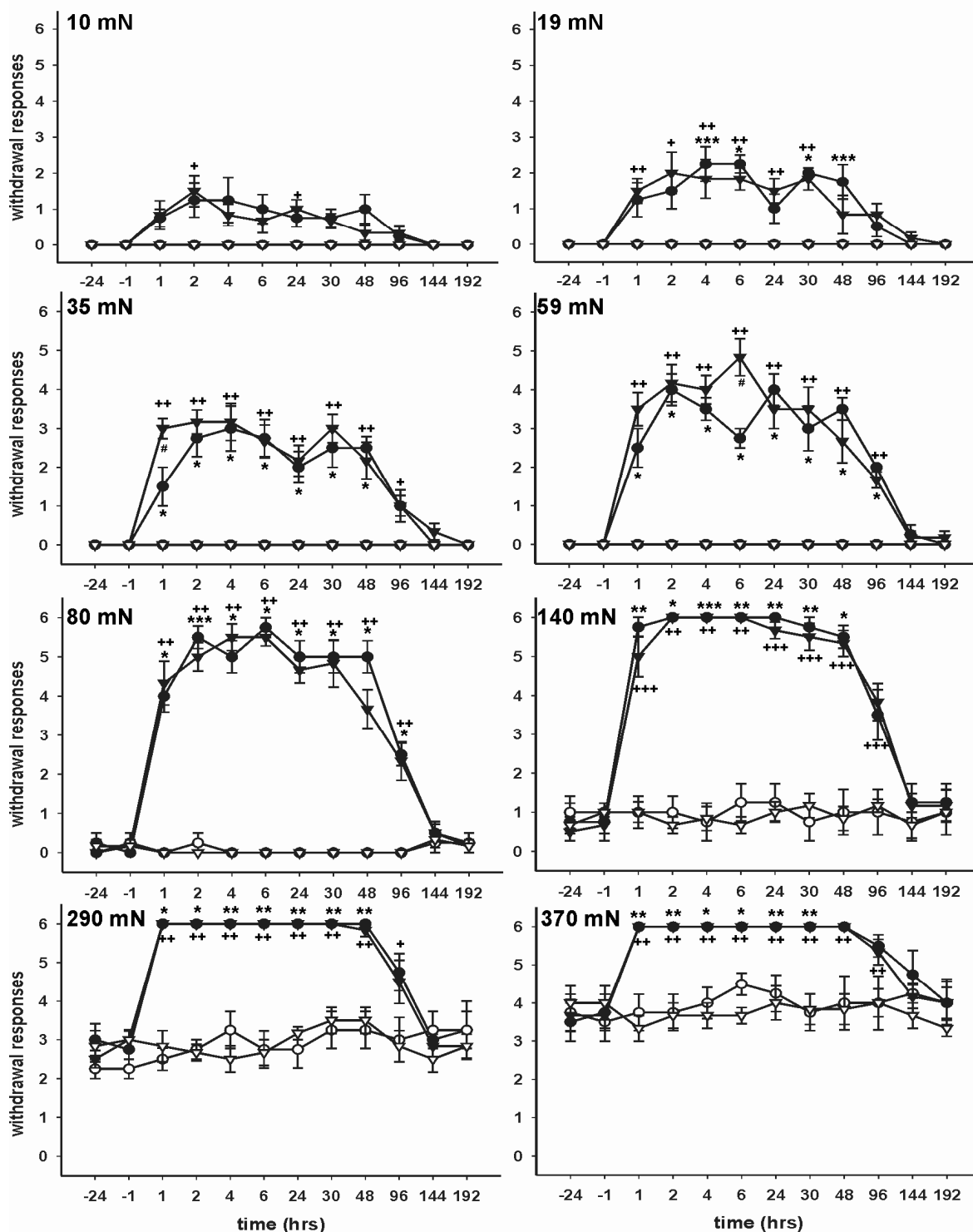


Obr. 18 100 μM SB 366791 intratekálně před provedením plantární incise. Počet reflexních odpovědí (průměr \pm standardní chyba průměru) vyvolaných při stimulaci Von Freyovými vlákny (10 – 370 mN) planty pedis zvířat, kterým byl 100 μM SB 366791 nebo rozpouštěcí roztok aplikován intratekálně 15 min před chirurgickým zákrokem. Po provedení incise se počet vyvolaných odpovědí operovaných končetin výrazně zvýšil u zvířat, kterým bylo předoperačně aplikováno rozpouštědlo (\blacktriangle), odpovědi korespondujících kontralaterálních končetin se neměnily (Δ). Tento nárůst reaktivity operovaných končetin byl u skupiny zvířat ovlivněných SB 366791 mírně oslaben (\bullet) v porovnání s operovanými končetinami zvířat po injekci rozpouštědla (Δ), v porovnání s korespondujícími kontralaterálními končetinami však zůstal signifikantní (\circ). Oslabující účinek SB 366791 se týkal zvýšených odpovědí na mechanické podněty nízkých intenzit, tedy mechanické alodynie. Odpovědi korespondujících kontralaterálních intaktních končetin na mechanické podněty se neměnily (\circ , Δ). 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, + $P < 0,05$; ++ $P < 0,01$; +++ $P < 0,001$ 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.

4.4.3. Účinek intratekálně aplikovaného 10 μM TRPV1 antagonisty SB 366791 na pooperační změny odpovědi zvířat na mechanické podněty

V další sérii pokusů byly zjišťovány změny reaktivity zvířat na mechanické podněty aplikované na kůži planty pedis způsobené chirurgickou plantární incisí a případný efekt intratekálně aplikovaného 10 μM TRPV1 antagonisty 15 minut před provedením tohoto zákroku. Kontrolním zvířatům byl intratekálně aplikován rozpouštěcí roztok.

Experimentálním zvířatům byl v této sérii pokusů 15 minut před provedením plantární incise intratekálně aplikován 10 μM roztok SB 366791. (Obr. 19) Po chirurgickém zákroku byl u těchto zvířat pozorován výrazný nárůst počtu vyvolaných odpovědí při stimulaci kůže v okolí incise mechanickými podněty slabých intenzit, velmi podobný pooperačnímu nárůstu zjištěnému u kontrolní skupiny zvířat, kterým bylo 15 min před plantární incisí aplikováno rozpouštědlo. Zvýšení počtu odpovědí experimentálních zvířat na stimulaci mechanickými podněty o intenzitách 35 a 59 mN bylo poněkud méně výrazné než u kontrolní skupiny, toto oslabení nárůstu účinkem TRPV1 antagonisty však bylo jen velmi mírné a přechodné, patrné pouze v jednom testovacím čase po provedení chirurgického zákroku. Pooperační hypersenzitivita na slabé mechanické podněty, mechanická alodynie, se tedy v tomto případě plně rozvinula a její průběh nebyl signifikantně ovlivněn účinkem intratekálně aplikovaného 10 μM roztoku TRPV1 antagonisty. Reaktivita experimentálních zvířat na stimulaci operovaných končetin silnějšími Von Freyovými vlákny (140, 290 a 370 mN) a rozvoj pooperační mechanické hyperalgie rovněž nebyly účinkem intratekálně podaného 10 μM SB 366791 nijak ovlivněny v porovnání s pooperační reaktivitou kontrolních zvířat na stimulaci těmito podněty.

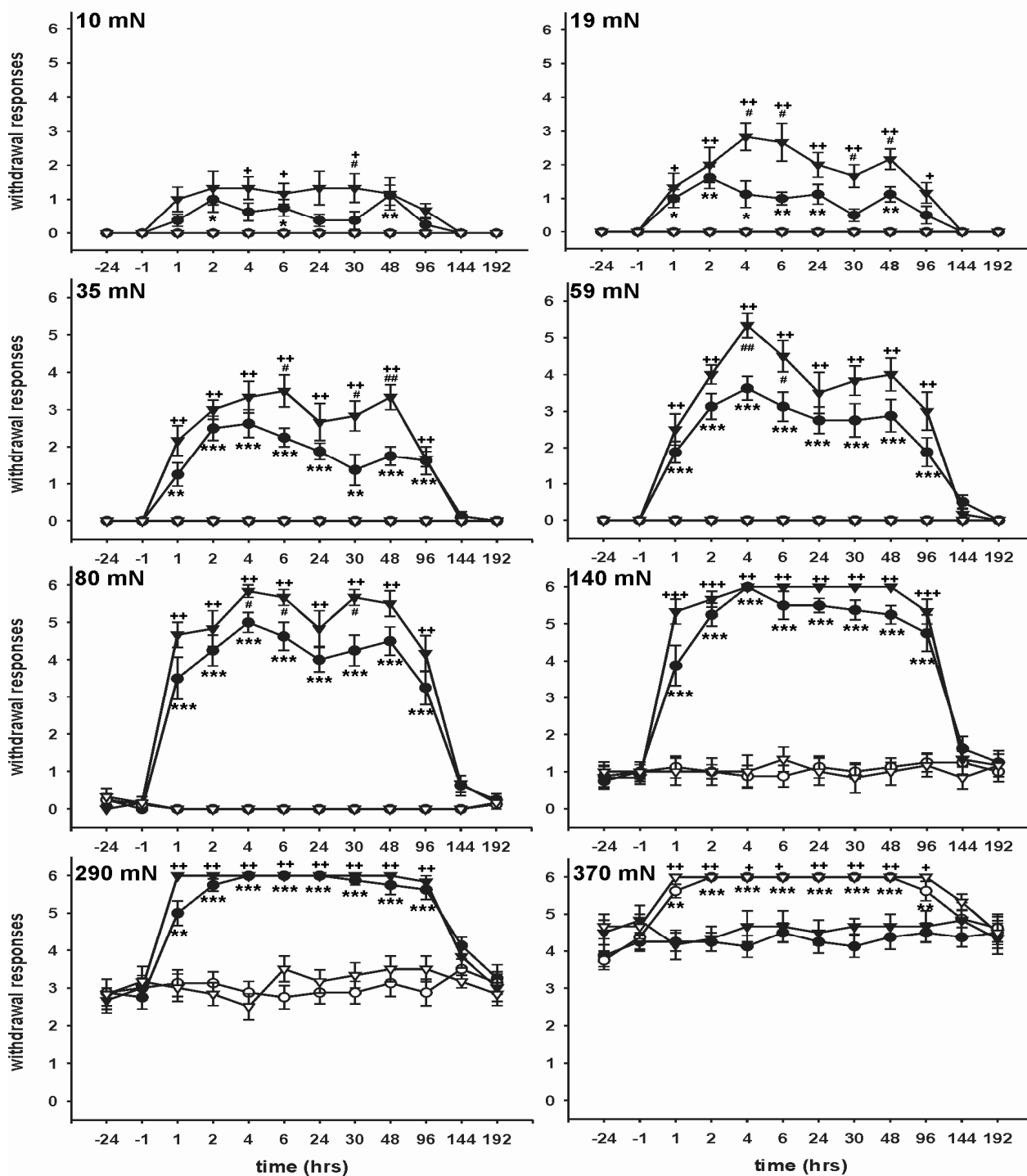


Obr. 19 10 μ M SB 366791 intratekálně před provedením plantární incise. Počet reflexních odpovědí (průměr \pm standardní chyba průměru) vyvolaných při stimulaci Von Freyovými vlákny (10 – 370 mN) planty pedis zvířat, kterým byl 10 μ M SB 366791 nebo rozpouštěcí roztok aplikován intratekálně 15 min před chirurgickým zákrokem. Nárůst reaktivity operovaných končetin na mechanické podněty zjištěn u zvířat, kterým bylo předoperačně aplikováno rozpouštědlo (\blacktriangle), byl u skupiny zvířat ovlivněných 10 SB 366791 velmi lehce oslaben (\bullet) v porovnání s operovanými končetinami zvířat po injekci rozpouštědla (Δ). V porovnání s korespondujícími kontralaterálními končetinami však zůstal stále výrazně signifikantní (\circ). Oslabující účinek SB 366791 se týkal zvýšených odpovědí na mechanické podněty 2 nízkých intenzit. Odpovědi korespondujících kontralaterálních intaktních končetin na mechanické podněty se neměnily (\circ , Δ). 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, + $P < 0,05$; ++ $P < 0,01$; +++ $P < 0,001$ odpovědi pravých končetin zvířat po injekci rozpouštědla versus levých, # $P < 0,05$ odpovědi pravých končetin zvířat po injekci SB 366791 versus odpovědi pravých končetin zvířat po injekci rozpouštědla.

4.4.4. Účinek intradermálně aplikovaného 100 μ M TRPV1 antagonisty SB 366791 na pooperační změny odpovědi zvířat na mechanické podněty

V této sérii pokusů bylo sledováno ovlivnění pooperačních změn reaktivity experimentálních zvířat na mechanické podněty aplikované na kůži planty pedis účinkem intradermálně aplikovaného 100 μ M roztoku SB 366791. SB 366791 byl zvířatům injikován do kůže planty pedis 30 minut předem a ihned po provedení chirurgické incise. Kontrolní skupině zvířat byl stejným způsobem intradermálně aplikován rozpouštěcí roztok. (Obr. 20)

V porovnání s výrazným zvýšením počtu vyvolaných odpovědí slabými mechanickými podněty, zjištěném při stimulaci operovaných končetin kontrolních zvířat, kterým bylo před a po chirurgickém zákroku intradermálně injikováno rozpouštědlo, byl nárůst reaktivity experimentálních zvířat ovlivněných intradermální injekcí SB 366791 na tyto podněty jen velmi mírný. Pooperační hypersenzitivita na mechanické podněty slabých intenzit byla účinkem intradermálně aplikovaného TRPV1 antagonisty výrazně oslabena v několika testovacích časech a tento efekt přetrvával minimálně dva dny po provedení chirurgického zákroku na plantě pedis. Naproti tomu pooperačně zvýšené odpovědi experimentálních zvířat na mechanické podněty silnějších intenzit (140 a 290 mN), pooperační mechanická hyperalgie, účinkem intradermálně aplikovaného SB 366791 ovlivněna nebyla ve srovnání s kontrolní skupinou zvířat po intradermální injekci rozpouštědla. Odpovědi kontralaterálních, intaktních končetin všech zvířat na veškeré testované mechanické podněty zůstávaly v celém časovém průběhu pokusu nezměněny.



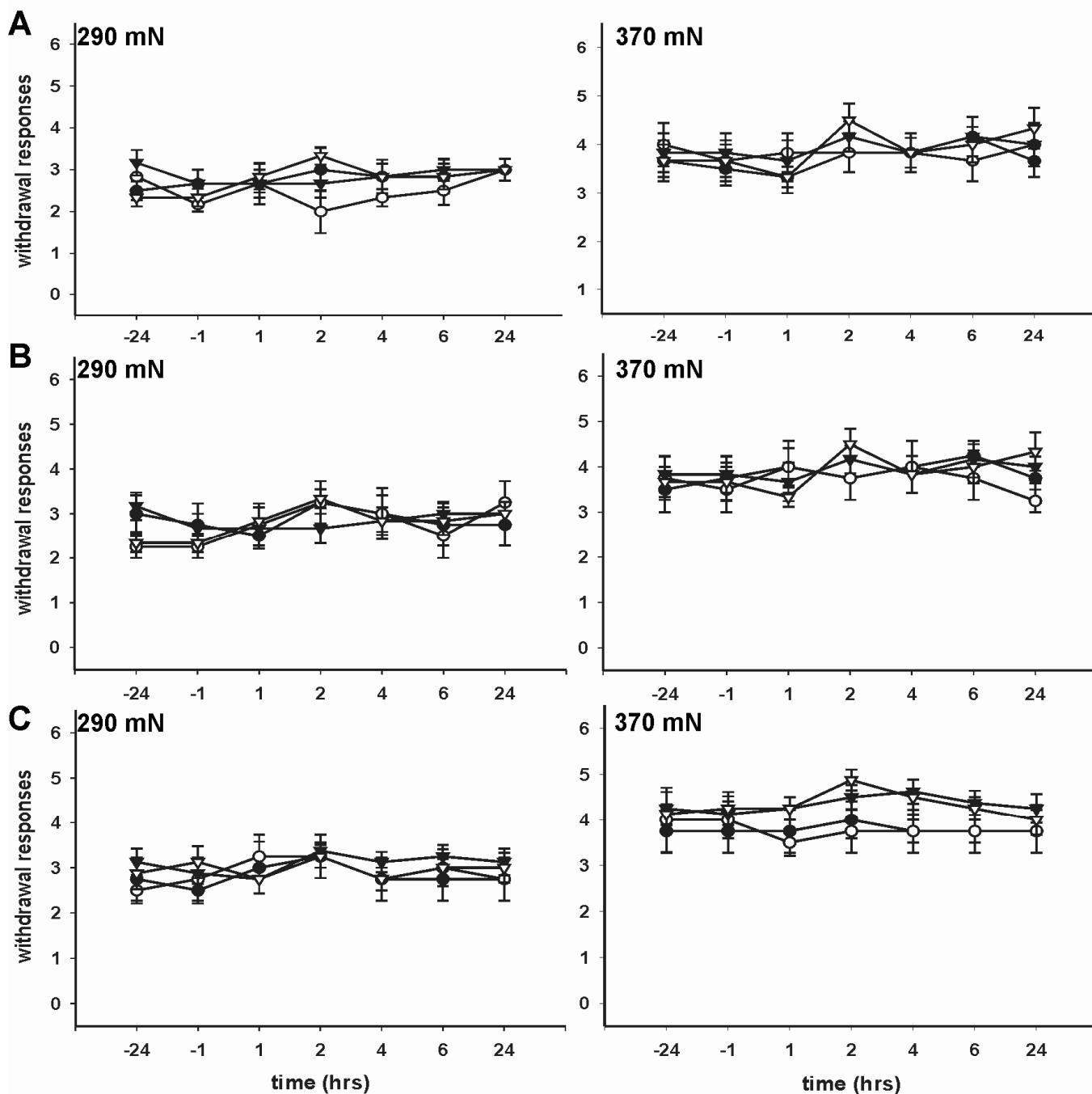
Obr. 20 100 μ M SB 366791 intradermálně před a po provedení plantární incise. Počet reflexních odpovědí (průměr \pm standardní chyba průměru) vyvolaných při stimulaci Von Freyovými vlákny (10 – 370 mN) planty pedis zvířat, kterým byl 100 μ M SB 366791 nebo rozpouštěcí roztok aplikován intradermálně 30 min před a po chirurgickém zákroku. Po provedení incise se počet vyvolaných odpovědí operovaných končetin výrazně zvýšil u zvířat, kterým bylo aplikováno rozpouštědlo (\blacktriangle), odpovědi korespondujících kontralaterálních končetin se neměnily (\triangle). Tento nárůst reaktivity operovaných končetin byl u skupiny zvířat ovlivněných SB 366791 oslaben (\bullet) v porovnání s operovanými končetinami zvířat po injekci rozpouštědla (Δ), v porovnání s korespondujícími kontralaterálními končetinami však zůstal signifikantní (\circ). Oslabující účinek SB 366791 se týkal především mechanické alodynie. Odpovědi korespondujících kontralaterálních intaktních končetin na mechanické podněty se neměnily (\circ , Δ). 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, + $P < 0,05$; ++ $P < 0,01$; +++ $P < 0,001$ 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.

4.4.5. Ovlivnění základní reaktivity zvířat na mechanické podněty různých intenzit aplikovaných na intaktní kůži planty pedis účinkem TRPV1 antagonisty SB 366791 aplikovaného intratekálně nebo intradermálně

V následující sérii pokusů byla testována základní reaktivita zvířat na mechanické podněty 290 a 370 mN aplikované na intaktní kůži planty pedis bez chirurgické incise a její případné ovlivnění účinkem intratekálně aplikovaného TRPV1 antagonisty v koncentracích 100 a 10 μM nebo intradermálně aplikovaného 100 μM roztoku TRPV1 antagonisty. Kontrolní zvířata podstoupila identickou testovací proceduru jako experimentální, místo účinné látky jim byl aplikován pouze rozpouštěcí roztok. (Obr. 21)

Stimulace intaktní kůže planty mechanickými silami 290 a 370 mN vyvolávala reflexní elevace končetin u všech testovaných zvířat. Odpovědi obou končetin se od sebe před intratekální nebo intradermální aplikací roztoku SB 366791 nijak nelišily. U všech kontrolních zvířat, ovlivněných pouze rozpouštěcím roztokem bez účinné látky, zůstaly odpovědi obou končetin na tyto podněty v celém časovém průběhu pokusu nezměněny. Intratekální ani intradermální injekce rozpouštědla neměla žádný vliv na reaktivitu kontrolních zvířat na mechanické podněty 290 a 370 mN aplikované na intaktní kůži planty pedis.

Experimentálním zvířatům byl aplikován intratekálně buď 100 μM nebo 10 μM roztok TRPV1 antagonisty, nebo intradermálně 100 μM SB 366791. Chirurgická incise na plantě pedis u těchto zvířat vytvořena nebyla. U žádného z experimentálních zvířat této série pokusů nebyla zaznamenána žádná změna odpovědi při stimulaci intaktní kůže jejich končetin mechanickými silami 290 a 370 mN, a to v celém průběhu pokusu, jejich odpovědi se nelišily od reaktivity kontrolních zvířat na tyto podněty. Po intratekální aplikaci 100 μM nebo 10 μM roztoku TRPV1 antagonisty tedy nebyl u žádného zvířete zaznamenán rozvoj hypo – ani hypersenzitivity na tyto mechanické podněty, odpovědi na stimulaci intaktní kůže Von Freyovými vlákny 290 a 370 mN se nezměnila ani po intradermální aplikaci 100 μM roztoku SB 366791 v porovnání s reaktivitou zvířat kontrolní skupiny.



Obr. 21 Počet reflexních odpovědí (průměr +/- standardní chyba průměru) vyvolaných při stimulaci Von Freyovými vlákny (290 a 370 mN) planty pedis obou končetin u různých skupin zvířat, bez provedení plantární incise. První skupině zvířat byl intratekálně aplikován 100 μM roztok TRPV1 antagonisty nebo rozpouštědla (A), druhé skupině zvířat byl intratekálně aplikován 10 μM roztok TRPV1 antagonisty (B), třetí skupině zvířat byl 100 μM roztok TRPV1 antagonisty nebo rozpouštědla aplikován intradermálně (C). Rozpouštědlo nebo SB 366791 byly aplikovány v čase 0. Odpovědi na mechanické podněty (Von Freyova vlákna 290 a 370 mN) se po injekci SB 366791 (●,○) ani rozpouštědla (▲, Δ) nezměnily u žádné z experimentálních skupin zvířat a zůstávaly na stejné úrovni v celém průběhu pokusu. Nebyl zjištěn rozdíl ani mezi jednotlivými skupinami zvířat, ani mezi pravými a levými končetinami zvířat v rámci experimentální skupiny.

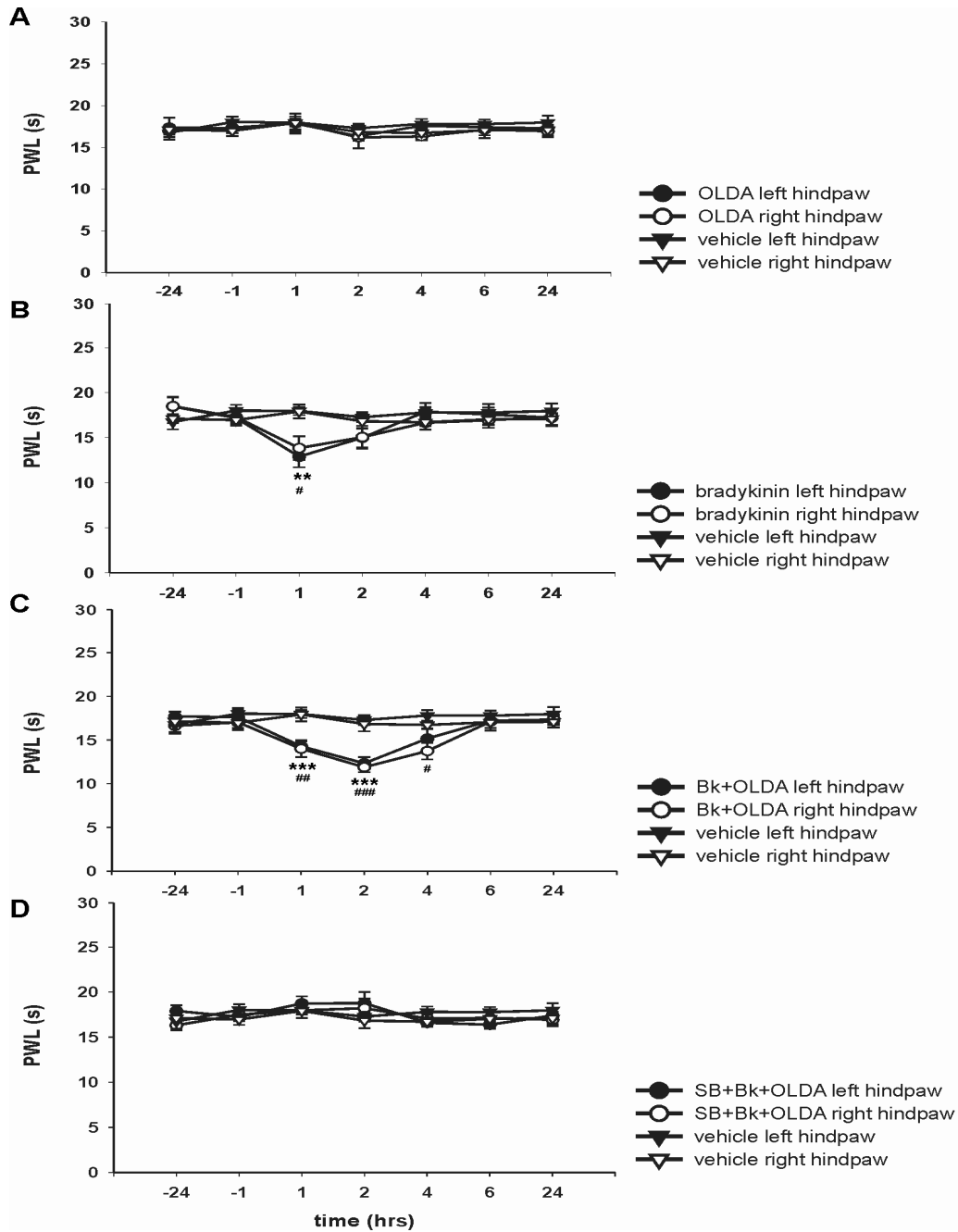
4.5. Úloha centrálních TRPV1 receptorů v nocicepci, možné mechanismy jejich aktivace a senzitivace

Poslední část studie se zabývala úlohou centrálních TRPV1 receptorů v nocicepci. U experimentálních zvířat, kterým nebyla provedena plantární incise, byly sledovány změny reaktivity na tepelné a mechanické podněty jednak po aktivaci centrálních TRPV1 endogenním agonistou, dále po senzitivaci centrálních TRPV1 bradykininem, a dále po aktivaci senzitivovaných TRPV1 endogenním agonistou. V poslední sérii pokusů byl testován účinek TRPV1 antagonisty SB 366791 na změny odpovědi způsobené aktivací nebo senzitivací centrálních TRPV1 receptorů zjištěné v předchozích pokusech. V této části studie byla opět stejnými behaviorálními metodami testována citlivost zvířat na tepelné a mechanické podněty aplikované na intaktní kůži planty pedis a zjišťovány její případné změny způsobené aktivací nebo senzitivací centrálních TRPV1 receptorů. Všem zvířatům použitým v této části studie byly implantovány intratekální katétrů a 5 dní po implantaci otestovány jejich odpovědi na mechanickou a tepelnou stimulaci planty pedis. V den pokusu, před intratekální injekcí účinné látky, byly tyto kontrolní odpovědi testovány znovu, u žádného ze zvířat však nebyla zaznamenána významná změna reaktivity na tepelné nebo mechanické podněty oproti prvnímu testování. Kontrolní odpovědi na tepelnou a mechanickou stimulaci intaktní kůže planty pedis se mezi pravými a levými končetinami zvířat nelišily.

4.5.1. Ovlivnění reaktivity zvířat na tepelné a mechanické podněty různých intenzit aplikované na intaktní kůži planty pedis účinkem intratekálně podaného TRPV1 agonisty

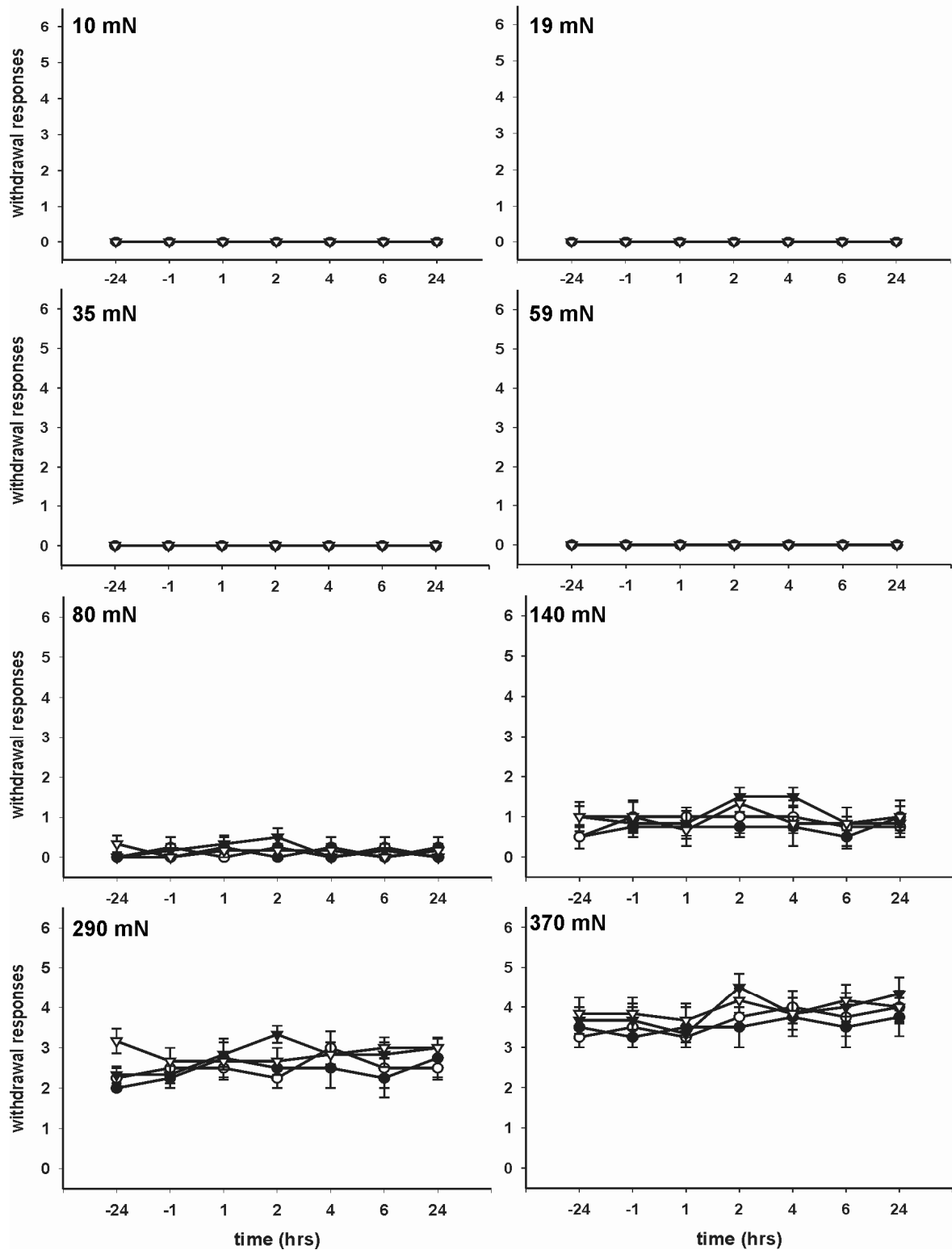
V této sérii pokusů byla testována základní reaktivita zvířat na tepelné a mechanické podněty aplikované na intaktní kůži planty pedis bez chirurgické incise a její případné ovlivnění účinkem intratekálně aplikovaného TRPV1 agonisty OLDA v koncentraci 50 μM .

Odpovědi zvířat na tepelné podněty byly testovány dvakrát před intratekální injekcí OLDA a v dalších pěti časových intervalech po injekci. V těchto pokusech však nebyla po intratekální aplikaci OLDA zjištěna žádná změna reaktivity zvířat na tepelnou stimulaci v porovnání s kontrolními hodnotami zjištěnými před jeho aplikací. Odpovědi zůstávaly na stejné úrovni v celém časovém průběhu pokusu a nelišily se ani od odpovědi zvířat, kterým byl intratekálně aplikován rozpouštěcí roztok bez účinné látky. Účinkem intratekálně aplikovaného 50 μM agonisty na TRPV1 receptorech tedy nedošlo k významnému ovlivnění termosenzitivity intaktní kůže planty pedis u žádného z testovaných zvířat v průběhu 24 h po jeho aplikaci. (Obr. 22A)



Obr. 22 Reakční časové intervaly (průměr \pm standardní chyba průměru) na tepelné podněty měřené na obou končetinách u různých skupin zvířat. První skupině zvířat byl intratekálně aplikován roztok OLDA (A), druhé skupině zvířat byl intratekálně aplikován roztok bradykininu (B), třetí skupině zvířat byl intratekálně aplikován roztok OLDA současně s bradykininem (C), zvířatům čtvrté skupiny byl intratekálně aplikován roztok TRPV1 antagonisty a poté OLDA s bradykininem (D). V těchto pokusech nebyly prováděny plantární incise, 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 (\bullet, \circ). Odpovědi končetin se v rámci této experimentální skupiny významně nelišily mezi pravou a levou stranou, nelišily se ani od kontrolních hodnot zjištěných před intratekální injekcí. (B) Reakční intervaly obou končetin zvířat se po intratekální aplikaci roztoku bradykininu výrazně zkrátily oproti kontrolní reaktivitě zjištěné před injekcí. Zkrácení bylo signifikantní v první hodině po injekci, reaktivita na tepelné podněty se pak v dalších hodinách vrátila na bazální úroveň (\bullet, \circ). (C) Reakční intervaly na tepelné podněty této skupiny zvířat se po intratekální aplikaci roztoků bradykininu a OLDA rovněž významně zkrátily oproti kontrolní reaktivitě zjištěné před injekcí, navíc bylo toto zkrácení oproti předchozí experimentální skupině zvířat podstatně výraznější. Zkrácení bylo signifikantní minimálně 4 h po injekci, reaktivita na tepelné podněty se pak postupně vracela na bazální úroveň (\bullet, \circ). (D) Po intratekální injekci SB 366791 následované bradykininem s OLDA nedošlo k žádné změně reaktivity na tepelné podněty končetin v celém průběhu pokusu (\bullet, \circ). Odpovědi končetin se v rámci této experimentální skupiny významně nelišily mezi pravou a levou stranou, nelišily se ani od kontrolních hodnot zjištěných před intratekální injekcí. SB 366791 kompletně zablokoval zkrácení reakčních intervalů a tedy i termální hypersenzitivitu způsobenou bradykininem s OLDA. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ 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.

Ve stejných časových intervalech byly testovány i odpovědi zvířat na mechanické podněty. Tenká Von Freyova vlákna působící silami nízkých intenzit (10, 20, 35, 59 mN) nevyvolávala reflexní elevace končetin zvířat při stimulaci intaktní kůže planty pedis před intratekální injekcí OLDA a reaktivita na tyto podněty se nezvýšila u žádného z testovaných zvířat ani po intratekální aplikaci OLDA. Stimulace planty pedis intenzivnějšími mechanickými podněty (80, 140, 290 a 370 mN) vyvolávala reflexní odpovědi zvířat za kontrolních podmínek, tedy před intratekální injekcí TRPV1 agonisty. U žádného z experimentálních zvířat této série pokusů však nebyla po intratekální injekci OLDA zaznamenána jakákoliv změna těchto odpovědí při stimulaci intaktní kůže jejich končetin těmito mechanickými silami, a to v celém průběhu pokusu. Odpovědi se nelišily od kontrolní reaktivity zjištěné před provedením intratekální injekce a ani od reaktivity zvířat, kterým bylo do intratekálního katétru aplikováno pouze rozpouštědlo. Po intratekální aplikaci 50 μ M roztoku TRPV1 agonisty tedy nebyl u žádného zvířete zaznamenán rozvoj hypo – ani hypersenzitivity na mechanické podněty. (Obr. 23)



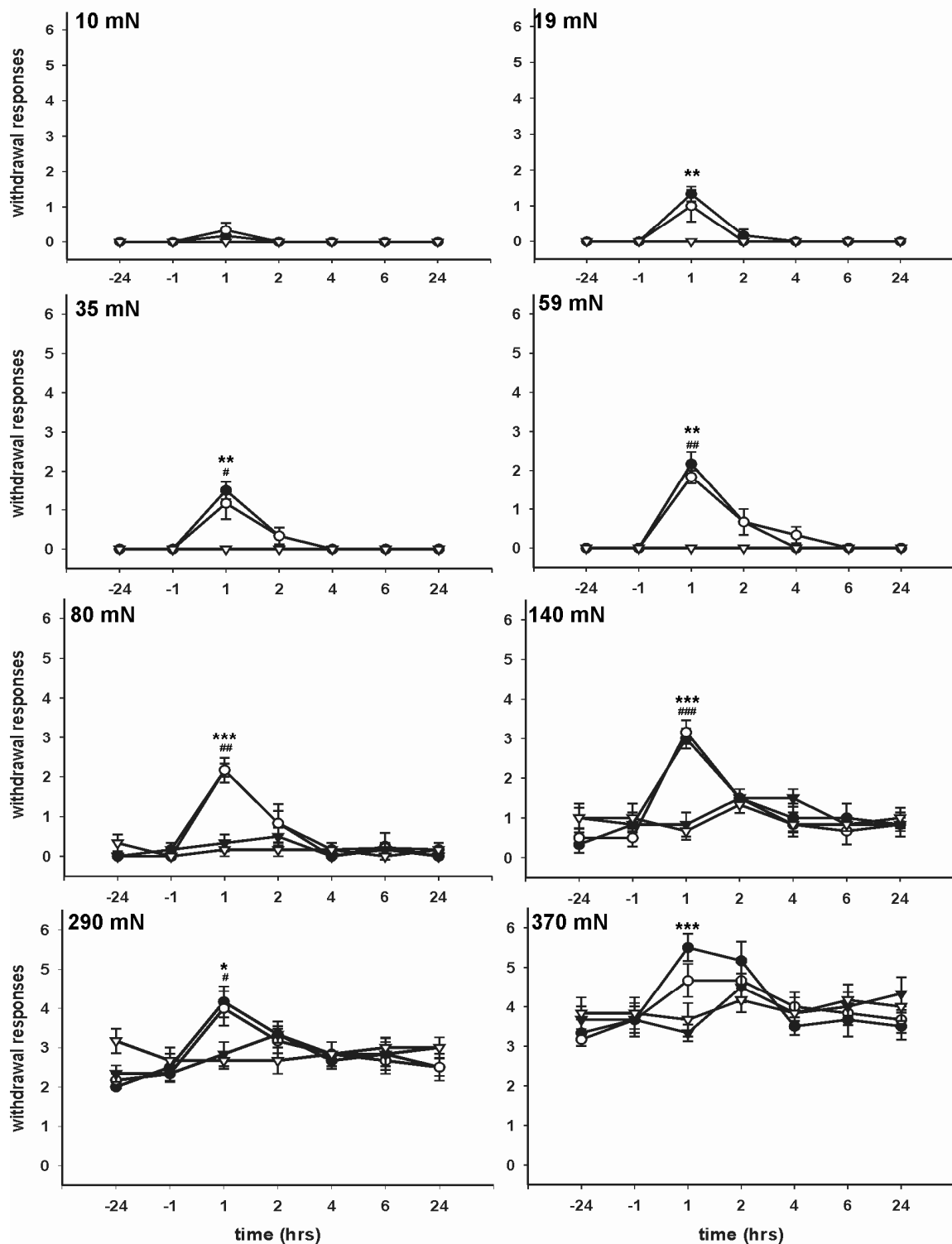
Obr. 23 OLDA aplikovaný intratekálně bez provedení plantární incise. Počet reflexních odpovědí (průměr +/- standardní chyba průměru) vyvolaných při stimulaci Von Freyovými vlákny (10 – 370 mN) planty pedis zvířat, kterým byl intratekálně aplikován roztok OLDA (v čase 0). Odpovědi na mechanické podněty se po injekci OLDA (●,○) nezměnily a zůstávaly na stejné úrovni v celém průběhu pokusu. V pokusech nebyl zjištěn rozdíl mezi kontrolními počty odpovědí zjištěnými před intratekální aplikací a hodnotami po injekci, odpovědi se nelišily ani mezi pravými a levými končetinami zvířat v rámci experimentální skupiny.

4.5.2. Ovlivnění reaktivity zvířat na tepelné a mechanické podněty různých intenzit aplikované na intaktní kůži planty pedis účinkem intratekálně podaného bradykininu

V další sérii pokusů byla testována základní reaktivita zvířat na tepelné a mechanické podněty aplikované na intaktní kůži planty pedis a její případné ovlivnění účinkem intratekálně aplikované substance senzitivizující TRPV1 receptory, roztoku bradykininu v koncentraci 1 mM.

Odpovědi zvířat na tepelné podněty byly testovány ve stejných časech jako v první sérii pokusů. Po intratekální aplikaci bradykininu bylo zjištěno významné zkrácení reakčních časů zvířat na tepelnou stimulaci v porovnání s kontrolními hodnotami zjištěnými před jeho aplikací, a to v čase 1 h po intratekální injekci. Kontrolní reakční intervaly zvířat na tepelný podnět (v průměru přibližně 17 s) se v první hodině po aplikaci bradykininu zkrátily na přibližně 13 s v průměru a tento rozdíl byl statisticky významný, zkrácení bylo patrné i v porovnání s intervaly zvířat po intratekální aplikaci rozpouštědla. Účinkem intratekálně injikovaného 1 mM bradykininu tedy došlo k rozvoji přechodné hypersenzitivity intaktní kůže planty pedis na tepelné podněty detekovatelné 1 h po jeho aplikaci. V dalším průběhu pokusu se reakční časy těchto zvířat začaly opět postupně prodlužovat a v čase 2 h po injekci dosáhly úrovně kontrolních hodnot. Zjištěné odpovědi na tepelné podněty této skupiny zvířat a jejich změny se mezi pravými a levými končetinami nelišily. (Obr. 22B; obr. 27A)

Ve stejných časových intervalech byly testovány i odpovědi zvířat na mechanické podněty. Tenká Von Freyova vlákna působící silami nízkých intenzit (10, 20, 35, 59 mN) nevyvolávala reflexní elevace končetin zvířat při stimulaci intaktní kůže planty pedis před intratekální injekcí 1 mM bradykininu. Po jeho aplikaci však zvířata začala na tyto slabé podněty reagovat, reflexní odpovědi bylo možné vyvolat v prvních dvou hodinách po provedení injekce, na podnět 59 mN reagovala zvířata ještě 4 h po injekci. V testovacím čase 1 h dosahoval zjištěný rozdíl odpovědí statistické významnosti. Stimulace planty pedis intenzivnějšími mechanickými podněty (80, 140, 290 a 370 mN) vyvolávala reflexní odpovědi zvířat i za kontrolních podmínek, tedy před intratekální injekcí bradykininu. Po intratekální aplikaci bradykininu bylo zaznamenáno výrazné zvýšení odpovědí při stimulaci intaktní kůže planty pedis těmito mechanickými silami, a to v testovacích časech 1 h a 2 h po injekci. V těchto časech se odpovědi na podněty 140 a 290 mN statisticky významně lišily od kontrolní reaktivity zjištěné před provedením intratekální injekce, rozdíly odpovědí na podněty 80 a 370 mN dosáhly statistické signifikance v čase 1 h po injekci. Po intratekální aplikaci 1 mM roztoku bradykininu byl tedy zaznamenán rozvoj hypersenzitivity na všechny testované mechanické podněty, rozdíly odpovědí na mechanické podněty byly významné i v porovnání se skupinou zvířat, kterým byl intratekálně aplikován rozpouštěcí roztok. Tato mechanická alodynzie a hyperalgie měla přechodný ráz, v dalším průběhu pokusu se pak reaktivita zvířat na mechanické podněty začala opět snižovat a v čase 2 h po injekci dosáhla úrovně kontrolních hodnot. Zjištěné odpovědi na mechanické podněty této skupiny zvířat a jejich změny se mezi pravými a levými končetinami nelišily. (Obr. 24, obr. 27B)



Obr. 24 Bradykinin aplikovaný intratekálně bez provedení plantární incise. Počet reflexních odpovědí (průměr +/- standardní chyba průměru) vyvolaných při stimulaci Von Freyovými vlákny (10 – 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 významně zvýšil (●,○). V první hodině po injekci se rozvinula mechanická alodynie a hyperalgie na obou testovaných končetinách těchto zvířat, poté se reaktivita na mechanické podněty postupně snižovala na bazální úroveň. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ odpovědi levých končetin zvířat po injekci účinné látky versus levých končetin zvířat po injekci rozpouštědla, # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ odpovědi pravých končetin zvířat po injekci účinné látky versus odpovědi pravých končetin zvířat po injekci rozpouštědla.

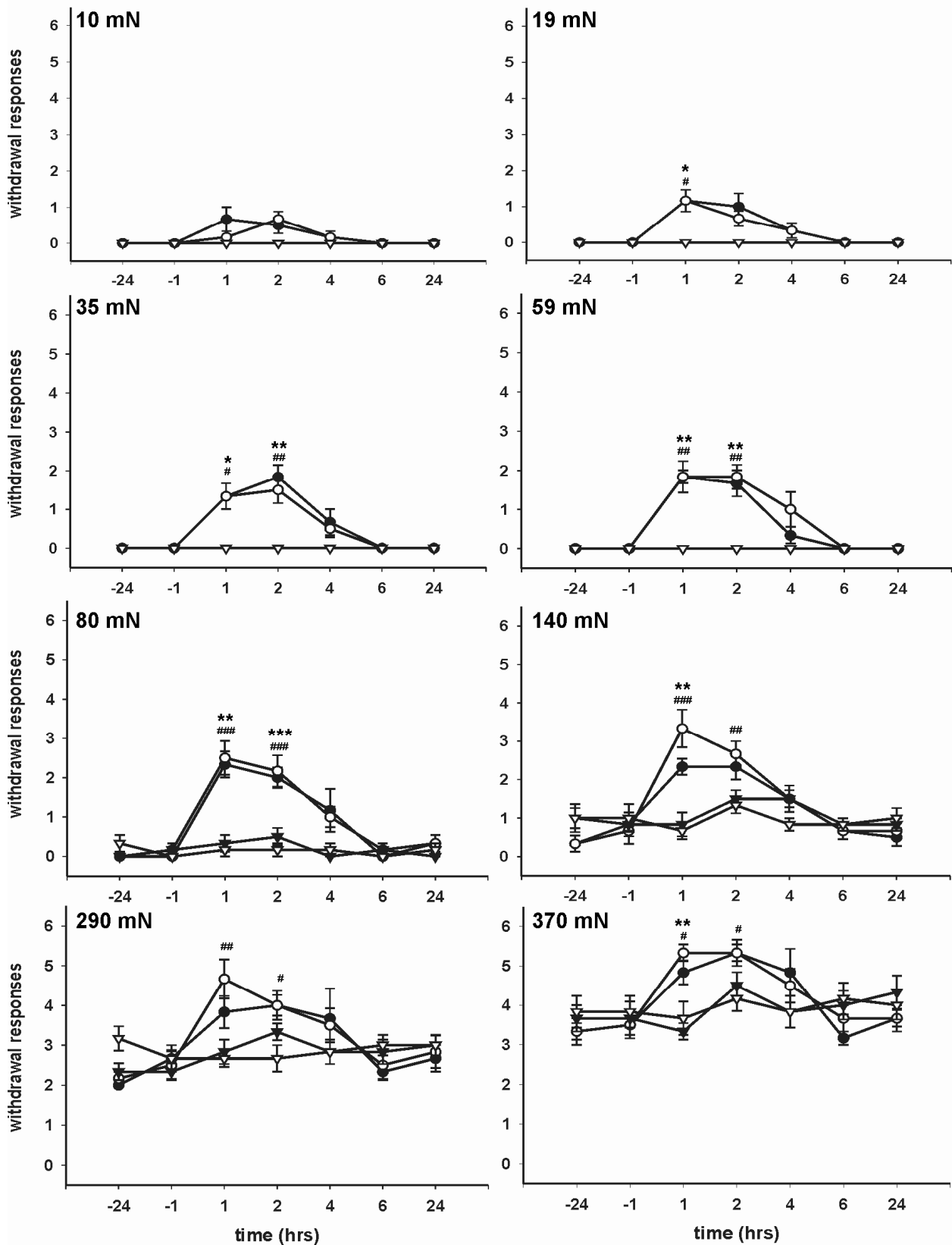
4.5.3. Ovlivnění reaktivity zvířat na tepelné a mechanické podněty různých intenzit aplikované na intaktní kůži planty pedis účinkem intratekálně podaných roztoků bradykininu a OLDA současně

V této sérii pokusů byla testována základní reaktivita zvířat na tepelné a mechanické podněty aplikované na intaktní kůži planty pedis a její případné ovlivnění účinkem intratekálně podaného roztoku bradykininu následovaného intratekálně aplikovaným roztokem OLDA.

Odpovědi zvířat na tepelné podněty byly testovány ve stejných časech jako v předchozích pokusech této části studie. Po intratekální aplikaci bradykininu a OLDA bylo u této skupiny experimentálních zvířat zjištěno významné zkrácení reakčních časů zvířat na tepelnou stimulaci v porovnání s kontrolními hodnotami zjištěnými před intratekální injekcí, a to v časech 1 h, 2 h a 4 h po intratekální injekci. Kontrolní reakční intervaly zvířat na tepelný podnět (v průměru přibližně 17 s) se v první hodině po aplikaci bradykininu a OLDA zkrátily na přibližně 13 s v průměru, v druhé hodině pak dosáhly minimálních hodnot a od 4. hodiny po intratekální injekci se začaly opět prodlužovat. Zkrácení reakčních intervalů těchto experimentálních zvířat na tepelné podněty bylo v porovnání s kontrolními hodnotami statisticky významné v testovacích časech 1 h, 2 h i 4 h po injekci, významné rozdíly byly zjištěny i v porovnání se skupinou zvířat po intratekální aplikaci rozpouštěcího roztoku. Účinkem intratekálně injikovaných roztoků bradykininu a OLDA došlo tedy k rozvoji přechodné hypersenzitivity intaktní kůže planty pedis na tepelné podněty detekovatelné 1 h, 2 h a 4 h po jejich aplikaci. V dalším průběhu pokusu se reakční časy těchto zvířat začaly opět postupně prodlužovat a v čase 6 h po injekci dosáhly úrovně kontrolních hodnot. Oproti termální hyperalgezií způsobené účinkem samotného bradykininu byla v tomto případě hypersenzitivita na tepelné podněty zřetelně výrazněji vyjádřena a přetrvávala delší dobu. Zatímco po intratekální aplikaci samotného bradykininu bylo zkrácení reakčních intervalů na tepelné podněty statisticky významné pouze v první hodině po injekci, v případě intratekální aplikace bradykininu a OLDA dosahovalo signifikance ještě 4 h po injekci. Z těchto výsledků je jasně patrná potenciace účinku bradykininu působením OLDA, která se projevila tepelnou hyperalgezií přetrvávající výrazně delší dobu, než po aplikaci samotného bradykininu. Zjištěné odpovědi na tepelné podněty této skupiny zvířat a jejich změny se mezi pravými a levými končetinami nelišily. (Obr. 22C; obr. 27A)

Stejným způsobem byly testovány také odpovědi zvířat na mechanické podněty. Tenká Von Freyova vlákna působící silami nízkých intenzit (10, 20, 35, 59 mN) nevyvolávala reflexní elevace končetin zvířat při stimulaci intaktní kůže planty pedis před intratekální injekcí bradykininu a OLDA. Po jejich aplikaci však zvířata začala na tyto slabé podněty reagovat, reflexní odpovědi bylo možné vyvolat v prvních čtyřech hodinách po provedení injekce. Zvýšení odpovědí experimentálních zvířat na nejslabší použitý mechanický podnět (10 mN) po intratekální aplikaci bradykininu a OLDA statisticky významné nebylo, pro Von Freyova vlákna o silách 20, 35 a 59 mN pak dosáhlo statistické signifikance v testovacích časech 1 h i 2 h po injekci. Oproti předešlému pokusu s aplikací samotného bradykininu přetrvávala v tomto případě mechanická alodynie vyvolaná účinkem bradykininu s OLDA déle. Stimulace planty pedis intenzivnějšími mechanickými podněty (80, 140, 290 a 370 mN) vyvolávala reflexní odpovědi zvířat i za kontrolních podmínek, tedy před intratekální injekcí bradykininu a OLDA. Také po intratekální aplikaci bradykininu s OLDA bylo zaznamenáno výrazné zvýšení odpovědí při stimulaci intaktní kůže planty pedis těmito mechanickými silami, a to v testovacích časech 1 h, 2 h a 4 h po injekci. V těchto časech se odpovědi na podněty 80, 290 a 370 mN statisticky významně lišily od kontrolní reaktivity zjištěné před provedením intratekální injekce, rozdíly odpovědí na podnět 140 mN dosahoval statistické signifikance v časech 1 h a 2 h po injekci. Po intratekální aplikaci roztoku bradykininu a

OLDA byl tedy zaznamenán rozvoj hypersenzitivity na všechny testované mechanické podněty, jak v porovnání s kontrolní reaktivitou, tak s reaktivitou skupiny zvířat po intratekální injekci rozpouštědla. Tato mechanická alodynie a hyperalgie měla přechodný ráz, v dalším průběhu pokusu se pak reaktivita zvířat na mechanické podněty začala opět postupně snižovat a v čase 6 h po injekci dosáhla úrovně kontrolních hodnot. Zjištěné odpovědi na mechanické podněty této skupiny zvířat a jejich změny se mezi pravými a levými končetinami nelišily. (Obr. 25; obr. 27B)



Obr. 25 Bradykinin s OLDA aplikovaný intratekálně bez provedení plantární incise. Počet reflexních odpovědí (průměr +/- standardní chyba průměru) vyvolaných při stimulaci Von Freyovými vlákny (10 – 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 (●,○). V první hodině po injekci se rozvinula mechanická alodynie a hyperalgie na obou testovaných končetinách těchto zvířat přetrvávající minimálně 2 h po injekci, poté se reaktivita na mechanické podněty postupně snižovala na bazální úroveň. Zvýšení odpovědí na mechanické podněty nízkých i vyšších intenzit bylo oproti předchozí experimentální skupině výraznější a přetrvávalo déle. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ odpovědi levých končetin zvířat po injekci účinné látky versus odpovědi pravých 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.

4.5.4. Ovlivnění reaktivity zvířat na tepelné a mechanické podněty aplikované na intaktní kůži planty pedis účinkem intratekální injekce 100 μ M roztoku TRPV1 antagonisty následované současnou intratekální aplikací roztoků bradykininu a OLDA

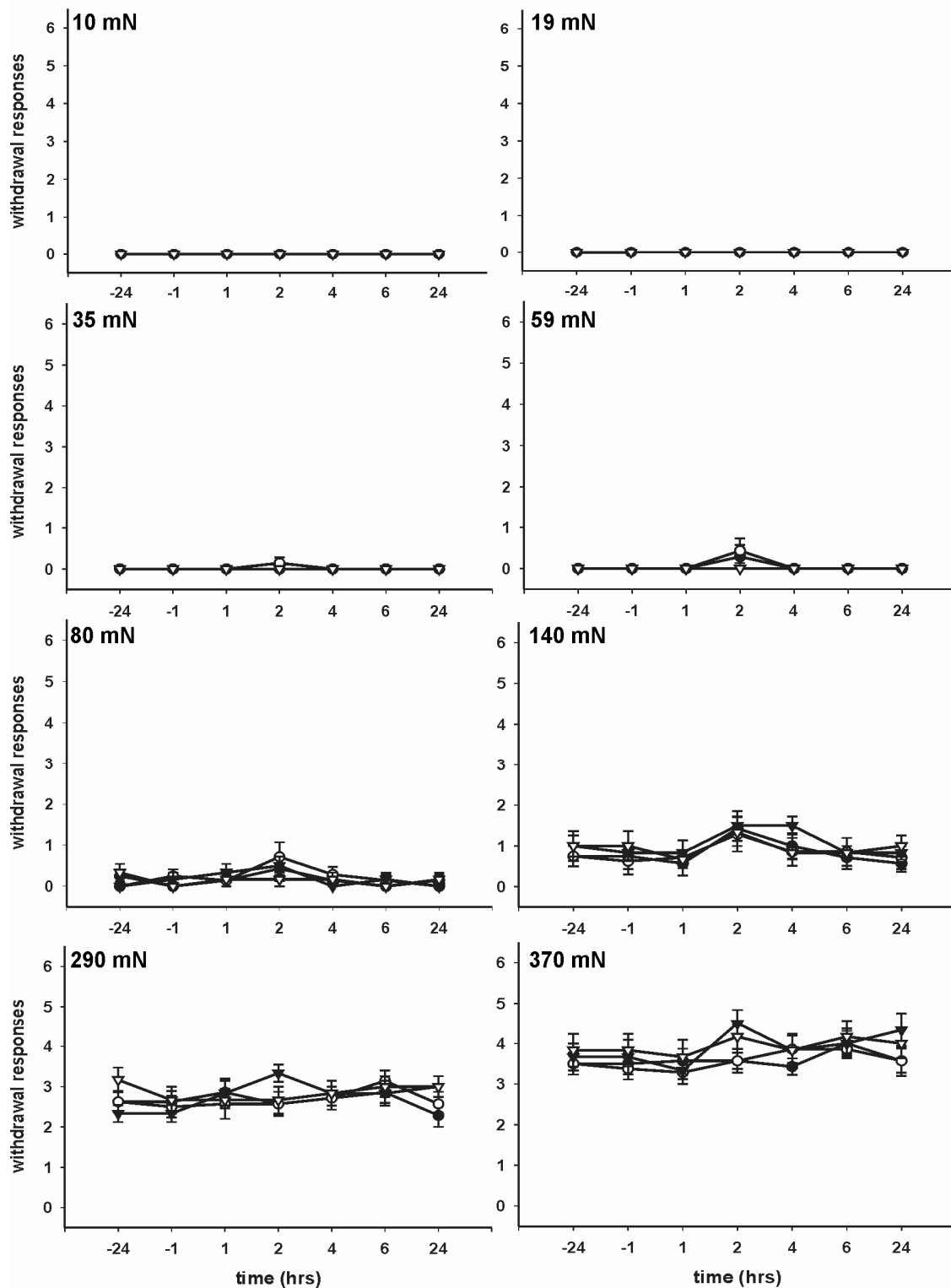
V této sérii pokusů byla testována základní reaktivita zvířat na tepelné a mechanické podněty aplikované na intaktní kůži planty pedis a její případné ovlivnění účinkem intratekálně podaného roztoku SB 366791 před intratekální injekcí roztoku bradykininu současně s roztokem OLDA.

Odpovědi zvířat na tepelné podněty byly testovány podle stejného experimentálního protokolu, dvakrát před intratekálními injekcemi farmak a v dalších pěti časových intervalech po injekcích. V těchto pokusech nebyla po intratekální aplikaci SB 366791 následované podáním bradykininu s roztokem OLDA zjištěna žádná změna reaktivity zvířat na tepelnou stimulaci v porovnání s kontrolními hodnotami zjištěnými před provedením injekcí. Odpovědi těchto zvířat na tepelné podněty zůstávaly na stejné úrovni v celém časovém průběhu pokusu a nelišily se ani od odpovědi skupiny zvířat, které byl intratekálně aplikován rozpouštěcí roztok bez účinné látky. Účinkem intratekálně aplikovaného 100 μ M TRPV1 antagonisty tedy došlo k úplnému zablokování hypersenzitivity intaktní kůže planty pedis na tepelné podněty vyvolané intratekální injekcí bradykininu s OLDA, a to u všech testovaných zvířat v průběhu 24 h po jejich aplikaci. Zjištěné reakční intervaly na tepelné podněty se mezi pravými a levými končetinami této skupiny zvířat významně nelišily. (Obr. 22D; obr. 27A)

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 ještě znovu 24 hodin po první injekci, a to bez TRPV1 antagonisty. Testování odpovědi na tepelný a mechanický podnět 80 mN pak proběhlo bezprostředně před touto injekcí a v časech 1 h a 2 h po její aplikaci. Výsledky sloužily jako pozitivní kontrola. Po této druhé intratekální aplikaci bradykininu a OLDA bylo opět zjištěno významné zkrácení reakčních časů zvířat na tepelnou stimulaci v porovnání s kontrolními hodnotami zjištěnými před intratekální injekcí, v testovacím čase 2 h byly reakční časy těchto zvířat o 29,1% kratší než kontrolní a tento rozdíl byl statisticky signifikantní. 24 h po první aplikaci SB 366791 následovaného bradykininem s OLDA, došlo tedy u těchto zvířat k rozvoji přechodné hypersenzitivity intaktní kůže planty pedis na tepelné podněty, a to účinkem druhé intratekální injekce roztoků bradykininu a OLDA tentokrát bez ovlivnění roztokem TRPV1 antagonisty. Tyto výsledky potvrzují, že v rozvoji termální hyperalgie vyvolané intratekálně podaným bradykininem s OLDA hrají důležitou roli centrální TRPV1 receptory. (Obr. 28A)

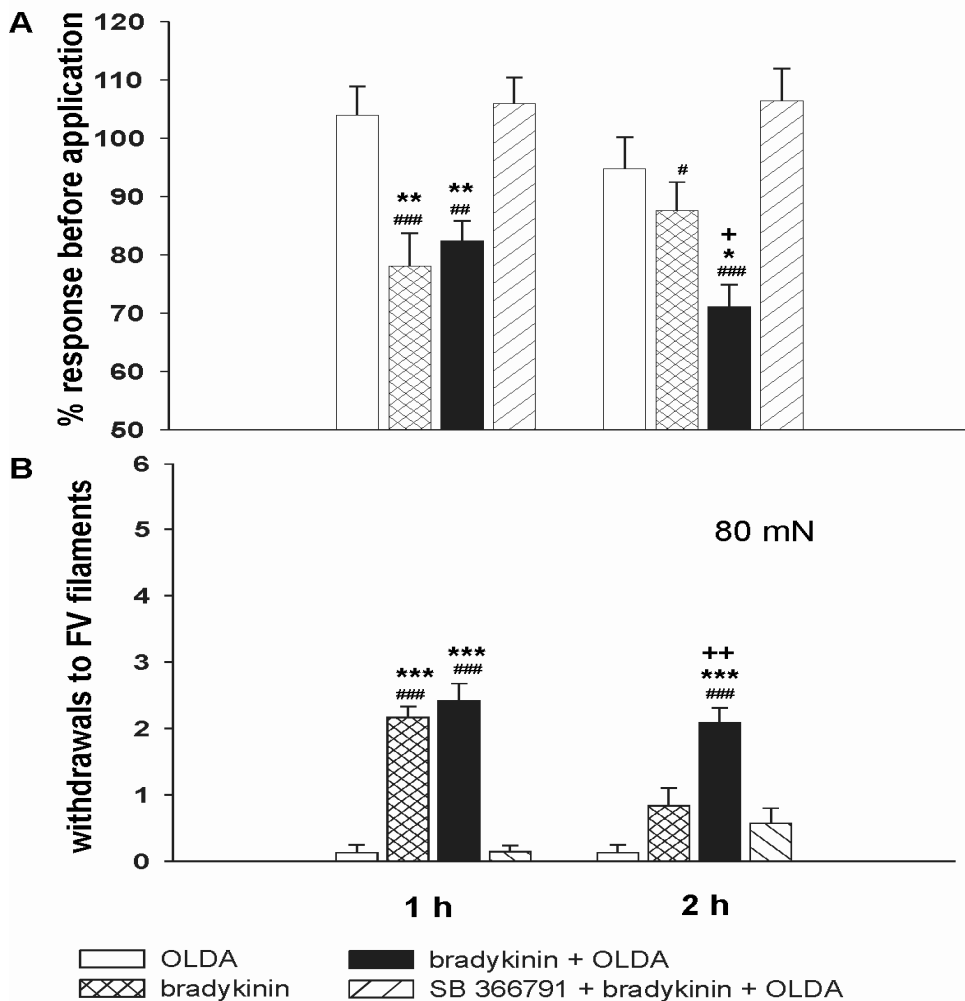
Dále byly u zvířat této experimentální skupiny stejným způsobem testovány jejich odpovědi na mechanické podněty. Tenká Von Freyova vlákna působící silami nízkých intenzit (10, 20, 35, 59 mN) nevyvolávala reflexní elevace končetin zvířat při stimulaci intaktní kůže planty pedis před intratekálními injekcemi SB 3667091 a bradykininu s OLDA. Zvířata však na slabé mechanické podněty nezačala reagovat ani po jejich aplikaci, pouze stimulace podněty 35 a 59 mN vyvolala ojedinělé reflexní odpovědi zvířat 2 h po injekci, tato změna však nebyla statisticky významná. Reaktivita na mechanické podněty nízkých intenzit se tedy významně nezvýšila ani u jednoho z testovaných zvířat po intratekální aplikaci TRPV1 antagonisty následované injekcí bradykininu s OLDA. Stimulace planty pedis intenzivnějšími mechanickými podněty (80, 140, 290 a 370 mN) vyvolávala reflexní odpovědi zvířat i za kontrolních podmínek před provedením intratekálních injekcí SB 366791 a bradykininu s OLDA. Po jejich aplikaci však nebyla u žádného z experimentálních

zvířat této série pokusů zaznamenána jakákoliv změna reflexních odpovědí při stimulaci intaktní kůže jejich končetin těmito mechanickými silami, a to v celém průběhu pokusu. Odpovědi se nelišily od kontrolní reaktivity zjištěné před intratekální aplikací účinných látek a ani od reaktivity zvířat, kterým bylo intratekálně aplikováno rozpouštědlo. Působením 100 μ M roztoku TRPV1 antagonisty tedy došlo k úplnému zablokování mechanické alodynie a hyperalgie vznikajících účinkem intratekálně podaného bradykininu s OLDA, a to u všech zvířat této experimentální skupiny. Lze shrnout, že v celém průběhu tohoto pokusu nebyl zaznamenán rozvoj hypo – ani hypersenzitivity na mechanické podněty u žádného z testovaných zvířat, zjištěné odpovědi na mechanické podněty této skupiny zvířat se mezi pravými a levými končetinami nelišily. (Obr. 26; obr. 27B)

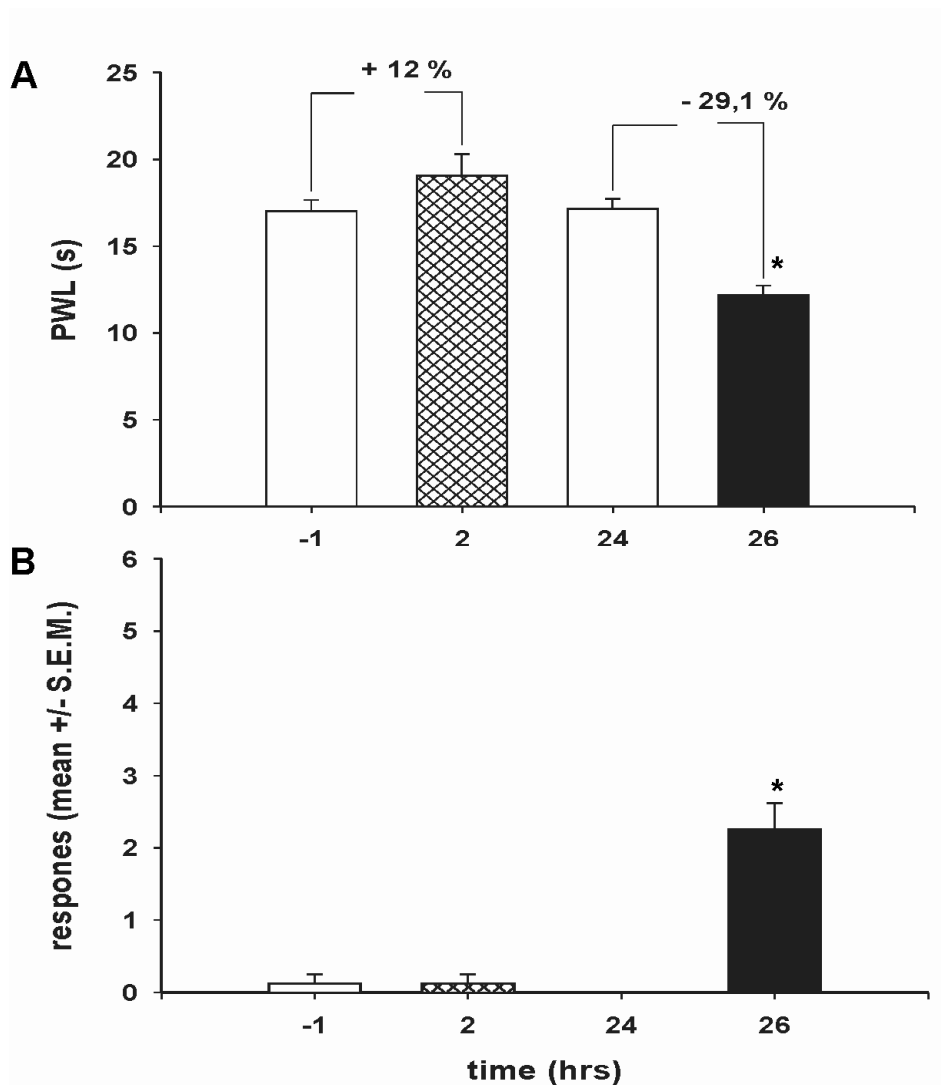


Obr. 26 Bradykinin s OLDA aplikované intratekálně po intratekální injekci SB 66791, bez provedení plantární incise. Počet reflexních odpovědí (průměr +/- standardní chyba průměru) vyvolaných při stimulaci Von Freyovými vlákny (10 – 370 mN) planty pedis zvířat, kterým byl intratekálně aplikován nejprve roztok SB 366791 a poté bradykinin s OLDA (v čase 0). Odpovědi na mechanické podněty se po injekcích roztoků těchto látek (●,○) nezměnily a zůstávaly na stejné úrovni v celém průběhu pokusu. V pokusech nebyl zjištěn rozdíl mezi kontrolními počty odpovědí zjištěnými před intratekální aplikací a hodnotami po injekci, odpovědi se nelišily ani mezi pravými a levými končetinami zvířat v rámci této experimentální skupiny. SB 366791 účinně zablokoval nárůst reaktivity na mechanické podněty způsobené OLDA a bradykininem a zabránil tak rozvoji mechanické alodynie a hyperalgie.

Po druhé intratekální aplikaci bradykininu a OLDA 24 h poté však bylo u těchto zvířat pozorováno významné zvýšení odpovědi zvířat na mechanický podnět 80 mN v porovnání s kontrolními hodnotami zjištěnými před intratekální injekcí, v testovacím čase 2 h statisticky signifikantní. 24 h po první aplikaci SB 366791 následovaného bradykininem s OLDA, došlo k rozvoji přechodné hypersenzitivity intaktní kůže planty pedis na mechanický podnět, a to účinkem druhé intratekální injekce roztoků bradykininu a OLDA bez ovlivnění roztokem TRPV1 antagonisty. Podle těchto výsledků hrají centrální TRPV1 receptory pravděpodobně významnou roli i v rozvoji mechanické hyperalgie vyvolané intratekálně podaným bradykininem s OLDA. (Obr. 28B)



Obr. 27 Intratekální aplikace OLDA, bradykininu, bradykininu s OLDA a SB 366791 + bradykininu s OLDA, bez plantární incise. Reakční časové intervaly na tepelné podněty v časech 1 h a 2 h po intratekální injekci vyjádřené relativně jako procento z kontrolních hodnot naměřených před intratekální 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) zvířat, kterým byly intratekálně aplikovány roztoky OLDA, bradykininu, bradykininu s OLDA a SB 366791 + bradykininu s OLDA. (A) Po intratekální injekci OLDA nedošlo k výraznější změně odpovědi na tepelné podněty. 1 i 2 h po aplikaci roztoku bradykininu se reakční intervaly na tepelné podněty této skupiny zvířat 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. (B) Odpovědi na mechanický podnět 80 mN se po intratekální injekci OLDA výrazně nezměnily, 1 h po aplikaci roztoku bradykininu se počet vyvolaných odpovědí tímto mechanickým podnětem v porovnání se zvířaty po aplikaci OLDA signifikantně zvýšil. V případě aplikace bradykininu s OLDA byl tento nárůst ještě výrazněji vyjádřen a přetrvával na rozdíl od zvířat po aplikaci samotného bradykininu ještě 2 h po intratekální injekci. SB 366791 zablokoval zvýšení reaktivity zvířat na mechanický podnět vyvolané 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. 28 Intratekální aplikace bradykininu s OLDA 24 h po injekcích roztoků SB 366791 a bradykininu s OLDA, bez plantární incise. 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 významně zkrátily oproti kontrolní reaktivitě zjištěné před injekcí a tento rozdíl dosahoval statistické signifikance. (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 počet odpovědí na mechanickou stimulaci obou končetin v porovnání s kontrolní hodnotou signifikantně zvýšil. * $P < 0,05$ odpovědi zvířat 1 h před versus 2 h po intratekální injekci.

5. Diskuse

5.1. Celkový přehled výsledků

Pilotní studie zkoumala nový zvířecí model pooperační bolesti, model incise kůže hřbetu, na kterém byl jasně prokázán a podrobně charakterizován rozvoj pooperační mechanické alodynie a hyperalgie, primární i sekundární. (86) Po provedení incise začala zvířata reagovat na stimulaci kůže ovlivněné chirurgickým zákrokem slabými mechanickými podněty, které před zákrokem reflexní odpovědi nevyvolávaly, rozvinula se pooperační mechanická alodynie. Došlo rovněž ke zvýšení odpovědi na silnější mechanické podněty (hyperalgie). Subkutánně injikovaný bupivakain aplikovaný předoperačně do místa incise oslabil průběh primární mechanické alodynie. Jeho účinkem došlo rovněž k úplnému zablokování sekundární mechanické alodynie a oslabení sekundární hyperalgie.

Pokusy první části studie dokázaly, že po lokální aplikaci kapsaicinu ve vysoké koncentraci před chirurgickým zákrokem dojde k vyřazení kapsaicin-senzitivních nervových vláken, tudíž k selektivnímu zablokování nociceptivní aferentace z místa incise, a následnému zablokování rozvoje pooperační tepelné hyperalgie a mechanické alodynie i hyperalgie. V důsledku poranění kůže planty pedis a musculus plantaris chirurgickou incisí došlo k mohutnému zvýšení reaktivity experimentálních zvířat na mechanické i tepelné podněty při stimulaci kůže planty pedis v bezprostředním okolí incise, podobně jako v řadě dalších studií. (32, 331) Mechanická stimulace Von Freyovými vlákny různé síly umožnilo rozlišit pooperační změny odpovědi zvířat na mechanické podněty slabých intenzit (10 – 80 mN), které nevyvolávaly reflexní odtahnutí končetiny při aplikaci na intaktní kůži, a pooperační změny reaktivity zvířat na intenzivnější mechanické podněty (140 – 370 mN), které vyvolávaly odpovědi už při stimulaci intaktní kůže před provedením plantární incise. Díky tomuto přístupu bylo možné rozlišit pooperační mechanickou alodynii a hyperalgií. Intradermální injekce kapsaicinu výrazně oslabila průběh pooperační tepelné a mechanické hyperalgie i mechanické alodynie. Největší účinek byl pozorován v případě aplikace 24 h před provedením chirurgické incise, kdy došlo k téměř úplnému zablokování rozvoje pooperační mechanické alodynie. Tento efekt kapsaicinu na mechanosenzitivitu plně korespondoval s jeho účinkem na termální senzitivitu a s rozvojem termální hypoalgie u experimentálních zvířat ovlivněných kapsaicinem před provedením plantární incise, nebo u skupiny zvířat, kterým po aplikaci kapsaicinu incise vytvořena nebyla. Lze předpokládat, že mechanismus účinku kapsaicinu skutečně spočíval ve funkční, případně morfologické inaktivaci periferních nervových zakončení exprimujících TRPV1 receptory, která byla demonstrována v řadě studií. (62, 89, 219, 265)

Další část studie jasně prokázala aktivaci a centrální senzitivizaci míšních neuronů chirurgickou incisí pomocí exprese c – Fos v zadních rožích lumbální míchy imunohistochemickou metodou a potvrdila efekt předoperačně aplikovaného kapsaicinu na její rozvoj. U zvířat předoperačně ovlivněných kapsaicinem byl počet neuronů vykazujících Fos imunopozitivitu v obou zadních rožích míchy 2 h po chirurgickém zákroku v porovnání s kontrolními výrazně redukován. Dále se ukázalo, že samotná intradermální injekce kapsaicinu bez následné plantární incise nezpůsobí nárůst exprese c – Fos v neuronech zadních rohů lumbální míchy 24 h po její aplikaci. V souladu s výsledky předchozí části studie, kdy v behaviorálních pokusech s aplikací kapsaicinu 2 h po provedení incise nedošlo k úplnému zablokování pooperační alodynie a hyperalgie, je zřejmé, že za 2 h po chirurgickém zákroku dojde v důsledku chirurgického traumatu k rozvoji centrální senzitivizace míšních neuronů. Předoperační aplikací kapsaicinu lze tento rozvoj ovlivnit, neboť kapsaicin svým účinkem selektivně zablokoval aktivaci periferních neurálních zakončení chirurgickou

incisi a následnou nociceptivní aferentaci z místa traumatu, tedy dva hlavní heterosynaptické mechanismy jejího vzniku. (145)

Behaviorální i imunohistochemické metody spolehlivě prokázaly klíčovou roli kapsaicin – senzitivních nociceptivních vláken v rozvoji pooperační mechanické alodynie a tepelné i mechanické hyperalgie. Specifický antagonist na kapsaicinových TRPV1 receptorech aplikovaný intratekálně výrazně ovlivnil termosenzitivitu intaktní kůže planty pedis ve smyslu hypoalgie a navíc úplně zablokoval rozvoj pooperační tepelné hyperalgie. Jeho účinek byl závislý na použité koncentraci a dokazuje významnou úlohu centrálních TRPV1 receptorů exprimovaných na centrálních zakončených kapsaicin – senzitivních neuronů v termosenzitivitě i v rozvoji pooperační tepelné hyperalgie. V případě intradermální aplikace TRPV1 antagonisty do místa incise byl jeho účinek na tyto bolestivé stavy méně potentní. Efekt TRPV1 antagonisty na mechanosenzitivitu a pooperační mechanickou alodynii a hyperalgiu byl v porovnání s termosenzitivitou podstatně slabší, a to v případě intratekální i lokální aplikace, což naznačuje existenci oddělených neurálních mechanismů vzniku mechanické a tepelné hyperalgie.

TRPV1 receptory exprimované na centrálních výběžcích kapsaicin – senzitivních nociceptorů hrají podle výsledků našich pokusů významnou úlohu v termosenzitivitě i v rozvoji pooperační tepelné hyperalgie. Látky, o kterých se předpokládá, že jsou hlavními endogenními agonisty TRPV1 receptoru, jsou však poměrně slabě účinné a jejich koncentrace v míše je navíc za fyziologických podmínek nízká. (61, 279) Samotný endogenní agonista TRPV1 receptorů aplikovaný intratekálně neovlivnil reaktivitu zvířat na tepelné podněty. Avšak v případě, že byly centrální TRPV1 předem senzitivizovány bradykininem, došlo po aplikaci TRPV1 agonisty zcela evidentně k rozvoji přechodné hypersenzitivity na tepelné i mechanické podněty u těchto experimentálních zvířat. Podle těchto zjištění se tedy endogenní TRPV1 agonisté mohou uplatnit jako aktivátory centrálních TRPV1 receptorů, a to v podmínkách zánětu nebo tkáňového poranění, protože se za těchto okolností jejich koncentrace v tkáni výrazně zvýší, a navíc dochází v důsledku působení zánětlivých mediátorů rovněž k senzitivizaci TRPV1 receptorů k působícím podnětům. (304) Je velmi pravděpodobné, že se centrální TRPV1 receptory podílí právě tímto mechanismem také na rozvoji pooperační bolesti.

5.2. Účinky lokálních anestetik na bolest chirurgického původu (86)

Hlavním cílem pilotní studie bylo vytvořit klinicky relevantní zvířecí model pooperační bolesti po incisi na ochlupené kůži. Na našem modelu incise kůže hřbetu potkana byla spolehlivě prokázána přítomnost pooperační mechanické alodynie i hyperalgie, přesně kvantifikovatelná, prostorově rozlišitelná na primární a sekundární, reprodukovatelná s velkou přesností z hlediska intenzity i časového průběhu. Odlišit alodynii od hyperalgie umožnilo testování odpovědi na mechanické podněty pomocí Von Freyových vláken různé síly, působících silami různých intenzit. Také pozorování, že bupivakain selektivně ovlivnil průběh alodynie bez výraznějšího efektu na hyperalgiu, umožnilo odlišit tyto dva patologické bolestivé stavy a naznačilo existenci oddělených neurálních mechanismů jejich vzniku. Model incise kůže hřbetu se v několika ohledech liší od nejčastěji používaného zvířecího modelu pooperační bolesti, modelu plantární incise. (32, 331) Tento zvířecí model pooperační bolesti po incisi na hladké neochlupené kůži planty pedis se od předešlého liší zejména z kvantitativního hlediska. Odpovědi zvířat na mechanické podněty aplikované na kůži hřbetu v blízkosti chirurgické rány zůstávají zvýšené téměř 2 týdny po provedení tohoto zákroku, což je přibližně dvakrát déle než u modelu plantární incise. Sekundární mechanická alodynie a hyperalgie jsou rovněž výrazněji vyjádřeny v okolí incise kůže hřbetu v porovnání s plantou

pedis. Práh pro vnímání mechanických podnětů je na ochlupené kůži podstatně nižší než na kůži hladké, a to jak při stimulaci intaktní kůže, tak po provedení chirurgické incise. Tyto rozdíly jsou pravděpodobně dány různou anatomickou strukturou (zejména tloušťkou) a uspořádáním inervace kůže těchto dvou lokalit. Ochlupená kůže hřbetu se od hladké kůže liší i vaskulární odpovědí na případné poranění. Podstatou tohoto rozdílu jsou změny v uvolňování vazoaktivních regulačních peptidů, které jsou zároveň potentními algogeny. (241)

Inhibice iniciálního senzitivizujícího impulsu prostřednictvím blokády nociceptivní aferentace, přenosu nervových vzruchů, nebo neurotransmise v míše by teoreticky měla zabránit rozvoji kaskády dějů ovlivňujících neuronální plasticitu v zadních rozích míchy, která je podstatou centrální senzitivizace. Několik studií prokázalo, že plantární incise senzitivizuje neurony zadních rohů míchy na minimálně 1 h, a to jak nociceptivní specifické míšní neurony s vysokým prahem pro mechanické podněty, tak nízkoprahové WDR neurony, které dostávají aferentaci z jak z nociceptivních tak i z mechanoceptivních vláken. Nicméně, při stimulaci slabými Von Freyovými vlákny, o intenzitách blízkých pooperační prahové hodnotě pro mechanický podnět, bylo v těchto pokusech možné vyvolat odpověď pouze spinálních WDR neuronů. (293, 330) Tato neuronální aktivita pravděpodobně odpovídá pooperační mechanické alodynii. Podle našich výsledků došlo účinkem bupivakainu k selektivní supresi pooperační alodynii (zejména sekundární), ne hyperalgie, takže je pravděpodobné, že bupivakain selektivně působí na neurální procesy senzitivizující míšní WDR neurony.

Bupivakain byl v našich pokusech injikován 30 minut před provedením incise, ale jeho lokální účinek i systémová plazmatická koncentrace stoupají ještě několik hodin po aplikaci. Není proto možné určit, kdy přesně bupivakain účinkuje a které neuronální procesy ovlivňuje. Může blokovat iniciální nociceptivní aferentaci z poraněných nervových zakončení v místě incise nebo jejich periferní senzitivizaci, případně aktivaci a senzitivizaci intaktních nervových zakončení různými tkáňovými mediátory uvolňovanými neurony a buňkami imunitního systému v bezprostřední blízkosti místa poranění, svým systémovým účinkem může bupivakain blokovat i procesy centrální senzitivizace v somatech neuronů CNS. Výsledky těchto pokusů tudíž nedemonstrují účinky bupivakainu, které by bylo možné nazvat výhradně *preemptivními*.

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

Při stimulaci senzitivního 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. Aktivace způsobí uvolnění glutamátu a neuropeptidů (substance P, CGRP, neurokinin A) z jeho periferních i centrálních výběžků a tím je umožněn přenos nociceptivní informace. Fáze aktivace je pak následována refrakterní periodou, během které se nociceptor stává resistantní k dalšímu působení kapsaicinu a jiným bolestivým podnětům. V rámci této kapsaicinem evokované desenzitivizace můžeme rozlišit klasickou farmakologickou desenzitivizaci, kdy prodloužené působení nebo opakovaná aplikace kapsaicinu o nízké koncentraci vede k progresivnímu snižování odpovědi neuronu na další stimulaci kapsaicinem, a funkční desenzitivizaci, kdy expozice nervového vlákna kapsaicinu o vysoké koncentraci vede ke snížení nebo ztrátě citlivosti nejen na kapsaicin, ale i na podněty jiných modalit. (60, 85) Hlavním podkladem farmakologické i funkční desenzitivizace je vzestup intracelulární koncentrace kalcia způsobený kapsaicinem. Ten aktivuje enzym kalcineurin,

který způsobí defosforylaci kapsaicinového iontového kanálu, jehož aktivita se v důsledku kalcium-dependentní defosforylace výrazně sníží. (60, 174, 326) Vysokokonzentrovány kapsaicin má v konečném důsledku svého působení neurotoxické účinky na kapsaicin – senzitivní neurony provázené morfologickými změnami, od lehkého zduření axonálního zakončení až po kompletní destrukci nociceptivních zakončení, případně degeneraci neuronu. Neuronální destrukce vyvolaná kapsaicinem je částečně osmotického původu a částečně mechanismem kalcium-senzitivních proteáz aktivovaných intracelulárním influxem iontů kalcia. Rozsah těchto účinků závisí *in vivo* na druhu a stáří organismu, době působení, způsobu aplikace a na celkové dávce kapsaicinu. (316) Po systémovém podání vysoké dávky kapsaicinu novorozným myším nebo krysám dojde k úplné selektivní degeneraci kapsaicin senzitivních nervových zakončení a k trvalé ztrátě více než 80% těl sensorických neuronů o malém průměru. (141) Po lokální aplikaci jsou poškozené axony schopny regenerace z jejich z proximálních částí, protože somata jejich neuronů v tomto případě přežívají. (315)

Pooperační změny odpovědi zvířat na mechanické a tepelné podněty, testované v našich experimentech, podléhaly dvěma různým vlivům. Periferní senzitivizace primárních aferentních vláken chirurgickou incisí, případně centrální senzitivizace, způsobila zvýšení reaktivity zvířat na testované podněty. Naproti tomu funkční inaktivace kapsaicin – senzitivních aferentních neuronů působením kapsaicinu měla na pooperační odpovědi zcela opačný efekt, v jejím důsledku došlo ke snížení citlivosti zvířat na mechanické a tepelné podněty. Důkazem je prodloužený účinek intradermálně aplikovaného kapsaicinu u zvířat, kterým po jeho aplikaci nebyla vytvořena plantární incise. U těchto zvířat přetrvával až 10 dní, zatímco reaktivita zvířat po plantární incisí se vrátila na bazální úroveň už za 6 dní po zákroku. Slabší účinek kapsaicinu aplikovaného 6 dní před chirurgickým zákrokem na pooperační mechanickou a tepelnou hyperlagézii i mechanickou alodynii lze vysvětlit postupnou regenerací funkce kapsaicin – senzitivních vláken. Při intradermální aplikaci vysoké dávky kapsaicinu dochází k inaktivaci, případně destrukci pouze periferních neurálních zakončení, somata těchto neuronů ovlivněna nejsou. Axony jsou tudíž schopny rychlé funkční i morfologické regenerace. U skupiny zvířat, kterým byl kapsaicin aplikován 2 h po provedení plantární incise, bylo možné pozorovat jeho analgetický účinek už 2 h po injekci. Nicméně, v dalším časovém průběhu tohoto experimentu jeho efekt nedosáhl takové úrovně, jako v pokusech, kdy byl kapsaicin aplikován 24 h před zákrokem. Časový interval od provedení chirurgického zákroku do funkční eliminace kapsaicin – senzitivních zakončení injekcí kapsaicinu 2 h poté byl pravděpodobně dostatečný k tomu, aby mohlo dojít k rozvoji změn ve smyslu centrální senzitivizace na úrovni míchy. V důsledku centrální senzitivizace míšních neuronů se analgetický účinek pooperačně aplikovaného kapsaicinu nemohl uplatnit v plném rozsahu. Význam iniciální nociceptivní aferentace způsobené chirurgickým traumatem pro centrální změny byl demonstrován například ve studii (278), kdy krátkodobé ovlivnění lokálním anestetikemablokovalo expresi c – Fos v jádrech spinálních neuronů. V důsledku krátkodobého účinku lokálního anestetika však nebyl ovlivněn rozvoj behaviorálních změn reaktivity těchto zvířat na testované podněty.

Lokálně aplikovaný kapsaicin ve vysoké koncentraci je velmi účinný k indukci degenerace epidermálních nervových zakončení a následné hypoalgie také u lidí. (185, 219, 265) Jeho efekt je přímo závislý na koncentraci, které dosáhne po aplikaci v bezprostřední blízkosti kapsaicin – senzitivního vlákna exprimujícího TRPV1 receptory. Záleží tedy jednak na způsobu aplikace a také na koncentraci kapsaicinu v použitém roztoku. Intradermální injekce 2 µg kapsaicinu eliminovala v místě aplikace téměř veškerá epidermální nervová zakončení lidské kůže a zároveň způsobila výrazné snížení citlivosti na tepelné podněty. (265) V našich pokusech na potkanech se jevila jako velmi účinná použitá dávka 1,5 mg. Po srovnání s omezeným účinkem kapsaicinu na lidskou kůži při použití nižší koncentrace (265)

lze předpokládat, že vysoká koncentrace kapsaicinu v bolusu injekčního roztoku zvětší vzdálenost difúze kapsaicinu v efektivní koncentraci z místa aplikace do okolních tkání.

Abychom obešli celou řadu vnitřních i vnějších faktorů ovlivňujících penetraci topicky aplikovaného kapsaicinu do plantární kůže potkana a vyhnuli se problematice související s jeho biologickou dostupností i technickým provedením aplikace, byla v této studii k aplikaci roztoku kapsaicinu použita intradermální injekce. I když je velmi pravděpodobné, že stejného účinku by bylo možné dosáhnout při použití kapsaicinové masti, nelze vyloučit, že v případě intradermální injekce je efekt kapsaicinu výrazněji vyjádřen. Intradermálně injikovaný kapsaicin pronikne pravděpodobně snáze v efektivní koncentraci do hlubších tkání, jako je fascie a sval, které hrají u modelu plantární incise velmi důležitou roli. (32) Rozdíly v účinku topicky aplikovaného kapsaicinu, způsobené pravděpodobně různými složením nosných substancí použitých mastí a tudíž různou mírou penetrace kapsaicinu do kůže, byly demonstrovány ve studii, kdy topická aplikace 5% kapsaicinu neměla analgetický účinek, zatímco intrakutánní injekce 0,1% roztoku způsobila hyposenzitivitu k tepelným podnětům. (44) Jiná studie prokázala analgetický účinek při opakované aplikaci 1% kapsaicinové masti. (328) Lokální aplikace kapsaicinu je v klinické praxi často používána k léčbě nejružnějších bolestivých stavů. Je však pacienty špatně tolerována z důvodu bolestivosti v iniciální fázi jeho účinku. Navíc, potřebného efektu je dosaženo pouze při opakované aplikaci po dobu několika týdnů, často vážně spolupráce pacientů. (224) Lokální anestézie kůže místním anestetikem před jednorázovou aplikací vysoké dávky kapsaicinu by mohlo být účinným řešením tohoto problému. Není však zcela objasněno, jestli by v takovém případě zůstal analgetický účinek kapsaicinu stejný, nebo jestli by byl působením lokálního anestetika nějak ovlivněn. Podle výsledků našich pokusů by lokálně aplikovaný kapsaicin mohl být účinnou látkou také k ovlivnění pooperační bolesti, představující v porovnání s lokálními anestetiky řadu výhod. Jeho účinek je na rozdíl od lokálních anestetik selektivní a přetrvává delší dobu, navíc, nervový přenos informací ostatních senzoričkových modalit není působením kapsaicinu ovlivněna.

5.4. Senzitizace míšních neuronů chirurgickou incisí a její ovlivnění lokálně aplikovaným kapsaicinem ve vysoké koncentraci

Jedna skupina mechanismů centrální senzitizace je závislá na neuronální vzrušovací aktivitě a uplatňuje se okamžitě po působení stimulu, druhá závisí na transkripci a představuje mechanismy s pozdním nástupem účinku. (145) Iniciální aktivace periferních zakončení nociceptorů intenzivním bolestivým podnětem spojeným s tkáňovým poraněním hraje rozhodující roli. Intenzivní aferentace z místa traumatu způsobí facilitaci synaptického přenosu v zadních rozcích míchy, která je důsledkem aktivace celé řady intracelulárních signálních drah v míšních neuronech působením neurotransmiterů jako jsou glutamát, SP, BDNF (brain-derived neurotrophic factor), ephrin-B ligandy a aktivací jejich receptorů (ionotropní i metabotropní glutamátové receptory spřažené s G-proteiny, NK₁ receptory a tyrosinkinázové receptory trkB a Eph), které jsou na tyto intracelulární signální kaskády napojeny. Vedou ke zvýšení efektivity synaptického přenosu jednak změnou aktivity iontových kanálů a receptorů mechanismem posttranslačních úprav jejich strukturních proteinů (zejména fosforylace intracelulárními kinázami), a rovněž zvýšeným transportem receptorů na membránu. (319, 320) Kromě tohoto heterosynaptického mechanismu hrají v časné fázi centrální senzitizace významnou úlohu také homosynaptické mechanismy facilitace vyvolané sérií vzruchů o nízké (wind – up) nebo vysoké frekvenci (LTP). U skupiny zvířat, kterým byl kapsaicin aplikován 2 h po provedení plantární incise, nedošlo k tak účinnému ovlivnění pooperační hyperalgie a alodynii, jako v pokusech, kdy byl kapsaicin

aplikován 24 h před zákrokem. V časovém intervalu mezi provedením chirurgického zákroku a funkční eliminací kapsaicin – senzitivních zakončení kapsaicinem se pravděpodobně uplatnily časné mechanismy centrální senzitivizace závislé na zvýšené vzruchové aktivitě nociceptorů. V jejich důsledku došlo k neuronálním změnám způsobujícím facilitaci synaptického přenosu v zadních rozích míchy, analgetický účinek kapsaicinu se proto v případě pooperační aplikace nemohl uplatnit v plném rozsahu.

Zvýšená vzruchová aktivita nociceptorů v terénu tkáňového poranění nebo zánětu může způsobit i dlouhodobé změny efektivity synaptického přenosu v zadních rozích míchy. Týkají se transkripce genů kódujících zejména proteiny zodpovědné za příjem, vedení a synaptický přenos vzruchu a jejich výsledkem jsou potom změny excitability a vodivých vlastností, v některých případech až změna fenotypu neuronu. (320) V důsledku intenzivní bolestivé aferentace dochází k aktivaci především ERK-CREB signální kaskády, která v neuronálním jádře ovlivňuje expresi řady důležitých genů (143, 144, 247), v časné fázi je touto cestou indukován například gen kódující transkripční faktor c-Fos. (128) Expresce c - Fos a jeho následné vazba na jadernou DNA pak vede k dalším změnám v genové expresi neuronů zadních rohů míchy, které se týkají především transkripce a neuronální exprese řady neuropeptidů a proteinů, a jsou zároveň přímým obrazem aktivace těchto neuronů přicházející nociceptivní aferentací. Expresce c – Fos je funkční marker sloužící k identifikaci neuronů centrálního nervového systému aktivovaných nociceptivním podnětem. V našich pokusech jsme využili tohoto markeru k objektivnímu ověření centrální senzitivizace míšních neuronů chirurgickou incí. Stejně jako několik dalších studií, například na experimentálním zvířecím modelu pooperační bolesti (278) nebo artritidy (2, 3), 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 24 před provedením zákroku, byl nárůst exprese c – Fos v zadních rozích míchy výrazně oslaben, což dokazuje zablokování procesů centrální senzitivizace v míšních neuronech účinkem kapsaicinu. Toto zjištění plně koresponduje s výsledky behaviorálních pokusů první části naší studie, kdy kapsaicin aplikovaný intradermálně 24 h před provedením plantární incise zcela zabránil rozvoji pooperační tepelné hyperalgie a výrazně oslabil průběh pooperační mechanické alodynie i hyperalgie, pravděpodobně mechanismem inaktivace až destrukce kapsaicin-senzitivních neuronálních zakončení s následnou blokadou nociceptivní aferentace z místa incise.

V neuronech zadních rohů míchy bylo prokázáno výrazné zvýšení c – Fos mRNA již několik minut po periferní stimulaci nociceptivním podnětem, hladina c - Fos mRNA dosahuje maxima přibližně za 30 – 40 minut. Po 1 – 2 h transkripce lze v těchto neuronech spolehlivě detekovat proteinový produkt Fos, jeho akumulace je v jádře neuronu nejvyšší asi 2 hodiny po indukci transkripce. (128) Na podkladě těchto zjištění byla v našich pokusech sledována expresce c – Fos právě 2 h po působení nociceptivního podnětu. Dosažené výsledky plně odpovídají behaviorálním pokusům, kdy v případě aplikace kapsaicinu 2 h po chirurgickém zákroku nedošlo k tak výraznému ovlivnění pooperační hyperalgie a alodynie, jako u zvířat ovlivněných kapsaicinem předoperačně. Nárůst exprese c – Fos v neuronech zadních rohů míchy 2 h po provedení incise potvrzuje rozvoj centrální senzitivizace 2 h po působení tohoto inzultu. V jejím důsledku dojde k facilitaci synaptického přenosu v zadních rozích míchy dřív, než se může uplatnit analgetický efekt pooperačně aplikovaného kapsaicinu, který by zabránil vzniku těchto bolestivých stavů.

Za 2 h po provedení chirurgické incise na plantě pedis byl jasně pozorován nárůst exprese c – Fos v jádrech spinálních neuronů, a to nejen v zadních rozích lumbální míchy na straně operované končetiny, ale rovněž v zadních rozích kontralaterálních. Asynchronická aktivace velkého množství periferních zakončení nociceptorů intenzivním bolestivým podnětem nebo

tkáňovým poraněním způsobí facilitaci synaptického přenosu velkého množství různých neuronů zadních rohů míchy. Naše zjištění lze vysvětlit anatomickým uspořádáním centrálních zakončení primárních aferentních neuronů, které na kontralaterální stranu mohou vysílat své kolaterály. (312)

V řadě prací bylo spolehlivě prokázáno, že je c - Fos v buňkách centrálního nervového systému exprimován jako odpověď na stimulaci specifickým typem podnětu. V neuronech míchy je indukován zejména nociceptivními podněty, a to tepelnými, mechanickými i chemickými. (128) Chemická látka kapsaicin je svým excitačním účinkem na nociceptivní neurony v iniciální fázi svého působení sama o sobě potentním algogenem. (315) Zůstalo tedy otázkou, jak ovlivní samotná intradermální injekce kapsaicinu expresi c - Fos v neuronech zadních rohů míchy, bez následné nociceptivní stimulace plantární incisí. 26 h po intradermální aplikaci vysoké dávky kapsaicinu zvířatům, kterým nebyla vytvořena chirurgická incise na plantě pedis, (ve stejném čase po injekci jako u zvířat po chirurgickém zákroku), nebyl podle našich výsledků zjištěn významný nárůst exprese c - Fos v neuronech zadních rohů jejich míchy ani na straně injekce, ani na straně kontralaterální. Lze tedy předpokládat, že 26 h po aplikaci kapsaicinu ve vysoké koncentraci je plně rozvinut jeho desenzitizační, analgetický účinek a toto zjištění je v souladu s výsledky behaviorální části naší studie, které dále potvrzuje.

Preemptivní přístup v léčbě bolesti je v posledních letech často diskutován. Tkáňové poranění organismu vede totiž k rozvoji centrální senzitivace v důsledku intenzivní nociceptivní aferentace z poškozené tkáně a tato aferentace pokračuje i po skončení působení nociceptivního podnětu, který poranění způsobil. (145, 260, 320, 321) Preemptivní způsob léčby by tedy mohl být velmi efektivním ve snaze ovlivnit právě bolest chirurgického původu, neboť centrální senzitivaci nociceptivního systému vznikající v důsledku tkáňového poranění operačním zákrokem a následnému rozvoji patologických bolestivých stavů lze účinně zabránit plánovanou předoperační aplikací farmak. Nejčastěji jsou k tomuto účelu používána lokální anestetika, která kompletně blokují neurální transmissi z místa poranění. Na zvířecím modelu plantární incisí bylo prokázáno, že předoperační aplikace lidokainu nebo bupivakainu sice zabránil nárůstu exprese c - Fos v neuronech zadních rohů míchy, nicméně mechanosenzitivita zvířat je tímto způsobem ovlivněna jen na omezenou dobu, danou biologickým poločasem použitého lokálního anestetika. (278) Podobné výsledky přinesla studie na zvířecím modelu incisí hřbetu, kdy předoperačně aplikovaný bupivakain do místa incisí oslabil rozvoj pooperační mechanické alodynie. (86) Mechanismus účinku lokálně aplikovaného kapsaicinu ve vysoké koncentraci je však úplně jiný než mechanismus působení lokálních anestetik. Místní anestetika zablokují veškerý neurální přenos periferními aferentními vlákny jen krátkodobě, pokud nejsou podávána opakovaně nebo kontinuálně. Naproti tomu vysoká dávka kapsaicinu účinkuje selektivně na vlákna exprimující kapsaicinové TRPV1 receptory, které vyřadí z funkce. Jeho účinek přetrvává několik dní, než dojde opět k regeneraci těchto epidermálních zakončení a obnovení jejich funkce. (271) Protože výsledky našich pokusů navíc prokázaly rozhodující úlohu právě primárních aferentních vláken exprimujících TRPV1 receptory v rozvoji pooperační bolesti, je zřejmé, že selektivní ovlivnění jejich funkce vysokou dávkou kapsaicinu představuje účinnější způsob pooperační analgesie než aplikace lokálních anestetik.

Po integraci v zadních rozích míchy je nociceptivní informace přenášena projekčními neurony cestou přímých nebo nepřímých ascendentních drah do vyšších center CNS. Tractus spinothalamicus (STT), projikující přímo bez interpulace do vyšších cerebrálních struktur, je jednou z nejdůležitějších nervových drah účastnících se nocicepce vůbec. Neurony ventrální části STT jsou koncentrovány především v marginální zóně (lamina I), v nucleus proprius, v oblasti baze zadních rohů a v lamina VII šedé hmoty míchy a jejich axony probíhají ascendentně cestou ventrolaterálního provazce, axony dorsálně segregovaných STT neuronů,

především z lamina I, využívají dorsolaterální provazec bílé hmoty míchy. (26, 312) Ventrální STT vstupuje primárně do VPL/VPM thalamu a dorsální STT inervuje zejména VPI thalamu. (13, 27, 90) VPL, VPM a komplex zadních thalamických jader poskytují dále intenzivní aferentaci primární somatosenzorické kůře S I, ventrokaudální jádra mediálního thalamu pak sekundární somatosenzorické kůře S II. Lze tedy rozlišit ventrální STT – VPL/VPM – SI a dorsální STT – VPI/VMpo – SII části spinothalamické ascendentní nociceptivní dráhy, přičemž ventrální hraje roli především v senzorio – diskriminační, zatímco dorsální v afektivně – kognitivní složce bolestivého vjemu. (13, 38, 68, 168) Abychom ověřili, že se exprese c – Fos v lumbální míše skutečně týká neuronů účastnících se nocicepce, byly v našich pokusech retrográdně značeny neurony STT traktu, tj. hlavní dráhy nocicepce, pomocí injekce barviva do oblasti ventrobazálního komplexu jader thalamu. Místo aplikace barviva bylo vždy mikroskopicky ověřeno na histologickém řezu z mozkové tkáně. Označené neurony se nacházely především v nucleus proprius, v oblasti baze zadních rohů, v lamina VII a rovněž v marginální zóně (lamina I) šedé hmoty lumbální míchy, což přesně odpovídá lokalizaci neuronů ventrální části STT. V jejich jádrech pak byla sledována přítomnost Fos s předpokladem, že se jedná o neurony přímo se účastnící nocicepce. Plantární incise indukovala v našich pokusech zcela evidentně expresi c – Fos v jádrech STT neuronů zadních rohů lumbální míchy, což spolehlivě dokazuje jejich aktivaci tímto nociceptivním podnětem. Kapsaicin aplikovaný intradermálně do místa incise 24 h před provedením zákroku pak expresi c – Fos v STT neuronech lumbální míchy účinně zablokoval, tedy zabránil rozvoji jejich senzitivizace.

Zadní míšní provazce obsahují vzestupné větve primárních aferentních neuronů patřících k lemniskárnímu systému, jedné z nepřímých drah nocicepce, a dále ascendentní projekce neuronů druhého řádu nacházejících se v zadním rohu šedé hmoty míchy. Tato „postsynaptická dráha zadních provazců“ (PSDC) má původ v neuronech lokalizovaných v nucleus proprius (lamina III nebo IV, ventrálně od substantia gelatinosa) a v lamina V a VI šedé hmoty míchy. PSDC neurony odpovídají na bolestivou i nebolestivou mechanickou stimulaci, na nociceptivní tepelné podněty, některé PSDC neurony jsou aktivovány nociceptivními podněty viscerálními. V případě jejich senzitivizace v důsledku tkáňového poranění se PSDC neurony původně nereagující na tepelný podnět mohou stát termosenzitivními. PSDC je jednou z hlavních senzoriockých drah vůbec a významně přispívá k mechanické a termální nocicepci. (314) Na zvířecích experimentálních modelech byla prokázána exprese c – Fos v jádrech PSDC neuronů po stimulaci nociceptivním mechanickým podnětem, po intradermální injekci kapsaicinu i po nociceptivní stimulaci viscerální. Lze předpokládat, že se PSDC uplatňují i v mechanismech neuropatické bolesti, neboť přerušení zadních provazců zabránilo rozvoji jejich symptomů na zvířecím modelu periferní neuropatie. Nicméně, po stimulaci experimentálních zvířat s periferní neuropatií mechanickým podnětem nebyla prokázána indukce exprese c – Fos v jádrech PSDC neuronů zadních rohů míchy. Zajímalo nás, jestli jsou i tyto PSDC neurony senzitivizovány chirurgickou incisí a účastní se rozvoje pooperační mechanické alodynii a mechanické i tepelné hyperalgie u zvířecího modelu plantární incise. Injekcí barviva do nucleus gracilis byly tyto PSDC neurony nejprve retrográdně označeny a vizualizovány v míše, 2 h po provedení plantární incise pak byly hodnoceny z hlediska přítomnosti Fos v jádrech. Největší počet označených neuronů byl po injekci barviva do nucleus gracilis pozorován v nucleus proprius, dále pak v lamina III a IV šedé hmoty míchy. Tyto lokalizace odpovídají místům původu PSDC. 2 h po provedení plantární incise byla v našich pokusech jasně pozorována přítomnost Fos imunoreaktivity v jádrech PSDC neuronů zadních rohů lumbální míchy. Tyto výsledky přesvědčivě dokázaly, že se PSDC neurony účastní nocicepce u zvířecího modelu pooperační bolesti, modelu plantární incise, a jsou chirurgickou incisí planty pedis senzitivizovány. Hrají tím pádem významnou úlohu v rozvoji pooperační mechanické alodynii a mechanické i tepelné

hyperalgie. Účinkem kapsaicinu intradermálně aplikovaného do místa incise 24 h před provedením tohoto zákroku došlo k zablokování nárůstu exprese c – Fos jak v STT, tak i v PSDC neuronech, což bylo v souladu s našim předpokladem a dále potvrdilo důležitou roli PSDC v nocicepci po operačním zákroku a v rozvoji pooperačních bolestivých stavů. 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.

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

Výsledky našich pokusů prokázaly klíčovou úlohu periferních kapsaicin – senzitivních nervových zakončení v rozvoji pooperační bolesti na zvířecím modelu plantární incise. Intradermálně aplikovaný kapsaicin ve vysoké koncentraci měl silný analgetický účinek na pooperační mechanickou alodynii i mechanickou a tepelnou hyperalgezi, maximálního účinku bylo dosaženo v případě jeho intradermální aplikace 24 h před provedením chirurgického zákroku. Podstatou tohoto analgetického efektu byla s největší pravděpodobností funkční eliminace periferních nociceptivních zakončení, případně jejich morfologická destrukce působením kapsaicinu ve vysoké koncentraci. Nedořešenou otázkou však zůstává úloha specifických kapsaicinových TRPV1 receptorů v tomto druhu bolesti. Abychom ověřili jejich roli a zjistili, jestli by farmakologické ovlivnění jejich funkce mělo analgetický účinek podobný kapsaicinu, použili jsme v následujících pokusech k ovlivnění pooperační bolesti specifického antagonistu na TRPV1 receptorech.

Rada preklinických studií prokázala vysokou efektivitu různých TRPV1 antagonistů na termální i mechanickou hyperalgezi u zvířecích modelů bolesti zánětlivého nebo neuropatického původu a ukázala tak jeden z možných způsobů strategie farmakologického ovlivnění těchto bolestivých stavů. (104, 302) Specifický TRPV1 antagonist by mohl přinést určité výhody v léčbě pooperační bolesti oproti kapsaicinu. Topická aplikace kapsaicinu je jednak špatně tolerována z důvodu bolestivosti v iniciální fázi jeho účinku a dostatečného efektu je v případě použití kapsaicinové masti dosaženo pouze při její opakované aplikaci po dobu několika týdnů. (224) Navíc je lokálně aplikovaný kapsaicin ve vysoké koncentraci neurotoxický, indukuje morfologickou degeneraci epidermálních nervových zakončení a následnou hypoalgezi. I když byla prokázána regenerace axonů větvíci se výrůstky, zůstává otázkou, jestli se plně regeneruje i jejich funkce a jestli senzitivita na mechanické a tepelné podněty zůstane po lokální léčbě kapsaicinem ve vysoké koncentraci neovlivněna. (185, 219, 265) V několika studiích byl prokázán také negativní vliv lokálně aplikovaného kapsaicinu na hojení rány. (103, 303)

Nejčastěji používaný kompetitivní TRPV1 antagonist, capsazepin, není úplně selektivní na TRPV1 receptory a v podmínkách *in vivo* nejeví výraznou efektivitu. Účinnost tohoto slabého antagonisty se liší u různých živočišných druhů a závisí na modalitě testovaného podnětu. Navíc v koncentraci, která je nutná k blokádě TRPV1 receptorů, inhibuje zároveň acetylcholinové receptory a napětově závislé kalciové kanály. (298, 302) Omezenou účinnost má i další TRPV1 antagonist, ruthenium red, anorganické barvivo blokující vstup kalcia do buněk. Je to neselektivní antagonist všech TRPV kanálů a svým účinkem ovlivňuje celou řadu dalších iontových kanálů a receptorů, inhibuje uvolňování transmiterů jako ACH nebo GABA. (119) V nedávné době bylo syntetizováno velké množství nejrůznějších nových TRPV1 antagonistů vykazujících přísnou selektivitu a vysokou účinnost. Patří mezi ně

například na arginin bohaté hexapeptidy a peptoidy (triméry N – alkyl glycinu), což jsou nekompetitivní blokátory póru TRPV1 kanálu se submikromolární aktivitou, nebo vaniloidní sloučeniny jako iodo – resiniferatoxin – nekompetitivní antagonist s velmi vysokou afinitou, který však vykazuje další nespecifické účinky, látka JYL1421 (derivát ury) a řada dalších. (126, 139, 295) Účinek jednoho z těchto nově syntetizovaných selektivních TRPV1 antagonistů, A – 425619 (sloučenina na bázi ury), byl testován *in vivo* na zvířecím modelu zánětlivé, neuropatické a rovněž pooperační bolesti. V této studii se systémově podávaný A - 425619 projevil jako velmi účinný k ovlivnění pooperační tepelné hyperalgie a jako částečně účinný na pooperační mechanickou alodynii. Na průběh hyperalgie zánětlivého původu byl jeho analgetický efekt rovněž významný, a to v případě systémové, lokální i intratekální aplikace. (126) Po detailní analýze farmakologických vlastností velkého množství těchto substancí byla podrobně charakterizována látka N-(3-methoxyphenyl)-4-chlorocinnamid (SB 366791), vysoce potentní a selektivní TRPV1 antagonist. Díky své schopnosti působit jako přísně selektivní TRPV1 antagonist při aktivaci TRPV1 podněty různých modalit (kapsaicinem, acidosou i vysokou teplotou), ověřené v řadě pokusů (118), představuje SB 366791 velmi vhodný nástroj k výzkumu fyziologie i molekulární farmakologie TRPV1 iontových kanálů. V našich pokusech byl SB 366791 použit k ověření úlohy TRPV1 receptorů v rozvoji pooperační bolesti a k ovlivnění pooperační mechanické alodynii a mechanické a tepelné hyperalgie na zvířecím modelu plantární incise.

Inhibice TRPV1 iontových kanálů působením SB 366791 se podle výsledků elektrofyziologických pokusů rozvine velmi rapidně, vykazuje napěťovou závislost a je jen pomalu reverzibilní. Tento rychlý nástup antagonismu byl prokázán elektrofyziologickou metodou terčíkového zámku, kdy byl influx kationů TRPV1 iontovým kanálem indukovaný kapsaicinem nebo acidosou kompletně zablokovan při současné aplikaci těchto agonistů s antagonistou SB 366791, bez předchozí inkubace. 1 μ M SB 366791 zablokoval aktivaci TRPV1 kapsaicinem nebo acidosou na disociovaných neuronech spinálních ganglií potkanů z více než 95%, stejná koncentrace SB 366791 inhibovala aktivaci TRPV1 vysokou teplotou z 84%. Inhibiční účinek SB 366791 na TRPV1 je tedy evidentně potencován v přítomnosti TRPV1 agonisty a pomalá reversibilita jeho antagonismu je způsobena vysokou afinitou SB 366791 k TRPV1 receptorům. (118) Protože se SB 366791 jeví jako kompetitivní TRPV1 antagonist, je velmi zvláštní, že inhibuje tyto receptory jak v případě aktivace chemickými (kapsaicin, acidosa), tak i fyzikálními podněty (vysoká teplota). Je známo, že se vazebné místo pro kapsaicin nachází na intracelulární straně TRPV1 receptoru (151, 297), naopak protony působí svým aktivačním účinkem na extracelulární stranu receptorového proteinu (284), aktivace působením tepla je způsobena mechanismem destabilizace póru TRPV1 receptoru představujícího iontový kanál. (98, 105) Mechanismus antagonismu SB 366791 při aktivaci TRPV1 těmito různými podněty lze vysvětlit dvěma způsoby. SB 366791 může jednak jako kompetitivní antagonist fyzicky blokovat vazebné místo TRPV1 pro kapsaicin, a to úplně nebo částečně. Obsazení tohoto vazebného místa pak brání aktivaci TRPV1 jinými podněty, protože dojde k ovlivnění mechanismu otevírání iontového kanálu. Další možností může být allosterický způsob inhibice TRPV1 účinkem SB 366791, nezávislý na přítomnosti agonisty. V takovém případě by se SB 366791 navázal na allosterické místo TRPV1 receptoru, vzdálené od vazebných míst pro kapsaicin a jiné agonisty, a inhiboval tak funkci celého TRPV1 receptoru jeho allosterickou modifikací nezávisle na způsobu aktivace. (118) V žádné studii nebyl dosud prokázán účinek SB 366791 na kterékoliv další iontové kanály, receptory spřažené s G – proteiny, enzymy nebo jiné proteiny.

Kapsaicinové TRPV1 receptory jsou exprimovány na membránách periferních i centrálních výběžků subpopulace sensorických neuronů specializovaných na detekci nepříjemných a bolestivých podnětů různých modalit, tepelných, mechanických i chemických. Jejich exprese je jednou z hlavních biologických vlastností charakterizujících

převážnou většinu nociceptivních senzoričkových neuronů patřících do skupiny C- i A δ -vláken. Periferní TRPV1 receptory slouží *in vivo* především k detekci tepelných podnětů, a to v rozsahu teplot, které u experimentálních zvířat i lidí vyvolávají bolest (43 – 52 °C). (98) Lokální snížení hodnoty pH (<6,8) vznikající například v okolí poraněné, zanícené nebo ischemické tkáně je dalším důležitým aktivátorem periferních TRPV1 receptorů *in vivo*, protony navíc fungují i jako endogenní a exogenní modulatory funkce TRPV1 receptorů. (284) Také endogenní látky vaniloidní povahy produkované zejména v prostředí poraněné nebo zanícené tkáně, podobné svojí chemickou strukturou kapsaicinu a často fungující jako druhé posly v intracelulárních signálních kaskádách (např. polynenasycené mastné kyseliny a jejich deriváty, jako kyselina arachidonová nebo kyselina linolenová, diacylglycerol, aj.), aktivují periferní TRPV1 receptory nebo modulují jejich citlivost na jiné podněty. (284, 335) Slabě kyselé extracelulární prostředí potencuje aktivaci TRPV1 tepelnými podněty a vaniloidy, silně kyselé podmínky aktivují TRPV1 kanál přímo. Vaniloidy a kyselé pH snižují práh TRPV1 pro tepelné podněty z bolestivých až na nebolestivé teploty. TRPV1 je tedy integrátorem fyzikálních a chemických bolestivých podnětů v pravém slova smyslu. (98) Protože jsou tkáňová poranění spojená se zanícením, infekcí a hypoxií provázená výlevem mediátorů zánětu i lokálním zvýšením kyselosti a teploty, má TRPV1 receptor díky své integrační schopnosti klíčový význam pro přínos informace o fyziologickém prostředí primárního aferentního vlákna a pro ovlivnění jeho excitability v tomto prostředí. Svojí funkcí detekovat a integrovat fyzikální i chemické podněty významně přispívá k periferním a pravděpodobně i k centrálním mechanismům zodpovědným za senzitivizaci nociceptoru v důsledku tkáňového poranění. Typickým příkladem je jeho úloha v rozvoji tepelné hyperalgie spojené se zánětem, která je důsledkem konvergentního působení tepla, nízkého pH a zánětlivých mediátorů na TRPV1 receptor.

Je více než pravděpodobné, že se periferní TRPV1 receptory významně uplatňují také v rozvoji bolestivých stavů způsobených chirurgickým zákrokem, neboť v jeho důsledku rovněž dochází k lokálnímu výlevu mediátorů zánětu a snížení pH. Výsledky předchozích pokusů navíc prokázaly klíčovou úlohu periferních kapsaicin – senzitivních nervových zakončení v rozvoji pooperační bolesti. Předpokládali jsme proto, že lokální aplikace TRPV1 antagonisty SB 366791 do místa incise bude mít na pooperační tepelnou i mechanickou hyperalgiu analgetický účinek. V našich experimentech lokálně aplikovaný SB 366791 skutečně významně oslabil průběh pooperační tepelné hyperalgie na zvířecím modelu plantární incise, zatímco jeho účinek na mechanickou pooperační alodynii a hyperalgiu byl jen velmi mírný. I když nelze vyloučit určitou míru vstřebávání a průnik tohoto TRPV1 antagonisty do systémového krevního řečiště po intradermální aplikaci do místa incise, bylo možné považovat jeho efekt za periferní, neboť penetrace SB 366791 do CNS je velmi obtížná. Naše zjištění jsou v souladu s výsledky studie Honore et al, 2005 (126), která na zvířecím modelu pooperační bolesti rovněž prokázala dobrou účinnost TRPV1 antagonisty A – 425619 na pooperační tepelnou hyperalgiu a méně výraznou na mechanickou alodynii, podobný minimální efekt na pooperační mechanickou alodynii byl demonstrován také na modelu plantární incise u experimentálních myší s delecí genu pro TRPV1. U těchto zvířat byl výrazně oslaben rozvoj pooperační tepelné hyperalgie, nárůst exprese c – Fos v jádrech neuronů zadních rohů míchy však v těchto experimentech zablokovan nebyl. (230) Podle výsledků všech těchto studií jsou účinky vysoké dávky kapsaicinu na pooperační tepelnou i mechanickou alodynii a hyperalgiu nadřazené účinkům TRPV1 antagonisty. Analgetický efekt lokálně aplikovaného kapsaicinu byl i v našich experimentech na zvířecím modelu plantární incise podstatně výraznější v porovnání s účinkem lokálně aplikovaného TRPV1 antagonisty. Tento rozdíl je možné vysvětlit různými mechanismy působení těchto dvou účinných látek. Lokálně aplikovaný TRPV1 antagonist pouze zablokuje periferní TRPV1 receptory. 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 úplné morfologické destrukci nociceptivního nervového zakončení, tedy k jeho úplnému vyřazení z funkce.

Zatímco je funkce periferních TRPV1 receptorů v současné době poměrně dobře objasněná a ověřená velkým množstvím různých studií, zůstává funkce centrálních TRPV1 stále velkou neznámou. Nedořešenou otázkou zůstává zejména způsob jejich aktivace. Je zřejmé, že se fyzikální podněty jako vysoká teplota (43 – 52 °C) nebo chemické podněty jako kapsaicin a acidosa svým aktivačním účinkem na TRPV1 receptory v míše za fyziologických okolností neuplatňují. Jako aktivátory centrálních TRPV1 receptorů přicházejí v úvahu endogenní látky vaniloidní povahy. Tyto lipidové substance podobné svojí chemickou strukturou kapsaicinu vyvolávají neselektivní kationtový proud působením specificky na TRPV1 receptory, avšak jsou výrazně slabšími agonisty než například kapsaicin a vyvolávají odpovědi s o něco pomalejší kinetikou. K efektivní aktivaci TRPV1 receptorů nebo modulaci jejich funkce je tudíž nutná jejich vysoká koncentrace a otázkou zůstává, jestli je v tkáních za fyziologických nebo případně patologických podmínek *in vivo* tak vysoké koncentrace dosaženo. Tyto polynenasycené mastné kyseliny a strukturně příbuzné metabolity jsou však produkovány za pomoci řady enzymů z membránových fosfolipidů, a tím je jejich přístup k receptorům na membráně té stejné nebo přilehlé buňky velmi snadný a efektivní. Navíc, v podmínkách tkáňové léze nebo zánětu mohou makrofágy a endotelie uvolňovat zvýšené množství těchto substancí do těsně omezeného mezibuněčného prostoru, takže jejich lokální koncentrace pravděpodobně může dosáhnout v těchto případech účinných hodnot. V poraněné nebo zanícené tkáni se jejich fyziologický význam navíc uplatňuje v kombinaci s dalšími aktivátory TRPV1 receptorů, například zvýšenou teplotou nebo zvýšenou koncentrací protonů. Lze tedy předpokládat, že se endogenní vaniloidy uplatňují jako aktivátory centrálních TRPV1 receptorů, a to zejména v podmínkách tkáňového poranění spojeného se zánětem, infekcí nebo ischemií. (284, 335)

Lokálně aplikovaný SB 366791 výrazně ovlivnil průběh pooperační tepelné hyperalgie a částečně i pooperační mechanické alodynii. Jeho analgetický účinek se však v tomto případě uplatnil výhradně na periférii a prokázal tak významnou úlohu pouze periferních TRPV1 receptorů v rozvoji pooperační bolesti na zvířecím modelu plantární incise. V těchto experimentech nedošlo k ovlivnění funkce centrálních TRPV1 receptorů exprimovaných na centrálních výběžcích primárních aferentních neuronů TRPV1 antagonistou. I když není úloha TRPV1 receptorů v míše dosud zcela objasněna, lze s velkou pravděpodobností předpokládat, že v podmínkách tkáňového poranění chirurgickým zákrokem dochází k ovlivnění jejich funkce různými modulatory, případně k jejich přímé aktivaci na úrovni míchy. Zajímalo nás, jakou úlohu hrají centrální TRPV1 receptory v rozvoji pooperační mechanické a tepelné hyperalgie na modelu plantární incise, a jak budou tyto bolestivé stavy ovlivněny blokadou centrálních TRPV1 receptorů pomocí intratekálně aplikovaného antagonisty. V našich pokusech došlo účinkem SB 36679 intratekálně aplikovaného 15 min před provedením plantární incise k úplnému zablokování rozvoje pooperační tepelné hyperalgie vznikající po provedení chirurgického zákroku na plantě pedis experimentálních zvířat. U těchto experimentálních zvířat se navíc rozvinula přechodná hyposenzitivita na tepelné podněty, a to nejen na operovaných, ale i na kontralaterálních končetinách. Naopak, průběh pooperační mechanické alodynii a hyperalgie byl po intratekální aplikaci TRPV1 antagonisty ovlivněn jen minimálně. V sérii pokusů na zvířatech, kterým plantární incise provedena nebyla, rovněž indukoval intratekálně aplikovaný SB 366791 rozvoj hyposenzitivity na tepelné podněty, zatímco jejich mechanosenzitivita ovlivněna nebyla.

I když v našich experimentech oslabil lokálně aplikovaný SB 366791 svým účinkem průběh pooperační tepelné hyperalgie a dokázal tak důležitou roli periferních TRPV1 receptorů v jejím rozvoji, k úplnému zablokování tohoto bolestivého stavu nedošlo. Naše zjištění lze vysvětlit skutečností, že i když 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 tímto specifickým antagonistou ovlivněny nejsou a zůstávají i nadále plně funkční. Celá řada z nich je rovněž schopna detekce tepelných podnětů (například další receptory z rodiny TRPV jako TRPV2, TRPV3 i TRPV4, dále VRL-1 receptory, atd.) (150), v prostředí tkáňového poranění navíc podléhá senzitivaci a může se tím pádem podílet na rozvoji hypersenzitivity na tepelné podněty i bez účasti TRPV1 receptorů. Naopak, intratekálně aplikovaný SB 366791 kompletně zablokoval v našich pokusech rozvoj pooperační tepelné hyperalgie a navíc způsobil rozvoj hyposenzitivity na termální podněty i na intaktních končetinách experimentálních zvířat. Podle těchto našich zjištění se úloha TRPV1 receptorů exprimovaných na centrálních výběžcích primárních nociceptivních neuronů v transmisi nociceptivní informace a zejména v rozvoji tepelné hyperalgie jeví jako zcela esenciální a nadřazená úloze periferních TRPV1. Experimentální blokáda centrálních TRPV1 receptorů intratekálně aplikovaným antagonistou zabrání jejich aktivaci, a tím i dalšímu neurálnímu přenosu informace o tepelném podnětu do vyšších center CNS. Tento 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 v porovnání s jeho lokálním podáním o tolik 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 na pooperační mechanickou alodynii a hyperalgiu lze v podstatě vysvětlit stejným způsobem, jako jeho omezený efekt na pooperační hyperalgiu termální. I když lokálně aplikovaný SB 366791 zablokuje periferní TRPV1 receptory, jejichž exprese bývá v terénu tkáňové léze často zvýšená (144, 147, 186), není schopen rozvoji pooperační hypersenzitivity na mechanické podněty zabránit. Mnoho dalších periferních receptorů účastnících se detekce mechanických podnětů (například, MDEG, ASIC2, TRPV4) (150) totiž působením SB 366791 ovlivněno není. Tyto receptory mohou i po jeho lokální aplikaci dále přijímat mechanické podněty, podléhat senzitivaci v prostřední tkáňového poranění a účastnit se tak rozvoje pooperační mechanické alodynii a hyperalgie. Intratekální aplikace SB 366791 zabrání aktivaci centrálních TRPV1 receptorů a dalšímu přenosu nociceptivní informace z těchto neuronů do vyšších center CNS, bez závislosti na modalitě periferního podnětu. Nicméně, pooperační hypersenzitivita na mechanické podněty v případě intratekálního podání SB 366791 byla ovlivněna jen mírně. Hlavním důvodem jsou pravděpodobně mechanismy sumace na neuronálních synapsích v zadních rožích míchy. V případě periferní stimulace mechanickým podnětem dochází zcela jistě 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 a 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. Tímto mechanismem pak může dojít k centrální senzitivaci WDR neuronů na úrovni míchy a následnému rozvoji mechanické alodynii a hyperalgie i v případě blokády

centrálních TRPV1 receptorů působením specifického antagonisty. V delším časovém horizontu se navíc uplatňují na aktivitě závislé změny transkripce v primárních senzických neuronech, jeden z hlavních mechanismů jejich senzitivace v podmínkách tkáňového poranění. V jádrech senzických neuronů dochází během senzitivace ke změnám exprese stovek genů, v jejichž důsledku se mění nejen jejich excitabilita a vodivé vlastnosti, ale často i celý fenotyp neuronu. Například, velké neurony spinálních ganglií ze skupiny A β – vláken, které se za fyziologických podmínek neúčastní přenosu bolestivé informace, začnou v terénu zánětu nebo po poranění exprimovat SP a BDNF, tvořit synapse s míšními WDR neurony, a tím získají schopnost indukovat centrální senzitivaci. V konečném důsledku je pak informace o nebolestivém dotyku vedená těmito neurony vnímána bolestivě, rozvíjí se mechanická alodynne. (182, 187, 216) Protože se nejedná o kapsaicin-senzitivní neurony, TRPV1 receptory na membránách těchto neuronů exprimovány nejsou, nemohou podléhat ani specifickému účinku SB 366791, který by bránil neurální transmissi. Tato subpopulace primárních senzických neuronů hraje pravděpodobně také určitou roli v pooperační hypersenzitivitě na mechanické podněty po intratekální aplikaci TRPV1 antagonisty, neboť přenos informace na míšní WDR těmito neurony není působením SB 366791 blokován. Uplatní se však s delším časovým odstupem od vzniku tkáňového traumatu.

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

Aktivace centrálních TRPV1 receptorů na úrovni míchy není dosud úplně objasněna. *In vivo* se jako jejich aktivátory uplatňují pravděpodobně endogenní vaniloidní substance. (284, 335) V nedávné době byly v nervové tkáni savců identifikovány N – acyldopaminové substance sloužící jako přirozené ligandy TRPV1 receptorů, jejichž katecholová funkční skupina se podobá struktuře kapsaicinu, a to NADA (N-arachidonyl dopamin), endogenní látka účinkující jako potentní agonsita na TRPV1 a CB1 receptorech v nanomolárních koncentracích, OLDA (N-oleoyl dopamin), PALDA (N-palmitoyl dopamin) a STEARDA (N-stearyl dopamin). (61) OLDA je přísně selektivním endogenním agonistou na TRPV1 receptorech, bez prokazatelného účinku na CB1 receptory a svým působením na periferní TRPV1 receptory indukuje v *in vivo* experimentech výraznou termální hyperalgezi s mnohem větší potencí než NADA, PALDA nebo STEARDA. (61, 279) Mezi další přirozené ligandy TRPV1 receptorů patří například látka anandamid, strukturální analog kapsaicinu. V nanomolárních koncentracích způsobuje analgesii svým účinkem na kanabinooidové receptory exprimované na membránách primárních senzických neuronů, ve vyšších koncentracích působí na TRPV1 receptory a jeho fyziologické účinky jsou zcela opačné než zprostředkované kanabinoidovými receptory. I když je anandamid velmi slabým TRPV1 agonistou, potencuje odpovědi TRPV1 receptorů na další podněty, zejména na tepelné a acidosu. Na druhou stranu je v podmínkách zvýšené teploty nebo zvýšené koncentrace protonů potencován efekt anandamidu jako TRPV1 agonisty. Substance jako ATP, bradykinin, serotonin, leukotrieny a prostaglandiny produkované v prostředí zánětu stimulují produkci lipidových druhých posílů, které senzitivují nociceptivní vlákno a tím zvyšují jeho excitabilitu. Anandamid produkovaný non-neuronálními buňkami pak působí synergicky s těmito modulatory a ovlivňuje aktivitu TRPV1 kanálů na přilehlých nervových zakončeních. Spolu s produkty lipooxygenázy (např. kyselina 12- nebo 15-(S)-hydroperoxyeikosatetraenová, leukotrien LB4) je jedním z několika endogenních lipidů schopných modulace funkce i přímé aktivace TRPV1 receptorů v příslušných koncentracích. (131, 335)

Zatímco je účinnost N – acyldopaminových substancí na TRPV1 receptory srovnatelná s kapsaicinem, anandamid a produkty lipooxygenázy jsou minimálně 20 – krát slabšími agonisty. Podstata jejich nízké afinity k TRPV1 receptorům oproti N – acyldopaminovým substancím nebo kapsaicinu je v chemické struktuře. Jejich molekula sice obsahuje dlouhý uhlíkový nenasycený řetězec, nutný k interakci s TRPV1 receptorem, ale nemá vanilylovou skupinu. Molekuly NADA, OLDA, PALDA a STEARDA ve své struktuře kromě nenasyceného uhlíkového řetězce vanilylovou skupinu obsahují, jejich vazba na TRPV1 receptor je tudíž efektivnější.

V našich experimentech se ukázalo, že míšní TRPV1 receptory exprimované na membránách centrálních výběžků primárních aferentních neuronů mají důležitou úlohu v neurálních mechanismech detekce tepelných podnětů a hrají rozhodující roli v rozvoji pooperační tepelné hyperalgie na zvířecím modelu plantární incise. Za účelem objasnění způsobu aktivace TRPV1 receptorů na úrovni míchy byl dalším pokusným zvířatům intratekálně injikován 50 μ M roztok OLDA pomocí permanentního intratekálního katétru a následně testována jejich termosenzitivita a mechanosenzitivita. Způsob implantace intratekálního katétru vycházel ze studie TL Yakshe (1976). (323) 5 dní po implantaci se zvířata plně zotavila a přítomnost katétru neovlivnila jejich odpovědi na mechanické ani tepelné podněty, po zákroku nedocházelo k rozvoji hyper – ani hyposenzitivity na tyto podněty. Oproti našim předpokladům jsme zjistili, že intratekálně aplikovaný OLDA v příslušné koncentraci neměl významný efekt na termosenzitivitu ani mechanosenzitivitu pokusných zvířat, jejich odpovědi na tepelné ani mechanické podněty se po injekci nezměnily v porovnání s reaktivitou zjištěnou před intratekální injekcí. Intratekálně aplikovaný 50 μ M OLDA nezpůsobil v důsledku aktivace centrálních TRPV1 receptorů rozvoj tepelné hyperalgie, jak bylo očekáváno. V *in vivo* studii, která zkoumala účinky endogenních TRPV1 agonistů a prokázala rozvoj hypersenzitivity zvířat na tepelné podněty účinkem OLDA, byl však tento roztok zvířatům aplikován subkutánně, ne intratekálně (61), rozdíl v účinku OLDA při subkutánní a intratekální aplikaci může být způsoben jeho různou biologickou dostupností při těchto dvou 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, charakter tkáňového prostředí pak může jejich citlivost k agonistům významně ovlivnit. Výsledky našich pokusů naznačují skutečnost, že endogenní vaniloidy jsou poměrně slabými agonisty a jejich koncentrace v míše nedosahuje za fyziologických podmínek dostatečně vysokých hodnot, aby mohly být jejich účinkem přímo aktivovány centrální TRPV1 receptory.

Poranění spojená se zanícením, infekcí a hypoxií jsou provázána výlevem mediátorů zánětu a lokálním zvýšením kyselosti a teploty usnadňujícím aktivaci nociceptorů a vznik bolesti. Také TRPV1 kanál podléhá významnou měrou senzitivizaci v prostředí zánětu pod vlivem působení těchto tkáňových mediátorů. Na regulaci funkce TRPV1 kanálu se podílí různé buněčné enzymy (proteinkinázy, fosfolipázy, fosfatázy, atd.), které jsou odpovědné za posttranslační modifikace TRPV1 proteinu ovlivňující jeho chemické i biologické vlastnosti, a mohou tím způsobit jeho senzitivizaci. Jsou aktivovány metabotropními receptory tkáňových mediátorů zánětu exprimovaných na membráně nociceptoru prostřednictvím G-proteinů. Příkladem je bradykininový receptor B2, TrkA receptor pro nervový růstový faktor (NGF) a P_{2Y1} receptor pro ATP. Senzitivizace proudových odpovědí vaniloidního receptoru vyvolaných na primárních nociceptorech TRPV1 agonistou v přítomnosti některých mediátorů zánětu (bradykinin, serotonin, prostagladin), jeden z hlavních mechanismů modulace jeho aktivity, závisí především na míře fosforylace TRPV1 proteinu. Zejména C-terminální doména TRPV1

receptoru je velmi bohatá na potenciální fosforylační místa a rozhodujícím způsobem ovlivňuje míru afinity receptoru k agonistům i otevírání kanálu, mezi důležitá fosforylační místa patří například Ser800 a Thr704, která jsou fosforylována proteinkinázou C (PKC). (186) Naproti tomu defosforylace fosfatázou 2B (kalcineurinem) je zodpovědná za desenzitizaci vaniloidního receptoru, při níž se v přítomnosti agonisty rychle ztrácí aktivita receptoru následkem jeho konformační změny. (208)

V místě tkáňového poranění jsou z poškozených buněk a buněk z imunitního systému uvolňovány mediátory zánětu (cytokiny, růstové faktory, chemokiny, prostanoidy, aminy, puriny, protony a kininy), které svými účinky na metabotropní receptory exprimované nociceptivními neurony snižují práh jejich aktivace, fenomén nazývaný senzitivace. Kininové peptidy (zejména bradykinin) jsou v tomto ohledu jedny z nejdůležitějších. Vznikají v poraněné tkáni z kininogenových prekursorů působením proteáz kallikerinu a kininázy. Aktivují konstitutivně exprimované B₂ a zánětem indukované B₁ bradykininové receptory spřažené s G – proteiny exprimované na membránách sensorických neuronů. Bradykininové receptory jsou prostřednictvím G - proteinů spřaženy s aktivitou PLC β, v jejímž důsledku dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace kalcia a aktivaci na kalcium závislé PKC. Aktivovaná PKC pak katalyzuje fosforylaci různých receptorových proteinů a proteinů iontových kanálů, což je důležitá posttranslační úprava měnící jejich biologické vlastnosti. Posttranslační změny receptorových proteinů nociceptoru přispívají zásadním způsobem k jejich senzitivaci. Jednou z klíčových posttranslačních změn uplatňujících se v rozvoji senzitivace nociceptoru je právě fosforylace C – terminální domény TRPV1 receptoru působením PKC, prostřednictvím aktivace bradykininových receptorů spřažených s G-proteiny exprimovaných na membráně kapsaicin – senzitivního neuronu.

Ačkoliv je bradykinin považován primárně za periferně působící zánětlivý mediátor, je evidentní, že se významně uplatňuje i v centrální transmissi nociceptivní informace. Intratekální aplikace B₂ agonisty způsobí rozvoj termální hyperalgie (56), naopak intratekálně podaný B₂ antagonist oslabí hypersenzitivitu v akutní fázi zánětu indukovaného intraplantární injekcí formalinu. (97) Exprese B₂ receptorů byla spolehlivě prokázána na membránách neuronů spinálních ganglií a v zadních rožích míchy. Ve spinálních gangliích je B₂ receptor exprimován malými i středně velkými sensorickými neurony, v povrchových laminách zadních rohů míchy exprimuje B₂ receptory 70 % neuronů vykazujících zároveň NMDA imunopozitivitu. B₂ receptory se tedy nacházejí na membránách nejen primárních sensorických, ale i postsynaptických neuronů zadních rohů míchy a bradykinin tak může v zadních rožích míchy ovlivňovat neurální přenos presynapticky i postsynapticky. Ukázalo se, že intenzivní nociceptivní aferentace indukuje výraznou produkci bradykininu v míše. Zatímco není za fyziologických podmínek hladina bradykininu v míše detekovatelná, po indukcii nociceptivní aferentace periferním nociceptivním podnětem se jeho koncentrace v míše podstatně zvýší. Protože jsou bradykininové B₂ receptory v zadních rožích míchy exprimovány presynapticky i postsynapticky a bradykinin, jejich specifický agonista, je indukovan nociceptivní stimulací, je zřejmé, že zásadně ovlivňuje synaptickou aktivitu v zadních rožích míchy. Elektrofyziologické experimenty prokázaly například potenciaci glutamatergní synaptické transmise v zadních rožích míchy zvyšující excitační synaptický přenos působením bradykininu. Bradykinin způsobí aktivaci intracelulární signální kaskády napojené na jeho receptory jednak zvýšené uvolňování glutamátu z centrálních zakončení primárních aferentních neuronů, v postsynaptických neuronech zadních rohů míchy pak fosforylaci jejich AMPA a NMDA receptorů. Tím jsou ovlivněny jejich biologické vlastnosti i aktivita a synaptický přenos nociceptivní informace v zadních rožích míchy je v důsledku působení bradykininu facilitován. (304)

Intratekálně aplikovaný endogenní TRPV1 agonista OLDA neovlivnil v našich experimentech senzitivitu zvířat na tepelné nebo mechanické podněty, v použité koncentraci

nebyl dostatečně účinný k aktivaci centrálních TRPV1 receptorů v míše. Úloha centrálních TRPV1 receptorů v rozvoji pooperační tepelné hyperalgie však byla přesvědčivě prokázána. Jaký byl v tomto případě mechanismus jejich aktivace? Ačkoliv byl TRPV1 původně popsán jako iontový kanál nezávislý na napětí, byla nedávno spolehlivě prokázána jeho napěťová závislost. Pravděpodobnost otevření TRPV1 iontového kanálu se zvyšuje v případě změny membránového potenciálu ve smyslu depolarizace a bylo dokázáno, že zejména intenzita tepelného podnětu nutná k jeho aktivaci je silně závislá na membránovém potenciálu. Při depolarizaci membrány dochází k aktivaci TRPV1 receptoru a následnému otevření iontového kanálu podstatně nižší teplotou než v případě její hyperpolarizace, výsledky elektrofyziologické pokusů jasně ukázaly a přesně popsaly závislost velikosti proudu TRPV1 kanálem indukovaným tepelným podnětem na transmembránovém napětí. Termosenzitivita TRPV1 receptorů tedy není charakterizována jediným prahem pro tepelný podnět, ale je citlivě modulována změnami membránového potenciálu. Na druhou stranu, případné změny okolní teploty mají také za následek výrazné posuny křivky závislosti proudu TRPV1 iontovým kanálem indukovaného působícím podnětem na transmembránovém napětí. Elektrický proud tímto kanálem vykazuje při různých membránových potenciálech přísnou teplotní závislost, zvýšení teploty vede ke zvýšení frekvence otevírání TRPV1 iontového kanálu a změně membránového potenciálu směrem k aktivační úrovni, tedy posun křivky závislosti proudu na transmembránovém napětí doleva. Agonisté TRPV1 receptorů chemické povahy fungují jako modulátory napěťově závislých charakteristik tohoto iontového kanálu a potencují proudové odpovědi vyvolané tepelným podnětem, kapsaicin způsobuje v závislosti na použité koncentraci rovněž výrazný posun křivky závislosti proudu na napětí TRPV1 iontového kanálu doleva. (296) Endogenní TRPV1 agonisté se v pokusech *in vitro* ukázali jako velmi málo potentní. Nelze však opomenout, že *in vivo* podmínkách může být membránový potenciál primárního aferentního neuronu různými způsoby modulován, centrální TRPV1 receptory se navíc v tomto případě nacházejí v prostředí o teplotě 37 °C. V případě, že je membránový potenciál změněn ve smyslu depolarizace a za předpokladu, že se frekvence otevírání TRPV1 iontového kanálu při zvýšené teplotě zvyšuje, může dojít k aktivaci TRPV1 iontového kanálu slabším podnětem, než v *in vitro* pokusech prováděných při pokojové teplotě. Křivka závislosti proudu na napětí se posouvá doleva, k dosažení aktivační úrovně a následnému otevření TRPV1 iontového kanálu stačí tím pádem podstatně menší změna membránového potenciálu. Za těchto podmínek nelze vyloučit, že mohou být centrální TRPV1 receptory těmito slabými endogenními agonisty vaniloidní povahy aktivovány.

Dalším z možných způsobů aktivace centrálních TRPV1 receptorů zůstává působení endogenních vaniloidů jako agonistů na centrálních TRPV1 receptorech v případě senzitivizace TRPV1 receptorů v podmínkách tkáňového poranění, v důsledku které se významně zvýší jejich citlivost k působení těchto slabých agonistů. V důsledku intenzivní nociceptivní aferentace dochází ke zvýšení produkce bradykininu v míše a lze předpokládat, že tomu tak je i v případě nocicepce po provedení plantární incise. Uvolněný bradykinin obsadí B₂ receptory exprimované na membránách neuronů v zadních rožích míchy, aktivací kaskády intracelulárních dějů způsobí fosforylaci proteinů TRPV1 receptorů a tím jejich senzitivizaci. V důsledku této posttranslační změny se centrální TRPV1 receptory stanou citlivější k endogenním vaniloidním substancím, které se začnou uplatňovat jako jejich aktivátory. (304)

Po intratekální injekci bradykininu došlo podle očekávání k přechodnému zvýšení reaktivity našich pokusných zvířat na tepelné i mechanické podněty, rozvinula se tepelná i mechanická hyperalgie. Naše zjištění je v souladu s výsledky dalších studií (56, 97, 304), které spolehlivě prokázaly facilitující účinky bradykininu na synaptický přenos senzitivní informace na úrovni míchy. *In vitro* elektrofyziologické pokusy ukázaly, že bradykinin

zvyšuje jednak AMPA- i NMDA- indukované excitační postsynaptické proudy, dále excitační postsynaptické proudy vyvolané stimulací primárních aferentních neuronů a také frekvenci i amplitudu miniaturních excitačních postsynaptických proudů neuronů zadních rohů míchy. (304) Možných mechanismů facilitačního působení bradykininu na synaptický přenos v zadních rozích je několik. Obsazením svého B₂ receptoru na membráně neuronu v zadním rohu míchy aktivuje bradykinin kaskády intracelulárních dějů funkčním spřažením s G – proteiny. Jejich prostřednictvím pak může být pomocí PLC β aktivována na kalcium závislá PKC, která indukuje fosforylaci AMPA a NMDA receptorů míšních neuronů a tím ovlivní jejich aktivitu ve smyslu senzitivace, případně zvýší jejich transport na membránu neuronů. Bradykininový B₂ receptor je rovněž funkčně spřažen s aktivitou PLA₂ konvertující membránové fosfolipidy na kyselinu arachidonovou. Z kyseliny arachidonové pak vznikají prostanoidy, které jsou neméně důležitými modulátory synaptického přenosu v zadních rozích míchy významně se uplatňujícími v jeho facilitaci.

V případě, kdy byl pokusným zvířatům intratekálně aplikován nejprve roztok bradykininu, a poté agonista na TRPV1 receptorech OLDA, došlo rovněž k významným změnám jejich reaktivity na tepelné i mechanické podněty. Rozvinula se jasně prokazatelná termální i mechanická hyperalgie, která přetrvávala několik hodin po intratekální injekci. V porovnání s hypersenzitivitou vyvolanou pouze bradykininem přetrvávalo zvýšení citlivosti na mechanické i tepelné podněty po aplikaci bradykininu s OLDA podstatně delší dobu a bylo o něco výrazněji vyjádřeno. Je možné předpokládat, že v iniciální fázi hraje důležitou úlohu senzitivující účinek bradykininu na míšní receptory (například AMPA nebo NMDA) aktivované při transmisi nociceptivní informace působením neurotransmiterů (EAA, SP, CGRP, aj.) uvolňovaných z primárních aferentních neuronů po jejich stimulaci mechanickým nebo tepelným podnětem. Zároveň však může docházet účinkem bradykininu v míše k senzitivaci centrálních TRPV1 receptorů, mechanismem fosforylace C – koncové domény jejich proteinů, a tím ke zvýšení i jejich citlivosti k působení agonistů. V této situaci, po senzitivaci centrálních TRPV1 receptorů v zadních rozích míchy bradykininem, se pak s největší pravděpodobností může uplatnit OLDA jako agonista na těchto receptorech a stává se jejich účinným aktivátorem. Aktivace centrálních TRPV1 receptorů pak významně ovlivní synaptický přenos nociceptivní informace na úrovni míchy a podílí se na jeho facilitaci. V našich experimentech bylo navíc možné zablokovat mechanickou i termální hyperalgiu indukovanou intratekální injekcí bradykininu s OLDA pomocí intratekálně aplikovaného TRPV1 antagonisty SB 366791, 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.

TRPV1 receptory v zadních rozích míchy, exprimované na membránách centrálních výběžků primárních aferentních neuronů, mají důležitou úlohu v sensorických neurálních mechanismech a hrají rozhodující roli v rozvoji pooperační tepelné hyperalgie na zvířecím modelu plantární incise. Jejich možnými aktivátory na úrovni míchy jsou za těchto okolností endogenní vaniloidní substance, přestože jsou velmi slabými TRPV1 agonisty a za fyziologických podmínek není v organismu dosaženo jejich dostatečné koncentrace nutné k aktivaci TRPV1 receptorů. V případě tkáňového poranění nebo zánětu však dochází k periferní senzitivaci primárních aferentních neuronů a zároveň centrální senzitivaci postsynaptických neuronů v zadních rozích míchy v důsledku působení nejrůznějších tkáňových mediátorů. Jedním z nejvýznamnějších z nich je bradykinin, který se uplatňuje nejen jako periferně působící zánětlivý mediátor, ale i v centrální transmisi nociceptivní informace. Jeho účinkem dojde k zásadním změnám biologických vlastností TRPV1 receptorů ve smyslu senzitivace a zvýšení jejich citlivosti, v jejichž důsledku se i slabí endogenní TRPV1 agonisté stanou účinnými aktivátory centrálních TRPV1 receptorů. Bylo prokázáno, že intenzivní nociceptivní aferentace způsobí zvýšení produkce bradykininu

v míše (304), a lze tudíž předpokládat, že k němu dochází také po provedení chirurgické incise na plantě pedis. Aktivace centrálních TRPV1 receptorů endogenními vaniloidy po jejich senzitivizaci bradykininem uvolněným v míše v důsledku silné nociceptivní aferentace je pravděpodobně jedním z hlavních mechanismů rozvoje pooperační hyperalgie.

6. Závěr

Hlavním tématem této studie jsou neurální mechanismy nocicepce a patologických bolestivých stavů. Práce byla zaměřena na bolest chirurgického původu, tedy stav, kdy je vyvolávající příčinou vzniku bolesti operační zákrok, neboť mechanické tkáňové poranění způsobené operačním zákrokem je jednou z častých příčin rozvoje chronické bolesti, případně patologických bolestivých stavů, a chronická pooperační bolest je v klinické medicíně dodnes obtížně řešitelným problémem. Pro studium mechanismů uplatňujících se v rozvoji pooperační bolesti byla vyvinuta řada experimentálních modelů zvířecích i lidských. V našich pokusech byly použity dva různé zvířecí modely. V rozvoji tohoto bolestivého stavu se uplatňují neurální mechanismy jak periferní, tak centrální senzitivizace nociceptivního systému. Tkáňové poranění chirurgickým zákrokem může být příčinou rozvoje chronické pooperační bolesti, která dosahuje často značné intenzity, může být příčinou zvýšené pooperační morbidity a je v mnoha případech velmi obtížně terapeuticky ovlivnitelná. Cílem této práce bylo blíže objasnit mechanismy vzniku pooperační bolesti a představit tak některé z možných způsobů jejího ovlivnění farmaky. Účinná pooperační analgésie má velký význam pro celkový pooperační vývoj pacientova stavu.

Bolest chirurgického původu byla v této studii zkoumána na zvířecím modelu incise kůže hřbetu a na zvířecím modelu plantární incise. Chirurgická incise na hřbetu krysy vedla k rapidnímu rozvoji mechanické alodynii a hyperalgie kůže přetrvávající řadu dní, a to jak v bezprostřední blízkosti incise (primární alodynii a hyperalgie), tak i na intaktní kůži vzdálené až 2 cm od místa poranění (sekundární alodynii a hyperalgie), neboť aktivace periferních neurálních zakončení tímto nociceptivním podnětem způsobujícím tkáňové poranění a následná intenzivní aferentace z místa poranění způsobila nejen periferní senzitivizaci nociceptorů, ale i facilitaci synaptického přenosu v zadních rožích míchy. Pooperační mechanickou alodynii, zejména sekundární, bylo možné selektivně zablokovat předoperačně aplikovaným bupivakainem subkutánně do místa incise po dobu minimálně jednoho týdne, mechanismem kompletní blokády nociceptivní aferentace z místa poranění. Je tedy zřejmé, že nedojde – li v iniciální fázi k nociceptivní aferentaci z místa poranění, nerozvinou se plně změny synapsí v zadních rožích míchy ve smyslu senzitivizace. Podobný analgetický účinek bupivakainu byl navíc zjištěn také v případě jeho subkutánní aplikace na jiné místo, což naznačuje existenci i jiných účinných mechanismů působení tohoto lokálního anestetika na pooperační bolest, než je přímá blokáda primárních aferentních vláken v místě incise. Předoperační podání lokálního anestetika do místa plánované incise se nabízí jako jedna z možností účinného ovlivnění pooperační bolesti. Nevýhodou však zůstává jejich krátkodobý účinek. V iniciální fázi místní anestetikum sice zabrání aktivaci periferních nociceptivních zakončení chirurgickým zákrokem, nicméně neovlivní uvolnění mediátorů zánětu a dalších tkáňových působků produkovaných v místě poranění, které se rozhodujícím způsobem podílí na jejich periferní senzitivizaci. Změny vlastností nociceptorů způsobené mechanismy periferní senzitivizace se pak po odeznění účinku lokálního anestetika mohou projevit. Navíc je účinek těchto farmak nespecifický, jejich působením dojde k ovlivnění nejen senzitivních, ale i motorických a autonomních nervových vláken.

Klíčovou úlohu v detekci nociceptivního podnětu a následné transmisi nociceptivní informace hrají primární aferentní neurony specificky reagující na nociceptivní podněty senzitivní na chemickou látku kapsaicin. Ukázalo se, že hrají rozhodující úlohu i v rozvoji pooperačních bolestivých stavů. Jejich selektivní vyřazení z funkce na dostatečně dlouhou dobu představuje velmi účinný a specifický způsob farmakologického ovlivnění pooperační bolesti, výhodnější než pomocí místních anestetik. Výsledky našich pokusů na zvířecím

modelu plantární incise prokázaly silný analgetický efekt intradermálně aplikovaného kapsaicinu ve vysoké koncentraci na pooperační mechanickou alodynii i mechanickou a termální hyperalgií indukované chirurgickou incisí na plantě pedis. Je známo, že vysoká dávka kapsaicinu způsobí desenzitizaci, případně úplnou morfologickou destrukci zakončení kapsaicin – senzitivních neuronů. Po lokální aplikaci kapsaicinu do místa incise před provedením chirurgického zákroku došlo v našich pokusech zcela evidentně tímto mechanismem k selektivnímu zablokování nociceptivní aferentace z místa incise a tím i následného rozvoje pooperační tepelné a mechanické hyperalgie i mechanické alodynii. Rozsah tohoto analgetického účinku kapsaicinu byl závislý na načasování jeho aplikace vzhledem k provedení operačního zákroku. Maximálního efektu bylo dosaženo v případě, kdy byla vysoká dávka kapsaicinu aplikována předoperačně a zároveň byla plantární incise provedena dřív, než mohlo dojít k následné regeneraci funkce kapsaicin – senzitivních nociceptivních zakončení v místě aplikace. Jednorázová lokální aplikace kapsaicinu ve vysoké koncentraci se ukázala jako analgeticky velmi účinná v léčbě pooperační bolesti, vhodná k použití i v klinické praxi. Způsobí selektivní vyřazení nociceptivních aferentních zakončení z jejich funkce, a to na dostatečně dlouhou dobu, aby nemohlo dojít k rozvoji senzitivizace a následně patologických bolestivých stavů. Inaktivace nociceptorů účinkem kapsaicinu ve vysoké koncentraci je reverzibilní.

Zvýšená vzruchová aktivita nociceptorů může způsobit dlouhodobé změny efektivity synaptického přenosu v zadních rožích míchy mechanismem aktivace některých transkripčních faktorů a změnami na úrovni transkripce genů kódujících proteiny zodpovědné za příjem, vedení a synaptický přenos vzruchu. V časně fázi je touto cestou indukován například gen c - Fos kódující transkripční faktor Fos, jehož exprese je spolehlivým funkčním markerem sloužícím k identifikaci neuronů centrálního nervového systému senzitivizovaných intenzivním nociceptivním podnětem. Plantární incise způsobila v jádrech neuronů zadních rohů lumbální míchy jasně prokazatelný nárůst exprese c – Fos, a to jak na ipsilaterální, tak i na kontralaterální straně od operované končetiny, což dokazuje jejich centrální senzitivizaci tímto podnětem a indukcí dlouhodobých změn jejich biologických vlastností ovlivněním genové exprese v důsledku intenzivní nociceptivní aferentace. Právě tyto změny efektivity synaptického přenosu v zadních rožích míchy, závislé na transkripci a dlouhodobého charakteru, jsou rozhodující pro rozvoj chronické bolesti a případně patologických bolestivých stavů. Hlavním léčebným cílem by proto mělo být rozvoji těchto dlouhodobých změn předejít. Dojde – li jednou k ovlivnění transkripce genů kódujících proteiny podílející se na synaptickém přenosu vzruchů v jádrech nociceptivních neuronů, je velmi obtížné dalšímu rozvoji senzitivizace zabránit a vznikající patologické bolestivé stavy terapeuticky ovlivnit. Nárůst exprese c - Fos byl zablokován předoperačně aplikovaným kapsaicinem ve vysoké koncentraci do místa incise. Intradermálně aplikovaný kapsaicin zcela evidentně zabránil rozvoji centrální senzitivizace, neboť inaktivoval kapsaicin-senzitivní neurální zakončení a tím zablokoval nociceptivní aferentaci z místa incise, a to jak STT, tak PSDC neuronů v zadních rožích míchy. V důsledku jeho účinku nedošlo ani ke změnám na úrovni transkripce genů v jádrech těchto nociceptivních neuronů. To je jednou z podstat jeho výborného analgetického efektu na pooperační mechanickou alodynii i mechanickou a termální hyperalgií. Lokálně aplikovaný kapsaicin je vysoce účinný v ovlivnění pooperační alodynii a hyperalgie na zvířecím modelu plantární incise a nabízí možnost využití tohoto způsobu léčby pooperační bolesti v klinické praxi.

Kapsaicinové TRPV1 receptory, integrátory fyzikálních a chemických bolestivých podnětů klíčové pro přenos bolesti, podléhající významnou měrou senzitivizaci v prostředí zánětu pod vlivem působení tkáňových mediátorů, jsou exprimovány nejen na periferních, ale i centrálních zakončeních kapsaicin – senzitivních neuronů. Protože jsou kapsaicin – senzitivní nociceptory rozhodující pro rozvoj pooperační bolesti, nabízí se další možnost

farmakologického ovlivnění tohoto bolestivého stavu, a to pomocí specifického antagonisty na TRPV1 receptorech. Na zvířecím modelu plantární incise došlo účinkem intratekálně aplikovaného specifického antagonisty na TRPV1 receptorech k významnému ovlivnění termosenzitivity intaktní kůže planty pedis ve smyslu hypoalgie, a navíc k úplnému zablokování rozvoje pooperační tepelné hyperalgie. Průběh mechanické alodynii a hyperalgie byl jeho účinkem rovněž oslaben. Tato zjištění jasně prokázala významnou úlohu centrálních TRPV1 receptorů v termosenzitivitě i v rozvoji pooperační tepelné hyperalgie. Naopak, analgetický efekt lokálně aplikovaného TRPV1 antagonisty na pooperační mechanickou alodynii i mechanickou a tepelnou hyperalgiu byl v případě jeho intradermální aplikace do místa incise v porovnání s intratekální aplikací podstatně slabší. Na periferních zakončeních nociceptivních neuronů je totiž kromě TRPV1 exprimována celá řada dalších receptorů, které se mohou účastnit detekce termálních nebo jiných nociceptivních podnětů a podléhat senzitivizaci chirurgickou incisí. Protože lokálně aplikovaný TRPV1 antagonist blokuje s vysokou selektivitou pouze TRPV1 receptory, aktivaci ani senzitivizaci nociceptoru tímto podnětem nezabrání a jeho efekt na pooperační hyperalgiu a alodynii je tím pádem méně výrazný. Účinek selektivního TRPV1 antagonisty na mechanosenzitivitu a pooperační mechanickou alodynii a hyperalgiu byl v porovnání s jeho účinkem na termosenzitivitu podstatně mírnější, a to v případě intratekální i lokální aplikace. Toto zjištění naznačuje možnost existence různých neurálních mechanismů rozvoje pooperační mechanické a tepelné hyperalgie. V porovnání s lokálně aplikovaným kapsaicinem se TRPV1 antagonist v našich pokusech ukázal jako slabší a celkově méně účinné analgetikum k ovlivnění pooperační bolesti. Jeho účinek je navíc velmi krátkodobý, v případě lokální aplikace pooperační mechanickou ani tepelnou hyperalgiu nezablokoval. Intradermálně aplikovaný kapsaicin ve vysoké koncentraci na rozdíl od TRPV1 antagonisty aktivuje periferní TRPV1 receptory exprimované na membránách nociceptivních neuronů, až způsobí úplné vyřazení jejich periferních zakončení z funkce, případně jejich destrukci. Aferentace z místa incise je tak kompletně zablokována, a to je pro účinné farmakologické ovlivnění rozvoje pooperačních bolestivých stavů rozhodující. Analgetický efekt kapsaicinu je tudíž výraznější a k ovlivnění pooperační bolesti v klinické praxi se jeví jako vhodnější. Protože je velkou nevýhodou lokálně aplikovaného kapsaicinu výrazná bolestivost v iniciální fázi jeho působení, lze ho s výhodou použít v kombinaci s lokálním anestetikem, které svým účinkem iniciální bolestivost zablokuje, ale kapsaicinem indukovanou desenzitivizaci nociceptivního vlákna neovlivní.

TRPV1 receptory exprimované na centrálních výběžcích kapsaicin – senzitivních nociceptorů v zadních rozích míchy hrají podle výsledků našich pokusů významnou úlohu v termosenzitivitě i v rozvoji pooperační tepelné a mechanické hyperalgie. Jejich úloha v synaptickém přenosu na úrovni míchy však stále není objasněna, otázkou zůstává zejména způsob jejich aktivace v zadních rozích míchy. Možnými aktivátory centrálních TRPV1 v zadních rozích míchy jsou endogenní agonisté na TRPV1 vaniloidních receptorech. Tyto endogenní vaniloidní substance jsou však velmi slabými agonisty TRPV1 receptorů a jako jejich aktivátory velmi málo účinné. Důležitým faktorem pro jejich případné uplatnění za fyziologických podmínek je napětíová závislost TRPV1 iontových kanálů. V případě posunu hodnoty membránového potenciálu primárního aferentního neuronu ve smyslu depolarizace stačí k jejich aktivaci následnému otevření TRPV1 iontového kanálu stačí jen jeho malá změna. Navíc, koncentrace endogenních vaniloidů stoupá v podmínkách zánětu nebo tkáňového poranění a zároveň dochází k senzitivizaci TRPV1 receptorů působením zánětlivých mediátorů, zejména bradykininu. Protože dochází k výraznému zvýšení produkce bradykininu v míše také v důsledku intenzivní nociceptivní aferentace z místa poranění, mohou se i za těchto okolností stát endogenní vaniloidy účinnými aktivátory senzitivizovaných centrálních TRPV1 receptorů a podílet se na mechanismech centrální senzitivizace míšních neuronů.

V případě, že byl v našich pokusech před intratekální injekcí TRPV1 agonisty aplikován intratekálně roztok bradykininu, došlo k rozvoji přechodné hypersenzitivity na tepelné i mechanické podněty. A protože v našich experimentech navíc intratekálně aplikovaný TRPV1 antagonista účinně zablokoval hypersenzitivitu zvířat na tepelné i mechanické podněty indukovanou aktivací centrálních TRPV1 receptorů endogenním agonistou po jejich senzitivizaci bradykininem, je zcela evidentní, že se centrální TRPV1 receptory na neurálních mechanismech vzniku těchto patologických bolestivých stavů skutečně významně podílejí. Je velmi pravděpodobné, že se právě tento mechanismus aktivace centrálních TRPV1 receptorů endogenními agonisty uplatňuje i v případě tkáňového poranění chirurgickým zákrokem a podílí se na rozvoji pooperační bolesti.

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 hyperalgézi 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 alodynie. Naše výsledky potvrdily klíčovou úlohu nejen periferních, ale zejména centrálních TRPV1 receptorů v synaptické transmisi nociceptivní informace v zadních rožích míchy a v její modulaci, objasnily možný způsob jejich aktivace a senzitivizace na úrovni míchy, a zároveň prokázaly jejich významnou roli v neurálních mechanismech rozvoje pooperační bolesti.

7. Shrnutí

Tkáňové poranění vede v důsledku působení mechanismů periferní senzitivace primárních nociceptorů a centrální senzitivace neuronů v zadních rozích míchy ke zvýšení citlivosti organismu na bolestivé i nebolestivé podněty. V těchto procesech hraje klíčovou úlohu subpopulace kapsaicin – senzitivních sensorických neuronů. Kapsaicin-senzitivní neurony exprimují na svých periferních i centrálních zakončeních kapsaicinové TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) receptory, lokální aplikace vysoké dávky kapsaicinu může způsobit regionální destrukci těchto zakončení. TRPV1 receptory se rozhodujícím způsobem podílí na neurálním přenosu nociceptivní informace a na jeho modulaci. Cílem studie bylo ověřit úlohu kapsaicin – senzitivních primárních aferentních vláken a roli periferních i centrálních TRPV1 receptorů v rozvoji hypersenzitivity vznikající po poranění chirurgickým zákrokem, otestovat účinek vysoké dávky kapsaicinu a specifického TRPV1 antagonisty na pooperační bolest a blíže objasnit funkci centrálních TRPV1 receptorů v mechanismech nocicepce.

Na zvířecím modelu plantární incise byly behaviorálními metodami testovány odpovědi zvířat na mechanické (pomocí Von Freyových vláken) a tepelné podněty (pomocí tepelného zdroje) před provedením a v několika časových intervalech po provedení chirurgického zákroku. V první sérii pokusů byla zvířatům intradermálně aplikována vysoká dávka kapsaicinu 24 h předem, 6 dní předem nebo 2 h po provedení incise. Další skupině zvířat byl podán specifický TRPV1 antagonist (SB 366791) intratekálně nebo intradermálně před provedením incise. Rozsah centrální senzitivace neuronů v zadních rozích míchy plantární incisí byl rovněž hodnocen podle počtu spinothalamických (STT) neuronů a postsynaptických neuronů zadních provazců (PSDC) exprimujících c – Fos v L3 – L5 segmentech lumbální míchy pomocí imunohistochemického barvení. V závěrečné části studie byly behaviorálními metodami testovány změny odpovědi zvířat na mechanické a tepelné podněty po intratekální aplikaci TRPV1 agonisty OLDA (N – oleoyldopamin), bradykininu a obou těchto látek zároveň.

V důsledku plantární incise došlo k výraznému zvýšení citlivosti kontrolních zvířat na mechanické i tepelné podněty. Kapsaicin aplikovaný intradermálně před nebo po provedení chirurgického zákroku významně oslabil pooperační termální i mechanickou hyperalgií v celém jejím průběhu. Jeho účinkem došlo rovněž ke snížení počtu STT i PSDC neuronů zadních rohů lumbální míchy exprimujících c - Fos po provedení plantární incise. Intradermálně aplikovaný SB 366791 měl pouze mírný analgetický účinek na pooperační tepelnou hyperalgií a mechanickou alodynii. V případě intratekální aplikace byl však jeho efekt mnohem výraznější, rozvoj pooperační tepelné hyperalgie byl jeho účinkem kompletně zablokovan a průběh mechanické alodynii oslaben. Intratekální aplikace samotného endogenního agonisty OLDA neměla vliv na reaktivitu zvířat na tepelné ani mechanické periferní podněty, nicméně, jeho účinkem došlo k potenciaci senzitivujícího efektu intratekálně aplikovaného bradykininu.

Lokálně aplikovaný kapsaicin ve vysoké koncentraci se ukázal jako vysoce analgetický účinný na pooperační tepelnou i mechanickou hyperalgií. Také intratekálně aplikovaný TRPV1 antagonist měl výrazný analgetický efekt na průběh pooperační tepelné hyperalgie a mechanické alodynii. Naše výsledky potvrdily klíčovou úlohu nejen periferních, ale i centrálních TRPV1 receptorů v transmissi nociceptivní informace a v její modulaci, a zároveň prokázaly jejich významnou roli v rozvoji pooperační bolesti.

8. Summary

Tissue injury leads to increased sensitivity to noxious and innocuous stimuli due to mechanisms of peripheral sensitisation of primary nociceptors and central sensitization of neurons in the spinal dorsal horns. The subpopulation of capsaicin – sensitive sensory neurons plays an important role in this process. The capsaicin – sensitive neurons express capsaicin TRPV1 receptors (transient receptor potential 1) on their peripheral and central terminals, local high concentration capsaicin treatment can induce regional destruction of these endings. It is well established that TRPV1 receptors play the key role in neural transmission of nociceptive information and its modulation. The aims of this study were to investigate the role of capsaicin – sensitive primary afferent fibers and the involvement of peripheral and central TRPV1 receptors in the development of hypersensitivity after surgical tissue trauma, to test the effect of high concentration capsaicin and the specific TRPV1 antagonist treatment on postoperative pain and to enlighten the function of central TRPV1 receptors in the neural mechanisms of nociception.

Using behavioral testing methods, the responses to mechanical (Von Frey filaments) and thermal stimuli (radiant heat source) were tested on the rat plantar incision model of surgical pain before and several times after the surgical procedure. In the first series of experiments the animals were treated intradermally with high concentration capsaicin 24 hrs before, 6 days before or 2 hrs after the plantar incision was made. Another group of experimental animals was treated with TRPV1 antagonist (SB 366791), either intrathecally or intradermally applied before the surgery. The magnitude of central sensitization of neurons in the spinal dorsal horns due to the plantar incision was also judged by the number of spinothalamic (STT) and postsynaptic dorsal column (PSDC) neurons expressing c – Fos in L3 – L5 segments of the lumbar spinal cord using immunohistochemical staining. In the last part of this study the changes of responsiveness to mechanical and thermal stimulation after intrathecal application of TRPV1 agonist (OLDA, N – oleoyldopamine), bradykinin and both compounds together were investigated using the same behavioral methods as described above.

The plantar incision caused rapid increase of responsiveness to mechanical and thermal stimuli in the control group of animals treated with vehicle. However, high dose of capsaicin applied intradermally before or after the surgical procedure significantly reduced the postoperative thermal and mechanical hyperalgesia, the number of STT and PSDC neurons expressing c – Fos in the spinal dorsal horns was also greatly reduced in animals pretreated with capsaicin 24 hrs before the plantar incision was made in comparison to controls. Intradermal TRPV1 antagonist treatment had only moderate analgesic effect on postoperative thermal hyperalgesia and mechanical allodynia. In sharp contrast, the effect of TRPV1 antagonist was much more pronounced after intrathecal application, thermal hyperalgesia was blocked completely and mechanical allodynia was reduced remarkably in this group of animals. Even though intrathecal treatment with OLDA did not affect the responsiveness of animals to mechanical or thermal stimuli, it potentiated the sensitizing effect of intrathecally applied bradykinin significantly.

Local high concentration capsaicin treatment showed great analgesic effect on postoperative thermal and mechanical hyperalgesia. Also, intrathecal application of TRPV1 antagonist appeared to be very effective in the treatment of postoperative thermal hyperalgesia and mechanical allodynia. According to our results, not only peripheral, but also central TRPV1 receptors play an important role in the neural transmission of nociceptive information and its modulation and they seem to be essential for the development of postoperative pain states.

9. Seznam literatury

1. Abbadie, C and Besson, JM. Effects of morphine and naloxone on basal and evoked Fos – like immunoreactivity in lumbar spinal cord neurone sof arthritic rats. *Pain*.1993;52:29-39
2. 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
3. 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
4. Abbadie, C and Besson, JM. Chronic treatments with aspirin or acetaminophen reduce both the development of polyarthritis and Fos – like immunoreactivity in the rat lumbar spinal cord. *Pain*.1994;57:45-54
5. Al-Chaer ED, Lawand NB, Westlund KN and Willis WD. Visceral nociceptive input into the ventral posterolateral nucleus of the thalamus: a new function for the dorsal column pathway. *Journal of Neurophysiology*.1996;76:2662-2674
6. Aley, KO and Levine, JD. Dissociation of tolerance and dependence for opioid peripheral antinociception in rats. *Journal of Neuroscience*.1997;17:3907-3912
7. Allen, GV and Pronych, SP. Trigeminal autonomic pathways involved in nociception-induced reflex cardiovascular responses.*Brain Research*.1997;754:269-278
8. Altman RD, Auen A, Holmburg CE, Pfeifer LM, Sack M, Young GT. Capsaicin cream 0,025% as monotherapy for osteoarthritis: a double-blind study. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*.1994;23(3):25-33
9. Amaya F, Shimosato G, Nagano M, Ueda M, Hashimoto S, Tanaka Y, Suzuki H, Tanaka M. NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia. *European Journal of Neuroscience*.2004;20:2303-2310
10. Apfel SC, Arezzo JC, Lipson L, Kessler JA. Nerve growth factor prevents experimental cisplatin neuropathy. *Annals in Neurology*.1992;31:76-80
11. Apfel SC, Kessler JA, Adornato BT, Litchy WJ, Sanders C, Rask CA. Recombinant human nerve growth factor in the treatment of diabetic polyneuropathy. *Neurology*.1998;51:695-702
12. Apkarian, AV. (1995) A thalamic model for true and referred visceral pain. In: *Visceral Pain. Progress in Pain Research and Management. Vol.5 pp.217-259. Ed. G. F.Gebhart. IASP Press, Seattle.*
13. Apkarian, AV. (1995) Thalamic anatomy and physiology of pain perception: connectivity, somato-visceral convergence and spatio-temporal dynamics of nociceptive information coding. In: *Forebrain Areas Involved in Pain Processing. pp.49-62. Eds. J.M. Besson, G. Guilbaud and H. Ollat. John Libbey Eurotext, Paris.*
14. Apkarian, AV. Functional imaging of pain: new insights regarding the role of cerebral cortex in human pain perception. *Neuroscience*.1995;7:279-293
15. Bach FW, Jensen TS, Kastrop J, Stigsby B, Dejgard A. The effect of intravenous lidocaine on nociceptive processing in diabetic neuropathy.*Pain*. 1990;40:29-34
16. Back, IN and Finlay I. Analgesic effect of topical opioids on painful skin ulcers. *Journal of pain symptom management*.1995;10:493

17. Baumann TK, Simone DA, Shain CN, LaMotte RH. Neurogenic hyperalgesia: the search for the primary afferent nerve fibers that contribute to capsaicin-induced pain and hyperalgesia. *Journal of Neurophysiology*.1991;66:212-227
18. Beitz AJ, Newman A, Shepard M, Ruggles T, Eikmeier L. A New Rodent Model of Hind Limb Penetrating Wound Injury Characterized by Continuous Primary and Secondary Hyperalgesia. *The Journal of Pain*.2004;5(1):26-37
19. Belmonte, C and Cervero, F. (1996) *Neurobiology of Nociceptors*. p. 531. Oxford University Press, Oxford.
20. Ben-Ari Y, Khazipov R, Leinekugel X, Caillard O, Gaiarsa JL. GABA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated „menage a trois“. *Trends in Neuroscience*.1997;20:523-529
21. Bentley, GN and Gent, JP. Neurokinin actions on substantia gelatinosa neurons in adult longitudinal spinal cord preparation.*Brain Research*.1995;673:101-111
22. Berkley, KJ and Hubscher, CH. Are there separate central nervous system pathways for touch and pain? *Nature Med*.1995;1:766-773
23. Bernard, JF. (1995) The spino-parabrachio-amygdaloid and –hypothalamic nociceptive pathways. In: *Forebrain Areas Involved in Pain Processing*. pp.27-48. Eds. J.M. Besson, G. Guilbaud and H. Ollat. John Libbey Eurotext, Paris.
24. Bernardini A, Sauer SK, Haberberger R, Fischer MJ, Reeh PW. Excitatory nicotinic and desensitizing muscarinic (M₂) effects on C-nociceptors in isolated rat skin. *Journal of Neuroscience*.2001;21:3295-3302
25. 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
26. Besson, JM and Chaouch, A. Peripheral and Spinal mechanisms of nociception. *Physiological Reviews*.1987;67:67-186
27. Besson, JM et al. (1995) *Forebrain Areas Involved in Pain Processing*. p.283. John Libbey Eurotext, Paris.
28. Bevan S, Hothi S, Hughes G, James IF and Rang HP. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neuron excitant capsaicin. *British Journal of Pharmacology*.1992;107:544-552
29. Birder, LA and Perl, ER. Expression of α_2 -adrenergic receptors in rat primary afferent neurones after peripheral nerve injury or inflammation. *Journal of Physiology(Lond)*.1999;515:533-542
30. Bland-Ward, PA and Humphrey, PPA. P2X receptors mediate ATP-induced primary nociceptive neurone activation. *Journal of Autonomic Nervous System*.2000;81:146-151
31. Brain, SD and Cambridge, H. Calcitonin gene-related peptide: vasoactive effects and potential therapeutic use. *Gen. Pharmacology*.1996;27:607-611
32. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*.1996;64:493-501
33. Buerkle H, Boschin M, Marcus MA, Brodner G, Wusten R, Van Aken H. Central and peripheral analgesia mediated by the acetylcholinesterase inhibitor neostigmine in the rat inflamed knee joint model. *Anesthesia analgesia*.1998;86:1027-1032
34. Buerkle H, Hüge V, Wolfgart M, Steinbeck J, Mertes N, Van Aken H, Prien T. Intra-articular clonidine analgesia after knee arthroscopy. *European Journal of Anesthesiology*.2000;17:295-299
35. Buerkle H, Schapsmeier M, Bantel C, Marcus MA, Wusten R, Van Aken H. Thermal and mechanical antinociceptive action of spinal vs peripherally administered

- clonidine in the rat inflamed knee joint model. *British Journal of Anesthesia*.1999;83:436-441
36. Burkey AR, Carstens E, Wenniger JJ, Tang J, Jasmin L. An opioidergic cortical antinociception triggering site in the agranular insular cortex of the rat that contributes to morphine antinociception. *Journal of Neuroscience*.1996;16:6612-6623
 37. Burnstock, G. P2X receptors in sensory neurones. *British Journal of Anesthesia*.2000;84:476-488
 38. Bushnell, MC. (1995) Thalamic processing of sensory-discriminative and affective-motivational dimensions of pain. In: *Forebrain Areas Involved in Pain Processing*. pp.49-62. Eds. J.M. Besson, G. Guilbaud and H. Ollat. John Libbey Eurotext, Paris.
 39. Calford, MB and Tweedale, R. Interhemispheric transfer of plasticity in the cerebral cortex. *Science*.1990;249:805-807
 40. Capsaicin Study Group. Treatment of painful diabetic neuropathy with topical capsaicin. A multi-centre, double-blind, vehicle-controlled study. *Archives of Internal Medicine*.1991;151:2225-2229
 41. Carlton, SM and Zhou, S. Attenuation of formalin-induced nociceptive behaviors following local peripheral injection of gabapentin. *Pain*.1998;76:201-207
 42. Carlton SM, Hargett GL, Coggeshall RE. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Neuroscience Letters*.1995;197:25-28
 43. Carlton SM, Zhou S, Coggeshall RE. Peripheral GABA_A receptors: evidence for peripheral primary afferent depolarization. *Neuroscience*.1999;93:713-722
 44. Carlton SM, Du J, Zhou S, Coggeshall RE. Tonic control of peripheral cutaneous nociceptors by somatostatin receptors. *Journal of Neuroscience*.2001;21:4042-4049
 45. Carpenter SE and Lynn B. Vascular and sensory responses of human skin to mild injury after topical treatment with capsaicin. *British Journal of Pharmacology*.1981;73:755-758
 46. Carter, RB and Francis, WR. Capsaicin desensitization to plasma extravasation evoked by antidromic C-fiber stimulation is not associated with antinociception in rats. *Neuroscience Letters*.1991;127:49-52
 47. Casey, KL and Minoshima S. (1995) The forebrain network for pain: an emerging image. In: *Forebrain Areas Involved in Pain Processing*. pp.49-62. Eds. J.M. Besson, G. Guilbaud and H. Ollat. John Libbey Eurotext, Paris.
 48. Casey KL, Minoshima S, Morrow TJ, Koeppe RA. Comparison of human cerebral activation patterns during cutaneous warmth, heat pain and deep cold pain. *Journal of Neurophysiology*. 1996;76:571-581
 49. Casey, KL. The sensory-limbic model of pain memory: connections from thalamus to the limbic system mediate the learned component of the affective dimension of pain. *Pain Forum*. 1997;6:22-43
 50. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*.2000;288:306-313
 51. 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
 52. Caterina, MJ and Julius, D. The Vanilloid Receptor: A Molecular Gateway to the Pain Pathway. *Annual Reviews in Neuroscience*.2001;24:487-517
 53. Cervero, F. What is a nociceptor-specific (class 3) cell? *Pain*.1995;62:123-124

54. Chabal C, Jacobson L, Mariano A, Chaney E, Britell CW. The use of oral mexilitine for the treatment of pain after peripheral nerve injury. *Anesthesiology*.1992;76:513-517
55. Chaplan SR, Pogrel JW, Yaksh TL. Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.1994;269:1117-1123
56. Chapman, V and Dickenson, AH. The spinal and peripheral roles of bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in the rat. *Journal of Pharmacology*.1992;219:427-433
57. Chen CC, England S, Akopian AN and Wood JN. 1998. A sensory neuron specific, proton gated ion channel. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA* 95:10240-10245
58. Cheshire, WP and Snyder, CR. Treatment of reflex sympathetic dystrophy with topical capsaicin. Case report. *Pain*.1990;42:307-311
59. Cho HJ, Kim DS, Lee NH, Kim JK, Lee KM, Han KS, Kang YN, Kim KJ. Changes in the α_2 -adrenergic receptor subtypes gene expression in rat dorsal horn ganglion in an experimental model of neuropathic pain. *Neuroreport*.1997;8:3119-3122
60. 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
61. 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
62. Chung K, Klein CM, Coggeshall RE. The receptive part of the primary afferent axon is most vulnerable to systemic capsaicin in adult rats. *Brain Research*.1990;511:222-226
63. Clement CI, Keay KA, Owler BK, Bandler R. Common patterns of increased and decreased c-fos expression in midbrain and pons evoked by noxious deep somatic and noxious visceral manipulations in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 1996;366:495-515
64. Coggeshall, RE and Carlton, SM. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. *Brain Research Reviews*.1997;24:28-66
65. Conn, PJ and Pin, JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual Reviews of Pharmacology*.1997;37:205-237
66. Cook AJ, Woolf CJ, Wall PD, McMahon SB. Dynamic receptive field plasticity in rat spinal cord dorsal horn following C primary afferent input. *Nature*. 1987;325:151-153
67. Craig AD, Bushnell MC, Zhang ET, Blomqvist A. A thalamic nucleus specific for pain and temperature sensation. *Nature*.1994;372:770-773
68. Craig AD, Wiegand SJ, Price JL. The thalamo-cortical projection of the nucleus submedius in the cat. *Journal of Comparative Neurology*.1982;296:28-48
69. Crowley KL, Flores JA, Hughes CN, Iacono RP. Clinical application of ketamine ointment in the treatment of sympathetically maintained pain. *Int.Journal of Pharmaceutical Compounding*.1998;2:122-127
70. Davis KD, Treede RD, Raja SN, Meyer RA, Campbell JN. Topical application of clonidine relieves hyperalgesia in patients with sympathetically maintained pain. *Pain*.1991;47:309-317

71. 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
72. Dejgard A, Petersen P, Kastrup J. Mexilitine for treatment of chronic painful diabetic neuropathy. *Lancet*.1988;1:9-11
73. DeLeo, JA and Yeziarski, RP. The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain*. 2001;90:1-6
74. Dessirier JM, O'Mahony M, Carstens E. Oral irritant effects of nicotine: psychophysical evidence for decreased sensation following repeated application and lack of cross-desensitization with capsaicin. *Chemical Senses*.1997;22:483-492
75. Devers, A and Galer, BS. Topical lidocaine patch relieves a variety of neuropathic pain conditions: an open-label study. *Clinical Journal of Pain*.2000;16:205-208
76. De Biasi S, Amadeo A, Spreafico R, Rustioni, A. Enrichment of glutamate immunoreactivity in lemniscal terminals of the ventropostero-lateral thalamic nucleus of the rat: an immunogold and WGA-HRP study. *Anatomical Records*.1994;240:131-140
77. Di Piero V, Fiacco F, Tombari D, Pantano P. Tonic pain: a SPECT study in normal subjects and cluster headache patients. *Pain*. 1997;70:185-191
78. Dini D, Bertelli G, Gozza A, Forno GG. Treatment of the post-mastectomy pain syndrome with topical capsaicin. *Pain*.1993;54(2):223-226
79. Doly S, Fischer J and Conrath M. The vanilloid receptor-1 (TRPV1) is expressed in some rat dorsal horn NK1 cells. *Brain Research*.2004;1004:203-207
80. Donnerer J, Schuligoi R, Stein C. Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. *Neuroscience*.1992;49:693-698
81. Draisci, G and Iadarola, MJ. Temporal analysis of increases in c – fos, preprodynorphin and preproenkephalin mRNAs in rat spinal cord. *Mol. Brain Research*.1989;6:31 – 37
82. Dray, A and Perkins M. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends in neuroscience*.1993;16:99-104
83. Dray, A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 1997;75:704-712
84. Dray A and Dickenson A. Capsaicin, nociception and pain. In: Wood JN, ed. *Capsaicin in the Study of Pain*. London: Academic Press, 1993;239-253
85. Dray A, Bettany J and Forster P. Actions of capsaicin on peripheral nociceptors of the neonatal rat spinal cord-tail in vitro: dependence of extracellular ions and independence of second messengers. *British Journal of Pharmacology*.1990;101:727-733
86. Duarte AM, Pospisilova E, Reilly E, Mujenda F, Hamaya Y, Strichartz GR. Reduction of Postincisional Allodynia by Subcutaneous Bupivacaine. *Anesthesiology*.2005;103:113-125
87. Dubner, R and Ruda, MA. Activity – dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends in Neuroscience*. 1992;15:96-103
88. Dubner, R. and Bennett, GJ. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Annual Reviews of Neuroscience*.1983;6:381-418
89. Dux M, Sann H, Schemann M, Jancso G. Changes in fibre population of the rat hairy skin following selective chemodenervation by capsaicin. *Cell Tissue Research*.1999;296:471-477

90. Eaton, SA and Salt, TE. (1995) The role of excitatory amino-acid receptor in thalamic nociception. In: *Forebrain Areas Involved in Pain Processing*. pp. 131-142. Eds. J.M. Besson, G. Guilbaud and H. Ollat. John Libbey Eurotext, Paris.
91. Eaton, SA and Salt, TE. Role of N-methyl-D-aspartate and metabotropic glutamate receptor in corticothalamic excitatory postsynaptic potentials in vivo. *Neuroscience*.1996;73:1-5
92. Edwards, WT. Intravenous lidocaine in the management of various chronic pain states. A review of 211 cases. *Regional Anesthesia*.1985;10:1-6
93. Epstein, JB and Macroe, JH. Topical application of capsaicin for treatment of oral neuropathic pain and trigeminal neuralgia. *Oral surgery Oral medicine Oral Pathology*.1994;77:135-140
94. Epstein JB, Grushka M, Le N. Topical clonidine for orofacial pain: a pilot study. *Journal of orofacial pain*.1997;11:346-352
95. Esser, MJ and Sawynok, J. Acute amitriptyline in a rat model of neuropathic pain: differential symptom and route effects. *Pain*.1999;80:643-653
96. Fang L, Wu J, Lin Q, Willis WD. Calcium – calmodulin – dependent protein kinase II contributes to spinal cord central sensitization. *Journal of Neuroscience*. 2002;22:4196-4204
97. Ferreira J, Campos MM, Araujo R, Bader M, Pesquero JB, Calixto JB. The use of kinin B(1) and B(2) receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. *Neuropharmacology*.2002;43:1188-1197
98. 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
99. Fletcher, EJ and Lodge, D. New developments in the molecular pharmacology of α -amino-3-dihydro-5-methyl-4-isoxale propionate and kainate receptors. *Pharmacological Therapy*.1996;70:65-89
100. Fox A, Kesingland A, Gentry C, McNair K, Patel S, Urban L, James I. The role of central and peripheral cannabinoid₁ receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain*.2001;92:91-100
101. Fuchs PN, Pappagallo M, Meyer RA. Topical EMLA pre-treatment fails to decrease the pain induced by 1% topical capsaicin. *Pain*.1999;80:637-642
102. Fusco BM, Geppetti P, Fanciullacci M, Sicuteri F. Local application of capsaicin for the treatment of cluster headache and idiopathic trigeminal neuralgia. *Cephalalgia*.1991;11:234-235
103. Gallar J, Pozo MA, Rebollo I, Belmonte C. Effects of capsaicin on corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.1990;31:1968-1974
104. 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, Messegue A, Ferrer-Montiel A. Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*.2002;99:2374-2379
105. 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
106. Garcia-Sanz N, Fernandez-Carvajal A, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Fajardo-Sanchez E, Fernandez-Ballester G, Ferrer-Montiel A. Identification of a

- tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *Journal of Neuroscience*.2004;24:5307-5314
107. Garry EM, Moss A, Delaney A, O'Neill F, Blakemore J, Bowen J, Husi H, Mitchell R, Grant SG, Fleetwood-Walker SM. Neuropathic sensitization of behavioral reflexes and spinal NMDA receptor/CaM kinase II interactions are disrupted in PSD-95 mutant mice. *Curr. Biology*. 2003;13:321-328
 108. Gentili M, Juhel A, Bonnet F. Peripheral analgesic effect of intra-articular clonidine. *Pain*.1996;64:593-596
 109. Giesler GJ, Katter JT, Dado RJ. Direct spinal pathways to the limbic system for nociceptive information. *Trends in Neuroscience*.1994;17:244-250
 110. Giesler, GJ. (1995) The spino-hypothalamic tract. In: *Forebrain Areas Involved in Pain Processing*. pp.49-62. Eds. J.M. Besson, G. Guilbaud and H. Ollat. John Libbey Eurotext, Paris.
 111. Giesler, GJ. Evidence of direct nociceptive projections from the spinal cord to the hypothalamus and telencephalon. *Neuroscience*.1995;7:253-261
 112. Gilchrist HD, Allard BL, Simone DA. Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats. *Pain*.1996;67:179-188
 113. Giordano, J and Roberts, LV. Peripherally administered serotonin 5-HT₃ receptor antagonists reduce inflammatory pain in rats. *European Journal of Pharmacology*.1989;170:83-86
 114. Giordano J, Daleo C, Sacks SM. Topical ondasetron attenuates nociceptive and inflammatory effects of intradermal capsaicin in humans. *European Journal of Pharmacology*.1998;354:R13-R14
 115. Gold MS, Levine JD, Correa AM. Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE₂ – induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *Journal of Neuroscience*. 1998;18:10345-10355
 116. Goswami C, Dreger M, Jahnke R, Bogen O, Gillen C, Hucho F. Identification and characterization of a Ca²⁺-sensitive interaction of the vanilloid receptor TRPV1 with tubulin. *Journal of Neurochemistry*.2004;91:1092-1103
 117. Gottrup H, Bach FW, Arendt-Nielsen L, Jensen TS. Peripheral lidocaine but not ketamine inhibits capsaicin-induced hyperalgesia in humans. *British Journal of Anesthesia*.2000;85:520-528
 118. 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.
 119. Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23(4):183-91. Review.
 120. Guo W, Zou S, Guan Y, Ikeda T, Tal M, Dubner R, Ren K. Tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor in the spinal cord during the development and maintenance of inflammatory hyperalgesia. *Journal of Neuroscience*. 2002;22:6208-6217
 121. Hall, JM. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacological Therapy*.1992;93:131-190

122. Handwerker, HO and Kobal, G. Psychophysiology of experimentally induced pain. *Physiological Reviews*. 1993;73:639-671
123. Handwerker HO and Reeh PW. 1991. Pain and inflammation. In *Proceedings of the 6th World Congress on Pain*, ed. MR Bond, JE Charlton, CJ Woolf, pp.59-70. Amsterdam:Elsevier
124. Harris, JA. Using c – fos as a Neural Marker of Pain. *Brain Research Bulletin*. 1998;45(1):1-8
125. Heyneman CA, Lawless-Liday C, Wall GC. Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases. A comparison. *Drugs*.2000;60:555-574
126. Honore P, Wismer CT, Mikusa J, Zhu CZ, Zhong C, Gauvin DM, Gomtsyan A, El Kouhen R, Lee CH, Marsh K, Sullivan JP, Faltynek CR, Jarvis MF. A – 425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)-urea], a novel transient receptor potential type V1 receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther*.2005;314:410-421
127. Hu HJ, Glauner KS, Gereau RW 4th. ERK integrates PKA and PKC signalling in superficial dorsal horn neurons I: modulation of A – type K currents. *Journal of Neurophysiology*. 2003;90:1671-1679
128. Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c – fos – like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*.1987;328:632-634
129. Hunter JC, Woodburn VL, Durieux C, Pettersson EK, Poat JA, Hughes J. C – fos antisense oligodeoxynucleotide increases formalin – induced nociception and regulates preprodynorphin expression. *Neuroscience*.1995;65:485-492
130. Hwang SJ, Burette A and Valtschanoff JG. VR1-positive primary afferents contact NK1-positive spinoparabrachial neurons. *The Journal of comparative neurology*.2003;460:255-265
131. Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.2000;97:6155-6160
132. Hwang, SJ and Valtschanoff, JG. Vanilloid receptor VR1 - positive afferents are distributed differently at different levels of the rat lumbar spinal cord. *Neuroscience Letters*.2003;349:41-44
133. Iadarola MJ, Douglass J, Civelli O, Naranjo JR. Differential activation of spinal cord dynorphin and enkephalin neurons during hyperalgesia: Evidence using cDNA hybridization. *Brain Research*.1988;455:205-212
134. Iadarola MJ, Brady LS, Draisci G, Dubner R. Enhancement of dynorphin gene expression in spinal cord following experimental inflammation: Stimulus specificity, behavioral parameters and opioid receptor binding. *Pain*.1988;35:313-326
135. Ikeda H, Heinke B, Ruscheweyh R, Sandkuhler J. Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science*. 2003;299:1237-1240
136. Inoue M, Kobayashi M, Kozaki S, Zimmer A, Ueda H. Nociceptin/orphanin FQ-induced nociceptive responses through substance P release from peripheral nerve endings in mice. *ProcNatlAcadSci USA*.1998; 95:10949-10953
137. Jackson DL, Graff CB, Richardson JD, Hargreaves KM. Glutamate participates in the periperipheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. *European Journal of Pharmacology*.1995;284:321-325
138. Jahnelt R, Dreger M, Gillen C, Bender O, Kurreck J and Hucho F. Biochemical characterization of the vanilloid receptor 1 expressed in dorsal root ganglia derived cell line. *European Journal of Biochemistry*.2001;268:5489-5496

139. Jakab B, Helyes Z, Varga A, Bolcskei K, Szabo A, Sandor K, Elekes K, Borzsei R, Keszthelyi D, Pinter E, Petho G, Nemeth J, Szolcsanyi J. Pharmacological characterization of the TRPV1 receptor antagonist JYL1421 (SC0030) in vitro and in vivo in the rat. *European Journal of Pharmacology*.2005;517:35-44
140. Jancso N, Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *British Journal of Pharmacology*.1967;31:138-151
141. Jancso G, Kiraly E and Jancso-Gabor A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature*.1977;270:741-743
142. Jensen, TS and Yaksh TL. Brainstem excitatory amino acid receptors in nociception: microinjection mapping and pharmacological characterization of glutamate-sensitive sites in the brainstem associated with algogenic behavior. *Neuroscience*.1992;46:535-547
143. Ji, RR and Rupp F. Phosphorylation of transcription factor CREB in rat spinal cord after formalin – induced hyperalgesia: relationship to c-fos induction. *Journal of Neuroscience*. 1997;17:1776-1785
144. Ji, RR and Woolf, CJ. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiology Dis*. 2001;8:1-10
145. Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends in neurosciences*.2003;26:696-705
146. Ji RR, Befort K, Brenner GJ, Woolf CJ. ERK MAP kinase activation in superficial spinal cord neurons induces prodynorphin and NK-1 upregulation and contributes to persistent inflammatory pain hypersensitivity. *Journal of Neuroscience*. 2002;22:478-485
147. Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ. Nociceptive – specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat. Neuroscience*. 1999;2:1114-1119
148. Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heta hyperalgesia. *Neuron*. 2002;36:57-68
149. Jordt SE, Tominaga M and Julius D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA* 97:8134-8135
150. Julius, D., Basbaum, AI. Molecular mechanisms of nociception.*Nature*.2001;413:203-210
151. 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
152. Jung J, Shin JS, Lee SY, Hwang SW, Koo J, Cho H, Oh U. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *Journal of Biological Chemistry*.2004;279:7048-7054
153. Kajander KC, Sahara Y, Iadarola MJ, Bennett GJ. Dynorphin increases in the dorsal spinal cord in rats with a painful peripheral neuropathy. *Peptides*.1990;11:719-728
154. Kalso E, Smith L, McQuay HJ, Andrew Moore R. No pain, no gain: clinical excellence and scientific rigour – lessons learned from IA morphine. *Pain*.2002;98:269-275
155. Karlsten R, Gordh T, Post C. Local antinociceptive and hyperalgesic effects in the formalin test after peripheral administration of adenosine analogues in mice. *Pharmacology toxcology*.1992;70:434-438

156. Kedei N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ and Blumberg PM. Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *Journal of Biological Chemistry*.2001;276:28613-28619
157. Kelly, S and Chapman V. Effects of peripheral nerve injury on functional spinal VR1 receptors. *Neuroreport*. 2002;13:1147-1150
158. Khasar SG, Green PG, Chou B, Levine JD. Peripheral nociceptive effects of α_2 -adrenergic receptor agonists in the rat. *Neuroscience*.1995;66:427-432
159. 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
160. Kingery WS, Agashe GS, Guo TZ, Davies MF, Clark JD, Maze M. Capsaicin sensitive afferents mediate the development of heat hyperalgesia and hindpaw edema after sciatic section in rats. *Neuroscience Letters*.2002;318:39-43
161. Kolesnikov, Y and Pasternak, GW. Topical opioids in mice: analgesia and reversal of tolerance by a topical N-methyl-D-aspartate antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.1999;290:247-252
162. Kurkccuoglu, N and Alaybeyi, F. Topical capsaicin for psoriasis. *British Journal of Dermatology*.1990;123:549-550
163. Kwak J, Wang MH, Hwang SW, Kim TY, Lee SY, Oh U. Intracellular ATP increases capsaicin-activated channel activity by interacting with nucleotide-binding domains. *Journal of Neuroscience*.2000;20:8298-8304
164. Lamotte RH, Shian CN, Simone DA and Tsai EP. Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms. *Journal of Neurophysiology*.1991;66:190-211
165. Larsen R. (2004) *Anestezie*. 7. vydání.str. 165-171. Grada Publishing, a.s.
166. Lawand NB, Willis WD, Westlund KN. Excitatory amino acid receptor involvement in peripheral nociceptive transmission in rats. *European Journal of Pharmacology*.1997;324:169-177
167. Lenz FA, Gracely RH, Zirh AT, Romanoski AJ, Dougherty PM. The sensory-limbic model of pain memory. *Pain Forum*. 1997;6:22-31
168. Lenz, FA. (1995) The region posterior inferior to the human thalamic principal sensory nucleus (Vc) may contribute to the affective dimension of pain through thalamo-corticolimbic connections. In: *Forebrain Areas Involved in Pain Processing*. pp.49-62. Eds. J.M. Besson, G. Guilbaud and H. Ollat. John Libbey Eurotext, Paris.
169. Levine JD, Taiwo YO, Collins SD, Tam JK. Noradrenaline hyperalgesia is mediated through interaction with sympathetic post-ganglionic neurone terminals rather than activation of primary afferent nociceptors. *Nature(Lond)*.1986;323:158-160
170. Li C, Peoples RW and Weight FF. Enhancement of ATP-activated current by protons in dorsal root ganglion neurons. *European Journal of Physiology*. 1997;433:446-454
171. Likar R, Schafer M, Paulak F, Sittl R, Pipam W, Schalk H, Geissler D, Bernatzky G. Intraarticular morphine analgesia in chronic pain patients with osteoarthritis. *Anesthesia analgesia*.1997;84:1313-1317
172. Likar R, Sittl R, Gragger K, Pipam W, Blatnig H, Breschan C, Schalk HV, Stein C, Schafer M. Peripheral morphine analgesia in dental surgery. *Pain*.1998;76:145-150
173. Liu CN, Devor M, Waxman SG, Kocsis JD. Subthreshold oscillations induced by spinal nerve injury in dissociated muscle and cutaneous afferents of mouse DRG. *Journal of Neurophysiology*. 2002;87:2009-2017

174. 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
175. Liu, X and Sandkuhler, J. Long – term potentiation of C – fiber – evoked potentials in the rat spinal dorsal horn is prevented by spinal N – methyl – D – aspartic acid receptor blockage. *Neuroscience Letters*. 1995;191:43-46
176. Liu, XJ and Sawynok, J. Peripheral antihyperalgesic effects by adenosine A₁ receptor agonists and inhibitors of adenosine metabolism in a rat neuropathic pain model. *Analgesia*.2000;5:19-29
177. Lonze, BE and Ginty, DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. 2002;35:605-623
178. Luo ZD, Chaplan SR, Higuera ES, Sorkin LS, Stauderman KA, Williams ME, Yaksh TL. Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve – injured rats. *Journal of Neuroscience*. 2001;21:1868-1875
179. Lynn B, Ye W, Cotsell B. The actions of capsaicin applied topically to the skin of the rat on C-fiber afferents, antidromic vasodilatation and substance P levels. *British Journal of Pharmacology*.1992;107:400-406
180. Lynn, B. Capsaicin: actions on C-fiber afferents that may be involved in itch. *Skin Pharmacology*.1992;5:9-13
181. Ma, QP and Woolf, CJ. Basal and touch – evoked Fos – like immunoreactivity during experimental inflammation in the rat. *Pain*.1996;67:307-316
182. Ma, Q-P and Woolf, CJ. Progressive tactile hypersensitivity: an inflammation – induced incremental increase in the excitability of the spinal cord. *Pain*. 1996;67:97-106
183. Macrae, WA. Chronic pain after surgery. *British Journal of Anesthesia*.2001;87(1):88-98
184. Malmberg, AB and Yaksh, TL. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.1992;263:136-146
185. 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
186. Mandadi S, Numazaki M, Tominaga M, Bhat MB, Armati PJ, Roufogalis BD. Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV1 ion channels.*Cell Calcium*.2004;35(5):471-478
187. Mannion RJ, Costigan M, Decosterd I, Amaya F, Ma QP, Holstege JC, Ji RR, Acheson A, Lindsay RM, Wilkinson GA, Woolf CJ. Neurotrophins: peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus – induced inflammatory pain hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:9385-9390
188. Marks DR, Rapoport A, Padla D, Weeks R, Rosum R, Sheftell F, Arrowsmith F. A double-blind placebo-controlled trial of intranasal capsaicin for cluster headache. *Cephalgia*.1993;13:114-116
189. Mastermann, DL and Cummings, JL. Frontal-subcortical circuits: the anatomic basis of executive, social and motivated behaviors. *Journal of Psychopharmacology*.1997;11:107-114
190. McArthur JC, Yiannoutsos C, Simpson DM, Adornato BT, Singer EJ, Hollander H, Marra C, Rubin M, Cohen BA, Tucker T, Navia BA, Schifitto G, Katzenstein D, Rask C, Zaborski L, Smith ME, Shriver S, Millar L, Clifford DB,

- Karalnik JJ. A phase II trial of nerve growth factor for sensory neuropathy associated with HIV infection. *Neurology*.2000;54:1080-1088
191. McCarson KE and Krause, JE. NK – 1 and NK – 3 type tachykinin receptor mRNA expression in the rat spinal cord dorsal horn in increased during adjuvant or formalin – induced nociception. *Journal of Neuroscience*. 1994;14:712-720
 192. McCarthy, GM and McCarty, DJ. Effect of topical capsaicin in the painful osteoarthritis of the hands. *Journal of Rheumatology*.1992;19:604-607
 193. McCarty, DJ. Treatment of pain due to fibromyalgia with topical capsaicin: a pilot study. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*.1994;23(3):41-47
 194. McCleskey, EW and Gold, MS. Ion channels of nociception. *Annual Review of Physiology*. 1999;61:835-56
 195. McCormack K, Kidd BL, Morris V. Assay of topically administered ibuprofen using a model of post-injury hypersensitivity.*European Journal of Clinical Pharmacology*.2000;56:459-462
 196. McMahan, SB and Bennett, DLH. (1997) Growth factors and pain. In: *The Pharmacology of Pain. Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol.130, pp.135-166. Eds. A. Dickenson and J.M. Besson. Springer-Verlag, Berlin.
 197. McMahan, SB and Kotzenburg, M. Itching for an explanation. *Trends in Neurosciences*.1992;15:497-501
 198. McMahan, SB and Priestly, JV. Peripheral neuropathies and neurotrophic factors: animal models and clinical perspectives. *Current opinions in Neurobiology*.1995;5:616-624
 199. McMahan SB, Lewin G, Bloom SR. The consequences of long-term topical capsaicin application in the rat. *Pain*.1991;44:301-310
 200. Meller ST, Gebhart GF, Maves TJ. Neonatal capsaicin treatment prevents the development of the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. *Pain*.1992;51:317-321
 201. Mendell, LM and Wall, PD. Response of dorsal cord cells to peripheral cutaneous unmyelinated fibers. *Nature*. 1965;206:97-99
 202. Menterey, D and Besson, JD. Electrophysiological characteristics of dorsal horn cell in rats with cutaneous inflammation resulting from chronic arthritis. *Pain*.1982;13:343-364
 203. Meyer, RA. (1994) Peripheral neural mechanisms of nociception. In: *Textbook of Pain*. pp.13-44. Eds. P.D.Wall and R. Melczak. Churchill-Livingstone, Edinburgh.
 204. Millan MJ, Millan MH, Pilcher CW, Czlonkowski A, Herz A, Colpaert FC. Spinal cord dynorphin may modulate nociception via a μ -opioid receptor in chronic arthritis. *Brain Research*.1885;340:156-159
 205. Millan, MJ. Multiple opioid systems and pain: a review.*Pain*.1986;26:303-349
 206. Millan, MJ. The Induction of Pain. *Progress in Neurobiology*.1999;57:1-164
 207. Mohapatra, DP and Nau, C. Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry*.2003;278:50080-50090
 208. 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
 209. Montell, C and Rubin, GM. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*.1989;2(4):1313-1323
 210. Montell, C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005; 2005; re3.

211. Moore RA, Tramer MR, Carroll D, Wiffen PJ, McQuay HJ. Quantitative systematic review of topically applied non-steroidal anti-inflammatory drugs. *BMJ*.1998;316:333-338
212. Morello CM, Leckband SG, Stoner CP, Moorhouse DF, Sahagian GA. Randomized double-blind study comparing the efficacy of gabapentin with amitriptyline on diabetic peripheral neuropathy pain. *Archives of Internal Medicine*.1999;159:1931-1937
213. Munglani, R and Hunt, SP. Molecular biology of pain. *British Journal of Anesthesia*. 1995;75:186-192
214. Nahin RL, Hylden JL, Iadarola MJ, Dubner R. Peripheral inflammation is associated with increased dynorphin immunoreactivity in both projection and local circuit neuron in the superficial dorsal horn of the rat lumbar spinal cord. *Neuroscience Letters*.1989;96:241-252
215. Nakamura-Craig, M and Gill, BK. Effect of neurokinin A, substance P and calcitonin gene related peptide in peripheral hyperalgesia in the rat paw. *Neuroscience Letters*.1991;124:49-51
216. Neumann S, Doubell TP, Leslie T, Woolf CJ. Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurones. *Nature*. 1996;384:360-364
217. Noguchi K, Morita Y, Kiyama H, Ono K, Tohyama M. A noxious stimulus induces the preprotachykinin-A gene expression in the rat dorsal root ganglion: a quantitative study using in situ hybridization histochemistry. *Brain research*. 1988;464:31-35
218. Noguchi K, Kowalski K, Traub R, Solodkin A, Iadarola MJ, Ruda MA. Dynorphin expression and Fos – like immunoreactivity following inflammation induced hyperalgesia are colocalized in spinal cord neurons. *Mol. Brain Research*.1991;10:227-233
219. 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
220. Nozaki-Taguchi, N and Yaksh, TL. Characterization of the antihyperalgesic action of a novel peripheral mu-opioid receptor agonist – loperamide. *Anesthesiology*. 1999;90:225-234
221. Numazaki M, Tominaga T, Takeuchi K, Murayama N, Toyooka H, Tominaga M. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.2003;100:8002-8006
222. Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *J Biol Chem*. 2002;277:13375-13378
223. Owolabi JB, Rizkalla G, Tehim A, Ross GM, Riopelle RJ, Kamboj R, Ossipov M, Bian D, Wegert S, Porreca F, Lee DK. Characterization of antiallodynic actions of ALE-0540, a novel nerve growth factor receptor antagonist, in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*.1999;289:1271-1276
224. 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
225. Pappagallo M, Gaspardone A, Tomai F, Iamele M, Crea F, Gioffre PA. Analgesic effect of bamiphylline on pain induced by intradermal injection of adenosine. *Pain*.1993;53:199-204

226. Peikert A, Hentrich M, Ochs G. Topical 0,025% capsaicin in chronic post-herpetic neuralgia: efficacy, predictors of response and long-term course. *Journal of Neurology*.1991;238:452-456
227. Perkins, MN and Campbell, EA. Capsazepine reversal of the analgesic action of capsaicin in vivo. *British Journal of Pharmacology*.1992;107:329-333
228. Pertovaara, A and Wei, H. Peripheral effects of morphine in neuropathic rats: role of sympathetic postganglionic nerve fibers. *European Journal of Pharmacology*.2001;429:139-145
229. Pogatzki EM, Niemeier JS, Brennan TJ. Persistent secondary hyperalgesia after gastrocnemius incision in the rat. *European Journal of Pain*.2002;6:295-305
230. Pogatzki-Zahn EM, Shimizu I, Caterina M, Raja SN. Heat hyperalgesia after incision requires TRPV1 and is distinct from pure inflammatory pain. *Pain*.2005;115:296-307
231. Premkumar LS, Qi ZH, Van Buren J, Raisinghani M. Enhancement of potency and efficacy of NADA by PKC-mediated phosphorylation of vanilloid receptor. *Journal of Neurophysiology*.2004;91:1442-1449
232. Prescott, ED and Julius, D. A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science*.2003;300:1284-1288
233. Price, DD. Central neural mechanisms of normal and abnormal pain states.In: Fields HL, Liebskind JC, eds. *Pharmacological Approaches to the Treatment of Chronic Pain: New Concepts and Critical Issues*. Seattle:IASP Press, 1994;61-84
234. Ralston, HJ. (1995) The organization of spinothalamic tract circuitry in the macaque and the role of GABA information processing. In: *Forebrain Areas Involved in Pain Processing*. pp.49-62. Eds. J.M. Besson, G. Guilbaud and H. Ollat. John Libbey Eurotext, Paris.
235. Ramer MS, Thompson SW, McMahon SB. Causes and consequences of sympathetic basket formation ub dorsal root ganglion. *Pain (Suppl 6)*.1999;S111-S120
236. Rami HK and Gunthorpe MJ. The therapeutic potential of TRPV1 (VR1) antagonists: clinical answers await. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategie*. 2004; 1(1):97-104
237. Randic M, Jiang MC, Cerne R. Long – term potentiation and long – term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. *Journal of Neuroscience*. 1993;13:5228-5241
238. Rang, HP. Peripherally acting analgesic agents, in *Novel Aspects of Pain Management: Opioids and Beyond* (Sawynok J and Cowan A eds). 1999; pp 95-115; Wiley-Liss, New York.
239. Rashid H, Inoue M, Bakoshi S, Ueda H. Increased Expression of Vanilloid Receptor 1 on Myelinated Primary Afferent Neurons Contributes to the Antihyperalgesic Effect of Capsaicin Cream in Diabetic Neuropathic Pain in Mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.2003;306:709-717
240. Ren K, Thomas DA, Dubner R. Nerve growth factor alleviates a painful peripheral neuropathy in rats. *Brain Research*.1995;699:286-292
241. Rendell MS, Johnson ML, Smith D, Finney D, Capp C, Lammers R, Lancaster S. Skin blood flow response in the rat model of wound healing: Expression of vasoactive factors. *Journal of Surgical Research*.2002;107:8-26
242. Reuben, SS and Connely NR. Postoperative analgesia for outpatient arthroscopic knee surgery with intraarticular clonidine. *Anesthesia analgesia*.1999;88:729-733

243. Rice AS, Farquhar-Smith WP, Nagy I. Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids*.2002;66:243-256
244. Richardson BP, Engel G, Donatsch P, Stadler PA. Identification of serotonin M-receptor subtypes and their specific blockade by a new class of drugs. *Nature(Lond)*.1985;316:126-131
245. Richardson JD, Kilo S, Hargreaves KM. Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB₁ receptors. *Pain*.1998;75:111-119
246. Robbins WR, Staats PS, Levine J, Fields HL, Allen RW, Campbell JN, Pappagallo M. Treatment of intractable pain with topical large-dose capsaicin: preliminary report. *Anesthesia analgesia*.1998;86:579-583
247. Roberson ED, English JD, Adams JP, Selcher JC, Kondratieck C, Sweatt JD. The mitogen – activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 1999;19:4337-4348
248. Rowbotham MC, Reisner-Keller LA, Fields HL. Both intravenous lidocaine and morphine reduce the pain of postherpetic neuralgia. *Neurology*.1991;41:1024-1028
249. Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ. Interleukin - 1 β – mediated induction of Cox – 2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature*. 2001;410:471-475
250. Samad TA, Sapirstein A, Woolf CJ. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. *Trends in Molecular Medicine*. 2002;8:390-396
251. Sandkuhler, J and Liu, X. Induction of long – term potentiation at spinal synapses by noxious stimulation or nerve injury. *European Journal of Neuroscience*. 1998;10:2476-2480
252. Sandkuhler, J. Learning and memory in pain pathways. *Pain*. 2000;88:113-118
253. Sawynok, J and Reid, A. Peripheral adenosine 5'-triphosphate enhances nociception in the formalin test via activation of a purinergic P_{2X} receptor. *European Journal of Pharmacology*.1997;330:115-121
254. Sawynok J, Esser MJ, Reid AR. Antidepressants as analgesics. An overview of central and peripheral mechanisms of action. *Journal of psychiatry and Neuroscience*.2000;26:21-28
255. Sawynok J, Esser MJ, Reid AR. Peripheral antinociceptive actions of desipramine and fluoxetine in an inflammatory and neuropathic pain test in the rat. *Pain*.1999;82:149-158
256. Sawynok, J. Adenosine receptor activation and nociception. *European Journal of Pharmacology*.1998;347:1-11
257. Sawynok, J. Topical and Peripherally Acting Analgesics. *Pharmacological reviews*.2003;55(1):1-20
258. Scheffler NM, Sheitel PL, Lipton MN. Treatment of painful diabetic neuropathy with capsaicin 0,075%. *Journal of the American Podiatric Medical Association*.1991;81:288-293
259. Schmelz, M and Kress, M. Topical acetylsalicylate attenuates capsaicin induced pain, flare and allodynia but not thermal hyperalgesia. *Neuroscience Letters*.1996;214:72-74
260. Scholz, J and Woolf, CJ. Can we conquer pain? *Nature neuroscience supplement*.2002;5:1062-1067

261. Shir, Y and Seltzer, Z. A-fibers mediate mechanical hyperaesthesia and allodynia and C-fibers mediate thermal hyperalgesia in a new model of causalgiform pain disorders in rats. *Neuroscience Letters*.1990;115:62-67
262. Shu, X and Mendell, LM. Nerve growth factor acutely sensitizes the response of adult rat sensory neurons to capsaicin. *Neuroscience Letters*. 1999;274:159-162
263. Simone DA, Baumann TK and Lamotte RH. Dose-dependent pain and mechanical hyperalgesia in humans after intradermal injection of capsaicin. *Pain*.1989;38:99-107
264. Simone, DA and Ochoa, J. Early and late effects of prolonged topical capsaicin on cutaneous sensibility and neurogenic vasodilatation in humans. *Pain*.1991;47:285-294
265. 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
266. Simone DA, Baumann TK, Collins JG, LaMotte RH. Sensitization of cat dorsal horn neurons to innocuous mechanical stimulation after intradermal injection of capsaicin. *Brain Research*. 1989;486:185-189
267. Sivilotti LG, Thompson SW, Woolf CJ. The rate of rise of the cumulative depolarization evoked by repetitive stimulation of small-calibre afferents is a predictor of action potential windup in rat spinal neurons in vitro. *Journal of Neurophysiology*. 1993;69:1621-1631
268. Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P and Davis JB. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature*.2002;418:186-190
269. Soares, JC and Mann JJ. The anatomy of mood disorders. Review of structural neuroimaging studies. *Biol. Psychiatry*. 1997;41:86-106
270. Steen KH, Wegner H, Meller ST. Analgesic profile of peroral and topical ketoprofen upon low pH-induced muscle pain. *Pain*.2001;93:23-33
271. 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
272. Steen KH, Reeh PW, Kreysel HW. Topical acetylsalicylic, salicylic acid and indomethacin suppresses pain from experimental tissue acidosis in human skin. *Pain*.1995;62:339-347
273. Stein, C and Schäfer, M. Peripheral opioid analgesia: basic and clinical aspects. *Seminars in Anesthesia*. 1997;16:112-116
274. Stein A, Yassouridis A, Szopko C, Helmke K, Stein C. Intraarticular morphine versus dexamethasone in chronic arthritis. *Pain*. 1999;83:525-532
275. Stein C, Schäfer M, Cabot PJ, Carter L, Zhang Q, Zhou L, Gaisor M. Peripheral opioid analgesia. *Pain Reviews*.1997;4:173-187
276. Stow PJ, Glynn CJ, Minor B. EMLA cream in the treatment of postherpetic neuralgia. Efficacy and pharmacokinetic profile. *Pain*.1989;39:301-305
277. Su, X and Gebhart, GF. Effects of tricyclic antidepressants on mechanosensitive pelvic nerve afferent fibers innervating the rat colon. *Pain*.1998;76:105-114
278. 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
279. 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
 280. Szolcsanyi J, Sandor Z, Petho G, Varga A, Bolcskei K, Almasi R, Riedl Z, Hajos G, Czeh G. Direct evidence for activation and desensitization of the capsaicin receptor by N – oleoyldopamine on TRPV1 – transfected cell line in gene deleted mice and in the rat. *Neuroscience Letters*.2004;361:155-158
 281. Taiwo, YO and Levine, JD. Direct cutaneous hyperalgesia induced by adenosine. *Neuroscience*.1990;38:757-762
 282. Taiwo, YO and Levine, JD. Serotonin is a directly-acting-hyperalgesic agent in the rat. *Neuroscience*.1992;48:485-490
 283. Thompson SW, King AE, Woolf CJ. Activity - dependent changes in rat ventral horn neurons in vitro: summation of prolonged afferent evoked postsynaptic depolarizations produce a D-AVP sensitive windup. *European Journal of Neuroscience*. 1990;2:638-649
 284. 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
 285. Tracey DJ, Cunningham JE, Romm MA. Peripheral hyperalgesia in experimental neuropathy: exacerbation by neuropeptide Y. *Brain Research*.1995; 699:245-254
 286. Treede RD, Meyer RA, Campbell JN. Comparison of heat and mechanical receptive fields of cutaneous C-fiber nociceptors in monkey. *Journal of Neurophysiology*.1990;64:1502-1513
 287. Tsuda M, Koizumi S, Kita A, Shigemoto Y, Ueno S, Inoue K. Mechanical allodynia caused by intraplantar injection of P2X receptor agonist in rats: involvement of heteromeric P2X_{2/3} receptor signaling in capsaicin-insensitive primary afferent neurones. *Journal of neuroscience*.2000;20:RC90
 288. Tverskoy M, Oren M, Vaskovich M, Dashkovsky I, Kissin I. Ketamine enhances local anesthetic and analgesic effects of bupivacaine by a peripheral mechanism: a study in postoperative patients. *Neuroscience Letters*.1996;215:5-8
 289. Twillman RK, Long TD, Cathers TA, Mueller DW. Treatment of painful skin ulcers with topical opioids. *Journal of pain symptom management*.1999;17:288-292
 290. Ulrich, D. and Huguenard, JR. GABA (A)-receptor mediated rebound burst firing and burst shunting in thalamus. *Journal of Neurophysiology*.1997;78:1748-1751
 291. Vaile, JH and Davis, P. Topical NSAIDs for musculoskeletal conditions. A review of the literature. *Drugs*.1998;56:783-799
 292. Valtschanoff JG, Rustioni A, Guo A and Hwang SJ. Vanilloid receptor VR1 is both presynaptic and postsynaptic in the superficial laminae of the rat dorsal horn. *The Journal of comparative neurology*.2001;436:225-235
 293. Vandermeulen, EP and Brennan, TJ. Alterations in ascending dorsal horn neurons by a surgical incision in the rat foot. *Anesthesiology*.2000;93:1294-1302
 294. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*. 1998;38:98-120
 295. Varga A, Nemeth J, Szabo A, McDougall JJ, Zhang C, Elekes K, Pinter E, Szolcsanyi J, Helyes Z. Effects of the novel TRPV1 receptor antagonist SB 366791 in vitro and in vivo in the rat. *Neuroscience Letters*.2005;385:138-142

296. 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
297. Vyklicky L, Lyfenko A, Kuffler DP, Vlachova V. Vanilloid receptor TRPV1 is not activated by vanilloids applied intracellularly. *Neuroreport*.2003;14:1061-1065
298. Wahl P, Foged C, Tullin S, Thomsen C. Iodo-resiniferatoxin, a new potent vanilloid receptor antagonist. *Molecular Pharmacology*.2001;59:9-15
299. Waldmann, R. Proton – gated cation channels – neuronal acid sensors in the central and peripheral nervous system. *Adv Exp Med Biol*. 2001;502:293-304
300. Walker K, Perkins M, Dray A. Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem Int*. 1995;26:1-16
301. Walker K, Reeve A, Bowes M, Winter J, Wotherspoon G, Davis A, Schmid P, Gasparini F, Kuhn R, Urban L. mGlu5 receptors and nociceptive function II. mGlu5 receptors functionally expressed on peripheral sensory neurons mediate inflammatory hyperalgesia. *Neuropharmacology*.2001;40:10-19
302. 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
303. Wallengreen J and Chen, D. Local skin lesions in the rat after subcutaneous deposition of capsaicin. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*.2002;15:154-165
304. 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
305. Warncke T, Jorum E, Stubhaug A. Local treatment with the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist ketamine, inhibits development of secondary hyperalgesia in man by peripheral action. *Neuroscience Letters*.1997;227:1-4
306. Watson, CPN and Evans, RJ. The postmastectomy pain syndrome and topical capsaicin: a randomized trial. *Pain*.1992;51(3):375-379
307. Watson CP, Tyler KL, Bickers DR, Millikan LE, Smith S, Coleman E. A randomized vehicle-controlled trial of topical capsaicin in the treatment of post-herpetic neuralgia. *Clinical Therapeutics*.1993;15:510-526
308. Watson CP, Evans RJ, Watt VR. Post-herpetic neuralgia and topical capsaicin. *Pain*.1988;33:333-340
309. Watson CP, Evans RJ, Watt VR. The post-mastectomy pain syndrome and the effect of topical capsaicin. *Pain*.1989;38:177-186
310. Weisman, MH. Preliminary findings on the role of neuropeptide suppression by topical agents in the management of rheumatoid arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*.1994;23(3):18-24
311. White, DM and Cousins, MJ. Effect of subcutaneous administration of calcium channel blockers on nerve injury-induced hyperalgesia. *Brain Research*.1998;801:50-58
312. Willis, WD and Coggeshall, RE. (1991) *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord*. 2nd edn. p.595. Plenum Press, New York.
313. Willis, WD and Coggeshall, RE. (2004) *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord*. 3rd edn. Vol. 1 pp.91- 101. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
314. Willis, WD and Coggeshall, RE. (2004) *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord*. 3rd edn. Vol. 2 pp.612 - 623. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
315. Winter J, Bevan S, Campbell EA. Capsaicin and pain mechanisms. *British Journal of Anesthesia*. 1995;75:157-168

316. Wood JN, Coote PR, Minhas A, Mullaney I, McNeill M and Burgess GM. Capsaicin-induced ion fluxes increase cyclic GMP but not cyclic AMP levels in rat sensory neurone in culture. *Journal of Neurochemistry*. 1989;53:1203-1211
317. Wood, RM. Ketamine for pain in hospice patients. *Int.Journal of Pharmaceutical Compounding*.2000;4:253-254
318. Woolf, CJ and King, AE. Dynamic alterations in the cutaneous mechanoreceptive fields of dorsal horn neurons in the rat spinal cord. *Journal of Neuroscience*. 1990;10:2717-2726
319. Woolf, CJ and Salter, MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*. 2000;288:1765-1769
320. Woolf, CJ. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: Implications for diagnosis and therapy. *Life Sciences*.2004;74:2605-2610
321. Woolf, CJ. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. *Annals of Internal Medicine*.2004;140:441-451
322. Xiao, W-H and Bennett, GJ. Synthetic ω -conopeptides applied to the site of nerve injury suppress neuropathic pains in rats. *Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics*.1995;274:666-672
323. Yaksh TL and Rudy TA. Chronic Catheterization of the Spinal Subarachnoid Space. *Physiology and Behavior*.1976;17:1031-1036
324. Yamamoto T and Yaksh TL. Effects of intrathecal capsaicin and an NK-1 antagonist, CP, 96-345, on the thermal hyperalgesia observed following unilateral constriction of the sciatic nerve in the rat. *Pain*.1992;51:329-334
325. Yang LC, Chen LM, Wang CJ, Buerkle H. Postoperative analgesia by intra-articular neostigmine in patients undergoing knee arthroscopy. *Anesthesiology*.1998;88:334-339
326. 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
327. Yoshimura M and Yonehara N. Influence of capsaicin cream in rats with peripheral neuropathy. *Pharmacological Research*.2001;44(2):105-111
328. Yoshimura M, Yonehara N, Ito T, Kawai Y, Tamura T. Effects of Topically Applied Capsaicin Cream on Neurogenic Inflammation and Thermal Sensitivity in Rats. *Japanese Journal of Pharmacology*.2000;82:116-121
329. Yu XM, Askalan R, Keil GJ 2nd, Salter MW. NMDA channel regulation by channel-associated protein tyrosine kinase Src. *Science*. 1997;275:674-678
330. Zahn, PK and Brennan, TJ. Incision - induced changes in receptive field properties of rat dorsal horn neurons. *Anesthesiology*.1999;91:772-785
331. Zahn, PK and Brennan TJ. Primary and Secondary Hyperalgesia in a Rat Model for Human Postoperative Pain. *Anesthesiology*.1999;90:863-872
332. Zhou L, Zhang Q, Stein C, Schafer M. Contribution of opioid receptors on primary afferent versus sympathetic neurons to peripheral opioid analgesia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.1998;286:1000-1006
333. Zhou XF, Deng YS, Xian CJ, Zhong JH. Neurotrophins from dorsal root ganglia trigger allodynia after spinal nerve injury in rats. *European Journal of Neuroscience*.2000;12:100-105
334. Zou X, Lin Q, Willis WD. Enhanced phosphorylation of NMDA receptor 1 subunits in spinal cord dorsal horn and spinothalamic tract neurons after intradermal injection of capsaicin in rats. *Journal of Neuroscience*. 2000;20:6989-6997

335. 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

10. 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