

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie



Vliv stárnutí, ročního období a teploty na práh bolesti u laboratorního potkana.

Effect of aging, season and temperature on pain threshold in laboratory rat.

Bc. Jana Vítková

Praha 2013

Vedoucí diplomové práce: doc. MVDr. Šimon Vaculín Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

Podpis

Poděkování

Za neocenitelnou a nezištnou pomoc, cenné rady a připomínky při vypracování této práce děkuji Doc. MVDr. Šimonu Vaculínovi PhD., a také děkuji svým rodičům, kteří mě ve studiu podporovali. Dále bych chtěla poděkovat GAUK č. 607012, z kterého se část výzkumu financovala.

Jana Vítková

Abstrakt

S bolestí se ve svém životě setkal snad každý živočich. Provádí se mnoho výzkumů v laboratorních podmínkách, abychom zjistili, jak bolest funguje a jak ji dokázat zmírnit či využít v náš prospěch. Naše práce se zaměřila na vliv stárnutí, ročního období, aklimatizace a okolní teploty na termální a mechanický práh bolesti u laboratorního potkana. Zajímalo nás, jak tyto faktory ovlivňují výsledky jednotlivých výzkumů. Ve všech experimentech byli používáni samci potkanů kmene Wistar. Termální práh bolesti byl měřen pomocí latence obranné reakce tří částí těla: předních, zadních končetin a ocasu. Mechanický práh bolesti byl měřen pomocí von Freyových vláken a teplota pokožky IR teploměrem. Naše výsledky ukázaly, že: (i) stárnutí organismu ovlivňuje vnímání termálního prahu bolesti; (ii) při stárnutí i změně teploty se vyskytuje kraniokaudální distribuce nocicepční citlivosti – přední končetiny mají nižší latenci než zadní končetiny; (iii) termální práh bolesti závisí nepřímo na okolní teplotě a teplotě pokožky; (iv) nevyskytuje se vliv opakovaného měření na nocicepční práh u všech třech částí těla; (v) zadní končetiny a ocas jsou více citlivé na změny okolní teploty než přední končetiny; (vi) mechanický práh bolesti se nemění při změně okolní teploty. Tyto nálezy poukázaly na značnou důležitost zaznamenávání laboratorních podmínek experimentů a jejich následný vliv na výsledky.

Klíčová slova:

termální práh bolesti, věk, sezóna, aklimatizace, okolní teplota, teplota pokožky, tepelný práh bolesti

Abstract

Every living creature meets with pain up to these days. Many researches are made in labour conditions, we try to find out how the pain works and how we can suppress it or how we can utilize it in our welfare. Our work is focused on the effect of aging, season, acclimatization and ambient temperature on thermal and mechanic pain threshold in laboratory rats. We were interested how these factors affect the results of the research. Adult male Wistar rats were used in all experiments. Thermal pain thresholds were measured by withdrawal reaction of three body sites: forelimbs, hind limbs and tail. Mechanic pain thresholds were measured by von Frey filaments and a skin temperature was measured by IR thermometer, both of three body sites. Our results demonstrate that : (i) aging have effect on nociceptive pain threshold; (ii) there is presence of cranio-caudal distribution of nociceptive sensitivity in aging and in changing of ambient temperature – forelimbs have lower latency than hind limbs; (iii) thermal pain threshold depends indirectly on ambient and skin temperature; (iv) there was no effect of repeated measurement on nociceptive thresholds of the three body sites; (v) hind limbs and tails are more sensitive to changes of ambient temperature than forepaws; (vi) mechanic pain threshold not change with changes of temperature. These findings show the importance of recording laboratory conditions in experiments and their influence of the results.

Keywords: thermal pain threshold, age, season, acclimatization, ambient temperature, skin temperature, mechanic pain threshold.

Obsah

Obsah.....	6
Seznam zkratk:.....	8
1. Úvod	9
2. Literární přehled	10
2.1 Bolest.....	10
2.2 Fyziologie bolesti	10
2.3 Práh bolesti.....	13
2.4 Bolest a stáří	14
2.4.1 Změny zapříčiněné stárnutím.....	14
2.5 Tepelný práh bolesti u starých zvířat	15
2.6 Tepelný práh bolesti ve stáří u lidí	16
2.7 Vliv ročního období na vnímání bolesti u potkanů a lidí	16
2.8 Vliv okolní teploty na termální práh bolesti u potkanů.....	17
2.9 Vliv okolní teploty na termální práh bolesti u lidí	17
2.10 Vliv okolní teploty na mechanický práh bolesti.....	18
3. Cíl diplomové práce	19
4. Materiál a metody.....	20
4.1Materiál	20
4.1.1 Zvířata.....	20
4.1.2 Prahy bolesti	20
4.1.3Měření teploty pokožky	22
4.2 Metody	22
4.2.1 Vliv stáří	22
4.2.2 Vliv sezóny	23
4.2.3 Statistické metody 1	23
4.2.4 Vliv okolní teploty a teploty pokožky	24
4.2.5 Statistické metody 2	25
5. Výsledky.....	26
5.1 Vliv stáří	26
5.2 Vliv sezóny	29

5.3 Vliv aklimatizace, okolní teploty a teploty kůže	31
5.3.1 Vliv aklimatizace	31
5.3.2 Vliv opakovaného měření.....	31
5.3.3 Vliv okolní teploty.....	32
5.3.4 Vliv teploty kůže	36
5.3.5 Mechanický práh bolesti	37
6. Diskuze.....	39
6.1 Měření prahu bolesti.....	39
6.2 Vliv stáří.....	39
6.3 Vliv sezóny.....	44
6.4 Vliv aklimatizace, okolní teploty a teploty kůže potkana.....	44
7. Závěr.....	47
8. Literatura.....	48

Seznam zkratk:

ANOVA	analýza variance
AM	aktivačně – motivační složka
CNS	centrální nervová soustava
GABA	γ amino máselná kyselina
KE	kognitivně evaluační složka
LSD test	least significant difference test
MV	motoricky vegetativní složka
NGF	nerve growth factor
NK1	neurokinin 1
PAG	periaqueductální šed'
RF	retikulární formace
SD	senzoricko – diskriminační složka
TrkA	transforming tyrosine kinase protein A

1. Úvod

Bolest během života zažije každý z nás, provází nás napříč životem od mládí až po nejvyšší stáří. Starořecký filosof Díogenés ze Sinopé řekl: „ Člověk je učeň, bolest je jeho mistrem. Nic se nenaučíš bez mistra.“ Existuje několik způsobů jak bolest kantifikovat. U lidí se používá na měření intenzity bolesti vizuální analogová a číselná škála (VAS), kde pacient na úsečce zaznamenává svoji bolest od 0 (žádná) až do 10 (nejhorší bolest jakou si dokáže představit. Dalšími způsoby, využívanými jak u lidí, tak i u zvířat, je měření prahu bolesti nebo tolerance na bolest. Práh bolesti je okamžik, kdy bolest začíná být patrná, oproti tomu tolerance na bolest je bolest, kterou je schopný ještě jedinec vydržet.

Naše práce se zabývala tepelným a mechanickým prahem bolesti. Jedním z typů prahů bolesti, které se dají měřit, je termální (tepelný) práh bolesti. Většinou se výsledky, získané pomocí měření termálního prahu bolesti, používají k vyhodnocování účinku analgetik a změny prahu bolesti se interpretují jako analgetický, nebo hyperalgetický účinek. Avšak výsledky prací věnujících se tomu, jak moc laboratorní podmínky a parametry testovaného organismu ovlivňují prováděný pokus, jsou rozporuplné. Důkladné studium vlivu okolních parametrů na tepelný práh bolesti tak může poskytnout doporučení, za jakých podmínek prahy měřit, abychom předešli chybám.

2. Literární přehled

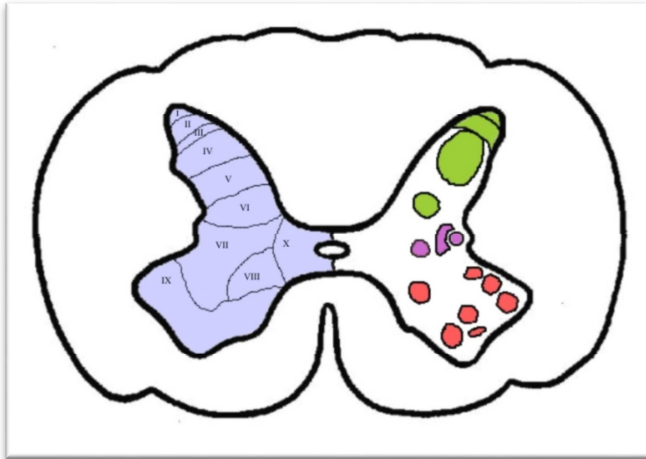
2.1 Bolest

Bolest je definována jako nepříjemná sensorická a emocionální zkušenost, spojená s akutním nebo potenciálním poškozením tkání nebo popisovanou výrazu takového poškození (IASP 1979). Česká Společnost pro studium a léčbu bolesti definici obohacuje o subjektivitu. Díky subjektivitě je značně obtížné bolest přesněji definovat. Bolest je nepostradatelná pro organismus, brání ho před poškozením či ho informuje o tom, že k němu může v nejbližší době dojít. Bolest nám pomáhá při diagnóze některých chorob či nás informuje o stavu hojení poraněné tkáně. Ovšem nežádoucí začíná být, když ztratí svoji varovnou funkci a stane se běžnou součástí života.

2.2 Fyziologie bolesti

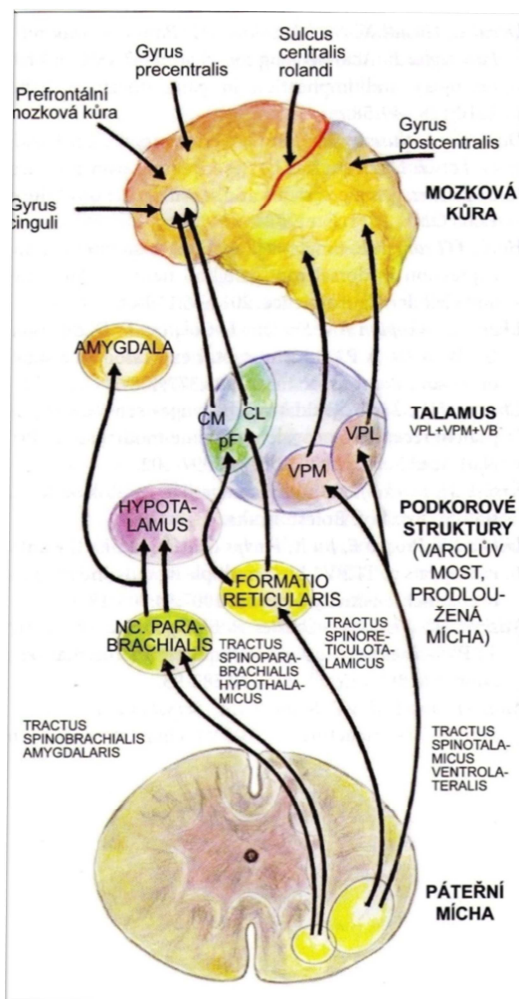
Dráha bolesti začíná na receptorech bolesti – nociceptorech. Nociceptory se nacházejí na volných nervových zakončeních ve většině tkání (vyjma např. mozkové tkáně apod.). Nociceptory rozdělujeme na termální, mechanické, chemické a polymodální. Termální receptory můžeme rozdělit na dva druhy – reagující na teplo nebo na chlad. Chladové receptory mají prahovou hodnotu mezi 8 a 10°C (Cain et al. 2001). Práh tepelných receptorů se nachází mezi 35 a 45°C, což je teplota, při které může nastat poškození tkáně (Simone a Kajander 1997). Chemické nociceptory reagují na výskyt daných látek ve svém blízkém okolí (serotonin, histamin, kapaicin, bradykinin) (Raja et al. 1994). Mechanické receptory odpovídají především na mechanické dráždění (píchnutí, tlak, tah a říznutí). Polymodální nociceptory reagují na různé druhy dráždění, pokud je dosaženo intenzity, kdy již hrozí poškození tkáně. Specifickým typem jsou spící nociceptory, které odpovídají až po senzitivaci (například u zánětu), do té doby neodpovídají na žádný podnět (McMahon a Koltzenburg 1990).

Ze somatických nociceptorů (receptory v kůži, kloubech a svalech) je bolest vedena dvěma odlišnými typy nervových vláken (nemyelinizovanými C vlákny, vedoucími pomalou tupou bolest, a myelinizovanými A δ vlákny, vedoucími rychlou ostrou bolest) do zadních rohů míšních. Zadní rohy míšních jsou rozděleny do 10 Rexedových vrstev (Obr 1). A δ vlákna končí zejména v Rexedových vrstvách I, II a III., kdežto C vlákna končí v I, II, V a VIII Rexedových vrstvách (Albe – Fessard 1996). Rexedovy vrstvy I, II a V jsou specifické



Obr 1. Rexedovy vrstvy (převzato z <http://www.nan.upol.cz/neuro/cd51.html>)

a spinothalamický (Millan 1999) (Obr 2). Spino-parabrachiální systém se přepojuje v parabrachiálních jádrech a končí buď v hypothalamu nebo v amygdale (spino-parabrachio-



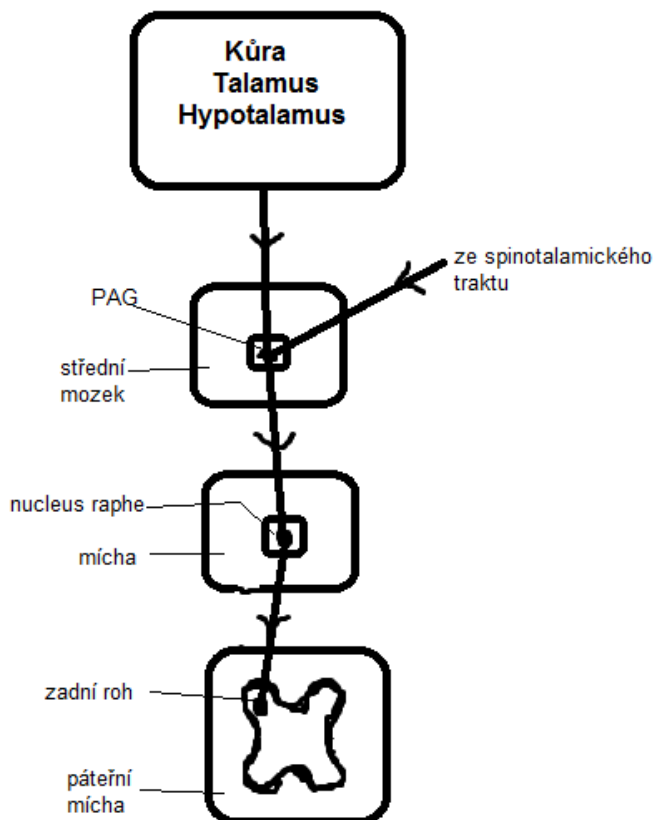
Obr 2. Dráhy bolesti (převzato z Rokyta et al. (2012))

na nocicepci, kdežto na vrstvách II a V mohou být přijímány i nebolestivé informace, jež se zapojují do modulace bolesti. V uvedených vrstvách dle Rexeda (zadního rohu míšního) se dráha bolesti se přepojuje na druhý neuron, překříží střední linii na kontralaterální stranu a dále pokračuje vzestupně anterolaterálním míšním traktem. Na základě supraspinálního zakončení jej můžeme dělit na trakt spino-parabrachiální

amygdalární a spino-parabrachio-hypotalamická dráha). Spino-thalamický systém můžeme dále rozčlenit na dvě dráhy – jedna se nepřepojuje v retikulární formaci (RF), druhá ano. První dráha je fylogeneticky mladší a nazývá se neospinothalamická. Vede přímo do laterálních thalamických jader a poté do korových center, zvláště pak do somatosenzorické kůry I a II. Druhá dráha je fylogeneticky starší a nazývá se paleospinothalamická. Přepojuje se v RF, poté pokračuje do mediálního thalamu a končí zejména v předním cingulu a insule. Na základě korového umístění můžeme bolest rozdělit na různé složky podle výkonných funkcí daných oblastí: afektivně – motivační (AM), sensoricko – diskriminační (SD), kognitivně evaluační (KE) a složku motoricky vegetativní (Treede et al. 1999). Cingulární kůra, hypothalamus, insula a kůra jsou odpovědné za AF, somatosenzorická kůra I a II za SD,

hypotalamus a amygdala za vegetativní projevy a v neposlední řadě za KE jsou zodpovědné nespecifické asociační oblasti mozkové kůry, ve kterých se projikují veškeré informace ze všech výše uvedených center.

Organismus je však vyzbrojen i mechanismem, který dovede bolest tlumit. Tlumicí systém spolupracuje se vzestupnými drahami bolesti a společně tak tvoří jeden celek. Občas je důležité bolest potlačit (např. bolest se projeví, až když se živočich dostane mimo život ohrožující situaci). Zde převažuje tlumivý systém nad vzestupným systémem bolesti. Klíčovým mozkovým centrem, účastnícím se tlumení bolesti, je periakveduktální šed' v mezencephalu (PAG) (Obr 3). PAG získává informace jak z limbického systému (afektivní vegetativní složka) tak z laminy I (odbočka vzestupné dráhy) (Willis 1988). Z PAGu vedou neurony do rostroventrální míchy a zde začínají sestupné inhibiční dráhy (noradrenergní



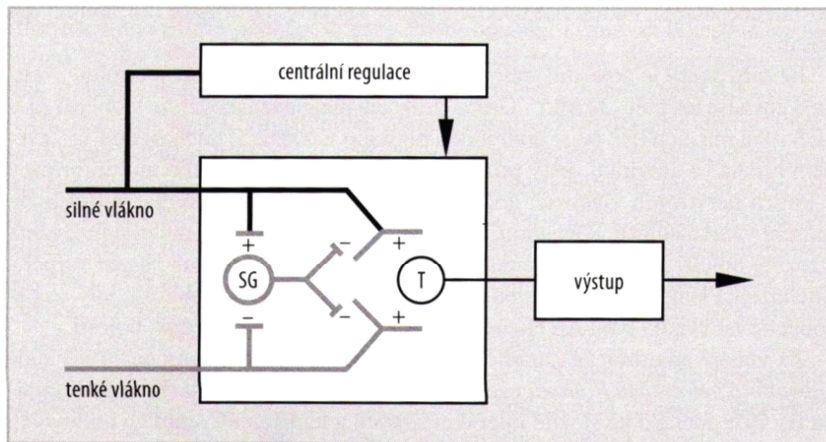
Obr. 3. Sestupné dráhy

První mechanismus redukuje uvolňování excitačních mediátorů (Substance P a glutamát) z prvního neuronu na základě presynaptické inhibice. Druhý je založen na výlevu inhibičních mediátorů (GABA, endorfinů a enkefalinů), jejich interakcí s receptory postsynaptické membrány druhém neuronu a jeho následnou inhibicí.

či serotonergní). Sestupné (descendentní) inhibiční dráhy jsou aktivovány mechanismem disinhibice. V normálním stavu (nebolestivý stav) jsou sestupné dráhy pod vlivem inhibičního neuronu, na kterém se však nachází četné opioidní receptory. Když jsou tyto receptory aktivovány, je inhibiční neuron utlumen a sestupné dráhy jsou aktivovány. Sestupné dráhy tak aktivují v zadních rožích míšních další inhibiční interneuron, jenž přímo tlumí vzestupnou dráhu bolesti v místě přepojení prvního neuronu na druhý.

Zde mohou nastat dva typy tlumení bolesti (Fields a Basbaum 1994).

Existuje ještě jeden mechanismus pro modulaci bolesti, který je znám a využíván již velmi dlouhou dobu, např. východními kulturami ve formě akupunktury. Jedná se o vrátkový



Obr.4 Schéma vrátkové teorie bolesti (převzato z Opavský (2011))

buňka, která se nachází v V. Rexedovy vrstvě. Při běžné situaci vede dotykovou informaci. Když se organismus střetne s bolestivým stimulem, přepne se do bolestivého módu a vede bolest. Přepnout do nebolestivého módu se však dá díky silné stimulaci dotykových receptorů, nacházejících se na A β vláknech.

2.3 Práh bolesti

Jedním z mnoha způsobů, jak se dá kvantifikovat bolest, je měření prahu bolesti. Práh bolesti je moment, kdy se bolest stává rozeznatelnou. Nejčastěji se používá k měření podnět tepelný, mechanický či elektrický a měří se latence reakce nebo intenzita stimulu vyvolávajícího reakci. V naší práci jsme užili podnět tepelný a mechanický. K měření mechanického prahu bolesti se využívá tupého hrotu, který je přiložen na kůži. Pomocí hrotu se zvyšuje tlak na kůži, dokud není vyvolán práh bolesti. Těmto hrotům, které měří mechanický práh bolesti, se říká Analgesy Meter. Analgesy Meter využívá Randall Selitto metoda, při které je končetina zvířete vložena mezi dva tupé kužely. Kužely se k sobě postupně přibližují a díky tomu se u zvířete vyvolává bolest, která je zaznamenávána na stupnici přístroje. Tento přístroj se většinou využívá při měření účinku analgetik (Randall a Selitto, 1957). V mnoha laboratořích, jako i v naší, se používají k měření mechanického prahu bolesti (zejména pro zjištění alodynies) von Freyova vlákna. Von Freyova vlákna jsou pojmenována po německém fyziologovi Maxu von Freyovi (1852 – 1932). Původně byly vytvořeny ze zvířecích chlupů a lidských vlasů o různých průměrech. Dnes se místo vlasů využívají nylonová monofilamenta o různých průměrech, která jsou upevněna v plastických

držátkách (Schmidt a Gerhart 2013). Monofilamenta se přikládají k dané končetině a pomocí vyvíjení tlaku se zjišťuje, jaký průměr monofilamenta již vyvolá reakci zvířete.

K měření tepelného prahu se jako první používal dololimetr zkonstruovaný J.Hardym, H.Wolffe a H. Goodell v roce 1940. Dololimetr pracoval na principu 100W žárovky, vysílající tepelnou energii na začerněnou pokožku. Tepelný impulz z této aparatury, způsobuje ostrý bodavý pocit (Sherman a Robillard 1964). Princip měření tepelného prahu zůstal u moderních přístrojů tentýž, jenom se pokožka již nečerní. Tepelný paprsek je zaměřen na neosrstěnou část těla – plantu v případě plantar testu. Paprsek zespondu svítí, dokad' zvíře končetinou neucukne. Dalšími metodami, kterými se dá měřit tepelný práh bolesti, je tail-flick test nebo hot plate test. U tail-flick testu se měří latence reakce ocasu, na rozdíl od plantar testu jde však paprsek shora a zvíře je imobilizované, proto může hrozit ovlivnění výsledků vlivem stresu. U hot plate testu se měří latence končetin. Potkani se dají na horkou plotýnku a pozoruje se, kdy si začnou tlapy lízat nebo nadzvedat.

2.4 Bolest a stárí

Stárnutí světové populace je jedním z největších sociálních problémů této doby. Podle Světové Zdravotnické Organizace (duben 2012) se mezi lety 2000 a 2050 množství lidí starších 60 let zdvojnásobí z 11% na 22% světové populace – předpokládá se až nárůst z 605 milionů lidí na 2 biliony mezi těmito lety a množství lidí starších 80 let se zečtyřnásobí až na předpokládaných 400 milionů lidí v tomto období. Zvyšování věku populace je zapříčiněno zdokonalováním zdravotní péče, přispívající k nižší úmrtnosti (nejstarším člověkem podle statistik je Jeanne Louise Calmentová, která se dožila 122 let).

2.4.1 Změny zapříčiněné stárnutím

Stárnutí je naprogramovaný biologický děj. V roce 1993 byl americkými vědci objeven gen, který se spolupodílí na stárnutí moučného červa – *daf 2* (Rokyta et al. 2012). Při vyřazení tohoto genu se červům prodloužil život na dvojnásobek. Podobný gen jako je *daf 2* u moučného červa nalezneme i u člověka na lokusu chromosomu 4 – těmto genům se říká geny dlouhověkosti „longevity genes“ (Puca et al. 2001). Všichni živočichové včetně *homo sapiens* jsou biologicky navrženi tak, aby se za život stihli několikrát rozmnožit a předat všechny své znalosti a dovednosti svým potomkům. Pokud jsou všechny úkoly splněny, není již z biologického hlediska žádný důvod k ponechání živočicha naživu. To nám ukazuje, že stárnutí a smrt je biologický proces, kterému se nedá uniknout.

Ve studiích zaměřených na stárnoucí zvířata a lidi bylo nalezeno mnoho strukturních, biochemických a funkčních změn v centrálním i periferním nervovém systému. V periferních nervech se např. prokázalo, že se zvyšujícím se věkem dochází k poklesu hustoty myelinizovaných a nemyelinizovaných vláken až o 50% (Verdu et al. 2000). Při vedení bolestivého vzruchu pomocí A δ vláken se úbytek myelinizovaných pochev nervových vláken projevuje slabým zpomalením vedení bolesti. Na nemyelinizovaná C vlákna degenerace myelinizovaných pochev žádný vliv nemá. Do vedení bolesti v periferním nervovém systému zasahují také myelinizovaná A α vlákna, která se účastní vrátkování. A α vlákna při vrátkování tlumí vedení bolesti, a tak, pokud jsou tato vlákna demyelinizovaná, hůře plní svojí funkci, což může mít za následek převahu bolestivého vedení. A tak, přestože se s věkem snižuje množství nervových vláken v organismu, může dojít ke zvyšování vnímání bolesti.

I v centrální nervové soustavě (CNS) byly zaznamenány podobné degenerativní změny. V CNS se nachází většinou myelinizovaná vlákna, která se však od dvacátého roku života každé desetiletí demyelinizují až o 10% (Marner et al. 2003). Kromě strukturních změn axonů dochází s postupujícím věkem ke snižování množství neurotransmiterů a jejich příslušných receptorů. Například se snižuje množství substance P v zadních rozích míšních (Buck et al. 1981). S postupujícím věkem taktéž dochází k poklesu terminálů serotonergních a noradrenergických neuronů v lamině I. Zhoršená funkce těchto drah má za následek klesající účinnost inhibičního systému, a to může být další z mechanismů, který přispívá k vyššímu výskytu bolesti ve stáří (Gibson 2003).

Na stárnutí organismu se částečně podílejí různé odpadní látky a produkty metabolismu, které se hromadí s věkem v těle (Harman 2003). Z těchto látek mají asi největší vliv na vnímání bolesti hromadící se volné radikály v těle. Volné radikály vytvářejí systematické chyby v tkáních, které se mohou projevovat jako bolestivé syndromy (Hague et al. 1994). Některé studie navíc ukázali přímou souvislost mezi nahromaděnými volnými radikály a vznikem bolestivé informace. Zvláště neuropatickou a zánětlivou bolest lze potlačit aplikací scavengerů volných radikálů. To poukazuje na zvýšení produkce volných radikálů při bolesti, ale také jejich přímou účast na vedení bolesti (Kim et al. 2004, Eisenberg et al. 2008).

2.5 Tepelný práh bolesti u starých zvířat

Tepelným prahem bolesti na končetinách u starých laboratorních zvířat se dodnes moc prací nezabývalo. Většina prací se zaměřuje na pokusy prováděné pomocí tail-flick testu

na ocasu potkanů. Ocas potkanů je však jejich hlavní termoregulační orgán, a tak se tepelný práh bolesti na ocasu liší od tepelného práhu bolesti měřeného na končetinách, které úlohu termoregulace nemají. Tepelný práh bolesti na končetinách zkoumal Yezieski et al. (2010) na potkaních samicích. Prokázal hyperalgezií – zvýšenou vnímavost na bolest při vystavení teplotám 42 a 44.5 °C na hot plate testu. Svým výzkumem se snažil dokázat záměnu vláken (u mladých jedinců více vedené A δ vlákny, u starých se pomocí C vláken), které vedou přednostně bolest u starších potkanů. Hess et al. (1981) dosáhl odlišných výsledků – prokázal zvyšování termálních prahů bolesti s věkem, tedy hypoalgezií. Ve své práci využíval samce potkanů ve věku od 2 do 24 měsíců.

Pokusů prováděných pomocí tail-flick testu na ocasech potkanů je o poznání více. Gagliese a Melzack (2000) zaznamenal ve svém souhrnném review celkově 15 studií. Výsledky ve studiích se však od sebe značně lišily. Devět z nich nezaznamenalo žádnou změnu s věkem při měření termálních prahů bolesti. Čtyři z nich potvrdily zvýšení tepelného práhu a dvě práce snížení tepelného práhu bolesti s věkem. Další pokusy pomocí tail-flick testu prováděli i Jourdan et al. (2000) na potkaních samicích ve věku od 4-29 měsíců. Ve své práci potvrdili většinové mínění – tepelný práh bolesti je neměnný se zvyšujícím se věkem. Kvůli malému množství prací zabývajících se tepelným prahem bolesti na končetinách a lehce rozporuplným výsledkům měření termálních prahů na ocasu, jsme se rozhodli naši práci zacílit, jak na termální prahy bolesti na končetinách, tak i na ocasu.

2.6 Tepelný práh bolesti ve stáří u lidí

Tepelnému práhu bolesti u lidí se věnovalo hned několik studií. Některé studie zaznamenali pokles tepelného práhu bolesti, jiné nárůst a další neměnný práh bolesti. Vzrůst tepelného práhu bolesti u starých lidí zaznamenal Heft a Robinson (2010) a také Sherman a Robillard (1964). Výzkum, který nezaznamenal žádnou změnu v prazích bolesti, provedl Edward a Fillingim v roce 2001 na dvou skupinách dobrovolníků (průměrný věk 22,4 a 62,2 let). Podobný výsledek zaznamenal také Lautenbacher et al. (2005). Naproti tomu snížení tepelného práhu bolesti zaznamenal Huang et al. (2010). Jeho výzkumná skupina zahrnovala jedince od 23 let do 87 let.

2.7 Vliv ročního období na vnímání bolesti u potkanů a lidí

Vlivem ročního období na práh bolesti se zabývala Yamamotová et al. (2008). Ve své práci zjistili zvýšený práh bolesti v zimě oproti jiným ročním obdobím. Dále nenašli žádný vliv

data narození na nocicepci. Pokusy byly prováděny na 180 ženách ve věku 23 ± 6 let. I další článek ukazuje na vliv sezóny na vnímání bolesti (Chesler et al. 2002). Vlivem ročního období na práh bolesti se moc prací do dnešní doby nezabývalo, a tak jsme se rozhodli na tento efekt částečně zacílit.

2.8 Vliv okolní teploty na termální práh bolesti u potkanů

Termální práh bolesti se měří pravidelně v laboratořích věnující se bolesti. Pár z nich se však zaměřilo i na to, zdali měřené hodnoty jsou ovlivnitelné i okolním prostředím a případně jak. Nejčastější otázkou bylo, jak moc ovlivňuje okolní teplota či teplota pokožky měřený termální práh bolesti.

Touto tématikou se zabývali zejména Tjølsen a Hole, kteří zjistili, že kromě okolní teploty mohou tepelný práh bolesti ovlivnit i teplota kůže, teplota okolí, stres a další faktory, které ovlivňují vasomotoriku zvířat. Ve svém pokusu na vliv okolní teploty a teploty pokožky na tail-flick test, a hot plate test zjistili, že když se zvýší teplota kůže při měření, latence se zkrátí a výsledky poté mohou být vykládány špatně jako hyperalgezie – snížený práh bolesti, při snížení teploty pokožky zase jako analgezie. Hot plate test je náchylný na stejný problém jako tail-flick test – na změnu teploty pokožky (Tjølsen a Hole 1992, 1993). Sawamura et al. (2002) ve své práci prokázal signifikantní korelaci mezi tail-flick testem a teplotou kůže na ocasu. Latence tail-flick testu klesla při zvyšující se teplotě pokožky ocasu. Berge et al. 1988, Schoenfeld et al. 1985 se rovněž zabývali efektem okolní teploty na latenci u ocasu. Také v jejich pracích se prokázala negativní korelace mezi okolní teplotou a latencí u ocasu. Naopak Lichtman et al. (1993) popsali, že teplota pokožky má zanedbatelný vliv na tail-flick test, a tím pádem je zbytečné monitorovat změnu teploty ocasu.

Owens et al. (2002) se zaměřili na to, jaká by měla být teplota ocasu při měření. Zjistili, že vhodná teplota je $37,8 \pm 0,6^\circ\text{C}$.

Zatím není známa žádná studie zaměřená na efekt okolní teploty či teploty kůže na tepelný práh bolesti na končetinách potkana. Proto se naše práce zaměřila na tuto neznámou tématiku.

2.9 Vliv okolní teploty na termální práh bolesti u lidí

U lidí se na výzkum tepelného prahu bolesti zaměřili Pertovaara et al. (1996). Došli k závěru, že kritická teplota vyvolávající tepelný práh bolesti je nezávislá na teplotě kůže

u lidí. Avšak teplota kůže je velmi důležitý zdroj pro změnu citlivosti na tepelné záření – při zvýšení doby trvání tepelného stimulu, se kritická teplota pro vyvolání bolesti sníží – to může být vyvoláno časovou sumací. Na vliv okolní teploty u lidí se zaměřila skupina Strigia (2000). Okolní teplota ovlivnila jak vnímání tepelného stimulu, tak studeného stimulu. Stimulační intenzita byla nižší v chladném prostředí než v neutrálním, mezi neutrálním a teplým okolním prostředím se nenašla žádná změna.

2.10 Vliv okolní teploty na mechanický práh bolesti

Vlivu okolní teploty na mechanický práh bolesti se věnovala Pertovaara et al. (1996). Jedna z prací zaměřených na mechanický práh u lidí zjistila, že mechanický práh bolesti není ovlivněn změnou teploty (Pertovaara et al. 1996). Mechanickému prahu pod vlivem okolní teploty se nevěnuje moc pozornosti.

3. Cíl diplomové práce

Diplomová práce je zaměřena metodologicky, a to na měření tepelného a mechanického prahu bolesti u potkaních samců. Cílem diplomové práce bylo zjistit přirozené faktory, které mohou ovlivnit výsledky laboratorního měření tepelného prahu bolesti. Hlavním úkolem bylo se zaměřit na vliv stárnutí potkanů, ročního období a mikroklimatu na tepelný práh bolesti. Výsledky z výzkumu by mohli poukázat na případné okolnosti, kterých by si měl vědec všímat, aby jeho měření byla přesnější.

4. Materiál a metody

4.1 Materiál

Metodika ustájení zvířat a měření prahu bolesti byla u všech pokusů stejná, a proto jsou společně popsány na začátku.

4.1.1 Zvířata



Obr 5. potkan kmene Wistar

K měření termálních prahů bolesti byli použiti samci potkanů outbredního albinotického kmene Wistar (Obr 5.). Všechna zvířata byla chována ve skupinách v chovných nádobách s volným

přístupem k vodě a krmivu.

Teplota vzduchu byla udržována na 22 ± 2 °C a relativní vlhkosti v rozmezí 40-80%. Režim světlo-tma byl nastaven na 12:12 hodin.

Pokusy byly vedeny v souladu s návodem Etické komise Mezinárodní společnosti pro studium bolesti (Zimmermann, 1983) a byly schváleny Odbornou komisí pro laboratorní zvířata 3. LF UK.

4.1.2 Prahy bolesti

Termální práh bolesti byl měřen pomocí plantar – testu (od firmy Ugo Basile) (Obr 6).



Obr 6. Plantar-test

Plantar – test (Hargreavesova metoda) nám umožňuje rozpoznávat periferně zprostředkovanou reakci na tepelnou stimulaci.

Potkani jsou umístěni do třech plastických boxů (27×17×14 cm) s možností volného pohybu po nich. Po vymizení průzkumné činnosti vyvolané novým prostředím (cca 5 minut), je světelný tepelný zdroj umístěn pod skleněnou podlahu a ručně namířen přímo pod požadovanou část těla potkana (tlapky – na chodidlovou část, ocas – 2,5cm od špičky ocasu). Po zapnutí světla se automaticky spustí stopky, které měří dobu, než potkan ucukne s tlapkou nebo ocasem. Intenzita paprsku byla nastavena na 40 (FS1) nebo 90, v souladu s předešlými pokusem a územ laboratoře, aby průměrná latence prvních, klidových měření odpovědi byla kolem 7 s. Cutoff hodnota byla nastavena na 22 s, aby se předešlo případnému poškození tkání. Naměřený čas pak určuje latenci k danému tepelnému podnětu. U každého potkana jsme měřili hodnotu z každé končetiny a ocasu (KONČETINY) třikrát. Rozestup mezi jednotlivými měřeními byl asi 5 minut. V průběhu měření byl hlídán čistý povrch boxů, v případě vymočení či vyloučení exkrementů byl plastický box vytřen a řádně vysušen, aby nedocházelo k případnému zkreslování výsledků díky změně povrchu boxů. Pro další statistické zpracování byly použity průměry těchto tří hodnot.

Mechanický práh bolesti jsme měřili pomocí von Freyových vláken (Obr. 7) na končetinách potkanů. Von Freyova vlákna jsou vyrobena z nylonových vláken o různých velikostech od 1,65 do 6,65. Každá velikost je schopna vyvolat mechanické podráždění o určité síle (viz tabulka 1). K měření jsme na základě předchozích zkušeností v naší



Obr 7. von Freyova vlákna

laboratoři, používali vlákna od 5,18 do 6,65. Při měření se von Frey vlákno přitlačilo ke končetině (u přední končetiny mezi zápěstní kůstky druhého a třetího prstu, u zadní končetiny na nárt hned za koncem prstů) tak, aby se vlákno ohnulo do tvaru písmene U. Pokud při použití vlákna potkan ucuknul tlapkou, bylo měření znovu opakováno. Jestliže potkan ucuknul tlapkou po použití vlákna o stejném

průměru při opakování ještě dvakrát za sebou, byla tloušťka vlákna považována za odpovídající mechanickému prahu bolesti a hodnota byla zaznamenána. Pokud však potkan zareagoval jen na jedno měření ze tří, mohlo

se jednat jen o leknutí, ale ne o zaznamenání mechanického prahu bolesti, a tak se pokračovalo s vláknem o větší tloušťce. Vždy se postupovalo od nejtenčího vlákna – 5,18, po nejtlustší – 6,65.

Size	1,65	2,36	2,44	2,83	3,22	3,61	3,84	4,08	4,17	4,31	4,56	4,74	4,93	5,07	5,18	5,46	5,88	6,1	6,45	6,65
Force (g)	0,008	0,02	0,04	0,07	0,16	0,4	0,6	1	1,4	2	4	6	8	10	15	26	60	100	180	300

Tabulka 1. Závislost mezi velikostí vo Freyových vláken a mechanickou silou, kterou působí (EB-instruments 2013)

4.1.3 Měření teploty pokožky

K měření teploty pokožky byl použit bezkontaktní lékařský teploměr – čelní (I&CS spol. S.r.o.) (Obr. 8). Teplota byla vždy zaznamenána po prvním měření termálních prahů



bolesti provedeném na plantar testu (u části týkající se vlivu teploty). Potkanům byla teplota měřena z obou předních i zadních končetin a ocasu. Na ocasu byla teplota zaznamenávána vždy z místa, vzdáleného od špičky ocasu 2,5 cm. Na končetinách se teploměr zaměřoval na nárt pacek.

Obr 8. bezkontaktní lékařský teploměr

4.2 Metody

4.2.1 Vliv stáří

Pokus byl prováděn na 32 samcích, kteří byli chováni po čtyřech v chovných boxech. V každém ročním období (jaro, léto, podzim, zima) bylo do pokusu zařazeno 8 nově narozených samců potkanů. Před odstavenem byla mláďata chována společně s matkami. Poté byli do pokusu zařazeni jen potomci samčího pohlaví. Prahy bolesti byly měřeny pomocí plantar testu (intenzita paprsku $40_{(FS1)}$) ve stáří jednoho měsíce (po odstavu), dále v 3. měsíci

a potom každé tři měsíce až do věku 15 měsíců. Pro popsaní efektu stárnutí byly porovnávány prahy všech naměřených hodnot (přední, zadní končetiny, ocas - KONČETINY) u po sobě následujících měření (1,3,6...15) a potom u měření v 6. (dospělost) a 15. (stáří) měsíci. Poté se porovnávaly hodnoty zvlášť u předních a zadních končetin a u ocasu.

4.2.2 Vliv sezóny

Pro pokus jsme využili výsledky měření, získané při vlivu stárnutí. Měření tepelných prahů bolesti na plantar testu (intenzitu paprsku $40_{(FS1)}$) probíhala vždy po 3 měsících tak, že každé další měření bylo v jiném ročním období. Abychom popsali efekt sezóny, porovnávali jsme mezi sebou prahy na jaře, v létě, na podzim a v zimě. Pro vyřazení efektu stáří jsme použili vždy skupinu, ve které se nacházelo celkem 32 jedinců – 8 jedinců ve věku 6 měsíců, 8 ve věku 9 měsíců, 8 ve 12 měsících a 8 v 15 měsících pro jednotlivou sezónu. Věkový průměr potkanů tak byl v každém ročním období 10,5 měsíce.

4.2.3 Statistické metody I

Do statistického zpracování výsledků byly použity průměrné hodnoty z každé měřené části těla (přední, zadní končetina a ocas) v daném stáří (1,3...15 měsíců).

Data byla zpracována pomocí testu ANOVA pro opakovaná měření, pokud se ukázala signifikance u námi porovnávaných faktorů, byl následně proveden post hoc LSD test pro vyhodnocení rozdílů mezi nimi. Vícefaktorovou ANOVU jsme použili pro faktor STÁŘÍ, který byl manifestován šesti úrovněmi, a faktor KONČETINY, který byl manifestován třemi měřenými úrovněmi – přední, zadní končetiny a ocas, a pro jejich interakci (STÁŘÍ×KONČETINY). U následného post hoc LSD testu jsme se zaměřili jednak na srovnání výsledků u dvou po sobě jdoucích měření (vliv věku) a zároveň na porovnání latencí mezi 6. (dospělost) a 15. (stáří) měsícem (vliv stárnutí u dospělého organismu).

U vyhodnocování sezóny se také použilo testu ANOVA a pro prokázání signifikance se prováděl post hoc LSD test. Pro prokázání statistické významnosti se provedla vícefaktorová ANOVA pro faktor SEZÓNA a následně pro interakci faktorů SEZÓNA×KONČETINY. Za statisticky významný byl vždy považován výsledek, pokud $p < 0,05$.

4.2.4 Vliv okolní teploty a teploty pokožky

K měření tepelných prahů bolesti bylo použito 12 dospělých samic potkanů. Potkani byli chováni v chovných boxech po třech. Po aklimatizaci na nové prostředí byli potkani rozděleni do dvou skupin po šesti (dva chovné boxy v jedné slupině). Jedna šestice byla chována za normálních laboratorních podmínek (KONTROLY) - při 22°C, vlhkosti v rozmezí 40-80%, volný přístup k vodě a krmivu a světelným režimu světlo:tma 12:12. Druhá šestice byla nechána v aklimatizační místnosti (AKLIMATIZACE), kde byla teplota nastavena buď na 20°C (prvních čtrnáct dní), či 24°C (druhých čtrnáct dní) se světelným režimem světlo:tma – 12:12 a volným přístupem k vodě a krmivu.

Aklimatizovaní potkani se nechali týden aklimatizovat na 20°C. Po týdnu takovéto aklimatizace byli potkani vždy ve stejný čas podrobeni měření termálních prahů bolesti v následujících čtyřech dnech. První den byli přeneseni po jednom chovném boxu (tři potkani) do místnosti na měření, která byla vychlazená na 18°C (první den měření). Po vymizení průzkumné činnosti jim byly pomocí plantar testu (intenzita 90_(FS1)) změřeny tepelné prahy bolesti na všech čtyřech končetinách a ocasu. Po prvním změření všech končetin a ocasu u potkanů byla pomocí bezdotykového lékařského čelního teploměru změřena teplota na všech čtyřech končetinách a ocase. Po doměření termálních prahů bolesti byl změřen i mechanický práh bolesti pomocí von Freyových vláken. Po doměření první trojice potkanů byli potkani umístěni zpět do aklimatizační místnosti a vzala se druhá trojice. Měření u ní probíhalo stejně jako u té první. Druhý den byla teplota v měřicí místnosti zvýšena na 20°C, třetí na 24°C a čtvrtý na 26°C. Měření probíhala stejně jako první den. Po těchto měřeních byli potkani umístěni do standardních chovných podmínek na 3 dny a poté do aklimatizační místnosti s teplotou 24°C. Po týdnu aklimatizace byli opět bráni na měření do měřicí místnosti, kde byla místnost postupně temperována po dnech na 18°C, 20°C, 24°C a 26°C. Pokus byl prováděn stejně jako při aklimatizační teplotě 20°C.

Po dobu čtyř po sobě jdoucích dní bylo šestici kontrolních potkanů chovaných za normálních laboratorních podmínek 22±2°C, prováděno stejné měření jako u aklimatizovaných potkanů s tím rozdílem, že potkani byli po celé čtyři dny měřeni v měřicí místnosti za stejné teploty (běžné pokojové teploty – cca 22°C).

U obou skupin potkanů (KONTROLY, AKLIMATIZACE) byl měřen mechanický práh bolesti pomocí von Freyových vláken. Na základě poznatků z práce Pertovaara et al. 1996 jsme provedli měření, které mělo potvrdit neměnnost mechanického prahu bolesti v závislosti na teplotě.

4.2.5 Statistické metody 2

Do statistického zpracování výsledků byly použity průměrné hodnoty z každé měřené části těla (přední, zadní končetina a ocas - KONČETINY) za různých aklimatizačních teplot (20 nebo 24°C), různých okolních teplot (18,20,24 a 26°C) nebo u KONTROL opakovaných měřených hodnot.

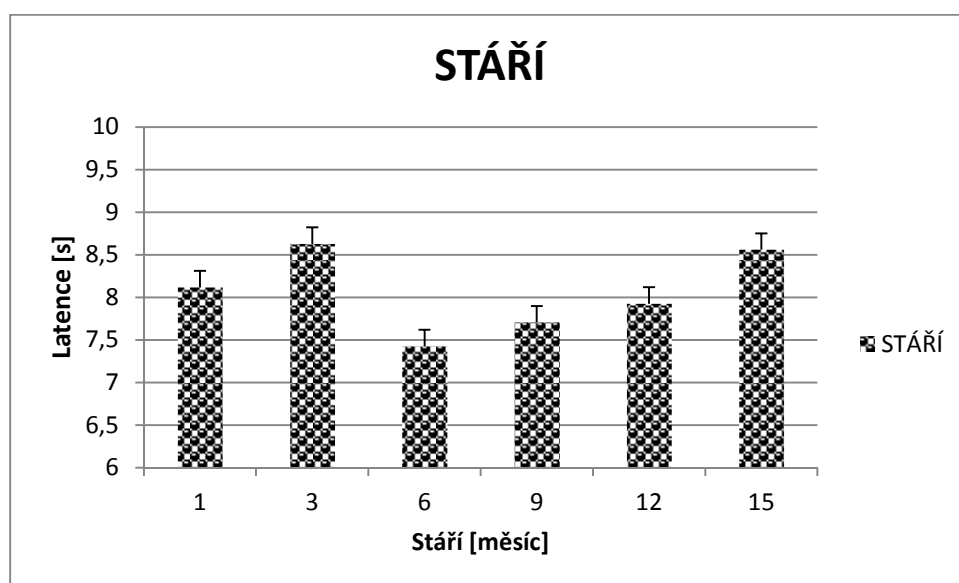
Data byla následně zpracována pomocí testu ANOVA pro opakovaná měření a při prokázání signifikance, byl proveden post hoc LSD test pro vyhodnocení rozdílů u jednotlivých hodnot faktoru či interakcí mezi nimi. Za statisticky významný byl vždy považován výsledek, pokud $p < 0,05$. První se zkoumal vliv faktoru AKLIMATIZACE. Následně jsme se zaměřili na vliv čtyř po sobě opakovaných měření u KONTROL. Vliv okolní teploty jsme zkoumali dvěma způsoby: zaprvé jsme zkoumali vliv faktoru TEPLOTA pomocí ANOVA testu, následně jsme provedli interakci dvou faktorů KONČETINY×TEPLOTA. Zadruhé jsme se zaměřili na významnost korelace latence a teploty. Korelace byla prováděna ze čtyř teplot a čtyř průměrů prahů bolesti u předních, zadních končetin a ocasu. Signifikance korelace se posuzuje porovnáním t s tabulkovým t -krit pro hladinu významnosti 0,975 – $t = R\sqrt{(n-2)/\sqrt{(1-R^2)}}$, pro korelace čtyř teplot a čtyř průměrů latencí je pak kritické $R^2=0,9026$ – tzn. pokud vyjde R^2 vyšší než kritické R^2 , jedná se o statisticky významnou korelaci. Vliv teploty kůže byl vyhodnocován jen podle korelace, taktéž ze čtyř hodnot, takže pro ni platila stejná kritická hodnota jako u okolní teploty.

U mechanického prahu bolesti byla provedena korelace teploty a hodnot z von Freyových vláken u všech skupin dohromady.

5. Výsledky

5.1 Vliv stáří

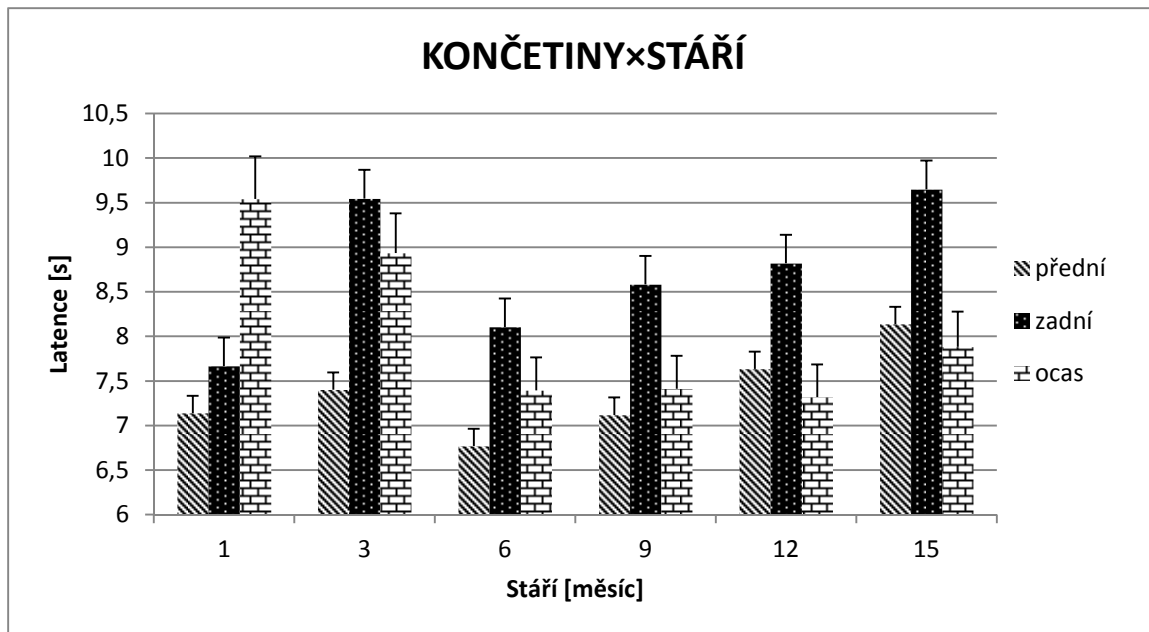
Vliv stáří na termální práh bolesti byl zjišťován u potkanů v období 1-15 měsíců. Výsledky analýzy variance faktoru STÁŘÍ ukázaly statistickou významnost ($F(5,155)=2,3541$, $p=0,04309$) (graf 1). Avšak post hoc test ukázal, že hodnoty mezi sebou nedosáhly statistické významnosti. To může být způsobeno tím, že hodnoty latence jsou vzaty dohromady ze všech končetin i ocasu.



graf 1: Vliv stáří na termální prahy bolesti. Statistická významnost, post hoc testy neukázaly žádnou signifikanci mezi jednotlivými hodnotami.

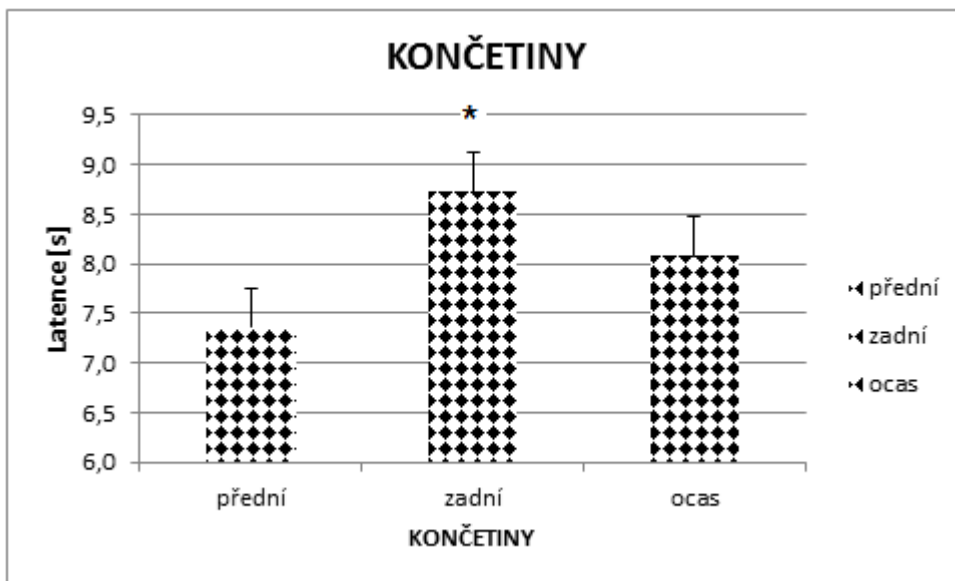
Proto jsme dále vliv stáří posuzovali podle končetin: vliv stáří na přední, zadní končetiny a ocas (KONČETINY). Výsledky analýzy variance ukázaly, že interakce sledovaných faktorů KONČETINY \times STÁŘÍ je statisticky významná ($F(10,310)=7,1998$, $p=0,00$) (graf 2). Post hoc testy odhalily, že nejméně se mění latence u předních končetin, kde po sobě následující měření nevykazují žádné statisticky významné změny. Signifikance však byla zaznamenána při porovnání nocicepční latence u předních končetin mezi šestým a patnáctým měsícem ($6,78 \pm 0,19$ s vs. $8,14 \pm 0,26$ s, $p=0,000$). Vývoj nocicepce zadních končetin je obdobný jako u předních končetin. Od prvního do třetího měsíce latence stoupá, poté do šestého měsíce klesne a následně stoupá až k patnáctému měsíci. U zadních končetin jsou, na rozdíl od předních, po sobě následující měření většinou signifikantní. Jen mezi

šestým a devátým ($8,11 \pm 0,20$ s vs. $8,58 \pm 0,22$ s, $p=0,213$), a devátým a dvanáctým měsícem ($8,58 \pm 0,22$ s vs. $8,82 \pm 0,27$ s, $p=0,534$) není zaznamenána signifikance. U zadních končetin, stejně jako u předních, byla nalezena signifikance mezi šestým a patnáctým měsícem ($8,1 \pm 0,2$ s vs. $9,65 \pm 0,59$ s, $p=6,52E-13$). Z pohledu stáří byla na předních a zadních končetinách zaznamenána nejnižší latence ve věku jednoho a šesti měsíců. U předních končetin v prvním měsíci dosahovala latence ($7,14 \pm 0,26$ s) a v šestém měsíci dokonce ($6,8 \pm 0,19$ s). U zadních končetin dosahovala hodnota latence v prvním měsíci ($7,67 \pm 0,24$ s) a v šestém měsíci ($8,11 \pm 0,20$ s). Naopak nejdelší latence byla u předních končetin naměřena v patnácti měsících ($8,14 \pm 0,26$ s). U zadních končetin bylo nejvyšší latence dosaženo ve třetím měsíci $9,55 \pm 0,35$ s a v patnáctém měsíci ($9,65 \pm 0,59$ s). Latence ocasu se značně lišila od předních a zadních končetin. Nejvyšší latence dosáhl v prvním měsíci ($9,54 \pm 0,55$ s) a na nejnižší se pohyboval od šestého do dvanáctého měsíce. Latence ocasu má částečně jiný profil, než končetiny. Nejvyšší latence je zaznamenána v období jednoho měsíce, poté klesá až do šestého měsíce ($7,40 \pm 0,38$ s). Následně je až do dvanáctého měsíce téměř neměnná a od dvanáctého do patnáctého měsíce je zaznamenán nesignifikantní nárůst latence. Signifikantní pokles je jen mezi třetím a šestým měsícem ($8,93 \pm 0,47$ s vs. $7,40 \pm 0,38$ s, $p=6,96E-05$). U ocasu, jako u jediného, nebyla zaznamenána signifikance mezi šestým a patnáctým měsícem ($7,40 \pm 0,38$ s vs. $7,88 \pm 0,41$ s, $p=0,203$). Statisticky významná interakce KONČETINY \times STÁŘÍ poukazuje na rozdílný vývoj nocicepční citlivosti různých částí těla. V průběhu stárnutí se latence prodlužuje na předních a zadních končetinách více než na ocasu.



graf 2: Vliv stáří na termální prahy bolesti jednotlivých měřených částí. Významné rozdíly nebyly kvůli přehlednosti do grafu zaneseny. Statistická významnost, post hoc testy ukázali signifikanci předních končetin mezi 6 a 15 měsícem, u zadních končetiny mezi 1 a 3 měsícem, 3 a 6 měsícem, 12 a 15 měsícem i mezi 6 a 15 měsícem, u ocasu signifikantní mezi 3a 6 měsícem.

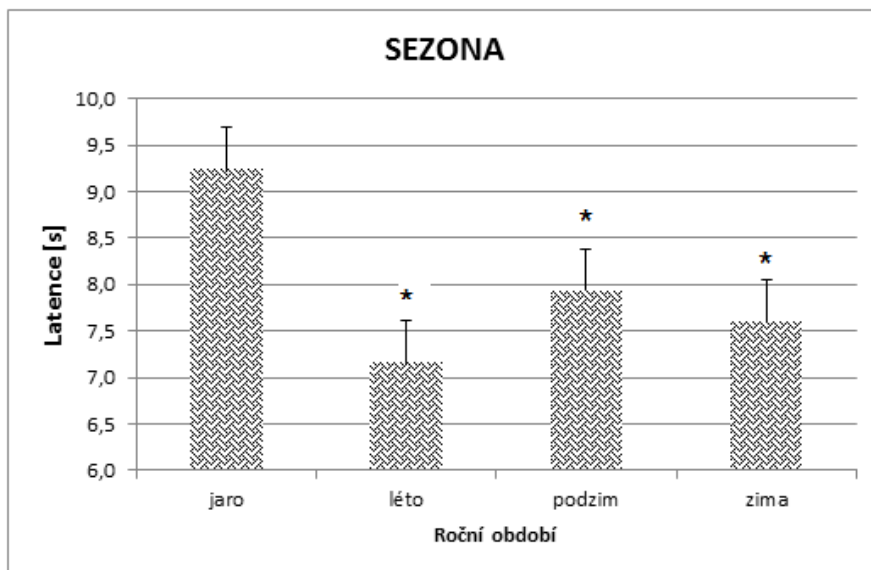
V neposlední řadě jsme se zaměřili na samotný faktor KONČETINY, který byl také signifikantní ($F(2,62)=15,994$, $p=0,000$) (graf 3). Při porovnání předních a zadních končetin vyšlo najevo, že přední končetiny mají signifikantně nižší latenci než zadní ($7,37\pm 0,24$ s vs. $8,73\pm 0,31$ s, $p=0,024$). Mezi jinými měřenými částmi se již signifikance nevyskytovala.



graf 3: Vliv měřených částí na termální práh bolesti. * $p < 0,05$ vs. jaro. Přední končetiny signifikantně nižší latence než zadní končetiny.

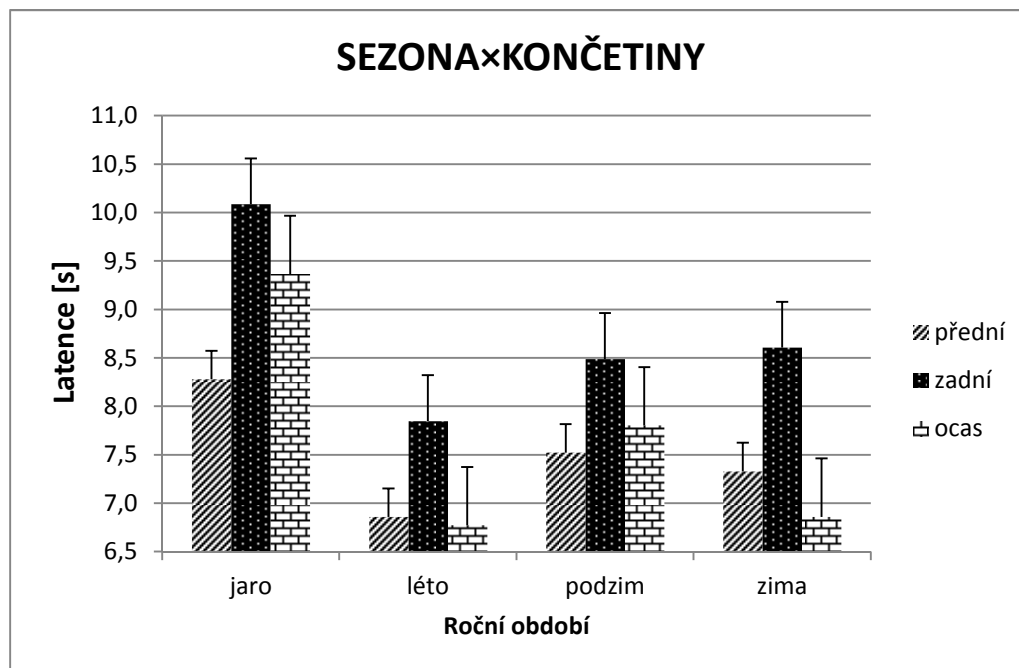
5.2 Vliv sezóny

Vliv sezóny byl zjišťován u potkanů ve věku od šesti do patnácti měsíců ve čtyřech ročních obdobích, kde se vyřazoval vliv stárnutí díky tomu, že v každém ročním období byli zahrnuti potkani všech věkových skupin. Výsledky analýzy variance u faktoru SEZONA vyšly signifikantní ($F(3,93)=13,287$, $p=0,0000$) (graf 4). Post hoc LSD test však ukázal jednoznačnou signifikanci jenom mezi jarem a létem ($8,42 \pm 0,19$ s vs. $8,57 \pm 0,65$ s, $p=0,001$), jarem a podzimem ($8,42 \pm 0,19$ s vs. $7,94 \pm 0,23$ s, $p=0,033$), a jarem a zimou ($8,42 \pm 0,19$ s vs. $7,60 \pm 0,43$ s, $p=0,008$).



graf 4 : Vliv ročního období na termální prahy bolesti. * $p < 0,05$ vs. jaro. Signifikance mezi jarem a létem, jarem a podzimem, jarem a zimou.

Poté jsme se zabývali sledování interakce faktorů SEAZONA \times KONČETINY, jež nejsou statisticky významné ($F(6, 186) = 1,8698$, $p = 0,08808$) (graf 5). Z toho vyplývá, že efekt sezóny je stejný na přední a zadní končetiny i na ocas.

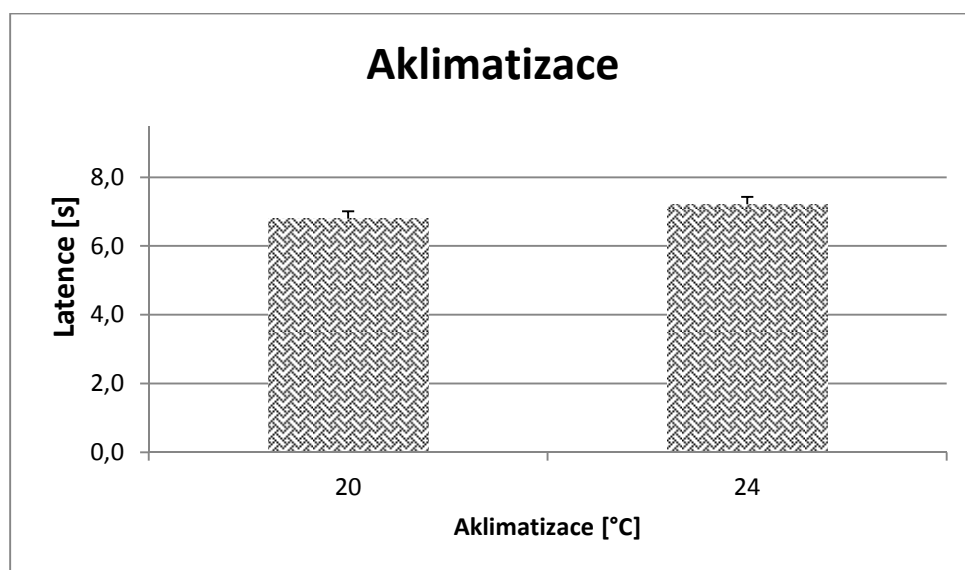


graf 5: Vliv sezóny na termální prahy bolesti u měřených částí.

5.3 Vliv aklimatizace, okolní teploty a teploty kůže

5.3.1 Vliv aklimatizace

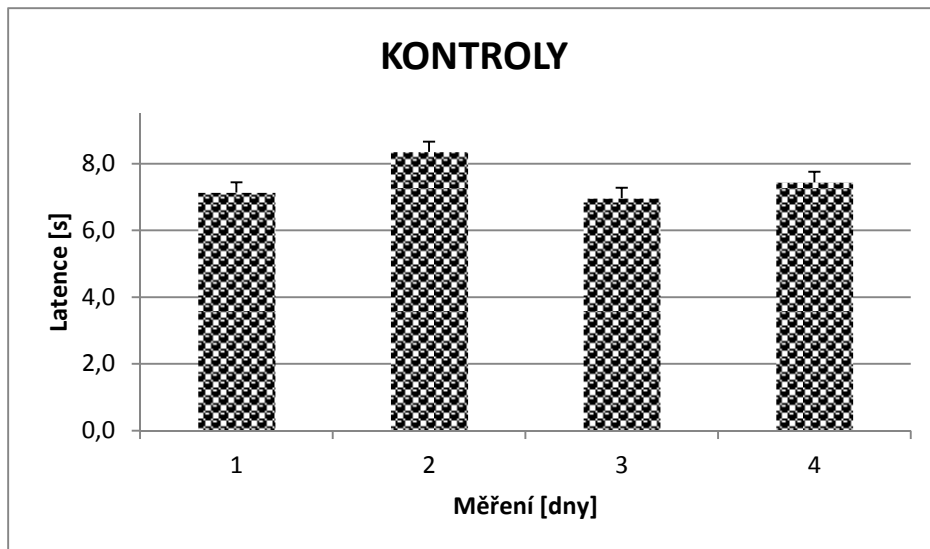
V této části jsme se zabývali měřením tepelných prahů bolesti u potkanů za různých aklimatizačních teplot 20°C a 24°C. Snažili jsme se zjistit, jestli chování potkanů v takto odlišných aklimatizačních podmínkách ovlivní tepelný práh bolesti. Z výsledků se ukázalo, že prahy bolesti se neliší při těchto dvou aklimatizačních teplotách ($F(1,3)=0,69183$, $p=0,467$) (graf 6).



graf 6: Vliv aklimatizace na termální prahy bolesti.

5.3.2 Vliv opakovaného měření

Dále jsme se snažili zjistit, zdali opakované měření na plantar testu ovlivňuje odpověď potkanů na daný stimul. K tomuto porovnání jsme použili pouze výsledky z měření KONTROL – potkani ponechání v běžných laboratorních podmínkách 22 ± 2 °C a měřeny při okolní teplotě pokojové cca 22°C. Neukázala se nám signifikance ($F(3,9)=3,6377$, $p=0,05753$) (graf 7), a tak se nám neprokázal vliv opakovaného měření na tepelný práh bolesti měřený pomocí plantar testu.

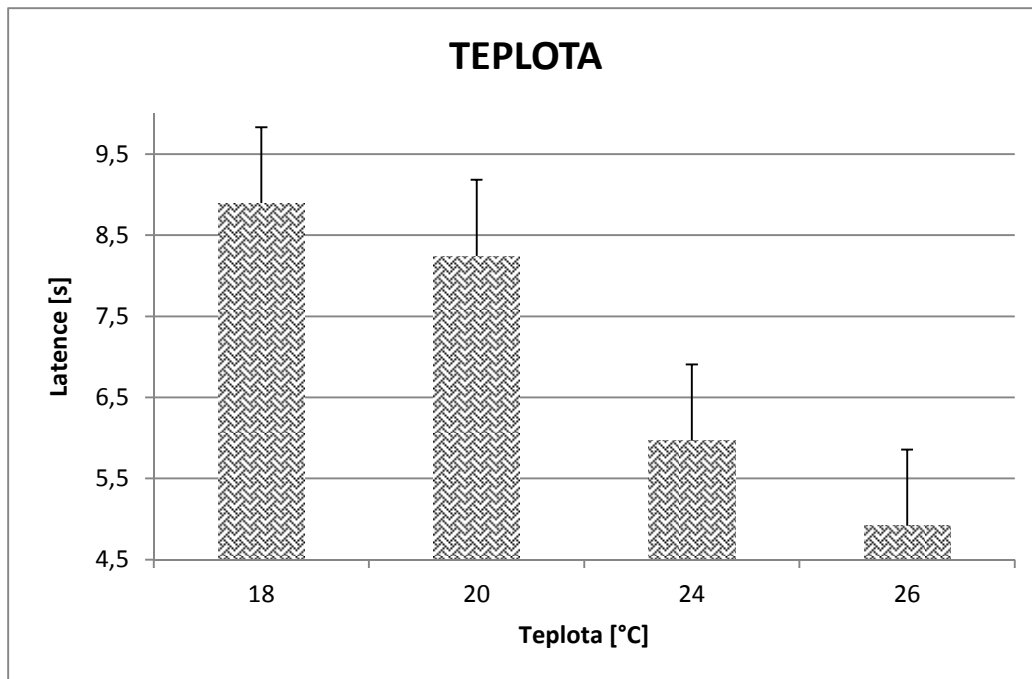


graf 7: Vliv opakovaného měření na termální práh bolesti.

5.3.3 Vliv okolní teploty

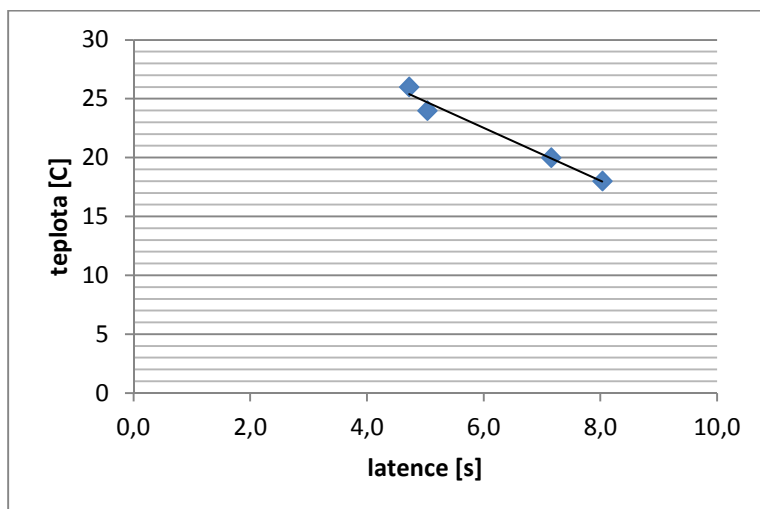
Vliv okolní teploty jsme vyhodnocovali jak pomocí ANOVY tak i pomocí korelací. U obou těchto metod faktor TEPLOTA zahrnovala hodnoty 18, 20, 24 a 26°C.

U analýzy variance jsme se zaměřili v první řadě na faktor TEPLOTA, který byl signifikantní ($F(3,24)=85,167$ $p=0,000$) (graf 8). Post hoc testy odhalily, že signifikantní rozdíly jsou mezi 18 a 24°C ($8,89\pm 0,51$ s vs. $5,96\pm 0,27$ s, $p=0,000$), mezi 18 a 26°C ($8,89\pm 0,51$ s vs. $4,92\pm 0,30$ s, $p=0,000$), mezi 20 a 24°C ($8,25\pm 0,44$ s vs. $5,96\pm 0,27$ s, $p=0,000$) a i mezi 20 a 26°C ($8,25\pm 0,44$ s vs. $4,92\pm 0,30$ s, $p=0,000$). Tedy vždy u dvou teplot, které mají rozdíl alespoň 4°C.

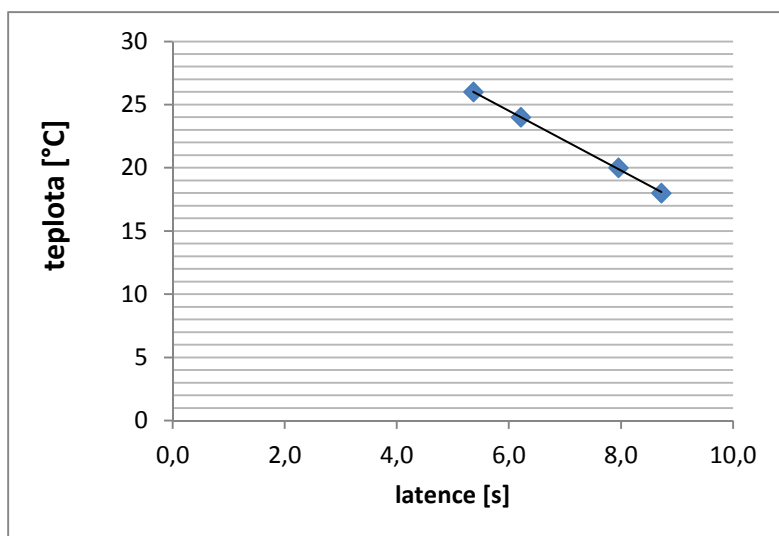


graf 8: Vliv okolní teploty na termální práh bolesti. Významné rozdíly nebyly kvůli přehlednosti do grafu zaneseny. Statistická významnost, post hoc testy ukázali signifikanci mezi 18 a 24°C, 18 a 26°C, 20 a 24°C i mezi 20 a 26°C.

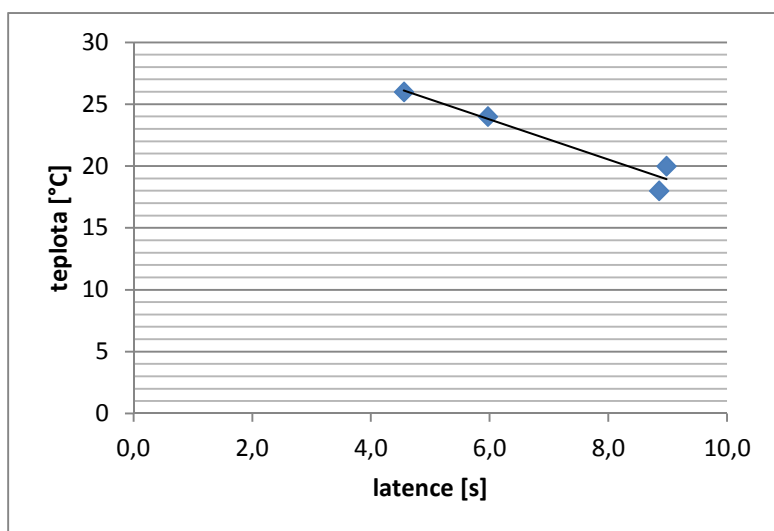
Závislost tepelných prahů bolesti s okolní teplotou byla vždy signifikantně významná. Prahy bolesti negativně korelovaly s okolní teplotou jak u předních končetin ($R^2 = 0,9788$), tak u zadních končetin ($R^2 = 0,9995$) a u ocasu ($R^2 = 0,9382$) (Graf 9 – 11).



graf 9: Korelace okolní teploty a latence předních končetin.



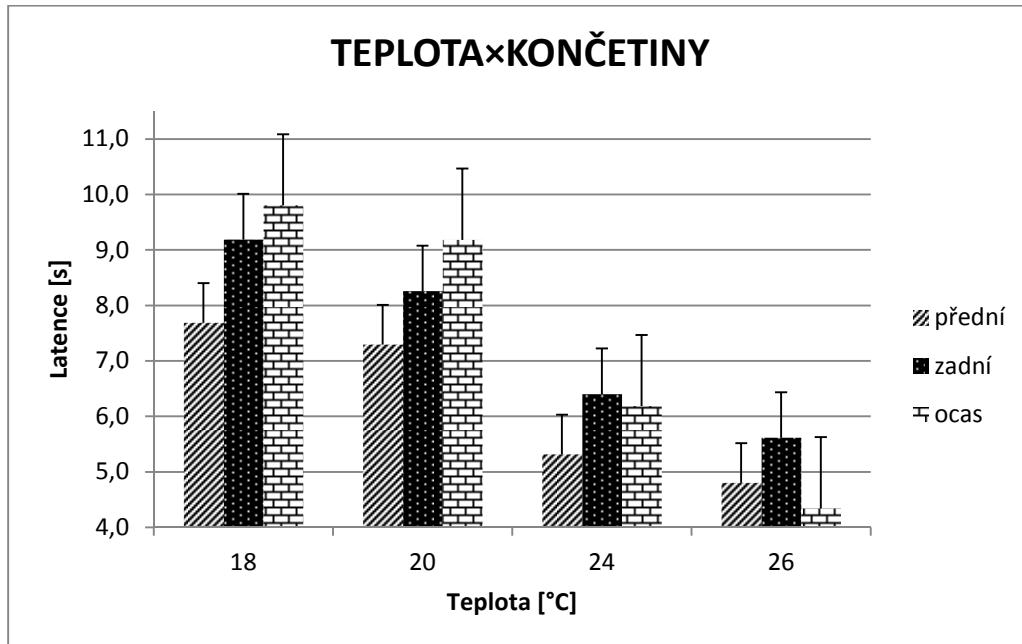
graf 10: Korelace okolní teploty a latence zadních končetin.



graf 11: Korelace okolní teploty a latence ocasu.

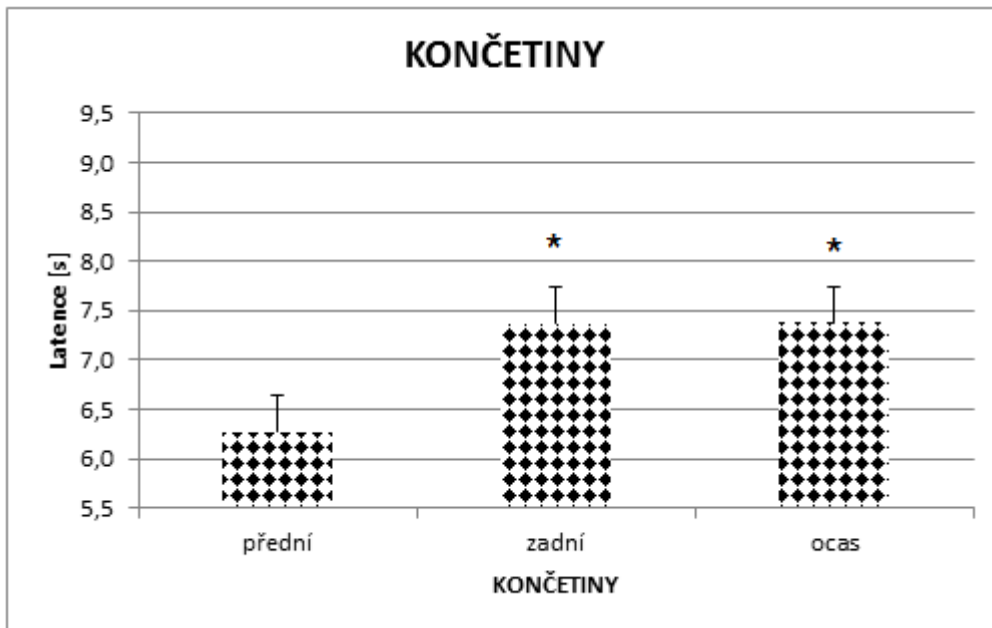
Následně jsme se zaměřili na interakci faktorů TEPLOTA×KONČETINY ($F(6,48)=4,9328$, $p=0,0005$) (graf 12), která byla významná. Post hoc test ukázal signifikanci u předních končetin mezi 18 a 24°C ($7,69\pm 1,05$ s vs. $5,32\pm 1,06$, $p=0,000$), 18 a 26°C ($7,69\pm 1,05$ s vs. $4,80\pm 0,59$ s, $p=0,000$), 20 a 24°C ($7,30\pm 1,01$ s vs. $5,32\pm 1,06$, $p=0,000$) i mezi 20 a 26°C ($7,30\pm 1,01$ s vs. $4,80\pm 0,59$ s, $p=0,000$). U zadních končetin byla všude nalezena signifikance kromě mezi 24 a 26°C. U ocasu byla signifikance nalezena všude.

Z grafu jde vidět, že průběh latencí u končetin za různých teplot je téměř shodný. Jedině ocas má větší klesající tendenci. Signifikance v tomto případě může být způsobena, buď pravidelným rozstupem mezi jednotlivými měřeními částmi těla, nebo zvýšenou klesající tendencí latencí ocasu při měnící se okolní teplotě.



graf 12: vliv okolní teploty na termální prahy bolesti u měřených částí. Významné rozdíly nebyly kvůli přehlednosti do grafu zaneseny. Statistická významnost, post hoc testy ukázali signifikanci u předních končetin mezi 18 a 24°C, 18 a 26°C, 20 a 24°C, 20 a 26°C, u zadní končetin mezi 18 a 20°C, 18 a 24°C, 18 a 26°C, 20 a 24°C, 20 a 26°C, u ocasu signifikance všude.

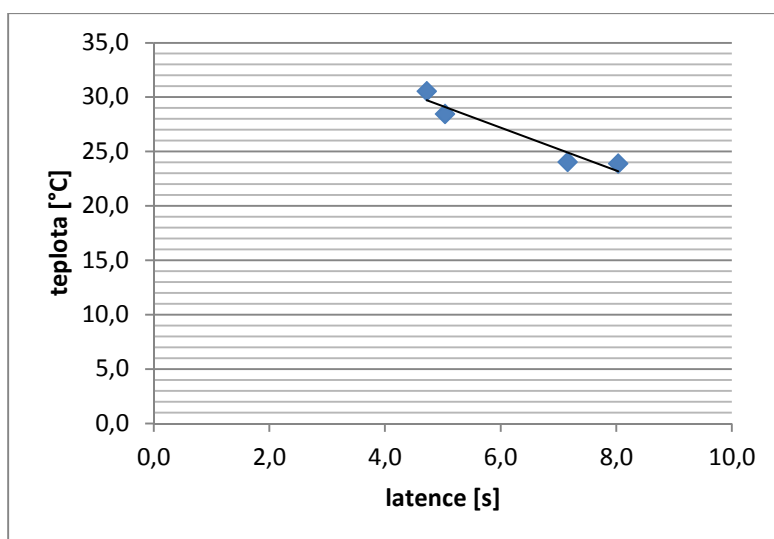
V neposlední řadě jsme sledovali faktor KONČETINY ($F(2,16)=14,715$, $p=0,0002$) (graf 13), kde byla nalezena také signifikance. Porovnávali jsme přední končetiny od zadních končetin a ocasu u všech potkanů aklimatizovaných na 20 a 24°C (tj. vyjma KONTROL) a ukázalo se nám, že přední končetiny mají nižší práh bolesti než zadní končetiny ($6,28 \pm 0,62$ s vs. $7,37 \pm 0,71$ s, $p=0,0419$) a také přední končetiny mají nižší práh bolesti než ocas ($6,28 \pm 0,62$ s vs. $7,38 \pm 1,11$ s, $p=0,0254$).



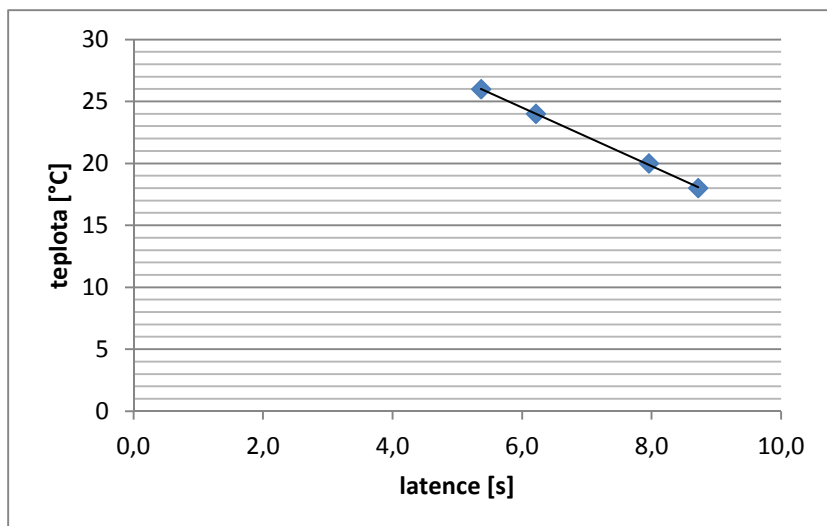
graf 13: Vliv měřených částí na termální práh bolesti. * $p < 0.05$ vs. přední končetiny. Signifikance mezi předními a zadními končetinami i mezi předními končetinami a ocasem.

5.3.4 Vliv teploty kůže

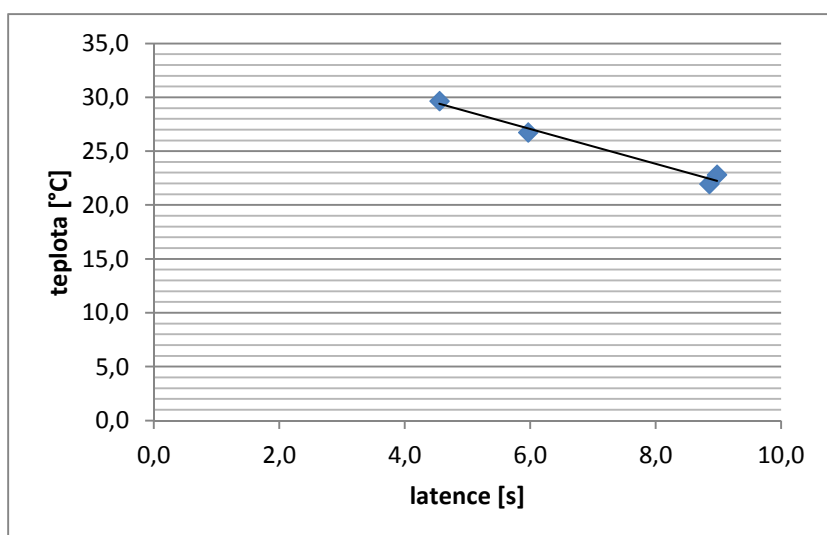
Závislost tepelných prahů bolesti s teplotou kůže byla vždy signifikantně významná. Prahy bolesti negativně korelovaly s teplotou kůže jak u předních končetin ($R^2 = 0,9283$), tak u zadních končetin ($R^2 = 0,9995$) a u ocasu ($R^2 = 0,9802$) (Graf 14 – 16).



graf 14: Korelace teploty kůže a latence předních končetin.



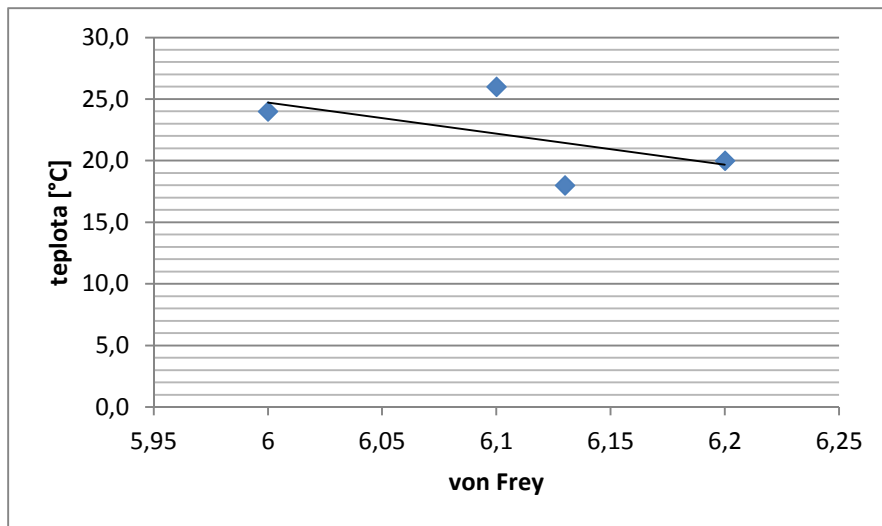
graf 15: Korelace teploty kůže a latence zadních končetin.



graf 16: Korelace teploty kůže a latence ocasu.

5.3.5 Mechanický práh bolesti

Nakonec jsme se zaměřili na měření mechanického prahu bolesti. Mechanický práh bolesti (graf 17) jsme vyhodnocovali pomocí korelace se stejnými podmínkami, jako byly u korelace latence a okolní teploty (krit. $R^2 = 0,9026$). Ukázalo se nám, že faktor von Frey a teplota spolu nekorelují ($R^2 = 0,327$)



graf 17: Vliv okolní teploty na mechanický práh bolesti.

6. Diskuze

6.1 Měření prahu bolesti

Termální nocicepční citlivost jsme zjišťovali pomocí měření tepelných prahů bolesti na plantar testu, kde se zaznamenává doba, po kterou potkan nereaguje na stimulus až do ucuknutí potkana s danou končetinou či ocasem. Plantar test jsme použili, protože na rozdíl od další metody – hot plate testu, umožňuje posouzení jednotlivých končetin, tedy i předních končetin od zadních. Oproti tail-flick testu má plantar test výhodu v tom, že zvířata se mohou volně pohybovat po měřícím boxu a nejsou jako u tail-flick testu imobilizovaná.

6.2 Vliv stáří

Stárnutí organismů je běžnou součástí koloběhu života na naší planetě. Proto jsme se zaměřili i my na vliv stárnutí potkanů na tepelný práh bolesti. Potkani byli měřeni v období 1-15 měsíců (vždy s tříměsíční periodou).

Hlavní výsledky této části práce jsou tyto: 1. latence se u předních a zadních končetin s věkem zvyšovala, akorát v šestém měsíci nastal částečný pokles. 2. latence u ocasu měla částečně odlišný průběh od předních a zadních končetin. Nejdlejší latence ocasu byla naměřena v prvním měsíci, do šestého měsíce klesala, a pak setrvala neměnná či v mírném vzestupu. 3. přední končetiny měly nižší latenci než zadní po celou dobu měření.

Naše data ukázala zvyšující se latence od 6 měsíce do 15 měsíce, a tím potvrdila zvyšování prahů bolesti – snižování vnímání bolesti u starších jedinců. Obdobných výsledků dosáhl i Hess et al. (1981), který využíval samce kmene Wistar ve věkovém rozmezí 2-24 měsíců. Svůj pokus prováděl pomocí metody hot plate testu. Opačného výsledku dosáhl ve své práci Yezieski et al. (2010), který prokázal u potkaních samic (od 8 do 24 měsíc) hyperalgezii pomocí hot plate testu (10 a 45°C), taktéž prokázal hyperalgezii u starších jedinců pomocí escape testu, kde měly potkaní samice na výběr mezi tmavou oblastí s teplotně neutrální podlahou a ozářeným prostorem s teplotně měnící se podlahou (10, 15, 42 a 44,5°C). Většina pokusů prováděných na potkanech je však prováděná pomocí metody tail-flick testu. Různé výsledky dosažené pomocí tail-flick testu popisuje ve svém souhrnném review Gagliese a Melzack (2000). Při porovnání 15 studií zjistili, že devět prací z nich

zaznamenalo nezměněnou latenci s věkem, u čtyř prací se přiklání ke zvýšení latence a u dvou se latence snižuje s věkem.

Více se výzkum zaměřil na testování tepelného prahu bolesti ve stáří na lidech, bohužel v těchto studiích nepanuje shoda. Některé studie popisují nárůst prahu bolesti, jiné neměnný stav a některé i pokles prahu bolesti ve stáří. Heft a Robinson (2010) prováděli průzkum na dobrovolnících rozdělených do dvou skupin. První skupina zahrnovala dobrovolníky pod 45 let a druhá skupina nad 65 let. Měření tepelného prahu bolesti bylo prováděno na dvou místech – na rtu – holé místo, a na bradě – místo s chlupy. Bylo pozorováno zvýšení tepelného prahu bolesti u starší věkové skupiny. Shodně s předešlou studií i Sherman a Robillard (1964) pozorovali vzrůst tepelného prahu bolesti u starších lidí. Jejich výzkumná skupina obsahovala 200 jedinců různých etnických skupin s širokým věkovým rozpětím. Pro nás nejdůležitější z toho rozpětí jsou: mladí od 20-30 let a staří 65-97 let. Naproti tomu, Edward a Fillingim (2001) nezjistili žádný rozdíl v tepelném prahu bolesti u svých dvou skupin dobrovolníků (průměrný věk 22,4 let a 62,2 let). Taktéž Lautenbacher et al. (2005) nezjistili žádné věkové rozdíly u tepelného prahu bolesti. Lautenbacher prováděl výzkum na 20 mladých (21-35let) a 20 starých (63-88 let) lidech. Naopak snížení prahu pro tepelnou bolest publikoval Huang et al. (2010). Své výzkumy prováděl na 274 dobrovolnících od 23 let do 87 let.

Naše práce tedy ukazuje, že se prahy bolesti s věkem zvyšují. Tyto změny ve vnímání tepelného prahu bolesti ve stáří mohou být způsobeny několika mechanismy. V první řadě mohou být vyvolány změnou nervových vláken, která u starších živočichů vedou bolest. Mladí jedinci většinou vyhodnocují bolest na základě vstupů a následného vedení rychlejšími myelinizovanými A δ vlákny, naproti tomu starší jedinci na základě vedení pomalejšími nemyelinizovanými C typy vláken (Chakour et al. 1996). Tento rozdíl může být způsoben demyelinizací myelinizovaných A δ vláken, která přichází s rostoucím věkem, a tím pádem vyšší převaze funkčních nemyelinizovaných C vláken ve stáří (Verdu et al. 2000, Marnier et al. 2003). Převahu C vláken používaných při vedení bolesti u starších lidí potvrdil ve své práci i Yezieski et al. (2010). Ve své práci se zabývali efektem stárnutí na termální práh bolesti u samic potkanů Long Evans. Pomocí Termal escape metody prokázali hyperalgezií u starých potkanů při vystavení teplotám 42°C a 44.5°C. Takto vysoké teploty jsou vedeny nemyelinizovanými C vlákny. Hyperalgezie v tomto případě potvrzuje zvýšené využívání C vláken k vedení termální bolesti u starších potkanů. Když vezmeme v potaz, že rychlost vedení A δ vláken je mezi 10,6 – 30 m/s a C vláken mezi 0,5 – 2 m/s (Mountcastle 2005)

rozdíl mezi těmito rychlostmi je od 10,1 – 28 m/s. Pokud budeme počítat průměrnou dráhu od packy do míchy 6 cm (závislost vzdálenosti záleží např. i na věku a kmenu potkana), po výpočtu bude časový rozdíl, který nastane při záměně používání A δ vláken za C vlákna při vedení vzruchu, mezi 0,012 – 0,0043 s (v závislosti na rychlosti vedení vláken v daném rozmezí). Tento rozdíl je na našich přístrojích, měřících jen na jednu desetinu sekundy, těžko zaznamatelný. Z tohoto výpočtu usuzujeme, že vliv změny vláken mohl ovlivnit naše výsledky jen velmi nepatrně.

Při stárnutí také dochází k degeneraci sensorických vláken. Tento proces není ještě zcela objasněn. V některých pracích se výzkumníci přiklánějí k tomu, že za tím stojí nervový růstový faktor (NGF). Dimerická molekula NGF se váže s vysokou afinitou na dvě transmembránové molekuly tyrosinkinázy A (TrkA), které spolu poté interagují a spouštějí signální kaskádu, která fosforyluje transkripční faktory, vázající se na specifické sekvence DNA (Rokyta et al. 2012). Existují i další membránové receptory, které interagují s nižší afinitou s NGF – například neurotrofinový receptor p75. Vazba NGF na tyto receptory je důležitá pro přežití nervových vláken. TrkA má vysokou afinitu k NGF a převádí signály pro přežití a diferenciaci vláken. Naproti tomu u nízko afinitního p75 receptoru se předpokládá, že ve své nevázané monoklonální formě může vést k navození buněčné smrti. To poukazuje na nepostradatelnost NGF při přežití nervových vláken (Rabizadeh et al. 1993).

Jiným mechanismem, zvyšujícím práh bolesti ve stáří, může být pokles substance P ve spinální míše (Bergman et al. 1996). Bergman prováděl své pokusy na samcích potkanů typu Sprague-Dawley, kteří byli 30 měsíců staří. Substance P je nocicepční mediátor, který pomáhá při přenosu vzruchu mezi jednotlivými nervovými vlákny vedoucími do mozku. Pokud je nedostatek substance P, zpomaluje se tím vedení nocicepčního vzruchu do mozku, a tím pádem se zpomaluje i vyhodnocení bolestivého stimulu. Cruce et al. (2001) se snažili výzkumem potvrdit jejich vlastní hypotézu o snižování termálních prahů bolesti s věkem. Z Bergmanovy práce věděli, že se snižuje koncentrace substance P s věkem. Jejich hypotéza byla založená na zvyšujícím se množství receptoru neurokininu 1 (NK1), jenž je vyvoláno snižujícím se množstvím substance P. Díky vyššímu množství receptoru by tak mohlo docházet k snižování prahů bolesti ve stáří. Jejich hypotézu se jim nepovedlo potvrdit, jednak nedošlo k snížení tepelných prahů bolesti s věkem, jednak nepotvrdili zvyšující se množství NK1 s věkem a zjistili jeho neměnnou koncentraci v průběhu života. Naše výsledky pokusů se shodují s výsledky Bergmana, i přestože jsme měli v pokusu zařazeny mladší jedince

(maximálně do 15 měsíců), proto se můžeme domnívat, že proces snižování koncentrace substance P je postupný, a tím pádem mohl zasáhnout i naši skupinu potkanů.

Naproti výše popsaným mechanismům, zvyšujících termální prahy ve stáří, stojí mechanismy působící pronociceptivně. Například s věkem se snižující množství serotoninu a noradrenalinu ve spinální míše vyvolá disinhibici nociceptivní aferentace. Aktivují se z PAGu descendentní inhibiční dráhy, zahrnující serotonergní a noradrenergické axony. Díky sníženému množství neurotransmiterů serotoninu a noradrenalinu, nedochází k tak rychlému a velkému přenosu vzruchu a to může mít za následek, že inhibiční dráha nocicepce hůře funguje. (Ko a spol 1997). Tento mechanismus může částečně vyrovnávat výše uvedené změny snižující vnímání bolesti, a z toho vyplývající zvyšující se práh bolesti.

Měřením tepelných prahů bolesti u potkanů se zabývalo mnoho prací, například Jourdan et al. (2000) prováděli pokus na potkaních samicích kmene Lou/C/Jall (4-29 měsíců) a termální práh bolesti zjišťovali metodou tail immersion testu. Nezaznamenali téměř žádnou změnu prahu bolesti na ocasu. I Girardot a Holloway (1985) prokázali neměnný tepelný práh bolesti se zvyšujícím se věkem. Naproti tomu Crisp et al. (1994) ve své práci přišli na snížení prahů bolesti s věkem. Crisp ve svém výzkumu využil 344 potkanů kmene Fisher ve věku od 5-6 měsíců, 15-16 měsíců a 25-26 měsíců, jenž byli testováni tail-flick testem. Potkani ze skupiny 25-26 měsíců signifikantně rychleji reagovali na tepelný podmět než potkani ze skupiny 15-16 měsíců. Skupina potkanů 5-6 měsíc se nelišila od starších potkanů. Tyto rozdíly ve vnímání termálního prahu na ocasu měřených pomocí tail-flick testu u potkanů zaznamenal Gagliese a Melzack (2000) ve svém souhrnném review, kde zaznamenal většinu prací, v nichž se latence nemění. Našlo se i pár takových, kde se latence s věkem zvyšovala, nebo snižovala. V naší práci se vliv stáří na tepelný práh bolesti na ocasu nepotvrdil, tepelný práh bolesti zůstal téměř neměnný.

Takto rozporuplné výsledky mohou být způsobeny mnoha faktory, které ovlivňují samotné měření prahu bolesti na ocasu. Ocas je nejdůležitější termoregulační orgán potkana, a tak rozdílné výsledky mohou být způsobeny jeho termoregulační schopností. (Dawson a Keber 1979). Ztráty tepla jsou regulovány pomocí on-off regulace průtoku krve v ocase, který vede k rychlé proměnlivosti teploty kůže na ocasu. Svazky tepen a cév jsou rozloženy podél ocasu. Teplota je také částečně odlišná na proximální a distální části ocasu, na distální části ocasu je teplota nižší. (Tjølsen et al. 1989, Tjølsen a Hole 1993). Když je teplota kůže snížena může se ukazovat, že potkan má vyšší práh bolesti, když je naopak teplota zvýšena,

potkan může manifestovat nižší práh bolesti. Snižování a zvyšování teploty kůže na ocasu může být ovlivněno kromě okolní teploty i stresem. (Hole a Tjølsen 1993). Stres způsobený změnou prostředí či manipulací s potkanem může značně ovlivnit periferní průtok krve a teplotu ocasu. Stres s pohybem je zodpovědný za zvyšování produkce tepla. To má za následek zvyšující se frekvenci a trvání, a tím pádem i zvyšující se teplotu ocasu. Takto zvýšená teplota na ocasu, může mít za následek již výše zmíněný naměření nižšího prahu bolesti (Tjølsena Hole 1992). My jsme měřili latenci vždy ve stejné vzdálenosti (2,5 cm) od špičky ocasu na ventrální straně. Proto jsme v našem pokusu vždy potkany nechali přivyknout prostředí do kterého byli přemístěni a snažili jsme se, aby je okolní ruchy nepřiváděli do stresové situace.

Při porovnání latencí předních a zadních končetin u věkových skupin 1-15měsícem jsme ukázali, že přední končetiny mají nižší latenci než zadní po celou dobu měření. Tyto výsledky nám potvrdili hypotézu kranio kaudální distribuce citlivosti u potkanů. I když se často setkáváme s podobnými výsledky, dosud nebyla tato distribuce citlivosti přesněji objasněna. V předchozích pracích, prováděných v naší laboratoři bylo zjištěno, že před odstavem je situace přesně opačná. Přední končetiny mají vyšší latenci než zadní, v době odstavu mají však přední končetiny již nižší latenci než zadní. Některé práce ukázaly, že vliv různých látek s potenciálním analgetickým účinkem je odlišný nejen u mláďat a dospělých, ale i na předních a na zadních končetinách i na ocasu (Vaculín et al. 2002, Franěk et al. 2008). Na kraniokaudální distribuci citlivosti u potkanů také poukázala ve své práci Yamamotová a Šlamberová (2012). Ukázaly, že vliv metamfetaminu roste v rostrokaudálním směru u dospělých potkanů. Většina prací se však zabývala jen rozdílem mezi zadními končetinami a ocasem (Romita a Henry 1996, Kauppila et al. 1998, Fang a Proudfit 1998). Rozdíly mezi předními a zadními končetinami se zabýval jen Anseloni et al. (2004), který popsal antinocicepční efekt sání u 17 denních potkanů. Přední končetiny si potkani po termálním podráždění lízali, zadní nikoliv. Jedním z možných vysvětlení kranio kaudální distribuce může být využívání jiných nervových drah. Např. morfin inhibuje nociceptivní reakci vyvolanou teplem na ocasu aktivací α_2 adrenergických receptorů, serotoninových a muskarinových cholinergních receptorů, zatímco u zadních končetin dochází k aktivaci pouze muskarinových cholinergních receptorů (Fang a Proudfit 1998).

6.3 Vliv sezóny

Roční období je dalším možným faktorem ovlivňujícím termální práh bolesti. Náš pokus byl prováděn na již dospělých potkanech (6,9,12,15 měsíců). Jedinci byli dáváni do pokusu tak, aby bylo zastoupeno každé roční období, a zároveň tak, aby byl eliminován vliv stárnutí.

Výsledky naší práce ukázaly, že roční období má vliv na práh. Jaro se signifikantně liší od dalších ročních období – má nejdelší latenci. Yamamotová et al. (2008) naproti tomu u lidí naměřila nejvyšší latenci v zimě. Naše výchylka na jaře může být způsobena sezonními změnami u NKA a substance P. Substance P a NKA jsou v nejnižší koncentraci na jaře ve frontálním kortexu. Nejvyšší koncentrace naproti tomu je v létě. Což může být důvod zásadního ovlivnění vnímání bolesti v průběhu roku. Snížené množství substance P je zodpovědné za pomalejší vedení bolestivého vzruchu do mozku. Množství substance P a NKA je ovlivněno cirkadiálními rytmy, které jsou zachovány i u potkanů chovaných v laboratorních podmínkách se světelným režimem 12:12. (Moreno et al. 2004). Chesler et al. 2002 se zabývali vlivem ročního období a vlhkosti na tepelný práh bolesti. Výsledky jeho práce ukázaly, že latence se zvyšuje se zvyšující se vlhkostí. Nejvyšších hodnoty vlhkosti naměřili v pozdním jaru, létě a na začátku podzimu. V našem pokusu jsme se snažili vlhkost zachovat stejnou ve všech ročních obdobích, a tak se nám nejvyšší latence projevila na jaře.

6.4 Vliv aklimatizace, okolní teploty a teploty kůže potkana

Posledním faktorem, kterým jsme se zabývali a který může mít vliv na termální a mechanické prahy bolesti, je aklimatizace, okolní teplota a teplota kůže u potkanů. Pokus byl prováděn na 12 dospělých samcích kmene Wistar. Jedna skupina potkanů byla chována za normálních laboratorních podmínek (KONTROLY) a druhá skupina potkanů byla prvně chována v aklimatizačních podmínkách 20°C a poté v aklimatizačních podmínkách 24°C. Aby bylo dosaženo změny okolní teploty, měřicí místnost byla temperována každý den na jinou teplotu (18, 20, 24 a 26°C) při měření u obou aklimatizačních teplot. Termální nocicepční citlivost jsme prováděli pomocí plantar testu.

Hlavními výsledky tohoto pokusu jsou: 1. Aklimatizace na 20 a 24°C nemá vliv na prahy bolesti, 2. I malé zvýšení okolní teploty signifikantně sníží práh bolesti, 3. opakované měření nemá vliv na prahy bolesti na předních, zadních končetinách ani

na ocasu, 4. Přední končetiny jsou z pohledu tepelného prahu bolesti méně citlivé na změny teploty než zadní končetiny a ocas, 5. Žádná korelace mezi teplotou a mechanickým prahem bolesti.

V naší práci jsme se zabývali vlivem aklimatizace na termální práh bolesti. Aklimatizace byla prováděna ve velmi úzkém teplotním rozmezí jen 4°C (na 20 a 24°C). Rozmezí mezi 20 a 24°C je rozmezí teplot, v kterém by se měl chovat potkan pro pokusné a jiné vědecké účely, podle předpisu Evropského společenství (ES) č. 2007/526/ES . Takto malé rozpětí nepotvrdilo vliv aklimatizace na termální práh bolesti. Vliv aklimatizace na termální práh bolesti nebyl dosud popsán. Většina výzkumů je prováděna na základě ovlivnění prahů bolesti pomocí okolní teploty.

Několik prací se zabývalo vlivem okolní teploty na termální práh bolesti. Výzkumy byly prováděny jak na zvířatech, tak na lidech a prokázaly signifikantní vliv na nocicepční citlivost u ocasu a případně i u končetin. Avšak většinou rozmezí okolních teplot byla extrémní oproti našemu výzkumu, který zahrnoval i pokojové teploty. Schoenfeld et al. (1985) porovnávali změny v prazích bolesti u potkanů při okolní teplotě 10 a 30°C, nebo v 8 a 26°C u lidí (Hardy et al. 1951), nebo v 15 a 35 °C na lidech (Strigo et al. 2000), nebo u pokusů na koních se porovnávaly prahy při okolní teplotě pod 10°C a nad 20°C (Poller et al. 2013). V naší práci jsme prokázali, že termální práh bolesti je signifikantně ovlivněn již okolní pokojovou teplotou s rozdílem jen 4°C (mezi 20 a 24°C). Následně byl tento nálezn potvrzen i negativní korelací latence a okolní teplotou jak u ocasu, což již bylo popsáno dříve u ocasu (Berge et al. 1988), tak i u předních a zadních končetin. Naše výsledky tak ukazují, že nejen extrémní, ale i minimální změny v okolní teplotě mohou být zodpovědné za signifikantní změny jednak ve změně teploty pokožky, jednak i v nocicepční citlivosti u předních, zadních končetin a ocasu.

Když se zaměříme jen na práce zabývající se teplotu pokožky a ne okolní teplotou, objeví se nám mnoho popisujících signifikantní vliv na nocicepční práh jak u lidí (Mauderli et al., 2003; Pertovaara, 1996), tak u potkanů (Hole a Tjølsen 1993; Tjølsen a Hole, 1993; Dirig et al., 1997; Han a Ren, 1991 Sawamura et al., 2002; Berge et al., 1988). Avšak Lichtman et al. (1993) popisuje téměř zanedbatelný vliv změny teploty kůže ocasu na tepelný práh bolesti. Všechny studie prováděné na potkanech využívají pouze měření pomocí tail-flick testu k zjištění termálního prahu bolesti. Ocas je nejdůležitější termoregulační orgán u potkanů (Dawson a Keber 1978). Berge et al. (1988) prokázali, že teplota pokožky ocasu pozitivně koreluje s okolní teplotou. Zatím nejsou známe žádné informace o vztahu mezi teplotou pokožky na tlapkách a okolní teplotou. Naše výsledky ukázaly signifikantně

negativní korelaci mezi teplotou pokožky a latencí na tepelný podmět, dále jsme ukázali, že kromě teploty ocasu, taky teplota předních a zadních končetin pozitivně koreluje s okolní teplotou a tedy negativně koreluje s prahem bolesti.

Vliv opakovaného měření byl zkoumán na skupině KONTROL, kde byla jednotlivá měření prováděna čtyři dny po sobě za stejných podmínek, vyšlo nesignifikantně. Z toho můžeme usoudit, že se potkan během čtyř měření nedokázal naučit předcházet bolestivému stimulu. Podobně žádný efekt opakovaného měření u plantar testu nenalezl ani Hargeaves et al. (1988). Dirig et al. (1997) také nezaznamenal, žádnou změnu při opakovaných pokusech prováděných pomocí plantar testu. Opakované měření na plantar testu se využívá v mnoha studiích (Moreno-Rocha et al. 2012; Rusina et al., 2005; Vaculín et al., 2008). Plantar test se liší od hot plate testu, kde opakování a učení hrají klíčovou roli, a proto se latence při měření pomocí hot plate testu po několikátém opakování stávají kratšími (LeBars, 2001).

I u měření vlivu okolní teploty jsme provedli vyhodnocení vlivu končetin na termální práh bolesti. Touto tematikou, i když u lidí, se zabýval Hagander et al. (2000), který porovnával prahy bolesti na rukách a nohách u dospělých mužů. Avšak nenašel žádný rozdíl mezi horními a dolními končetinami, našel pouze rozdíl v citlivosti na teplo a chlad. Naše práce však potvrdila kranio kaudální distribuci bolesti i při vlivu okolní teploty na termální práh bolesti u končetin. Přední končetiny měly kratší latenci než zadní a ocas.

V neposlední řadě jsme se věnovali měření mechanického prahu bolesti, u kterého nebyla zaznamenána žádná změna pomocí korelace. Von Freyova vlákna jsou nejčastěji používanou metodou k měření mechanického prahu bolesti. Bell-Krotoski a Tomancik (1987) prokázali, že měření pomocí von Freyových vláken je objektivní a reprodukovatelné, existují i zde různé překážky. Výsledky prováděné pomocí von Freyových vláken mohou být ovlivněny okolní teplotou či stresem (Vrinten a Hamers, 2003). A tak nejsme schopni přesně interpretovat naše výsledky, protože nevíme, zdali okolní teplota nemá vliv na mechanický práh bolesti měřený pomocí von Freyových vláken, nebo zde zasáhli i jiné parametry jako je učení či nepatrný stres. Von Freyova vlákna jsou velmi dobře viditelná, a tak se potkan mohl naučit, co bude následovat po jejich přiložení.

7. Závěr

Lidstvo se už dlouhou dobu zabývá měřením prahů bolesti. Bylo vynalezeno mnoho různých technik, jak daný práh bolesti zjistit. Kromě správného používání přístrojů, má vliv na výsledky i prostředí a stav daného jedince, který je podrobován měření. Následná správná interpretace výsledků je velmi důležitá.

V naší práci jsme dokázali, že jak faktor stárnutí, tak i sezóna a okolní teplota mohou mít značný vliv na měření termálního prahu bolesti. Dále jsme potvrdili, že kromě okolní teploty má vliv na tepelný práh bolesti i teplota pokožky, která koreluje s okolní teplotou. V neposlední řadě se nám povedla prokázat kranio kaudální distribuce bolesti, která poukázala na rozdíly mezi jednotlivými měřenými částmi (přední, zadní končetiny a ocas). Naopak vliv aklimatizace (20°C a 24°C) na termální práh bolesti a vliv okolní teploty na mechanický práh bolesti jsme neprokázali.

Z toho můžeme vyvodit nezbytnost přesného zaznamenávání laboratorních podmínek a záznamů o měřeném jedinci, aby se výsledky jednotlivých prací mohly správně porovnávat a interpretovat. Přesnější výsledky by mohly využít ve farmaceutické medicíně například pro zlepšení posouzení bolesti, kterou pacient má, a tím pádem lepšímu nasazení analgetik. Další výzkum by se měl zaměřit na sjednocení výsledků a doplnění vlivu dalších faktorů, jako je například vlhkost, a následnou aplikaci těchto znalostí v léčbě bolesti.

8. Literatura

Albe-Fessard DG. (1996). *La douleur. Ses mécanismes et les bases de ses traitements.* (Masson, Paris).

Anseloni V, Ren K, Dubner R, Ennis M. (2004). Ontogeny of analgesia elicited by non-nutritive suckling in acute and persistent neonatal rat pain models. *Pain.* 109(3):507-13.

Bell-Krotoski J., Tomancik, E. (1987). The repeatability of testing with Semmes-Weinstein monofilaments. *Journal of Hand Surgery* 12(1):155-161.

Berge OG, Garcia-Cabrera I, Hole K. (1988). Response latencies in the tail-flick test depend on tail skin temperature. *Neurosci Lett.* 86(3):284-8.

Bergman E, Johnson H, Zhang X, Hokfelt T. (1996). Neuropeptides and neurotrophin receptor mRNAs in primary sensory neurons of age rats. *J Comp Neurol.* 375:303-320.

Cain DM, Khasabov SG, Simone DA. (2001). Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: an in vivo study. *J Neurophysiol* 85: 1561–1574.

Chakour MC, Gibson SJ, Bradbeer M, Helme RD. (1996). The effect of age on A delta- and C-fibre thermal pain perception. *Pain* 64(1):143-52.

Chesler EJ, Wilson SG, Lariviere WR, Rodriguez-Zas SL, Mogil JS. (2002). Identification and ranking of genetic and laboratory environment factors influencing a behavioral trait, thermal nociception, via computational analysis of a large data archive. *Neuroscience and Behavioral Reviews* 26:907-923.

Crisp T, Stafinsky JL, Hoskins DL, Dayal B, Chinrock KM, Uram M. (1994). Effects of aging on spinal opioid-induced antinociception. *Neurobiol Aging.* 15(2):169-74.

Cruce WL, Lovell JA, Crisp T, Stuesse SL. (2001). Effect of aging on the substance P receptor, NK-1, in the spinal cord of rats with peripheral nerve injury. *Somatosens Mot Res.* 18(1):66-75.

Dawson NJ, Keber AW. (1979). Physiology of heat loss from an extremity: the tail of the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 6(1):69-80.

Dirig DM, Salami A, Ratbun ML, Ozaki GT, Yaksh TL. (1997). Characterization of variables defining hindpaw withdrawal latency evoked by radiant thermal stimuli. *J Neurosci Methods.* 76:183-191.

Edwards RR, Fillingim RB. (2001). Age-associated differences in responses to noxious stimuli. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56(3):M180-5.

Evropské Společenství. (2007). Doporučení Komise zed ne 18 června 2007 týkající se pokynů pro umístění zvířat používaných pro pokusne a jiné vědecké účely a péči o ně. Pp18.

Fang F, Proudfit HK. (1998). Antinociception produced by microinjection of morphine in the rat periaqueductal gray is enhanced in the foot, but not the tail, by intrathecal injection of alpha1-adrenoceptor antagonists. *Brain Res.* 790(1-2):14-24.

Fields HL a Basbaum AI. (1994). Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: *Textbook of pain, 3rd edn.* Wall PD a Melzack R.(editoři) (Churchill-Livingstone, Edinburgh). pp 243-257.

Franěk M, Vaculín Š, Rokyta R. (2008). Analgesic effect of mGluRs antagonists in early postnatal period. *Physiol Res.* 57:14P.

Gagliese L, Melzack R. (2000). Age differences in nociception and pain behaviours in the rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 24, 843-854.

Gibson SJ. (2003). Pain and Aging: The Pain Experience over the Adult Life Span. *Proceeding of the 10th World Congress on Pain* 61.

Girardot MN, Holloway FA. (1985). Effect of age and long-term stress experience on adaptation to stress analgesia in mature rats: role of opioids. *Behav Neurosci.* 99(3):411-22.

Haque MF, Aghabeighi B, Wasil M, Hodges S, Harris M. (1994). Oxygen free radicals in idiopathic facial pain. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 20(3):104-16.

Han JS, Ren MF. (1991). The importance of monitoring tail-skin temperature in measuring tail-flick latency. *Pain.* 46(1):117.

- Hardy JD, Goodell H, Wolff HG. (1951). The influence of skin temperature upon the pain threshold as evoked by thermal radiation. *Science*. 114(2954):149-50.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 32:77–88.
- Harman D. (2003). The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Sognam* 5 (5):557-61.
- Heft MW, Robinson ME. (2010). Age differences in orofacial sensory thresholds. *J Dent Res* 89(10):1102-5.
- Hess GD, Joseph JA, Roth GS. (1981). Effect of age on sensitivity to pain and brain opiate receptors. *Neurobiol Aging*. 2(1):49-55.
- Hole K, Tjølsen A. (1993) The tail-flick and formalin tests in rodents: changes in skin temperature as a confounding factor. *Pain* 53:247-253.
- Huang HW, Wang WC, Lin CC. (2010). Influence of age on thermal thresholds, thermal pain thresholds, and reaction time. *J Clin Neurosci* 17(6):722-6.
- IASP. (1979). *Pain* 6:249-52.
- Jourdan D, Boghossian S, Alloui A, Veyrat-Durebex C, Coudore MA, Eschalier A, Alliot J. (2000). Age-related changes in nociception and effect of morphine in the Lou rat. *Eur J Pain*.4(3):291-300.
- Kauppila T, Jyväskylä E, Hämäläinen MM, Pertovaara A. (1998). The effect of a selective alpha2-adrenoceptor antagonist on pain behavior of the rat varies, depending on experimental parameters. *Pharmacol Biochem Behav*. 59(2):477-85.
- Kim HK, Park SK, Zhou JL, Tagliabatella G, Chung K, Coggeshall RE, Chung JM. (2004). Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 111(1-2):116-24.
- Ko ML, King MA, Gordon TL, Crisp T. (1997). The effects of aging on spinal Neurochemistry in the rat. *Brain Res Bull*. 42(2):95-8.

Lautenbacher S, Kunz M, Strate P, Nielsen J, Arendt-Nielsen L. (2005). Age effects on pain thresholds, temporal summation and spatial summation of heat and pressure pain. *Pain* 115(3):410-8.

Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* 53(4):597-652.

Lichtman AH, Smith FL, Martin BR. (1993). Evidence that the antinociceptive tail-flick response is produced independently from changes in either tail-skin temperature or core temperature. *Pain*.55(3):283-95.

Marner L, Nyengaard JR, Tang Y, Pakkenberg B. (2003). Marked loss of myelinated nerve fibers in the human brain with age. *J Comp Neurol* 462(2):144-52.

Mauderli AP, Vierck CJ, Cannon RL, Rodrigues A, Shen C. (2003). Summation of Heat and Cold Pain Relationships Between Skin Temperature and Temporal summation of heat and cold pain. *J Neurophysiol.* 90:100-109.

McMahon S, Koltzenburg M. (1990). The changing role of primary afferent neurones in pain. *Pain* 43(3):269-72.

Melzack R, Wall PD. (1965). Pain mechanisms, a new theory. *Science* 150:971-979.

Millan MJ. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57(1):1-164.

Moreno NV, Debeljuk L, Rodríguez ED, Alvarez CF, López BD. (2004). Seasonal changes of SP and NKA in frontal cortex, striatum and testes in the rat. Role of maternal pineal gland. *Peptides.* 25(6):997-1004.

Moreno-Rocha LA, Domínguez-Ramírez AM, Cortés-Arroyo AR, Bravo G, López-Muñoz FJ. (2012). Antinociceptive effects of tramadol in co-administration with metamizol after single and repeated administrations in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 103(1):1-5.

Mountcastle VB. (2005). *The Sensory Hand neural mechanism of somatic sensation.* (Cambridge, MA: Harvard University Press).

Obrázek 1. <http://www.nan.upol.cz/neuro/cd51.html>

Obrázek 2. Rokyta R, Kršiak M, Kozák J. (2012). Transmise bolesti a její centrální projekce. *Bolest*. (editor) Rokyta R. (Tigis, Praha).

Obrázek 4. (2011). Opavský J. Teorie Bolesti. *Bolest v ambulantní praxi*. (editor) Ševčík P, Kozák J. (Maxdorf, Praha).

Owens NC, Ootsuka Y, Kanosue K, McAllen RM. (2002) Thermoregulatory control of sympathetic fibers supplying the rat's tail. *Journal of Physiology*.849-858.

Pertovaara A, Kauppila T, Hämäläinen MM. (1996). Influence of skin temperature on heat pain threshold in humans. *Exp Brain Res*. 107(3):497-503.

Poller CH, Hopster K, Rohn K, Kästner SBR. (2013). Evaluation of contact heat thermal threshold testing for standardized assessment of cutaneous nociception in horses – comparison of different locations and environmental conditions. *BMC Veterinary Research* 9:4.

Puca AA, Daly MJ, Brewster SJ, Matise TC, Barrett J, Shea-Drinkwater M, Kang S, Joyce E, Nicoli J, Benson E, Kunkel LM, Perls T. (2001). A genome-wide scan for linkage to human exceptional longevity identifies a locus on chromosome 4. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 10 505–10 508.

Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, Yang J, Bitler CM, Butcher LL, Bredesen DE. (1993). Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science*.261(5119):345-8.

Raja SN, Meyer RA, Ringkamp M, Campbell JN. (1994). Peripheral neural mechanisms of nociception. In: *Textbook of pain*, Wall PD a Melzack R (editoři), (Churchill-Livingstone, Edinburgh), pp. 13 – 44.

Randall LO, Selitto JJ. (1957). A method for measurement of analgetic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn*. 111, 409-414.

Rokyta R, Fricová J, Kozák J, Kršiak M, Lejško J, Vrba I. (2008). *Léčba bolesti ve stáří*. Rokyta R. (editor) (Mladá fronta, Praha).

Rokyta R, Kršiak M, Kozák J. (2012). Buněčné a molekulární mechanism bolesti. *Bolest*. (editor)Rokyta R, Kršiak M, Kozák J. (Tigis, Praha). 48-65.

- Romita VV, Henry JL. (1996). Intense peripheral electrical stimulation differentially inhibits tail vs. limb withdrawal reflexes in the rat. *Brain Res.*720(1-2):45-53.
- Rusina R, Vaculín Š, Yamamotová A, Barek S, Dvořáková H, Rokyta R. (2005). The effect of motor cortex stimulation in deafferentated rats. *Neuro Endocrinol Lett.* 26(4):283-8.
- Sawamura S, Tomioka T, Hanaoka K. (2002). The importance of tail temperature monitoring during tail-flick test in evaluating the antinociceptive action of volatile anesthetics. *Acta Anaesthesiol Scand.*46(4):451-4.
- Schmidt RF, Gerhart GF. (2013). *Encyklopedia of Pain 2nd editotion.* (Springer Reference).
- Schoenfeld AD, Lox CD, Chen CH, Lutherer LO. (1985). Pain threshold changes induced by acute exposure to altered ambient temperatures. *Peptides.* 1:19-22.
- Sherman ED, Robillarde E. (1964). Sensitivity to pain in relationship to age. *J AM. Geriatr Soc* 12:1037-44,
- Simone DA, Kajander KC. (1997). Responses of cutaneous A-fiber nociceptors to noxious cold. *J Neurophysiol* 77(4):2049-60.
- Strigo IA, Carli F, Bushnell MC. (2000). Effect of ambient temperature on human pain and temperature perception. *Anesthesiology.* 92(3):699-707.
- Treede RD, Kenshalo DR, Gracely RH, Jones AKP. (1999). The cortical representation of pain. *Pain* 79:105–111.
- Tjølsen A, Hole K. (1992). The effect of morphine on core and skin temperature in rats. *Neuroreport.* 3(6):512-4.
- Tjølsen A, Hole K. (1993). The tail-flick latency in influenced by skin temperature. *APS Journal* 2(2):107-111.
- Tjølsen A, Lund A, Gerge OG, Hole K. (1989) An improved method for tail-flick testing with adjustment for tail skin temperature. *Journal of Neuroscience Methods* 26(3):259-265.
- Vaculín Š, Franěk M, Hess L, Rokyta R. (2002). Ovlivnění nocicepce medetomidinem a jeho kombinací s ketamenem u laboratorního potkana. *Psychiatrie* 6(suppl4):14-17.

Vaculín Š, Yamamotová A, Franěk M. (2008). Změny bolestivého prahu v průběhu života potkana. *Psychiatrie*. 12.

Verdú E, Ceballos D, Vilches JJ, Navarro X. (2000). Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *J Peripher Nerv Syst* 5(4):191-208.

Vrinten DH, Hamers FFT. (2003). „CatWalk“ automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat;a comparison with von Frey testing. *Pain* 102(1-2): 203-209.

WHO. (2012). <http://www.who.int/features/factfiles/ageing/en/index.html>

Willis WD. (1988). Anatomy and physiology of descending control of nociceptive responses of dorsal horn neurons: comprehensive review. *Prog Brain Res* 77:1-29.

Yamamotová A, Papežová H, Rokyta R. (15.11.2008 - 19.11.2008). Is there a "birthday phenomenon" in nociceptive sensitivity in women?. *Konference: Neuroscience 2008, Washington*.

Yamamotová A, Šlamberová R. (2012). Behavioral and antinociceptive Effect of different psychostimulant drugs in prenatally methamphetamine-exposed rats. *Physiol.Res.* 61(2):139-147.

Yezielski RP, King CD, Morgan D, Carter CS, Viersk CJ. (2010). Effect of age on thermal sensitivity in the rat. *Journal of Gerontology*. 4, 353-362.

Zimmermann, M. (1983).Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16(2), 109–110.