

Modulacja aktywności wolnoprzewodzących włókien nerwowych przez czynniki stanu zapalnego w modelu stawu kolanowego szczura

The Activity of Fine Afferent Nerve Fibres of the Rat Knee Joint and Their Modulation by Inflammatory Mediators

Maciej Pawlak^{1,2(A,B,C,D,E)}, Piotr Borkiewicz^{1(B,E)}, Tomasz Podgórski^{1(C,F)},
Robert F. Schmidt^{2(A,D,G)}

¹ Zakład Biochemii, Katedra Fizjologii, Biochemii i Higieny, AWF Poznań

¹ Division of Biochemistry, Department of Physiology, Biochemistry and Hygiene, University of Physical Education, Poznań

² Physiologisches Institut der Universität, Würzburg, Niemcy

STRESZCZENIE

Wstęp. Ból pochodzący ze stawów ma charakter receptorowy i powstaje w wyniku podrażnienia zakończeń wolnoprzewodzących włókien nerwowych typu C i A-delta. Celem pracy była charakterystyka wolnoprzewodzących włókien nerwowych zaopatrujących staw kolanowy szczura oraz przedstawienie możliwości wykorzystania modelu tego stawu do obiektywnego badania wybranych procesów z zakresu patofizjologii bólu.

Materiał i metody. W modelu *in vivo* zapisywano potencjały czynnościowe z włókien nerwowych zaopatrujących normalny lub zmieniony zapalnie staw kolanowy szczura. Badano reakcję włókien nerwowych na oddziaływanie bodźców mechanicznych (włosy von Freya) oraz rotacji stawu w zakresie normalnym (bezbolesnym) oraz szkodliwym (bolesnym). Chemosensytywność włókien nerwowych testowano aplikując substancje o charakterze drażniącym lub sensytyzującym.

Wyniki. Włókna nerwowe zaopatrujące staw kolanowy szczura reagowały podrażnieniem na bodźce mechaniczne oraz chemiczne (bradykininę, kapsaicynę). Bradykinina, substancja P oraz prostaglandyna E2 sensytyzowały znaczną część włókien nerwowych w zakresie aplikowanych bodźców mechanicznych.

Wnioski. Model stawu kolanowego szczura umożliwia obiektywną analizę procesów nocyceptywnych zachodzących w stawie kolanowym. Model ten można z powodzeniem wykorzystać do badań z zakresu modulacji procesów bólowych.

Słowa kluczowe: ból, model eksperymentalny, staw kolanowy, szczur, stan zapalny

SUMMARY

Background. The origin of joint pain involves the activation of terminals of slowly conducting C and A-delta afferent fibres. The aim of this study was to characterize the slowly conducting nerve fibres supplying the rat knee joint and to illustrate the usefulness of this model for objective studies of the pathophysiological aspects of articular nociception and pain.

Material and methods. Using an *in vivo* model, single afferent fibres innervating normal and inflamed knee joints were isolated and electrophysiologically characterized. Responses of these fibres were examined after local mechanical stimulation (von Frey hairs) and rotations consisting of inward and outward rotations of the knee joint within (non-noxious) and outside (noxious stimuli) its normal working range. The chemosensitivity of afferent fibres was tested by applying excitatory and sensitizing agents.

Results. The nerve fibres supplying the rat knee joint responded to mechanical and chemical stimuli (bradykinin, capsaicin). Bradykinin, substance P and prostaglandin E2 sensitized a considerable percentage of nerve fibres to mechanical stimuli.

Conclusions. The rat knee joint is a useful model to study nociception and inflammatory processes in an objective way. It can also be successfully used to study aspects of pain modulation.

Key words: pain, experimental model, knee joint, rat, inflammation

WSTĘP

Schorzenia stawów mają szerokie spektrum etiologiczne obejmujące infekcje, procesy autoimmunologiczne lub zaburzenia metaboliczne, a ich bezpośrednie lub pośrednie skutki obejmować mogą nawet do 20% populacji kraju [1]. Towarzyszący tym schorzeniom ból, podobnie jak ból mięśni lub kości ma charakter receptorowy i powstaje jako wynik podrażnienia zakończeń wolnoprzewodzących włókien nerwowych typu A-delta i C, czyli nocyceptorów [2]. Rola tych nocyceptorów ulega zmianie w przypadku uszkodzenia tkanki bądź wystąpienia procesów zapalnych. Poprzez szereg uwalnianych wówczas substancji chemicznych, tzw. czynników stanu zapalnego, obniżeniu ulega próg wrażliwości na bodźce mechaniczne, chemiczne i fizyczne, co powoduje, iż nocyceptory mogą być wówczas aktywowane już przez bodźce o mniejszym natężeniu, dotychczas odczuwane jako nieszkodliwe [3,4,5].

Obiektywne dane dotyczące zjawisk bólowych i nocycepcji w obrębie narządu ruchu prześledzić można najlepiej w modelu zwierzęcym, a tylko w przypadku nielicznych metod badawczych możliwe jest to u ludzi (ochotników). Aktualnie dostępnych jest kilka modeli eksperymentalnych, które w oparciu o doświadczenia prowadzone na zwierzętach, najczęściej szczurach, umożliwiają nie tylko obiektywny pomiar bólu stawowego, a przede wszystkim pozwalają na zbadanie podłoża neurofizjologicznego oraz biochemicznego podawanych środków o działaniu analgetycznym [6]. Pozyskane w taki sposób informacje pozwalają na zrozumienie szeregu procesów, które nie tylko umożliwiają doskonalenie farmakologicznych metod leczenia bólu i stanów zapalnych, ale też zmieniają dotychczasowy punkt widzenia odnośnie do niektórych zabiegów fizjoterapeutycznych i technik rehabilitacyjnych [7,8,9].

Celem pracy była elektrofizjologiczna charakterystyka włókien nerwowych zaopatrujących staw kolanowy szczura oraz przedstawienie możliwości wykorzystania eksperymentalnego modelu stawu kolanowego szczura do obiektywnego badania wybranych procesów z zakresu patofizjologii bólu i stanu zapalnego w obrębie narządu ruchu. Zamierzeniem tej pracy jest również uświadomienie potrzeby prowadzenia takich badań oraz nakreślenie ich praktycznych aspektów.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 215 włóknach dośrodkowych nerwu przyśrodkowego stawowego szczurów Wistar, po spełnieniu procedur formalnych dotyczących doświadczeń na zwierzętach. Znieczu-

BACKGROUND

Joint diseases have a wide etiological spectrum including infections, autoimmune processes and metabolic disorders and their direct and indirect effects can affect up to 20% of a country's population [1]. Pain accompanying these diseases, just as muscle and bone pain, results from activation of terminals of slowly conducting A-delta and C nerve fibres, called nociceptors [2]. The function of such nociceptors changes in damaged or inflamed tissue. Through release of chemical substances, so-called inflammatory mediators, the threshold for mechanical, chemical and physical stimuli decreases and nociceptors are activated by stimuli of lower intensity, classified as non-noxious under normal conditions [3,4,5].

Objective data concerning pain and nociception in the musculoskeletal system can be studied in animal models and, in only some cases, on humans (volunteers). Currently, a few experimental models based on experimental animals, mainly rats, are available. They allow both an objective measurement of joint pain and the study of neurophysiologic and biochemical background of action of analgesic drugs [6]. The information obtained in this way make it possible to understand a number of processes which not only help improve the pharmacological methods of pain and inflammation therapy, but also change the current point of view regarding certain physiotherapeutic treatments and rehabilitation techniques [7,8,9].

The goal of this paper was to provide an electrophysiological characterization of nerve fibres supplying the knee joint in the rat as well as present the rat knee joint model as an objective research tool to study selected processes of the pathophysiology of musculoskeletal pain and inflammation. Moreover, the intention of this paper is to point out the usefulness of such research and its practical aspects.

MATERIAL AND METHODS

The study was carried out on 215 afferent nerve fibres of the medial articular nerve of adult male Wistar rats. All experiments were prereviewed and consented by a local animal care committee. The ani-

lenie uzyskiwano poprzez śródtrzewnową (i.p.) iniekcję trapanalu (Thiopental; Byk Gulden, Niemcy) w ilości 120-150 mg/kg masy ciała, a następnie utrzymywano je podając 20-25 mg/kg i.p. tego środka. Zwierzęta tracheotomizowano i respirowano po dożylnym podaniu środka zwiotczającego mięśnie (Pancuronium; Organon, Niemcy). U części zwierząt ($n = 93$), wywoływano stan zapalny poprzez dostawową iniekcję wodnego roztworu kaolinu oraz karagenianu [10].

Wypreparowane z proksymalnego odcinka nerwu udowo-goleniowego (*n. saphenus*) cienkie wiązki włókien nerwowych (filamenty) umieszczano kolejno na elektrodzie zapisującej, z której następnie odprowadzano potencjały czynnościowe (Ryc. 1). Wrażliwość nocyceptorów na bodźce mechaniczne określano poprzez nacisk za pomocą kalibrowanych włosów von Freya (Ryc. 2A) lub poprzez aplikację cyklu bodźców złożonego z 4 rotacji stawu kolanowego, tj. rotacji wewnętrznej i rotacji zewnętrznej w ramach normalnego (tzn. bezbolesnego lub nienoksycznego) zakresu roboczego stawu oraz takich rotacji w obszarze bolesnym (tzn. szkodliwym lub noksycznym). Rotacje wykonywano za pomocą urządzenia wytwarzającego moment obrotowego o wielkości 20 mNm i 60 mNm, odpowiednio dla bodźców nienoksycznych i noksycznych. Każda rotacja trwała 10 sekund, a cykle powtarzano co 3 lub 5 minut (Ryc. 2B).

Bodźce chemiczne (bradykininę – BK; substancję P – SP lub prostaglandynę E2 – PGE2) aplikowano w rejon stawu kolanowego zaopatrywany przez nerw piszczelowy. W tym celu wprowadzano w tętnicę piszczelową cienki kateter w kierunku proksymalnym, poniżej miejsca odejścia tętnicy stawowej (Ryc. 1), dzięki czemu substancje testowe o koncentracji od 10^{-5} do 10^{-3} M mogły być transportowane wstecznie do tętnicy, aby następnie, z biegiem krwi, poprzez gałąź tętnicy stawowej przeniknąć do tkanki stawu kolanowego. Kateter wypełniano objętością 0,2 ml rozpuszczonej substancji testowej, po czym jego zawartość aplikowano w arterię i przepłukiwano tyrodą (0,3 ml) przez 5 sekund.

Badania dotyczące sensytyzacyjnego (uwrażliwiającego) działania substancji chemicznych (BK, SP, PGE2) na włókna nerwowe wykonywano przeprowadzając serię kontrolnych cykli ruchowych, przy czym tylko ostatnie 3-5 cykli charakteryzujących się zbliżoną do siebie liczbą impulsów wykorzystywano do określenia wielkości referencyjnej (kontrolnej), przyjmowanej za 100%.

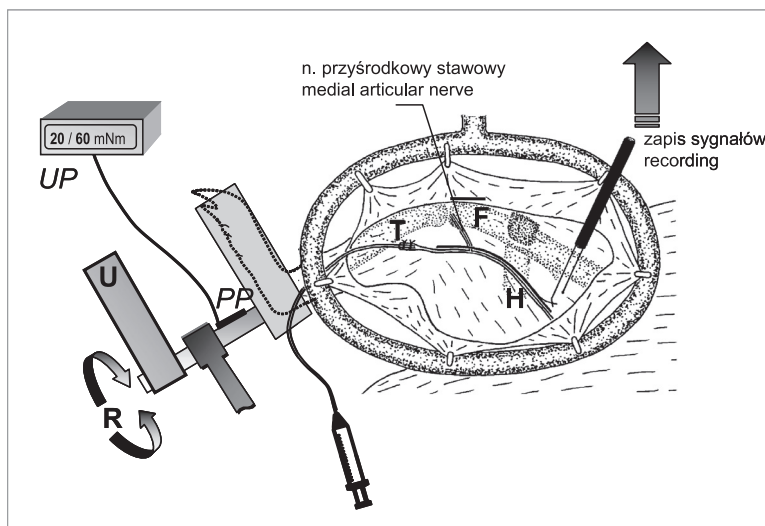
Liczba potencjałów czynnościowych zapisywanych z włókien nerwowych była rejestrowana i kwantyfikowana przy użyciu oprogramowania Mrate, a wyniki opracowano statystycznie korzystając z pakietu statystycznego SPSS.

mals were anaesthetized by an i.p. injection of 120-150 mg/kg Thiopental (Byk Gulden, Germany), supplemented (20-25 mg/kg i. p.) when required to maintain a deep anaesthesia. After a tracheotomy the rats were paralyzed by i.v. administration of Pancuronium (Sigma, Germany) and artificially ventilated. In some of the animals ($n = 93$), an acute inflammation was induced by injection of an aqueous solution of kaolin and carrageenan into the joint cavity [10].

Fine filaments were dissected free from the proximal saphenous nerve and placed on a recording electrode for afferent recording of action potentials (Fig. 1). The mechanosensitivity of nociceptors was tested by pressure of calibrated v. Frey hairs (Fig. 2A) or by application of stimuli cycles consisting of 4 knee rotations, outward and inward rotations within the normal working range of the knee (= non-noxious, normal) and outward and inward rotations exceeding the normal working range of the joint (= noxious, hyperrotation). The amount of torque applied to the joint was measured by a force transducer attached to the foot and standardized for each of the individual movements (approximately 20 mNm for normal and 60 mNm for extreme rotations). Each rotation lasted 10 s and such a movement cycle was repeated every 3 or 5 min (Fig. 2B).

The chemical stimuli (bradykinin, BK; substance P, SP; or prostaglandin E2, PGE2) were administered close to the part of the knee joint innervated by the saphenous nerve. For this purpose a catheter was inserted into the right saphenous artery at a point distal to the medial articular artery branch (Fig. 1). This cannula served as a portal to administer test substances at a concentration of 10^{-5} to 10^{-3} M to the knee by close intraarterial injection. The catheter was filled with 0.2 ml of a solution of the substance tested which was then given as a bolus i.a. and the catheter was washed with 0.3 ml of Tyrode's solution within 5 s.

The sensitization effect of chemical substances tested (BK, SP, PGE2) on nerve fibres was tested in a series of control cycles, but only the last 3-5 cycles with a similar number of spikes were used as a reference (control) value expressed as 100%. The number of nerve action potentials was recorded and quantified using Mrate software and the results were calculated and statistically analyzed using a SPSS software package.



Ryc. 1. Schemat modelu stawu kolanowego szczura. Stopę szczura mocowano w uchwyt w formie buta, celem umożliwienia pomiaru momentu obrotowego (tzn. obciążenia stawu kolanowego) wywołanego ruchem odwodzącym i przywodzącym kości piszczelowej (T). Kość udowa (F) została przymocowana za pomocą klamry (H) celem jej unieruchomienia. Do zapisu aktywności włókien nerwowych unerwiających staw kolanowy, izolowano cienkie filamenty, które nakładano na srebrną elektrodę. R – ruchy rotacyjne stawu kolanowego; UP – urządzenie pomiarowe; PP – pasek pomiarowy; U – uchwyt

Fig. 1. Experimental set-up to perform single fibre recordings from knee joint afferents. (A) A shoe-like holder is fixed to the hind foot of the rat to measure the torque during rotation of the tibia (T) against the femur. A special grip (H) is attached to the femur (F) and fixed to a frame immobilizing the proximal hindlimb. For electrical recording of the mechanosensitivity of articular afferents innervating the knee joint via medial articular nerve, fine filaments of the saphenous nerve were isolated and put on a silver wire recording electrode. R – rotation movements of the knee joint, UP – measuring equipment, PP – strain gauge, U – grip

WYNIKI

Badane włókna nerwowe charakteryzowały się prędkością przewodzenia potencjałów czynnościowych w zakresie od 0,6 do 19,2 m/s. Do włókien wolnoprzewodzących grupy C (do 2,5 m/s), wg kryterium podanego przez Gassera [11] należało 42% badanej populacji, pozostałe natomiast do grupy A-delta, przewodzącej szybciej, od 2,51 do 20 m/s. Pola receptywne testowanych zakończeń włókien nocycceptywnych były najczęściej pojedyncze, o średnicy 2-5 mm. Średni próg pobudzenia przez bodziec elektryczny wynosił dla tych włókien 9,2 V.

Włókna ze stawów zdrowych miały przeważnie charakter wysokoprogowy (60%), tzn. aktywowane były dopiero za pomocą rotacji w obszarze noksychnym. Udział takich włókien w stawach zapalnych był niższy i wynosił 40%. Załedwie 8,1 i 7,6% wszystkich badanych włókien aferentnych, odpowiednio w stawach zdrowych i zmienionych zapalnie, wykazywało aktywność spontaniczną na początku eksperymentu, przy czym częstotliwość rejestrowanych impulsów wynosiła od 0,1 do 3 Hz i w przypadku 40% włókien utrzymywała się na niezmiennym poziomie.

Bodźce mechaniczne wywołane przez nacisk włosami von Freya prowadziły w tym modelu do odpowiedzi włókien nerwowych wyrażonych jako liczbę

RESULTS

The nerve fibres tested had conduction velocities of their action potentials between 0.6 to 19.2 m/s. About 42% of them were group C slowly conducting fibres (up to 2.5 m/s) according to the classification of Gasser [11] and the rest were A-delta fibres, conducting faster, from 2.51 to 20 m/s. The receptive fields of nociceptive fibres tested were mainly single with a diameter of 2-5 mm. The mean electrical threshold was 9.2 V.

The afferent fibres from normal joints were mostly classified as high-threshold (60%) and were activated only by noxious rotations. In inflamed knee joints the proportion of such fibres was lower (40%). Only 8.1 and 7.6%, respectively, of all fine afferent fibres tested in normal and inflamed joints demonstrated spontaneous activity at the beginning of the experiment. The frequency of recorded spikes ranged from 0.1 to 3 Hz, and in 40% of the fibres remained unchanged throughout the experiment.

The mechanical stimuli evoked by pressure with von Frey hairs led in this model to responses of nerve fibres, expressed as the number of their actions potentials (Fig. 2A, upper row). Furthermore, in this experimental knee joint model, the mechanical stimuli applied as outward and inward rotations in non-noxious and noxious ranges generated stable and

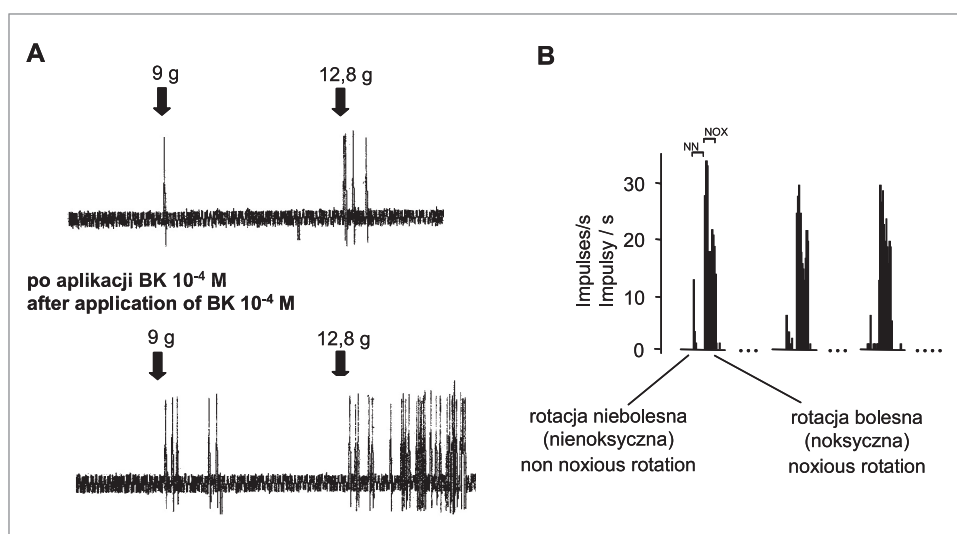
ich depolaryzacji (Ryc. 2a, górny rząd). Również aplikacja bodźców mechanicznych w formie rotacji zewnętrznych i wewnętrznych, zarówno w zakresie niebolesnym, jak i noksyicznym stawu wywoływała w warunkach zastosowanego modelu eksperymentalnego stabilne i dobrze reprodukowane odpowiedzi, co ilustrują trzy rotacje kontrolne przedstawione na Ryc. 2b. Wykazano, że liczba wszystkich zarejestrowanych podczas rotacji potencjałów czynnościowych dla całej populacji badanych włókien nerwowych była w stawie zapalnym o 45% wyższa niż w stawie zdrowym. Różnica ta była jeszcze bardziej widoczna (66,5%), kiedy porównano tylko rotacje wykonane w zakresie bólowym (noksyicznym).

Znaczna część nocyceptorów reagowała podrażnieniem na aplikowane bodźce chemiczne. Przykład odpowiedzi włókna nerwowego na aplikację bradykininy zamieszczono na Ryc. 3. W przypadku tego peptydu podobną odpowiedź przy zastosowaniu koncentracji 10^{-4} M lub 10^{-3} M, zarejestrowano u 47,8% i 35,3 % włókien nerwowych, odpowiednio ze zdrowych ($n = 46$) i zapalnych stawów kolanowych ($n = 34$). W podobny sposób, wytworzeniem dużej liczby potencjałów czynnościowych, reagowało 58% i 61% włókien nocyceptywnych podrażnionych przez kap-

well reproduced responses, as illustrated in the three control rotations in Figure 2B. It was shown that the number of all registered action potentials during rotations in the complete population of fibres from inflamed joints was higher by 45% compared with fibres from normal knee joints. The difference was even more evident (66.5%) when only noxious rotations were compared.

A significant proportion of nociceptors was activated by chemical stimuli. Examples of responses of nerve fibres after the administration of bradykinin are illustrated in Fig. 3. Similar responses to this peptide at a concentration of 10^{-4} M or 10^{-3} M, were registered in 47.8% and 35.3% of nerve fibres from normal ($n = 46$) and inflamed knee joints ($n = 34$), respectively. Similar generation of a large amount of action potentials was found for 58% and 61% of nociceptive fibres activated by capsaicin at a concentration of 10^{-4} M or 10^{-3} M from normal ($n = 30$) and inflamed knee joints ($n = 18$), respectively. Activation of fine afferent nerve fibres was only sporadically observed for substance P (only 4%) and prostaglandin E2 (from 3 to 10% in different experiments).

Apart from objective analyses of nociceptor stimulation, the rat knee joint model makes it possible



Ryc. 2. (a) Potencjały czynnościowe zarejestrowane z jednego dośrodkowego włókna nerwowego (prędkość przewodzenia 2,1 m/s) ze zdrowego stawu kolanowego podczas stymulacji mechanicznej za pomocą włosów von Freya o podanym nacisku, w warunkach kontrolnych (górny rząd) oraz po aplikacji bradykininy (dolny rząd). Można zauważyć, że próg wrażliwości nocyceptora został osiągnięty w tym przypadku przy zastosowaniu nacisku 9 g, a w konsekwencji tego wygenerowany został pojedynczy potencjał czynnościowy. Podwyższenie siły nacisku do 12,8 g, zwiększyło znacznie liczbę wytworzonych potencjałów czynnościowych. (b) Histogram aktywności włókna dośrodkowego (prędkość przewodzenia = 3,4 m/s), przedstawiający 1., 3. i 5. cykl ruchowy dla warunków kontrolnych

Fig. 2. (a) Action potentials of an afferent unit from the normal knee joint (conduction velocity 2.1 m/s) during local mechanical stimulation using v. Frey hairs with defined pressure under control conditions (upper row) and after the application of bradykinin, BK (lower row). The threshold for mechanical stimuli for this nerve fibre was 9 g and this pressure produced only one spike. An increase of the stimulus strength to 12.8 g enhanced the number of spikes. (b) Peristimulus-time histogram (spikes/s) of the activity of an afferent fibre (c. v. = 3.4 m/s) showing the first, third, and fifth movement cycles of control rotations

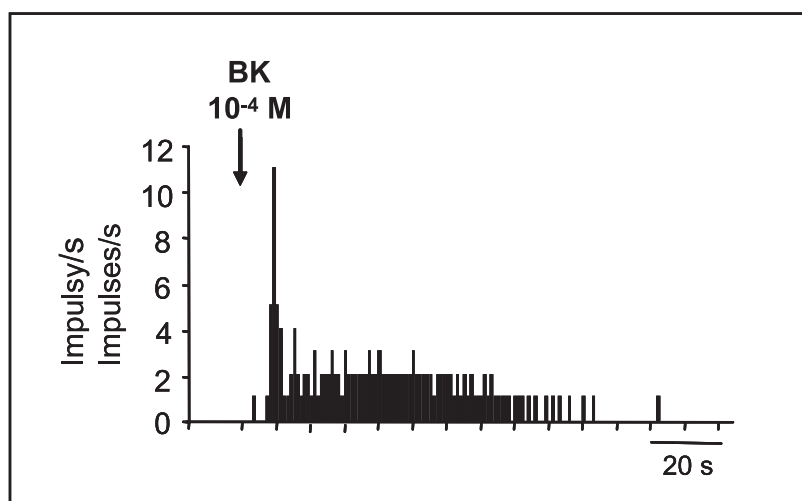
saicynę o koncentracji 10^{-4} M lub 10^{-3} M, odpowiednio w grupie włókien pochodzących ze zdrowej ($n = 30$) i zmienionej zapalnie tkanki stawu kolanowego ($n = 18$). Tylko w bardzo sporadycznych przypadkach rejestrowano podrażnienie włókna nerwowego po aplikacji substancji P (około 4 %) lub prostaglandyny E2 (w różnych doświadczeniach od 3 do 10%).

Poza obiektywną analizą pobudzenia nocyceptorów, model stawu kolanowego szczura umożliwia również badanie procesów uwrażliwienia, czyli sensytyzacji nocyceptorów, co wyraża się m. in. w zwiększonej odpowiedzi na kolejne, aplikowane bodźce mechaniczne lub chemiczne. Znaczne efekty sensytyzacyjne zanotowano w przypadku aplikacji bradykininy. Peptyd ten, poza działaniem drażniącym, uwrażliwiał również znaczną część aferentnych zakończeń nocyceptywnych na bodźce mechaniczne, na co wskazuje zwiększenie liczby generowanych potencjałów czynnościowych przez ten sam nacisk włosów von Freya (Ryc. 2A, dolny rząd). Bradykinina w stężeniach od 10^{-5} M do 10^{-3} M sensytyzowała również włókna nerwowe na zastosowane rotacje w przypadku 57% i 44%, odpowiednio w zdrowych ($n = 28$) i zmienionych zapalnie ($n = 22$) stawach kolanowych. Efekty sensytyzujące wśród włókien ze zdrowych stawów były statystycznie istotnie większe niż w przypadku włókien ze stawów zapalnych.

Również SP sensytyzowała włókna nerwowe na bodźce mechaniczne (Ryc. 4). W populacji badanych włókien stwierdzono statystycznie istotny przyrost liczby impulsów po podaniu SP (10^{-4} M) u 38% włókien nerwowych ze zdrowego ($n = 44$) i w przypadku 26,5% włókien z zapalnego stawu kolanowe-

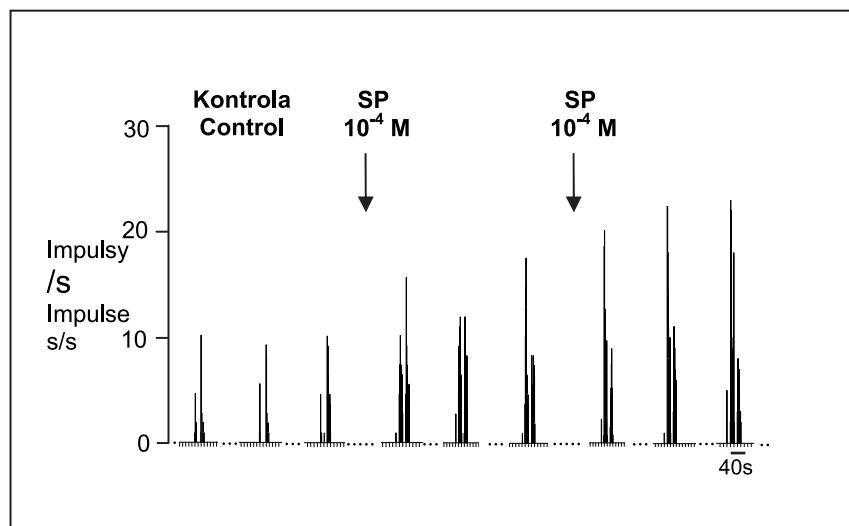
to examine the sensitization of nociceptors, recorded as increased responses following the application of successive mechanical and/or chemical stimuli. Considerable sensitisation was observed after the administration of bradykinin. Apart from its excitatory action, this peptide is able to sensitize some of the fine afferent nociceptive endings to mechanical stimuli, as shown by an increased number of action potentials under the same pressure from von Frey hairs (Fig. 2A, lower row). Bradykinin at a concentration of 10^{-5} M do 10^{-3} M also sensitized nerve fibres to rotations, in 57% and 44% of normal ($n = 28$) and inflamed ($n = 22$) knee joints, respectively. The sensitizing effects in fibres from normal joints were statistically significantly higher compared to fibres from inflamed joints.

Substance P also successfully sensitized nerve fibres to mechanical stimuli (Fig. 4). In the study population of fibres, statistically significant increases in the number of impulses after SP administration (10^{-4} M) were found in 38% nerve fibres ($n = 44$) from among normal and in 26.5% units ($n = 38$) from among inflamed knee joints. The administration of prostaglandin E2 (10^{-4} M) sensitized more than 60% of nerve fibres to mechanical stimuli.



Ryc. 3. Charakterystyka wyładowań włókna dośrodkowego, o prędkości przewodzenia 2,2 m/s, po iniekcji i. a. bradykininy (BK) w rejon stawu kolanowego, zgodnie z oznaczonymi przez strzałki relacjami czasowymi i zastosowaną koncentracją

Fig. 3. Activity of an afferent unit (conduction velocity 2.2 m/s) after i. a. injection of bradykinin, BK, in the knee joint area, according to arrows pointing time and concentration used



Ryc. 4. Histogram przedstawiający wyładowania włókna dośrodkowego (prędkość przewodzenia = 1,73 m/s) w trakcie regularnie przeprowadzanych cykli ruchowych po aplikacji SP 10^{-4} M (strzałki). Na rycinie pokazano wyniki 1., 3. i 5. cyklu ruchowego. Odstęp czasu pomiędzy aplikacjami wynosił 20-25 minut

Fig. 4. Histogram illustrating the activity of afferent fibre (conduction velocity 1,73 m/s) during regular movement cycles after application of SP 10^{-4} M (arrows). This figure shows the first, third, and fifth movement cycles. The interval between applications was 20-25 minutes

go ($n = 34$). W przypadku aplikacji prostaglandyny (PGE2) zanotowano efekty uwrażliwiające odpowiedzi na bodźce mechaniczne w odniesieniu do ponad 60% włókien nerwowych.

DYSKUSJA

Wykorzystany w badaniach model stawu kolanego szczura umożliwia przeprowadzenie zapisów z pojedynczych włókien nerwowych, co pozwala na obiektywną charakterystykę funkcjonalnej roli doprowadzających włókien nerwowych zaopatrujących ten rejon. Powyższe, w powiązaniu z uzyskaniem powtarzalnych reakcji na zastosowane czynniki o charakterze mechanicznym i chemicznym umożliwia ocenę i weryfikację różnych hipotez naukowych z obszaru farmakologii, fizjoterapii czy też ortopedii, tym bardziej, że anatomicznie staw kolanowy szczura jest podobny do stawu kolanego innych ssaków oraz człowieka. Różnice w zakresie geometrii powierzchni stawowych oraz przebiegu więzadeł i mięśni są konsekwencją odmiennej postawy podczas poruszania się, co wyraża się w przyjmowaniu przez staw kolanowy szczura pozycji zgiętej, podczas gdy w przypadku człowieka dominuje pozycja wyprostowana stawu [12].

Badania własne dotyczące charakterystyki włókien nerwowych o charakterze nocyceptywnym porównać można z wynikami prac przeprowadzonych na preparatach stawu skokowego [13] skóry tylnej łapy szczura [14] bądź też stawu kolanego kota

DISCUSSION

The rat knee joint model used in our study enables electrophysiological recordings from individual fine nerve fibres, allowing an objective characterization of the functional role of afferent nerve fibres supplying this area. This combined with reproducible reactions to mechanical and chemical stimuli applied during the experiments enables an evaluation and verification of various scientific hypotheses in the field of pharmacology, physiotherapy or orthopaedics, the more so as, anatomically, the knee joint of the rat is similar to other mammals' knee joints, including those of humans. Some differences in the geometry of joint surfaces and the course of ligaments and muscles are a consequence of a different position of the knee joint during motion, the joint being flexed in the rat, but generally extended in humans [12].

The results of this study pertaining to the characteristics of nociceptive nerve fibres supplying the knee joint of the rat are comparable with the results of other experiments carried out on preparations of the ankle joint [13], skin of the posterior rat paw [14] or on the feline knee joint [3,5,15,16]. There are similarities concerning the percentage of slowly con-

[3,5,15,16]. Stwierdza się przy tym podobieństwo dotyczące zarówno udziału włókien wolnoprzewodzących, ich progów wrażliwości na bodźce mechaniczne i chemiczne, jak również mechanizmów aktywacji receptorów prowadzących do depolaryzacji i wytworzenia potencjałów czynnościowych [4,5,17]. Zbieżne są też obserwacje o średnich progach naciśku, które w tkance zmienionej zapalnie, we wszystkich modelach eksperymentalnych były niższe niż w tkance zdrowej. W badanej populacji włókien nerwowych ze stawu kolanowego szczura stwierdzono tylko znacznie niższy udział włókien spontanicznie aktywnych, tzn. depolaryzujących bez eksperymentalnego aktywowania włókna nerwowego bodźcami mechanicznymi, chemicznymi lub fizycznymi, w porównaniu z wynikami badań prowadzonych na innych gatunkach zwierząt [3,18].

Znaczna liczba włókien nerwowych podlegała podrażnieniu lub sensybilizacji przez czynniki chemiczne należące najczęściej do grupy tzw. czynników stanu zapalnego. Drażniące efekty prostaglandyn stwierdzane we włóknach aferentnych nerwu przyśrodkowego stawowego były niższe w porównaniu z danymi uzyskanymi w doświadczeniach prowadzonych na kotach i wynosiły około 10%. Również Grubb i wsp. [19] stwierdzili tylko u 18% cienkich, wolnoprzewodzących włókien nerwowych ze stawu skokowego szczura aktywację poprzez PGE₂.

Dane dotyczące liczby włókien nocycceptywnych podrażnionych przez BK nie są w piśmiennictwie homogenne i sięgają do 70% w przypadku włókien aferentnych nerwu przyśrodkowego stawowego u kota [20], co może wynikać z udziału w aktywowaniu stawowych włókien aferentnych przez BK zarówno receptorów B₂, jak i podlegających ekspresji w stanie zapalnym receptorów B₁. Drażniące i uwrażliwiające działanie BK może być, przynajmniej częściowo, efektem odmiennych mechanizmów, bowiem zarówno u kotów, jak i szczurów znajdują się włókna aferentne nerwu przyśrodkowego stawowego, które dają się wyłącznie podrażnić lub tylko sensytyzować albo też podrażnić i sensytyzować [10,18,21]. Stwierdzony w szeregu eksperymentach, kilku, a nawet kilkudziesięciosekundowy czas opóźnienia (latencja) pomiędzy aplikacją porcji testowej BK i wystąpieniem odpowiedzi może sugerować nie tylko bezpośrednie mechanizmy prowadzące do takich reakcji, ale również pośrednie, powiązane z wydzielaniem innych mediatorów. Pewnego potwierdzenia takich przypuszczeń dostarczyły obserwacje Averbeck i Reeh [22] wykazujące, że w preparacie skóry szczura *in vitro* aplikacja BK w koncentracji 10⁻⁵ M znacznie zwiększyła uwalnianie innych neuropeptydów, m. in. SP, calcitonine gene-related peptide (CGRP) lub PGE₂.

ducting nerve fibres, their sensitivity thresholds to mechanical and chemical stimuli as well as mechanisms of receptor activation leading to depolarization and generation of action potentials [4,5,17]. Also the mean thresholds for mechanical stimuli (pressure) in inflamed tissue were lower, compared with normal tissue, in ours and other experimental models. The study population of nerve fibres from the rat knee joint included a much lower number of spontaneous active fibres. Such fibres, depolarizing without experimental activation by mechanical, chemical or physical stimuli, are more frequent in recordings acquired from other animal species [3,18].

A large number of nerve fibres were excited or sensitized by chemical substances belonging mostly to the group of inflammatory factors. The stimulating effects of prostaglandin found in the population of afferent fibres of the medial articular nerve amounted to 10% and were lower in comparison with data obtained in experiments conducted in cats. Also, Grubb et al. [19] found that only 18% of fine slowly conducting nerve fibres from the rat ankle joint were activated by PGE₂.

Literature data concerning the number of nociceptive fibres stimulated by BK are not homogeneous, with figures reaching 70% of nerve fibres in the feline medial articular nerve [20], which may be a consequence of BK activation via B₂ receptors as well by B₁ receptors, the latter being expressed only during inflammatory processes. The excitation and sensitization effects of BK are probably, at least partly, caused by two different mechanisms, because some afferent articular fibres of cats and rats can be either excited or sensitized, and others can be both excited and sensitized [10,18,21]. It was found in many of experiments that there was a latency of several seconds between the administration of BK and the evoked response, which suggests not only direct mechanisms leading to the response, but also indirect ones, associated with secretion of other mediators. This assumption is confirmed to a certain extent by the results of Averbeck and Reeh [22], who demonstrated that administration of BK at a concentration of 10⁻⁵ M significantly increased the release of other neuropeptides such as SP, calcitonin gene-related peptide (CGRP) or PGE₂ in an *in vitro* preparation of rat skin.

The activity of nociceptive fibres is also modulated by substances with sensitizing properties. Such substances released close to the nociceptor or available otherwise may noticeably change its sensitivity to stimuli. The role of "inflammatory mediators", such as bradykinin [4,20], serotonin [16], prostaglandin E₂ and I₂ [15,17] or histamine [23], has been studied in knee joints and other tissues [22,24,25].

Aktywność włókna nocyceptywnego modulowana jest również przez substancje o charakterze sensytyzującym. Uwolnione w otoczeniu nocyceptora albo dostępne w inny sposób substancje te mogą bowiem znacznie zmienić jego wrażliwość na odbierane bodźce. W piśmiennictwie fachowym rola odgrywana przez „mediatory stanu zapalnego”: bradykininę [4,20], serotoninę [16], prostaglandynę E2 i I2 [15,17] oraz histaminę [23] była przedmiotem badań zarówno w stawie kolanowym, jak i w innych tkankach [22,24,25].

W badanej populacji włókien nerwowych bradykinina nie tylko podrażniała włókna aferentne nerwu stawowego przyśrodkowego, ale ponadto większość z nich (59%) uwrażliwiała na bodźce mechaniczne. Sensytyzacja przez BK wiązała się również z obniżeniem progu na bodźce aplikowane przez włosy von Freya (Ryc. 2) oraz z silniejszymi reakcjami na bodźce ruchowe (rotacje), jak i bodźce chemiczne.

Również prostaglandyny, których obecność wykazano m.in. w płynie stawowym pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów [26,27] przejawiają znaczne sensytyzujące działanie na włókna nerwowe zaopatrujące staw kolanowy [15,17,28]. PGE2 spowodowała również w preparacie skóry szczura *in vitro* obniżenie progu wrażliwości na bodźce mechaniczne, co prowadziło do prawie 50-procentowego wzrostu liczby impulsów na bodźce ponadprogowe [29]. Blokowanie syntezy prostaglandyn kwasem acetylosalicylowym albo indometacyną skutecznie obniżyło zarówno aktywność spontaniczną nocyceptorów, jak i wywołaną przez bodźce mechaniczne w zdrowym i zapalnym stawie kolanowym [28].

Aplikacja substancji P prowadziła wprawdzie bardzo rzadko do podrażnienia włókien nerwu stawowego przyśrodkowego [5], powodowała jednak znaczną sensytyzację odpowiedzi na bodźce ruchowe (rotacje) i to zarówno we włóknach ze zdrowych, jak i zapalnych stawów kolanowych. Stwierdzony w badaniach własnych wyższy udział włókien nerwowych podlegających sensytyzacji ze zdrowych stawów w porównaniu z populacją włókien ze stawu zapalnego był najprawdopodobniej konsekwencją uwalniania SP w szczelinę stawową i okoliczną tkankę [30, 31], co prowadziło do „przedsensytylizacji” zakończeń nocyceptywnych. Efekt ten dotyczy również innych mediatorów stanu zapalnego jak PGE2 i BK, gdzie procesy zapalne zachodzące w stawie doprowadziły do częściowej sensytyzacji. W konsekwencji egzogenna aplikacja tych substancji może uaktywnić jeszcze tylko niewielką część włókien aferentnych. W przypadku substancji P rozważane są też inne, pośrednie możliwości sensytyzacji włókien nerwowych, np. aktywizowanie komórek tucznych przez SP z na-

Bradykinin not only excited afferent fibres of the medial articular nerve in the study population but also sensitized most of them (59%) to mechanical stimuli. BK-related sensitization led to a decrease in the threshold of sensitivity to mechanical stimuli applied by von Frey hairs (Fig. 2) or more pronounced responses to movement stimuli (rotations) and to chemical stimuli.

Prostaglandins, which were found/among other locations, in articular fluid collected from patients suffering from rheumatoid arthritis [26,27] also demonstrate a marked sensitizing effect on knee joint fibres [15,17,28]. PGE2 also decreased the sensitivity threshold to mechanical stimuli in an *in vitro* rat skin preparation, resulting in an increased number (up to 50%) of recorded impulses evoked by supra-threshold stimuli [29]. The blocking of prostaglandin synthesis by acetylsalicylic acid or indomethacin successfully decreased the activity of nociceptors, both spontaneous and induced by mechanical stimuli, in the normal and inflamed knee joint [28].

The administration of substance P led to excitation of medial articular nerve fibres of the rat only in some cases [5], but caused marked sensitization to movement stimuli (rotations) in both normal and inflamed knee joints. The finding of a higher proportion of nerve fibres underlying sensitization in normal knee joints compared with fibres from inflamed joints was probably a consequence of SP release into the joint and the surrounding tissue [30,31], which led to "presensitization" of nociceptive endings. This effect is also seen with other inflammatory mediators, such as PGE2 and BK, where inflammatory processes produced partial sensitization in the knee joint. As a result, exogenous administration of such substances can activate only a small proportion of afferent fibres. In the case of substance P, other, indirect processes of nerve fibre sensitization are also considered, for example the activation of mast cells by SP with the following activation of histamine and/or other substances sensitizing the nociceptors. This assumption is supported by data about the receptor NK1, of significance for SP, which has been found both on nerve fibres in the joint and, using immunohistochemical techniques, on mast cells [32].

The rat knee joint model used in our study affords a wide range possibilities for application, from the monitoring of inflammatory processes, to activation and sensitization of nociceptors [3,33] to analysis of spontaneous activity of nerve fibres [34] or studies of efficacy of substances with analgesic properties. This model also makes possible precise and reproducible application of mechanical, chemical and physical (for example thermal or electric) stimuli. It also adds

stępującą aktywacją histaminy i/lub innych substancji powodując sensytyzację nocyceptorów. To przypuszczenie wzmacniają dane o istotnym dla SP receptorze NK1, który wykazano zarówno na stawowych włóknach nerwowych, jak również, immunohistochemicznie, na komórkach tucznych [32].

Model stawu kolanowego szczura zastosowany w badaniach własnych daje szerokie możliwości jego wykorzystania, od monitorowania rozwoju procesu zapalnego, przez aktywację i sensytyzację nocyceptorów [3,33], aż po analizę aktywności spontanicznej włókien nerwowych [34] lub określenie efektywności substancji o działaniu analgetycznym. Pozwala on również na dokładną i powtarzalną aplikację bodźców mechanicznych, chemicznych oraz bodźców fizykalnych, np. termicznych czy elektrycznych. Obszar zastosowania modelu badawczego poszerza możliwość wywołania w stawie kolanowym szczura eksperymentalnego stanu zapalnego.

Model stawu kolanowego pozwala na dalsze badanie istotnego również z klinicznego punktu widzenia zagadnienia zależności pomiędzy pro- i przeciwzapalnie działającymi peptydami w obszarze terminalnym włókien nocyceptywnych, bowiem wykazano, że aktualna wrażliwość nocyceptora w dużym stopniu zależna jest od środowiska, w którym się znajduje, a dokładniej od występującego tam „koktajlu” złożonego z pro- i antyzapalnie działających peptydów [33,35,36,37].

Podkreślając znaczenie modelu stawu kolanowego dla badań klinicznych poprzez umożliwienie testowania technik wyłączenia bólu, badanie środków analgetycznych działających miejscowo czy też wytypowanie swoistych punktów zaczepu dla środków farmakologicznych, warto dostrzec jego atrakcyjność dla sportu i fizjoterapii. Przedstawiony w pracy model włączony został ostatnio w cykl badań dotyczących wpływu czynników fizycznych na aktywność włókien nerwowych. Powyższe powinno przyczynić się do pełniejszego zrozumienia roli i funkcji niektórych czynników stosowanych podczas zabiegów rehabilitacyjnych, szczególnie temperatury (np. kąpiele lub naświetlań) lub lokalnego schłodzenia tkanki (m.in. krioterapii). Oddziaływanie temperatury nabrało nowego wymiaru wskutek poznania molekularnego podłoża aktywacji kanałów z rodziny TRP (Transient Receptor Potential), do których należą poznane dotychczas kanały jonowe wrażliwe na temperaturę. Ostatnio wskazuje się nawet na analgetyczny charakter aktywacji kanału TRPM8 [38] oraz wyjaśnienia rolę sygnalizacyjną, jak również terapeutyczną niektórych, znanych i stosowanych od dawna substancji jak kapsaicyna [39], allicina [9] czy mentol [7]. Nie jest też wykluczone, że w procesy sensyty-

another possibility for inducing an experimental inflammatory process within the rat knee joint.

The knee joint model also allows further investigations of a significant clinical problem, namely, the relationship between pro- and antiinflammatory peptides acting close to the terminal nociceptive fibres. To date it has been shown that the nociceptor sensitivity status depends mainly on its environment, and more precisely, on the composition of a "cocktail" of pro- and antiinflammatory peptides found in the environment at a given time [33,35,36,37].

While emphasising the significance of the knee joint model for clinical research, including its potential for use in testing new methods for abolishing pain, studying pharmacological analgesic agents or selecting targets for pharmacological therapy, it is also worth noting its attractiveness for sport and physiotherapy. The model has recently been implemented in a series of studies concerning the influence of physical factors on nerve fibre activity. The studies should help to better understand the role and function of factors employed during physiotherapeutic and rehabilitation treatment, especially temperature (as in baths or irradiation) or local cooling of tissue (e.g. cryotherapy). The effects of temperature have acquired a new meaning with the discovery of the molecular background of activation of TRP family (Transient Receptor Potential) channels, including known temperature-activated channels. Recently it has been shown that TRPM8 channels are involved in analgesic effects [38], and the signalling and therapeutic roles of long known and used substances such as capsaicin [39], allicin [9] or menthol [7] have been explained. It is also possible that sensitizing processes triggered by thermal stimuli may involve other receptors, e.g. the NK1 or NK2 receptors for substance P [40,41]. Moreover, the effect of temperature on tissue might be amplified by inflammatory mediators like ATP or bradykinin [42, 43].

It can be expected in the years to come that some new aspects will come to light regarding the response of tissues to antinociceptive actions of other physical factors employed in physiotherapy and sport massage, for example temperature or electromagnetic fields. Using an experimental model, such as a knee joint model, based on an objective measurement method is particularly attractive because the intensity and duration of physical or chemical stimuli acting on the tissue can be controlled. The possibility cannot be ruled out that patients with local inflammatory processes, especially after limb injuries, may react differently to physiotherapeutic treatment, demonstrating hypersensitivity to a particular type or intensity of stimuli applied.

zacji bodźcem termicznym włączone mogą być inne receptory, np. NK1 lub NK2 dla substancji P [40,41]. Ponadto efekt oddziaływania temperatury na tkankę może zostać wzmocniony przez czynniki stanu zapalnego, jak ATP lub bradykininę [42,43].

Spodziewać się można również nowych aspektów poznawczych w zakresie odpowiedzi na antynocyceptywną rolę innych czynników fizycznych wykorzystywanych w fizjoterapii i masażu sportowym, m.in. TENS lub pola elektromagnetycznego. Zastosowanie modelu doświadczalnego bazującego na obiektywnej metodzie pomiaru jest również atrakcyjne w aspekcie natężenia i długości czasu oddziaływania bodźców fizycznych na tkankę. Nie można wykluczyć, że pacjenci, szczególnie po urazach kończyn, mogą odmiennie reagować na stosowane zabiegi fizjoterapeutyczne, wykazując jeszcze nadwrażliwość na rodzaj lub natężenie stosowanych bodźców.

WNIOSKI

1. Czynniki stanu zapalnego jak bradykinina, substancja P i prostaglandyna E2 modulują aktywność wolnoprzewodzących włókien nerwowych zaopatrujących rejon stawu kolanowego szczura.
2. Model stawu kolanowego szczura pozwala na aplikację bodźców mechanicznych, chemicznych i termicznych stymulujących włókna nerwowe zaopatrujące zdrowy i zmieniony zapalnie staw kolanowy. Model ten można z powodzeniem wykorzystywać do badań z zakresu modulacji procesów bólowych w zabiegach fizjoterapeutycznych i ćwiczeniach rehabilitacyjnych.

CONCLUSIONS

1. Inflammatory mediators such as bradykinin, substance P and prostaglandin E2 are able to modulate the activity of slowly conducting nerve fibres supplying the knee joint area in the rat.
2. The rat knee joint model allows for the application of mechanical, chemical and thermal stimuli that activate afferent fibres innervating normal and inflamed knee joint tissue. This model can be successfully used to study the mechanisms of nociception and the resulting pain in physiotherapeutic procedures and rehabilitation exercises.

PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

1. Ashburn MA. Guideline for the management of pain in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and juvenile chronic arthritis. Edited by: Ashburn MA. Glenview IL. American Pain Society 2002; 1-178.
2. Heppelmann B. Anatomy and histology of joint innervation. *J Peripher Nerv Syst* 1997; 2(1): 5-16.
3. Schaible HG, Schmidt RF. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. *J Neurophysiol* 1988; 60(6): 2180-95.
4. Messlinger K, Pawlak M, Schepelmann K, Schmidt RF. Responsiveness of slowly conducting articular afferents to bradykinin: effects of an experimental arthritis. *Pain* 1994; 59(3): 335-43.
5. Pawlak M, Schmidt RF, Heppelmann B, Hanesch U. The neurokinin-1 receptor antagonist RP 67580, reduces the sensitization of primary afferents by substance P in the rat. *Eur J Pain* 2001; 5: 69-79.
6. Neugebauer V, Han JS, Adwanikar H, Fu Y, Ji G. Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. *Mol Pain* 2007; 3: 8.
7. McKemy DD. How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation. *Mol Pain* 2005; 1(1): 16.
8. Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC i wsp. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 2002; 108(5): 705-15.
9. Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V i wsp. The Pungency of Garlic: Activation of TRPA1 and TRPV1 in Response to Allicin. *Curr Biol* 2005; 15: 929-34.
10. Pawlak M, Heppelmann B, Messlinger K, Schmidt RF. The knee joint of the rat as a model for electrophysiological studies of primary afferents. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 1996; 431(Suppl 6): R62.
11. Gasser HS. Unmyelinated fibres originating in dorsal root ganglia. *J Gen Physiol* 1950; 33: 651-90.
12. Hildebrand C, Öqvist G, Brax L, Tuisku F. Anatomy of the rat knee joint and fibre composition of a major articular nerve. *Anat Rec* 1991; 229(4): 545-55.
13. Kelly DC, Asghar AUR, Marr CG, McQueen DS. Nitric oxide modulates articular sensory discharge and responsiveness to bradykinin in normal and arthritic rats in vivo. *Neuroreport* 2001; 12(1): 121-5.
14. Banik RK, Kozaki Y, Sato J, Gera L, Mizumura K. B2 Receptor-mediated enhanced bradykinin sensitivity of rat cutaneous C-Fibres nociceptors during persistent inflammation. *J Neurophysiol* 2001; 86: 2727-35.
15. Schaible HG, Schmidt RF. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin E2. *J Physiol* 1988; 403(1): 91-104.

16. Herbert MK, Schmidt RF. Activation of normal and inflamed fine articular afferent units by serotonin. *Pain* 1992; 50(1): 79-88.
17. Schepelmann K, Meßlinger K, Schaible H-G, Schmidt RF. Inflammatory mediators and nociception in the joint: excitation and sensitization of slowly conducting afferent fibers of cat's knee by prostaglandin I₂. *Neuroscience* 1992; 50(1): 237-47.
18. Schmidt RF, Schaible H-G, Meßlinger K, Heppelmann B, Hanesch U, Pawlak M. Silent and active nociceptors: structure, functions and clinical implications. In: *Progress in Pain Research and Management*, Vol. 2, (Gebhart DL, Hammond DL and Jensen TS, eds), IASP Press, Seattle; 1994. str. 213-50.
19. Grubb BD, Birrell J, McQueen DS, Iggo A. The role of PGE₂ in the sensitization of mechano-receptors in normal and inflamed ankle joints of the rat. *Exp Brain Res* 1991; 84: 383-92.
20. Neugebauer V, Schaible HG, Schmidt RF. Sensitization of articular afferents to mechanical stimuli by bradykinin. *Pflügers Arch* 1989; 415(3): 330-5.
21. Birrell GJ, McQueen DS, Iggo A, Grubb BD. Prostanoid-induced potentiation of the excitatory and sensitizing effects of bradykinin on articular mechanoreceptors in the rat ankle joint. *Neuroscience* 1993; 54(2): 537-44.
22. Averbeck B, Reeh PW. Interactions of inflammatory mediators stimulating release of calcitonin gene-related peptide, substance P and prostaglandin E₂ from isolated rat skin. *Neuro-pharmacology* 2001; 40: 416-23.
23. Herbert MK, Just H, Schmidt RF. Histamine excites groups III and IV afferents from the cat knee joint depending on their resting activity. *Neurosci Lett* 2001; 305: 95-8.
24. Habelt C, Kessler F, Distler C, Kress M, Reeh PW. Interactions of inflammatory mediators and low pH not influenced by capsazepine in rat cutaneous nociceptors. *Neuroreport* 2000; 11(5): 973-6.
25. Michaelis M, Vogel C, Blenk KH, Arnarson A, Janig W. Inflammatory mediators sensitize acutely axotomized nerve fibers to mechanical stimulation in the rat. *J Neurosci* 1998; 18(18): 7581-7.
26. Yasui T, Adatsuka M, Tobetto K, Hayaishi M, Anto T. The effect of hyaluronan on interleukin-1 α -induced prostaglandin-E₂ production in human osteoarthritis synovial cells. *Agents Actions* 1992; 37: 155-6.
27. Goto M, Hanyu T, Yoshio T i wsp. Intra-articular injection of hyaluronate (SI-6601D) improves joint pain and synovial fluid prostaglandin E₂ levels in rheumatoid arthritis: A multi-center clinical trial. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19: 377-83.
28. Schaible H-G, Grubb BD. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain* 1993; 55(1): 5-54.
29. Chen X, Tanner K, Levine JD. Mechanical sensitization of cutaneous C-fiber nociceptors by prostaglandin E₂ in the rat. *Neurosci Lett* 1999; 267(2): 105-8.
30. Bileviciute I, Lundeberg T, Eklom A, Theodorsson E. Bilateral changes of substance P-, neurokinin A-, calcitonin-gene-related peptide and neuropeptide Y-like immunoreactivity in rat knee joint synovial fluid during acute monoarthritis. *Neurosci Lett* 1993; 153: 37-40.
31. Marshall KW, Chiu B, Inman RD. Substance P and arthritic analysis of plasma and synovial fluid levels. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 87-90.
32. Árnason JA, Malone DG. Role of mast cells in arthritis. *Chem immunol* 1995; 62: 204-38.
33. Heppelmann B, Pawlak M. Sensitisation of articular afferents in normal and inflamed knee joints by substance P in the rat. *Neurosci Lett* 1997; 223(2): 97-100.
34. Messlinger K, Schepelmann K, Pawlak M, Schmidt RF. Bradykinin B1 and B2 receptor antagonist do not change the ongoing activity of slowly conducting articular afferents in the inflamed knee joint of the cat. *Neurosci Lett* 1993; 164(1-2): 21-4.
35. Heppelmann B, Pawlak M. Inhibitory effect of somatostatin on the mechanosensitivity of articular afferents in normal and inflamed knee joints of the rat. *Pain* 1997; 73: 377-82.
36. Heppelmann B, Just S, Pawlak M. Galanin influences the mechanosensitivity of sensory endings in the rat knee joint. *Eur J Neurosci* 2000; 12(5): 1-6.
37. Carlton SM, Du J, Zhou S, Coggeshall RE. Tonic control of peripheral cutaneous nociceptors by somatostatin receptors. *J Neurosci* 2001; 21(11): 4042-9.
38. Proudfoot CJ, Garry EM, Cottrell DF i wsp. Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. *Curr Biol* 2006; 16: 1591-605.
39. 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(6653): 816-24.
40. Sluka KA, Milton MA, Willis WD, Westlund KN. Differential roles of neurokinin 1 and neurokinin 2 receptors in the development and maintenance of heat hyperalgesia induced by acute inflammation. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 1263-73.
41. Löfgren O, Qi Y, Lundeberg T. Inhibitory effects of tachykinin receptor antagonists on thermally induced inflammatory reactions in a rat model. *Burns* 1999; 25(2): 125-9.
42. Tominaga M, Caterina MJ. Thermosensation and pain. *J Neurobiol* 2004; 61(1): 3-12.
43. Sugiura T, Tominaga M, Katsuya H, Mizumura K. Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor1. *J Neurophysiol* 2002; 88: 544-8.

Liczba słów/Word count: 7385

Tabele/Tables: 0

Ryciny/Figures: 4

Piśmiennictwo/References: 43

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Prof. dr hab. med. Maciej Pawlak

61-871 Poznań, ul. Królowej Jadwigi 27/39

tel. (0-61) 835-51-88 fax: (0-61) 835-51-88, e-mail: pawlak@awf.poznan.pl

Otrzymano / Received

Zaakceptowano / Accepted

13.11.2007 r.

24.01.2008 r.