

BUDOUČÍ MOŽNOSTI GENOVÉ TERAPIE BOLESTI

RNDr. Omar Šerý, Ph.D.¹, Prof. William Didden, MD., Ph.D.²

¹Laboratoř neurobiologie a molekulární psychiatrie, Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta MU, Brno

²GHC Research Institute, Houston, TX, U.S.A.

Genetická podmíněnost vnímání bolesti je v posledních letech všeobecně přijímaný názor. Polymorfizmy DNA v rámci genů mohou ovlivňovat například míru exprese těchto genů a zasahovat do přenosu nervového signálu či způsobu zpracování nervových signálů. Asociační studie jsou jedním z nástrojů vyhledávání genů, které souvisejí s vnímáním bolesti. Cílem mnohých výzkumů se v dnešní době stává možnost genetického ovlivnění vnímání bolesti. První úspěšné experimenty na potkaních odhalily použitelné cílové geny pro ovlivnění genovou terapií za účelem potlačení bolesti. Je pouze otázkou několika let, kdy se podaří dořešit některé problémy spojené především s nalezením vhodného a bezpečného mechanismu cíleného přenosu genu do nitra nervových buněk a aplikovat genovou terapii také při léčbě bolesti.

Klíčová slova: bolest, genová terapie, gen, polymorfismus, DNA, léčba.

Neurol. pro praxi, 2006; 2: 90–93

Úvod

Posledních několik let se věda zaměřuje na možnosti genové terapie bolesti. Možnosti léčby bolesti se za dobu existence lidstva prakticky neposunuly vpřed. Použití opioidů je stále neúčinnější způsob, jak potlačit bolest. To je také zřejmý důvod, proč se nyní molekulární biologové ve spolupráci s anesteziology a neurology zaměřují na nové možnosti terapie bolesti. Pozornost je nyní věnována především vyhledávání vhodných vektorů přenosu nukleových kyselin do jader buněk cílových tkání. Jsou vyhledávány vhodné geny, jejichž zablokováním nebo naopak posílenou expresí lze docílit potlačení vnímání bolesti. Dalším nástrojem výzkumu bolesti jsou asociační studie, které pomáhají vyhledávat geny, které modulují vnímání bolesti.

Je pravdou, že do současné doby nebyla oficiálně na člověku provedena genová terapie bolesti, nicméně blízká budoucnost tuto možnost v nejbližších letech přinese.

Geny ovlivňující přenos nebo modulaci bolesti

Neuroanatomické a neurofyzilogické aspekty vzniku a vedení bolestivých stimulů již byly do značné míry popsány. V současné době je pozornost molekulárních biologů zaměřena na vyhledávání tzv. kandidátních genů a jejich polymorfizmů (genových variant), které se výraznou měrou podílejí na vnímání bolesti.

Mezi nejdiskutovanější kandidátní geny ovlivňující vnímání bolesti patří geny pro endogenní opioidy a jejich receptory. Biologický efekt endogenních opioidů, kterými jsou endorfiny, enkefaliny a dynorfiny, zprostředkovávají receptory δ , κ a μ , nověji označované jako receptory OP1, OP2 a OP3. Všechny tři typy opioidních receptorů se účastní vnímání bo-

lesti a všechny endogenní opioidy mají analgetický efekt.

Kromě zmíněných tří typů opioidních receptorů byl nedávno objeven orphanový receptor jehož endogenním ligandem je peptid složený ze 17 aminokyselin, nazvaný orphanin FQ nebo nociceptin (OFQ/N1-17), který se podobá dynorfinu. Úloha orphaninu FQ v percepci bolesti je dvojaká. Intracerebroventrikulární injekce orphaninu FQ vyvolává u potkanů hyperalgezií a snižuje analgetický efekt opioidů, na druhou stranu po intratékální aplikaci působí analgeticky.

Katechol-O-metyltransferáza (COMT) je enzym, který na synapsích reguluje hladiny katecholaminů a enkefalinů. Diatchenko et al. (4) zkoumal v genu tohoto enzymu 6 polymorfních míst a objevil tři důležité haplotypy (alelické varianty více polymorfizmů v rámci jednoho chromozomu), které výraznou měrou ($p < 0,0004$) ovlivňují vnímání experimentální bolesti osobami ženského pohlaví.

Chemokiny a jejich receptory jsou dalším vhodným kandidátem pro studium genetické podmíněnosti vnímání bolesti. Chemokinové receptory se nacházejí mimo jiné i v mozkových tkáních. Bylo zjištěno, že aktivace chemokinových receptorů CCR5, CCR2 a CCR7 způsobuje desenzitizaci μ a δ opioidních receptorů. Aktivace prozánětlivých cytokinů tak potlačuje analgetickou funkci opioidních receptorů a posiluje percepci bolesti v zánětlivých místech.

Je známo, že cytokiny ovlivňují neuronální funkci a to nejen modulací přenosu signálu na neuronech, ale také modulací vývoje CNS. Na myši, které chyběl gen pro IL-6 (IL-6 knock out) bylo zjištěno, že měla sníženou hustotu opioidních receptorů ve středním mozku. IL-6 je nezbytný pro správný vývoj neuronálních mechanismů využívajících endogenní i exogenní opioidy. IL-6 lokálně přispívá ke zvýšení percepcie bolesti v zánětlivé tkáni (13).

Další kandidátní geny vnímání bolesti možno nalézt v drahách přenosu nebo mezi modulátory přenosu bolestivých stimulů. Patří sem NMDA receptor (N-metyl-D-aspartát), neuropeptid FF, adenosinový receptor A1, muskarinové acetylcholinové receptory, cholecystokinin a jeho receptory, kanabinoidní receptory, melatonin a jeho receptory, VIP (vazoaktivní intestinální peptid) atd. – pro přehled Šerý et al. (16).

Geny ovlivňující odpověď na farmakoterapii bolesti

Farmakogenetické studie se zaměřují na vliv genotypu na klinický účinek farmak. Při tomto výzkumu se jedná především o nalezení genetické podstaty odlišného účinku farmak na různé osoby. Dále jde o možnost určení genotypu a na základě genotypu i nalezení vhodné terapie a dávkování léčiv.

Cytochrom P450 (CYP2D6) katalyzuje biotransformaci kodeinu, tramadolu, dihydrokodeinu, oxykodonu, hydrokodonu, dextropropoxyfenu, etylmorfinu a částečně metadonu. Na základě genotypu CYP2D6 lze osoby rozdělit na ultrarychlé, rychlé a pomalé metabolizéry a osoby s nefunkčním enzymem CYP2D6. Například u ultrarychlých metabolizérů dochází k velmi rychlé přeměně kodeinu na morfin, takže na rozdíl od ostatních osob mají ultrarychlí metabolizéři stejné příznaky po aplikaci kodeinu jako po aplikaci morfinu. Naopak u pomalých metabolizérů nelze kodein použít pro analgézi, vzhledem k tomu, že kodein má oproti morfinu na potlačování bolesti mnohem slabší účinky. O-desmetyltramadol aktivuje opioidní receptory μ silněji než samotný tramadol. Efektivnost přeměny tramadolu na O-desmetyltramadol závisí na genotypu CYP2D6. Souhrn mutací genu pro CYP2D6 stejně jako terapeutické konsekvence detailně popisuje Bertils-

son et al. (1). Genotypizace pacientů pro geny zúčastněné v metabolismu použitých analgetik se jeví jako účinná metoda pro výběr analgetik (a dávkování) vhodných pro daného pacienta.

V kódující oblasti genu pro OPRM1 (opioidní receptor μ) byl nalezen polymorfismus A118G. V klinických studiích bylo zjištěno, že přítomnost alely G118 u pacientů vyžaduje větší dávky alfentanilu a způsobuje nižší analgetických efekt ve srovnání s pacienty, kteří alelu G118 ve svém genotypu nenesou. Klepstad et al. (11) zkoumal vztah několika polymorfizmů genu pro opioidní receptor μ (OPRM1) na účinnost léčby bolesti morfinem u pacientů s rakovinou. Byl objeven statisticky významný vztah mezi A118G polymorfismem genu pro OPRM1. Pacienti s genotypem GG potřebovali více morfinu pro zvládnutí bolesti než heterozygoti nebo homozygoti AA.

Asociační studie ve výzkumu bolesti

Podstatou asociačních studií je srovnávání dvou a více souborů osob. Každý soubor je charakterizován specifickým fenotypem, jakým může být například stejná hladina tolerance vůči bolestivému stimulu. Například stanovíme dvě skupiny osob – skupinu osob, která na bolestivý stimul má vysokou toleranci a skupinu osob s nízkou tolerancí. Pomocí laboratorní analýzy se u všech osob stanoví genotyp pro daný polymorfismus tzv. kandidátního genu, u kterého předpokládáme jeho vztah k bolesti. Poté se statisticky srovnává četnost genotypů nebo alel zkoumaného polymorfismu mezi zkoumanými skupinami osob. Testuje se nulová hypotéza, že srovnávané soubory se neliší. Pokud je hladina pravděpodobnosti menší než 0,05, jedná se o signifikantní rozdíl.

Současné možnosti laboratorní analýzy DNA zahrnují jednak klasický přístup, kdy je prostřednictvím klasické řetězové polymerázové reakce studován postupně jeden polymorfismus po druhém, jednak jsou dnes k dispozici technologie DNA čipů, které umožňují zkoumat najednou tisíce až statisíce polymorfizmů. Využitím DNA čipů se cena detekce jednoho polymorfismu několikanásobně zlevňuje a pravděpodobnost nalezení toho „pravého“ odpovědného genu se zvyšuje až (v případě skenování celého genomu) na téměř stoprocentní jistotu zachytu.

Do současné doby bylo publikováno několik asociačních studií zabývajících se studiem genů, které mohou ovlivňovat vnímání bolesti. Tento výzkum často doprovázejí etické problémy. Nejvíce problematickým stále zůstává zvolení zkoumaného modelu bolesti. V některých výzkumných projektech etická komise umožnila například využití nádoby s ledovou vodou, do které zkoumané osoby ponoří ruku a čas, po který vydrží nechat ruku ve vodě udá-

vá toleranci bolesti v sekundách. Využití tlakového algometru (působení na palec ruky) je další alternativou jak měřit vnímání bolesti. Nejčastěji jsou ale při studiích využívány stavy pacientů spojené s bolestí, jako jsou různé chirurgické zákroky, bolest zad atd., kdy je bolest měřena vizuální analogovou škálou (VAS).

Nevýhodou všech těchto metod je značná účast individuálního psychického přístupu každého jedince k bolesti. Psychická součást vnímání bolesti jak známo může vyvolat zcela odlišnou reakci dvou jedinců na tentýž bolestivý stimul. Psychická součást ovlivnění vnímání bolesti zahrnuje osobní zkušenost s bolestí, současný psychický stav jedince a mnohé další faktory. Zatímco určitý bolestivý stimul se může jedné osobě zdát nesnesitelným, u druhé osoby může paradoxně vyvolat i sexuální vzrušení. Coghill et al. (2) zjistil, že osoby rozdělené podle vizuální analogové škály (VAS) na tři skupiny podle subjektivního pocitu vnímání experimentální bolesti měli objektivní neurální koreláty za použití funkční zobrazovací metody MRI (magnetic resonance imaging), a to v rámci primárního somatosenzorického kortexu, předního cingulárního a prefrontálního kortexu. Coghill et al. (2) uzavřel svou studii konstatováním, že osoby jsou schopny vyjádřit míru bolesti introspekci do takové míry, že jejich výpověď odpovídá reálné aktivaci shora uvedených částí mozkového kortexu. Otázkou ale stále zůstává, do jaké míry je aktivace mozkového kortexu ovlivněna geneticky nebo například zkušenostmi s bolestí.

Vliv pohlaví na vnímání bolesti již byl také zkoumán. Je patrné, že před chirurgickým zákrokem mají muži tendenci předvídat větší pooperační bolesti než ženy. Ženy ale mají tendenci referovat o větších pooperačních bolestech než muži a více si pamatují bolestivé stimuly.

Kim (10) zkoumal vztah mezi variabilitou ve vnímání bolesti (variability in human pain sensitivity) a pohlavím, etnicitou, temperamentem a polymorfismy genů pro TRPV1 (vanniloid receptor subtype 1), δ opioidní receptor – subtyp 1 (OPRD1) a katechol-O-metyltransferázu (COMT). Zajímavé na této práci bylo experimentální vyvolání bolestivého stimulu. Bolest byla u pokusných osob vyvolána jednak vložením ruky do nádoby s ledovou vodou, jednak aplikací termálního stimulu o teplotě 35, 43, 44, 45, 46, 47, 48 a 49 °C na spodní část předloktí. Měření bolesti bylo prováděno pomocí vizuální analogové škály (VAS). Celkový počet pětiset studovaných osob v této práci je účtyhodný. Američanky evropského původu homozygotní pro Val585 alelu genu pro TRPV1 ponechaly ruku v nádobě s ledovou vodou statisticky signifikantně déle, než heterozygotní ženy téhož etnického původu nebo ženy homozygotní pro alelu Ile585. Dále ženy homozygotní pro C307 alelu genu

pro OPRD1 měly vyšší teplem zapříčiněnou intenzitu bolesti při 49 °C než heterozygotní ženy nebo ženy homozygotní pro alelu T307. Muži heterozygotní pro polymorfismus Phe27Cys genu pro OPRD1 vykazovali nižší intenzitu bolesti zapříčiněnou teplem při 49 °C než obě homozygotní skupiny mužů.

Solovieva (15) zkoumala vztah mezi bederní bolestí zad a polymorfismy interleukinu 1 (IL-1) a antagonisty interleukinu 1 (IL-1RN) a zjistila vztah mezi intenzitou bolesti měřenou pomocí VAS a alelou T889 genu pro IL-1 α a alelou A1812 genu pro IL-1RN. Alela T3954 genu pro IL-1 β byla asociována s počtem dnů doprovázených bolestí zad.

Hühne (7) studoval vztah mezi polymorfismem I/D ACE a komplexním regionálním bolestivým syndromem typu I (CRPS I) s negativním výsledkem.

Compton (3) studovala vztah mezi tolerancí na bolest a polymorfismy C17T, A118G a mikrosatelitním polymorfismem genu pro OPRM1. Bolest byla testována jednak pomocí tlakového algometru, kdy tlakový stimul byl aplikován na palec tyčinkou o ploše 0,5 cm² (Somedic A/B, Švédsko), jednak pomocí nádoby s ledem. Osoby, které ponechaly ruku v ledové lázni více než 300 sekund byly charakterizovány jako „pain tolerant“, pokud nedokázaly udržet ruku v lázni ani 60 sekund, byly charakterizovány jako „pain intolerant“. Compton (3) nenalezla vztah mezi uvedenými polymorfismy a tolerancí k bolesti.

V naší studii (17) jsme se zaměřili na zkoumání vztahu mezi polymorfismem A/G v intronu 13 genu pro MAO-B a vnímáním pooperační bolesti, kdy pro model bolesti byli zařazeni pacienti, kteří se podrobili plánované tonzilektomii. Je známo, že osoby s alelou A vykazují signifikantně nižší enzymovou aktivitu MAO-B než osoby s alelou G. Naše pozorování naznačila, že průměrná intenzita pooperační bolesti u mužů je částečně ovlivněna funkčním polymorfismem genu pro MAO-B. Muži s genotypem G vykazovali vyšší průměrnou intenzitu pooperační bolesti (VAS skóre = 3,96) než muži s genotypem A (VAS skóre = 3,45).

Podstata genové terapie

V léčbě chronické bolesti můžeme v budoucnu očekávat velké úspěchy založené na bázi genové terapie. Genová terapie bolesti umožňuje dva přístupy k ovlivnění funkce genu. Jednak je možné vnést do buňky novou kopii genu, jehož produkt potlačuje bolest, jednak lze zablokovat expresi genu, který se účastní přenosu informace o bolesti nebo stimulace přenosu bolesti.

Genová terapie má v rukou dvě základní metody – buď vnášení upravených virů nebo vnášení různě upravených oligonukleotidů (krátkých sekvencí DNA nebo RNA). Upravené viry jsou takové viry, které jsou jednak schopny specificky nalézt cílovou

tkáň pomocí specifity jejich povrchových receptorů a zároveň jsou upraveny tak, aby nebyly schopny se v cílové tkáni množit. V genomu těchto virů se nalézá specifický uměle vnesený gen, který se nalézá v takové oblasti virového genomu, ve které bude po vnesení do hostitelského organismu probíhat exprese. Takto vnesený gen bude v cílové tkáni produkovat specifický protein, kterého tak v cílové tkáni bude větší koncentrace než za fyziologických podmínek. Tato vyšší koncentrace specifického proteinu pak lokálně změní fyziologické funkce. Dále lze pomocí virů vnášet do buněk části genů v „antisense“ orientaci. Tyto části genů v „antisense“ orientaci pak budou inhibovat expresi těch genů, vůči kterým je antisense komplementární.

Druhou základní metodou genové terapie je možnost využití uměle připravených různě upravených krátkých sekvencí DNA nebo RNA. V současné době jsou za budoucí vhodné terapeutické nástroje považovány siRNA (malé interferující RNA), ODNs (oligonukleotidy antisense), ribozymy a DNAzymy. „Oligonukleotidy antisense“ jsou ve skutečnosti krátké úseky nukleových kyselin, které jsou komplementární k mRNA nebo DNA genu, jehož funkci chceme zablokovat. Na specifické místo se lokálně nanese roztok uměle syntetizovaných „oligonukleotidů antisense“, které jsou stabilní díky modifikaci různými chemickými skupinami (metylfosfonáty, fosfortriestery, atd.). Tyto oligonukleotidy bez problémů pronikají do buněk a v cytoplasmě se specificky komplementárně vážou na mRNA za tvorby duplexu nebo na DNA za tvorby triplexu. Tím zablokují v prvním případě translaci, ve druhém případě transkripci daného genu lokálně v dané tkáni (12).

RNA interference je v buňkách přirozeně vyskytující se jev objevený v roce 1998. V buňce vznikají dvoušroubovicové molekuly RNA, které jsou štěpeny enzymem endonukleázou na krátké fragmenty dlouhé 21–23 bází, které se nazývají siRNA. Tyto dvoušroubovicové fragmenty jsou rozpleteny helikázou a vlákno antisense je inkorporováno do multikomponentního komplexu RISC (RNA-induced silencing komplex) způsobujícího sekvenci specifické utlumení genu štěpením cílové mRNA. Přírodním zásahem do tohoto procesu lze utlumit expresi vybraných genů, čehož by se v blízké budoucnosti dalo využít terapeuticky.

Ribozymy a DNAzymy jsou enzymy složené z nukleové kyseliny schopné štěpit RNA nezávisle na buněčných nukleázách. Ribozymy i DNAzymy lze uměle navrhnout tak, aby specificky štěpily cílovou RNA, čehož lze také využít k záměrnému potlačování exprese vybraných genů.

K dalším metodám genové terapie patří i využití tzv. elektroporace – zavádění celých genů v rámci plazmidu přímo do buněk za využití pulzů elektrického proudu. Tyto metody jsou použitelné pro vnášení genů spíše do kůže za účelem léčby kožních onemocnění. V současnosti se pracuje na vývoji mikrokrojehel, které by umožňovaly efektivní, bezpečný a bezbolestný přenos DNA do cílových tkání.

Možnosti genové terapie v léčbě bolesti

Hlavním virovým vektorem pro genovou terapii cílenou na primární senzory neurony je v současné době uvažován herpetický virus HSV-1 (Herpes simplex virus 1). Tento virus nese obalenou dvoušroubovicovou DNA, která se při napadení buňky nestává součástí hostitelského genomu. Přirozeným cílem tohoto viru jsou primární senzory neurony. Mezi nejdůležitější kandidátní geny, které jsou vnášeny tímto způsobem do hostitelských buněk s cílem potlačit bolest, patří geny pro biologicky aktivní antinociceptivní peptidy.

Wilson et al. (18) použil rekombinantní HSV virus pro přenos genu pro lidský proenkefalin A (prekurzor enkefalinu) do myších ganglií zadních kořenů. Vzhledem k tomu, že odpověď myši na bolestivý tepelný stimul byla podobná u infikovaných i kontrolních myší, autoři této práce se domnívají, že hladina proenkefalinu A byla u infikovaných myší příliš nízká, než aby dokázala potlačit bolestivý stimul. Nicméně po aplikaci kapsaicinu prokázaly infikované myši menší citlivost na bolest než kontrolní myši, což potvrdilo pozitivní efekt zvýšené exprese vneseného genu pro proenkefalin A na potlačení bolesti. Xu et al. (19) použil rekombinantní adenovirus pro vnesení genu pro μ receptor do zadních míšních kořenů potkana. Výsledkem bylo zesílení antinociceptivního efektu podávaného morfinu ve srovnání s neinfikovanými potkany. Modelem bolesti zde byla termální hyperalgie a uměle vyvolaný zánět v zadní tlapce. Eaton et al. (5) aplikoval pomocí adenovirového vektoru gen pro BDNF na spinální úroveň s velmi pozitivním efek-

tem na potlačení chronické bolesti, jejímž modelem bylo jednostranné poškození sedacího nervu. Hao et al. (6) využil rekombinantní herpetický virus pro subkutánní vnesení genu pro GDNF (glial-derived neurotrophic factor) do potkana s alodynií po liguře spinálního nervu L5. Výsledkem byl antialodynický efekt aplikace rekombinantního viru. Ten samý tým vědců přenesl subkutánně gen pro glutamátdekarboxylázu prostřednictvím rekombinantního herpetického viru do zadních míšních kořenů potkana také s pozitivním výsledkem, kdy bolest potlačující efekt přetrvával po dobu asi šesti týdnů. Kang et al. (9) aplikoval rekombinantní herpetický virus obsahující cDNA pro preproenkefalin bilaterálně do amygdaly potkana. Čtyři dny po aplikaci rekombinantního viru byl pozorován prokazatelný efekt na potlačení vnímání bolestivých stimulů vyvolaných formalinovým testem.

Závěr

Experimenty s genovou terapií na zvířatech jsou běžnou praxí mnoha výzkumných týmů na celém světě. Genová terapie člověka je již realitou. První genová terapie člověka byla provedena při klinických testech v roce 1990. Čtyřletému děvčátku byl do bílých krvinek vnesen gen pro adenosindeaminázu. Imunodeficienci této pacientky byla na několik měsíců potlačena, nicméně jak se ukázalo, léčbu bylo třeba vždy po několika měsících opakovat. Zachování dlouhodobé účinnosti genové terapie je jedním z problémů, který je mimo jiné v současnosti řešen. Nejvíce nadějí je vkládáno do genové terapie nádorů, svalových dysfunkcí, Alzheimerovy choroby atd. Je jen otázkou několika let, kdy se genová terapie uplatní také v léčbě bolesti.

Tato práce byla podpořena grantovým projektem IGA MZ ČR č. NM 7146-3/2002 a projektem MSM0021620806.

RNDr. Omar Šerý, Ph.D.

Laboratoř neurobiologie a molekulární psychiatrie, Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta MU
Kotlářská 2, 611 37 Brno
e-mail: omarsery@sci.muni.cz

Literatura:

1. Bertilsson L, Dahl ML, Dalen P, Al-Shurbaji A. Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 2002; 53(2): 111–22.
2. Coghill RC, McHaffie JG, Yen YF. Neural correlates of interindividual differences in the subjective experience of pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(14): 8538–42.
3. Compton P, Geschwind DH, Alarcon M. Association between human μ -opioid receptor gene polymorphism, pain tolerance, and opioid addiction. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003; 121(1): 76–82.
4. Diatchenko L, Slade GD, Nackley AG, Bhalang K, Sigurdsson A, Belfer I, Goldman D, Xu K, Shabalina SA, Shagin D, Max MB, Makarov SS, Maixner W. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Hum Mol Genet* 2005; 14(1): 135–43.
5. Eaton MJ, Blits B, Ruitenberg MJ, Verhaagen J, Oudega M. Amelioration of chronic neuropathic pain after partial nerve injury by adeno-associated viral (AAV) vector-mediated over-expression of BDNF in the rat spinal cord. *Gene Ther* 2002; 9(20): 1387–95.

6. Hao S, Mata M, Wolfe D, Huang S, Glorioso JC, Fink DJ. HSV-mediated gene transfer of the glial cell-derived neurotrophic factor provides an antiallodynic effect on neuropathic pain. *Mol Ther* 2003; 8(3): 367–75.
7. Huhne K, Leis S, Schmelz M, Rautenstrauss B, Birklein F. A polymorphic locus in the intron 16 of the human angiotensin-converting enzyme (ACE) gene is not correlated with complex regional pain syndrome I (CRPS I). *Eur J Pain* 2004; 8(3): 221–5.
8. Indo Y, Tsuruta M, Hayashida Y, Karim MA, Ohta K, Kawano T, Mitsubuchi H, Tonoki H, Awaya Y, Matsuda I. Mutations in the TRKA/NGF receptor gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Nat Genet* 1996; 13(4): 485–8.
9. Kang W, Wilson MA, Bender MA, Glorioso JC, Wilson SP. Herpes virus-mediated preproenkephalin gene transfer to the amygdala is antinociceptive. *Brain Res* 1998; 792(1): 133–5.
10. Kim H, Neubert JK, San Miguel A, Xu K, Krishnaraju RK, Iadarola MJ, Goldman D, Dionne RA. Genetic influence on variability in human acute experimental pain sensitivity associated with gender, ethnicity and psychological temperament. *Pain* 2004; 109(3): 488–96.
11. Klepstad P, Rakvag TT, Kaasa S, Holthe M, Dale O, Borchgrevink PC, Baar C, Vikan T, Krokan HE, Skorpen F. The 118 A > G polymorphism in the human micro-opioid receptor gene may increase morphine requirements in patients with pain caused by malignant disease. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004; 48(10): 1232–9.
12. Myers KJ, Dean NM. Sensible use of antisense: how to use oligonucleotides as research tools. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21(1): 19–23.
13. Obreja O, Schmelz M, Poole S, Kress M. Interleukin-6 in combination with its soluble IL-6 receptor sensitises rat skin nociceptors to heat, in vivo. *Pain* 2002; 96(1–2): 57–62.
14. Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, Lamerdin JE, Mohrenweiser HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, van Ommen GJ, Hofker MH, Ferrari MD, Frants RR. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4. *Cell* 1996; 87(3): 543–52.
15. Solovieva S, Leino-Arjas P, Saarela J, Luoma K, Raininko R, Riihimäki H. Possible association of interleukin 1 gene locus polymorphisms with low back pain. *Pain* 2004; 109(1–2): 8–19.
16. Šerý O, Hrazdílová O, Matalová E, Ševčík P. Pain research update from genetic point of view. *Pain Practice* 2005; 5(4): 341–348.
17. Šerý O, Hrazdílová O, Pítelová R, Ševčík P. DNA polymorfismus genu pro monoaminoxidázu B ovlivňuje vnímání bolesti. *Česká a slovenská psychiatrie* 2005; 101(4): 194–198.
18. Wilson SP, Yeomans DC, Bender MA, Lu Y, Goins WF, Glorioso JC. Antihyperalgesic effects of infection with a preproenkephalin-encoding herpes virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(6): 3211–6.
19. Xu Y, Gu Y, Xu GY, Wu P, Li GW, Huang LY. Adeno-associated viral transfer of opioid receptor gene to primary sensory neurons: a strategy to increase opioid antinociception. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(10): 6204–9.