

Lek. med. Marek Zubrzycki

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH  
POD TYTUŁEM:

**UDZIAŁ ENDOGENNYCH UKŁADÓW OPIOIDOWEGO I  
KANABINOIDOWEGO  
W MODULACJI BÓLU USTNO-TWARZOWEGO**

PROMOTOR:

Prof. dr hab. n. med. MARIUSZ STASIOŁEK

Kierownik Katedry i Kliniki Neurologii UM w Łodzi

Łódź 2022

Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi Panu Profesorowi Mariuszowi Stasiołkowi za możliwość realizacji pracy, za opiekę naukową oraz wszelkie kreatywne wskazówki i pomoc merytoryczną.

**Publikacje składające się na cykl będący podstawą pracy doktorskiej:**

1. **Marek Zubrzycki**, Maria Zubrzycka, Grzegorz Wyśiadecki, Janusz Szmraj, Hanna Jerczyńska, Mariusz Stasiołek. Effect of Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibitor URB597 on Orofacial Pain Perception in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23: 4665.

Praca oryginalna: IF=5,924, MEiN=140 pkt.

2. **Marek Zubrzycki**, Maria Zubrzycka, Grzegorz Wyśiadecki, Janusz Szmraj, Hanna Jerczyńska, Mariusz Stasiołek. Release of Endocannabinoids into the Cerebrospinal Fluid During the Induction of the Trigemino-Hypoglossal Reflex in Rats. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2022, 44, 2401-2416.

Praca oryginalna: IF=2,081, MEiN=70 pkt.

3. **Marek Zubrzycki**, Mariusz Stasiołek, Maria Zubrzycka. Opioid and endocannabinoid system in orofacial pain. *Physiol Res.* 2019, 68(5):705-715.

Praca poglądowa: IF=1,655, MNiSW=40 pkt.

Suma IF: 9.66 Suma MNiSW/MEiN: 250.000

Ogólna suma IF doktoranta: 32,34

Indeks Hirscha wynosi 6 (127 cytowań Scopus).

## WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

2-AG	- 2-arachidonoylglycerol	- 2-arachidonoilglicerol
aCSF	- artificial cerebrospinal fluid	- sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy
AEA	- N-arachidonyl ethanol amine, Anandamide	- anandamid
BBB	- blood brain-barrier	- bariera krew-mózg
CB1R	- cannabinoid receptor type-1	- receptor kanabinoidowy typu 1
CB2R	- cannabinoid receptor type-2	- receptor kanabinoidowy typu 2
CBR	- cannabinoid receptor	- receptor kanabinoidowy
CGRP	- calcitonin gene related peptide	- peptyd pochodny genu kalcytoninowego
CNS	- central nervous system	- ośrodkowy układ nerwowy
CSF	- cerebrospinal fluid	- płyn mózgowo-rdzeniowy
CVOs	- circumventricular organs	- narządy okołokomorowe
DAGL	- diacylglycerol lipase	- lipaza diacyloglicerolowa
DH	- spinal cord dorsal horn	- rogi grzbietowe rdzenia kręgowego
DRG	dorsal root ganglia	- zwoje korzeni grzbietowych
ECS	- endocannabinoid system	- układ endokanabinoidowy
EM-2	- endomorphin-2	- endomorfin 2
ETJ	- evoked tongue jerks	- odruch cofania języka
FAAH	- fatty acid amide hydrolase	- hydrolaza amidowa kwasów tłuszczowych
GABA	- gamma-aminobutyric acid	- kwas gamma-amino-masłowy
MAGL	- monoacylglycerol lipase	- lipaza monoacyloglicerolowa
MOR	- $\mu$ opioid receptor	- receptor opioidowy mi
NTC	- nucleus trigeminalis caudalis	- jądro tylne pasma rdzeniowego n.V
OR	- opioid receptor	- receptor opioidowy
PAG	- periaqueductal central gray	- istota szara środkowa śródmózgowia
RVM	- rostral ventromedial medulla	- brzuszno-dogłowa część rdzenia przedłużonego
SP	- Substance P	- substancja P
TG	- trigeminal ganglia	- zwój trójdzielny
TRPV1	- transient receptor potential vanilloid 1	- receptor waniloidowy przejściowego potencjału typu 1
URB597	- FAAH inhibitor - degrading enzyme of AEA	- enzym degradujący Anandamid

## SPIS TREŚCI

PUBLIKACJE SKŁADAJĄCE SIĘ NA CYKL PRACY DOKTORSKIEJ	3
WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW	4
1. WSTĘP	7
1.1. Definicja bólu	7
1.2. Układ endokanabinoidowy	7
1.2.1. Biosynteza i degradacja endokanabinoidów	8
1.2.2. Receptory kanabinoidowe i ich rozmieszczenie w OUN	10
1.3. Układ endoopioidowy	13
1.3.1. Receptory opioidowe i ich rozmieszczenie w OUN	14
1.4. Synergizm kanabinoidów i opiodów	15
1.5. Organizacja neuronalna łuku odruchowego odruchu trójdzielno-podjęzykowego	17
1.6. Rola płynu mózgowo-rdzeniowego w bólu	19
2. CEL PRACY	21
3. MATERIAŁ I METODY	21
3.1. Zwierzęta doświadczalne	21
3.2. Dobór metodyki doświadczeń	22
3.3. Charakterystyka grup doświadczalnych	23
3.4. Analiza statystyczna	25
4. WYNIKI	26
5.1. Wpływ perfuzji komór mózgowych AEA, 2-AG, EM-2 i URB597 na amplitudę odruchu trójdzielno-podjęzykowego u szczurów	26
5.2. Wpływ stymulacji miazgi zębów i obwodowego podania URB597 na stężenie AEA i 2-AG w strukturach mózgu u szczurów	26

5.3. Wpływ stymulacji miazgi zębów i obwodowego podania URB597 na poziom mRNA neuroprzekaźników (SP, CGRP i EM-2) w strukturach mózgu u szczurów	26
5.4. Wpływ stymulacji miazgi zębów i obwodowego podania URB597 na poziom mRNA receptorów CB1R, CB2R i MOR w strukturach mózgu u szczurów	27
5.5. Wpływ stymulacji miazgi zębów i obwodowego podania URB597 na stężenie AEA i 2-AG w płynie mózgowo-rdzeniowym	28
5.6. Korelacje między stężeniami AEA i 2-AG w CSF, a ekspresją mRNA CB1R i CB2R w strukturach mózgu szczurów	29
6. DYSKUSJA	30
7. WNIOSKI	34
8. SPIS TABEL	35
9. SPIS SCHEMATÓW	35
10. STRESZCZENIE	36
11. ENGLISH SUMMARY	38
12. PIŚMIENNICTWO	40
13. SPIS PUBLIKACJI POZA DOKTORETEM	51

# 1. WSTĘP

## 1. 1. Definicja bólu

Według Międzynarodowego Stowarzyszenia Badania Bólu (International Association Study of Pain, IASP) „Ból jest to nieprzyjemne doznanie czuciowe i emocjonalne związane z rzeczywistym lub potencjalnym uszkodzeniem tkanek, albo opisywane w kategoriach takiego uszkodzenia” (IASP 2010, Wiliams i Craing 2016). Ból można klasyfikować na podstawie obszaru ciała dotkniętego chorobą, schematu czasu trwania lub dysfunkcji układu, który może powodować ból (Wiliams i Craing 2016).

Ból ustno-twarzowy to termin zdefiniowany przez Amerykańską Akademię Bólu Ustno-Twarzowego (American Academy of Orofacial Pain) jako „ból związany z twardymi i miękkimi tkankami głowy, twarzy i szyi” (Rotpenpian i Yakkaphan 2021, Pigg i wsp. 2021). Ból ustno-twarzowy dotyczy około 10% do 26% populacji dorosłej, z czego 7-11% przypadków jest sklasyfikowanych jako ból przewlekły, stanowiący poważny problem medyczny i społeczny (Benoliel i Sharav 2010, Melis i wsp. 2019). Co bardzo ważne, ból ustno-twarzowy występuje nawet u około 50% populacji osób starszych, z porównywalną częstotliwością u obu płci (Madland i Feinmann 2001). Pomimo postępu w badaniach nad bólem, wciąż nie ma leczenia skutecznego w stopniu, który zapewniłby całkowite zniesienie tego rodzaju bólu. Dlatego stale poszukuje się nowych możliwości terapeutycznych. Uważa się, że ból ustno-twarzowy powodowany jest uszkodzeniem gałęzi nerwu trójdzielnego lub neurogennym zapaleniem rozprzestrzeniającym się na okolicę ustno-twarzową. Jednak szczegółowa patogeneza charakteryzuje się znacznym poziomem skomplikowania i pozostaje w dużej części przypadków niedostatecznie poznana (Chiang i wsp. 2011, Sesle 2021). Zgodnie z wynikami badań prowadzonych na przestrzeni ostatnich lat, układ endokanabinoidowy (ECS) i endoopioidowy (EOS), mające podobne cechy farmakologiczne i lokalizację, mogą stać się nowymi celami molekularnymi w opracowywaniu leków na ten ból (Bushlin i wsp. 2010, Zubrzycki i wsp. 2017, 2019).

## 1.2. Układ endokanabinoidowy (ECS)

Kanabinoidy to związki naturalnie występujące w konopiach indyjskich (*Cannabis sativa*, *Cannabis indica* i *Cannabis ruderalis*). Najbardziej znanym spośród tych związków jest delta-9-tetrahydrokannabinol ( $\Delta^9$ -THC), który wywołuje efekty psychoaktywne (Dewey

1986, Radwan i wsp. 2009, Hill i wsp. 2017) i kanabidiol (CBD) który nie jest psychoaktywny (Schubart i wsp. 2011). Dowody stosowania *Cannabis sativa* do celów leczniczych sięgają czasów starożytnych w Azji. Preparaty tego gatunku stosowano jako środek przeciwbólowy na ból zęba, ból głowy i nerwoból już w 1000 r p.n.e. w indyjskiej medycynie ajurwedyjskiej (Indian Ayurvedic) (Zuardi 2006).

Układ endokanabinoidowy (ECS) jest złożonym układem neuromodulacyjnym, który odgrywa ważną rolę w regulacji wielu procesów fizjologicznych, w plastyczności synaptycznej i w neuromodulacji bólu (Hohmann i wsp. 2005, Guindon i Hohmann 2009, Woodhams i wsp. 2017). Składa się on z trzech głównych składowych: (1.) receptorów kanabinoidowych "klasycznych" (CB1R, CB2R) i "nieklasycznych" (TRPV1, GPR55, PPARs), (2.) endogennych ligandów (endokanabinoidów): N-arachidonoiloetanolaminy – anandamidu (AEA) i 2-arachidonyloglycerolu (2-AG) oraz (3.) enzymów, odpowiedzialnych za syntezę i degradację endokanabinoidów (EC) (Devane i wsp. 1992, Di Marzo 2006). AEA wykazuje większe powinowactwo do receptora CB1R niż CB2R, przy czym jest częściowym agonistą receptora CB1R, natomiast 2-AG ma mniejsze powinowactwo do receptora CB1R niż AEA, jest natomiast pełnym agonistą. Oba związki są niestabilne i podatne na hydrolizę, zarówno in vitro, jak i in vivo (Biernacki i wsp. 2016).

Endokanabinoidy nie są magazynowane jak klasyczne neuroprzekaźniki, lecz wytwarzane „na żądanie” w odpowiedzi na bodźce fizjologiczne i patologiczne (Howlet 2002). Działają na zasadzie wstecznych przekaźników, które hamują uwalnianie neurotransmiterów w synapsach hamujących i pobudzających, pośrednicząc tym samym w różnych formach długo- i krótkoterminowej plastyczności (Di Marzo 2006, Ahn i wsp. 2008, Murataeva i wsp. 2014).

Ostatnio kongenery endokanabinoidów (mediatory mające działanie zbliżone do endokanabinoidów, ale słabe powinowactwo do ich receptorów), takie jak: N-acyloetanolaminy (NAE), w tym N-palmitoiloetanolamina (PEA) i N-oleoiloetanolamina (OEA) i 2-mono-acyloglicerol (2-MAG) oraz pochodne długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, wliczając pierwszorzędowe amidy kwasów tłuszczowych i kilka N-acylowanych aminokwasów, zaliczono do bardziej rozbudowanego rozszerzonego układu ECS zwanego „endokanabinoidomem” (ECBome) (Iannotti i wsp. 2016).

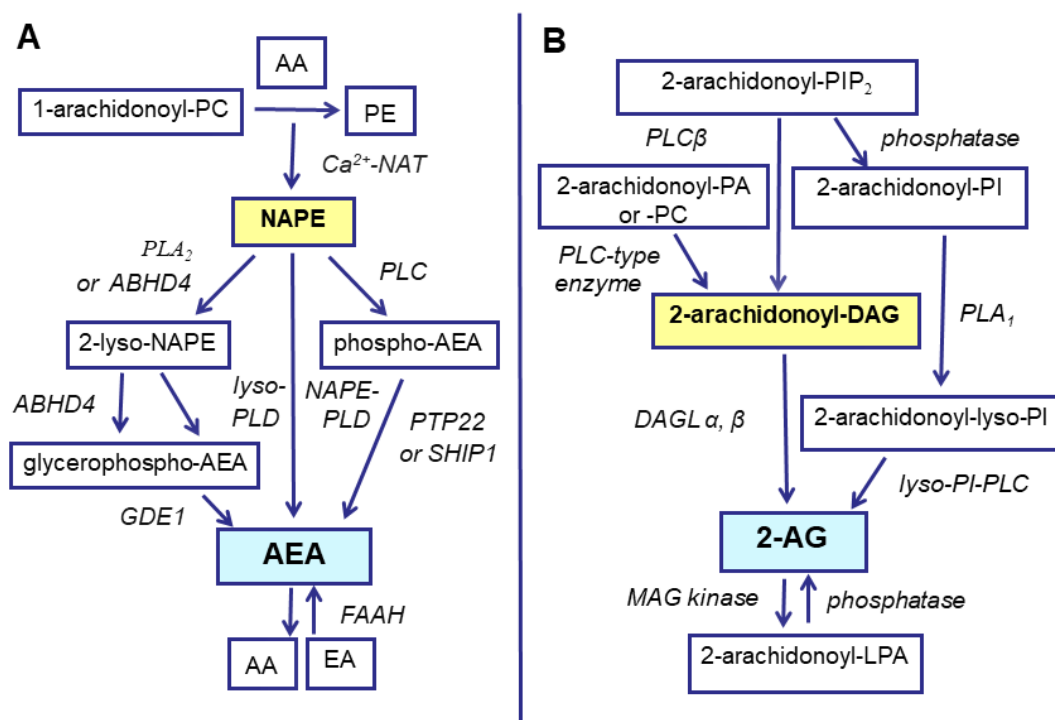
### 1.2.1. Biosynteza i degradacja endokanabinoidów

Endogenne kanabinoidy to endogenne lipidy, które wpływają na zachowanie w sposób, który częściowo odzwierciedla efekty wywoływane przez psychoaktywne składniki konopi, w



szczegółności  $\Delta$ -9-THC (Piomelli 2003, Di Marzo i wsp. 2007). Pierwszymi odkrytymi i najlepiej scharakteryzowanymi endokannabinoidami są AEA i 2-AG (Devane i wsp. 1992).

Pomimo podobieństw w budowie chemicznej AEA i 2-AG są syntetyzowane i degradowane przez odrębne szlaki enzymatyczne, które nadają tym dwóm endokannabinoidom różne role fizjologiczne i patofizjologiczne. Główny szlak syntezy AEA obejmuje prekursor fosfolipidów *N*-arachidonoilofosfatydyloetanoloaminę (NAPE) i jej zależną od wapnia hydrolizę przez fosfolipazę D, *N*-arachidonoilofosfatydyloetanoloaminy (NAPE-PLD) (Muccioli 2010). Dodatkowe NAE, takie jak PEA i OEA są również produkowane przez NAPE-PLD, ale innymi drogami (Fezza i wsp. 2014). 2-AG jest głównie syntetyzowany z fosfolipidów błonowych (zawierających 2-arachidonoil-PIP<sub>2</sub>) w dwuetapowym procesie katalizowanym przez fosfolipazę (PLC $\beta$ ) i lipazę diacyloglicerolową (DAGL) (Di Marzo i wsp. 2006). Istnieją dwie izoformy lipazy DAGL odpowiedzialne za produkcję 2-AG. DAGL $\alpha$  odpowiada za syntezę neuronalną 2-AG w OUN (Jain i wsp. 2013), podczas gdy DAGL $\beta$  przyczynia się do powstawania 2-AG w komórkach układu odpornościowego (Hsu i wsp. 2012). ECS wpływa na wiele szlaków sygnalizacyjnych (Nakane i wsp. 2002) (schemat 1).



**Schemat 1.** Schemat syntezy i degradacji (A.) anandamidu (AEA) i (B.) 2-arachidonyloglicerolu (2-AG) wykonany na podstawie cytowanych publikacji. Opis w tekście. Skróty: 2-AG – 2-arachidonoilglicerol; AA – kwas arachidonowy; ABHD4 – domena  $\alpha, \beta$ -hydrolazy zawierająca białko-4; AEA – anandamid; DAG – 1,2-diacyloglicerol; DAGL $\alpha, \beta$  – lipaza diacyloglicerolowa  $\alpha$  i  $\beta$ ; EA – etanoloamina; GDE1 – glicerofosfodiesteraza E1; LPA – kwas lizofosfatydowy; MAG – monoacyloglicerol; NAPE – *N*-arachidonoilo-

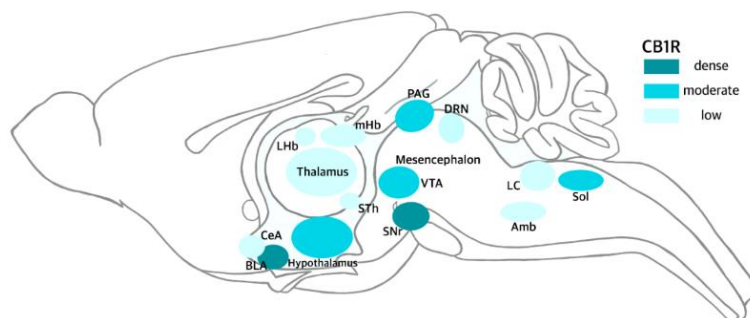
fosfatydyloetanolamina; NAT – N-acylotransferaza; PA – kwas fosfatydowy; PC – fosfatydylocholina; PE – fosfatydyloetanolamina; PI – fosfatydyloinozytol; PIP2 – fosfatydyloinozytol-4,5-bisfosforan; PLA1, 2 – fosfolipazy A1 i A2; PLC – fosfolipaza C; PLD – fosfolipaza D; PTPN22 – niereceptor białkowej fosfatazy tyrozynowej 22; SHIP1 – domena homologii Src 2 zawierająca inozytol 5' fosfataza 1.

Degradacja endokannabinoidów następuje przez enzymy hydrolizujące. AEA jest rozkładany głównie przez hydrolazę amidową kwasów tłuszczowych (FAAH), a 2-AG przez lipazę monoacyloglicerolową (MAGL) (Murataeva i wsp. 2014, Di Marzo 2006, Ahn i wsp. 2008). W degradację tych związków zaangażowane są również inne enzymy, zawierające domenę  $\alpha$ - $\beta$ -hydrolazy 6 (ABHD6) i  $\alpha$ - $\beta$ -hydrolazy 12 (ABHD12), (Savinainen i wsp. 2011), cyklooksygenazy (COX-2) i lipooksygenazy (LOX-12) (Murataeva i wsp. 2014, Maccarrone 2017). Działanie inhibitorów FAAH i MAGL polega na wydłużaniu działania biologicznego endokannabinoidów poprzez zwiększanie ich poziomów w obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) (Woodhams i wsp. 2017, Greco i wsp. 2020, 2021a,b.).

### 1.2.3. Receptory kanabinoidowe i ich rozmieszczenie w OUN

Zarówno kannabinoidy, jak i endokannabinoidy działają głównie na szeroko rozpowszechnione receptory kannabinoidowe typu 1 (CB1R) i kannabinoidowe typu 2 (CB2R), które są receptorami sprzężonymi z białkiem G (GPCR) (Matsuda i wsp. 1990, Munro i wsp. 1993).

Receptor CB1 odkryto w 1990 roku (Matsuda i wsp. 1990), a receptor CB2 odkryto w 1993 roku (Munro i wsp. 1993). Aktywacja receptorów CB1 hamuje cyklazę adenylową, blokuje kanały  $\text{Ca}^{2+}$  bramkowane napięciem (voltage-gated calcium channels, VGCC) i aktywuje kanały  $\text{K}^{+}$  w neuronach, natomiast aktywacja receptorów CB2 hamuje cyklazę adenylową, ale nie blokuje VGCC ani nie aktywuje kanałów  $\text{K}^{+}$  (Brown i wsp. 2004, Guo i Ikeda 2004, Zou i Kumar 2018). Receptory CB1 występują głównie w szerokim obszarze mózgu w tym w regionach uczestniczących w przenoszeniu i modulacji bólu (Devane i wsp. 1988, Herkenham i wsp. 1990) (schemat 2).

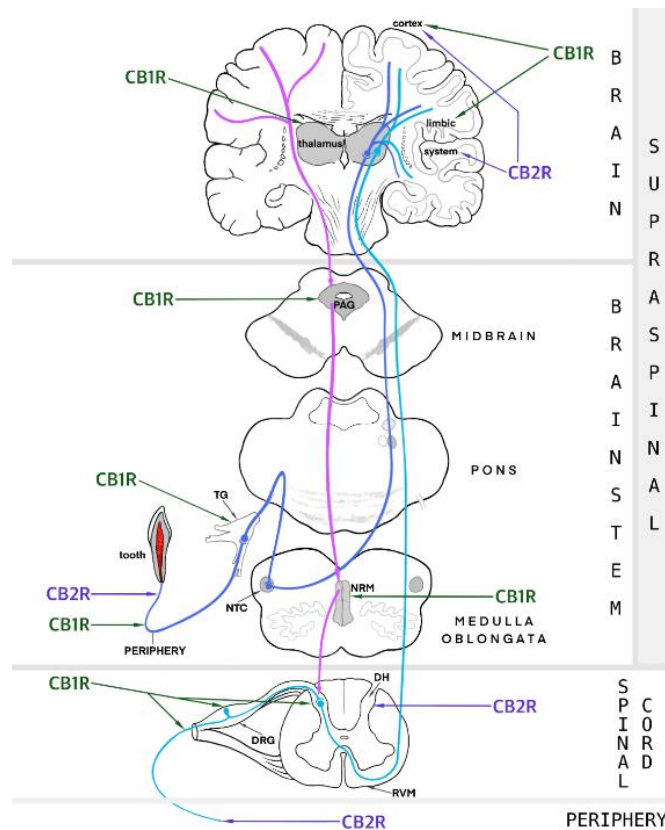


**Schemat 2.** Rozmieszczenie receptorów CB1 (CB1R) w obszarach międzymózgowia i pnia mózgu. Rozmieszczenie receptorów CB1R wskazane jest przez kształty kół o niskiej (bardzo jasno zielony), umiarkowanej (jasno zielony) i wysokiej (ciemno zielony) ekspresji. Zmodyfikowany schemat zaczerpnięty z Befort (2015) zgodnie z warunkami licencji Creative Commons Attribution License (CC BY).

Receptory CB1 są najbardziej rozpowszechnionymi receptorami w mózgu ssaków (Dewane i wsp. 1988, Fonesca i wsp. 2013). Największą gęstość rozmieszczenia w OUN wykazują w hipokampie, zakręcie obręczy, jądrze migdałowatym, jądrze półleżącym, węchomózgowiu i w korze nowej. Pień mózgu i wzgórze charakteryzują się niższym poziomem jego ekspresji. W śródmózgowiu i tyłomózgowiu CB1R występują obficie w gałce bladej, korze mózdzku, jądrze ruchowym nerwu błędnego i jądrze pasma samotnego (Hu i Mackie 2015, Mackie 2015). Dużą gęstość CB1R wykazano w regionach związanych z modulacją i przewodzeniem bólu (Hill i wsp. 2017).

Natomiast receptory CB2 są obecne głównie w układzie odpornościowym i ulegają ekspresji na różnego rodzaju komórkach immunologicznych (limfocytach, monocytach, makrofagach i mikrogleju) (Munro i wsp. 1993, Cabral i Marciano-Cabral 2005). Obecność CB2R stwierdza się również w neuronach, zwłaszcza w stanach patologicznych (Spiller i wsp. 2019). Jednak poziom ekspresji CB2R w mózgu jest znacznie niższy niż CB1R (Onaivi i Ishiguro 2006).

Receptory kanabinoidowe (CB) odgrywają kluczową rolę w nocycepcji obwodowej, rdzeniowej i nadrdzeniowej, w tym w szlakach wstępujących i zstępujących bólu (Hill i wsp. 2017) (schemat 3).



**Schemat 3.** Rola układu endokanabinoidowego (ECS) w kontroli bólu na poziomie obwodowym, rdzeniowym i nadrzdzeniowym. Objaśnienia w tekście. (Wykonanie własne).

Na neuronach obwodowych CB1R zlokalizowane w zakończeniach nocyceptywnych hamują transmisję nocyceptywną, podczas gdy CB2R zmniejszają uwalnianie czynników pronocyceptywnych (Ibrahim i wsp. 2005). W rdzeniu kręgowym CB1R występują w rogach grzbietowych (dorsal horn DH), gdzie są zlokalizowane w interneuronach rdzeniowych, na zakończeniach aferentnych neuronów czuciowych i zakończeniach eferentnych neuronów ponadrdzeniowych (Bridges i wsp. 2003, Nadal i wsp. 2013). Są także obecne w zwojach korzenia grzbietowego (dorsal root ganglia, DRG), a ich stymulacja hamuje uwalnianie działających probólowo: Substancji P (SP) i peptydu związanego z genem kalcytoninowym (calcitonin gene related peptide CGRP) (Piomelli i wsp. 2003).

Strukturami ponadrdzeniowymi, szczególnie bogatymi w receptory CB1 są: substancja szara okołowodociągowa (periaqueductal central grey, PAG) i brzuszno-dogłówna część rdzenia przedłużonego (rostral medulla, RVM), wchodzące w skład zstępującego układu antynocyceptywnego. Na poziomie ponadrdzeniowym w PAG i RVM receptory CB1 hamują wstępującą transmisję nocyceptywną i aktywują hamujący zstępujący szlak bólu poprzez hamowanie uwalniania kwasu gamma-aminomasłowego (gamma-aminobutyric acid GABA),

co odhamowuje neurony pobudzające (głównie glutaminergiczne) (Lau i Vaughan 2014). Zaobserwowano, że sygnalizacja receptorów CB1 i CB2 jest plejotropowa przez co endokannabinoidy mogą oddziaływać także na inne receptory związane z przetwarzaniem bólu (Morales i Reggio 2017), takie jak przejściowe potencjalne receptory waniloidowe 1 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1) (Zygmunt i wsp 2013, Muller i wsp. 2018), receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (PPAR) (O’Sullivan 2016), GPR55 (Zhao i Abood 2013), GABA<sub>A</sub> (Katona i wsp. 2001, Bakas i wsp. 2017) i Adenozyna A3 (Lane i wsp. 2010).

### 1.3. Endogenny układ opioidowy (EOS)

Endogenny układ opioidowy (EOS) składa się z endogennych peptydów opioidowych (endoopioidy, EOP): enkefaliny, endorfiny, dynorfiny i endomorfiny oraz receptorów opioidowych (OR):  $\mu$  (mu, MOR),  $\delta$  (delta, DOR) i  $\kappa$  (kappa, KOR) (Kieffer 1995, Cox 2013). Receptory opioidowe należą do grupy receptorów sprzężonych z białkami Gi/Go (G-protein-coupled receptors, GPCRs) i są kodowane przez trzy geny: *Oprm1*, *Oprd1* i *Oprk1* (Law i wsp. 2013). Endoioopioidy wykazują odmienne powinowactwo do poszczególnych OR (tabela 1).

**Tabela 1.** Endogenne peptydy opioidowe

Endogenne opioidy	Sekwencja aminokwasowa	Powinowactwo do receptora opioidowego
Met-enkefalin Leu-enkefalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	DOR
$\beta$ -endorfin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu	MOR i DOR
dynorfin A dynorfin B	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr	KOR
endomorfin-1 endomorfin-2	Tyr-Pro-Trp-Phe-NH <sub>2</sub> Tyr-Pro-Phe-Phe-NH <sub>2</sub>	MOR

Endogenne peptydy opioidowe są wytwarzane w OUN i tkankach obwodowych. W OUN spełniają rolę hamującego przekaźnika lub hamującego neuromodulatora (Hill i wsp.1976). Istnieje wiele badań opisujących wpływ endogennych opioidów na organizm ludzki. Szczególne zainteresowanie budzi ich wpływ na funkcje neuronów związanych z mechanizmami bólu. Wykazano ich hamujące działanie na neurony istoty galaretowatej rdzenia kręgowego, neurony jądra pasma rdzeniowego nerwu trójdzielnego, wzgórza, PAG, tworzącego siatkowatego i jądra wielkiego szwu (Waung i wsp. 2019, Bagley i Ingram 2020).

Ostatnio badanymi endogennymi związkami aktywującymi MOR są: endomorfina-1 (EM-1, Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>) i endomorfina-2 (EM-2, Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>) (Zadina i wsp. 1997). Rozmieszczenie ich w OUN jest bardzo zróżnicowane. Najwięcej tych peptydów występuje w korze mózgowej, wzgórzu, podwzgórzu i prążkowie ale głównym miejscem ich lokalizacji jest rdzeń przedłużony i rogi tylne rdzenia kręgowego (Martin - Schild i wsp. 1998). Podobnie jak inne endogenne peptydy opioidowe, są podatne na szybką degradację, dlatego badania nad ich rolą w bólu są ograniczone. Na przestrzeni lat donoszono o licznych modyfikacjach chemicznych tych ligandów w celu dostarczenia konkretnych informacji na temat ich zależności struktura-aktywność oraz ulepszenia ich właściwości terapeutycznych (Liu i Wang 2012).

### 1.3.1. Receptory opioidowe w ośrodkowym układzie nerwowym

Mechanizm działania opioidów zależy jest od ich bezpośredniego wpływu na receptory opioidowe. Receptory opioidowe występują zarówno w strukturach OUN jak i obwodowego na zakończeniach aferentnych włókien C przewodzących ból oraz w tkankach o pochodzeniu nieneuronalnym takich jak komórki odpornościowe, mikroglej i astrocyty (Shinoda i wsp. 1989, Mousa i wsp. 2000, Celik i wsp. 2016). Ekspresję obwodowych receptorów opioidowych i endogennych peptydów opioidowych wykazano także w okolicy ustno-twarzowej, w miazdze zębów szczura (Wei i wsp. 1991), w TG, jądrze ogonowym nerwu trójdzielnego i przyzębiu (Liu i wsp. 2021), co wskazuje, że mogą być one zaangażowane w modulację bólu ustno-twarzowego (Zubrzycki i wsp. 2017). W mózgowiu najwyższą ekspresję MOR zaobserwowano w mózdku, jądrze ogoniastym i jądrze półleżącym. DOR zidentyfikowano w hipokampie, korze mózgowej, skorupie, jądrze ogoniastym, jądrze półleżącym i płacie skroniowym. Największą ekspresję KOR wykryto w jądrze ogoniastym, jądrze półleżącym, jądrach podwzgórza i skorupie (Erbs i wsp. 2015).

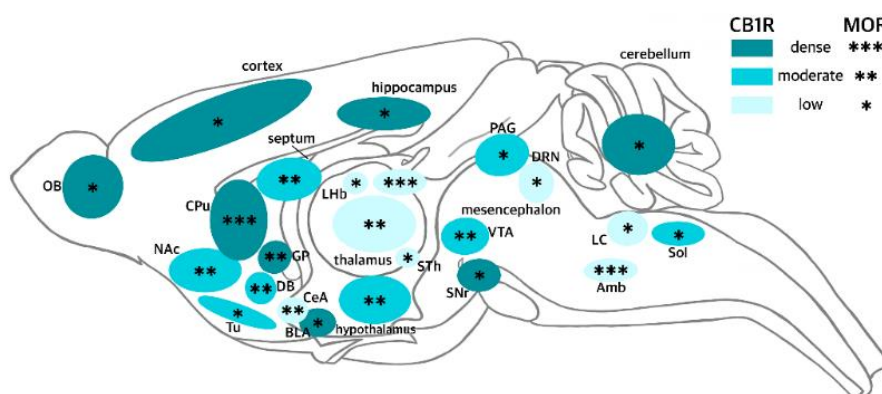
OR są syntetyzowane w DRG i transportowane do zakończeń nerwów centralnych i obwodowych. Mechanizm działania receptorów opioidowych w antynocycepcji jest spowodowany modulacją kanałów wapniowych i potasowych w zwoju korzenia grzbietowego i rogu grzbietowym i polega na hamowaniu uwalniania pro-nocyceptywnych neuroprzekazników z zakończeń presynaptycznych neuronów (poprzez „zamknięcie” kanałów jonowych dla wapnia) oraz depolaryzację błony postsynaptycznej (poprzez „otwarcie” kanałów jonowych dla potasu) (Torrecilla i wsp. 2008, Al-Hasani i

Bruchas2011).

Niektóre badania wykazały, że receptory opioidowe mogą ulegać heteromeryzacji z innymi klasami GPCR w warunkach fizjologicznych i patofizjologicznych, tworząc funkcjonalne dimery, heterodimery i oligomery (Bouvier 2001, Gupta i wsp. 2006). Mogą również wchodzić ze sobą w interakcje, a także tworzyć kompleksy z receptorami kannabinoidowymi CB1 co skutkuje zwiększonym działaniem przeciwbólowym opioidów (Mollica i wsp. 2017).

#### 1.4. Synergizm kanabinoidów i opioidów

W ostatnich latach coraz większą uwagę poświęca się wzajemnym powiązaniom między endogennymi układami antynocyceptywnymi (Zubrzycki i wsp. 2019, Greco i wsp. 2022). Wykazano, że endogenne układy opioidowe mogą być zaangażowane w antynocycepcję kannabinoidów i odwrotnie (Bushlin i wsp. 2010, Wilson-Poe i wsp. 2012, 2013), ponieważ endogenne elementy tworzące te układy mają podobne rozmieszczenie anatomiczne i mają porównywalne właściwości funkcjonalne (Navarro i wsp. 2001, Woodhams i wsp. 2017). Ponadto wykazano, że lokalizacja receptorów opioidowych MOR i kanabinoidowych CB1R pokrywa się w kilku regionach mózgu, o których wiadomo, że uczestniczą w antynocycepcji, w tym w PAG, jądrach szwu i jądrach wzgórza (schemat 4). Sugeruje to, że mogą one osiągać efekt przeciwbólowy nie tylko przez działanie samodzielne, ale też łącznie (Cichewicz 2004).



**Schemat 4.** Schematyczne przedstawienie rozmieszczenia CB1R i MOR w mózgu szczura. Własna modyfikacja autorów. Rozmieszczenie receptorów CB1R w śródmózgowiu, wzgórzu i podwzgórzu wskazane jest przez kształty kół o niskiej (bardzo jasno zielony), umiarkowanej (jasno zielony) i wysokiej (ciemno zielony) ekspresji. Rozmieszczenie receptorów MOR w śródmózgowiu, wzgórzu i podwzgórzu wskazane jest przez ilość gwiazdek o niskiej (jedna), umiarkowanej (dwie) i wysokiej (trzy) ekspresji. Rysunek zaczerpnięty z Befort (2015) zgodnie z warunkami licencji Creative Commons Attribution License (CC BY).



*Amb- jądro niejednoznaczne; BLA - podstawno-boczne jądro ciała migdałowatego; CeA - centralne ciało migdałowate; CPu - skorupa ogoniasta; DB - pasmo przekątne; DRN - jądro grzbietowe szwu; LC, miejsce sinawe; LHb, boczne jądro uzdeczki; mHb, przyśrodkowe jądro uzdeczki; NAc - jądro półleżące; OB - opuszka węchowa; PAG- istota szara środkowa śródmózgowia; SNr – istota czarna; Sol - jądro pasma samotnego; STh - jądro podwzgórzowe; Tu - guzek węchowy; VTA- obszar brzusznej nakrywki.*

Sformułowano trzy hipotezy wyjaśniające mechanizm współdziałania między opioidami i kanabinoidami. Po pierwsze, wykazano, że w rogach grzbietowych rdzenia kręgowego MOR i CB1R występują wspólnie w interneuronach rdzeniowych na zakończeniach, (Salio i wsp. 2001), zwiększając możliwość bezpośredniego oddziaływania pomiędzy tymi typami receptorów w tej samej komórce. Po drugie aktywacja receptorów opioidowych lub kanabinoidowych może skutkować podobnymi efektami behawioralnymi, w tym analgezą, ponieważ wykorzystują wspólne szlaki przekazywania sygnałów. Obie należą do rodziny GPCR, które wiążą się z białkiem G i hamują aktywność cykazy adenylowej (Salio i wsp. 2001, Cichewicz 2004, Viganò i wsp. 2005). Po trzecie podawanie kanabinoidów stymuluje syntezę i uwalnianie endogennych peptydów opioidowych, co może przyczyniać się do niektórych efektów farmakologicznych kanabinoidów (Desroches i Beaulieu 2010). Tak więc, łączenie kanabinoidów i leków opioidowych może być obiecującym podejściem do generowania długotrwałej analgezji, przy jednoczesnym unikaniu lub minimalizowaniu problemów z tolerancją związanych z lekami opioidowymi (Ozdemir i wsp. 2020).

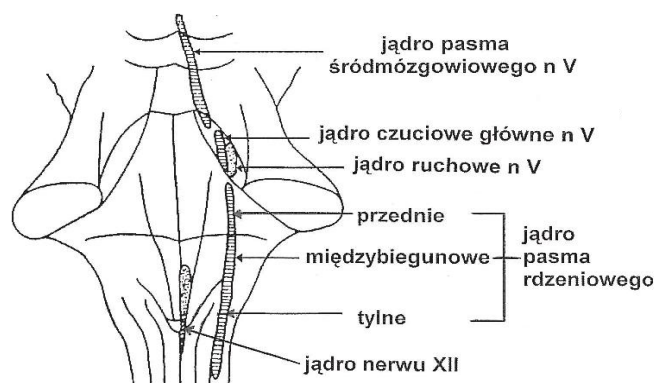
Interakcje między endokanabinoidami (EC) a układem opioidowym w zakresie przetwarzania bodźców bólowych oceniano przy użyciu ligandów receptorów kanabinoidowych lub inhibitorów enzymów degradujących EC. Wykazano, że podawanie agonistów receptorów kanabinoidowych może prowadzić do uwolnienia peptydów opioidowych i że EC są zaangażowane w działanie agonistów opioidowych (Cichewicz 2004, Lau i wsp. 2014). W kontekście niniejszej pracy interesujące są obserwacje wskazujące, że szlaki obu układów są zaangażowane w modulację kontroli zstępującej pnia mózgu w nocycepcji nerwu trójdzielnego (Zubrzycki i wsp. 2019). W jednym z badań stwierdzono, że blokada zarówno OR, jak i CBR1 prowadziła do znacznego zmniejszenia efektu przeciwbólowego związanego z AEA w której pośredniczy anandamid (Zubrzycki i wsp. 2017). Tak więc, łączenie kanabinoidów i leków opioidowych może stanowić obiecującym podejściem ukierunkowane na osiągnięcie długotrwałego efektu przeciwbólowego, przy jednoczesnym unikaniu lub minimalizowaniu problemów z tolerancją związanych z lekami opioidowymi (Ozdemir i wsp. 2020).



### 1.5. Organizacja neuronalna łuku odruchowego odruchu trójdzielno-podjęzykowego

Opuszkowy odruch cofania języka (evoked tongue jerk – ETJ) oparty na odruchu trójdzielno-podjęzykowym (trigemino-hypoglossal reflex) jest wykorzystywany od wielu lat do badania przewodzenia w obrębie pnia mózgu jest (Zubrzycka i wsp. 1997). Odruch ten wywoływano drażniąc miazgę siekaczy dolnych, której aktywacja wywołuje bodźce bólowe.

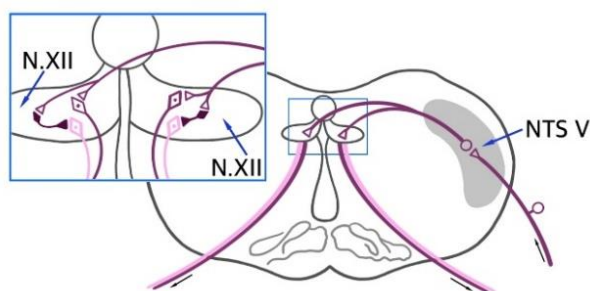
Beasley i Holland (1978) badali miazgę kłów pod mikroskopem elektronowym i stwierdzili, że zawiera ona około 81% włókien C – wolno przewodzących, pozostałe to włókna A-δ – szybko przewodzące. Występowanie wyłącznie włókien C i A-δ w miazdze zębów pozwala przypuszczać, że jej drażnienie wywołuje wybiórcze pobudzenie włókien dośrodkowych przewodzących czucie bólu. Wykazano, że włókna czuciowe przewodzące dośrodkowe impulsy z twarzy, jamy ustnej i miazgi zębów, biegną w nerwie trójdzielnym i utworzone są przez wypustki neuronów skupionych w zwoju trójdzielnym. Ośrodkowa projekcja neuronów czuciowych zwoju trójdzielnego, szczególnie neuronów unerwiających miazgę zębów, była przedmiotem licznych badań (Wooda i wsp. 1977, Arvidsson i Gobel 1981). Część włókien czuciowych nerwu trójdzielnego po wejściu do mózgowia kieruje się w stronę śródmózgowia, docierając do jądra pasma śródmózgowiowego n.V (nucleus tractus mesencephalici n.V). Odrębna część włókien dośrodkowych dzieli się na krótkie gałęzie wstępujące i dłuższe gałęzie zstępujące. Gałęzie wstępujące kończą się w moście w jądrze czuciowym głównym (nucleus sensorius principalis n.V), a zstępujące schodzą do jądra pasma rdzeniowego (nucleus tractus spinalis n.V), które składa się z trzech części ułożonych podłużnie: jądra przedniego (anterior), międzybiegunowego (interpolaris) i jądra tylnego (posterior) pasma rdzeniowego n.V schodzących aż do części szyjnej rdzenia kręgowego (Olszewski 1950) (schemat 5).



**Schemat 5.** Schemat jąder czuciowych nerwu trójdzielnego. Wykonanie własne.

Stwierdzono obecność włókien łączących jądra czuciowe n.V z jądrem ruchowym nerwu podjęzykowego. Stosując drażnienie miazgi zębów i jednocześnie rejestrując potencjały czynnościowe drugiego neuronu czuciowego, Wooda i wsp. (1977) stwierdzili, że impulsacja z miazgi biegnie bezpośrednio do wszystkich jąder czuciowych nerwu trójdzielnego. Stosując metodę znakowania neuronów i włókien nerwowych po wstrzyknięciu peroksydazy chrzanowej do miazgi zębów szczęki górnej i żuchwy Arvidsson i Gobel (1981) i Jacquin i wsp. (1983) wykazali, że projekcja z tych zębów biegnie po stronie ipsilateralnej do jądra czuciowego głównego nerwu trójdzielnego (nucleus sensorius principalis n.V) i do części przedniej jądra pasma rdzeniowego nerwu trójdzielnego (nucleus tractus spinalis n.V).

W odruchu trójdzielno-podjęzykowym jakim jest odruch cofania języka wywołany drażnieniem miazgi zębów, impulsacja z jąder czuciowych n.V przekazywana jest do ipsi- i kontralateralnego jądra nerwu podjęzykowego, gdzie pobudzone zostają motoneurony mięśni cofających język, następuje również hamowanie motoneuronów mięśni wysuwających język (schemat 6).



**Schemat 6.** Schemat łuku odruchowego odruchu trójdzielno-podjęzykowego. NTS V – jądro pasma rdzeniowego n.V; N. XII – jądro nerwu podjęzykowego, jasny trójkąt – synapsa pobudzająca; ciemny trójkąt – synapsa hamująca.

Łuk odruchowy odruchu trójdzielno-podjęzykowego przebiega pod dnem czwartej komory mózgowej pomiędzy jądrem czuciowym nerwu trójdzielnego i jądrem ruchowym nerwu podjęzykowego. Jądro nerwu podjęzykowego położone jest powierzchownie pod dnem komory czwartej. Na tej podstawie można przypuszczać, że neuropeptydy wprowadzane do komór mózgowia mogą szybciej docierać do tego jądra ze światła komory czwartej niż do innych elementów łuku odruchowego odruchu trójdzielno-podjęzykowego i mogą oddziaływać na ośrodek ruchowy, czuciowy lub neurony pośredniczące odruchu ETJ.

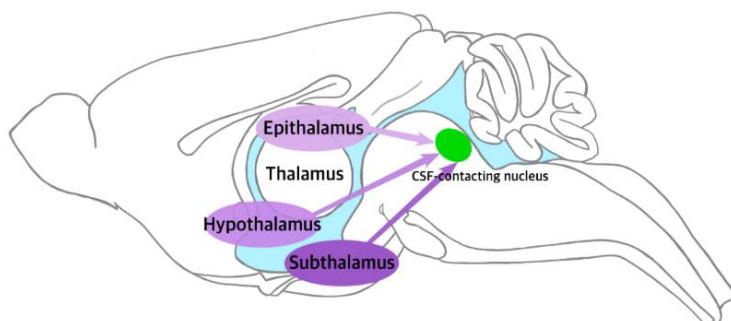
## 1.6. Rola płynu mózgowo-rdzeniowego w transmisji bólowej

Płyn mózgowo-rdzeniowy (CSF) pełni istotną rolę w zachowaniu homeostazy OUN i zapewnieniu optymalnych warunków funkcjonowania i komunikacji neuronów (Abbott i wsp. 2006).

Istnienie bariery krew–mózg (blood brain barrier, BBB) pomiędzy mięszem mózgu, a układem naczyniowym reguluje transport metabolitów do i z OUN (Tietz i Engelhardt 2015). Poza restrykcyjną kontrolą BBB pozostają narządy okołokomorowe (CVO), które charakteryzuje brak ścisłego kontaktu komórek śródbłónka z astrocytami.

Przekazywanie sygnałów między tkanką nerwową a CSF i krwią odbywa się pomimo zachowanych barier w mózgu, jednak jego mechanizm jest wciąż nie w pełni wyjaśniony (Liddel 2011). Oprócz hipotezy dyfuzyjnej w mechanizmach tego procesu rozpatruje się zaangażowanie m.in. wyspecjalizowanych komórek wyściółki (tanycytów), (Vigh i wsp. 2004, Vigh i Teichmann 1998), komórek podobne do tanycytów w narządach okołokomorowych (Langlet i wsp. 2014) oraz jądra kontaktującego się z płynem mózgowo-rdzeniowym położonego w brzusznej części PAG, w dolnej części wodociągu i górnej części dna komory czwartej (Wang i wsp. 2013, Song i Shang 2018, Song i wsp. 2019).

Unikalne cechy połączeń morfologicznych jądra kontaktującego się z płynem mózgowo-rdzeniowym sugerują, że jest to jedyny obszar w obrębie OUN zaangażowany w dwukierunkową transdukcję sygnału i transport substancji bioaktywnych między mięszem mózgu a CSF (Liu i wsp. 2014, Wu i wsp. 2015, Xing i wsp. 2015) **Do jądra tego docierają połączenia m.in. ze struktur istotnych dla generowania i propagacji sygnałów bólowych specyficznych dla bólu ustno-twarzowego takich jak podwzgórze, niskowzgórze, nadwzgórze (schemat 7) (Song i wsp. 2020).**



**Schemat 7.** Schemat przedstawia rzuty połączeń śródmózgowia, wzgórza i podwzgórza z jądrem kontaktującym się z płynem mózgowo-rdzeniowym. Dane liczbowe zaczerpnięte z Song (2020) zgodnie z warunkami licencji Creative Commons Attribution License (CC BY).

Coraz więcej dowodów sugeruje, że jądro kontaktujące się z CSF pośredniczy w przekazywaniu i regulacji sygnałów bólowych i może być zaangażowane w modulację zstępującego układu hamującego. Jednak dokładne mechanizmy molekularne pozostają niejasne. (Liu i wsp. 2014, Fei i wsp. 2016, Xu i wsp. 2011, Zhou i wsp. 2017).

Wykazano, że niektóre z endokannabinoidów zmieniają przepuszczalność BBB w migrenie i innych bólach głowy (Sarchielli i wsp. 2007, Russo i wsp. 2008). Włókna zawierające AEA docierają do PAG i RVM, ale ich główna projekcja przebiega wzdłuż komór mózgu i pozostają w bliskim kontakcie z wyściółką trzeciej i czwartej komory (Vigh i Teichmann 1998, Vigh i wsp. 2004, Langlet i wsp. 2014, Zhang i wsp. 2003, Wang i wsp. 2013, Song i Shang 2018; Song i wsp. 2019). Również receptory kanabinoidowe występujące w komórkach śródbłónka naczyń włosowatych i astrocytach odgrywają ważną rolę w utrzymaniu integralności BBB w szczególności poprzez przywracanie szczelności połączeń ścisłych, ponieważ (Vendel i de Lange 2014, Hagan i wsp. 2021).

Endokannabinoidy wytwarzane w tkance nerwowej są uwalniane do CSF i mogą współzawodniczyć w regulacji czynności ośrodków nerwowych położonych w sąsiedztwie komór bocznych mózgu i dna czwartej komory (Bloom and Segal 1980, Jackson 1980, Black 1982, MacMillan i wsp. 1998). Bóle bólowe powodują uwalnianie mediatorów do CSF i do płynu zewnątrzkomórkowego mózgu (ECF). Można przypuszczać, że endogenne mediatory występujące w CSF i uwalniane do niego pod wpływem bólowej transmisji aferentnej także w warunkach fizjologicznych, mogą mieć zdolność modulacji somatycznych odruchów opuszkowych.

W prezentowanych badaniach warunkiem uzyskania efektu neuropeptydu podanego dokomorowo (intracerebroventricular, i.c.v.) jest uzyskanie odpowiedniego stężenia badanego w ECF ośrodków czuciowych i ruchowych odruchu trójdzielno-podjęzykowego. Ośrodki te znajdują się w pobliżu ścian IV komory mózgowej, a więc podany i.c.v. neuropeptyd ulega najpierw rozcieńczeniu w płynie CSF, a następnie przenika do ECF mózgowia. Z ECF dostaje się w pobliże struktur odpowiedzialnych za odruch trójdzielno-podjęzykowy. Można więc sądzić, że ostatecznie skuteczne w danych strukturach stężenie podanego i.c.v. neuropeptydu jest znacznie mniejsze niż stężenie pierwotne. To, czy neuropeptyd dotrze do mózgu, zależy w dużej mierze od jego zdolności pokonania BBB, która jest zależna od jego lipofilności. Związki hydrofilne gorzej pokonują tę barierę (Abbott 2002). Opioidy o wysokiej lipofilności przedostają się do mózgu łatwiej.

## 2. CEL PRACY

Do chwili obecnej nie udało się w sposób wystarczający poznać mechanizmów odpowiedzialnych za patofizjologię bólu ustno-twarzowego, ani opracować w pełni skutecznej metody jego leczenia. Powszechnie uznawany jest natomiast hamujący wpływ opioidów i kanabinoidów na pobudliwość większości neuronów OUN. Przedstawione powyżej dane wskazują ponadto na istnienie złożonych interakcji pomiędzy układem opioidowym i kanabinoidowym, również w obszarze ośrodkowego przetwarzania bodźców bólowych.

Celem niniejszej pracy była ocena zaangażowania składowych układu endokanabinoidowego i endoopioidowego w przetwarzanie bodźca bólowego z obszaru ustno-twarzowego wywołanego drażnieniem miazgi zębów u szczurów.

Cel pracy realizowano przez:

1. Ocenę wpływu stymulacji miazgi zębów, a także podawanego ośrodkowo i obwodowo inhibitora hydrolazy amidowej kwasu tłuszczowego (FAAH) – URB597 na:
  - a. uwalnianie endokanabinoidów (AEA, 2-AG) do płynu mózgowo-rdzeniowego
  - b. ekspresję w strukturach mózgu zaangażowanych w przetwarzanie bólu ustno-twarzowego (śródmózgowiu, wzgórzu i podwzgórzu) mRNA neuroprzekazników: endoopioidu endomorfiny 2 (EM-2), Substancji P (SP), peptydu pochodnego genu kalcytoninowego (CGRP), a także mRNA receptorów kanabinoidowych (CB1R, CB2R) i opioidowego (MOR)
2. Analizę korelacji między uwalnianiem endokanabinoidów (AEA i 2-AG) do płynu mózgowo-rdzeniowego podczas indukcji odruchu trójdzielno-podjęzykowego, a ekspresją receptorów kanabinoidowych (CB1R i CB2R) w strukturach mózgu zaangażowanych w przetwarzanie bólu ustno-twarzowego (śródmózgowiu, wzgórzu i podwzgórzu)

## 3. MATERIAŁ I METODY

### 3.1. Zwierzęta doświadczalne

Badania przeprowadzano na dorosłych szczurach samcach rasy Long-Evans o średniej masie ciała 330-350 g, wieku około 3 miesięcy. Zwierzęta przebywały w plastikowych klatkach w warunkach standardowych: temperatura 22°C, w 12-godzinnym cyklu naprzemiennym światło/ciemność. Szczury karmiono granulowaną paszą dla gryzoni i poiono wodą *ad libitum*. Zwierzęta usypiano wstrzykując dootrzewnowo roztwór chloralozy w ilości 150 mg·kg<sup>-1</sup> masy

ciała. U wszystkich zwierząt doświadczalnych znieczulenie utrzymywało się przez cały okres doświadczenia. Do każdego eksperymentu używano grup o liczebności  $n = 6$  zwierząt. Aby zminimalizować wpływ dobowy, wszystkie eksperymenty przeprowadzono między 8:00 a 12:00 po 7 dniach aklimatyzacji. Wszystkie procedury eksperymentalne uzyskały akceptację Lokalnej Komisji Etycznej Eksperymentów na Zwierzętach Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (42/ŁB 103/2018; 42/ŁB 103-A-DLZ/2020; 43/ŁB 103-B-NZP/2020) i były zgodne z Dyrektywą Rady Wspólnot Europejskich 2010/63/UE. Wszystkie procedury doświadczalne wykonano zgodnie z aktualnymi wytycznymi dotyczącymi opieki nad zwierzętami laboratoryjnymi (w tym z zastosowaniem procedur 3Rs) oraz zgodnie z wytycznymi ARRIVE (Kilkenny i wsp. 2010, McGrath i Lilley 2015).

### 3.2. Dobór metodyki doświadczeń

Do realizacji celów badania posłużono się metodą pozwalającą na rejestrację nasilenia odruchu trójdzielno-podjęzykowego w czasie perfuzji komór mózgowia roztworami związków aktywnych. Rejestrowano ruchy cofania rozciągniętego języka wywołane drażnieniem gałązek czuciowych n.V tj. miazgi zębów u szczurów. Zastosowana metoda pozwala na pomiar amplitudy wywołanych ruchów cofania języka, a jej obniżenie może odzwierciedlać stopień tłumienia bólu.

*Metodyka opisana szczegółowo w pracy 2.*

Wywołane drażnieniem miazgi zębów impulsy aferentne, włóknami nerwu zębodołowego dolnego, poprzez zwój trójdzielny docierały do jądra głównego i jądra pasma rdzeniowego n.V. Z jąder czuciowych impulsacja przekazywana była do motoneuronów leżących pod dnem czwartej komory mózgowia skupionych w jądrze nerwu podjęzykowego i stąd drogą włókien n. XII do mięśni języka.

Wydaje się, że płyn mózgowo-rdzeniowy stanowi drogę przenoszenia informacji między ośrodkami mózgowia. Można się spodziewać, że perfundowane przez układ komorowy związki mogą przenikać przez wyściółkę komór i działać na położone w pobliżu wodociągu mózgu i dna czwartej komory neurony ośrodka czuciowego i ruchowego badanego odruchu, co znajduje odbicie w wielkości wywołanych ruchów języka (ETJ).

*Zapis przedstawiony w pracy 1 schemat 4.*

Należy podkreślić, że zastosowana metoda rejestracji wywołanych drażnieniem miazgi zębów ruchów języka w czasie perfuzji komór mózgowia związkami aktywnymi jest metodą opracowaną i jak dotąd stosowaną wyłącznie w Zakładzie Fizjologii UM w Łodzi.

Aby wyjaśnić działanie mediatorów zaangażowanych w przetwarzanie informacji bólowej z obszaru ustno-twarzowego wywołanego drażnienia miazgi zębów u szczurów zastosowano kilka technik:

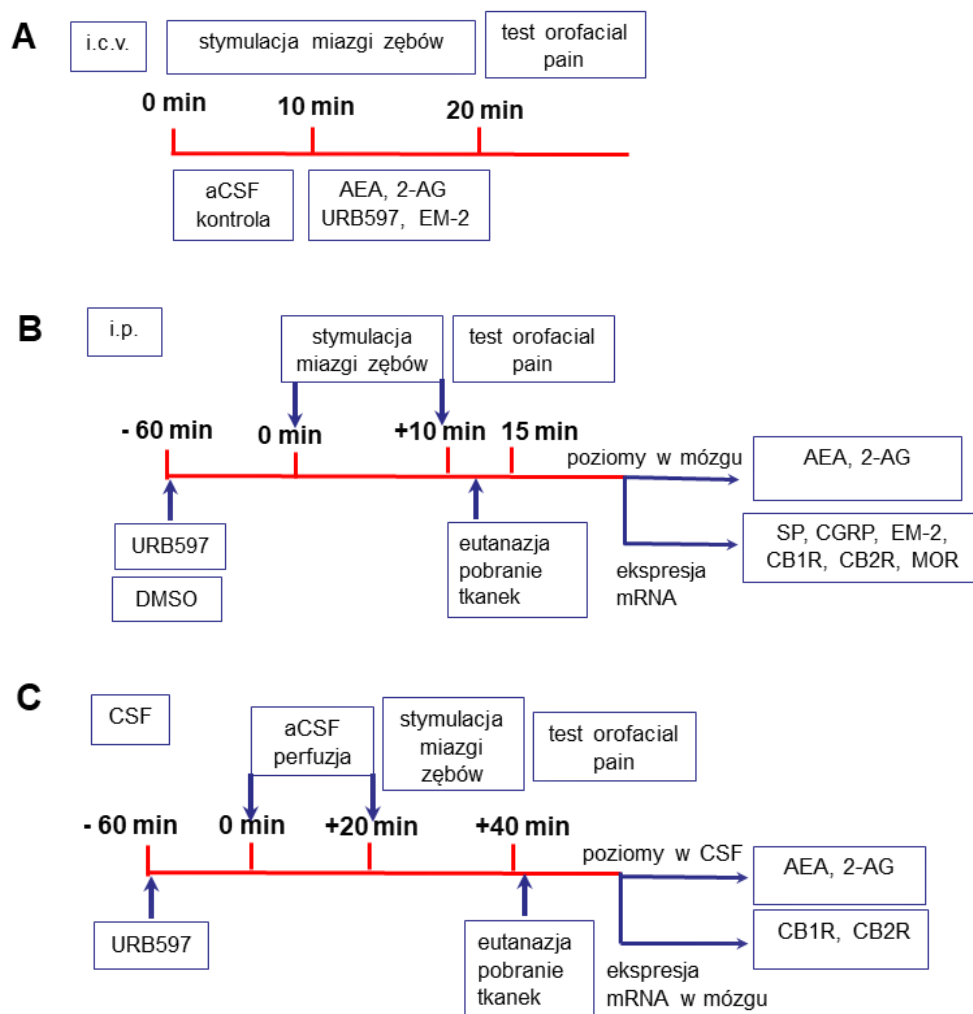
*Metodyki opisane szczegółowo w pracach 1 i 2.*

1. metodę perfuzji komór mózgowia,
2. test immunoenzymatyczny ELISA
3. ilościową metodę RT-PCR w czasie rzeczywistym.

### 3.3. Charakterystyka grup doświadczalnych

Kontrolną perfuzję komór mózgowych przeprowadzono za pomocą sztucznego płynu mózgowo-rdzeniowego (aCSF), który został opracowany przez Daniela i Lederisa (1967) i zawierał: 120 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 2,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3 mM MgSO<sub>4</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM glukozy, 1,0 g/l albuminy surowicy bydlęcej i 0,1 g/l kwasu askorbinowego (pH = 7,5). Roztwór umieszczono w łaźni termostatowej o temperaturze 37°C i stale nagazowywano karbogenem (mieszanina 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>).

AEA, 2-AG (Tocris Bioscience Bristol, Wielka Brytania), URB597 (3'-karbamilo-bifenyl-3-ilo-cykloheksylokarbaminian, EM-2 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) podawano dokomorowo (i.c.v.) w dawce 100 nmol/ml. URB597 podawany dootrzewnowo (i.p.) rozpuszczono w dimetylosulfotlenku (DMSO) (Rahn i wsp. 2008) i wstrzyknięto w dawce 2 mg/kg, na jedną godzinę przed stymulacją miazgi zębów (schemat 8) (Greco i wsp. 2020, Nozaki i wsp. 2015). Roztwór podawano w objętości 1 ml/kg (Greco i wsp. 2020).



**Schemat 8.** Plan procedur doświadczalnych

A. Wpływ perfuzji komórek mózgowych aCSF (kontrola) i AEA (n=6), 2-AG (n=6), URB597 (n=6) i EM-2 (n=6) na ETJ wywołany stymulacją miazgi zębów u szczurów.

B. Grupa zwierząt doświadczalnych, której podano URB597 dootrzewnowo (i.p.) 60 minut przed stymulacją miazgi zębów w celu określenia poziomów endokannabinoidów AEA i 2-AG oraz ekspresji mRNA SP, CGRP, EM-2 i CB1R, CB2R, MOR w tkankach śródmózgowia, wzgórza i podwzgórza została uśmiercono bezpośrednio po zakończeniu doświadczenia (n = 6). Na początku części eksperymentalnej tej pracy przeprowadzono doświadczenia, w których rejestrowano ETJ bez perfuzji komórek mózgowych (n=6). Wykazano, że wielkość ETJ nie zmieniała się w ciągu 80 minut stymulacji miazgi zębów przy zachowaniu stałych parametrów bodźców drażniących. Drugiej grupie zwierząt doświadczalnych podawano DMSO 1 ml/kg i.p. (n = 6).



C. Pobranie płynu mózgowo-rdzeniowego do oznaczeń stężenia AEA i 2-AG.

Płyn mózgowo-rdzeniowy pobrano ze zbiornika mózdkowo-rdzeniowego, a następnie przeprowadzono 20-minutową perfuzję komór bocznych sztucznym płynem mózgowo-rdzeniowym (aCSF) z zebraniem perfuzatu ze zbiornika mózdkowo-rdzeniowego podczas stymulacji miazgi zębów (n=6). Kolejna grupa składała się ze szczurów, które otrzymały i.p. URB597 na jedną godzinę przed eksperymentem. W tej grupie przeprowadzono 20-minutową perfuzję aCSF przed stymulacją miazgi zębów i przez kolejne 20 minut podczas stymulacji miazgi zębów (n=6). Płyn mózgowo-rdzeniowy do badań molekularnych zamrożono i przechowywano w temperaturze -70°C nie dłużej niż 2 tygodnie.

### 3.4. Analiza statystyczna

Badanie zaplanowano z wynikiem jako zmienną ciągłą. Zaprojektowano porównania parami ze stosunkiem 1:1 między grupami. Na podstawie wcześniejszych badań przyjęto wynik jako istotny, gdy różnica między obiema grupami przekracza 30%, przy odchyleniu standardowym wynoszącym 15%. Zakładając  $\alpha = 0,05$  i moc = 0,90, oszacowano, że potrzeba sześciu zwierząt na grupę, aby móc odrzucić hipotezę zerową. Do przeprowadzenia analizy statystycznej i wygenerowania wykresów zastosowano PRISM 9.2 (Graph-Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA) i Statistica Version 13.1 (TIBCO, Palo Alto, CA, USA). Rozkład każdej zmiennej sprawdzono za pomocą testu normalności Shapiro-Wilka, a każda zmienna o nienormalnym rozkładzie została przetransformowana za pomocą funkcji logarytmicznej tam, gdzie było to właściwe. W przypadku odpowiedzi nocyceptywnych neuroprzekaźników, ekspresji genów oraz poziomów AEA i 2-AG, statystyczne różnice między grupami oceniano przy użyciu jednokierunkowej ANOVA, a następnie testu wielokrotnych porównań post hoc Tuk-ey'a. Do oceny korelacji między poziomami AEA i 2-AG oraz ekspresją CBR1 i CBR2 wykorzystano korelację Pearsona. Wszystkie dane przedstawiono jako średnią  $\pm$  błąd standardowy średniej ( $\pm$  SEM), a wartość  $p \leq 0,05$  uznano za istotną statystycznie. Dane dodatkowe znajdują się w Aneksie prac 1 i 2. Dane i analiza statystyczna są zgodne z zaleceniami dotyczącymi projektowania i analizy eksperymentów w farmakologii (Curtis et al. 2015).

## 5. Wyniki

### 5.1. Wpływ perfuzji komór mózgowych AEA, 2-AG, EM-2 i URB597 na amplitudę odruchu trójdzielno-podjęzykowego u szczurów

Perfuzja komór mózgowych z AEA spowodowała istotne zmniejszenie ( $p=0,0027$ ) amplitudy ETJ w porównaniu z kontrolną perfuzją aCSF. Podobnie perfuzja z użyciem EM-2 i URB597 również miała działanie przeciwbólowe i spowodowała zmniejszenie amplitudy ETJ (odpowiednio  $p<0,0001$  i  $p=0,0001$ ). Perfuzja z 2-AG nie wykazała aktywności antynocyceptywnej w porównaniu z aCSF ( $p=0,6982$ ). Wpływ mediatorów na ETJ przedstawiono na rycinie 1 w pracy 1.

### 5.2. Wpływ stymulacji miazgi zębów i obwodowego podania URB597 na stężenie AEA i 2-AG w strukturach mózgu u szczurów

W następnym kroku zbadano, czy stymulacja nocyceptywna (drażnienie miazgi zębów) lub inhibicja aktywności FAAH URB597 wpłynie na stężenie 2-AG w strukturach mózgu (*rycina 8 i 9 praca 1*). Stwierdzono, że stężenie 2-AG nie różniło się między grupami we wzgórzu ( $F(2, 15) = 1,221$ ,  $p=0,3226$ ) i podwzgórzu ( $F(2, 15) = 1,090$ ,  $p=0,3615$ ). W śródmózgowiu stężenie 2-AG spadło w grupie stymulacji miazgi zębów ( $F(2, 15) = 7,324$ ,  $p=0,0060$ ), ale różnica ta osiągnęła istotność statystyczną jedynie w porównaniu z grupą po podaniu URB597 ( $p=0,0051$ ).

Stwierdzono istotne różnice między grupami w stężeniu AEA we wszystkich badanych strukturach mózgu (śródmózgowiu-  $F(2, 15) = 7,917$ ,  $p=0,0045$ ; wzgórzu-  $F(2, 15) = 10,85$ ,  $p=0,0012$  i podwzgórzu  $F(2, 15) = 6,590$ ,  $p=0,0088$ ) (*rycina 9 praca 1*). Nie było istotnych różnic pomiędzy grupą stymulacji miazgi zębów a grupą kontrolną we wszystkich strukturach. Z kolei, obwodowe podanie URB597 istotnie zwiększało stężenie AEA w śródmózgowiu ( $p=0,0062$ ), wzgórzu ( $p=0,0010$ ) i podwzgórzu ( $p=0,0087$ ).

### 5.3. Wpływ stymulacji miazgi zębów i obwodowego podania URB597 na poziomy mRNA neuroprzekaźników (SP, CGRP i EM-2) w strukturach mózgu u szczurów

Następnie oceniono zmiany w transkrypcji mRNA wybranych mediatorów w czasie drażnienia miazgi zębów i po podaniu inhibitora FAAH – URB597.

Ekspresja SP mRNA była podobna w śródmózgowiu i podwzgórzu, natomiast niższe poziomy ekspresji zaobserwowano we wzgórzu. Wystąpiły istotne różnice w poziomach ekspresji SP pomiędzy grupami eksperymentalnymi - w śródmózgowiu ( $F(2, 15) = 69,31, p < 0,0001$ ), wzgórzu ( $F(2, 15) = 6,341, p=0,0101$ ) i podwzgórzu ( $F(2, 15) = 51,26, p<0,0001$ ) (*rycina 2 praca 1*). Stymulacja miazgi zębów powodowała istotny wzrost ekspresji SP mRNA w porównaniu z kontrolą w śródmózgowiu ( $p<0,0001$ ) i podwzgórzu ( $p<0,0001$ ), podobny trend zaobserwowano we wzgórzu, ale nie był on istotny statystycznie ( $p=0,0819$ ). We wszystkich trzech strukturach mózgu – śródmózgowiu, wzgórzu i podwzgórzu, podanie URB597 powodowało obniżenie ekspresji SP mRNA w porównaniu z grupą ze stymulacją nocyceptywną (odpowiednio  $p<0,0001, p=0,0086$  i  $p<0,0001$ ).

We wszystkich trzech analizowanych strukturach mózgu stymulacja nocyceptywna i podanie URB597 powodowały istotną deregulację ekspresji mRNA CGRP (śródmózgowiu –  $F(2, 15) = 563,6, p<0,0001$ , wzgórzu –  $F(2, 15) = 253,1, p<0,0001$ ) i podwzgórzu-  $F(2, 15) = 360,4, p<0,0001$  (*rycina 3 praca 1*). W grupie stymulacji miazgi zębów wyższą ekspresję mRNA CGRP zaobserwowano we wszystkich strukturach w porównaniu z kontrolą. Podanie URB597 powodowało obniżenie ekspresji mRNA CGRP w porównaniu z kontrolą we wszystkich strukturach, jednak we wzgórzu ta zmiana nie była istotna statystycznie ( $p=0,1736$ ).

Ekspresja mRNA EM-2 w badanych strukturach mózgu również uległa istotnej zmianie w odpowiedzi na stymulację nocyceptywną i podanie URB-597 (śródmózgowie-  $F(2, 15) = 257,0, p<0,0001$ ; wzgórze-  $F(2, 15) = 449,3, p<0,0001$ ; podwzgórze-  $F(2, 15) = 62,83, p<0,0001$  (*rycina 4 praca 1*). We wszystkich strukturach stymulacja miazgi zębów powodowała wyższą ekspresję mRNA EM-2. Podobnie podanie URB597 powodowało obniżenie poziomu EM-2 we wzgórzu ( $p=0,0002$ ) i podwzgórzu ( $p=0,0406$ ). Nie było zmian w ekspresji mRNA EM-2 w odpowiedzi na URB597 w śródmózgowiu ( $p=0,9571$ ).

#### 5.4. Wpływ stymulacji miazgi zębów i obwodowego podania URB597 na poziomy mRNA receptorów CB1R, CB2R i MOR w strukturach mózgu u szczurów

Analiza statystyczna wykazała zmiany w ekspresji CB1R w strukturach mózgu w zależności od stymulacji bólowej i podania URB597 (śródmózgowiu-  $F(2, 15) = 7,217, p=0,0064$ ; wzgórzu-  $F(2, 15) = 5,417, p =0,0169$ ; podwzgórzu  $F(2, 15) = 5,821, p=0,0135$ ) (*rycina 5 praca 1*). W śródmózgowiu ekspresja CB1R była podwyższona w odpowiedzi na obwodowe podanie URB597 w porównaniu z kontrolą ( $p=0,0129$ ) i stymulacją miazgi zębów ( $p=0,0129$ ). Podobne wyniki zaobserwowano we wzgórzu w porównaniu z grupą kontrolną i stymulacją

miazgi zębów (odpowiednio  $p=0,0382$  i  $p=0,0253$ ). Wzrost ekspresji CB1R odnotowano również w podwzgórzu w porównaniu ze stymulacją nocyceptywną ( $p=0,0382$ ).

Zarówno stymulacja nocyceptywna, jak i podanie URB597 powodowały istotne zmiany w ekspresji mRNA CB2R tylko w podwzgórzu (śródmózgowie  $F(2, 15) = 0,3265$ ,  $p=0,7265$ ; wzgórze  $F(2, 15) = 3,261$ ,  $p=0,0667$ ; podwzgórze  $F(2, 15) = 6,442$ ,  $p=0,0096$ ) (*rycina 6 praca 1*). Obserwowano obniżenie ekspresji CB2R w odpowiedzi na podanie URB597 w porównaniu z kontrolą ( $p=0,0072$ ).

Stwierdzono istotne zmiany w ekspresji mRNA MOR w odpowiedzi na stymulację miazgi zębów i podanie URB597 we wszystkich analizowanych strukturach mózgu (śródmózgowiu  $F(2, 15) = 114,8$ ,  $p<0,0001$ ; wzgórzu  $F(2, 15) = 11,39$ ,  $p=0,0010$  podwzgórzu  $F(2, 15) = 24,48$ ,  $p<0,0001$ ) (*rycina 7 praca 1*). Stymulacja nocyceptywna powodowała zwiększenie ekspresji mRNA MOR we wszystkich strukturach w porównaniu z kontrolą, ale we wzgórzu różnica ta nie była istotna statystycznie ( $p=0,1483$ ). Z drugiej strony, podanie URB-597 obniżało ekspresję MOR w porównaniu z grupą kontrolną. W podwzgórzu efekt ten nie osiągnął jednak istotności statystycznej ( $p=0,0846$ ).

#### 5.5 Wpływ stymulacji miazgi zębów i podania URB597 na stężenie AEA i 2-AG w płynie mózgowo-rdzeniowym (CSF)

Analiza statystyczna wykazała, że stymulacja nocyceptywna i podanie URB-597 indukowały zmiany stężenia AEA w płynie mózgowo-rdzeniowym ( $F(2,15)=10,37$ ,  $p=0,002$ ). Obwodowe podanie inhibitora FAAH -URB597, spowodowało znaczny wzrost stężenia AEA w CSF szczurów w porównaniu do kontroli ( $p=0,042$ ) i szczurów poddanych stymulacji miazgi zębów ( $p=0,001$ ). Stymulacja miazgi zębów nie zmieniła natomiast stężenia AEA w porównaniu z kontrolą ( $p=0,190$ ) (*rycina 1 A praca 2*).

Stwierdzono również różnice w stężeniu 2-AG w CSF pomiędzy grupami eksperymentalnymi ( $F(2, 15) = 5,344$ ,  $p=0,018$ ). Podanie URB597 powodowało istotny spadek stężenia 2-AG ( $p=0,014$ ), podczas gdy stymulacja miazgi zębów nie miała wpływu na stężenie 2-AG w płynie mózgowo-rdzeniowym szczurów ( $p=0,3330$ ) (*rycina 1 B praca 2*).

## 5.6. Korelacje między stężeniami AEA i 2-AG w CSF, a ekspresją mRNA CB1R i CB2R w strukturach mózgu szczurów

W badaniu oceniono również korelacje między stężeniem endokannabinoidów w płynie mózgowo-rdzeniowym a ekspresją receptorów kannabinoidowych w śródmózgowiu, wzgórzu i podwzgórzu. W tabeli 2 zestawiono współczynniki korelacji i wartości „p” wszystkich badanych korelacji.

Zaobserwowano statystycznie istotne dodatnie korelacje między stężeniem AEA w płynie mózgowo-rdzeniowym a ekspresją mRNA CB1R w śródmózgowiu (korelacja Pearsona  $r=0,60$ ,  $p=0,008$ ) (*rycina 2 A praca 2*) i podwzgórzu ( $r=0,62$ ,  $p=0,006$ ) (*rycina 2 B praca 2*). Odwrotnie, zaobserwowano umiarkowaną ujemną korelację między ekspresją AEA i CB2R we wzgórzu ( $r=-0,59$ ,  $p=0,011$ ) (*rycina 2 C praca 2*).

Stwierdzono również umiarkowaną ujemną korelację między stężeniem 2-AG i ekspresją mRNA CB1R w śródmózgowiu ( $r=-0,51$ ,  $p=0,032$ ) (*rycina 2 D praca 2*), a także umiarkowaną dodatnią korelację między stężeniem 2-AG i ekspresją CB2R w śródmózgowiu ( $r=0,48$ ,  $p=0,042$ ) (*rycina 2 E praca 2*).

**Tabela 2.** Współczynniki korelacji Pearsona i związane z nimi wartości  $p$  dla endokannabinoidów (AEA/2-AG) i ekspresji receptorów CB1R/CB2R. Niebieski oznacza ujemne wartości R, czerwony oznacza dodatnie wartości R.

Endokanabinoidy	Względna ilość mRNA CB1R - śródmózgowie	Względna ilość mRNA CB1R - wzgórze	Względna ilość mRNA CB1R - podwzgórze	Względna ilość mRNA CB2R - śródmózgowie	Względna ilość mRNA CB2R - wzgórze	Względna ilość mRNA CB2R - podwzgórze
AEA CSF [ng/mL]	0.60 $p = 0.008$	0.26 $p = 0.292$	0.62 $p = 0.006$	-0.14 $p = 0.587$	-0.59 $p = 0.011$	-0.21 $p = 0.398$
2-AG CSF [ng/mL]	-0.51 $p = 0.032$	-0.41 $p = 0.093$	-0.28 $p = 0.267$	0.48 $p = 0.042$	0.32 $p = 0.193$	0.40 $p = 0.104$

## 6. DYSKUSJA

Wysoka częstość występowania bólu ustno-twarzowego w populacji ogólnej, a także jego niejednokrotnie bardzo uciążliwy i niepoddający się terapii charakter, powodują że schorzenie to stanowi poważny problem zarówno kliniczny jak i społeczny. Dlatego poszukiwanie nowych, bezpiecznych środków skutecznie zmniejszających natężenie bólu ustno-twarzowego jest ważnym obszarem badań współczesnej medycyny.

W ostatnich latach podkreśla się przeciwbólowy potencjał endokannabinoidów i endoopioidów jako modulatorów transmisji bólu ustno-twarzowego (Zubrzycka i wsp. 2011, Zubrzycki i wsp. 2017, 2019). Jednakże, obawy dotyczące bezpieczeństwa tych terapii ograniczają ich zastosowanie kliniczne. Nowatorskie podejścia w leczeniu bólu ustno-twarzowego obejmują m.in.: modulację aktywności endokannabinoidów poprzez regulację ich syntezy i/lub degradacji, działania mające na celu zwiększenie stężenia endokannabinoidów w CSF, a także próby łączenia potencjału przeciwbólowego tej grupy cząsteczek z opioidami. Celem lepszej charakteryzacji zaangażowania układu endokannabinoidowego i endoopioidowego w przetwarzanie bólu ustno-twarzowego w niniejszej pracy zastosowano model zwierzęcy z wykorzystaniem odruchu trójdzielno-podjęzykowego wywołanego drażnieniem miazgi zębów u szczurów.

W opisanych doświadczeniach z perfuzją komór mózgowych wykazano, że AEA, EM-2 i inhibitor FAAH - URB597 obniżały amplitudę odruchu cofania języka (ETJ). Obserwacja ta sugeruje zaangażowanie zarówno endogennych kanabinoidów (AEA) jak i opioidów (EM-2) w przetwarzanie bólu ustno-twarzowego w tym modelu. Ze względu na fakt, iż elementy łuku odruchowego odruchu trójdzielno-podjęzykowego zlokalizowane są w pobliżu komór mózgowych, można przypuszczać, że substancje te podane i.c.v. przenikały przez wyściółkę komór mózgowych i wywierały wpływ na sąsiednie struktury wywołując efekt przeciwbólowy, co ciekawe, podany dokomorowo 2-AG nie wykazywał znaczącego wpływu na amplitudę ETJ. Może mieć to związek z odmiennym od AEA powinowactwem tego mediatora do receptorów kanbinoidowych i w związku z tym potencjalnie innymi warunkami aktywacji pętli regulacyjnych związanych z 2-AG.

W dalszej części pracy zbadano, czy stymulacja miazgi zębów lub obwodowe podanie URB597 wpłynie na stężenie AEA i 2-AG w strukturach mózgu związanych z przetwarzaniem bólu ustno-twarzowego (śródmózgowiu, wzgórze i podwzgórze). Stwierdzono, że stymulacja miazgi zębów nie miała żadnego wpływu na poziom AEA i 2-AG, natomiast podanie inhibitora URB597 spowodowało istotny wzrost stężenia AEA we wszystkich badanych strukturach.

Wyniki te są zgodne z innymi doniesieniami, wskazującymi, że inhibicja aktywności FAAH za pomocą URB597 zwiększa poziom AEA w mózgu u szczurów i myszy (Kathuria i wsp. 2003, Gobbi i wsp. 2005, Jhaveri i wsp. 2006, Bortolato i wsp. 2007, Greco i wsp. 2020). Z drugiej strony inhibitor URB597 wykazywał znacznie mniejszy wpływ na stężenie 2-AG w badanych strukturach mózgu, co jest najprawdopodobniej związane z różnicami w szlakach katabolizmu tych endokannabinoidów.

Ze względu na fakt, iż ECS może kontrolować uwalnianie mediatorów zaangażowanych w migrenowy ból głowy (Greco i wsp. 2018b, 2020), w badaniu poddano również analizie wpływ stymulacji miazgi zębów i podawanego obwodowo inhibitora FAAH (URB597) na ekspresję mRNA takich mediatorów jak SP, CGRP oraz EM-2 w strukturach mózgu zaangażowanych w przetwarzanie sygnałów bólowych z obszaru ustno-twarzowego. Zaobserwowano, że stymulacja miazgi zębów powodowała znaczny wzrost ekspresji genów SP, CGRP i EM-2 w śródmózgowiu, wzgórzu i podwzgórzu. Natomiast obwodowe podanie URB597 na jedną godzinę przed stymulacją zmniejszało ekspresję tych endogennych neuropeptydów we wszystkich badanych strukturach mózgu w porównaniu do kontroli i do zwierząt poddanych stymulacji. Wyniki te wskazują, że modulacja poziomu endokannabinoidów za pomocą URB597 wywiera działanie nie tylko na ECS ale na wiele szlaków neuroprzekątnictwa w zróżnicowanych obszarach OUN, a związany z podawaniem tego inhibitora efekt przeciwbólowy może mieć bardzo złożony charakter.

Ponieważ skutki biologiczne endokannabinoidów i opioidów związane są z rozmieszczeniem swoistych dla nich receptorów w OUN (Wilson-Poe i wsp. 2013, Devane i wsp. 1988, Price i wsp. 2003, Hossain i wsp. 2020) w badaniu oceniano również wpływ stymulacji miazgi zębów i obwodowego podania URB597 na ekspresję receptorów CB1R i CB2R w śródmózgowiu, wzgórzu i podwzgórzu szczurów. Podczas gdy stymulacja miazgi zębów nie wpływała istotnie na ekspresję CB1R, po podaniu URB597 zaobserwowano wzrost ekspresji tego receptora w każdym z badanych obszarów mózgu. Mogło mieć to związek z zahamowaniem degradacji i w konsekwencji zwiększeniem stężenia AEA w tych strukturach. Obserwacje te sugerują, że przeciwbólowe działanie URB597 związane jest z CB1R, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami o zaangażowaniu tego receptora w odpowiedzi na ból ustno-twarzowy (Woodhams i wsp. 2017) na różnych poziomach szlaku przewodzenia i przetwarzania bodźca nocycyptywnego (Greco i wsp. 2020). Stymulacja miazgi zębów jak i podanie URB597 powodowały obniżenie ekspresji mRNA CB2R jedynie w podwzgórzu. Taka różnica w porównaniu do ekspresji CB1R może być związana ponownie z różnym powinowactwem ligandów endokannabinoidowych w tym AEA do różnych receptorów, ale

również z różnym wpływem aktywacji innych receptorów (TRPV1, PPAR $\gamma$ , GABA $_A$ , GPR55, Adenozyna A3) na ekspresję poszczególnych CBR (Zygmunt i wsp. 2013, Muller i wsp. 2018, O'Sullivan 2016, Katona i wsp. 2001, Bakas i wsp. 2017, Lane i wsp. 2010 i Zhao i Abood 2013). Nie można również wykluczyć różnic w modulacji allosterycznej, która koreluje z funkcjonalnością receptora i lokalizacją anatomiczną (Hojo i wsp. 2008, Navarro i wsp. 2021).

Ponieważ endokannabinoidy wchodzą w interakcje z opioidami powodując wzmacnianie działania przeciwbólowego (Cichewicz 2004, Ibrahim i wsp. 2005, Hojo i wsp. 2008, Bushlin i wsp. 2010), oceniono także wpływ stymulacji miazgi zębów i podania URB597 na ekspresję mRNA MOR w śródmózgowiu, wzgórzu i podwzgórzu. Zaobserwowano, że stymulacja miazgi zębów powodowała wzrost ekspresji mRNA MOR, a podanie URB597 obniżało ekspresję tego receptora we wszystkich badanych strukturach mózgu. Wynik ten ponownie podkreśla wpływ modulacji układu endokannabinoidowego na inne systemy neuroprzekąźnictwa w tym układ endopiodowy.

W dalszej części pracy oceniano wpływ stymulacji miazgi zębów i podania URB597 na uwalnianie endokannabinoidów do CSF oraz korelacje między stężeniem endokannabinoidów, a ekspresją ich receptorów w śródmózgowiu, wzgórzu i podwzgórzu.

Zaobserwowano, że stymulacja nocycetywna i hamowanie aktywności FAAH indukowały zmiany w stężeniu AEA i 2-AG w płynie mózgowo-rdzeniowym. Obwodowe podanie inhibitora URB597 wiązało się z istotnym wzrostem stężenia AEA w CSF, podczas gdy stężenie 2-AG uległo obniżeniu. Natomiast sama stymulacja miazgi zębów nie wpływała na stężenia AEA i 2-AG w CSF.

Wyniki te są zgodne z odmiennymi mechanizmami regulacyjnymi badanych endokannabinoidów. Włókna nerwowe zawierające AEA charakteryzują się szeroką dystrybucją w OUN, docierają m.in. do PAG i RVM, ale główna ich projekcja przebiega wzdłuż komór mózgu, w tym w ścisłym kontakcie z wyściółką trzeciej i czwartej komory (Vígh i Teichmann 1998, Vígh i wsp. 2004, Langlet i wsp. 2014, Zhang i wsp. 2003, Wang i wsp. 2013, Song i Shang 2018; Song i wsp. 2019). Transport AEA do CSF może potencjalnie zachodzić przez wyspecjalizowane komórki wyściółki (tanocyty) trzeciej komory mózgu, jak również za pośrednictwem jądra kontaktującego się z płynem mózgowo-rdzeniowym (CSF-contacting nucleus) (Bjelke i Fuxe 1993, Bolborea i Langlet 2021). Pewna część AEA mogła trafić do CSF także przez narządy okołokomorowe (CVOs), przestrzenie okołonaczyniowe Virchowa-Robbina, a także poprzez BBB (Proescholdt i wsp. 2000). Ze względu na znaną wymianę



między CSF, a płynem zewnątrzkomórkowym mózgu (ECF) należy zakładać, że endogenne kanabinoidy mogą docierać do CSF tą drogą.

W jednym z opublikowanych badań stwierdzono, że ogólnoustrojowe podanie inhibitora URB597 prowadzi do akumulacji AEA w mózgu i przechodzenia tej cząsteczki do CSF bez wpływu na poziomy 2-AG (Fegley i wsp. 2005), co pozostaje w zgodzie z przedstawionymi w tej pracy obserwacjami. Receptory kanabinoidowe CB1R i CB2R odgrywają ważną rolę w utrzymaniu integralności BBB, występują w komórkach śródbłonna naczyń włosowatych mózgu i astrocytach (Hagan i wsp. 2021). Z dostępnych badań wynika, że 2-AG może również aktywować inne receptory, które modyfikują przepuszczalność BBB (tj. receptory CB2R i PPAR $\alpha$ ), co może mieć również związek ze stwierdzonymi różnicami między badanymi endokanabinoidami (Hind i wsp. 2015, Piro i wsp. 2018). Wiadomo też, że endokanabinoidy mają skomplikowane właściwości biologiczne, związane z wieloma zjawiskami w tym mechanizmami transportu, modulacją allosteryczną, aktywacją innych receptorów niż CB2R. Brak wpływu stymulacji gałązek czuciowych nerwu trójdzielnego na zawartość 2-AG w CSF w naszym badaniu można tłumaczyć również tym, że stymulacja bólowa miazgi zębów powoduje uwalnianie z dendrytów znacznych ilości 2-AG do ECF bez podwyższania stężenia 2-AG w CSF. Niekoniecznie oznacza to, że 2-AG uwolnione do ECF nie dociera do komórek mózgowych ale raczej sugeruje, że następuje utrata wielu cząsteczek tego mediatora w długotrwałej drodze do komórek, ponieważ wiąże się on z różnymi receptorami i jest rozkładany przez inne niż dla AEA enzymy. Stymulacja miazgi zębów nie może wywołać depolaryzacji wystarczającej ilości zakończeń włókien nerwowych rozciągających się blisko wyjściółki komórek prawdopodobnie z powodu zbyt małej ilości uwalniania 2-AG z mózgu oraz zróżnicowanej proporcji w rozmieszczeniu receptorów CB2R w mózgowiu.

W następnej serii badań oceniano korelacje między stężeniem endokanabinoidów, a ekspresją receptorów kanabinoidowych w śródmózgowiu, wzgórzu i podwzgórzu. Zaobserwowano statystycznie istotne wysokie korelacje między stężeniem AEA w CSF, a ekspresją mRNA CB1R w śródmózgowiu (*rycina 2 A praca 2*) i podwzgórzu (*rycina 2 B praca 2*), oraz umiarkowaną pozytywną korelację między 2-AG i mRNA CB2R w śródmózgowiu (*rycina 2 E praca 2*). Z drugiej strony, stwierdzono umiarkowaną ujemną korelację między ekspresją AEA i mRNA CB2R we wzgórzu (*rycina 2 C praca 2*), oraz między 2-AG i ekspresją mRNA CB1R w śródmózgowiu (*rycina 2 D praca 2*).

Podsumowując, uzyskane wyniki sugerują, że obwodowe i ośrodkowe hamowanie FAAH przez URB597 wykazuje działanie przeciwbólowe w szczurzym modelu bólu ustno-twarzowego. Efekt ten jest związany ze wzrostem stężenia AEA i ekspresji CB1R w strukturach mózgu związanych z przetwarzaniem bólu ustno-twarzowego. Podobnego związku z efektem przeciwbólowym nie wykazano dla 2-AG pomimo, że cząsteczka ta występuje w wyższych stężeniach w mózgu niż AEA i może stymulować zarówno receptory CB1R jak i CB2R (Della Pietra i wsp. 2021). Wykazano również, że AEA, ale nie 2-AG jest znacznie podwyższony w CSF po obwodowym podaniu inhibitora FAAH. Oprócz wspomnianych wcześniej różnic w powinowactwie do poszczególnych receptorów, może mieć to również związek z niższymi poziomami dostępu 2-AG do presynaptycznych receptorów CB1R, a także różnicami w lokalizacji w stosunku do CB1R enzymów rozkładających 2-AG i AEA. Należy brać pod uwagę również to, że produkcja i synteza AEA i 2-AG może zachodzić w komórce niezależnie i wiązać się z przeciwstawnymi efektami tych enoknabinoidów (Di Marzo 2006, Ahn i wsp. 2008). Istotne jest również to, że profil aktywności enzymów katabilizujących FAAH/MAGL jest inny w poszczególnych strukturach układu nerwowego związanych z bólem ustno-twarzowym. Pomiary wrażliwości na ból głowy po zahamowaniu DAGL sugerują, że zmniejszona sygnalizacja 2-AG w korze i PAG, ale nie w NTC lub TG, promuje inicjację bólu głowy (Levine i wsp. 2020).

Uzyskane wyniki są zgodne z koncepcją, że AEA i 2-AG mogą w sposób niezależny regulować odczuwanie bólu, a związane z nimi mechanizmy regulacyjne mogą być specyficzne dla zastosowanego modelu doświadczalnego (Long i wsp. 2009, Lau i wsp. 2014). Może to w oczywisty sposób komplikować interpretację wyników i wymaga dalszych badań z zastosowaniem różnych protokołów badawczych. Pomimo wskazanych trudności, obserwacje poczynione w ramach tego badania potwierdzają, że obwodowe hamowanie FAAH może stanowić obiecujące podejście terapeutyczne w bólu ustno-twarzowym.

## **7. WNIOSKI**

Przeprowadzone doświadczenia wskazują, że:

1. Endokanabinoidy i endoopioidy biorą udział w przewodzeniu bólu ustno-twarzowego w modelu wykorzystującym ocenę odruchu trójdzielno-podjęzykowego wywołanego drażnieniem miazgi zębów.

2. W modulacji odruchu trójdzielno-podjęzykowego istotną rolę odgrywa migracja mediatorów pomiędzy strukturami mózgowia i płynem mózgowo-rdzeniowym, za czym przemawiają następujące wyniki:
  - a. Podanie badanych mediatorów endokannabinoidowych (AEA) i endopoidowego (EM-2) do płynu mózgowo-rdzeniowego wpływa na nasilenie odruchu trójdzielno-podjęzykowego,
  - b. Występuje dodatnia korelacja między stężeniem AEA w CSF a ekspresją CB1R w mózgowiu, a także między stężeniem 2-AG w CSF a ekspresją CB2R w mózgowiu.
  - c. Hamowanie aktywności FAAH za pomocą inhibitora URB597 wiąże się ze zwiększeniem stężenia AEA w strukturach mózgu i wpływa na uwalnianie AEA do CSF.
3. Obwodowe hamowanie FAAH może być skutecznym środkiem przeciwbólowym w leczeniu bólu ustno-twarzowego.

## **8. SPIS TABEL**

Tabela 1. Endogenne peptydy opioidowe

Tabela 2. Współczynniki korelacji Pearsona i związane z nimi wartości p dla endokannabinoidów (AEA/2-AG) i ekspresji CB1R/CB2R.

## **9. SPIS SCHEMATÓW**

Schemat 1. Schemat syntezy i degradacji A- anandamidu (AEA) i B- 2-arachidonyloglicerolu (2-AG).

Schemat 2. Rozmieszczenie receptotów CB1R w obszarach międzymózgowia i pnia mózgu.

Schemat 3. Rola układu endokannabinoidowego w kontroli bólu na poziomie obwodowym, rdzeniowym i nadrdzeniowym.

Schemat 4. Schematyczne przedstawienie rozmieszczenia CB1R i MOR w mózgu szczura.

Schemat 5. Schemat jąder czuciowych nerwu trójdzielnego.

Schemat 6. Schemat łuku odruchowego odruchu trójdzielno-podjęzykowego.

Schemat 7. Schemat przedstawiający rzuty połączeń śródmózgowia, wzgórza i podwzgórza z jądrem kontaktującym się z płynem mózgowo-rdzeniowym.

Schemat 8. Plan procedur doświadczalnych.

## 10. STRESZCZENIE

Ból ustno-twarzowy ze względu na wysoką częstotliwość występowania i brak skutecznego leczenia stanowi poważny problem zarówno medyczny jak i społeczny. Etiopatogeneza większości dolegliwości bólowych z obszaru ustno-twarzowego nie jest całkowicie wyjaśniona. Dotychczasowe badania sugerują, że układ endoopioidowy (EOS) i endokannabinoidowy (ECS) wywołują silne działanie przeciwbólowe poprzez aktywację odpowiednio receptorów  $\mu$ -opioidowego (MOR) i kanabinoidowego (CB1R). Jednak ich skuteczność jest zmienna w zależności od drogi podania i rodzaju bólu. W wyniku pobudzenia bądź hamowania struktur mózgowia zaangażowanych w przenoszenie i przetwarzanie informacji bólowej stężenie neuroprzekaźników w poszczególnych strukturach ośrodkowego układu nerwowego (OUN) ulega zmianom. Mogą być one również uwalniane do płynu mózgowo-rdzeniowego (cerebro-spinal fluid, CSF) i uczestniczyć w modulacji czynności ośrodków nerwowych położonych w sąsiedztwie komór bocznych mózgu i dna czwartej komory, gdzie znajdują się ośrodki czuciowe i ruchowe odruchu trójdzielno-podjęzykowego.

**Celem pracy** było zbadanie wpływu działania endokannabinoidów (anandamidu, AEA; 2-arachidonyloglicerolu, 2-AG), endoopioidu (endomorfiny-2, EM-2) i inhibitora hydrolazy amidowej kwasów tłuszczowych (fatty acid amide hydrolase, FAAH) URB597 podanego ośrodkowo (i.c.v.) i obwodowo (i.p.) na przetwarzanie bólu ustno-twarzowego wywołanego drażnieniem miazgi zębów u szczurów.

**Metodyka.** W badaniu wykorzystano model doświadczalny bólu ustno-twarzowego oparty na rejestracji amplitudy wywołanych ruchów cofania języka (ETJ) w odpowiedzi na stymulację miazgi zębów. Doświadczenia przeprowadzano na dorosłych szczurach samcach rasy Long-Evans będących w narkozie chloralozowej. Oceniano modulację bodźca bólowego pod wpływem ośrodkowego podania AEA, 2-AG i EM-2, a także ośrodkowego i obwodowego podania inhibitora URB597. Badano ponadto ekspresję mRNA mediatorów: SP, CGRP, EM-2, a także receptorów CB1R, CB2R i MOR w tkankach śródmózgowia, wzgórza i podwzgórza, jak również stężenia cząsteczek AEA i 2-AG w CSF.

Badania przeprowadzano z zastosowaniem metody perfuzji komór mózgowia, testu immunoenzymatycznego ELISA i RT-PCR.

**Wyniki.** W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że zwiększenie poziomu endokannabinoidu AEA w mechanizmie wykorzystującym hamowanie enzymu FAAH przez podawany zarówno ośrodkowo, jak i obwodowo inhibitor URB597 wykazuje działanie przeciwbólowe w zastosowanym modelu doświadczalnym bólu ustno-twarzowego. Efekt ten

wiązał się ze zwiększeniem ekspresji mRNA receptora CB1. Zastosowanie inhibitora URB597 nie wpływało na stężenie 2-AG w badanych strukturach mózgu i powodowało istotny spadek ekspresji mRNA receptora CB2 jedynie w podwzgórzu. Stymulacja miazgi zębów powodowała istotny wzrost ekspresji genów SP, CGRP i EM-2 w śródmózgowiu, wzgórzu i podwzgórzu. Natomiast inhibitor URB597 podany obwodowo godzinę przed stymulacją miazgi zębów obniżał ekspresję mRNA tych endogennych neuroprzekazników w porównaniu zarówno z grupą kontrolną i jak i grupą po stymulacji, we wszystkich badanych strukturach mózgu. W drugiej serii doświadczeń wykazano, że stężenie AEA w CSF, ale nie 2-AG ulega istotnemu wzrostowi po obwodowym podaniu inhibitora FAAH, natomiast stymulacja miazgi zębów nie ma istotnego wpływu na stężenie żadnej z tych cząsteczek w CSF. Wykazano dodatnie korelacje między stężeniem AEA w CSF, a ekspresją CB1R w mózgowiu, i między stężeniem 2-AG w CSF, a ekspresją CB2R w mózgowiu, a także ujemne korelacje między stężeniem AEA w CSF, a ekspresją CB2R w mózgowiu oraz między 2-AG w CSF i ekspresją CB1R w mózgowiu.

### **Wnioski.**

Przeprowadzone doświadczenia wskazują, że:

1. Endokanabinoidy i endopiody biorą udział w przewodzeniu bólu ustno-twarzowego w modelu wykorzystującym ocenę odruchu trójdzielno-podjęzykowego wywołanego drażnieniem miazgi zębów.
2. W modulacji odruchu trójdzielno-podjęzykowego istotną rolę odgrywa migracja mediatorów pomiędzy strukturami mózgowia i płynem mózgowo-rdzeniowym, za czym przemawiają następujące wyniki:
  - a. Podanie badanych mediatorów endokanabinoidowych (AEA) i endopiodowego (EM-2) do płynu mózgowo-rdzeniowego wpływa na nasilenie odruchu trójdzielno-podjęzykowego.
  - b. Występuje dodatnia korelacja między stężeniem AEA w CSF a ekspresją CB1R w mózgowiu, a także między stężeniem 2-AG w CSF a ekspresją CB2R w mózgowiu.
  - c. Hamowanie aktywności FAAH za pomocą inhibitora URB597 wiąże się ze zwiększeniem stężenia AEA w strukturach mózgu i wpływa na uwalnianie AEA do CSF.
3. Obwodowe hamowanie FAAH może być skutecznym środkiem przeciwbólowym w leczeniu bólu ustno-twarzowego.

## 11. ENGLISH SUMMARY

Orofacial pain, due to its high incidence and lack of effective treatment, has been a serious, both medical and social problem. The etiopathogenesis of most orofacial pain has not been elucidated completely. The research results obtained to date suggest that the endogenous opioid (EOS) and endocannabinoid (ECS) systems induce a potent analgesic effects by activation of the  $\mu$ -opioid (MOR) and cannabinoid (CB1R) receptors. However, their effectiveness varies depending on the route of administration and the type of pain. As a result of stimulation or inhibition of brain structures involved in the transmission and processing of nociceptive information, the concentration of neurotransmitters in the individual structures of the central nervous system (CNS) undergoes changes. They can also be released into the cerebrospinal fluid (CSF) and participate in modulating the activity of the nerve centers located in the vicinity of the lateral ventricles of the brain and the fundus of the fourth ventricle, where the sensory and motor centers of the trigemino-hypoglossal reflex are located.

**The aim of the study** was to investigate the effect of endocannabinoids (anandamide, AEA; 2-arachidonylglycerol 2-AG), an endoopioid (endomorphin-2, EM-2) and fatty acid amide hydrolase inhibitor (FAAH) - URB597 administered centrally (i.c.v.) and peripherally (i.p.) on the processing of orofacial pain caused by tooth pulp stimulation in rats.

**Methods.** The study used an experimental model of orofacial pain based on the amplitude of induced tongue retraction movements (evoked tongue jerk, ETJ) in response to tooth pulp stimulation. The experiments were carried out on adult male Long-Evans rats under chloralose anesthesia. Modulation of the pain stimulus under the influence of centrally administered AEA, 2-AG and EM-2, as well as central and peripheral administration of the URB597 was assessed. In addition, mRNA expression of mediators: SP, CGRP, EM-2, as well as CB1R, CB2R and MOR receptors in the midbrain, thalamic and hypothalamic tissues, as well as the concentration of AEA and 2-AG molecules in CSF were studied. The research was carried out using the method of perfusion of the cerebral ventricles, enzyme-linked immunosorbent assay ELISA and RT-PCR.

**Results.** As a result of the conducted research, increasing the level of endocannabinoid AEA in the mechanism using the inhibition of the FAAH enzyme by URB597, administered both centrally and peripherally, was demonstrated to have an analgesic effect in the experimental model of orofacial pain. This effect was associated with an increase in the expression of CB1 receptor mRNA. The use of the URB597 inhibitor did not affect the concentration of 2-AG in the studied brain structures and caused a significant decrease in the expression of CB2 receptor

mRNA only in the hypothalamus. Tooth pulp stimulation resulted in a significant increase in the expression of SP, CGRP and EM-2 genes in the midbrain, thalamus and hypothalamus. In contrast, the URB597 inhibitor administered peripherally one hour before tooth pulp stimulation lowered the mRNA expression of these endogenous neurotransmitters compared to both the control group and the stimulation group in all brain structures studied. In the second series of experiments, the concentration of AEA, but not of 2-AG, in the CSF was shown to undergo a significant increase after peripheral administration of the FAAH inhibitor, while tooth pulp stimulation has no significant effect on the concentration of any of these molecules in the CSF. Positive correlations between AEA concentration in the CSF and CB1R expression in the brain, and between 2-AG concentration in CSF and CB2R expression in the brain, as well as negative correlations between AEA concentration in CSF and CB2R expression in the brain, and between 2-AG in CSF and CB1R expression in the brain have been shown.

## **Conclusions**

The conducted experiments indicate that:

1. Endocannabinoids and endopioids are involved in the transmission of orofacial pain in a model using the assessment of the trigemino-hypoglossal reflex caused by tooth pulp stimulation.
2. The migration of mediators between the brain structures and cerebrospinal fluid plays an important role in the modulation of the trigemino-hypoglossal reflex, which is supported by the following results:
  - a. The studied endocannabinoid (AEA) and endopioid (EM-2) mediators administered into the cerebrospinal fluid penetrate the lining of the cerebral ventricles and act on the trigemino-hypoglossal reflex by direct effect on the neurons of the reflex arc.
  - b. There is a positive correlation between AEA concentration in the CSF and CB1R expression in the brain and between 2-AG in the CSF and CB2R expression in the brain.
  - c. Inhibition of FAAH activity with the URB597 inhibitor is associated with an increase in the concentration of AEA in the brain structures and affects the release of AEA to the CSF.
3. Peripheral inhibition of FAAH may be an effective analgesic in the treatment of orofacial pain.

## 12. PIŚMIENNICTWO

- Abbott, N.J.; Ronnback, L.; Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006, 7, 41–53.
- Ahn, K.; McKinney, M.K.; Cravatt, B.F. Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chem. Rev.* 2008, 108, 1687–1707.
- Al-Hasani, R.; Bruchas, M.R. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-Dependent Signaling and Behavior. *Anesthesiology* 2011, 115(6), 1363-1381.
- Arvisson, K.V.; Gobel, S. An HRP study of central projections of primary trigeminal neurons with innervate tooth pulps in the cat. *Brain Res.* 1981, 210, 1, 16.
- Bagley, E.E.; Ingram, S.L. Endogenous opioid peptides in the descending pain modulatory circuit. *Neuropharmacology* 2020, 172, 108131. doi:10.1016/j.neuropharm.2020.108131
- Bakas, T.; van Nieuwenhuijzen, P.S.; Devenish, S.O.; McGregor, I.S.; Arnold, J.C.; Chebib, M. The direct action of cannabidiol and 2-arachidonoyl glycerol at GABAA receptors. *Pharmacol. Res.* 2017, 119, 358–370.
- Basley, W.L.; Holland, G.R. A quantitative analysis of the innervation of the pulp of the cats canine tooth. *J. Comp. Neurol.* 1978, 178, 487-494.
- Befort, K. Interactions of the opioid and cannabinoid systems in reward: Insights from knockout studies. *Front. Pharmacol.* 2015, 6, 6.
- Benoliel, R.; Sharav, Y. Chronic orofacial pain. *Curr. Pain Headche Rep.* 2010, 14, 33-40.
- Biernacki, M.; Skrzydlewska, E. Metabolism of endocannabinoids. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2016, 70, 830-843.
- Bjelke, B.; Fuxe, K. Intraventricular beta-endorphin accumulates in DARPP-32 immunoreactive tanocytes. *Neuroreport* 1993, 5(3), 265-268.
- Black, P.M. Neuropeptides in cerebrospinal fluid. *Neurosurgery* 1982, 11(4), 550–555
- Bloom, F.; Segal, D. Endorphins in the cerebrospinal fluid. In: *Neurobiology of cerebrospinal fluid*. 1980, Vol. 1 (Wood JH, Ed.). Plenum Press, New York, USA.
- Bolborea, M.; Langlet, F. What is the physiological role of hypothalamic tanocytes in metabolism? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2021, 320, R994-R1003.
- Bouvier, M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter  $\mu$ ,  $\sigma$ ,  $\kappa$ , receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 2001, 2, 274-286.
- Bortolato, M.; Mangieri, R.A.; Fu, J.; Kim, J.H.; Arguello, O.; Duranti, A.; Tontini, A.; Mor, M.; Tarzia, G.; Piomelli, D. Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress. *Biol. Psychiatry* 2007, 62, 1103-1110.



Bridges, D.; Rice, A.S.C.; Egertová, M.; Elphick, M.R.; Winter, J.; Michael, G.J. Localisation of cannabinoid receptor 1 in rat dorsal root ganglion using in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Neuroscience* 2003, 119, 803–812.

Brown, S.P.; Safo, P.K.; Regehr, W.G. Endocannabinoids inhibit transmission at granule cell to Purkinje cell synapses by modulating three types of presynaptic calcium channels. *J. Neurosci.* 2004, 24, 5623–5631.

Bushlin, I.; Rozenfeld, R.; Devi, L.A. Cannabinoid-opioid interactions during neuropathic pain and analgesia. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2010, 10(1), 80–86.

Cabral, G.A.; Marciano-Cabral, F. Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: Immune functional relevance. *J. Leukoc. Biol.* 2005, 78, 1192–1197.

Celik, M.O.; Labuz, D.; Henning, K.; Busch-Dienstferting, M.; Gaveriaux-Ruff, C.; Kieffer, B. i wsp. Leukocyte opioid receptors mediate analgesia via Ca(2+)-regulated release of opioid peptides. *Brain Behav. Immun.* 2016, 57:227–242. doi: 10.1016/j.bbi.2016.04.018.

Chiang, C.Y.; Dostrovsky, J.O.; Iwata, K.; Sessle, B.J. Role of glia in orofacial pain. *Neuroscientist*. 2011, 17(3), 303–320.

Cichewicz, D.L. Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. *Life Sci.* 2004, 74(11), 1317–1324.

Cox, B.M. Recent developments in the study of opioid receptors. *Mol. Pharmacol.* 2013, 83, 723–728. doi: 10.1124/mol.112.083279

Curtis, M.J.; Bond, R.A.; Spina, D.; Ahluwalia, A.; Alexander, S.P.; Giembycz, M.A.; Gilchrist, A.; Hoyer, D.; Insel, P.A.; Izzo, A.A.; Lawrence, A.J.; MacEwan, D.J.; Insel, P.A.; Izzo, A.A.; Lawrence, A.J.; McEwan, D.J.; Moon, D.F.; Wonnacott, S.; Weston, A.H.; McGrath, J.C. Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in *BJP*. *Br. J. Pharmacol.* 2015, 172, 3461–3471.

Daniel, A.R.; Lederis, K. Release of neurohypophysial hormones in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 1967, 190, 171–187.

Della Pietra, A.; Giniatullin, R.; Savinainen, J.R. Distinct activity of endocannabinoid-hydrolyzing enzymes MAGL and FAAH in key regions of peripheral and central nervous system implicated in migraine. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 1204.

Desroches, J.; Beaulieu, P. Opioids and cannabinoids interactions: involvement in pain management. *Curr. Drug Targets* 2010, 11, 462–473.

Devane, W.A.; Dysarz, F.A.; Johnson, M.R.; Melvin, L.S.; Howlett, A.C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 1988, 34, 605–613.

Devane, W.A.; Hanus, L.; Breuer, A.; Pertwee, R.G.; Stevenson, L.A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992, 258, 1946–1949.

Dewey, W.L. Cannabinoid Pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1986, 38(2), 151–178.

Di Marzo, V. Endocannabinoids: Synthesis and Degradation. In *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany 2006, pp. 1–24.

Di Marzo, V.; Bisogno, T.; De Petrocellis, L. Endocannabinoids and Related Compounds: Walking Back and Forth between Plant Natural Products and Animal Physiology. *Chem. Biol.* 2007, 14, 741–756.

Erbs, E.; Faget, L.; Scherrer, G.; Matifas, A.; Filliol, D.; Vonesch, J.L. i wsp. A mu-delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. *Brain Struct. Funct.* 2015, 220 (2), 677–702. doi: 10.1007/s00429-014-0717-9.

Fegley, D.; Gaetani, S.; Duranti, A.; Tontini, A.; Mor, M. Tarzia, G. i wsp. Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester (URB597): effects on anandamide and oleoylethanolamide deactivation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005, 313, 352–358.

Fei, Y.; Wang, X.; Chen, S.; Zhou, X.; Zhang, C.; Li, Y.; Sun, L.; Zhang, L. Role of the RVM in Descending Pain Regulation Originating from the Cerebrospinal Fluid-Contacting Nucleus. *Neurochem. Res.* 2016, 41, 1651–1661.

Fezza, F.; Bari, M.; Florio, R.; Talamonti, E.; Feole, M.; Maccarrone, M. Endocannabinoids, Related Compounds and Their Metabolic Routes. *Molecules.* 2014, 19, 17078–17106.

Fonseca, B.M., Costa, M.A., Almada, A., Correia-da-Silva, G., Teixeira, N.A. Endogenous cannabinoids revisited: a biochemistry perspective, Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2013, 102–103, 13–30.

Gobbi, G.; Bambico, F.R.; Mangieri, R.; Bortolato, M.; Campolongo, P.; Solinas, M.; Cassano, T.; Morgese, M.G.; Debonnel, G.; Duranti, A.; Tontini, A.; Tarzia, G.; Mor, M.; Trezza, V.; Goldberg, S.R.; Cuomo, V.; Piomelli, D. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005, 102, 18620–18625

Greco, R.; Demartini, C.; Zanaboni, A.M.; Piomelli, D.; Tassorelli, C. Endocannabinoid System and Migraine Pain: An Update. *Front. Neurosci.* 2018a, 12, 172.

Greco, R.; Demartini, C.; Zanaboni, A.M.; Berliocchi, L.; Piomelli, D.; Tassorelli, C. Inhibition of monoacylglycerol lipase: Another signalling pathway for potential therapeutic targets in migraine? *Cephalalgia* 2018b, 38, 1138–1147.

Greco, R.; Demartini, C.; Zanaboni, A.M.; Tumelero, E.; Reggiani, A.; Misto, A.; Piomelli, D.; Tassorelli, C. FAAH inhibition as a preventive treatment for migraine: a pre-clinical study. *Neurobiol. Dis.* 2020, 134, 104624.

Greco, R.; Demartini, C.; Zanaboni, A.M.; Casini, I.; de Icco, R.; Reggiani, A.; Misto, A.; Piomelli, D.; Tassorelli, C. Characterization of the peripheral FAAH inhibitor, URB937, in animal models of acute and chronic migraine. *Neurobiol. Dis.* 2021a, 147, 105157.

Greco R, Demartini Ch, Francavilla M, Zanaboni AM, Tassorelli C. Dual Inhibition of FAAH and MAGL Counteracts Migraine-like Pain and Behavior in an Animal Model of Migraine. *Cells* 2021b, 26 10(10), 2543.

Greco, R.; Demartini, Ch.; Zanaboni, A.M.; Francavilla, M.; De Icco, R.; Ahmad, L.; Tassorelli, C. The endocannabinoid system and related lipids as potential targets for the treatment of migraine-related pain. *Headache* 2022, 62, 227-240. DOI: 10.1111/head.14267

Guindon, J.; Hohmann, A.G. The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 2009, 8, 403–421.

Guo, J.; Ikeda, S.R. Endocannabinoids Modulate N-Type Calcium Channels and G-Protein-Coupled Inwardly Rectifying Potassium Channels via CB1 Cannabinoid Receptors Heterologously Expressed in Mammalian Neurons. *Mol. Pharmacol.* 2004, 65, 665–674.

Gupta, A.; Decaillot, F.M.; Devi, L.A. Targeting opioid receptor heterodimers: strategies for screening and drug development. *AAPS J.* 2006, 8, E153-E159.

Hagan, K.; Varelas, P.; Zheng, H. Endocannabinoid System of the Blood-Brain Barrier: Current Understandings and Therapeutic Potentials. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2021, doi: 10.1089/can.2021.0101.

Herkenham, M.; Lynn, A.B.; Little, M.D.; Johnson, M.R.; Melvin, L.S.; De Costa, B.R.; Rice, K.C. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87, 1932–1936.

Hill, R.C.; Peper, C.M.; Mitchell, J.F. The depressant action of iontophoretically applied met-enkephalin on single neurons in rat brain. In: *Opiates and Endogenous Peptides*, ed. By H.W. Kosterlitz, Elsevier/North-Holland, Amsterdam 1976, 225-230.

Hill, K.P.; Palastro, M.D.; Johnson, B.; Ditre, J.W. Cannabis and pain: A clinical review. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2017, 2, 96–14.

Hind, W.H.; Tufarelli, C.; Neophytou, M.; Anderson, S.I.; England, T.J.; O Sullivan, S.E. Endocannabinoids modulate human blood-brain barrier permeability in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 2015, 172, 3015-3027.

Hohmann, A.G.; Suplita, R.L.; Bolton, N.M.; Neely, M.H.; Fegley, D.; Mangieri, R.; Krey, J.F.; Walker, J.M.; Holmes, P.V.; Crystal, J.D.; Duranti, A.; Tontini, A.; Mor, M.; Tarzia, G.; Piomelli, D. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* 2005, 435, 1108–1112.

Hojo, M.; Sudo, Y.; Ando, Y.; Minami, K.; Takada, M.; Matsubara, T.; Kanaide, M.; Taniyama, K.; Sumikawa, K.; Uezono, Y. Mu-opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB1 receptor: Electrophysiological and FRET assay analysis. *J. Pharmacol. Sci.* 2008, 108, 308–319.

Hossain, M.Z.; Ando, H.; Unno, S.; Kitagawa, J. Targeting Peripherally Restricted Cannabinoid Receptor 1, Cannabinoid Receptor 2, and Endocannabinoid-Degrading Enzymes for the

Treatment of Neuropathic Pain Including Neuropathic Orofacial Pain. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 1423.

Hsu, K.L.; Tsuboi, K.; Adibekian, A.; Pugh, H.; Masuda, K.; Cravatt, B.F. DAGLbeta inhibition perturbs a lipid network involved in macrophage inflammatory responses. *Nat. Chem. Biol.* 2012, 8, 999–1007.

Hu, S.; Mackie, K. Distribution of the Endocannabinoid System in the Central Nervous System. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2015, 231, 59–93.

Iannotti, F.A.; Di Marzo, V.; Petrosino, S. Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Prog. Lipid Res.* 2016, 62, 107–128.

IASP. Diagnosis and classification of neuropathic pain epidemiology and impact of neuropathic pain. *Pain Medicine XVIII*, 2010, 1–6

Ibrahim, M.M.; Porreca, F.; Lai, J.; Albrecht, P.J.; Rice, F.L.; Khodorova, A.; Davar, G.; Makriyannis, A.; Vanderah, T.W.; Mata, H.P.; et al. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 3093–3098.

Jackson, I.M.D. Significance and function of neuropeptides in the cerebrospinal fluid, In: *Neurobiology of Cerebrospinal Fluid*. 1980, Vol. 1 (Wood JH, Ed.). Plenum Press, New York, USA, 625–650.

Jacquín, M.F.; Semba, K.; Egger, M.D.; Rhoades, R.W. Organization on HRP-labelled trigeminal mandibular primary afferent neurone in the rat. *J. Comp. Neurol.* 1983, 215, 397–420.

Jain, T.; Wager-Miller, J.; Mackie, K.; Straiker, A. Diacylglycerol lipasealpha (DAGLalpha) and DAGLbeta cooperatively regulate the production of 2-arachidonoyl glycerol in autaptic hippocampal neurons. *Mol. Pharmacol.* 2013, 84, 296–302.

Jhaveri, M.D.; Richardson, D.; Kendall, D.A.; Barrett, D.A.; Chapman, V. Analgesic effects of fatty acid amide hydrolase inhibition in a rat model of neuropathic pain. *J. Neurosci.* 2006, 26, 13318–13327. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3326-06.2006.

Kathuria, S.; Gaetani, S.; Fegley, D.; Valiño, F.; Duranti, A.; Tontini, A.; Mor, M.; Tarzia, G.; La Rana, G.; Calignano, A.; Giustino, A.; Tatoli, M.; Palmery, M.; Cuomo, V.; Piomelli, D. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat. Med.* 2003, 9, 76–81.

Katona, I.; Rancz, E.A.; Acsády, L.; Ledent, C.; Mackie, K.; Hajos, N. Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABA-ergic transmission. *J. Neurosci.* 2001, 21, 9506–9518.

Kieffer, B.L. Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides: receptors for opioid peptides. *Cell Mol Neurobiol.* 1995, 15, 615–635.

- Kilkenny, C.; Browne, W.; Cuthill, I.C.; Emerson, M.; Altman, D.G. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. *Br. J. Pharmacol.* 2010, 160, 1577–1579.
- Lane, J.R.; Beukers, M.W.; Mulder-Krieger, T.; IJzerman, A.P. The endocannabinoid 2-arachidonylglycerol is a negative allosteric modulator of the human A3 adenosine receptor. *Biochem. Pharmacol.* 2010, 79, 48–56.
- Langlet, F. Role of tanycytes within the blood-hypothalamus interface. *Biol. Aujourd'hui.* 2014, 208(3), 225-235. doi: 10.1051/jbio/2014025.
- Lau, B.K.; Vaughan, C.W. Descending modulation of pain: the GABA disinhibition hypothesis of analgesia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2014, 29, 159–164.
- Law, P.Y.; Reggio, P.H.; Loh, H.H. Opioid receptors: toward separation of analgesic from undesirable effects. *Trends Biochem. Sci.* 2013, 38, 275– 282. doi: 10.1016/j.tibs.2013.03.003
- Levine, A.; Liktor-Busa, E.; Karlage, K.L.; Giancotti, L.; Salvemini, D.; Vanderach, T.W.; Largent-Milnes, T.M. DAGL $\alpha$  inhibition as a non-invasive and translational model of episodic headache. *Front. Pharmacol.* 2020, 11, 615028.
- Liddelow, S.A. Fluids and barriers of the CNS: a historical viewpoint. *Fluids Barriers CNS.* 2011, 8 (1), 2. doi: 10.1186/2045-8118-8-2.
- Liu, W.X.; Wang, R. Endomorphins: potential roles and therapeutic indications in the development of opioid peptide analgesic drugs. *Med. Res. Rev.* 2012, 32(3), 536-580. doi: 10.1002/med.20222.
- Liu, H.; Yan, W.W.; Lu, X. X.; Zhang, X. L.; Wei, J.Q.; Wang, X.Y. et al. Role of the cerebrospinal fluid-contacting nucleus in the descending inhibition of spinal pain transmission. *Exp. Neurol.* 2014, 261, 475–485. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.07.018
- Liu, Q.; Fan, W.; He, H.; Huang, F. The role of peripheral opioid receptors in orofacial pain. *Oral Dis.* 2021, 27(5), 1106-1114. doi: 10.1111/odi.13435.
- Long, J.Z.; Normura, D.K.; Cravatt, B.F. Characterization of monoacylglycerol lipase inhibition reveals differences in central and peripheral endocannabinoid metabolism. *Chem. Biol.* 2009, 16, 744–753.
- Lau, B.K.; Drew, G.M.; Mitchell, V.A.; Vaughan, C.W. Endocannabinoid modulation by FAAH and monoacylglycerol lipase within the analgesic circuitry of the periaqueductal grey. *Br. J. Pharmacol.* 2014, 171, 5225–5236.
- Maccarrone, M. Metabolism of the Endocannabinoid Anandamide: Open Questions after 25 Years. *Front Mol. Neurosci.* 2017, 29, 10, 166. doi: 10.3389/fnmol.2017.00166.
- Mackie, K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2005, 168, 299-325. doi: 10.1007/3-540-26573-2-10.

- Madland, G.; Feinmann, C. Chronic facial pain: a multidisciplinary problem. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2001, 71(6), 716-719. doi: 10.1136/jnnp.71.6.716
- MacMillan, S.J.A.; Mark, M.A.; Duggan, A.W. The release of  $\beta$ -endorphin and the neuropeptide-receptor mismatch in the brain. *Brain Res.* 1998, 794, 1, 127-136.
- Martin-Schild, S.; Gerall, A.A.; Kastin, A.J.; Zadina, J.E. Endomorphin-2 is an endogenous opioid in primary sensory afferent fibers. *Peptides* 1998, 19 (10), 1783-1789. doi: 10.1016/s0196-9781(98)00136-3.
- Matsuda, L.A.; Lolait, S.J.; Brownstein, M.J.; Young, A.C.; Bonner, T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 1990, 346(6284), 561-564. doi: 10.1038/346561a0.
- McGrath, J.C.; Lilley, E. Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): New requirements for publication in BJP. *Br. J. Pharmacol.* 2015, 172, 3189–3193.
- Melis, M.; Di Giosia, M.; Colloca, L. Ancillary factors in the treatment of orofacial pain: A topical narrative review. *J. Oral Rehabil.* 2019, 46(2), 200-207. doi: 10.1111/joor.12736.
- Mollica, A.; Pelliccia, S.; Famiglini, V.; Stefanucci, A.; Macedonio, G.; Chiavaroli, A.; Orlando, G.; Brunetti, L.; Ferrante, C.; Pieretti, S. et al. Exploring the first Rimonabant analog-opioid peptide hybrid compound, as bivalent ligand for CB1 and opioid receptors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2017, 32(1), 444-451. doi: 10.1080/14756366.2016.1260565.
- Morales, P.; Reggio, P.H. An update on non-CB 1, non-CB 2 cannabinoid related G-protein-coupled receptors. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2017, 2, 265–273.
- Mousa, S.A.; Machelska, H.; Schafer, M.; Stein, C. Co-expression of beta-endorphin with adhesion molecules in a model of inflammatory pain. *J. Neuroimmunol.* 2000, 108, 160–170. doi: 10.1016/s0165-5728(00)00284-8
- Muccioli, G.G. Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discov. Today* 2010, 15, 474–483.
- Muller, C.; Morales, P.; Reggio, P. Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. *Front. Mol. Neurosci.* 2018, 11, 487.
- Munro, S.; Thomas, K.L.; Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 1993, 365, 61–65. doi: 10.1038/365061a0.
- Murataeva, N.; Straiker, A.; MacKie, K. Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *Br. J. Pharmacol.* 2014, 171, 1379–1391.
- Nadal, X.; La Porta, C.; Bura, A.; Maldonado, R. Involvement of the opioid and cannabinoid systems in pain control: new insights from knockout studies. *Eur. J. Pharmacol.* 2013, 716 (1-3), 142-157. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.01.077

Nakane, S.; Oka, S.; Arai, S.; Waku, K.; Ishima, Y.; Tokumura, A.; Sugiura, T. 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphate, an arachidonic acid-containing lysophosphatidic acid: Occurrence and rapid enzymatic conversion to 2-arachidonoyl-sn-glycerol, a cannabinoid receptor ligand, in rat brain. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002, 402, 51–58.

Navarro, G.; Gonzalez, A.; Sánchez-Morales, A.; Casajuana-Martin, N.; Gómez-Ventura, M.; Cordomí, A.; Busqué, F.; Alibés, R.; Pardo, L.; Franco, R.J. Design of negative and positive allosteric modulators of the cannabinoid CB2 receptor derived from the natural product cannabidiol. *Med. Chem.* 2021, 64, 9354–9364.

Nozaki, C.; Markert, A.; Zimmer, A. Inhibition of FAAH reduces nitroglycerin-induced migraine-like pain and trigeminal neuronal hyperactivity in mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2015, 25, 1388–1396.

Olszewski, J. On the anatomical and functional organization of spinal trigeminal nucleus. *J. Comp. Neurol.* 1950, 92, 401–413.

Onaivi, E.S.; Ishiguro, H.; Gong, J.P.; Patel, S.; Perchuk, A.; Meozzi, P.A. i wsp. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2006, 1074:514-36. doi: 10.1196/annals.1369.052.

O’Sullivan, S.E. An update on PPAR activation by cannabinoids. *Br. J. Pharmacol.* 2016, 173, 1899–1910.

Ozdemir, E. The role of the cannabinoid system in opioid analgesia and tolerance. *Mini Rev. Med. Chem.* 2020, 20(10), 875-885.

Pigg, M.; Nixdorf, D.R.; Law, A.S.; Renton, T.; Sharav, Y.; Baad-Hansen, L.; List, T. New International Classification of Orofacial Pain: What Is in It For Endodontists? . *J. Endod.* 2021, 47, 345–357.

Piomelli, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003, 4, 873–884.

Piro, J.R.; Suidan, G.L.; Quan, J.; Pi, Y.; O’Neill, S.M.; Ilardi, M.; Pozdynaykow, N.; Lanz, T.; Xi, H.; Bell, R.; Samad, T. Inhibition of 2-AG hydrolysis differentially regulates blood brain barrier permeability after injury. *J. Neuroinflammation.* 2018, 15, 1–142.

Price, T.J.; Helesic, G.; Parghi, D.; Hargreaves, K.M.; Flores, C.M. The neuronal distribution of cannabinoid receptor type 1 in the trigeminal ganglion of the rat. *Neuroscience* 2003, 120, 155-162.

Proescholdt, M.G.; Hutto, B.; Brady, L.S.; Harkenham, M. Studies of cerebrospinal fluid flow and penetration into brain following lateral ventricle and cisterna magna injections of the tracer [14C]inulin in rat. *Neuroscience* 1999, 95, 577-592.

Radwan, M.M.; ElSohly, M.A.; Slade, D.; Ahmed, S.A.; Khan, I.A.; Ross, S.A. Biologically active cannabinoids from high-potency Cannabis sativa. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 906–911.

Rotpenpian, N; Yakkaphan, P. Review of Literatures: Physiology of Orofacial Pain in Dentistry. *ENEURO* 2021, 8(2), 0535-20.2021, 1–7.

Russo, E. Clinical endocannabinoid deficiency (CECD): Can this concept explain therapeutic benefits of cannabis in migraine, fibromyalgia, irritable bowel syndrome and other treatment-resistant conditions? *Neuro. Endocrinol. Lett.* 2008, 29, 192–200.

Salio, C.; Fischer, J.; Franzoni, M.F.; Mackie, K.; Kaneko, T.; Conrath, M. CB1-cannabinoid and mu-opioid receptor co-localization on postsynaptic target in the rat dorsal horn. *Neuroreport*. 2001, 12(17), 3689-3692. Doi. 10.1097/00001756-200112040-00017.

Sarchielli, P.; Pini, L.A.; Coppola, F.; Rossi, C.; Baldi, A.; Mancini, M.L.; Calabresi, P. Endocannabinoids in chronic migraine: CSF findings suggest a system failure. *Neuropsychopharmacology* 2007, 32, 1384–1390.

Savinainen J.R., Saario S.M., Laitinen J.T. The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors. *Acta Physiol.* 2011, 204, 267–276.

Schubart, C.D.; Sommer, I.; van Gastel, W.; Goetgebuer, R.L.; Kahn, R.S.; Boks, M.P. Cannabis with high cannabidiol content is associated with fewer psychotic experiences. *Schizphr. Res.* 2011, 130 (1-3), 216-221.

Seesle, B.J. Chronic Orofacial Pain: Models, Mechanisms, and Genetic and Related Environmental Influences. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 7112.

Shinoda, H.; Marini, A.M.; Cosi, C.; Schwartz, J.P. Brain region and gene specificity of neuropeptide gene expression in cultured astrocytes. *Science* 1989, 245, 415–417. doi: 10.1126/science.2569236

Song, S.Y.; Zhang, L.C. The establishment of a CSF-contacting nucleus “knockout” model animal. *Front. Neuroanat.* 2018, 12, 22.

Song, S.Y.; Li, Y.H.; Bao, C.Y.; Li, Y.; Yin, P.C.; Hong, J.; Li, W.-L.; Shi, Y.; Zhang, L.-C. Stereotaxic coordinates and morphological characterization of a unique nucleus (CSF-contacting nucleus) in rat. *Front. Neuroanat.* 2019, 13, 47.

Song, S.Y.; Li, Y.; Zhai, X.M.; Li, Y.; Bao, C.Y.; Shan, C.; Hong, J.; Cao, J.; Zhang, L. Monosynaptic Input Mapping of Diencephalic Projections to the Cerebrospinal Fluid-Contacting Nucleus in the Rat. *Front. Neuroanat.* 2020, 14, 7.

Spiller, K.J.; Bi, G.; He, Y.; Galaj, E.; Gardner, E.L.; Xi, Z.X. Cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptor mechanisms underlie cannabis reward and aversion in rats. *Br. J. Pharmacol.* 2019, 176 (9), 1268–1281. doi: 10.1111/bph.14625

Tietz, S.; Engelhardt, B. Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *J. Cell Biol.* 2015, 209, 493–506.

Torrecilla, M.; Quillinan, N.; Williams, J.T.; Wickman, K. Pre- and postsynaptic regulation of locus coeruleus neurons after chronic morphine treatment: A study of GIRK-knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 2008, 28, 618–624.



Vendel, E.; de Lange, E.C.M. Functions of the CB1 and CB 2 receptors in neuroprotection at the level of the blood-brain barrier. *Neuromolecular Med.* 2014, 16, 620–642.

Viganò, D.; Rubino, T.; Parolaro, D. Molecular and cellular basis of cannabinoid and opioid interactions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2005, 81(2), 360–368.

Vigh, B.; Vigh-Teichmann, I. Actual problems of the cerebrospinal fluid-contacting neurons. *Microsc. Res. Tech.* 1998, 41, 57–83.

Vigh, B.; Manzanoe-Silva, M. J.; Frank, C. L.; Vincze, C.; Czirok, S. J.; Szabo, A.; et al. The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. it's supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain. *Histol. Histopathol.* 2004, 19, 607–628.

Wang, C.G.; Ding, Y.L.; Zheng, T.F.; Wei, J.Q.; Liu, H.; Chen, Y.F.; Wang, J.Y.; Zhang, L.C. Extracellular signal-regulated kinase 5 in the cerebrospinal fluid-contacting nucleus contributes to morphine physical dependence in rats. *J. Mol. Neurosci.* 2013, 50, 215–220.

Waung, M.W.; Margolis, E.B.; Charbit, A.R.; Fields, H.L. A Midbrain Circuit that Mediates Headache Aversiveness in Rats. *Cell Rep.* 2019, 28, 2739–2747 e2734.

Wei, E.Q.; Kudo, T.; Inoki, R. Subcellular distribution of enkephalin precursor proteins in rat dental pulp and the usefulness as a substrate for enkephalin-producing enzymes. *Life Sci.* 1991, 48, 667–674. doi: 10.1016/0024-3205(91)90542-j

Williams, A.C.; Craig, K.D. Updating the definition of pain. *Pain* 2016, 157(11), 2420–2423. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000613.

Wilson-Poea, A.R.; Morgana, M.M.; Aicher, S.A.; Hegarty, D.M. Distribution of CB1 Cannabinoid Receptors and Their Relationship with Mu-Opioid Receptors in the Rat Periaqueductal Gray. *Neuroscience* 2012, 213, 191–200.

Wilson-Poe, A.; Pocius, E.; Herschbach, M.; Morgan, M.M. The periaqueductal gray contributes to bidirectional enhancement of antinociception between morphine and cannabinoids. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2013, 103, 444–449.

Wooda, A.; Azerad, J.; Albe-Fassard, D. Mapping of the trigeminal sensory complex of the cat. Characterization of its neurons by stimulations of peripheral field, dental pulp afferents and thalamic projections. *J. Physiol.* 1977, (Paris), 73, 367–378.

Woodhams, S.G.; Chapman, V.; Finn, D.P.; Hohmann, A.G.; Neugebauer, V. The cannabinoid system and pain. *Neuropharmacology* 2017, 124, 105–120.

Wu, Y.H.; Song, S.Y.; Liu, H.; Xing, D.; Wang, X.; Fei, Y. et al. Role of adrenomedullin in the cerebrospinal fluid-contacting nucleus in the modulation of immobilization stress. *Neuropeptides* 2015, 51, 43–54. doi: 10.1016/j.npep.2015.03.007

Xing, D.; Wu, Y.; Li, G.; Song, S.; Liu, Y.; Liu, H. et al. Role of cerebrospinal fluid-contacting nucleus in sodium sensing and sodium appetite. *Physiol. Behav.* 2015, 147, 291–299. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.04.034

- Xu, C.; Zhao, Z.J.; Wu, T.T.; Zhang, L.C. Distribution of TRPV1 in CSF contacting nucleus of rat brain parenchyma and its expression in neuropathic pain. *J. Neurol. Neurophysiol.* 2011, 2, 1–6.
- Zadina, J.E.; Hackler, L.; Ge, L.J.; Kastin, A.J. A potent and selective endogenous agonist for the  $\mu$ -opiate receptor. *Nature* 1997, 386, 499–502.
- Zhao, P.; Abood, M. GPR55 and GPR35 and their relationship to cannabinoid and lysophospholipid receptors. *Curr. Pain Headache Rep.* 2013, 92, 453–457.
- Zhang, L.C.; Zeng, Y.M.; Ting, J.; Cao, J.P.; Wang, M.S. The distributions and signaling directions of the cerebrospinal fluid contacting neurons in the parenchyma of a rat brain. *Brain Res.* 2003, 989, 1–8.
- Zhou, Q.Q.; Chen, S.S.; Zhang, Q.Q.; Liu, P.F.; Fang, H.Z.; Yang, Y. et al. Cerebrospinal fluid-contacting nucleus mediates nociception via release of fractalkine. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2017, 50, e6275. doi: 10.1590/1414-431x20176275.
- Zou, S.; Kumar, U. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 833.
- Zygmunt, P.M.; Ermund, A.; Movahed, P.; Andersson, D.A.; Simonsen, C.; Jönsson, B.A.; Blomgren, A.; Birnir, B.; Bevan, S.; Eschalier, A.; Mallet, C.; Gomis, A.; Högestätt, E.D. Monoacylglycerols activate TRPV1- a link between phospholipase C and TRPV1. *PLoS One*, 2013, 8, e81618.
- Zuardi, A.W. History of cannabis as a medicine: A review. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 2006, 28, 153–157.
- Zubrzycka, M.; Janecka, A.; Koziolkiewicz, W.; Traczyk, W.Z. Inhibition of tongue reflex in rats by tooth pulp stimulation during cerebral ventricle perfusion with (6-11) substance P analogs. *Brain Res.* 1997, 753, 128–132.
- Zubrzycka, M.; Szemraj, J.; Janecka, A. Effect of tooth pulp and periaqueductal central gray stimulation on the expression of genes encoding the selected neuropeptides and opioid receptors in the mesencephalon, hypothalamus and thalamus in rats. *Brain Res.* 2011, 1382, 19–22.
- Zubrzycki, M.; Janecka, A.; Liebold, A.; Ziegler, M.; Zubrzycka, M. Effects of centrally administered endocannabinoids and opioids on orofacial pain perception in rats. *Br. J. Pharmacol.* 2017, 174, 3780–3789.
- Zubrzycki, M.; Stasiolek, M.; Zubrzycka, M. Opioid and endocannabinoid system in orofacial pain. *Physiol. Res.* 2019, 68, 705–715.

### 13. SPIS PUBLIKACJI POZA DOKTOREM

#### Publikacje pełnotekstowe opublikowane przed rozpoczęciem przewodu doktorskiego

**Zubrzycki M**, Liebold A, Janecka A, Zubrzycka M. A new face of endocannabinoids in pharmacotherapy. Part I: Protective role of endocannabinoids in hypertension and myocardial infarction. *J. Physiol. Pharmacol.* 2014, 65, 2:171-181. IF=2,386

**Zubrzycki M**, Liebold A, Janecka A, Zubrzycka M. A new face of endocannabinoids in pharmacotherapy. Part II: Role of endocannabinoids in inflammation-derived cardiovascular diseases. *J. Physiol. Pharmacol.* 2014, 65, 2:183-191. IF=2,386

Zubrzycka A, **Zubrzycki M**, Janecka A, Zubrzycka M. New horizons in the etiopathogenesis and non-invasive diagnosis of endometriosis. *Curr. Mol. Med.* 2015, 15(8):697-713. IF=2,912

**Zubrzycki M**, Janecka A, Zubrzycka M. Trigemino-hypoglossal somatic reflex in the pharmacological studies of nociception in orofacial area. *Acta Neurobiol. Exper.* 2015, 75, (3):1-11. IF=1,708

**Zubrzycki M**, Liebold A, Ziegler M, Zubrzycka M. Effects of centrally administered endocannabinoids and opioids on orofacial pain perception in rats. *Br. J. Pharmacol.* 2017, 174(21):3780-3789. IF=6,81

**Zubrzycki M**, Liebold A, Skrabal C, Reinelt H, Ziegler M, Perdas E, Zubrzycka M. Assessment and pathophysiology of pain in cardiac surgery. *J. Pain Res.* 2018, 11:1599-1611. IF=2,236.

Zubrzycka A, **Zubrzycki M**, Perdas E, Zubrzycka M. Genetic, Epigenetic, and Steroidogenic Modulation Mechanisms in Endometriosis. *J. Clin. Med.* 2020, 9:1309. IF=4,242