

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 μ -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 trójdzielnopodjęzykowego.

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 przeprowadzono 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 przeprowadzono 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 endopioidy 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 endopioidowych (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.

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 μ -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.