



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ
ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ CB2 ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ
ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ
ΣΕ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΑΝΤΑΜΟΙΒΗΣ**

**Contribution of CB2 cannabinoid
receptors in reward processes**

Νικολάου Κατερίνα
Α.Μ. 1080133

Επιβλέπων Καθηγητής:
Παναγής Γεώργιος

*Εργαστήριο Νευροεπιστημών και Συμπεριφοράς, Τμήμα Ψυχολογίας,
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ρέθυμνο*

Τριμελής Επιτροπή:

Παναγής Γεώργιος, Καθηγητής Βιοψυχολογίας

Καστελλάκης Ανδρέας, Αναπληρωτής Καθηγητής Ψυχοφυσιολογίας

Θερμού Κυριακή, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Στον πατέρα μου

“I have spent the better part of my life decoding the mysteries that lie within this incredible plant. The collective work on the plant has now led to the identification of a major physiological system, the endocannabinoid system, which seems to be involved in many human diseases. I look forward to seeing my peers continue on with their research, further advancing the acceptance and integration of cannabinoids, in particular cannabidiol, its derivatives and specific CB2 agonists, into traditional medicine.”

*Dr. Mechoulam**

* In 1963 Dr. Mechoulam elucidated the structure of cannabidiol (CBD), one of the most medically relevant compounds found in cannabis. Shortly thereafter, he isolated and elucidated the structure of the active component of cannabis, tetrahydrocannabinol (THC) in 1964. Almost 3 decades later, in 1992 and 1995, he isolated and identified the endogenous cannabinoids, anandamide and 2-AG, which together with specific receptors form the endocannabinoid system – a major endogenous biochemical system found in the brain and periphery that is involved in a wide range of physiological functions.

ΣΥΝΟΨΗ

Μελέτες των τελευταίων χρόνων έχουν αναδείξει το σημαντικό ρόλο των CB₂ υποδοχέων των κανναβινοειδών (CB₂Rs) σε διεργασίες κινητοποίησης και ανταμοιβής. Η παρούσα εργασία εστιάζει στη διερεύνηση της εμπλοκής των CB₂Rs στο σύστημα ανταμοιβής, το οποίο διαμεσολαβεί για τις ενισχυτικές δράσεις εθιστικών ουσιών, όπως της κοκαΐνης, και στην περαιτέρω ενίσχυση της εικόνας του συστήματος των ενδογενών κανναβινοειδών ως φαρμακευτικού στόχου για την ανάπτυξη θεραπειών για τον εθισμό σε ουσίες.

Σκοπός της εργασίας υπήρξε η διερεύνηση της δράσης του αγωνιστή των CB₂Rs, JWH-133, στις ενισχυτικές δράσεις της κοκαΐνης. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν ενδοεγκεφαλικές μικροεγχύσεις του αγωνιστή στην περιοχή του κοιλιακού καλυπτρικού πεδίου (VTA) και μελετήθηκε η επίδρασή του στην ενίσχυση του εγκεφαλικού ερεθισμού. Για να ελέγξουμε την ειδικότητα των CB₂ υποδοχέων στις δράσεις που παρατηρήθηκαν σε δεύτερη σειρά πειραμάτων ελέγχθηκε η αντιστροφή των δράσεων του JWH-133 με την προχορήγηση του ανταγωνιστή των CB₂ υποδοχέων, SR144528.

Η μελέτη της δράσης του JWH-133 στην ενισχυτική δράση της κοκαΐνης και η αναστολή των επιδράσεών του από τον SR144528 πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου μετατόπισης της καμπύλης του προτύπου του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, μικροέγχυση του JWH-133 στο κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση στην ενισχυτική δράση της κοκαΐνης. Ειδικότερα, η παρούσα έρευνα έδειξε πως η επίδραση του JWH-133 στην ενισχυτική δράση της κοκαΐνης διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση των CB₂ υποδοχέων του κοιλιακού καλυπτρικού πεδίου, καθότι η προχορήγηση του SR144528 είχε ως αποτέλεσμα την αναστροφή της δράσης του JWH-133.

Οι CB₂Rs παρουσιάζουν εξαιρετικό ερευνητικό ενδιαφέρον για τη μελέτη του ρόλου τους στον εθισμό σε ουσίες και στην ενδεχόμενη φαρμακοθεραπευτικής αντιμετώπισής του.

ABSTRACT

Early studies in the existing literature suggest that CB₂ cannabinoid receptors (CB₂Rs) play a major role in modulating motivation and reward processes. This Master's research is focused on understanding CB₂Rs' implication in brain-reward systems responsible for the expression of reinforcing properties of drugs of abuse, such as cocaine, and providing further evidence that the endocannabinoid system could be explored as a potential drug discovery target for the treatment of drug addiction and reward-dysfunction-related disorders.

The aim of this study was to examine the effects of JWH133, a potent CB₂R agonist, on the systemic cocaine-induced potentiation of brain-stimulation reward using the intracranial self-stimulation (ICSS) paradigm. Therefore, we investigated the effects of local administration of JWH-133 into the ventral tegmental area (VTA) on the rewarding efficacy of cocaine. In order to verify the specificity of CB₂R's implication, reversal of JWH-133 effects was investigated by pre-treatment with the CB₂R antagonist SR144528. Thus, the effects of the different drugs used on the rewarding efficacy of self-stimulation were inferred using the curve-shift intracranial self-stimulation paradigm.

Our study indicates that intra-VTA administration of JWH-133 was able to affect the reward-facilitating effect of cocaine and that these effects were blocked by pre-administration of SR144528, suggesting CB₂R-mediated effects.

These findings support a common conclusion that CB₂Rs may constitute new targets in medication development for treatment of substance abuse and addiction.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
<hr/>	
1. ΕΝΔΟΓΕΝΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ	3
1.1 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ	6
1.1.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ CB ₁ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ	11
1.1.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ CB ₂ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ	15
1.2 ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ	21
1.2.1 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ	22
1.2.2 ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ	23
2. ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ	24
2.1 ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΟΥ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΟΥΣ JWH-133	26
2.1.1 JWH-133 ΚΑΙ ΚΟΚΑΙΝΗ	26
B. ΣΚΟΠΟΣ	27
<hr/>	
Γ. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	28
<hr/>	
1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ	28
2. ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΕΣ ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ	28
3. ΠΡΟΤΥΠΟ ΕΝΔΟΚΡΑΝΙΑΚΟΥ ΑΥΤΟΕΡΕΘΙΣΜΟΥ	31
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΤΟΥ ΕΡΕΘΙΣΜΟΥ	31
5. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ ΣΤΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΕΝΔΟΚΡΑΝΙΑΚΟΥ ΑΥΤΟΕΡΕΘΙΣΜΟΥ	32
6. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	34
7. Η ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ	34
8. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ ΣΗΜΕΙΩΝ ΕΜΦΥΤΕΥΣΕΩΣ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟΥ ΚΑΙ ΟΔΗΓΩΝ ΚΑΝΟΥΛΑΣ	36
9. ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΧΟΡΗΓΗΣΕΙΣ	37
10. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	38

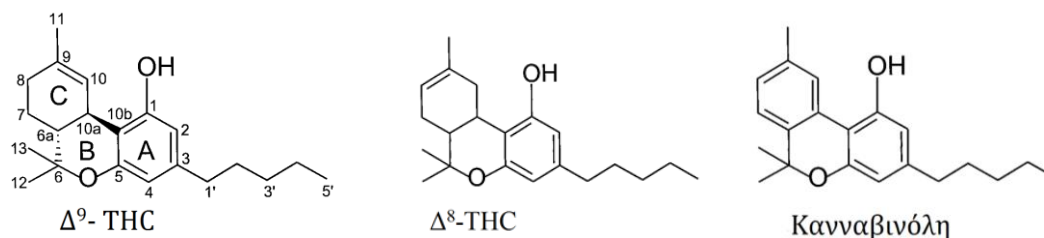
4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΙΚΡΟΕΓΧΥΣΗΣ ΤΟΥ JWH-133 ΣΤΟ ΚΟΙΛΙΑΚΟ ΚΑΛΥΠΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ ΣΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΟΚΑΙΝΗΣ	38
4.2 ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΣΤΡΟΦΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΙΚΡΟΕΓΧΥΣΗΣ ΤΟΥ JWH-133 ΣΤΟ ΚΟΙΛΙΑΚΟ ΚΑΛΥΠΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ ΣΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΟΚΑΙΝΗΣ ΜΕ ΤΟΝ SR144528	39
<i>Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</i>	40
<hr/>	
1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΙΚΡΟΕΓΧΥΣΗΣ ΤΟΥ JWH-133 ΣΤΟ ΚΟΙΛΙΑΚΟ ΚΑΛΥΠΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ ΣΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΟΚΑΙΝΗΣ	40
2. ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΣΤΡΟΦΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΙΚΡΟΕΓΧΥΣΗΣ ΤΟΥ JWH-133 ΣΤΟ ΚΟΙΛΙΑΚΟ ΚΑΛΥΠΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ ΣΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΟΚΑΙΝΗΣ ΜΕ ΤΟΝ SR144528	41
<i>Ε. ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</i>	45
<hr/>	
<i>ΣΤ. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</i>	48
<hr/>	
<i>Ζ. ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ</i>	49
<hr/>	
<i>Η. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ</i>	51
<hr/>	

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αναμέτρηση μεταξύ θηρευτή και θηράματος αποτελούσε ανέκαθεν την κινητήρια δύναμη των βασικών εξελικτικών μηχανισμών. Τα περισσότερα φυτά, επί παραδείγματι, έχουν αναπτύξει ένα ειδικό ρεπερτόριο χημικών μορίων το οποίο τα καθιστά ακατάλληλα για κατανάλωση. Σε περίπτωση βρώσης τους, ορισμένα χημικά μόρια είναι ικανά να διαταράξουν ενδογενή σηματοδοτικά μονοπάτια του εγκεφάλου προκαλώντας αλλαγές στη συμπεριφορά. Οι Katona και Freund υποστηρίζουν πώς τέτοιου είδους εξελικτικές διεργασίες ήταν αρκετά ισχυρές ώστε να δρομολογηθούν αγωνιστές ή ανταγωνιστές υποδοχέων με εξαιρετική ισχύ και ειδικότητα (Katona & Freund, 2012).

Αυτή η πολύτιμη φυσική συλλογή υπηρέτησε την παραδοσιακή ιατρική από τους προϊστορικούς χρόνους: υπάρχουν αρχαιολογικές ενδείξεις της θεραπευτικής τους χρήσης που χρονολογούνται πριν από τουλάχιστον 10.000 χρόνια. Τις τελευταίες δεκαετίες, η επιστήμη εστιάζει την έρευνα στη νευροβιολογική πτυχή του θέματος, μελετώντας μηχανισμούς δράσης και ενδογενή σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται και προσδίδουν στα χημικά αυτά μόρια την ικανότητα επίδρασης στη συμπεριφορά (Prisinzano, 2009).

Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα είναι το φυτό της κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) και η ανακάλυψη ενός ενδογενούς συστήματος κανναβινοειδών στα ζώα και στον άνθρωπο. Το φυτό *Cannabis sativa* συνθέτει μια πληθώρα χημικών συστατικών, μεταξύ των οποίων τα κανναβινοειδή, μια μοναδική και ετερογενή ομάδα ενώσεων φαινολικών τερπενίων τα οποία έχουν την ικανότητα πρόσδεσης στους υποδοχείς του ενδογενούς συστήματος των κανναβινοειδών. Επακόλουθο της ανάπτυξης συνθετικών αναλόγων των κανναβινοειδών και της ανακάλυψης ενδογενών ενώσεων με ικανότητα πρόσδεσης στους υποδοχείς κανναβινοειδών ήταν η επικράτηση του όρου «φυτοκανναβινοειδή» αναφορικά με τα παραπάνω συστατικά του φυτού της κάνναβης (βλ. **Εικόνα1**).



Εικόνα 1

Η δομή τριών συστατικών της κάνναβης: Δ⁹-THC, Δ⁸-THC και Κανναβινόλη (Howlett et al., 2002).

Συνοπτικά, τα κανναβινοειδή συμπεριλαμβάνουν τα ενδογενή κανναβινοειδή, που παράγονται από τον ίδιο τον οργανισμό, τα εξωγενή κανναβινοειδή ή φυτοκανναβινοειδή, που συντίθενται από το φυτό *Cannabis sativa*, και τα συνθετικά κανναβινοειδή.

Παρά την κοινή πρόσδεσή τους στους υποδοχείς κανναβινοειδών, τα κανναβινοειδή παρουσιάζουν μεγάλη στερεοχημική ετερογένεια. Κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις ομάδες σύμφωνα με τη χημική τους δομή: κλασικά, μη κλασικά, αμινοαλκυλοινδόλες και εικοσανοειδή (Howlett et al., 2002; Pertwee, 2005).

Εν συντομία, στην ομάδα των κλασικών αγωνιστών των υποδοχέων των κανναβινοειδών ανήκουν τα φυτοκανναβινοειδή (π.χ. Δ⁹- τετραυδροκανναβινόλη, κανναβινόλη) και τα συνθετικά τους ανάλογα. Στην ομάδα των εικοσανοειδών, ανήκουν κυρίως τα ενδογενή κανναβινοειδή. Αντιπροσωπευτικά ενδογενή κανναβινοειδή είναι το αραχιδονυλαιθανολαμίδιο ή ανανδαμίδιο (αγγλ. Anandamide, AEA), η βιροδαμίνη (αγγλ. Virodhamine, O-arachidonoyl-ethanolamine, OAE), η 2-αραχιδονυλογλυκερόλη (αγγλ. Arachidonoylglycerol, 2-AG), καθώς και μερικά συνθετικά ανάλογα της AEA. Οι δυο άλλες ομάδες, οι μη κλασικοί αγωνιστές των υποδοχέων των κανναβινοειδών και οι αμινοαλκυλοινδόλες, αποτελούνται από συνθετικά κανναβινοειδή (βλ. **Εικόνα 2**).

Κλασικοί	Εικοσανοειδή	Μη κλασικοί	Αμινοαλκυλοινδόλες
<u>Φυτοκανναβινοειδή:</u>	<u>Ενδογενή κανναβινοειδή:</u>	<u>Δικυκλικά/ τρικυκλικά ανάλογα της Δ⁹- THC:</u>	WIN5512 (CB ₁ /CB ₂)
Δ ⁹ - THC (CB ₁ /CB ₂) Δ ⁸ - THC (CB ₁ /CB ₂) Κανναβινόλη (CB ₁ /CB ₂)	Ανανδαμίδιο (CB ₁ >CB ₂) Βιροδαμίνη (CB ₁ /CB ₂) 2-αραχιδονυλογλυκερόλη (CB ₁ >CB ₂)	P55940 (CB ₁ /CB ₂) CP47497 (CB ₁ /CB ₂)	
<u>Συνθετικά ανάλογα:</u> JWH133 (CB ₂) HU210 (CB ₁ /CB ₂) L-759633(CB ₂) L-759656 (CB ₂) L-nantradol (CB ₁)	<u>Συνθετικά ανάλογα της AEA:</u> R-μεθανανδαμίδιο (CB ₁) Αραχιδονυλοχλωροαιθυλαμίδιο (CB ₁) Αραχιδονυλοκυκλοπροπυλαμίδιο (CB ₁) O-689 (CB ₁ >CB ₂) O-1812 (CB ₁)	CP55244 (CB ₁ /CB ₂) HU308 (CB ₂)	

Εικόνα 2

Αντιπροσωπευτικοί αγωνιστές των υποδοχέων των κανναβινοειδών (Howlett et al., 2002; Pertwee, 2005).

Εισαγωγή

Η ανακάλυψη της Δ^9 -τετραυδροκανναβινόλης (αγγλ. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, Δ^9 -THC), ως το κύριο ψυχοδραστικό συστατικό του φυτού της κάνναβης (Mechoulam & Gaoni, 1967) οδήγησε σε ανατρεπτικές ανακαλύψεις μιας νέας ομάδας χημικών ενώσεων προερχόμενων από το φυτό αυτό: περισσότερα από ογδόντα κανναβινοειδή έχουν μέχρι στιγμής ταυτοποιηθεί, το καθένα με το δικό του ξεχωριστό φαρμακολογικό προφίλ. Ωστόσο, μόνο μερικά απ'αυτά -εκ των οποίων ιδιαίτερα μελετημένα είναι η Δ^9 -THC- αλληλεπιδρούν με το ενδογενές σύστημα κανναβινοειδών.

ΕΝΔΟΓΕΝΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι δράσεις της κάνναβης διαμεσολαβούνται από υποδοχείς οι οποίοι ανήκουν σε ένα ενδογενές σύστημα κανναβινοειδών. Το ενδογενές σύστημα κανναβινοειδών αποτελείται από τους υποδοχείς κανναβινοειδών, τους φυσικούς προσδέτες τους ή ενδοκανναβινοειδή και τα ένζυμα βιοσύνθεσης και καταβολισμού τους. Η καθολική έκφραση του ενδοκανναβινοειδικού συστήματος υποδεικνύει τον ρυθμιστικό του ρόλο σε ποικίλες φυσιολογικές διεργασίες, ως ομοιοστατικός παράγοντας που ρυθμίζει την επεξεργασία πληροφοριών τόσο κεντρικά όσο και περιφερικά, και διεκπεραιώνει αντισταθμιστικό έλεγχο για την καλή λειτουργία οργάνων (Bosier, Muccioli, Hermans, & Lambert, 2010; Kano, Ohno-Shosaku, Hashimotodani, Uchigashima, & Watanabe, 2009).

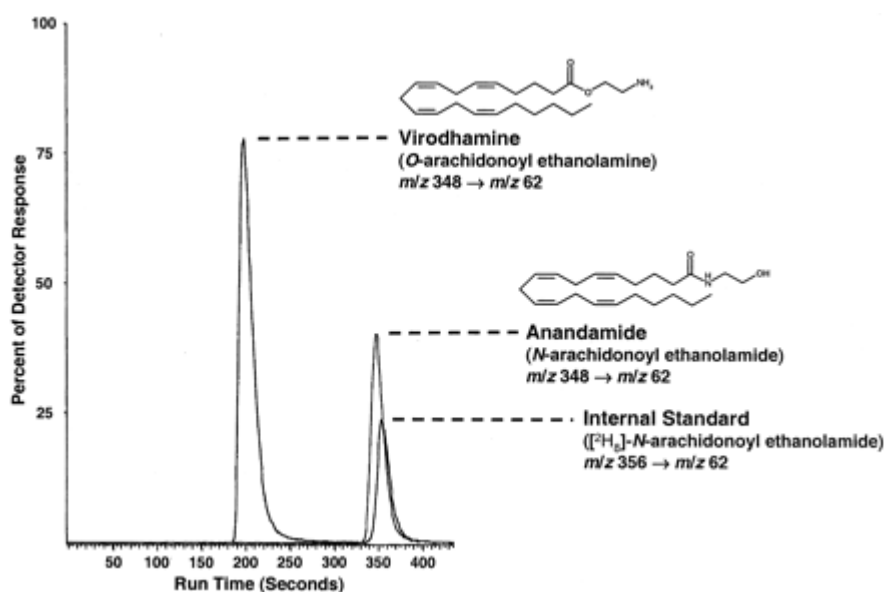
Οι πρώτες ενδείξεις ειδικής πρόσδεσης της Δ^9 -THC σε υποδοχείς θηλαστικών παρουσιάστηκαν είκοσι χρόνια αφότου αυτή ανακαλύφθηκε, όταν η ερευνητική ομάδα του Allyn Howlett έδειξε ότι σε νευροβλαστικά κύτταρα μύος (N18TG2) η έκθεση στην ίδια την Δ^9 -THC ή σε συνθετικά ανάλογά της, εμποδίζει την δράση της αδενυλικής κυκλάσης κατά ένα εναντιοειδικό τρόπο (Howlett, 1998). Ένα χρόνο μετά, ο διαμεμβρανικός υποδοχέας ο οποίος είχε ανταποκριθεί στην Δ^9 -THC κλωνοποιείται και ονομάζεται υποδοχέας κανναβινοειδών τύπου 1 (CB_1) (Matsuda, Lolait, Brownstein, Young, & Bonner, 1990a). Λίγα χρόνια αργότερα, ένας δεύτερος υποδοχέας της Δ^9 -THC κλωνοποιείται από ανθρώπινα λευχαιμικά προμυελοκύτταρα (HL-60) και ονομάζεται υποδοχέας κανναβινοειδών τύπου 2 (CB_2) (Munro, Thomas, & Abu-Shaar, 1993).

Η ανακάλυψη των υποδοχέων των κανναβινοειδών σηματοδότησε την έναρξη διερεύνησης για τους ενδογενείς προσδέτες τους ή όπως ονομάστηκαν στην πορεία,

τα ενδογενή κανναβινοειδή (Di Marzo et al., 1994). Λόγω της λιπόφιλης φύσης των φυτοκανναβινοειδών, οι Devane, Mechoulam και οι συνεργάτες τους υποστήριξαν την πιθανή ύπαρξη ενδογενών κανναβινοειδών σε λιποδιαλυτά τμήματα του εγκεφάλου. Ακολούθησε, το 1992 (Devane et al., 1992), η απομόνωση των δύο υποδοχέων τους και του πρώτου ενδογενή αγωνιστή από εγκεφαλικό ιστό χοίρου, ταυτοποιούμενου ως αραχιδονυλαιθανολαμίδιο (αγγλ. Arachidonoyl Ethanolamide, AEA), το οποίο θα πάρει το όνομα ανανδαμίδιο (αγγλ. anandamide) που στα σασκριτικά σημαίνει ευτυχία (ananda) -αρκετά επιτυχής ονομασία καθώς τα πλασματικά επίπεδα του ανανδαμιδίου μειώνονται σημαντικά στους ασθενείς με μείζονα κατάθλιψη (Hill, Miller, Carrier, Gorzalka, & Hillard, 2009) και αντιστοίχως, η παρεμπόδιση της υδρόλυσής της ασκεί ισχυρή αντικαταθλιπτική δράση (Gobbi et al., 2005). Το ανανδαμίδιο αποδείχθηκε τελικά να είναι μερικός αγωνιστής των δυο υποδοχέων των κανναβινοειδών, γεγονός ασυνήθιστο για ενδογενή φυσικό προσδέτη, και επιπλέον, εντοπίστηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις (της τάξεως του pmol ανα γραμμάριο ιστού) στον εγκέφαλο (Pertwee et al., 2010). Καθότι η φαρμακολογική της δράση δεν αντανακλούσε πλήρως τις συμπεριφορικές επιδράσεις της Δ⁹-THC (Smith et al., 1994), γεννιέται η υποψία για την ύπαρξη ενός δεύτερου ενδογενούς προσδέτη. Τρια χρόνια μετά, ένας επιπλέον προσδέτης και των δυο υποδοχέων απομονώνεται από εντερικό ιστό σκύλου ο οποίος προς έκπληξη των ερευνητών αποτελεί το γνωστό διάμεσο προϊόν του μεταβολισμού των τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων, 2-αραχιδονυλογλυκερόλη (αγγλ. 2-arachidonoylglycerol, 2-AG) (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). Η 2-AG είναι ολικός αγωνιστής και των δυο υποδοχέων, CB₁ και CB₂, και εντοπίζεται σε υψηλότερα επίπεδα (της τάξεως του nmol ανα γραμμάριο ιστού) στον εγκέφαλο (Stella, Schweitzer, & Piomelli, 1997). Πλήθος μεταγενέστερων ερευνών οδήγησαν στην ταυτοποίηση των βασικών ενζύμων που διαμεσολαβούν τις κύριες μεταβολικές οδούς του ανανδαμιδίου και της 2-αραχιδονυλογλυκερόλης, στις οποίες γίνεται αναφορά παρακάτω. Πολύ σύντομα μετά την ανακάλυψη της 2-αραχιδονυλογλυκερόλης, ένας τρίτος ενδογενής προσδέτης, ο νολαδινικός αιθέρας (2-αραχιδονυλογλυκερυλαιθέρας, 2-arachidonoylglyceryl-ether, 2-AGE) έρχεται στο φως, ο οποίος απομονώνεται από εγκεφαλικό ιστό χοίρου (Hanus et al., 2001). Ο νολαδινικός αιθέρας έχει υψηλή συγγένεια πρόσδεσης με τον CB₁ υποδοχέα (της τάξεως του nanomolar) και πολύ χαμηλότερη με τον CB₂ υποδοχέα (της τάξεως του micromolar) (Hanus et al., 2001). Κατά την προσπάθεια ανάπτυξης βιοαναλυτικών μεθόδων για την ποσοτικοποίηση του

Εισαγωγή

ανανδαμιδίου στον εγκέφαλο και στους περιφερικούς ιστούς, απαντάται ένα διαφορετικό μόριο το οποίο αν και παρουσιάζει το ίδιο μοριακό βάρος με αυτό του ανανδαμιδίου, εξέρχεται νωρίτερα από τη στήλη (βλ. **Εικόνα 3**). Το μόριο αυτό ταυτοποιείται ως Ο-αραχιδονουλαιθανολαμίνη (O-arachidonoyl-ethanolamine, OAE) το οποίο θα πάρει το όνομα βιροδαμίνη (virodhamine) από το σασκριτικό *virodha* που σημαίνει αντίθεση. Ο λόγος για την ονομασία έγκειται στον εστερικό δεσμό που σχηματίζεται μεταξύ του αραχιδονικού οξέος και της αιθανολαμίνης τα οποία απαρτίζουν το μόριο, σε αντίθεση με το αμίδιο που σχηματίζεται στο μόριο του ανανδαμιδίου.



Εικόνα 3

Διαχωρισμός ανανδαμιδίου και βιροδαμίνης (Porter et al., 2002)

(Liquid Chromatography (LC) Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Tandem Mass Spectrometry (APCI-MS-MS) Analysis)

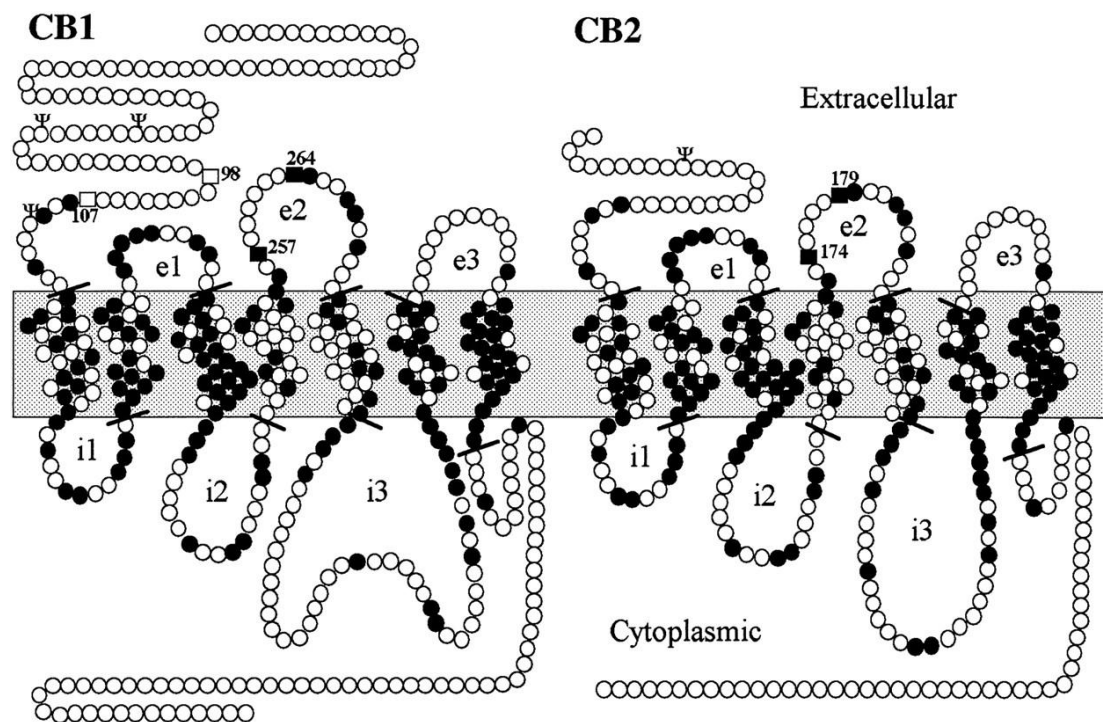
Η ανακάλυψη των ενδογενών κανναβινοειδών αφήνει ακόμη αμφιβολίες για το αν είναι οι μόνοι ή οι ισχυρότεροι ενδογενείς αγωνιστές. Είναι υπό αυτή την οπτική, παράτολμο να μετονομαστούν υποδοχείς κανναβινοειδών από ένα ενδογενή αγωνιστή όπως συνίσταται από τη Διεθνή Ένωση της Επιτροπής Φαρμακολογίας (International Union of Pharmacology Committee) όσο αφορά την Ονομασία Υποδοχέων και την Κατηγοριοποίηση Φαρμάκων (Receptor Nomenclature and Drug Classification). Παρ'όλες τις φαρμακολογικές ενδείξεις περι ύπαρξης περαιτέρω υποδοχέων κανναβινοειδών, απαιτούνται περισσότερα ερευνητικά δεδομένα.

Ο πατέρας των κανναβινοειδών Dr. Raphael Mechoulam σημειώνει σχετικά: “We have just scratched the surface, and I greatly regret that I don’t have another lifetime to devote to this field, for we may well discover that cannabinoids are involved in some way in all human diseases.”

Υποδοχείς κανναβινοειδών

Τα κανναβινοειδή ασκούν τη δράση τους προσδενόμενα στους δυο βασικούς υποδοχείς του ενδογενούς συστήματος κανναβινοειδών, τους υποδοχείς CB₁ και CB₂. Ο διαχωρισμός των δυο υποδοχέων βασίζεται στην αλληλουχία των αμινοξέων που τους απαρτίζουν, στους σηματοδοτικούς μηχανισμούς που ακολουθούν την ενεργοποίησή τους, την ιστοειδική κατανομή τους στον κάθε οργανισμό και στην ευαισθησία που παρουσιάζουν σε ορισμένους ισχυρούς αγωνιστές και ανταγωνιστές, ειδικούς για τον ένα ή τον άλλο τύπο υποδοχέων. Ως εκ τούτου, το κάθε κανναβινοειδές προσδένεται με τη δική του συγγένεια πρόσδεσης στους υποδοχείς. Για παράδειγμα, η Δ⁹- τετραυδροκανναβινόλη (Δ⁹- THC) παρουσιάζει υψηλότερη συγγένεια για τους CB₁ υποδοχείς, ενώ η κανναβινόλη δεν παρουσιάζει ειδικότητα ως προς την πρόσδεσή της στους CB₁ ή CB₂ υποδοχείς. Υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν την ύπαρξη κι άλλων κανναβινοειδικών υποδοχέων –ενδεικτικά GPR-55 (Baker, Pryce, Davies, & Hiley, 2006), GPR-119 (Overton et al., 2006), TRPV1 (Begg et al., 2005)- η παρούσα εργασία όμως εστιάζει στους υποδοχείς CB₁ και CB₂.

Οι υποδοχείς CB₁ και CB₂ παρουσιάζουν 44% ομοιότητα στην αλληλουχία των αμινοξέων τους και ανήκουν στην υπεροικογένεια υποδοχέων που συζεύγνυνται με πρωτείνες G (GPCRs) (Howlett et al., 2002). Αποτελούνται από 7 α-διαμεμβρανικές έλικες με ένα N-τελικό εξωκυττάριο άκρο και ένα C-τελικό ενδοκυττάριο άκρο (βλ. **Εικόνα 4**). Οι δύο υποδοχείς παρουσιάζουν 68% ομοιότητα στις διαμεμβρανικές περιοχές τους (Munro et al., 1993), ενώ ο CB₂ υποδοχέας έχει πολύ μικρό N-τελικό άκρο (33 αμινοξέα) σε σχέση με τον CB₁ (116 αμινοξέα) (Howlett et al., 2002). Η ομοιότητα στην ομολογία των αμινοξέων ανάμεσα στα τρωκτικά και στον άνθρωπο κυμαίνεται στο 97% για τον CB₁ υποδοχέα και στο 81% για τον CB₂ (Elphick & Egertova, 2001; Pertwee et al., 2010).



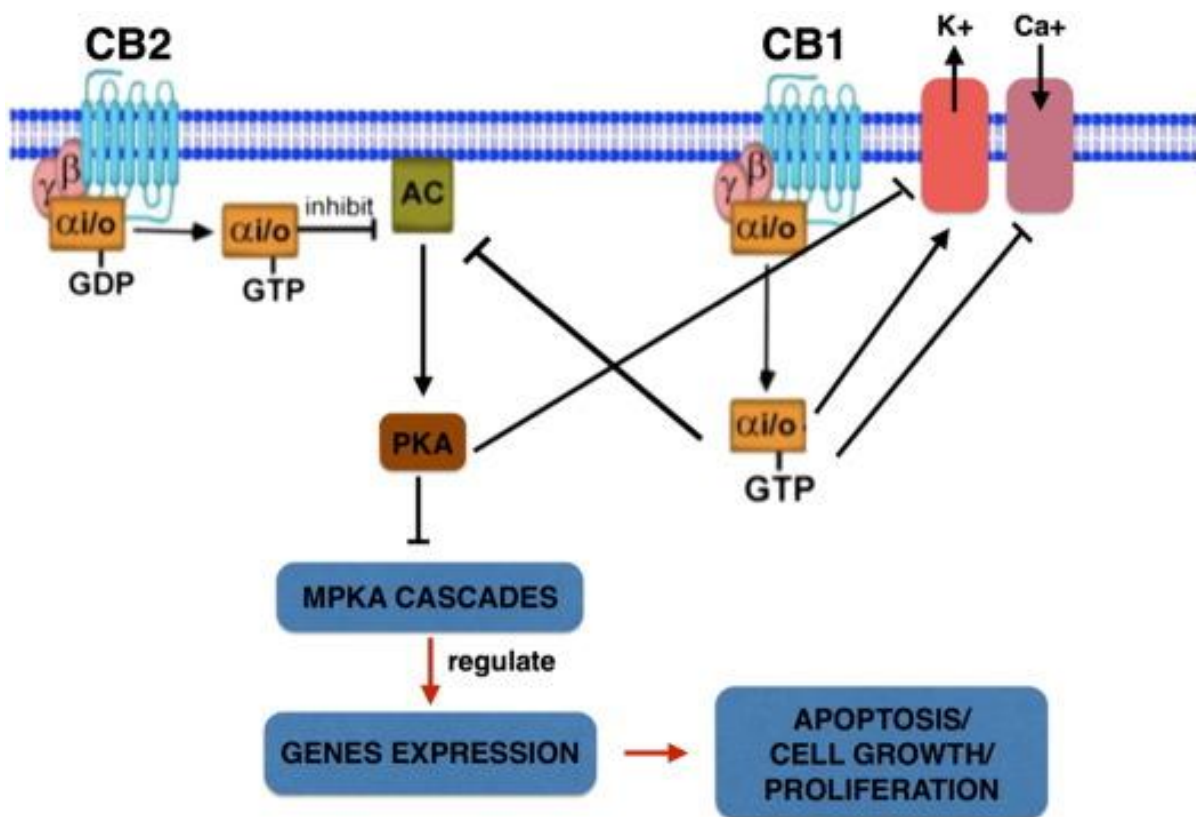
Εικόνα 4

Σχηματική αναπαράσταση CB₁ και CB₂ των υποδοχέων ανθρώπου. Τα μαύρα σημεία αναπαριστούν τα κοινά αμινοξέα ανάμεσα στους δυο υποδοχείς (Shire et al., 1996).

Και οι δύο υποδοχείς, CB₁ και CB₂, συνδέονται ειδικότερα με τις πρωτεΐνες G_i/G_o (Turu και Hunyady, 2010) αναστέλλοντας την αδενυλική κυκλάση (Stempel et al.), και διεγείρουν ενεργοποιούμενες από μιτογόνο πρωτεϊνικές κινάσες (MAP), ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο (Howlett et al., 2002). Η ενεργοποίηση των εν λόγω υποδοχέων προκαλεί ποικίλες επιπτώσεις στην κυτταρική φυσιολογία, συμπεριλαμβανομένων και της συναπτικής λειτουργίας, της γονιδιακής μεταγραφής και της επιβίωσης των κυττάρων.

Ειδικότερα, σηματοδοτικοί μηχανισμοί που διαμεσολαβούνται από την ενεργοποίηση των CB₁ και CB₂ μειώνουν την παραγωγή κυκλικού AMP (cAMP) και κατά συνέπεια αναστέλλουν την πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Επιπλέον, ρυθμίζουν τα επίπεδα φωσφορύλιωσης και διεγείρουν τη σηματοδότηση διαφορετικών μελών της οικογένειας των MAP κινασών, συμπεριλαμβανομένων των ERK1/2, p38 MAPK και c-jun. Η N-τελική κινάση (JNK) MAPK με τη σειρά της ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων καταλήγοντας σε μηχανισμούς που επάγουν την επιβίωση, απόπτωση,

πολλαπλασιασμό των κυττάρων (βλ. **Εικόνα 5**) καθώς και το μεταβολισμό γλυκόζης (Howlett, 2005).



Εικόνα 5

Σηματοδοτικοί μηχανισμοί των CB₁ και CB₂ υποδοχέων

Και οι δυο υποδοχείς κανναβινοειδών, CB₁ και CB₂ συνδέονται με πρωτεΐνες G_i/G_o. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων οδηγεί σε αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης, μείωση του cAMP, αναστολή της PKA και επάγει τα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια των κινασών MAPK.

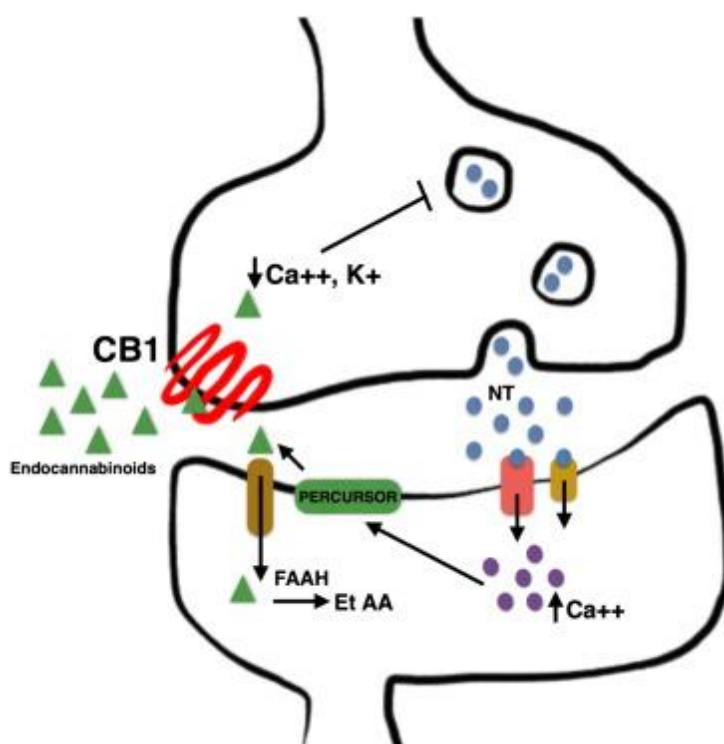
Επιπλέον, ο CB₁ υποδοχέας των κανναβινοειδών ρυθμίζει αρνητικά τασοελεγχόμενους διαύλους ασβεστίου και θετικά διαύλους καλίου εσωτερικής ανόρθωσης (Ohigashi et al.). Ο CB₁ υποδοχέας ρυθμίζει επίσης την απελευθέρωση ενδοκυττάριου ασβεστίου διαμέσου ενεργοποίησης της αδενυλικής κυκλάσης.

Το σύνολο αυτών των σηματοδοτικών μηχανισμών είναι άμεσα συνδεδεμένο με την πληθώρα λειτουργιών στις οποίες οι υποδοχείς των κανναβινοειδών έχουν ρυθμιστικό ρόλο.

(Katchan et al., 2016)

Εισαγωγή

Οι δυο αυτοί υποδοχείς των κανναβινοειδών ασκούν τις δράσεις τους κατόπιν ειδικής πρόσδεσης των αγωνιστών τους (ενδογενών/ φυτοκανναβινοειδών/ συνθετικών). Μετά την απόσπαση των αγωνιστών από τους υποδοχείς, τα μόρια αυτά προσλαμβάνονται στα κύτταρα και απενεργοποιούνται μέσω καταβολισμού τους (αναφορά θα γίνει στη συνέχεια). Ο μεταβολισμός για παράδειγμα του ανανδαμίδιου γίνεται με τη βοήθεια της υδρολάσης του αμιδίου των λιπαρών οξέων (αγγλ. Fatty acid amide hydrolase enzyme, FAAH) (Di Marzo, 1998; Giuffrida, Beltramo, & Piomelli, 2001) ή άλλες μεταβολικές διαδικασίες, ενώ η υδρόλυση της 2-AG από τη λιπάση της μονοακυλογλυκερόλης (αγγλ. Monoglyceride lipase, MGL) (βλ. **Εικόνα 6**).



Εικόνα 6

Δράση των κανναβινοειδών στην προσυναπτική απόληξη

Οι αγωνιστές των κανναβινοειδών προσδένονται στους CB₁ υποδοχείς, προκαλώντας αλλαγές στα ενδοκυττάρια επίπεδα ασβεστίου και καλίου. Κατά συνέπεια αναστέλλεται η απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών στον προσυναπτικό νευρώνα. Τα κανναβινοειδή ακολούθως μεταβολίζονται στον μετασυναπτικό νευρώνα (ενδεικτικά, το ανανδαμίδιο μεταβολίζεται από την υδρολάση του αμιδίου των λιπαρών οξέων, FAAH) και τα προϊόντα του μεταβολισμού τους ανακυκλώνονται. (Katchan, David, & Shoenfeld, 2016)

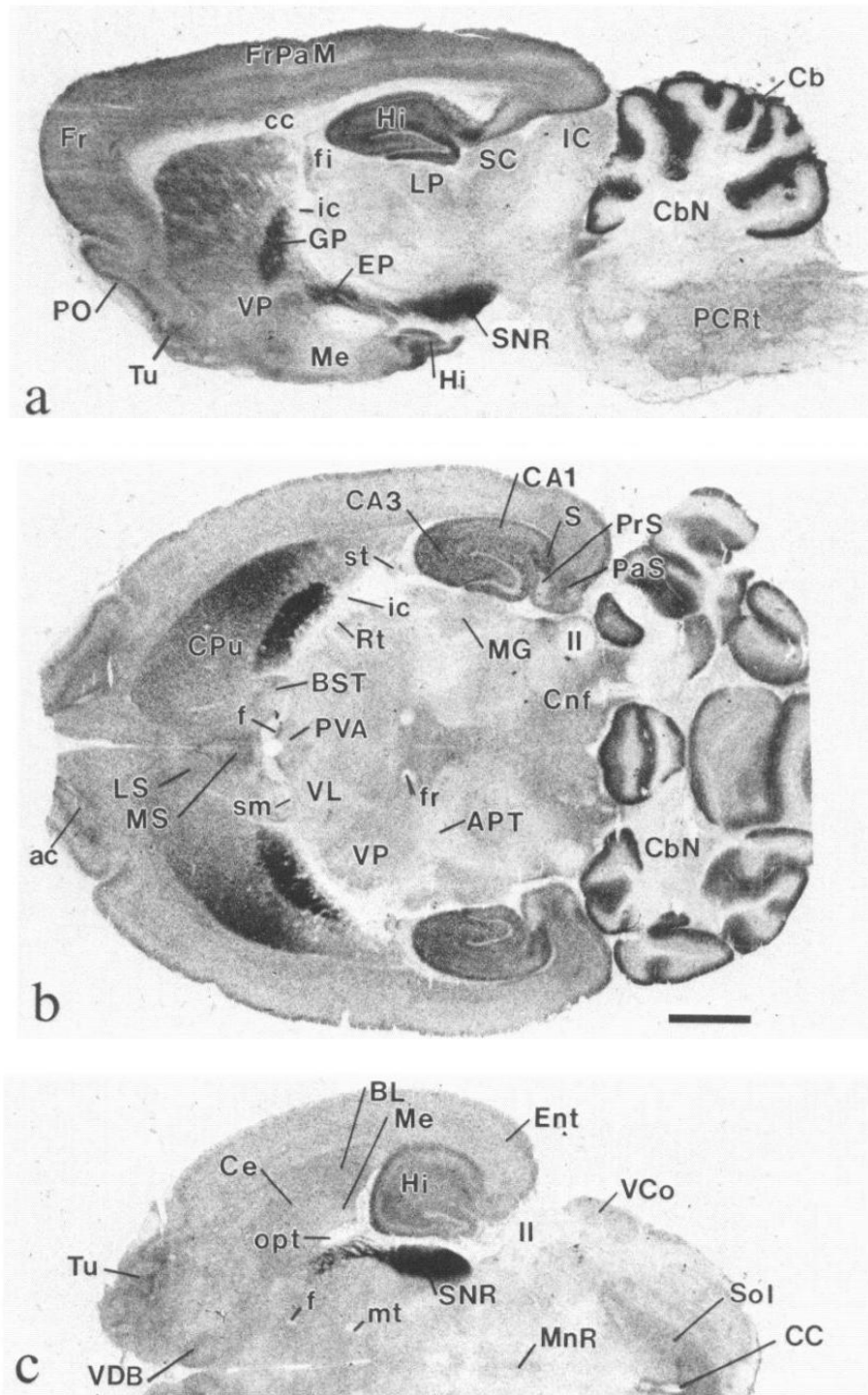
1. Δομή και κατανομή των CB₁ υποδοχέων των κανναβινοειδών

Το cDNA του CB₁ υποδοχέα απομονώθηκε πρώτη φορά από φλοιικό ιστό επίμυος χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτιδικό ιχνηθέτη προερχόμενο από υποδοχέα που συζεύγνυται με πρωτεΐνη G (Matsuda, Lolait, Brownstein, Young, & Bonner, 1990b). Ο γονιδιακός τύπος για τον ανθρώπινο CB₁ υποδοχέα βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6, στην περιοχή 6q14-q15 (Caenazzo et al., 1991; Hoehe et al., 1991).

Η απλουστευμένη υπόθεση πως οι δυο βασικοί υποδοχείς των κανναβινοειδών έχουν ξεχωριστή ανατομική θέση, με «κεντρικούς» τους CB₁ και «περιφερικούς» τους CB₂, επικράτησε για μια περίπου δεκαετία. Πλέον όμως, βάσιμα στοιχεία υποστηρίζουν μια ευρεία κατανομή των δυο υποδοχέων στον οργανισμό θηλαστικών, πουλιών, ερπετών και ψαριών (McPartland, Agrawal, Gleeson, Heasman, & Glass, 2006).

Οι CB₁ υποδοχείς έχουν μειωμένη αλλά λειτουργική έκφραση σε διάφορους περιφερικούς ιστούς (δες πιο κάτω) ενώ παρουσιάζουν έντονη έκφραση στον εγκέφαλο (βλ. **Εικόνα 7**). Η έντονη αυτή έκφρασή τους στον εγκέφαλο είναι αντικατόπτρισμα της σημαντικότητας των λειτουργιών που υποστηρίζονται από τη σηματοδότηση που διαμεσολαβείται από το ενδογενές σύστημα κανναβινοειδών καθώς, μεταξύ άλλων, παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στον πόνο, το συναίσθημα, την κινητοποίηση και σε γνωστικές διεργασίες (Piomelli, 2003).

Οι CB₁ υποδοχείς οριοθετούνται κυρίως μεταξύ των προσυναπτικών απολήξεων των κεντρικών και περιφερικών νευρώνων, όπου ρυθμίζουν την απελευθέρωση διεγερτικών και ανασταλτικών νευροδιαβιβαστών, μεταξύ άλλων, γλουταμινικού, GABA, ακετυλοχολίνης, νοραδρεναλίνης, ντοπαμίνης, σεροτονίνης και χολεκυστοκινίνης (Engler, Freiman, Urbanski, & Szabo, 2006; Howlett, 2002; Pertwee & Ross, 2002), αν και έχουν βρεθεί επίσης σε μετασυναπτικές περιοχές και στη νευρογλοία (Rodriguez, Mackie, & Pickel, 2001).



Εικόνα 7

Κατανομή των CB₁ υποδοχέων σε εγκέφαλο επίμυος.

Αυτοραδιογραφία με 10nM H³-CP55940, (a) οβελισαία τομή, (b,c) οριζόντιες τομές.

Κλίμακα 2 mm. (Herkenham et al., 1991)

Οι περιοχές που έχουν σημειωθεί βρίσκονται στον πίνακα συντομογραφιών.

Στους ανθρώπους και στα τρωκτικά, οι CB₁ υποδοχείς παρουσιάζουν υψηλότερη συγκέντρωση σε αισθητηριακές και κινητικές περιοχές σχετικές με κινητικές και γνωστικές λειτουργίες, όπως τις περιοχές των βασικών γαγγλίων, της μέλαινας ουσίας, της ωχράς σφαίρας, του ιπποκάμπου, της παρεγκεφαλίδας, και του πρόσθιου οσφρητικού πυρήνα (Mechoulam & Parker, 2013).

Η υψηλή παρουσία των CB₁ υποδοχέων στον ιππόκαμπο σχετίζεται άμεσα με τις διαταραχές στη μνήμη και τις γνωστικές λειτουργίες που προκαλούν τα κανναβινοειδή (Herkenham et al., 1990). Χρόνια έκθεση σε Δ⁹-THC ή παρασκευάσματα μαριχουάνας αλλοιώνει τη δομή και λειτουργία του ιπποκάμπου (Scallet, 1991), δομή η οποία είναι απαραίτητη σε διεργασίες μνήμης και μάθησης στον άνθρωπο και στα τρωκτικά.

Η σημαντική έκφραση των CB₁ υποδοχέων στα βασικά γάγγλια και η δράση των κανναβινοειδών στις περιοχές αυτές σχετίζεται με το λεπτό συντονισμό της κίνησης. Υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές διαταραγμένης έκφρασης και σηματοδότησης των CB₁ υποδοχέων σε διαταραχές του εξωπυραμιδικού συστήματος. Ειδικότερα, μελέτες έδειξαν μειωμένη σηματοδότηση των CB₁ υποδοχέων σε περιπτώσεις νευροεκφυλιστικών διαταραχών, όπως για παράδειγμα στη νόσο Parkinson και στη χορεία Huntington (Richfield & Herkenham, 1994; Sanudo-Pena et al., 1998).

Σημαντική είναι η παρουσία των CB₁ υποδοχέων και στην παρεγκεφαλίδα του επίμου (Matsuda, Bonner, & Lolait, 1993), γεγονός που πιθανότατα σχετίζεται με την αταξία, την ακινησία και την καταληψία οι οποίες ακολουθούν την οξεία χορήγηση Δ⁹-THC καθώς και άλλων κανναβινοειδών (Rodriguez de Fonseca, Del Arco, Martin-Calderon, Gorriti, & Navarro, 1998).

Από την άλλη πλευρά, η χαμηλή έκφραση των CB₁ υποδοχέων στην ανθρώπινη παρεγκεφαλίδα συνάδει με τα πιο διακριτικά ελλείμματα που παρατηρούνται στις κινητικές δεξιότητες ατόμων μετά τη χρήση μαριχουάνας (Ameri, 1999; Herkenham et al., 1990).

Κάποιες περιοχές του εγκεφάλου παρουσιάζουν μέτρια συγκέντρωση CB₁ υποδοχέων (νεοφλοιός, έξω-βασική αμυγδαλή, υποθάλαμος, περιωδραγωγός φαιά ουσία του μεσεγκεφάλου), ενώ άλλες, όπως ο θάλαμος και το εγκεφαλικό στέλεχος παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα του υποδοχέα.

Οι CB₁ υποδοχείς που εκφράζονται στο κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο (VTA) σε προσυναπτικούς γλουταματεργικούς και GABAεργικούς νευρώνες δρουν ως ανάδρομοι αναστολείς των ντοπαμινεργικών νευρώνων στο VTA, περιοχή η οποία έχει ουσιαστικό ρόλο στο σύστημα της ανταμοιβής (Maldonado, Valverde, & Berrendero, 2006). Επι παραδείγματι, μικροεγχύσεις Δ⁹-THC στο VTA οδηγούν σε ενεργοποίηση του συστήματος της ανταμοιβής όμοια με αυτήν που προκαλούν ουσίες όπως αμφεταμίνη, κοκαΐνη, ηρωίνη, και νικοτίνη (Zangen, Solinas, Ikemoto, Goldberg, & Wise, 2006).

Στον εγκέφαλο, οι CB₁ υποδοχείς έχουν υψηλή έκφραση και σε περιοχές που σχετίζονται με τον πόνο, συμπεριλαμβανομένων της περιυδραγωγού φαιάς ουσίας (Tsou, Brown, Sanudo-Pena, Mackie, & Walker, 1998) και του οπίσθιου κέρατος του νωτιαίου μυελού (Farquhar-Smith et al., 2000).

Αρκετές αναφορές εντοπίζουν CB₁ υποδοχείς σε νευρώνες των νωτιαίων γαγγλίων (Dorsal Root Ganglia, DRGs) σε ποικίλα επίπεδα έκφρασης mRNA του CB₁ υποδοχέα και του ίδιου του υποδοχέα (Ahluwalia, Urban, Capogna, Bevan, & Nagy, 2000; Bridges et al., 2003; T. J. Price, Helesic, Parghi, Hargreaves, & Flores, 2003; Salio, Cottone, Conrath, & Franzoni, 2002).

Παράλληλα, πέρα από την έκφραση των CB₁ υποδοχέων στο νευρικό σύστημα, οι υποδοχείς αυτοί εντοπίζονται στην πλειοψηφία των περιφερικών ιστών και οργάνων στα θηλαστικά. Μεταξύ άλλων, οι CB₁ υποδοχείς παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση πρόσληψης τροφής, την εναπόθεση λίπους και τον μεταβολισμό λιπιδίων και σακχάρων (φυσιολογικές διεργασίες στις οποίες η αναλυτική δράση των CB₁ θα αναφερθεί στη συνέχεια). Διαταραχή στις διεργασίες αυτές, σχετίζονται με υπερδραστηριότητα του συστήματος των CB₁ υποδοχέων (Gelfand & Cannon, 2006) στο ΚΝΣ καθώς και σε περιφερικούς ιστούς (ενδεικτικά, λιπώδης ιστός, σκελετικός μυϊκός ιστός, ήπαρ, γαστρεντερικός σωλήνας) (Iannotti et al., 2014; Ravinet Trillou, Delgorge, Menet, Arnone, & Soubrie, 2004).

2. Δομή και κατανομή των CB₂ υποδοχέων των κανναβινοειδών

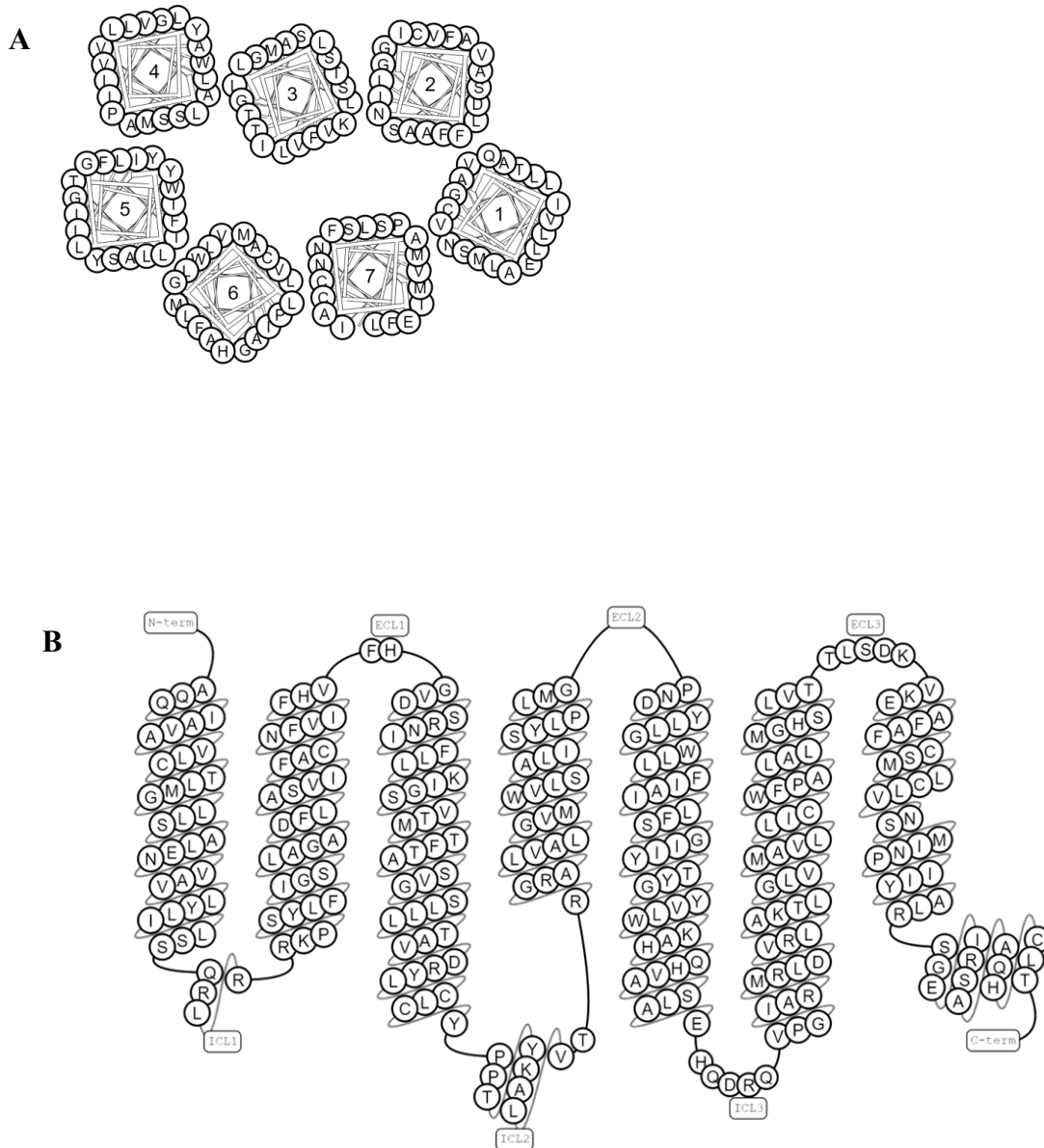
Η ύπαρξη ενός δεύτερου τύπου υποδοχέα κανναβινοειδών επιβεβαιώθηκε από την ομάδα του Kaminski το 1992, σε κύτταρα σπλήνα μύος (Kaminski, Abood, Kessler, Martin, & Schatz, 1992). Ένα χρόνο αργότερα, ο CB₂ υποδοχέας κλωνοποιείται από ανθρώπινα λευχαιμικά προμυελοκύτταρα (HL-60) με τη βοήθεια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτιδικό ιχνηθέτη προερχόμενο από υποδοχέα που συζεύγνυται με πρωτεΐνη G (Munro et al., 1993).

Ο γονιδιακός τόπος για τον ανθρώπινο CB₂ υποδοχέα βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1, στην περιοχή p35-p36 (Svizenska, Dubony, & Sulcova, 2008) ενώ στον επίμυ βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5, στην περιοχή q36 (Brown, Wager-Miller, & Mackie, 2002). Το γονίδιο του CB₂ υποδοχέα είναι συντηρημένο στον άνθρωπο και σε ζώα όπως ο χιμπατζής, ο μακάκος ρέζους, ο σκύλος, η αγελάδα, ο μύς, ο επίμυς, η κότα, το ψάρι ζέβρα και ο βάτραχος.

Ο CB₂ υποδοχέας των κανναβινοειδών αποτελείται από 360 αμινοξέα, γεγονός που τον καθιστά σχετικά μικρότερο από τον CB₁ υποδοχέα (473 αμινοξέα) (Cabral & Griffin-Thomas, 2009). Πιο κάτω απεικονίζεται η αμινοξική διαμόρφωση του υποδοχέα επίμυος (*Rattus norvegicus*) στις 7 χαρακτηριστικές διαμεμβρανικές έλικες (**Εικόνα 8A**) και η αλληλουχία της πολυπεπτιδικής του αλυσίδας (**Εικόνα 8B**).

Ο CB₂ υποδοχέας εκφράζεται κυρίως σε κύτταρα που προέρχονται από προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού (Jorda et al., 2002; Ziring et al., 2006) γεγονός που δικαιολογεί την αρχική ταυτοποίησή του σε κύτταρα και ιστούς του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως ο σπλήνας, οι λεμφαδένες και οι πλάκες του Peyer (Lynn & Herkenham, 1994).

Οι μελέτες που ακολούθησαν την ταυτοποίηση του εν λόγω υποδοχέα υποστήριξαν το σπουδαίο ρόλο του σε ιστούς και κυτταρικές σειρές της ανοσολογικής άμυνας του οργανισμού (Wang et al., 2016), επισημαίνοντας πως ανάμεσα στις κυτταρικές σειρές, τα Β-λεμφοκύτταρα παρά τα μεγάλα κοκκιώδη κύτταρα (φυσικά φονικά κύτταρα, NK-cells) εκφράζουν ιδιαίτερα ψηλά επίπεδα mRNA του υποδοχέα (Galiegue et al., 1995). Η βαθμιδωτή κατάταξη επιπέδων έκφρασης mRNA του CB₂ υποδοχέα στους ιστούς του ανοσοποιητικού συστήματος που εξετάστηκαν (αμυγδαλές > σπλήνας > λεμφοκύτταρα, μονοπύρηνια > θύμος αδένας) συνάδει με τη σύστασή τους σε Β-λεμφοκύτταρα (Galiegue et al., 1995).



Εικόνα 8

Διαγραμματική απεικόνιση διαμόρφωσης των αμινοξέων του CB₂ υποδοχέα επίμυος στις 7 διαμεμβρανικές έλικες (**A**) και αλληλουχία της πολυπεπτιδικής του αλυσίδας (**B**).

Πηγή: GPCRdb (gpcrdb.org)

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, οι CB₂ υποδοχείς θεωρούνταν αρχικά οι «περιφερικοί» υποδοχείς κανναβινοειδών. Αυτό οφειλόταν στην έντονη έκφρασή τους στο ανοσοποιητικό σύστημα και στην υποτιθέμενη απουσία τους από το κεντρικό νευρικό σύστημα. Πλέον όμως, υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν την παρουσία των CB₂ υποδοχέων στο κεντρικό νευρικό σύστημα όλο και αυξάνεται (βλ. **Εικόνα 9**).

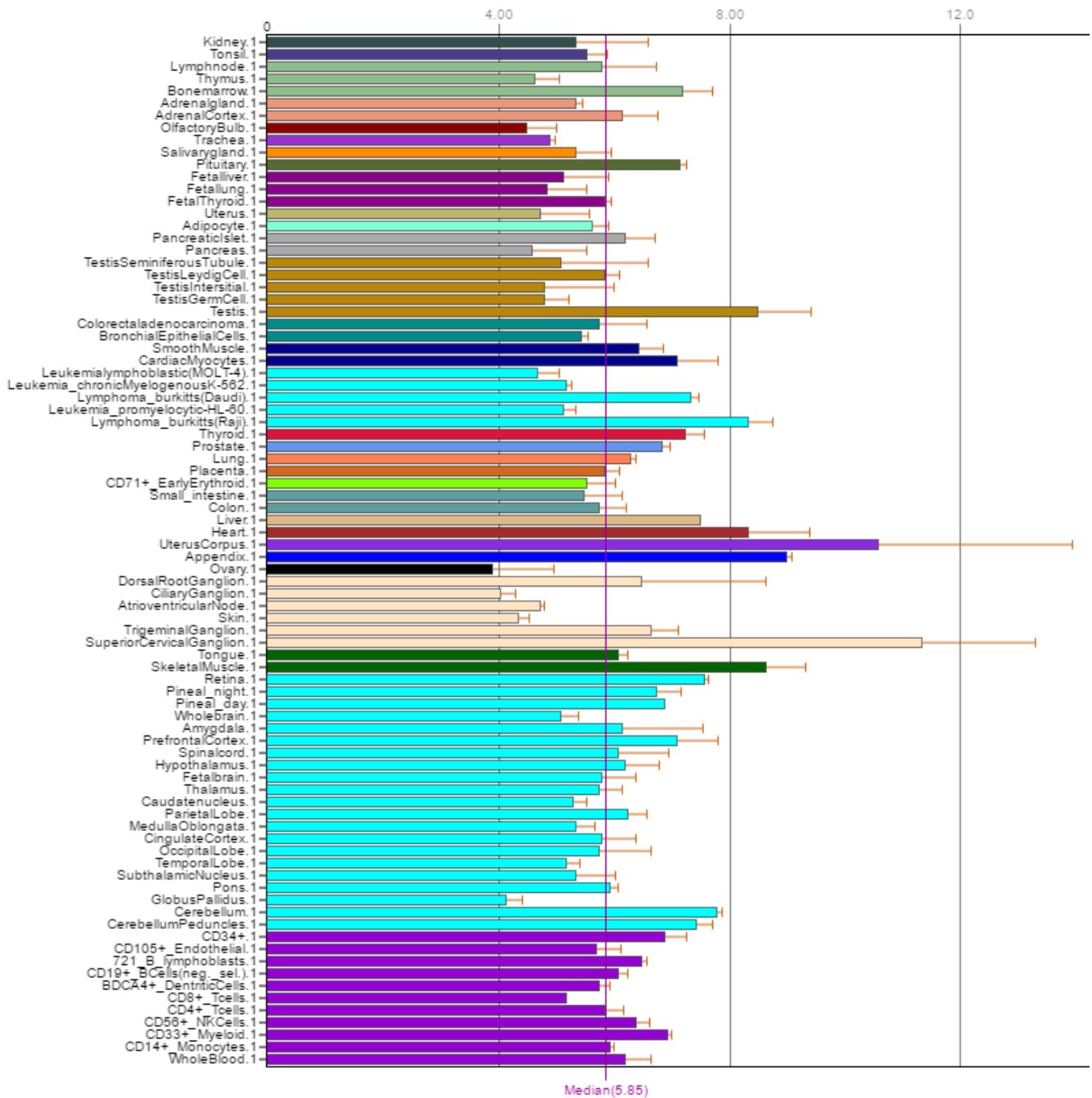
Μια από τις πρώτες αναφορές κεντρικής παρουσίας του CB₂ υποδοχέα υπήρξε η έρευνα της ομάδας του Skaper το 1996 (Skaper et al., 1996), ενώ μόλις το 2005 ανάλυση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR) ταυτοποίησε mRNA του CB₂ υποδοχέα στην παρεγκεφαλίδα και στο εγκεφαλικό στέλεχος επίμυος και ανοσοαποτύπωση κατά Western αποκάλυψε έκφραση CB₂ πρωτεΐνης στις ίδιες περιοχές (Van Sickle et al., 2005).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η πλέον αποδεδειγμένη έκφραση mRNA του υποδοχέα και της ίδιας της πρωτεΐνης του υποδοχέα στη μικρογλοία (Beltramo et al., 2006; Carlisle, Marciano-Cabral, Staab, Ludwick, & Cabral, 2002; Franco & Fernandez-Suarez, 2015; Klegeris, Bissonnette, & McGeer, 2003; Maresz et al., 2007; Walter et al., 2003). Η μικρογλοία αποτελείται από εξειδικευμένα κύτταρα προερχόμενα από μακροφάγα. Ως εκ τούτου θα μπορούσαν να θεωρηθούν τα ανοσοκύτταρα του εγκεφάλου τα οποία σε παθολογικές καταστάσεις σχηματίζουν την πρώτη γραμμή άμυνας του ΚΝΣ. Περνούν από διακριτές φάσεις ενεργοποίησης (μικρογλοίωση) ανάλογα με την ύπαρξη ειδικών παθολογικών ερεθισμάτων (Ashton & Glass, 2007; Franco & Fernandez-Suarez, 2015; Hanisch & Kettenmann, 2007). Ο CB₂ υποδοχέας ρυθμίζει τη μετανάστευση και διείσδυση των μικρογλοιακών κυττάρων σε περιοχές του εγκεφάλου όπου υπάρχει φλεγμονή ή εκφύλιση (Gomez, Hernandez, & Fernandez-Ruiz, 2008; Miller & Stella, 2008; D. A. Price et al., 2009; Ramirez et al., 2012; Tao et al., 2016; Walter et al., 2003).

Δεν υπάρχουν ακόμη βάσιμες αποδείξεις για έκφραση του υποδοχέα από τη μικρογλοία υγιούς εγκεφάλου (Stella, 2004) παρά την ύπαρξη μικρού αριθμού ερευνών που υποστηρίζουν το αντίθετο (Onaini et al., 2008), οι οποίες όμως όπως εκ των υστέρων φάνηκε, χρησιμοποίησαν αντισώματα για τον CB₂ υποδοχέα που δεν ήταν επαρκή ως προς την ειδικότητά τους (Atwood & Mackie, 2010; Baek, Darlington, Smith, & Ashton, 2013; Cecyre, Thomas, Ptito, Casanova, & Bouchard, 2014). Αξιοσημείωτη αύξηση του υποδοχέα παρουσιάζει η μικρογλοία εγκεφάλου ατόμων με Alzheimer (Benito et al., 2003) και ο νωτιαίος μυελός ατόμων με

Εισαγωγή

αμυοτροφική πλάγια σκλήρυνση και πολλαπλή σκλήρυνση (Yiangou et al., 2006). Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, είναι ξεκάθαρο πως κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες τα μικρογλοικά κύτταρα είναι ικανά έκφρασης του CB₂ υποδοχέα.



Εικόνα 9

Ιστοειδική έκφραση του mRNA του CB₂ υποδοχέα των κανναβινοειδών

Πηγή: BioGPS (biogps.org)

Έρευνες της τελευταίας δεκαετίας προτείνουν μικρή αλλά αξιόλογη έκφραση του CB₂ υποδοχέα σε περιοχές του εγκεφάλου όπως το ραβδωτό, ο ιππόκαμπος και ο θάλαμος (Gong et al., 2006; Jhaveri et al., 2008; Sierra et al., 2015; Wotherspoon et al., 2005) και πολύ πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν την έκφρασή του στον προμετωπιαίο φλοιό (den Boon et al., 2012; Garcia-Cabrerizo & Garcia-Fuster, 2016), στον επικλινή πυρήνα (Zhang et al., 2015), στην ωχρά σφαίρα σε μη ανθρώπινα πρωτεύοντα (Lanciego et al., 2011), στη μέλαινα ουσία (Garcia, Palomo-Garo, Gomez-Galvez, & Fernandez-Ruiz, 2016; Gomez-Galvez, Palomo-Garo, Fernandez-Ruiz, & Garcia, 2016) και στο κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο (Zhang et al., 2014; Zhang et al., 2016). Ως εκ τούτου μέχρι στιγμής η συλλογή δεδομένων που συσχετίζουν τον CB₂ υποδοχέα με κεντρικές δράσεις αποτελείται από περιορισμένο αριθμό μελετών, υπάρχουν όμως αυξανόμενα στοιχεία που συνδέουν τον υποδοχέα με κεντρικές λειτουργίες, παραδείγματος χάριν με διαδικασίες εθισμού στις οποίες διαμεσολαβούν δράσεις ουσιών όπως η κοκαΐνη, η νικοτίνη και το αλκοόλ (Ignatowska-Jankowska, Muldoon, Lichtman, & Damaj, 2013; Ortega-Alvaro et al., 2015; Pradier, Erxlebe, Markert, & Racz, 2015; Xi et al., 2011; Zhang et al., 2015). Συγκεκριμένα, στο VTA, οι CB₂ υποδοχείς εκφράζονται από τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες και διέγερσή τους από τον JWH-133, ένα ισχυρό και υψηλής εκλεκτικότητας για τον υποδοχέα αγωνιστή (Huffman et al., 1999), είχε ως συνέπεια τη μείωση της εκπυρσοκρότησης των νευρώνων της περιοχής (Zhang et al., 2014). Επιπροσθέτως, μικροεγχύσεις του JWH-133 στο VTA επίμυων προκάλεσαν μείωση της συμπεριφοράς αυτοχορήγησης κοκαΐνης, παρέχοντας επιπλέον στοιχεία στην ήδη υπάρχουσα υπόθεση για εμπλοκή του CB₂ υποδοχέα στις ενισχυτικές δράσεις ουσιών (Onaini, Ishiguro, Gu, & Liu, 2012).

Ειδικότερα, οι πιο αξιοσημείωτες περιοχές ως προς την έκφραση του CB₂ υποδοχέα στο νευρικό σύστημα είναι ο πρόσθιος οσφρητικός πυρήνας, οι νευρώνες του οσφρητικού, οπτικού, κινητικού και ακουστικού φλοιού, όπου τα σώματα και οι ακραίοι δενδρίτες των πυραμιδικών νευρώνων των στρωμάτων III και V εμφανίζουν έντονη χρώση. Ακόμη, πυραμιδικοί νευρώνες του ιπποκάμπου, ιδιαίτερα στις περιοχές CA2 και CA3 επιδεικνύουν μέτρια έως και έντονη ανοσοεπαγώμενη χρώση για τον CB₂ υποδοχέα.. Επίσης, κάποιοι θαλαμικοί πυρήνες παρουσιάζουν κυτταρικά σώματα με έντονη χρώση, με τον δικτυωτό πυρήνα του θαλάμου να εμφανίζει ένα πυκνό δίκτυο από ανοσοδραστικές για τον CB₂ υποδοχέα ίνες (Brusco, Tagliaferro,

Εισαγωγή

Saez, & Onaivi, 2008; Gong et al., 2006; Q. Lu, Straiker, Lu, & Maguire, 2000; Morgan, Stanford, & Woodhall, 2009).

Μεσαία έκφραση σε ανοσοθετικά για τον CB₂ υποδοχέα κυτταρικά σώματα παρουσιάζουν οι περιοχές της περιωδραγωγού φαιάς ουσίας (αγγλ. periaqueductal gray, PAG), της δικτυωτής μοίρας της μέλαινας ουσίας, και άλλες συστάδες πυρήνων του εγκεφαλικού στελέχους. Τα σώματα των κυττάρων Purkinje, περισσότερο από όλα τα λοβία της παρεγκεφαλίδας, παρουσιάζουν έντονη χρώση ενώ οι δενδρίτες τους που βρίσκονται στη μοριακή στιβάδα εμφανίζουν μέτρια χρώση (Gong et al., 2006).

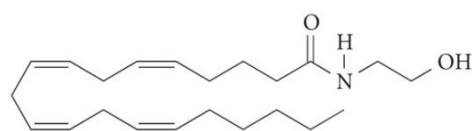
Όλο και περισσότερα δεδομένα προερχόμενα από γενετικά και ζωικά μοντέλα υποδεικνύουν μια ευθέως ανάλογη σχέση του CB₂ υποδοχέα και του κινδύνου εμφάνισης σχιζοφρένειας (Bae et al., 2014; Ishiguro et al., 2010; Khella, Short, & Malone, 2014; Ortega-Alvaro, Aracil-Fernandez, Garcia-Gutierrez, Navarrete, & Manzanares, 2011). Στον άνθρωπο, ο πολυμορφισμός CNR2 που κωδικεύει τον υποδοχέα, έχει συσχετιστεί με σχιζοφρένεια (Tong et al., 2013), κατάθλιψη (Onaivi et al., 2008), και διπολική διαταραχή (Minocci et al., 2011).

Οι CB₂ υποδοχείς φαίνεται πως ρυθμίζουν ποικίλες νευρωνικές λειτουργίες, όπως το στρες (Garcia-Gutierrez, Garcia-Bueno, Zoppi, Leza, & Manzanares, 2012), η μνήμη (Garcia-Gutierrez et al., 2013; Li & Kim, 2016), ο πόνος (Anand, Whiteside, Fowler, & Hohmann, 2009) και η ανταμοιβή (Zhang et al., 2016). Ενδεικτικά, η έκφρασή τους στα βασικά γάγγλια δίνει ερεθίσματα για θεραπευτικές προσεγγίσεις της νόσου Parkinson και της χορείας Huntington, η παρουσία τους στον ιππόκαμπο και στον προμετωπιαίο φλοιό έχει ερευνητικό ενδιαφέρον για τη νόσο Alzheimer και η έντονη έκφρασή τους στο εγκεφαλικό στέλεχος και στην παρεγκεφαλίδα ανοίγει ενδεχόμενες θεραπευτικές οδούς για μια πληθώρα διαταραχών όπως λόγου χάρη την παρεγκεφαλιδική αταξία. Ομοίως, ο ρυθμιστικός ρόλος τους σε περιοχές του μεσομεταιχμιακού συστήματος ανοίγει νέες προοπτικές για την αντιμετώπιση διαταραχών της ανταμοιβής, όπως για παράδειγμα τις εξαρτήσεις, ενώ δεδομένα σχετικά με τη διαμεσολάβηση των CB₂ υποδοχέων στη ρύθμιση της μικρογλοίωσης μπορούν να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη θεραπευτικών εργαλείων έναντι νευροεκφυλιστικών νόσων.

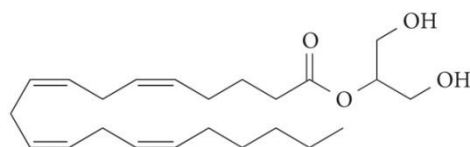
ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ

Η ανακάλυψη των υποδοχέων των κανναβινοειδών είχε ως επαύγασμα την διαπίστωση πως ο οργανισμός των θηλαστικών είναι ικανός να παράξει ενδογενείς αγωνιστές για τους υποδοχείς αυτούς. Τα ενδογενή κανναβινοειδή είναι νευροτροποποιητικά λιπίδια που ανήκουν στην ομάδα των εικοσανοειδών, των οποίων η σύνθεση και ο καταβολισμός υπόκειται σε ομοιοστατικές ρυθμίσεις. Ανάμεσα στα ενδογενή κανναβινοειδή, εκτενώς έχουν μελετηθεί το ανανδαμίδιο και η 2-AG (βλ. **Εικόνα 10**), τα οποία είναι παράγωγα του αραχιδονικού οξέος και συντίθενται ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού. Άλλα μόρια που ανήκουν στην οικογένεια των ενδογενών κανναβινοειδών είναι ο νολαδινικός αιθέρας (2-AGE), η βιροδαμίνη (OAE), η N-αραχιδονουλο-ντοπαμίνη (NADA), το δοκοσαετραενυλαιθανολαμίδιο (DEA) και το ομο-γ-λινολενυλαιθανολαμίδιο (HEA).

Όπως και η THC, το ανανδαμίδιο παρουσιάζει προφίλ μερικού αγωνιστή των δυο υποδοχέων των κανναβινοειδών. Η 2-AG είναι το πιο επικρατές ανάμεσα στα ενδογενή κανναβινοειδή και δρα ως πλήρης αγωνιστής των CB₁ και CB₂ υποδοχέων. Την ενεργοποίηση των υποδοχέων ακολουθεί η ταχύτατη επαναπρόσληψη των εκάστοτε ενδογενών κανναβινοειδών και η ενδοκυττάρια ενζυμική αποδόμησή τους. Παρακάτω γίνεται αναφορά των βασικών μεταβολικών οδών βιοσύνθεσης και καταβολισμού των δυο πιο μελετημένων κανναβινοειδών, του ανανδαμιδίου και της 2-AG.



Arachidonoyl ethanolamide



2-Arachidonoyl glycerol

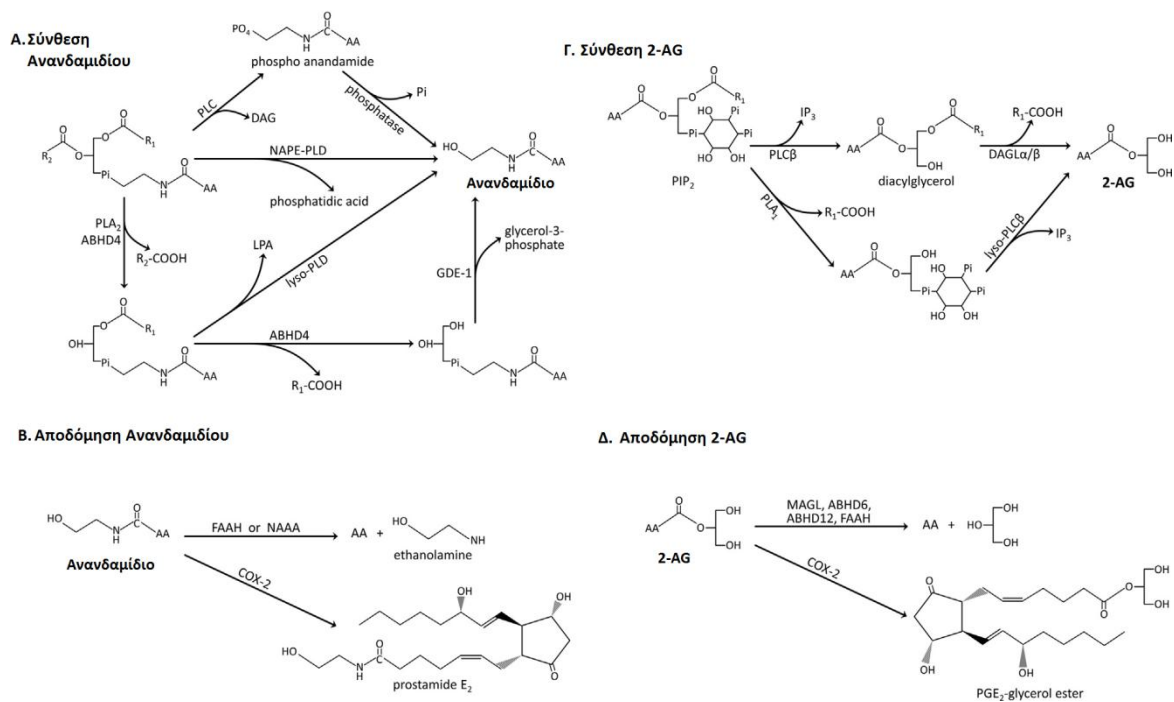
Εικόνα 10

Χημική δομή των κυριότερων ενδογενών κανναβινοειδών, ανανδαμιδίου και 2-AG, τα οποία προσδένονται στους CB₁ και CB₂ υποδοχείς (Mechoulam, Hanus, Pertwee, & Howlett, 2014)

Βιοσύνθεση και καταβολισμός κανναβινοειδών

Το ανανδαμίδιο και η 2-AG συντίθενται μετασυναπτικά «κατά παραγγελία». Ο μεταβολισμός των κανναβινοειδών είναι αρκετά πολύπλοκη διαδικασία (βλ. **Εικόνα 11**). Στη βιβλιογραφία αναφέρονται τουλάχιστον 5 μεταβολικές οδοί για τη σύνθεση του ανανδαμίδιου και των υπόλοιπων N-ακυλαιθανολαμινών (DEA, HEA), με πιο κοινή τη χρήση της N-ακυλφωσφατιδυλαιθανολαμίνης (αγγλ. N-acylphosphatidylethanolamine, NAPEs) ως πρόδρομο μόριο. Πρόκειται για τη μεταβολική οδό PLA όπου εμπλέκονται η φωσφολιπάση A2 (PLA2) και η λυσοφωσφολιπάση D (lysoPLD) (Sun et al., 2004). Όσο αφορά τη 2-AG, έχουν προταθεί μέχρι στιγμής δύο βασικές μεταβολικές οδοί για τη βιοσύνθεσή της με πιο σημαντική την εμπλοκή της φωσφολιπάσης C (PLC) και της λιπάσης της διακυλογλυκερόλης α (DAGLα).

Ταχύτατα μετά την ενεργοποίηση των υποδοχέων στόχων τους, τα κανναβινοειδή αποδεσμεύονται και υπόκεινται σε ενδοκυττάρια αποδόμηση, κατά κύριο λόγο από την υδρολάση του αμιδίου των λιπαρών οξέων (αγγλ. Fatty acid amide hydrolase, FAAH) στην περίπτωση του ανανδαμίδιου (Pryce et al., 2013) και από τη λιπάση της μονοακυλογλυκερόλης (αγγλ. Monoacylglycerol lipase, MAGL) στην περίπτωση της 2-AG (Ueda, Tsuboi, Uyama, & Ohnishi, 2011).



Εικόνα 11

Βασικές μεταβολικές οδοί βιοσύνθεσης και καταβολισμού ανανδαμίδιου και 2-AG (H. C. Lu & Mackie, 2016)

Παλίνδρομη σηματοδότηση ενδογενών κανναβινοειδών

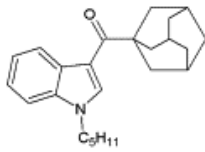
Το αναδαμίδιο και η 2-AG συντίθενται σύμφωνα με τις ανάγκες του οργανισμού, συνήθως ως απόκριση σε αυξημένη συγκέντρωση ενδοκυττάριου ασβεστίου. Είναι πλέον αποδεκτός ο ρόλος που διαδραματίζουν τα ενδογενή κανναβινοειδή (παρόλο που πιθανό να ισχύει μόνο για την 2-AG) ως παλίνδρομοι συναπτικοί αγγελιοφόροι οι οποίοι προλαμβάνουν την ανάπτυξη υπερβολικής νευρωνικής δραστηριότητας στο ΚΝΣ και τελικά συνεισφέρουν στη διατήρηση της ομοιόστασης, υπό φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες (Wilson & Nicoll, 2001). Υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν πως νευροδιαβιβαστές, όπως για παράδειγμα το γλουταμινικό οξύ, επάγουν μετασυναπτική αύξηση της συγκέντρωσης ενδοκυττάριου ασβεστίου με τρόπο που να συντελούν στη βιοσύνθεση και απελευθέρωση αναδαμίδιου και 2-AG στη σύναψη. Ως επακόλουθο, ενεργοποιούνται προσυναπτικοί CB₁ υποδοχείς κανναβινοειδών γεγονός που οδηγεί στη μείωση της απελευθέρωσης γλουταμινικού οξέος, GABA ή άλλων νευροδιαβιβαστών σε περιοχές όπως ο φλοιός, ο ιππόκαμπος, το κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο, η μέλαινα ουσία, ο υποθάλαμος και η παρεγκεφαλίδα (Ohno-Shosaku, Tanimura, Hashimoto-dani, & Kano, 2012). Υπάρχουν επίσης στοιχεία που υποστηρίζουν πως το αναδαμίδιο που παράγεται προσυναπτικά ως απόκριση στην ενεργοποίηση του μετασυναπτικού μεταβολοτρόπου υποδοχέα του γλουταμινικού οξέος MGLUR5, ενεργοποιεί μετασυναπτικούς TRPV1 διαύλους (Iannotti, Di Marzo, & Petrosino, 2016). Ακόμη, είναι άξιο αναφοράς πως παλίνδρομη σηματοδότηση της 2-AG επαγόμενη από ενεργοποίηση των MGLUR5, είναι ικανή να επιφέρει αναλγησία (Gregg et al., 2012). Οι παλίνδρομοι σηματοδοτικοί μηχανισμοί των ενδογενών κανναβινοειδών και ως εκ τούτου η τροποποίηση της συναπτικής πληροφορίας ερευνώνται από την επιστημονική κοινότητα καθότι είναι ακόμη εν μέρει αδιευκρίνιστοι.

ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ

Τα συνθετικά κανναβινοειδή είναι μιμητικά συνθετικά ανάλογα της κάνναβης, με μεγάλη χημική ετερογένεια και ακόμα μεγαλύτερο θεραπευτικό ενδιαφέρον. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η ρύθμιση του ενδογενούς συστήματος των κανναβινοειδών είναι πολλά υποσχόμενη ως θεραπευτική στρατηγική για την αντιμετώπιση ποικίλων ασθενειών. Ο φαρμακευτικός στόχος της ανάπτυξης τέτοιων συνθετικών ουσιών είναι η αποσύνδεση της θεραπευτικής ιδιότητας των κανναβινοειδών από τις ανεπιθύμητες ενέργειες που συνοδεύουν τη δράση τους. Λόγω του αυξανόμενου ενδιαφέροντος που παρουσιάζει ο CB₂ υποδοχέας και των ανεπιθύμητων παρενεργειών που προκαλεί η ενεργοποίηση του CB₁ υποδοχέα, δημιουργήθηκε μια θεμελιώδης ανάγκη για την ανάπτυξη αγωνιστών του CB₂ υποδοχέα των κανναβινοειδών.

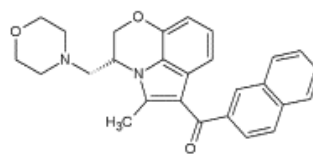
Τα πρώτα συνθετικά ανάλογα κανναβινοειδών είναι οι κυκλοεξυλ-φαινόλες (αγγλ. cyclohexylphenols, CP), οι οποίες αναπτύχθηκαν τις δεκαετίες του 1970 και 1980, με το συνθετικό CP55,940 να χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη της κατανομής και το χαρακτηρισμό του CB₁ υποδοχέα (Devane, Dysarz, Johnson, Melvin, & Howlett, 1988; Herkenham et al., 1990). Ακολούθησε η ανάπτυξη από την ομάδα του Δρ Raphael Mechoulam στο Hebrew University (HU) του HU-210, συνθετικής διβενζοπυρανόλης, δομικά όμοιας με την THC και πολύ ισχυρού αγωνιστή των CB₁ και CB₂ υποδοχέων (Ovadia, Wohlman, Mechoulam, & Weidenfeld, 1995). Τη δεκαετία του 1990, αναπτύχθηκε μια σειρά από αμινοαλκυλοινδόλες, όπως το συνθετικό WIN55,212 και μελετήθηκε η χρήση τους ως ενδεχόμενες ασφαλείς (μη ψυχοτρόπες) φαρμακοθεραπείες (Bell et al., 1991). Ο John W. Huffman (JWH) δημιούργησε την εκτενέστερη σειρά συνθετικών κανναβινοειδών με χημικές δομές που διαφέρουν από τις κλασσικές διβενζοπυρανόλες, διατηρούν ωστόσο τις κανναβομιμητικές τους δράσεις (Huffman et al., 2005). Άλλα συνθετικά κανναβινοειδή τα οποία αναπτύχθηκαν στην πορεία είναι η σειρά των AM-αναλόγων (Αλέξανδρος Μακρυγιάννης) (Carriero et al., 1998) και παράγωγα του ινδαζολ-καρβοξυαμίδιου (Jia et al., 2016). Μέχρι στιγμής εκατοντάδες συνθετικών αναλόγων κατηγοριοποιούνται στις ακόλουθες δομικές ομάδες: αδαμαντουλινδόλες, αμινοαλκυλοινδόλες, βενζουλοινδόλες, κυκλοεξυλφαινόλες, διβενζοπυράνια, ναφθουλοινδόλες, ναφθυλομεθοινδόλες, ναφθυλομεθυλινδίνες, ναφθυλοπυρόλες, φαινολοακετολοινδόλες, τετραμεθυλοκυκλοπροπυλικές κετονοινδόλες, κινολινοεστεροινδόλες και ινδαζολ-καρβοξυαμίδια (βλ. **Εικόνα 12**).

A. Adamantoylindole



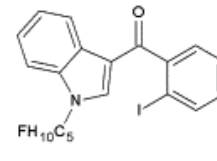
AB-001

B. Aminoalkylindole



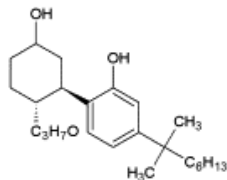
WIN 55,212-2

C. Benzoylindole



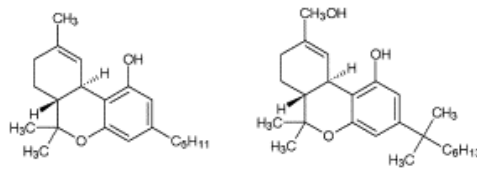
AM694

D. Cyclohexylphenol



CP 55,940

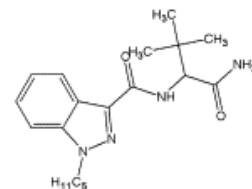
E. Dibenzopyran



delta-9-THC

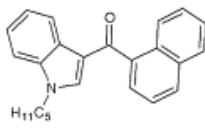
HU-210

F. Indazole carboxamide



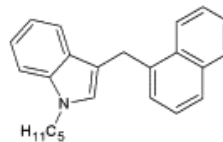
ADB-PINACA

G. Naphthoylindole



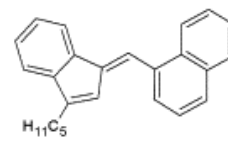
JWH-018

H. Naphthylmethylindole



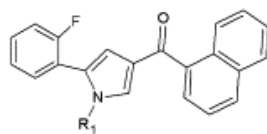
JWH-175

I. Naphthylmethyldiene



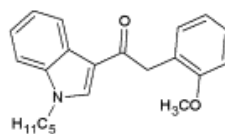
JWH-176

J. Naphthoylpyrrole



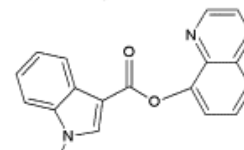
JWH-307

K. Phenylacetylindole



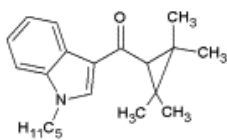
JWH-250

L. Quinolinylnyl ester indole



PB-22

M. Tetramethylcyclopropyl ketone indole



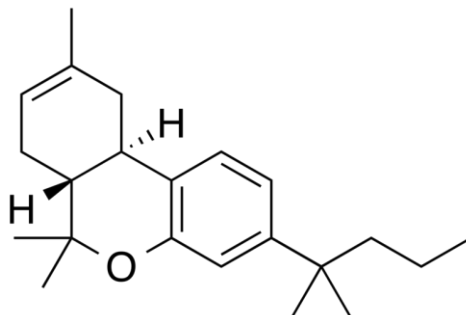
UR-144

Εικόνα 12

Κατηγοριοποίηση συνθετικών αναλόγων των κανναβινοειδών σύμφωνα με τη χημική δομή τους (Castaneto et al., 2014)

Το παράδειγμα του συνθετικού κανναβινοειδούς JWH-133

Το JWH-133 (βλ. **Εικόνα 13**) αποτελεί ισχυρό αγωνιστή του CB₂ υποδοχέα των κανναβινοειδών με σταθερά αποδέσμευσης $K_i = 3,4 \text{ nM}$ (και $K_i = 677 \text{ nM}$ για τον CB₁) και με συγγένεια δέσμευσης 200 φορές μεγαλύτερη για τον CB₂ υποδοχέα από τον CB₁. Αναπτύχθηκε και πήρε το όνομά του από τον John W. Huffman.



(6aR,10aR)-3-(1,1-Dimethylbutyl)-6a,7,10,10a-tetrahydro -
6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran

Εικόνα 13

Στερεοχημική δομή και χημικός τύπος του JWH-133

JWH-133 και κοκαΐνη

Πρόσφατες έρευνες της ομάδας του Xi (Zhang et al., 2016) έδειξαν πως τοπική μικροέγχυση JWH-133 στον επικλινή πυρήνα, προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη καταστολή της ενδοφλέβιας αυτοχορήγησης κοκαΐνης σε επίμυες. Επιπλέον, ο παραπάνω πειραματικός χειρισμός ανέστειλε την αυξημένη κινητικότητα που προκαλεί η κοκαΐνη σε μύες και την επαγόμενη από κοκαΐνη απελευθέρωση ντοπαμίνης στον επικλινή πυρήνα σε μύες και επίμυες. Αξιοσημείωτη είναι η έλλειψη δράσης –ενισχυτικής ή ανηδονικής- του εν λόγω αγωνιστή σε μύες ή επίμυες.

Τα παραπάνω δεδομένα προερχόμενα από την ομάδα του Xi, καθώς και ορισμένες άλλες μελέτες που ασχολήθηκαν με τη σχέση εθισμού και συστήματος ενδοκανναβινοειδών (της CB₂ σηματοδότησης ειδικότερα), αποτέλεσαν για την παρούσα έρευνα θεμέλιο πάνω στο οποίο βασίστηκε ο σχεδιασμός των πειραμάτων που την απαρτίζουν.

ΣΚΟΠΟΣ

Όπως προαναφέρθηκε, δεδομένα των τελευταίων ετών προάγουν την υπόθεση εμπλοκής του συστήματος των ενδοκανναβινοειδών και κυρίως της σηματοδότησης που διαμεσολαβείται από τους CB₂ υποδοχείς, σε διεργασίες ανταμοιβής και εθισμού σε ουσίες. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να προσθέσει υποστηρικτικά δεδομένα στην πιο πάνω υπόθεση, και να αποτελέσει ενδεχομένως βοηθητικό υλικό για την ανάπτυξη φαρμακοθεραπειών έναντι του εθισμού σε ουσίες.

Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία εξετάσαμε τη δράση του JWH-133, αγωνιστή των CB₂ υποδοχέων των κανναβινοειδών, στην ενισχυτική δράση της κοκαΐνης χρησιμοποιώντας το πρότυπο του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού. Ειδικότερα, προκειμένου να εξετάσουμε κατά πόσον η επίδραση του JWH-133 στην ενισχυτική δράση της κοκαΐνης διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση των CB₂ υποδοχέων του κοιλιακού καλυπτρικού πεδίου, η χορήγηση του φαρμάκου έγινε με μικροέγχυση στην περιοχή του κοιλιακού καλυπτρικού πεδίου. Για να ελέγξουμε την ειδικότητα των CB₂ υποδοχέων στις δράσεις που παρατηρήθηκαν, σε δεύτερη σειρά πειραμάτων ελέγχθηκε η αντιστροφή των δράσεων του JWH-133 με την προχορήγηση του ανταγωνιστή των CB₂ υποδοχέων (SR144528).

Η μελέτη της δράσης του JWH-133 στην ενισχυτική δράση της κοκαΐνης και η αναστολή των επιδράσεών του από το SR144528 πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου μετατόπισης της καμπύλης του προτύπου του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Για το σύνολο των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν 16 άρρενες επίμυες Sprague-Dawley. Η χειρουργική επέμβαση για την εμφύτευση του απαραίτητου συστήματος για τον ενδοκρανιακό αυτοερεθισμό και τη μικροέγχυση λάμβανε χώρα όταν το βάρος των επίμυων ήταν 330-350 γραμμάρια.

Οι συνθήκες διαβίωσης περιλάμβαναν 12ωρο κύκλο εναλλαγής φωτός/σκότους, σταθερή θερμοκρασία δωματίου (20-23 °C) και ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν κατά τη διάρκεια της φωτεινής φάσης του 24ωρου κύκλου και σε σταθερή θερμοκρασία δωματίου. Τα ζώα τοποθετούνταν σε κλωβούς ανά 3-4 κατά την περίοδο που ακολουθούσε τον απογαλακτισμό τους ενώ μετά την επέμβαση τοποθετούνταν μεμονωμένα σε ατομικούς κλωβούς.

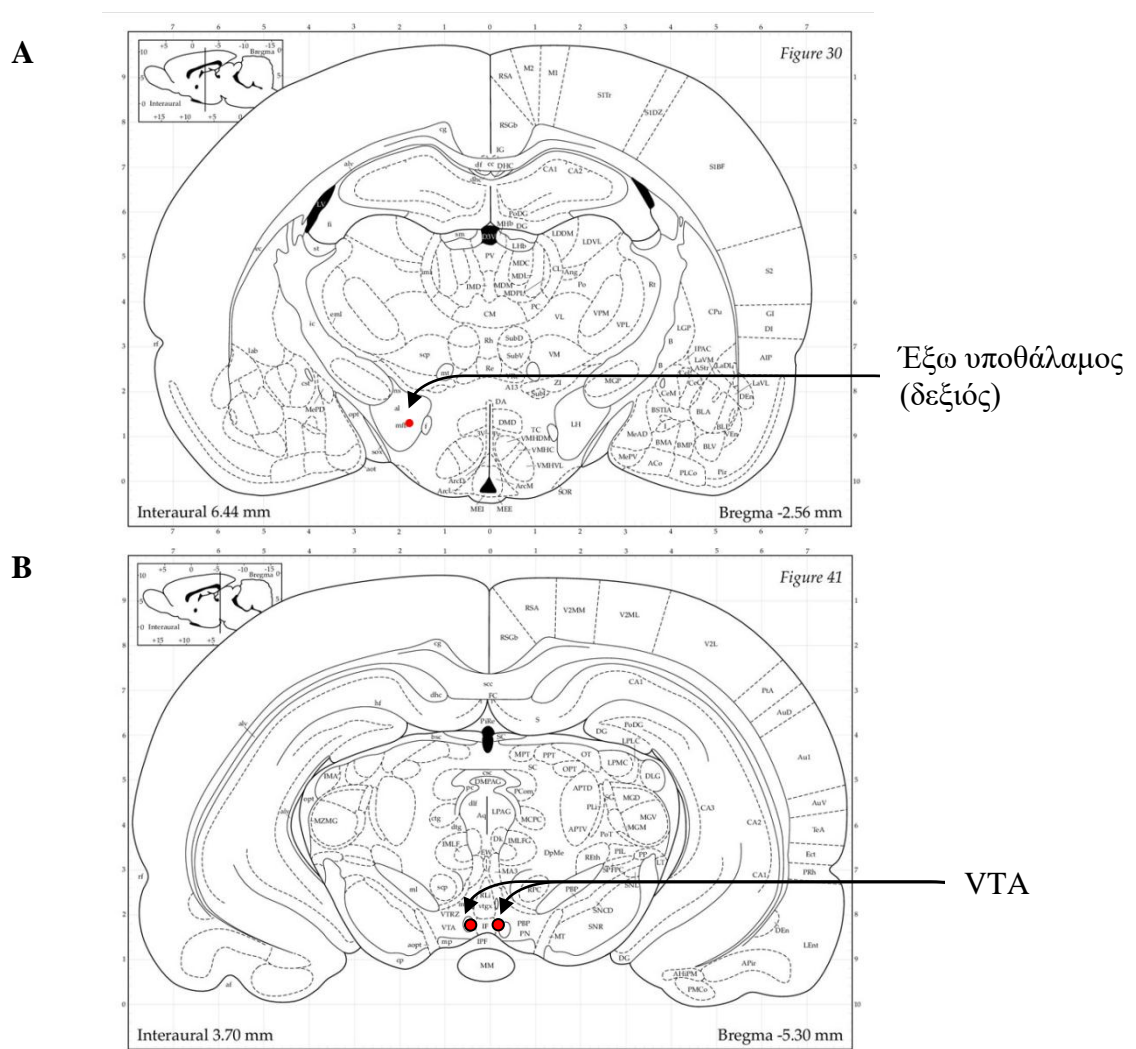
Οι συνεδρίες του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού πραγματοποιούνταν σε σταθερή –για το εκάστοτε ζώο– ώρα σε καθημερινή βάση. Τα ζώα υπόκειντο σε εξοικείωση με τον πειραματιστή 7 μέρες πριν και μετά τη χειρουργική επέμβαση. Επιπλέον, έλαβαν ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις και ενδοεγκεφαλικές εγχύσεις με φυσιολογικό ορό, ώστε να εξοικειωθούν με τις πειραματικές διαδικασίες.

Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων τα ζώα θυσιάζονταν με εγκεκριμένη μέθοδο ευθανασίας.

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΕΣ ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ

Για τον σκοπό της έρευνας στα πειραματόζωα πραγματοποιήθηκε εμφύτευση ηλεκτροδίου στην περιοχή του δεξιού έξω υποθαλάμου και οδηγών σωλήνων αμφοτερόπλευρα στην περιοχή του κοιλιακού καλυπτρικού πεδίου (VTA) (βλ. **Εικόνα 14**). Οι χειρουργικές επεμβάσεις πραγματοποιούνταν σε άσηπτο περιβάλλον υπό την επήρεια γενικής αναισθησίας. Για την αναισθησία, χορηγούνταν ενδομυϊκή ένεση υδροχλωρικής κεταμίνης (100 mg/kg) και ξυλαζίνης (10 mg/kg). Επιπλέον, χορηγούνταν ενδομυϊκά θειική ατροπίνη (0,6 mg/kg) για τη μείωση των βρογχικών εκκρίσεων και συνθετική βιταμίνη K₁ (φυτομεναδιόνη, 4 mg/kg) ως πρόδρομος παράγων πήξης.

Για την εμφύτευση του συστήματος ηλεκτροδίου και οδηγών σωλήνων χρησιμοποιήθηκε στερεοταξική συσκευή (David Kopf Instruments) και οι συντεταγμένες εμφύτευσης υπολογίστηκαν σύμφωνα με τον στερεοταξικό άτλαντα των Paxinos & Watson (2014). Το ηλεκτρόδιο κατέληγε στην έσω τηλεγκεφαλική δεσμίδα (medial forebrain bundle, MFB) στο επίπεδο του δεξιού έξω υποθαλάμου (-2.56 mm προσθιοπίσθια από το βρέγμα, -1.7 mm από τη μέση οβελιαία ραφή και -8.6 mm ραχαιοκοιλιακά από την επιφάνεια του κρανίου). Οι οδηγοί σωλήνων κατέληγαν 1.0 mm πάνω από την περιοχή του VTA (-5.3 mm προσθιοπίσθια από το βρέγμα, 0.5 mm δεξιά και αριστερά από τη μέση οβελιαία ραφή και -7.2 mm από την επιφάνεια του κρανίου).



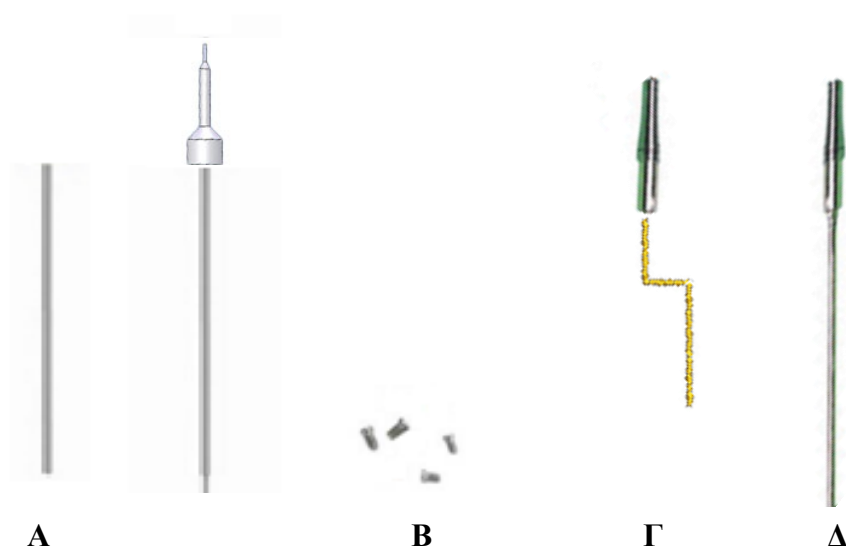
Εικόνα 14

Απεικόνιση επιλεγμένων στεφανιαίων τομών εγκεφάλου επίμυος. Τα σημεία απεικονίζουν τις περιοχές στόχους εμφύτευσης ηλεκτροδίου (A) και μικροέγχυσης (B) (Atlas Source: Paxinos, George, and Charles Watson. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Access Online via Elsevier, 2006)

Εμφυτεύθηκαν ηλεκτρόδια κατασκευασμένα από σύρμα ανοξείδωτου χάλυβα διαμέτρου 0.25 mm. Τα ηλεκτρόδια ήταν μονωμένα με ειδικό βερνίκι σε όλο το μήκος τους, με εξαίρεση την άνω άκρη τους η οποία συνδεόταν με ακίδα προερχόμενη από βελόνη σύριγγας μιας χρήσεως 21G και την κάτω κωνική αιχμή τους η οποία ήταν υπεύθυνη για τη διέγερση της εφαπτομένης σ' αυτήν περιοχής.

Η άνοδος κατασκευαζόταν από σύρμα ανοξείδωτου χάλυβα το οποίο συνδεόταν στην άνω άκρη του με ακίδα προερχόμενη από βελόνη σύριγγας μιας χρήσεως 21G. Οι οδηγοί σωλήνες κατασκευάζονταν από βελόνη σύριγγας μιας χρήσεως 23G και είχαν μήκος 23 mm. Τέσσερις μικρές βίδες, το ηλεκτρόδιο, η άνοδος και οι οδηγοί σωλήνες σταθεροποιούνταν με ακρυλικό πολυμερές στο κρανίο του πειραματοζώου (βλ. **Εικόνα 15**). Τέλος, στο χειρουργικό τραύμα γινόταν συρραφή με τη χρήση μεταξωτού ράμματος.

Οι εκπαιδεύσεις για τα πειράματα του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού ξεκινούσαν μια εβδομάδα μετά τη στερεοταξική επέμβαση. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σ' όλες τις φάσεις των πειραμάτων τηρούνταν οι κανόνες δεοντολογίας της Αμερικανικής Εταιρείας Νευροεπιστημών.



Εικόνα 15

Απαραίτητα εξαρτήματα για τον ενδοκρανιακό αυτοερεθισμό, τη μικροέγχυση και τη σταθεροποίηση του συστήματος στο κρανίο του πειραματοζώου. Οδηγός σωλήνα και μικροεγχυτήρας (Α), βίδες (Β), ηλεκτρόδιο (Γ) και άνοδος (Δ).

ΠΡΟΤΥΠΟ ΕΝΔΟΚΡΑΝΙΑΚΟΥ ΑΥΤΟΕΡΕΘΙΣΜΟΥ

Το πρότυπο του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού βασίζεται στην ανακάλυψη των Milner & Olds ότι ο άμεσος ηλεκτρικός ερεθισμός του εγκεφάλου μπορεί να είναι ιδιαίτερα ενισχυτικός και ότι επίμυες που τους έχει εμφυτευθεί ηλεκτρόδιο σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου είναι σε θέση να μάθουν να πιέζουν ένα μοχλό σε ένα κλωβό συντελεστικής μάθησης (Skinner Box), για να αυτοερεθίσουν με ηλεκτρικό ρεύμα την εν λόγω περιοχή. Οι περιοχές αυτές αποκαλέστηκαν από τον Olds «κέντρα ηδονής» (Olds & Milner, 1954).

Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι οι εξαρτησιογόνοι ουσίες επιδρούν στη συμπεριφορά αυτή επηρεάζοντας το υπόστρωμα του ενισχυτικού εγκεφαλικού ερεθισμού (Παναγής, 2002).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΤΟΥ ΕΡΕΘΙΣΜΟΥ

Τα πειράματα του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού πραγματοποιήθηκαν σε κλωβούς συντελεστικής μάθησης Skinner (Skinner Box). Οι κλωβοί αυτοί ήταν κατασκευασμένοι από Plexiglas (25 x 25 x 30 cm) και στο αριστερό μέρος του κάθε κλωβού ήταν τοποθετημένος ένας μεταλλικός μοχλός που βρισκόταν σε ύψος 4cm πάνω από τη βάση του κλωβού.

Το ηλεκτρόδιο συνδεόταν με ηλεκτρικό διεγέρτη (Med Associates, St. Albans, VT, USA). Η σύνδεση αυτή ήταν κατασκευασμένη με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτρέπει στο ζώο να κινείται ελεύθερα στον κλωβό. Κάθε πίεση του μοχλού ενεργοποιούσε το διεγέρτη με αποτέλεσμα το ζώο να δέχεται ηλεκτρικό ερέθισμα ως ανταμοιβή. Το ηλεκτρικό ερέθισμα που δεχόταν το πειραματόζωο ως ανταμοιβή ήταν μια σειρά παλμών με τα εξής χαρακτηριστικά: είχε διάρκεια 0.4sec και αποτελούνταν από τετραγωνικούς καθοδικούς παλμούς σταθερής διάρκειας (0.1msec) και έντασης (250μΑ) και ποικίλης συχνότητας (15-125 Hz, δηλαδή 6-50 αριθμούς παλμών/0.4sec). Ο αριθμός των πιέσεων του μοχλού καταγράφονταν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ ΣΤΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΕΝΔΟΚΡΑΝΙΑΚΟΥ ΑΥΤΟΕΡΕΘΙΣΜΟΥ

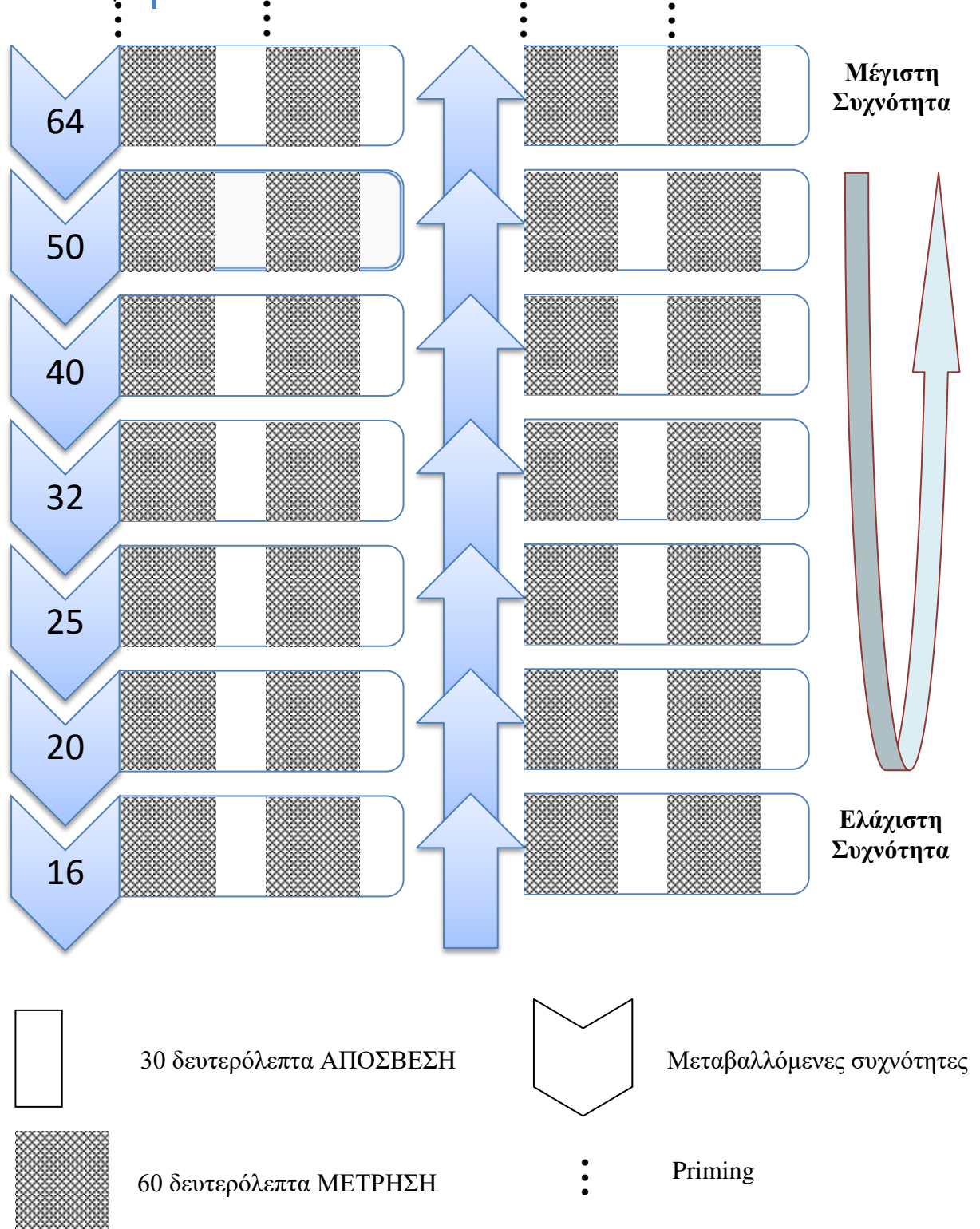
Πριν από την έναρξη των πειραμάτων του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού προηγήθηκε η εκπαίδευση των πειραματόζωων. Την πρώτη φορά που το ζώο τοποθετείτο στον κλωβό αφηνόταν να εξερευνήσει τον χώρο για λίγα λεπτά. Στη συνέχεια, χορηγούνταν ηλεκτρικά ερεθίσματα συχνότητας 50 παλμών και έντασης 250 μ A. Από την αντίδρασή του πειραματόζωου γινόταν μια πρώτη εκτίμηση για το αν η εμφύτευση του ηλεκτροδίου ήταν επιτυχημένη.

Εν συνεχεία ο επίμυς δεχόταν ερέθισμα μόνο όταν πλησίαζε τον μοχλό, έτσι ώστε να συνδέσει την πίεση του μοχλού με το ενισχυτικό ερέθισμα και να εκδηλώσει τη συμπεριφορά του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού. Ακολούθως, ο επίμυς παρέμενε για μία ώρα στον κλωβό όπου λάμβανε ερέθισμα σταθερής έντασης και συχνότητας κάθε φορά που πίεζε το μοχλό. Αυτό επαναλαμβανόταν για δύο ακόμα μέρες.

Στο διάστημα που ακολουθούσε, οι επίμυες εκπαιδεύονταν να αυτοερεθίζονται με την αυτοχορήγηση τεσσάρων εναλλασσόμενων σειρών μεταβαλλόμενων συχνοτήτων. Οι συχνότητες ξεκινούσαν από την υψηλότερη και αφού έφθαναν στη χαμηλότερη (2 μετρήσεις ανά συχνότητα) κατέληγαν προοδευτικά και πάλι στην υψηλότερη (άλλες 2 μετρήσεις ανά συχνότητα). Λαμβάνονταν συνολικά 4 μετρήσεις ανά συχνότητα.

Κάθε μέτρηση είχε διάρκεια 60sec και ακολουθείτο από μια περίοδο απόσβεσης 30sec. Πριν από την έναρξη της εκπαίδευσης ή της πειραματικής διαδικασίας ο επίμυς αφηνόταν να πιέζει το μοχλό για 60sec στην υψηλότερη συχνότητα, ως υπενθύμιση της πειραματικής διαδικασίας. Η μέτρηση αυτή δεν καταγραφόταν και δεν λαμβανόταν υπόψιν. Επιπροσθέτως, πριν από την έναρξη της κάθε δοκιμής ο επίμυς δεχόταν 3 σειρές παλμών ερεθισμού (priming) ως υπενθύμιση, στην ίδια συχνότητα παλμών της δοκιμής που ακολουθούσε (**βλ. Εικόνα 16**). Από το σύνολο των δοκιμών προέκυπτε η καμπύλη συχνότητας ερεθισμού-αντιδράσεων πειραματόζωου (καμπύλη ενίσχυσης του εγκεφαλικού ερεθισμού).

Η διαδικασία αυτή επαναλαμβανόταν καθημερινά έως ότου η καμπύλη της ενίσχυσης του εγκεφαλικού ερεθισμού παρέμενε σταθερή και δεν παρουσίαζε απόκλιση μεγαλύτερη του 10% για 3 ημέρες. Η πειραματική διαδικασία ξεκινούσε μόλις οι αντιδράσεις του επίμυ είχαν σταθεροποιηθεί.



Εικόνα 16

Σχηματική απεικόνιση του προγράμματος μεταβαλλόμενων συχνοτήτων στο οποίο βασίστηκε ο υπολογισμός του ουδού ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού και της ασυμπτώτου. Πριν από την έναρξη της κάθε δοκιμής ο επίμυς δεχόταν 3 σειρές παλμών ερεθισμού ως υπενθύμιση. Οι συχνότητες ξεκινούσαν από την υψηλότερη (ενδεικτικά 64 Hz) και αφού έφθαναν στη χαμηλότερη (ενδεικτικά 16 Hz)(2 μετρήσεις ανά συχνότητα με ενδιάμεση απόσβεση 30 δευτερολέπτων) κατέληγαν προοδευτικά και πάλι στην υψηλότερη. Μ' αυτόν τον τρόπο λαμβάνονταν συνολικά 4 μετρήσεις ανά συχνότητα. Από το σύνολο των δοκιμών προέκυπτε η καμπύλη συχνότητας ερεθισμού-αντιδράσεων πειραματοζώου.

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Κάθε καμπύλη ενίσχυσης του εγκεφαλικού ερεθισμού αναλύθηκε με βάση την παραλλαγή του σιγμοειδούς μοντέλου του Compertz (Coulombe & Miliaressis, 1987):

$$f(X)=ae^{-e^{b(xi-x)}}$$

όπου το a αντιστοιχεί στο μέγιστο ποσοστό αντίδρασεων του πειραματόζωου (ασύμπτωτος) και το x_i εκφράζει τη συχνότητα στην οποία αντιστοιχεί ο ουδός του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού. Ο ουδός είναι ο αριθμός των παλμών που αντιστοιχεί στο 36,7% της τιμής της ασύμπτωτου, δηλαδή το σημείο το οποίο βρίσκεται στην περιοχή της καμπύλης με την μεγαλύτερη κλίση. Η ασύμπτωτος b αντιπροσωπεύει ένα δείκτη της κλίσης της καμπύλης και το e αποτελεί τη βάση των νεπέριων λογαρίθμων.

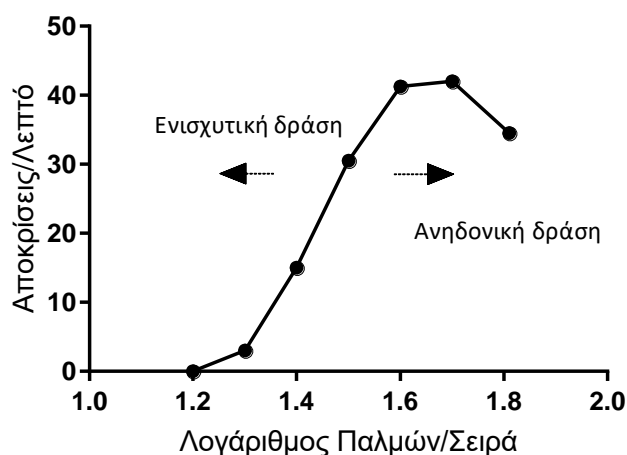
Η ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μετατόπισης της καμπύλης, αφενός γιατί έχει αποδειχθεί έγκυρη και αξιόπιστη και αφετέρου διότι έχει κριθεί η καταλληλότερη για μελέτες όπου ζητούμενο είναι να εκτιμηθούν οι πιθανές ενισχυτικές ή ανηδονικές δράσεις ψυχοτρόπων φαρμάκων.

Πρόκειται για μια ψυχοφυσική μέθοδο με την οποία καταγράφεται η συμπεριφορά ενός οργανισμού στις μεταβολές μιας παραμέτρου του ερεθίσματος όπως η συχνότητα ερεθίσματος, η ένταση ερεθίσματος, η διάρκεια παλμού, η διάρκεια παλμοσειράς κτλ. Με την μέθοδο αυτή προκύπτει μια σιγμοειδής καμπύλη που μοιάζει με τις κλασικές λογαριθμικές δόσοεξαρτώμενες φαρμακολογικές καμπύλες. Η διαφορά τους έγκειται στο γεγονός ότι στη μια περίπτωση μελετάται η αποτελεσματική δόση ενός φαρμάκου και στην άλλη η «δόση» ή η αποτελεσματικότητα του ηλεκτρικού ερεθίσματος.

Σε μελέτες στις οποίες χρησιμοποιείται το πρότυπο του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού λαμβάνουμε δύο καμπύλες η μία από τις οποίες είναι αποτέλεσμα κάποιου πειραματικού χειρισμού (π.χ. η χορήγηση ενός φαρμάκου) ενώ η άλλη έχει ληφθεί σε συνθήκες ελέγχου. Συγκρίνοντας τις καμπύλες αυτές μπορούμε να εξαγάγουμε συμπεράσματα για τη δράση του συγκεκριμένου πειραματικού χειρισμού στη συμπεριφορά ανταμοιβής και στην κινητική δραστηριότητα του πειραματόζωου.

Παρατηρείται αν ο πειραματικός χειρισμός μετατοπίζει την καμπύλη κάθετα ή οριζόντια και πόσο. Σημαντική μετατόπιση της καμπύλης προς τα δεξιά (δηλαδή προς τις υψηλότερες τιμές ερεθισμάτων) ή προς τα αριστερά (προς τις χαμηλότερες τιμές ερεθισμάτων), ερμηνεύεται ως αλλαγή στην αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης του εγκεφαλικού ερεθισμού (βλ. **Εικόνα 17**).



Εικόνα 17

Μέθοδος μετατόπισης της καμπύλης. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι συχνότητες εκφρασμένες ως λογάριθμος παλμών/σειρά ενώ στον κάθετο άξονα απεικονίζεται ο αριθμός των αποκρίσεων του πειραματοζώου εκφρασμένος ως πιέσεις μοχλού/λεπτό. Αρχικά λαμβάνεται μια βασική μέτρηση από την οποία προκύπτει μια σιγμοειδής καμπύλη συχνότητας/αποκρίσεων. Στη συνέχεια χορηγείται το υπό μελέτη φάρμακο και λαμβάνεται μια δεύτερη σειρά μετρήσεων από την οποία προκύπτει μια δεύτερη σιγμοειδής καμπύλη συχνότητας/αποκρίσεων. Μετατόπιση της δεύτερης καμπύλης προς τα αριστερά υποδηλώνει ενισχυτική δράση του φαρμάκου, ενώ προς τα αριστερά ανηδονική δράση.

Αν λοιπόν μετά από ένα πειραματικό χειρισμό απαιτηθεί διπλάσιος αριθμός παλμών ερεθισμού από ότι συνήθως για να επιτευχθεί ένα συγκεκριμένο επίπεδο απόκρισης, τότε μπορούμε να πούμε ότι η αποτελεσματικότητα του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού έχει μειωθεί στο μισό. Μετατοπίσεις προς τα πάνω ή προς τα κάτω, δηλαδή προς υψηλότερα ή προς χαμηλότερα ποσοστά αντιδράσεων του πειραματόζωου ερμηνεύονται ως αλλαγές στην κινητική απόδοση του πειραματόζωου.

Από τα ανωτέρω καθίσταται σαφές ότι η συγκεκριμένη μέθοδος δίνει τη δυνατότητα ποσοτικής εκτίμησης πειραματικών χειρισμών που επηρεάζουν την

ανταμοιβή. Για το λόγο αυτό θεωρείται αξιόπιστη και έγκυρη για τη μελέτη της πιθανής ενισχυτικής ή ανηδονικής δράσης ψυχοτρόπων ουσιών.

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ ΣΗΜΕΙΩΝ ΕΜΦΥΤΕΥΣΕΩΣ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟΥ ΚΑΙ ΟΔΗΓΩΝ ΚΑΝΟΥΛΑΣ

Μετά το πέρας των πειραμάτων, τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν και ακολούθησε η εξαγωγή του εγκεφάλου τους και η τοποθέτησή του σε διάλυμα 10% φορμόλης για τουλάχιστον 24 ώρες. Έπειτα κάθε εγκέφαλος κοβόταν σε μετωπιαίες τομές πάχους 60 μm με τη χρήση κρυοτόμου (Leica, CM1850), ώστε να επαληθευτεί η θέση εμφύτευσης του ηλεκτροδίου και των οδηγών κάνουλας. Οι τομές εξετάζονταν σε οπτικό μικροσκόπιο. Μόνο οι επίμυες στους οποίους η εμφύτευση πραγματοποιήθηκε επιτυχώς συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση και στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΧΟΡΗΓΗΣΕΙΣ

Για τις συστημακές χορηγήσεις κοκαΐνης, χρησιμοποιήθηκε υδροχλωρική κοκαΐνη (Κρατικό Μονοπώλιο Ναρκωτικών, Υπουργείο Υγείας) συγκεντρώσεως 5 mg/kg η οποία διαλύθηκε σε 0,9% φυσιολογικό ορό και χορηγήθηκε ενδοπεριτοναικά σε τελικό όγκο 1 ml/kg μάζας σώματος.

Για τις ενδοεγκεφαλικές μικροεγχύσεις του αγωνιστή και ανταγωνιστή των υποδοχέων των κανναβινοειδών χρησιμοποιήθηκε εγχυτήρας 30G (Plastics One) ο οποίος τοποθετείτο στον οδηγό σωλήνα και προεξείχε από αυτόν κατά 1 mm επιτρέποντας έτσι την έγχυση των φαρμάκων στην περιοχή του κοιλιακού καλυπτρικού πεδίου. Ο εγχυτήρας συνδεόταν μέσω μικρού σωλήνα πολυαιθυλενίου σε μικροσύριγγα χωρητικότητας 1 ml. Η μικροσύριγγα πραγματοποιούσε την έγχυση μέσω μιας αντλίας μικροέγχυσης (Storr et al.) με ρυθμό 0,5 ml/λεπτό.

Συνολικός όγκος 0,5 ml JWH-133 (10 µg/ml) ή/και SR144528 (0,4 µg/ml) ανά πλευρά χορηγείτο ενδοεγκεφαλικά σε διάστημα 1 λεπτού κατά τη διάρκεια του οποίου περιοριζόταν κάθε κινητική δραστηριότητα του πειραματοζώου. Ο εγχυτήρας παρέμενε στον οδηγό σωλήνα για 1 επιπλέον λεπτό ώστε να επιτευχθεί μέγιστη διάχυση της επιθυμητής ποσότητας του φαρμάκου στον εγκεφαλικό ιστό. Η διαδικασία επαναλαμβανόταν ομοίως και στον άλλο οδηγό σωλήνα για αμφίπλευρη έγχυση των φαρμάκων.

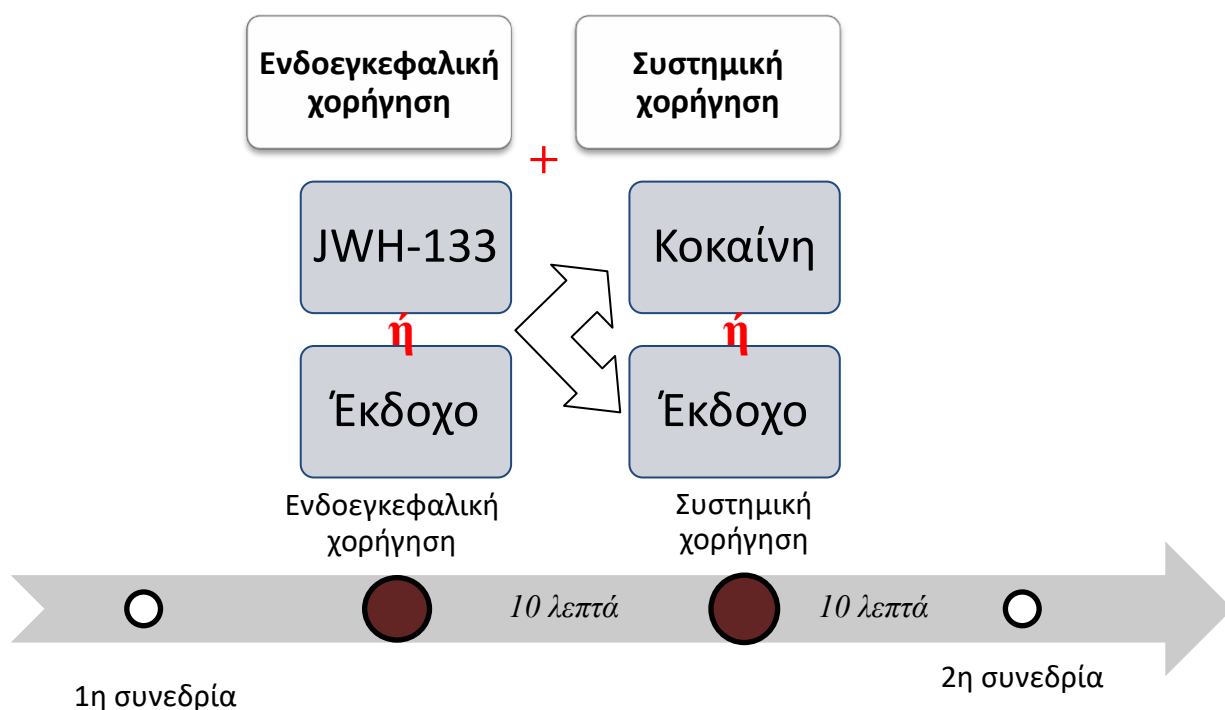
Τα φάρμακα JWH-133 και SR144528 διαλύθηκαν σε 5% DMSO (dimethylsulfoxide) και σε 0,9% φυσιολογικό ορό με τη βοήθεια λουτρού υπερήχων (Ultrasonic Degas Bath, MRC scientific instruments).

Υπήρξε αντιστάθμιση στη σειρά χορήγησης των διαφορετικών φαρμάκων και μεσολαβούσε διάστημα 3 ημερών μεταξύ των χορηγήσεων καθώς το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα είναι αρκετό για να επανέλθει η συμπεριφορά ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού στα προ-χειρισμού επίπεδα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Μελέτη της επίδρασης μικροέγχυσης του JWH-133 στο κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο στην ενισχυτική δράση της κοκαΐνης

Στόχος της πρώτης μελέτης ήταν να εξεταστεί η συμμετοχή των CB₂ υποδοχέων των κανναβινοειδών στο κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο στην ενισχυτική δράση της κοκαΐνης χρησιμοποιώντας το πρότυπο του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού. Χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό οκτώ άρρενες επίμυες οι οποίοι έλαβαν ένα συνδυασμό ενδοεγκεφαλικών μικροεγχύσεων JWH-133 (0,01 ng/αμφίπλευρη έγχυση) ή εκδόχου (5% DMSO σε φυσιολογικό ορό, αντιστοίχου όγκου) και συστημικών χορηγήσεων κοκαΐνης (5 mg/kg) ή εκδόχου (0,9% φυσιολογικός ορός, αντιστοίχου όγκου) (βλ. **Εικόνα 18**). Η ενδοεγκεφαλική μικροέγχυση του αγωνιστή ή του εκδόχου του πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά την πρώτη συνεδρία ενδοκρανιακού ερεθισμού και 10 λεπτά αργότερα ακολουθούσε η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση κοκαΐνης ή εκδόχου. Μετά την πάροδο 10 ακόμη λεπτών, πραγματοποιήθηκε και η δεύτερη συνεδρία ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού. Υπήρξε αντιστάθμιση στη σειρά χορήγησης των διαφορετικών φαρμάκων και μεσολαβούσε διάστημα 3 ημερών μεταξύ των χορηγήσεων.



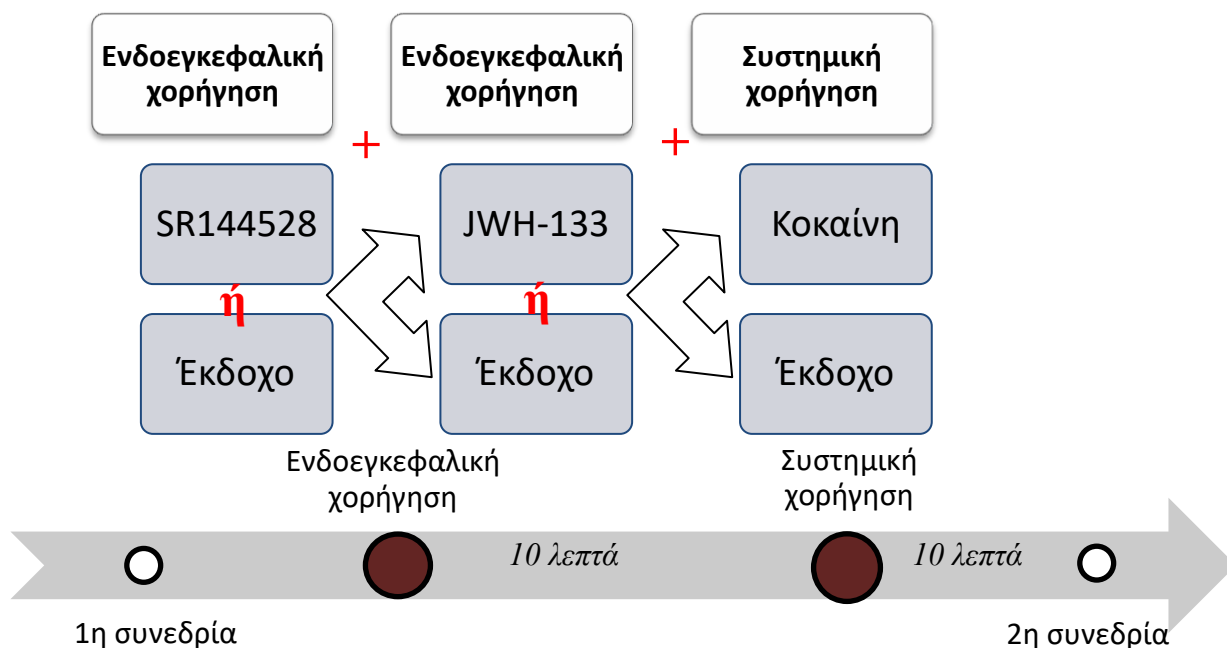
Εικόνα 18

Πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης της επίδρασης μικροέγχυσης στο κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο του JWH-133 στην ενισχυτική δράση της κοκαΐνης

Μελέτη αναστροφής της επίδρασης μικροέγχυσης του JWH-133 στο κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο στην ενισχυτική δράση της κοκαΐνης με τον SR144528

Η μελέτη που ακολούθησε είχε στόχο να διερευνήσει κατά πόσο η δράση της μικροέγχυσης στο κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο του JWH-133 στην ενισχυτική δράση της κοκαΐνης διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση των CB₂ υποδοχέων του κοιλιακού καλυπτρικού πεδίου. Χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό οκτώ άρρενες επίμυες οι οποίοι έλαβαν ένα συνδυασμό ενδοεγκεφαλικών μικροεγχύσεων SR144528 (0,008 ng/αμφίπλευρη έγχυση) ή εκδόχου (5% DMSO και φυσιολογικό ορό, αντιστοίχου όγκου) ή/και JWH-133 (0,01 ng/αμφίπλευρη έγχυση) ή εκδόχου (5% DMSO και φυσιολογικό ορό, αντιστοίχου όγκου) καθώς και συστημικών χορηγήσεων κοκαΐνης (5 mg/kg) ή εκδόχου (0,9% φυσιολογικός ορός, αντιστοίχου όγκου) (βλ. **Εικόνα 19**). Η ενδοεγκεφαλική μικροέγχυση των φαρμάκων ή του εκδόχου τους πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά την πρώτη συνεδρία ενδοκρανιακού ερεθισμού και 10 λεπτά αργότερα ακολουθούσε η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση κοκαΐνης ή εκδόχου. Μετά την πάροδο 10 ακόμη λεπτών, πραγματοποιήθηκε και η δεύτερη συνεδρία ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού.

Υπήρξε αντιστάθμιση στη σειρά χορήγησης των διαφορετικών φαρμάκων και μεσολαβούσε διάστημα 3 ημερών μεταξύ των χορηγήσεων.



Εικόνα 19

Πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης αναστροφής της επίδρασης μικροέγχυσης του JWH-133 στο κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο στην ενισχυτική δράση της κοκαΐνης με τον SR144528

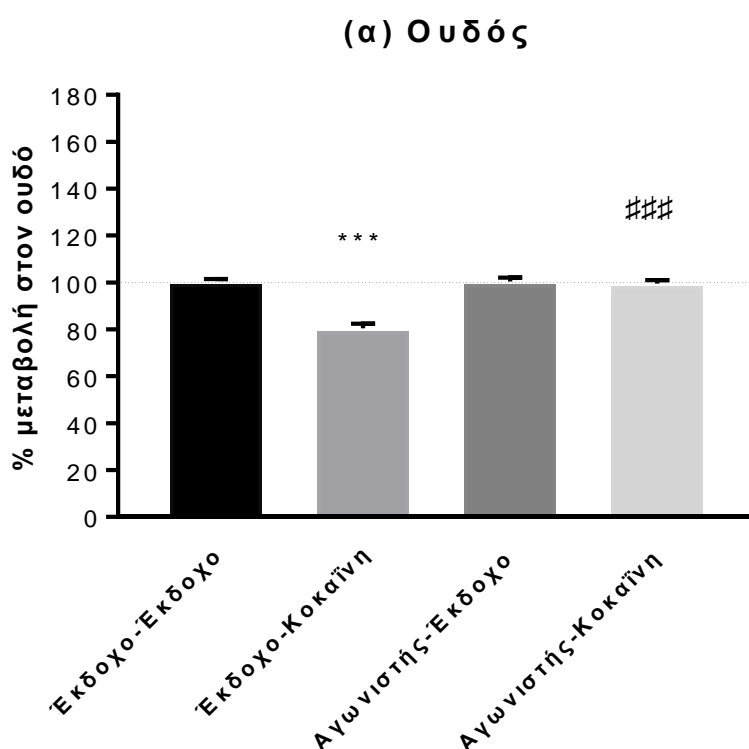
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

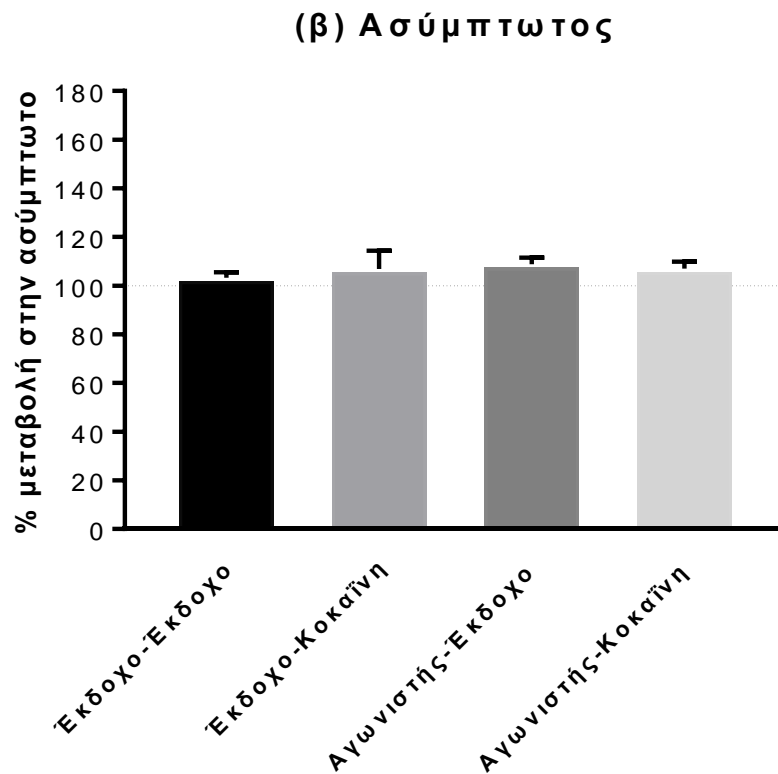
Μελέτη της επίδρασης μικροέγχυσης του JWH-133 στο κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο στην ενισχυτική δράση της κοκαΐνης

Οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στον ουδό και στην ασύμπτωτο στις πειραματικές ομάδες οι οποίες έλαβαν τον αγωνιστή JWH-133 ή το έκδοχό του και κοκαΐνη ή έκδοχο παρουσιάζονται στην **Εικόνα 20** (α και β, αντιστοίχως).

Διπλή ανάλυση διακύμανσης με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις έδειξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση JWH-133 και κοκαΐνης ($F(1,7)=26.53$, $p<0.01$) στον ουδό του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού. Περαιτέρω ανάλυση με t-test για σχετιζόμενα δείγματα έδειξε πως η κοκαΐνη (5 mg/kg) προκάλεσε στατιστικώς σημαντική μείωση ($p<0.01$) στον ουδό του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού.

Ανάλυση με t-test για σχετιζόμενα δείγματα έδειξε ότι η προχορήγηση του JWH-133 ανέστειλε την ενισχυτική δράση της κοκαΐνης ($p<0.001$). Ο JWH-133 από μόνος του δεν επηρέασε τον ουδό ($p>0.05$). Διπλή ανάλυση διακύμανσης με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις έδειξε πως δεν υπάρχει σημαντικά στατιστική επίδραση του JWH-133, της κοκαΐνης ή της αλληλεπίδρασής τους στην ασύμπτωτο του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού.





Εικόνα 20

Αλλαγές **(α)** στον ουδό και **(β)** στην ασύμπτωτο ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού, εκφραζόμενες ως ποσοστό μεταβολής από τις αντίστοιχες τιμές που προηγούνταν των χορηγήσεων.

Οι κάθετες στήλες αναπαριστούν το μέσο όρο \pm το τυπικό σφάλμα. Ο αστερίσκος (*) εκφράζει στατιστικώς σημαντική μεταβολή σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Έκδοχο-Έκδοχο), $***p < 0.001$. Η δίεση (#) εκφράζει στατιστικώς σημαντική μεταβολή σε σχέση με την ομάδα Έκδοχο-Κοκαΐνη, $###p < 0.001$.

Μελέτη αναστροφής της επίδρασης μικροέγχυσης του JWH-133 στο κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο στην ενισχυτική δράση της κοκαΐνης με τον SR144528

Οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στον ουδό και στην ασύμπτωτο στις πειραματικές ομάδες οι οποίες έλαβαν ενδοεγκεφαλικές χορηγήσεις του ανταγωνιστή SR144528 μαζί με τον αγωνιστή JWH-133 και συστηματικές χορηγήσεις κοκαΐνης ή των εκδόχων τους παρουσιάζονται στην **Εικόνα 21** και στην **Εικόνα 22**.

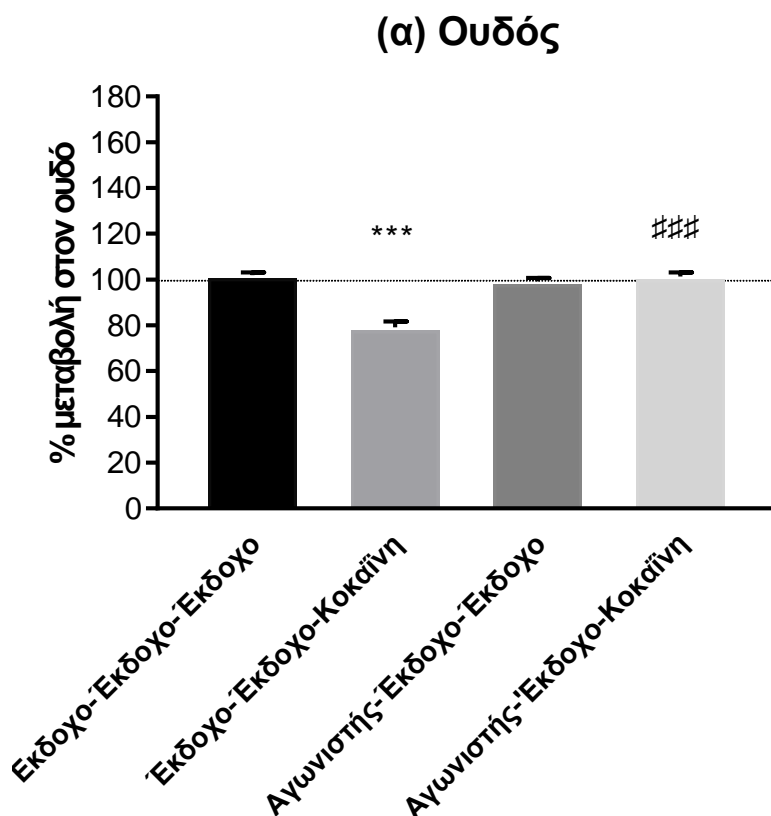
Διπλή ανάλυση διακύμανσης με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις έδειξε στατιστικώς σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του SR144528 και της χορήγησης

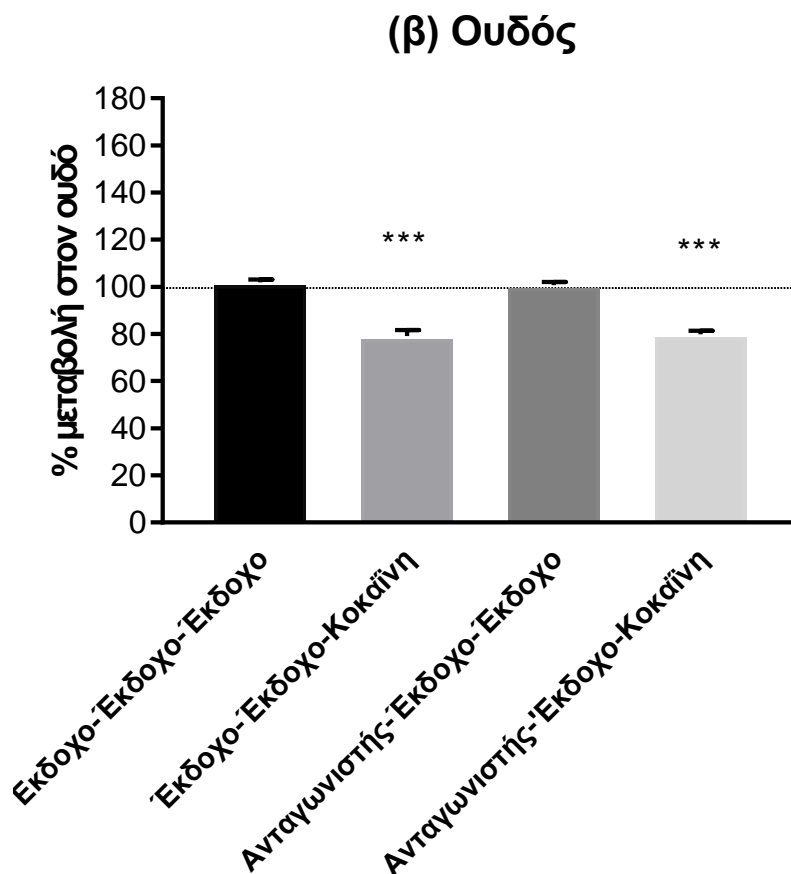
Αποτελέσματα

JWH-133 και κοκαΐνης ($F(1,7)=30.076$, $p<0.01$) στον ουδό. Ανάλυση t-test για σχετιζόμενα δείγματα έδειξε πως ο SR144528 ανέστειλε την επίδραση του JWH-133 στην ενισχυτική δράση της κοκαΐνης.

Η προχορήγηση του JWH-133 ανέστειλε την ενισχυτική δράση της κοκαΐνης ($p<0.001$). Ο JWH-133 από μόνος του δεν επηρέασε τον ουδό ($p>0.05$). Ομοίως, ούτε ο ανταγωνιστής είχε επίδραση στον ουδό του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού *per se* ($p>0.05$).

Διπλή ανάλυση διακύμανσης με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις έδειξε πως δεν υπάρχει σημαντικά στατιστική επίδραση του SR144528, του JWH-133, της κοκαΐνης ή της αλληλεπίδρασής τους στην ασύμπτωτο του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού.



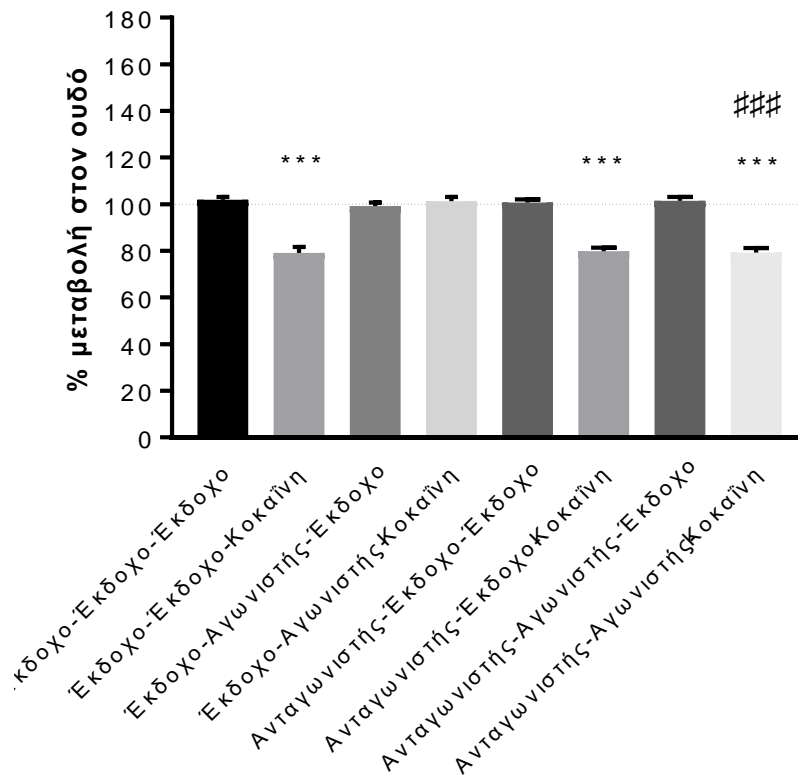


Εικόνα 21

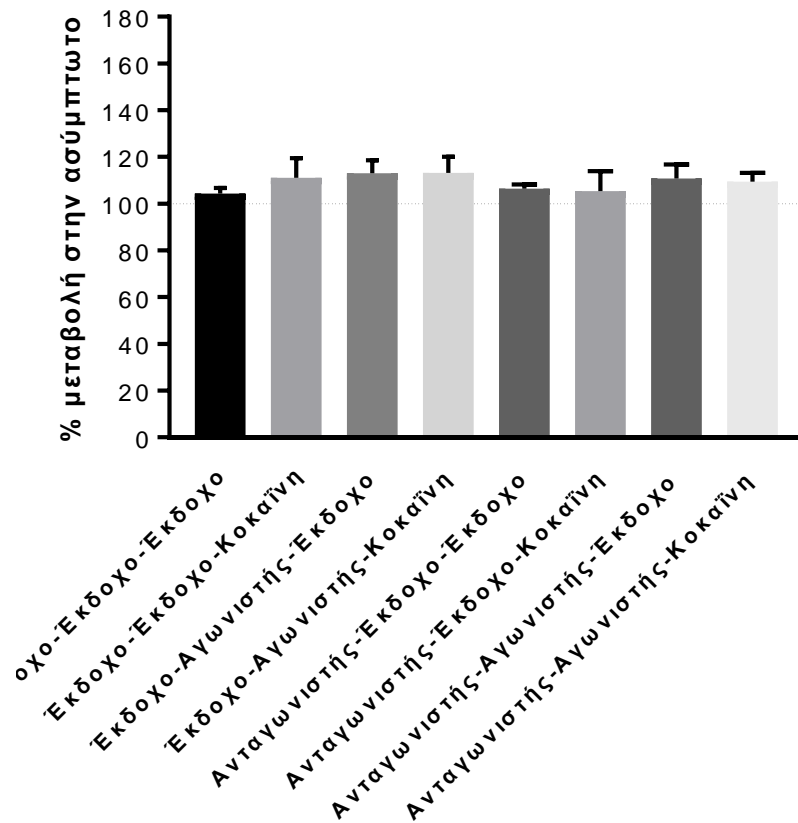
Αλλαγές στον ουδό ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού στις πειραματικές ομάδες στις οποίες χορηγήθηκε (α) ο αγωνιστής και (β) ο ανταγωνιστής, εκφραζόμενες ως ποσοστό μεταβολής από τις αντίστοιχες τιμές που προηγούνταν των χορηγήσεων.

Οι κάθετες στήλες αναπαριστούν το μέσο όρο ± το τυπικό σφάλμα. Ο αστερίσκος (*) εκφράζει στατιστικώς σημαντική μεταβολή σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Έκδοχο-Έκδοχο-Έκδοχο), *** $p < 0.001$. Η δίεση (#) εκφράζει στατιστικώς σημαντική μεταβολή σε σχέση με την ομάδα Έκδοχο-Αγωνιστής-Κοκαΐνη, ### $p < 0.001$.

(α) Ουδός



(β) Ασύμπτωτος



Εικόνα 22

Αλλαγές (**α**) στον ουδό και (**β**) στην ασύμπτωτο ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού, εκφραζόμενες ως ποσοστό μεταβολής από τις αντίστοιχες τιμές που προηγούνταν των χορηγήσεων.

Οι κάθετες στήλες αναπαριστούν το μέσο όρο \pm το τυπικό σφάλμα. Ο αστερίσκος (*) εκφράζει στατιστικώς σημαντική μεταβολή σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Veh-Veh), *** $p < 0.001$. Η δίσηση (#) εκφράζει στατιστικώς σημαντική μεταβολή σε σχέση με την ομάδα Veh-Agonist-Coc, ### $p < 0.001$.

ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη αυτή αποσκοπούσε στο να διερευνηθεί η εμπλοκή του συστήματος των ενδογενών κανναβινοειδών και κυρίως της σηματοδότησης που διαμεσολαβείται από τους CB₂ υποδοχείς στην περιοχή του κοιλιακού καλυπτρικού πεδίου, σε διεργασίες ανταμοιβής και εθισμού σε ουσίες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, μικροέγχυση του JWH-133, αγωνιστή των CB₂ υποδοχέων των κανναβινοειδών στο κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο ανέστειλε σημαντικά την ενισχυτική δράση της κοκαΐνης. Ειδικότερα, η παρούσα έρευνα έδειξε πως η επίδραση του JWH-133 στην ενισχυτική δράση της κοκαΐνης διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση των CB₂ υποδοχέων του κοιλιακού καλυπτρικού πεδίου, καθότι προχορήγηση του ανταγωνιστή των CB₂ υποδοχέων (SR144528) είχε ως αποτέλεσμα την αναστροφή των δράσεων του JWH-133.

Αναλυτικότερα, η προχορήγηση του JWH-133 ανέστειλε την ενισχυτική δράση της κοκαΐνης, ενώ ο JWH-133 από μόνος του δεν επηρέασε τον ουδό στον ενδοκρανιακό αυτοερεθισμό. Επιπρόσθετα, προχορήγηση με SR144528 ανέστειλε την επίδραση του JWH-133 στην ενισχυτική δράση της κοκαΐνης. Κανένα από τα φάρμακα (αγωνιστής, ανταγωνιστής, κοκαΐνη) δεν είχε επίδραση στην ασύμπτωτο του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού *per se*.

Τα πιο πάνω στοιχεία είναι σύμφωνα και συμπληρωματικά με τα πρόσφατα ευρήματα της ομάδας του Zhang, σύμφωνα με τα οποία μικροεγχύσεις του JWH-133 στο κυλιακό καλυπτρικό πεδίο επίμυων προκάλεσαν μείωση της συμπεριφοράς αυτοχορήγησης κοκαΐνης (Zhang et al., 2016).

Τα υπάρχοντα δεδομένα που συσχετίζουν την πιθανή δράση των CB₂ υποδοχέων των κανναβινοειδών και τον εθισμό στην κοκαΐνη είναι ελάχιστα. Αρχικά, ο CB₂ υποδοχέας εντοπίστηκε στον εγκέφαλο σε παθολογικές μόνο καταστάσεις (Ehrhart et al., 2005; Guzman et al., 2001; Ibrahim et al., 2003). Σύντομα όμως, περαιτέρω έρευνα απέδειξε την έκφραση του CB₂ υποδοχέα σε ποικίλες περιοχές του εγκεφάλου κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, όπως ο κερκοφόρος πυρήνας, ο επικλινής πυρήνας, η έλικα του προσαγωγίου, η αμυγδαλή, ο ιππόκαμπος, ο κοιλιακός έσω πυρήνας του υποθαλάμου, ο θάλαμος, η μέλαινα ουσία, ο ραχιαίος και ο έσω πυρήνας της ραφής (Garcia-Gutierrez, Perez-Ortiz, Gutierrez-Adan, & Manzanares, 2010; Onaivi, 2006; Van Sickle et al., 2005). Αξιοπρόσεκτη είναι η παρουσία του CB₂ υποδοχέα σε περιοχές που σχετίζονται με την ανταμοιβή, όπως το κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο και ο επικλινής πυρήνας.

Ένας ικανός αριθμός ερευνών υποστηρίζει την πιθανή εμπλοκή του του CB₂ υποδοχέα σε συμπεριφορές εθισμού. Αυξημένη έκφραση του γονιδίου που κωδικεύει τον CB₂ υποδοχέα έχει παρατηρηθεί σε εγκέφαλο μυός από την ομάδα του Onaivi, ως συνέπεια χρόνιας χορήγησης ηρωΐνης ή κοκαΐνης (Onaivi et al., 2008). Αντιθέτως, η ίδια ομάδα παρατήρησε μειωμένη έκφραση του ίδιου γονιδίου στο ραβδωτό και στον κοιλιακό μεσεγκέφαλο μυών μετά από χρόνια πρόσληψη αλκοόλ (Onaivi et al., 2008). Πρόσφατη έρευνα έδειξε πως ο CB₂ υποδοχέας ρυθμίζει την πρόσληψη αλκοόλ καθώς η έλλειψή του οδήγησε σε αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ σε μύες (Pradier et al., 2015).

Ακόμη, η φαρμακολογική ρύθμιση των CB₂ υποδοχέων περιόρισε την επίδραση της κοκαΐνης στην ενίσχυση των επιπέδων ντοπαμίνης στον επικλινή πυρήνα σε μύες (Xi et al., 2011). Στην ίδια μελέτη, αναστολή των CB₂ υποδοχέων προκάλεσε αύξηση στα εξωκυττάρια επίπεδα ντοπαμίνης, ενώ η διαγραφή του CB₂ υποδοχέα δεν είχε καμία επίδραση. Μελέτη της ομάδας του Aracil-Fernandez, κατέληξε στο συμπέρασμα πως υπερέκφραση του CB₂ υποδοχέα μείωσε την επίδραση της κοκαΐνης στην κινητικότητα, στην εξαρτημένη προτίμηση θέσης και στην αυτοχορήγηση κοκαΐνης σε μύες (Aracil-Fernandez et al., 2012).

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν πως συστηματική χορήγηση αγωνιστή των CB₂ υποδοχέων προκάλεσε αναστολή της εξαρτημένης προτίμησης θέσης επαγόμενης από κοκαΐνη σε μύες ενώ δεν είχε καμία επίδραση σε CB₂^{-/-} μύες (Ignatowska-Jankowska et al., 2013). Επίσης, μελέτες ηλεκτροφυσιολογίας έδειξαν πως η ενεργοποίηση των CB₂ υποδοχέων από τον JWH-133 ανέστειλε την εκπυρσοκρότηση

των ντοπαμινεργικών νευρώνων στο κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο, γεγονός που δεν παρατηρήθηκε σε CB₂^{-/-} μύες ή όταν προηγήθηκε χορήγηση ανταγωνιστή των CB₂ υποδοχέων (Zhang et al., 2014).

Γενικά, τα προαναφερθέντα αποτελέσματα της έρευνάς μας συνάδουν με την υπόθεση παρουσίας και σημαντικής συμμετοχής των CB₂ υποδοχέων του κοιλιακού καλυπτρικού πεδίου σε διεργασίες ανταμοιβής.

Μια πιθανή εξήγηση του μοριακού μηχανισμού που θα μπορούσε να υποστηρίζει τα ευρήματά μας είναι πως η ενεργοποίηση των CB₂ υποδοχέων του κοιλιακού καλυπτρικού πεδίου από τον JWH-133 και των υφιστάμενων πρωτεϊνών G_{i/o} με τις οποίες είναι συζευγνυμένοι, αναστέλλει άμεσα τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του κοιλιακού καλυπτρικού πεδίου, μειώνοντας έτσι την απελευθέρωση ντοπαμίνης από τον επικλινή πυρήνα και αναστέλλοντας ενδεχομένως την επαγόμενη από την κοκαΐνη αύξηση της αποτελεσματικότητας της ενίσχυσης του εγκεφαλικού ερεθισμού.

Ανεξάρτητα από τους ενδοκυττάριους σηματοδοτικούς μηχανισμούς και τις αλληλεπιδράσεις των νευρωνικών κυκλωμάτων, τα παρόντα ευρήματα προτείνουν πως η ενεργοποίηση των CB₂ υποδοχέων του κοιλιακού καλυπτρικού πεδίου αναστέλλει την ενισχυτική δράση της κοκαΐνης. Τα στοιχεία αυτά συμπληρώνουν το λειτουργικό προφίλ των CB₂ υποδοχέων το οποίο διευρύνεται συνεχώς και παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον ως προς τη δυνητική φαρμακοθεραπευτική του εξερεύνηση.

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματά μας συνιστούν την προσοχή στο ρυθμιστικό ρόλο των CB₂ υποδοχέων σε διεργασίες ανταμοιβής, όπως η εξάρτηση σε ουσίες. Είναι επιτακτική η ανάγκη διεξαγωγής επιπλέον μελετών για την εξερεύνηση του φαρμακοθεραπευτικού πεδίου του CB₂ υποδοχέα.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

2-AG = αραχιδονυλογλυκερόλη
2-AGE = νολαδινικός αιθέρας
AC = αδενυλική κυκλάση
ACEA = αραχιδονυλογλωροαιθυλαμίδιο
AEA = ανανδαμίδιο
ANOVA = ανάλυση διακύμανσης
Ca²⁺ = ιόν ασβεστίου
cAMP = κυκλική μονοφωσφορική αδενοσύνη
Cb = παρεγκεφαλίδα
CB₁ = υποδοχέας 1 των κανναβινοειδών
CB₂ = υποδοχέας 2 των κανναβινοειδών
CbN = εν τω βάθει πυρήνες της παρεγκεφαλίδας
cc = μεσολόβιο
Ce = κεντρικός πυρήνας αμυγδαλής
CPu = κερκοφόρος πυρήνας
Ent = ενδορινικός φλοιός
EP = ενδοσκελιαίος πυρήνας
FAAH = υδρολάση του αμιδίου των λιπαρών οξέων
fi = παρυφή ιπποκάμπου
Fr = πρόσθιος φλοιός
FrPaM = κινητική περιοχή πρόσθιου βραγματικού φλοιού
GABA = γ-αμινοβουτυρικό οξύ
GP = ωχρά σφαίρα
Hi = ιππόκαμπος
IC = κάτω διδύμιο
ICSS = ενδοκρανιακός αυτοερεθισμός
LP = πλαγιοπίσθιος θάλαμος
Me = μέσος αμυγδαλικός πυρήνας
MG = έσω γονατώδες σώμα
MGL = λιπάση της μονοακυλογλυκερόλης
OAE = βιροδαμίνη
Opt = οπτική ταινία
PCRt = μικροκυτταρικός δικτυωτός πυρήνας
PKA = πρωτεϊνική κινάση A
PO = πρωτοταγής οσφρητικός φλοιός
PVA = παρακοιλιακός πυρήνας υποθαλάμου
SC = άνω διδύμιο
Sm = μύελινη ταινία θαλάμου
SNR = δικτυωτή μέλαινα ουσία
Tu = οσφρητικός βολβός
VP = κοιλιακός οπίσθιος θάλαμος
VTA = κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο
Δ⁹-THC = Δ⁹- τετραυδροκανναβινόλη
ΚΝΣ = κεντρικό νευρικό σύστημα
ΠΝΣ = περιφερικό νευρικό σύστημα

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εισαγωγή

1	Η δομή τριών συστατικών της κάνναβης: Δ ⁹ -THC, Δ ⁸ -THC και Κανναβινόλη	1
2	Αντιπροσωπευτικοί αγωνιστές των υποδοχέων των κανναβινοειδών	2
3	Διαχωρισμός ανανδαμιδίου και βιροδαμίνης	5
4	Σχηματική αναπαράσταση CB ₁ και CB ₂ των υποδοχέων ανθρώπου	7
5	Σηματοδοτικοί μηχανισμοί των CB ₁ και CB ₂ υποδοχέων	8
6	Δράση των κανναβινοειδών στην προσυναπτική απόληξη	10
7	Κατανομή των CB ₁ υποδοχέων σε εγκέφαλο επίμυος	12
8	Διαγραμματική απεικόνιση διαμόρφωσης των αμινοξέων του CB ₂ υποδοχέα επίμυος στις 7 διαμεμβρανικές έλικες και αλληλουχία της πολυπεπτιδικής του αλυσίδας	16
9	Ιστοειδική έκφραση του mRNA του CB ₂ υποδοχέα των κανναβινοειδών	18
10	Χημική δομή των κυριότερων ενδογενών κανναβινοειδών, ανανδαμιδίου και 2-AG, τα οποία προσδέονται στους CB ₁ και CB ₂ υποδοχείς	21
11	Βασικές μεταβολικές οδοί βιοσύνθεσης και καταβολισμού ανανδαμιδίου και 2-AG	22
12	Κατηγοριοποίηση συνθετικών αναλόγων των κανναβινοειδών σύμφωνα με τη χημική δομή τους	25
13	Στερεοχημική δομή και χημικός τύπος του JWH-133	26

Μεθοδολογία

14	Απεικόνιση επιλεγμένων στεφανιαίων τομών εγκεφάλου επίμυος	29
15	Απαραίτητα εξαρτήματα για τον ενδοκρανιακό αυτοερεθισμό, τη μικροέγχυση και τη σταθεροποίηση του συστήματος στο κρανίο του πειραματοζώου	30
16	Σχηματική απεικόνιση του προγράμματος μεταβαλλόμενων συχνοτήτων	33
17	Μέθοδος μετατόπισης της καμπύλης	35
18	Πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης της επίδρασης μικροέγχυσης στο	38

	κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο του JWH-133 στην ενισχυτική δράση της κοκαΐνης	
19	Πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης αναστροφής της επίδρασης μικροέγχυσης του JWH-133 στο κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο στην ενισχυτική δράση της κοκαΐνης με τον SR144528	39

Αποτελέσματα

20	Αλλαγές στον ουδό και στην ασύμπτωτο ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού	40
21	Αλλαγές στον ουδό ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού στις πειραματικές ομάδες στις οποίες χορηγήθηκε ο αγωνιστής και ο ανταγωνιστής	42
22	Αλλαγές στον ουδό και στην ασύμπτωτο ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού, εκφραζόμενες ως ποσοστό μεταβολής από τις αντίστοιχες τιμές που προηγούνταν των χορηγήσεων.	44

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Ahluwalia, J., Urban, L., Capogna, M., Bevan, S., & Nagy, I. (2000). Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience*, *100*(4), 685-688.
- Ameri, A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol*, *58*(4), 315-348.
- Anand, P., Whiteside, G., Fowler, C. J., & Hohmann, A. G. (2009). Targeting CB2 receptors and the endocannabinoid system for the treatment of pain. *Brain Res Rev*, *60*(1), 255-266. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.12.003
- Aracil-Fernandez, A., Trigo, J. M., Garcia-Gutierrez, M. S., Ortega-Alvaro, A., Ternianov, A., Navarro, D., . . . Manzanares, J. (2012). Decreased cocaine motor sensitization and self-administration in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors. *Neuropsychopharmacology*, *37*(7), 1749-1763. doi: 10.1038/npp.2012.22
- Ashton, J. C., & Glass, M. (2007). The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol*, *5*(2), 73-80.
- Atwood, B. K., & Mackie, K. (2010). CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol*, *160*(3), 467-479. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00729.x
- Bae, J. S., Kim, J. Y., Park, B. L., Kim, J. H., Kim, B., Park, C. S., . . . Woo, S. I. (2014). Genetic association analysis of CNR1 and CNR2 polymorphisms with schizophrenia in a Korean population. *Psychiatr Genet*, *24*(5), 225-229. doi: 10.1097/YPG.0000000000000047
- Baek, J. H., Darlington, C. L., Smith, P. F., & Ashton, J. C. (2013). Antibody testing for brain immunohistochemistry: brain immunolabeling for the cannabinoid CB(2) receptor. *J Neurosci Methods*, *216*(2), 87-95. doi: 10.1016/j.jneumeth.2013.03.021
- Baker, D., Pryce, G., Davies, W. L., & Hiley, C. R. (2006). In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci*, *27*(1), 1-4. doi: 10.1016/j.tips.2005.11.003
- Begg, M., Pacher, P., Batkai, S., Osei-Hyiaman, D., Offertaler, L., Mo, F. M., . . . Kunos, G. (2005). Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther*, *106*(2), 133-145. doi: 10.1016/j.pharmthera.2004.11.005
- Bell, M. R., D'Ambra, T. E., Kumar, V., Eissenstat, M. A., Herrmann, J. L., Jr., Wetzel, J. R., . . . et al. (1991). Antinociceptive (aminoalkyl)indoles. *J Med Chem*, *34*(3), 1099-1110.
- Beltramo, M., Bernardini, N., Bertorelli, R., Campanella, M., Nicolussi, E., Fredduzzi, S., & Reggiani, A. (2006). CB2 receptor-mediated antihyperalgesia: possible direct involvement of neural mechanisms. *Eur J Neurosci*, *23*(6), 1530-1538. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04684.x
- Benito, C., Nunez, E., Tolon, R. M., Carrier, E. J., Rabano, A., Hillard, C. J., & Romero, J. (2003). Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci*, *23*(35), 11136-11141.
- Bosier, B., Muccioli, G. G., Hermans, E., & Lambert, D. M. (2010). Functionally selective cannabinoid receptor signalling: Therapeutic implications and

- opportunities. *Biochem Pharmacol*, 80(1), 1-12. doi: 10.1016/j.bcp.2010.02.013
- Bridges, D., Rice, A. S., Egertova, M., Elphick, M. R., Winter, J., & Michael, G. J. (2003). Localisation of cannabinoid receptor 1 in rat dorsal root ganglion using in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Neuroscience*, 119(3), 803-812.
- Brown, S. M., Wager-Miller, J., & Mackie, K. (2002). Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta*, 1576(3), 255-264.
- Brusco, A., Tagliaferro, P., Saez, T., & Onaivi, E. S. (2008). Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. *Synapse*, 62(12), 944-949. doi: 10.1002/syn.20569
- Cabral, G. A., & Griffin-Thomas, L. (2009). Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert Rev Mol Med*, 11, e3. doi: 10.1017/S1462399409000957
- Caenazzo, L., Hoehe, M. R., Hsieh, W. T., Berrettini, W. H., Bonner, T. I., & Gershon, E. S. (1991). Hindiii Identifies a 2 Allele DNA Polymorphism of the Human Cannabinoid Receptor Gene (Cnr). *Nucleic Acids Res*, 19(17), 4798-4798. doi: DOI 10.1093/nar/19.17.4798-a
- Carlisle, S. J., Marciano-Cabral, F., Staab, A., Ludwick, C., & Cabral, G. A. (2002). Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int Immunopharmacol*, 2(1), 69-82.
- Carriero, D., Aberman, J., Lin, S. Y., Hill, A., Makriyannis, A., & Salamone, J. D. (1998). A detailed characterization of the effects of four cannabinoid agonists on operant lever pressing. *Psychopharmacology (Berl)*, 137(2), 147-156.
- Castaneto, M. S., Gorelick, D. A., Desrosiers, N. A., Hartman, R. L., Pirard, S., & Huestis, M. A. (2014). Synthetic cannabinoids: epidemiology, pharmacodynamics, and clinical implications. *Drug Alcohol Depend*, 144, 12-41. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2014.08.005
- Cecyre, B., Thomas, S., Ptito, M., Casanova, C., & Bouchard, J. F. (2014). Evaluation of the specificity of antibodies raised against cannabinoid receptor type 2 in the mouse retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 387(2), 175-184. doi: 10.1007/s00210-013-0930-8
- Coulombe, D., & Miliareisis, E. (1987). Fitting intracranial self-stimulation data with growth models. *Behav Neurosci*, 101(2), 209-214.
- den Boon, F. S., Chameau, P., Schaafsma-Zhao, Q., van Aken, W., Bari, M., Oddi, S., . . . Werkman, T. R. (2012). Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(9), 3534-3539. doi: 10.1073/pnas.1118167109
- Devane, W. A., Dysarz, F. A., 3rd, Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*, 34(5), 605-613.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., . . . Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258(5090), 1946-1949.

- Di Marzo, V. (1998). 'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochim Biophys Acta*, 1392(2-3), 153-175.
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C., & Piomelli, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372(6507), 686-691. doi: 10.1038/372686a0
- Ehrhart, J., Obregon, D., Mori, T., Hou, H., Sun, N., Bai, Y., . . . Shytle, R. D. (2005). Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *J Neuroinflammation*, 2, 29. doi: 10.1186/1742-2094-2-29
- Elphick, M. R., & Egertova, M. (2001). The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356(1407), 381-408. doi: 10.1098/rstb.2000.0787
- Engler, B., Freiman, I., Urbanski, M., & Szabo, B. (2006). Effects of exogenous and endogenous cannabinoids on GABAergic neurotransmission between the caudate-putamen and the globus pallidus in the mouse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316(2), 608-617. doi: 10.1124/jpet.105.092718
- Farquhar-Smith, W. P., Egertova, M., Bradbury, E. J., McMahon, S. B., Rice, A. S., & Elphick, M. R. (2000). Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol Cell Neurosci*, 15(6), 510-521. doi: 10.1006/mcne.2000.0844
- Franco, R., & Fernandez-Suarez, D. (2015). Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol*, 131, 65-86. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.05.003
- Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carriere, D., Carayon, P., . . . Casellas, P. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*, 232(1), 54-61.
- Garcia-Cabrerizo, R., & Garcia-Fuster, M. J. (2016). Opposite regulation of cannabinoid CB1 and CB2 receptors in the prefrontal cortex of rats treated with cocaine during adolescence. *Neurosci Lett*, 615, 60-65. doi: 10.1016/j.neulet.2016.01.018
- Garcia-Gutierrez, M. S., Garcia-Bueno, B., Zoppi, S., Leza, J. C., & Manzanares, J. (2012). Chronic blockade of cannabinoid CB2 receptors induces anxiolytic-like actions associated with alterations in GABA(A) receptors. *Br J Pharmacol*, 165(4), 951-964. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01625.x
- Garcia-Gutierrez, M. S., Ortega-Alvaro, A., Busquets-Garcia, A., Perez-Ortiz, J. M., Caltana, L., Ricatti, M. J., . . . Manzanares, J. (2013). Synaptic plasticity alterations associated with memory impairment induced by deletion of CB2 cannabinoid receptors. *Neuropharmacology*, 73, 388-396. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.05.034
- Garcia-Gutierrez, M. S., Perez-Ortiz, J. M., Gutierrez-Adan, A., & Manzanares, J. (2010). Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors. *Br J Pharmacol*, 160(7), 1773-1784. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00819.x
- Garcia, C., Palomo-Garo, C., Gomez-Galvez, Y., & Fernandez-Ruiz, J. (2016). Cannabinoid-dopamine interactions in the physiology and physiopathology of the basal ganglia. *Br J Pharmacol*, 173(13), 2069-2079. doi: 10.1111/bph.13215

- Gelfand, E. V., & Cannon, C. P. (2006). Rimonabant: a selective blocker of the cannabinoid CB1 receptors for the management of obesity, smoking cessation and cardiometabolic risk factors. *Expert Opin Investig Drugs*, *15*(3), 307-315. doi: 10.1517/13543784.15.3.307
- Giuffrida, A., Beltramo, M., & Piomelli, D. (2001). Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther*, *298*(1), 7-14.
- Gobbi, G., Bambico, F. R., Mangieri, R., Bortolato, M., Campolongo, P., Solinas, M., . . . Piomelli, D. (2005). Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(51), 18620-18625. doi: 10.1073/pnas.0509591102
- Gomez-Galvez, Y., Palomo-Garo, C., Fernandez-Ruiz, J., & Garcia, C. (2016). Potential of the cannabinoid CB(2) receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *64*, 200-208. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.03.017
- Gomez, M., Hernandez, M., & Fernandez-Ruiz, J. (2008). Cannabinoid signaling system: does it play a function in cell proliferation and migration, neuritic elongation and guidance and synaptogenesis during brain ontogenesis? *Cell Adh Migr*, *2*(4), 246-248.
- Gong, J. P., Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Liu, Q. R., Tagliaferro, P. A., Brusco, A., & Uhl, G. R. (2006). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res*, *1071*(1), 10-23. doi: 10.1016/j.brainres.2005.11.035
- Gregg, L. C., Jung, K. M., Spradley, J. M., Nyilas, R., Suplita, R. L., 2nd, Zimmer, A., . . . Hohmann, A. G. (2012). Activation of type 5 metabotropic glutamate receptors and diacylglycerol lipase- α initiates 2-arachidonoylglycerol formation and endocannabinoid-mediated analgesia. *J Neurosci*, *32*(28), 9457-9468. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0013-12.2012
- Guzman, M. L., Upchurch, D., Grimes, B., Howard, D. S., Rizzieri, D. A., Luger, S. M., . . . Jordan, C. T. (2001). Expression of tumor-suppressor genes interferon regulatory factor 1 and death-associated protein kinase in primitive acute myelogenous leukemia cells. *Blood*, *97*(7), 2177-2179.
- Hanisch, U. K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, *10*(11), 1387-1394. doi: 10.1038/nn1997
- Hanus, L., Abu-Lafi, S., Frider, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D. E., . . . Mechoulam, R. (2001). 2-arachidonoyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(7), 3662-3665. doi: 10.1073/pnas.061029898
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R., & Rice, K. C. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*, *11*(2), 563-583.
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R., & Rice, K. C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*(5), 1932-1936.
- Hill, M. N., Miller, G. E., Carrier, E. J., Gorzalka, B. B., & Hillard, C. J. (2009). Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress.

- Psychoneuroendocrinology*, 34(8), 1257-1262. doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.03.013
- Hoehe, M. R., Caenazzo, L., Martinez, M. M., Hsieh, W. T., Modi, W. S., Gershon, E. S., & Bonner, T. I. (1991). Genetic and Physical Mapping of the Human Cannabinoid Receptor Gene to Chromosome-6q14-Q15. *New Biologist*, 3(9), 880-885.
- Howlett, A. C. (1998). The CB1 cannabinoid receptor in the brain. *Neurobiol Dis*, 5(6 Pt B), 405-416. doi: 10.1006/nbdi.1998.0215
- Howlett, A. C. (2002). The cannabinoid receptors. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68-9, 619-631. doi: Pii S0090-6980(02)00060-6
Doi 10.1016/S0090-6980(02)00060-6
- Howlett, A. C. (2005). Cannabinoid receptor signaling. *Handb Exp Pharmacol*(168), 53-79.
- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., . . . Pertwee, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*, 54(2), 161-202.
- Huffman, J. W., Liddle, J., Yu, S., Aung, M. M., Abood, M. E., Wiley, J. L., & Martin, B. R. (1999). 3-(1',1'-Dimethylbutyl)-1-deoxy-delta8-THC and related compounds: synthesis of selective ligands for the CB2 receptor. *Bioorg Med Chem*, 7(12), 2905-2914.
- Huffman, J. W., Szklennik, P. V., Almond, A., Bushell, K., Selley, D. E., He, H., . . . Martin, B. R. (2005). 1-Pentyl-3-phenylacetylindoles, a new class of cannabimimetic indoles. *Bioorg Med Chem Lett*, 15(18), 4110-4113. doi: 10.1016/j.bmcl.2005.06.008
- Iannotti, F. A., Di Marzo, V., & Petrosino, S. (2016). Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Prog Lipid Res*, 62, 107-128. doi: 10.1016/j.plipres.2016.02.002
- Iannotti, F. A., Silvestri, C., Mazzarella, E., Martella, A., Calvigioni, D., Piscitelli, F., . . . Di Marzo, V. (2014). The endocannabinoid 2-AG controls skeletal muscle cell differentiation via CB1 receptor-dependent inhibition of Kv7 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(24), E2472-2481. doi: 10.1073/pnas.1406728111
- Ibrahim, M. M., Deng, H., Zvonok, A., Cockayne, D. A., Kwan, J., Mata, H. P., . . . Malan, T. P., Jr. (2003). Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: pain inhibition by receptors not present in the CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(18), 10529-10533. doi: 10.1073/pnas.1834309100
- Ignatowska-Jankowska, B. M., Muldoon, P. P., Lichtman, A. H., & Damaj, M. I. (2013). The cannabinoid CB2 receptor is necessary for nicotine-conditioned place preference, but not other behavioral effects of nicotine in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 229(4), 591-601. doi: 10.1007/s00213-013-3117-6
- Ishiguro, H., Horiuchi, Y., Ishikawa, M., Koga, M., Imai, K., Suzuki, Y., . . . Arinami, T. (2010). Brain cannabinoid CB2 receptor in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 67(10), 974-982. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.09.024
- Jhaveri, M. D., Elmes, S. J., Richardson, D., Barrett, D. A., Kendall, D. A., Mason, R., & Chapman, V. (2008). Evidence for a novel functional role of cannabinoid CB(2) receptors in the thalamus of neuropathic rats. *Eur J Neurosci*, 27(7), 1722-1730. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06162.x

- Jia, W., Meng, X., Qian, Z., Hua, Z., Li, T., & Liu, C. (2016). Identification of three cannabimimetic indazole and pyrazole derivatives, APINACA 2H-indazole analogue, AMPPPCA, and 5F-AMPPPCA. *Drug Test Anal.* doi: 10.1002/dta.1967
- Jorda, M. A., Verbakel, S. E., Valk, P. J., Vankan-Berkhoudt, Y. V., Maccarrone, M., Finazzi-Agro, A., . . . Delwel, R. (2002). Hematopoietic cells expressing the peripheral cannabinoid receptor migrate in response to the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Blood*, *99*(8), 2786-2793.
- Kaminski, N. E., Abood, M. E., Kessler, F. K., Martin, B. R., & Schatz, A. R. (1992). Identification of a functionally relevant cannabinoid receptor on mouse spleen cells that is involved in cannabinoid-mediated immune modulation. *Mol Pharmacol*, *42*(5), 736-742.
- Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto-dani, Y., Uchigashima, M., & Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-Mediated Control of Synaptic Transmission. *Physiological Reviews*, *89*(1), 309-380. doi: 10.1152/physrev.00019.2008
- Katchan, V., David, P., & Shoenfeld, Y. (2016). Cannabinoids and autoimmune diseases: A systematic review. *Autoimmun Rev*, *15*(6), 513-528. doi: 10.1016/j.autrev.2016.02.008
- Katona, I., & Freund, T. F. (2012). Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu Rev Neurosci*, *35*, 529-558. doi: 10.1146/annurev-neuro-062111-150420
- Khella, R., Short, J. L., & Malone, D. T. (2014). CB2 receptor agonism reverses MK-801-induced disruptions of prepulse inhibition in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, *231*(16), 3071-3087. doi: 10.1007/s00213-014-3481-x
- Klegeris, A., Bissonnette, C. J., & McGeer, P. L. (2003). Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor. *Br J Pharmacol*, *139*(4), 775-786. doi: 10.1038/sj.bjp.0705304
- Lanciego, J. L., Barroso-Chinea, P., Rico, A. J., Conte-Perales, L., Callen, L., Roda, E., . . . Franco, R. (2011). Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*. *J Psychopharmacol*, *25*(1), 97-104. doi: 10.1177/0269881110367732
- Li, Y., & Kim, J. (2016). CB2 Cannabinoid Receptor Knockout in Mice Impairs Contextual Long-Term Memory and Enhances Spatial Working Memory. *Neural Plast*, *2016*, 9817089. doi: 10.1155/2016/9817089
- Lu, H. C., & Mackie, K. (2016). An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biol Psychiatry*, *79*(7), 516-525. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.07.028
- Lu, Q., Straiker, A., Lu, Q., & Maguire, G. (2000). Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina. *Vis Neurosci*, *17*(1), 91-95.
- Lynn, A. B., & Herkenham, M. (1994). Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther*, *268*(3), 1612-1623.
- Maldonado, R., Valverde, O., & Berrendero, F. (2006). Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci*, *29*(4), 225-232. doi: 10.1016/j.tins.2006.01.008
- Maresz, K., Pryce, G., Ponomarev, E. D., Marsicano, G., Croxford, J. L., Shriver, L. P., . . . Dittel, B. N. (2007). Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB1 on neurons and CB2 on autoreactive T cells. *Nat Med*, *13*(4), 492-497. doi: 10.1038/nm1561

- Matsuda, L. A., Bonner, T. I., & Lolait, S. J. (1993). Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol*, *327*(4), 535-550. doi: 10.1002/cne.903270406
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990a). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, *346*(6284), 561-564. doi: 10.1038/346561a0
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990b). Structure of a Cannabinoid Receptor and Functional Expression of the Cloned Cdna. *Nature*, *346*(6284), 561-564. doi: Doi 10.1038/346561a0
- McPartland, J. M., Agraval, J., Gleeson, D., Heasman, K., & Glass, M. (2006). Cannabinoid receptors in invertebrates. *J Evol Biol*, *19*(2), 366-373. doi: 10.1111/j.1420-9101.2005.01028.x
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., . . . et al. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, *50*(1), 83-90.
- Mechoulam, R., & Gaoni, Y. (1967). Recent advances in the chemistry of hashish. *Fortschr Chem Org Naturst*, *25*, 175-213.
- Mechoulam, R., Hanus, L. O., Pertwee, R., & Howlett, A. C. (2014). Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat Rev Neurosci*, *15*(11), 757-764. doi: 10.1038/nrn3811
- Mechoulam, R., & Parker, L. A. (2013). The endocannabinoid system and the brain. *Annu Rev Psychol*, *64*, 21-47. doi: 10.1146/annurev-psych-113011-143739
- Miller, A. M., & Stella, N. (2008). CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way. *Br J Pharmacol*, *153*(2), 299-308. doi: 10.1038/sj.bjp.0707523
- Minocci, D., Masei, J., Martino, A., Milianti, M., Piz, L., Di Bello, D., . . . Nieri, P. (2011). Genetic association between bipolar disorder and 524A>C (Leu133Ile) polymorphism of CNR2 gene, encoding for CB2 cannabinoid receptor. *J Affect Disord*, *134*(1-3), 427-430. doi: 10.1016/j.jad.2011.05.023
- Morgan, N. H., Stanford, I. M., & Woodhall, G. L. (2009). Functional CB2 type cannabinoid receptors at CNS synapses. *Neuropharmacology*, *57*(4), 356-368. doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.07.017
- Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, *365*(6441), 61-65. doi: 10.1038/365061a0
- Ohigashi, H., Huffman, M. A., Izutsu, D., Koshimizu, K., Kawanaka, M., Sugiyama, H., . . . Balansard, G. (1994). Toward the chemical ecology of medicinal plant use in chimpanzees: The case of *Vernonia amygdalina*, a plant used by wild chimpanzees possibly for parasite-related diseases. *J Chem Ecol*, *20*(3), 541-553. doi: 10.1007/BF02059596
- Ohno-Shosaku, T., Tanimura, A., Hashimotodani, Y., & Kano, M. (2012). Endocannabinoids and retrograde modulation of synaptic transmission. *Neuroscientist*, *18*(2), 119-132. doi: 10.1177/1073858410397377
- Onaivi, E. S. (2006). Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain. *Neuropsychobiology*, *54*(4), 231-246. doi: 10.1159/000100778
- Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Gong, J. P., Patel, S., Meozzi, P. A., Myers, L., . . . Uhl, G. R. (2008). Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and

- depression: from mice to human subjects. *PLoS One*, 3(2), e1640. doi: 10.1371/journal.pone.0001640
- Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Gu, S., & Liu, Q. R. (2012). CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. *J Psychopharmacol*, 26(1), 92-103. doi: 10.1177/0269881111400652
- Ortega-Alvaro, A., Aracil-Fernandez, A., Garcia-Gutierrez, M. S., Navarrete, F., & Manzanares, J. (2011). Deletion of CB2 cannabinoid receptor induces schizophrenia-related behaviors in mice. *Neuropsychopharmacology*, 36(7), 1489-1504. doi: 10.1038/npp.2011.34
- Ortega-Alvaro, A., Ternianov, A., Aracil-Fernandez, A., Navarrete, F., Garcia-Gutierrez, M. S., & Manzanares, J. (2015). Role of cannabinoid CB2 receptor in the reinforcing actions of ethanol. *Addict Biol*, 20(1), 43-55. doi: 10.1111/adb.12076
- Ovadia, H., Wohlman, A., Mechoulam, R., & Weidenfeld, J. (1995). Characterization of the hypothermic effect of the synthetic cannabinoid HU-210 in the rat. Relation to the adrenergic system and endogenous pyrogens. *Neuropharmacology*, 34(2), 175-180.
- Overton, H. A., Babbs, A. J., Doel, S. M., Fyfe, M. C., Gardner, L. S., Griffin, G., . . . Reynet, C. (2006). Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab*, 3(3), 167-175. doi: 10.1016/j.cmet.2006.02.004
- Pertwee, R. G. (2005). Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*(168), 1-51.
- Pertwee, R. G., Howlett, A. C., Abood, M. E., Alexander, S. P., Di Marzo, V., Elphick, M. R., . . . Ross, R. A. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2). *Pharmacol Rev*, 62(4), 588-631. doi: 10.1124/pr.110.003004
- Pertwee, R. G., & Ross, R. A. (2002). Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 66(2-3), 101-121. doi: 10.1054/plaf.2001.0341
- Porter, A. C., Sauer, J. M., Knierman, M. D., Becker, G. W., Berna, M. J., Bao, J., . . . Felder, C. C. (2002). Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 301(3), 1020-1024.
- Pradier, B., Erxlebe, E., Markert, A., & Racz, I. (2015). Interaction of cannabinoid receptor 2 and social environment modulates chronic alcohol consumption. *Behav Brain Res*, 287, 163-171. doi: 10.1016/j.bbr.2015.03.051
- Price, D. A., Martinez, A. A., Seillier, A., Koek, W., Acosta, Y., Fernandez, E., . . . Giuffrida, A. (2009). WIN55,212-2, a cannabinoid receptor agonist, protects against nigrostriatal cell loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*, 29(11), 2177-2186. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06764.x
- Price, T. J., Helesic, G., Parghi, D., Hargreaves, K. M., & Flores, C. M. (2003). The neuronal distribution of cannabinoid receptor type 1 in the trigeminal ganglion of the rat. *Neuroscience*, 120(1), 155-162.
- Prisinzano, T. E. (2009). Natural products as tools for neuroscience: discovery and development of novel agents to treat drug abuse. *J Nat Prod*, 72(3), 581-587. doi: 10.1021/np8005748

- Pryce, G., Cabranes, A., Fernandez-Ruiz, J., Bisogno, T., Di Marzo, V., Long, J. Z., . . . Baker, D. (2013). Control of experimental spasticity by targeting the degradation of endocannabinoids using selective fatty acid amide hydrolase inhibitors. *Multiple Sclerosis*, *19*(14), 1896-1904. doi: 10.1177/1352458513485982
- Ramirez, S. H., Hasko, J., Skuba, A., Fan, S., Dykstra, H., McCormick, R., . . . Persidsky, Y. (2012). Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates leukocyte-endothelial cell interactions and blood-brain barrier dysfunction under inflammatory conditions. *J Neurosci*, *32*(12), 4004-4016. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4628-11.2012
- Ravinet Trillou, C., Delgorge, C., Menet, C., Arnone, M., & Soubrie, P. (2004). CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int J Obes Relat Metab Disord*, *28*(4), 640-648. doi: 10.1038/sj.ijo.0802583
- Richfield, E. K., & Herkenham, M. (1994). Selective vulnerability in Huntington's disease: preferential loss of cannabinoid receptors in lateral globus pallidus. *Ann Neurol*, *36*(4), 577-584. doi: 10.1002/ana.410360406
- Rodriguez de Fonseca, F., Del Arco, I., Martin-Calderon, J. L., Gorriti, M. A., & Navarro, M. (1998). Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity. *Neurobiol Dis*, *5*(6 Pt B), 483-501.
- Rodriguez, J. J., Mackie, K., & Pickel, V. M. (2001). Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat caudate putamen nucleus. *Journal of Neuroscience*, *21*(3), 823-833.
- Salio, C., Cottone, E., Conrath, M., & Franzoni, M. F. (2002). CB1 cannabinoid receptors in amphibian spinal cord: relationships with some nociception markers. *J Chem Neuroanat*, *24*(3), 153-162.
- Sanudo-Pena, M. C., Patrick, S. L., Khen, S., Patrick, R. L., Tsou, K., & Walker, J. M. (1998). Cannabinoid effects in basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, *248*(3), 171-174.
- Scallet, A. C. (1991). Neurotoxicology of cannabis and THC: a review of chronic exposure studies in animals. *Pharmacol Biochem Behav*, *40*(3), 671-676.
- Shire, D., Calandra, B., Delpech, M., Dumont, X., Kaghad, M., Le Fur, G., . . . Ferrara, P. (1996). Structural features of the central cannabinoid CB1 receptor involved in the binding of the specific CB1 antagonist SR 141716A. *J Biol Chem*, *271*(12), 6941-6946.
- Sierra, S., Luquin, N., Rico, A. J., Gomez-Bautista, V., Roda, E., Dopeso-Reyes, I. G., . . . Lanciego, J. L. (2015). Detection of cannabinoid receptors CB1 and CB2 within basal ganglia output neurons in macaques: changes following experimental parkinsonism. *Brain Struct Funct*, *220*(5), 2721-2738. doi: 10.1007/s00429-014-0823-8
- Skaper, S. D., Buriani, A., Dal Toso, R., Petrelli, L., Romanello, S., Facci, L., & Leon, A. (1996). The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(9), 3984-3989.
- Smith, P. B., Compton, D. R., Welch, S. P., Razdan, R. K., Mechoulam, R., & Martin, B. R. (1994). The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid, in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, *270*(1), 219-227.
- Stella, N. (2004). Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia*, *48*(4), 267-277. doi: 10.1002/glia.20084

Βιβλιογραφία

- Stella, N., Schweitzer, P., & Piomelli, D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, *388*(6644), 773-778. doi: 10.1038/42015
- Stempel, A. V., Stumpf, A., Zhang, H. Y., Ozdogan, T., Pannasch, U., Theis, A. K., . . . Schmitz, D. (2016). Cannabinoid Type 2 Receptors Mediate a Cell Type-Specific Plasticity in the Hippocampus. *Neuron*, *90*(4), 795-809. doi: 10.1016/j.neuron.2016.03.034
- Storr, M. A., Bashashati, M., Hirota, C., Vemuri, V. K., Keenan, C. M., Duncan, M., . . . Sharkey, K. A. (2010). Differential effects of CB(1) neutral antagonists and inverse agonists on gastrointestinal motility in mice. *Neurogastroenterol Motil*, *22*(7), 787-796, e223. doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01478.x
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., . . . Waku, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, *215*(1), 89-97.
- Sun, Y. X., Tsuboi, K., Okamoto, Y., Tonai, T., Murakami, M., Kudo, I., & Ueda, N. (2004). Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem J*, *380*(Pt 3), 749-756. doi: 10.1042/BJ20040031
- Svizenska, I., Dubovy, P., & Sulcova, A. (2008). Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. *Pharmacol Biochem Behav*, *90*(4), 501-511. doi: 10.1016/j.pbb.2008.05.010
- Tao, Y., Li, L., Jiang, B., Feng, Z., Yang, L., Tang, J., . . . Zhu, G. (2016). Cannabinoid receptor-2 stimulation suppresses neuroinflammation by regulating microglial M1/M2 polarization through the cAMP/PKA pathway in an experimental GMH rat model. *Brain Behav Immun*, *58*, 118-129. doi: 10.1016/j.bbi.2016.05.020
- Tong, D., He, S., Wang, L., Jin, L., Si, P., & Cheng, X. (2013). Association of single-nucleotide polymorphisms in the cannabinoid receptor 2 gene with schizophrenia in the Han Chinese population. *J Mol Neurosci*, *51*(2), 454-460. doi: 10.1007/s12031-013-0062-0
- Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M. C., Mackie, K., & Walker, J. M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, *83*(2), 393-411.
- Ueda, N., Tsuboi, K., Uyama, T., & Ohnishi, T. (2011). Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Biofactors*, *37*(1), 1-7. doi: 10.1002/biof.131
- Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., . . . Sharkey, K. A. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, *310*(5746), 329-332. doi: 10.1126/science.1115740
- Walter, L., Franklin, A., Witting, A., Wade, C., Xie, Y., Kunos, G., . . . Stella, N. (2003). Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci*, *23*(4), 1398-1405.
- Wang, L. L., Zhao, R., Li, J. Y., Li, S. S., Liu, M., Wang, M., . . . Guan, D. W. (2016). Pharmacological activation of cannabinoid 2 receptor attenuates inflammation, fibrogenesis, and promotes re-epithelialization during skin wound healing. *Eur J Pharmacol*, *786*, 128-136. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.06.006

- Wilson, R. I., & Nicoll, R. A. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*, *410*(6828), 588-592. doi: 10.1038/35069076
- Wotherspoon, G., Fox, A., McIntyre, P., Colley, S., Bevan, S., & Winter, J. (2005). Peripheral nerve injury induces cannabinoid receptor 2 protein expression in rat sensory neurons. *Neuroscience*, *135*(1), 235-245. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.06.009
- Xi, Z. X., Peng, X. Q., Li, X., Song, R., Zhang, H. Y., Liu, Q. R., . . . Gardner, E. L. (2011). Brain cannabinoid CB(2) receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nat Neurosci*, *14*(9), 1160-1166. doi: 10.1038/nn.2874
- Yiangou, Y., Facer, P., Durrenberger, P., Chessell, I. P., Naylor, A., Bountra, C., . . . Anand, P. (2006). COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol*, *6*, 12. doi: 10.1186/1471-2377-6-12
- Zangen, A., Solinas, M., Ikemoto, S., Goldberg, S. R., & Wise, R. A. (2006). Two brain sites for cannabinoid reward. *Journal of Neuroscience*, *26*(18), 4901-4907. doi: 10.1523/Jneurosci.3554-05.2006
- Zhang, H. Y., Bi, G. H., Li, X., Li, J., Qu, H., Zhang, S. J., . . . Liu, Q. R. (2015). Species differences in cannabinoid receptor 2 and receptor responses to cocaine self-administration in mice and rats. *Neuropsychopharmacology*, *40*(4), 1037-1051. doi: 10.1038/npp.2014.297
- Zhang, H. Y., Gao, M., Liu, Q. R., Bi, G. H., Li, X., Yang, H. J., . . . Xi, Z. X. (2014). Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(46), E5007-5015. doi: 10.1073/pnas.1413210111
- Zhang, H. Y., Gao, M., Shen, H., Bi, G. H., Yang, H. J., Liu, Q. R., . . . Xi, Z. X. (2016). Expression of functional cannabinoid CB2 receptor in VTA dopamine neurons in rats. *Addict Biol*. doi: 10.1111/adb.12367
- Ziring, D., Wei, B., Velazquez, P., Schrage, M., Buckley, N. E., & Braun, J. (2006). Formation of B and T cell subsets require the cannabinoid receptor CB2. *Immunogenetics*, *58*(9), 714-725. doi: 10.1007/s00251-006-0138-x