



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΜΟΡΦΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ν. ΣΙΤΑΡΑΣ**

**Ο ρόλος του ενδογενούς συστήματος των
κανναβινοειδών σε συμπεριφορικές και
νευροβιολογικές παραμέτρους που σχετίζονται με τις
γνωστικές λειτουργίες. Πειραματική μελέτη σε επίμυες**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανδρέας Γαλανόπουλος

Ιατρός – Νευρολόγος
M.Sc. στις Νευροεπιστήμες

ΑΘΗΝΑ 2013

Στη γυναίκα μου

Σταυρούλα

και στις κόρες μου

Βάσια και Δήμητρα

Στοιχεία Διδακτορικής Διατριβής

Ημερομηνία αίτησης: 30 Απριλίου 2004

Ημερομηνία ορισμού της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 18 Ιουνίου 2004 (Τροποποίηση: 30 Μαρτίου 2007)

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

1. Ζ. Παπαδοπούλου-Νταϊφώτη,

(Επιβλέπουσα)

Ομότιμη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών

2. Γεώργιος Παπαδόπουλος,

Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών

3. Αικ. Αντωνίου,

Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 16 Μαΐου 2007

Ημερομηνία κατάθεσης της διδακτορικής διατριβής: 1 Φεβρουαρίου 2013

Ημερομηνία ορισμού Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 28 Ιανουαρίου 2013

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Καθηγητής Μελέτιος Αθανάσιος Δημόπουλος

Ονόματα Μελών της Επταμελούς Επιτροπής:

- 1. Ζ. Παπαδοπούλου-Νταϊφώτη,** Ομότιμη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 2. Γ. Παπαδόπουλος,** Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 3. Αικ. Αντωνίου,** Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- 4. Ν. Σιταράς,** Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 5. Ε. Σταμπουλής,** Καθηγητής Νευρολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 6. Ν. Πιτσικας,** Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7. Χ. Δάλλα,** Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΒΑΘΜΟΛΟΓΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....

Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα

N.5343/1932 άρθρο 202

ΕΘΝΙΚΟΝ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ



ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΙΠΠΟΚΡΑΤΙΚΟΣ ΟΡΚΟΣ ΚΕΙΜΕΝΟ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥ-
ΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΕΥΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ΗΓΗΣΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ
ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ
ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗ-
ΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΕΥΣ ΊΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ
ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝ-
ΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΕΥΓΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ
ΑΚΡΗΣΙΟΥΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΥΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗ-
ΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ
ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΕΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ
ΙΗΤΡΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ'
ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ
ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ ΕΙΡΕΕΙΝ, ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ
ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΤΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΕΥΜΒΟΥΛΙΗΝ
ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ.
ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΩΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ
ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΣΙΟΥΣ ΤΗΣΔΕ, ΕΞ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ
ΕΣΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ
ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟ-
ΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ,
ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ, Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η
ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ
ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ
ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ
ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΕΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧ-
ΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟ-
ΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΜΟΡΦΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ν. ΣΙΤΑΡΑΣ**

**Ο ρόλος του ενδογενούς συστήματος των
κανναβινοειδών σε συμπεριφορικές και
νευροβιολογικές παραμέτρους που σχετίζονται με τις
γνωστικές λειτουργίες. Πειραματική μελέτη σε επίμυες**

Ανδρέας Γαλανόπουλος

Ιατρός – Νευρολόγος
M.Sc. στις Νευροεπιστήμες

ΑΘΗΝΑ 2013

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Επώνυμο : Γαλανόπουλος
Όνομα : Ανδρέας
Όνομα πατέρα : Χρήστος
Όνομα μητέρας : Βασιλική
Επάγγελμα : Ιατρός Νευρολόγος
Ημερομηνία γέννησης : 26/07/1973
Οικογεν. κατάσταση : Έγγαμος, πατέρας 2 παιδιών
Διεύθυνση κατοικίας : Βουλγαροκτόνου 46, 18452 Νεάπολη Πειραιά
Διεύθυνση Ιατρείου : Λεωφόρος Μαραθώνος 105, 15351 Παλλήνη Αττικής
Τηλέφωνο : 210-4952417, 6937-114499
e-mail : galano@med.uoa.gr

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΕΣ - ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ

20/07/2004 : Απόκτηση μεταπτυχιακού διπλώματος (M.Sc.) του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Νευροεπιστημών της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης με βαθμό «**άριστα**» και μέσο όρο 8,80.

06/11/1998 : Πτυχίο Ιατρικής από το Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών με βαθμό «**λίαν καλώς**» και μέσο όρο 7,60.

22/09/1992 : Εισαγωγή στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Αθηνών με Πανελλήνιες Εξετάσεις.

18/09/1991 – 18/09/1992 : Φοίτηση στο 1^ο έτος του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών.

26/06/1991 : Αποφοίτηση από το 9^ο Λύκειο Πειραιά με βαθμό «**πολύ καλά**» 17,60/20,00.

ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΕΙΣ - ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

21/04/08 - σήμερα: Λειτουργία Ιδιωτικού Νευρολογικού Ιατρείου στην Παλλήνη Αττικής

01/2012 - σήμερα: Επιστημονικός Συνεργάτης Ιδιωτικού Θεραπευτηρίου ΥΓΕΙΑ

09/2008 – 12/2011: Επιστημονικός Συνεργάτης Ιδιωτικού Νοσοκομείου ΙΑΣΩ GENERAL

06/2008–09/2008: Επιστημονικός Συνεργάτης Ιδιωτικού Νοσοκομείου METROPOLITAN

30/08/09 – σήμερα : Ιατρικός Σύμβουλος στη Φαρμακευτική Εταιρεία Lundbeck

01/04/08: Απόκτηση τίτλου ιατρικής ειδικότητας Νευρολογίας.

18/02/2004 – 03/03/08 : Ειδίκευση στη Νευρολογία στη Νευρολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Νίκαιας Πειραιά «ο Άγιος Παντελεήμων».

15/02/2003 – 15/02/2004 : Εργασία κα συμμετοχή στις επιστημονικές δραστηριότητες στο Εργαστήριο Νευροεπιστημών και Συμπεριφοράς, Τμήμα Ψυχολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

27/11/2002 – 22/09/2003 : Ειδίκευση στην Ψυχιατρική στο Β2 Ψυχιατρικό Τμήμα του Θεραπευτηρίου Ψυχικών Παθήσεων Χανίων.

11/03/2002 – 11/09/2002 : 6μηνη ειδίκευση στην Παθολογία στο Β' Παθολογικό Τμήμα του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Η Ελπίς».

17/12/1998 – 17/03/1999 : 3μηνη ειδίκευση στην Παθολογία, Καρδιολογία και Χειρουργική στο Νομαρχιακό Γενικό Νοσοκομείο Μολάων.

17/03/1999-17/03/2000 : Ιατρός στο Περιφερειακό Ιατρείο Ασωπού του Κέντρου Υγείας - Νοσοκομείου Μολάων Λακωνίας.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

1) WIN 55,212-2 impairs non-associative, recognition and spatial memory in rats via CB1 receptor stimulation

Galanopoulos A, Polissidis A, Georgiadou G, Marselos M, Papadopoulou-Daifoti Z, Nomikos GG, Pitsikas N, Antoniou K.

Behav Brain Res (approved for publication)

2) The cannabinoid CB1 receptor biphasically modulates motor activity and regulates dopamine and glutamate release region dependently

Polissidis A, Galanopoulos A, Naxakis G, Papahatjis D, Papadop-Daifoti Z, Antoniou K.

Int J Neuropsychopharmacol. 2012 Mar 6:1-11

3) Δ(9)-THC and WIN55,212-2 affect brain tissue levels of excitatory amino acids in a phenotype-, compound-, dose-, and region-specific manner.

Galanopoulos A, Polissidis A, Papadopoulou-Daifoti Z, Nomikos GG, Antoniou K.

Behav Brain Res. 2011 Oct 10;224(1):65-72.

4) Individual differences in the effects of cannabinoids on motor activity, dopaminergic activity and DARPP-32 phosphorylation in distinct regions of the brain.

Polissidis A, Chouliara O, Galanopoulos A, Rentesi G, Dosi M, Hyphantis T, Marselos M, Papadopoulou-Daifoti Z, Nomikos GG, Spyraiki C, Tzavara ET, Antoniou K.

Int J Neuropsychopharmacol. 2010 Oct;13(9):1175-91.

5) Behavioural and dopaminergic alterations induced by a low dose of WIN 55,212-2 in a conditioned place preference procedure.

Polissidis A, Chouliara O, Galanopoulos A, Marselos M, Papadopoulou-Daifoti Z, Antoniou K.

Life Sci. 2009 Jul 31;85(5-6):248-54.

ΆΛΛΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ & ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1) Memantine in Everyday Clinical Practice. A Comparison of Studies in Germany and Greece

Förstl H, Stamouli SS, Janetzky W, Galanopoulos A, Karageorgiou C, Tzanakaki M.

Dement Geriatr Cogn Disord. 2011;32(4):267-72

2) Behavioral pharmacological properties of a novel cannabinoid 1',1'-dithiolane Δ⁸-THC analogue, AMG-3.

Antoniou K, Galanopoulos A, Vlachou S, Kourouli T, Nahmias V, Thermos, K, Panagis G, Daifoti Z, Marselos M, Papahatjis D and Spyraiki C.

Behavioural Pharmacology. 2005 Sep; 16(5-6): 499-510.

3) Οξεία γενικευμένη απομυελίνωση σε ολόκληρο τον άξονα του ΚΝΣ

Κ. Μπέλης, Α. Γαλανόπουλος, Ε. Αλεξίου, Γ. Γκέκας.

Τόμος 16, Τεύχος 4, 2007: 217 - 230.

4) Πολλαπλή σκλήρυνση σε νεαρή ασθενή με πρωτοπαθή χολική κίρρωση και σύνδρομο Sjögren. Κλινικός και θεραπευτικός προβληματισμός.

Α. Γαλανόπουλος, Ε. Αλεξίου, Ε. Καλαμπόκη, Γ. Γκέκας, Α. Παράση,

Χ. Δρακούλης.

Νευρολογία, Τόμος 15, Τεύχος 4, 2006: 223-228

5) Οξεία ψευδοπρομηκική παράλυση οφειλόμενη σε αμφοτερόπλευρες εμφρακτικές βλάβες οπισθίου σκέλους έσω κάψας.

Μ. Βικελής, Μ. Ξιφαράς, Α. Μπάστα, Αικ. Κολοβού, Α. Γαλανόπουλος, Ι. Μαρκάκης,

Γ. Γκέκας.

Νευρολογία, Τόμος 14, Τεύχος 2, 2005: 18 - 22.

6) Εχινοκοκκίαση κεντρικού νευρικού συστήματος με πολλαπλές ενδοκράνιες υδατίδες κύστεις. Παρουσίαση περίπτωσης.

Μ. Βικελής, Α. Γαλανόπουλος, Α. Μπάστα, Μ. Ξιφαράς, Γ. Γκέκας, Χ. Κυριαζής, Ν. Παπαγεωργίου, Μ. Γεραζούνης.

Νευρολογία, Τόμος 14, Τεύχος 2, 2005: 23 - 28.

7) Εγκεφαλική αυτοσωματική επικρατητική αρτηριοπάθεια με υποφλοιώδη έμφρακτα και λευκοεγκεφαλοπάθεια (σύνδρομο CADASIL): αναφορά περίπτωσης.

Μ. Βικελής, Μ. Ξιφαράς, Α. Μπάστα, Α. Γαλανόπουλος, Α. Τσακίρης, ΔΔ Μητσικώστας, Γ. Γκέκας.

Νευρολογία, Τόμος 13, Τεύχος 4, 2004: 220 - 220.

ΟΜΙΛΙΕΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1) Προκλήσεις στη θεραπευτική των ασθενών που λαμβάνουν L-Dopa: Προσφέροντας περισσότερο «καλό» χρόνο στην ημέρα τους

Αθήνα, 24 Νοεμβρίου 2012

“Κινητικές διακυμάνσεις στη νόσο Parkinson. Πότε και πώς εμφανίζονται;”

“Ο παρκινσονικός ασθενής σε θεραπεία με L-Dopa. Προβλήματα και ιδιαιτερότητες”

Γαλανόπουλος Α, Roewe W

2) 3^ο Πανελλήνιο Νευροφυσιολογικό Συνέδριο

Αγ. Νικόλαος, Κρήτη, 19-20 Οκτωβρίου 2012

“Η διέγερση με ή χωρίς επιθετικότητα στη νόσο Alzheimer. Ο ρόλος της μεμαντίνης στην καθυστέρηση και την αντιμετώπιση της διέγερσης”

Γαλανόπουλος Α

3) Επιστημονικό Συμπόσιο: Πρόγραμμα Alcone. Η χρήση των ψυχοτρόπων σκευασμάτων στην Άνοια. Ευρωπαϊκές Οδηγίες και Απόψεις. Focus Group Ελλάδας

Αθήνα 12-13 Οκτωβρίου 2012

“Η διέγερση με ή χωρίς επιθετικότητα στη νόσο Alzheimer’s. Ο ρόλος της μεμαντίνης στην καθυστέρηση και την αντιμετώπιση της διέγερσης”

Γαλανόπουλος Α.

4) 2^ο Συνέδριο Βιοψυχοκοινωνικής Προσέγγισης στην Ιατρική Περίθαλψη

Θεσσαλονίκη 15-17 Μαρτίου 2012

«Τα συμπεριφορικά συμπτώματα στη νόσο Alzheimer. Αναγνώριση και αντιμετώπιση»

Ιακωβίδης Α, Γαλανόπουλος Α

5) Αναζητώντας το «χαμένο» χρόνο στη νόσο Parkinson. Νέοι στόχοι και προοπτικές στη διαχείριση της νόσου από τη διάγνωση και καθ’ όλη τη διάρκειά της.

Αθήνα, 3 Δεκεμβρίου 2011

“Μηχανισμοί νευροεκφύλισης στη νόσο Parkinson”

“Συμπτώματα στη νόσο Parkinson. Από την πλευρά του ασθενούς”

Γαλανόπουλος Α., Stocchi F.

6) Ελληνογαλλική Νευροφυσιολογική Συνάντηση

Costa Navarino, Μεσσηνία, 28-29 Οκτωβρίου 2011

«Η σημασία του χρόνου στην θεραπευτική της νόσου Parkinson σε αρχικά και προχωρημένα στάδια»

Γαλανόπουλος Α.

7) Ελληνογαλλική Νευροφυσιολογική Συνάντηση

Costa Navarino, Μεσσηνία, 28-29 Οκτωβρίου 2011

«Συμπεριφορικά συμπτώματα στη νόσο Alzheimer. Διάγνωση και θεραπευτική προσέγγιση»

Γαλανόπουλος Α.

8) 3^ο Θερινό Σχολείο Γηριατρικής

Σκαφιδιά Ηλείας, 23-26 Ιουνίου 2011

«Κλειστό Κλινικό Φροντιστήριο για τη νόσο Parkinson»
Γαλανόπουλος Α

**9) 3^ο Θερινό Σχολείο Γηριατρικής
Σκαφιδιά Ηλείας, 23-26 Ιουνίου 2011**
«Κλειστό Κλινικό Φροντιστήριο για την Άνοια»
Γαλανόπουλος Α

**10) Νευροφυσιολογία, Διάγνωση και Θεραπεία στη Νευρολογία - Πολλαπλή Σκλήρυνση και
Κινητικές Διαταραχές.
Κέρκυρα 20 – 22 Μαΐου 2011**
«Η σημασία του χρόνου στην θεραπευτική της νόσου Parkinson. Η θέση της ρασαγιλίνης
στην καθυστέρηση εμφάνισης και την βελτίωση των συμπτωμάτων της νόσου»
Γαλανόπουλος Α

**11) Η Λειτουργική επικοινωνία στην έκπτωση γνωστικών λειτουργιών της νόσου Alzheimer.
Θεσσαλονίκη, 8 Μαΐου 2011**
Γαλανόπουλος Α, Saxton J.

**12) Λειτουργική επικοινωνία στη νόσο Alzheimer: ρόλος, αξιολόγηση και θεραπευτικές
παρεμβάσεις.
Αθήνα, 7 Μαΐου 2011**
Σακκά Π., Γαλανόπουλος Α., Saxton J.

**13) Περιφερικό Συμπόσιο Γενικής Ιατρικής Θεσσαλίας και Στερεάς Ελλάδας - Ευρωπαϊκό
Πολιτιστικό Κέντρο Δελφών, 18-20 Μαρτίου 2011**
«Κλινικό Φροντιστήριο: Συμπεριφορικά συμπτώματα στη νόσο Alzheimer: αναγνώριση, πιθανοί
αιτιοπαθογενετικοί μηχανισμοί και ο ρόλος της μεμαντίνης»
Γαλανόπουλος Α.

**14) Πρώιμη διάγνωση και νοσοτροποποίηση: Το επόμενο βήμα στη θεραπευτική της νόσου
Parkinson;**
Αθήνα, 29 Μαΐου 2010
Olanow CW, Γαλανόπουλος Α., Παπαλέξη Ε.

**15) Συμπεριφορικά συμπτώματα στην άνοια και ο ρόλος της μεμαντίνης
Αθήνα 9 Μαΐου 2010**
Robert Ph., Γαλανόπουλος Α., Παπαλέξη Ε.

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

**1) Effectiveness of memantine in autonomy of Alzheimer's patients with or without co-
existing vascular risk factors**
Kodounis A, Galanopoulos A, Kapitzoglou-Logotheti V, Mitsikostas D, Laggis N, Giailoglou D,
Parashos IA
Poster presented at 16th EFNS 2012, 8-11 Sep, Stockholm, Sweden

2) The effectiveness of rasagiline in a greek PD population with motor fluctuations
Galanopoulos A, Kapitzoglou V, Mitsikostas DD, Makris N, Kodounis A, Makri E, Varelas
G, Klados G, Galios D, Giailoglou D, Parashos IA
Poster presented at 8th MDPD 2012, 3-6 May, Berlin, Germany

**3) Rasagiline shows significant clinical improvements in Parkinson's Disease patients with
motor fluctuations**
Mitsikostas DD, Galanopoulos A, Makris N, Kapitzoglou V, Kodounis A, Makri E, Varelas
G, Klados G, Galios D, Giailoglou D, Parashos IA
Poster presented at 15th EFNS 2011, 10-13 Sep, Budapest, Hungary

4) Effectiveness of memantine on the independence status of Alzheimer Disease patients in real life clinical practice

Kapitzoglou-Logotheti V., Mitsikostas D., Laggis N., Kodounis A., Papalexi E., Galanopoulos A., Parashos IA

Poster presented at 15th EFNS 2011, 10-13 Sep, Budapest, Hungary

5) Memantine in the treatment of Alzheimer's Disease: Pooled analyses of 4305 patients in Germany and Greece

Förstl H, Stamouli S, Janetzky W, Karageorgiou C, Tzanakaki M, Papalexi E, Galanopoulos A.

Poster presented at IAGG 2011, Apr 14-17, Bologna, Italy

6) Memantin in der Praxis: Eine Untersuchung an 4305 Patienten in Deutschland und Griechenland

Förstl H, Stamouli S, Galanopoulos A., Karageorgiou C, Tzanakaki M, Janetzky W

Poster presented at DGPPN 2010, 24-27 Nov, Berlin, Germany

7) Rasagiline shows significant clinical improvements in a Greek PD population. Makri E, Galanopoulos A., Kapitzoglou V, Kodounis A Mitsikostas DD, Makris N, Varelas G, Galios D, Klados G, Parashos IA

Poster presented in MDPD 2010, 9-12 Dec, Barcelona, Spain

8) Memantine in everyday clinical practice. Comparisons of data from observational studies in Greece and in Germany

Stamouli S, Förstl H, Janetzky W, Karageorgiou C, Tzanakaki M, Papalexi E, Galanopoulos A.

Oral Presentation at Alzheimer Europe 2010, Oct 2-5, Luxemburg

9) The use of rasagiline in clinical practice in Greece

Kodounis A, Galanopoulos A., Galios D, Kapitzoglou V, Klados G, Makri E, Makris N, Mitsikostas DD, Varelas G, Parashos IA

Poster presented at 14th EFNS 2010, 25-28 Sep, Geneva, Switzerland

10) Extensive hypertensive encephalopathy completely reversed after successful treatment

A.P. Galanopoulos, M. Xifaras, A. Polissidis, Z. Papadopoulou-Daifoti

Poster presented at 14th EFNS 2010, 25-28 Sep, Geneva, Switzerland.

11) Glutamate and aspartate levels in the cerebrospinal fluid of a patient with Primary Progressive Aphasia

A.P. Galanopoulos, A. Polissidis, M. Xifaras, Z. Papadopoulou-Daifoti

Poster presented at 14th EFNS 2010, 25-28 Sep, Geneva, Switzerland

12) Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy (FSHMD) not associated with 4q35 deletion. Presentation of a greek family. A case report

Galanopoulos A., Xifaras M., Filippidou S., Passas N., Kekou K., Kanavakis E., Gekas G.

Poster presented at 13th EFNS 2009, Florence, Italy

13) Myasthenia gravis, primary biliary cirrhosis and thyroiditis Hashimoto. A case of rare coexistence of three autoimmune disorders.

A. Galanopoulos, M Xifaras, C. Dionisatos, G.Gekas

Poster presented at 12th EFNS 2008, August 23-26, Madrid, Spain

14) Severe myelopathy due to a spinal dural arteriovenous fistula of the upper thoracic spine. Rapid development of paraplegia mimicking an anterior spinal artery syndrome. A case report.

Galanopoulos A., Dimitraka M., Xifaras M., Gekas G.

Poster presented at 18th ENS 2008, June 7-11, Nice, France.

15) POEMS syndrome: clinical presentation and effective treatment with autologous peripheral blood stem cell transplantation. A case report.

Alexiou E., Galanopoulos A., Theologos G., Vlamis C., Markakis I., Repousis P., Gekas G.

Poster presented at 18th ENS 2008, June 7-11, Nice, France.

16) Bilateral pyramidal tract syndrome as the first neurological presentation of a patient with a large cervical plexiform neurofibroma with multiple intraspinal extensions. A case report.

A. Galanopoulos, M. Xifaras, Ch. Dionisatos, G. Gekas.

Poster presented at 11th EFNS 2007 Aug; Brussels, Belgium

17) Individual responses to novelty and cannabinoid administration

O. Chouliara, M. Dosi, A. Polissidis, A. Galanopoulos, E. Tzavara, M. Marselos,

Z. Papadopoulou-Daifoti, C. SpyraKI K. Antoniou

European Behavioural Pharmacology Society, 12th Biennial Meeting, Tuebingen, Germany, August 31 - September 3, 2007

18) A case of fulminant malignant demyelination along total central nervous system axis. ADEM or MS? Diagnostic speculation and therapeutic efforts.

A. Galanopoulos, K. Belis, E. Alexiou, G. Gekas.

Poster presented at 17th ENS 2007 June 16-20 Rhodes, Greece.

19) Permanent blindness in an immunocompetent patient with cryptococcal meningo-encephalitis.

E. Alexiou, E. Kalaboki, A. Galanopoulos, G. Gekas

Poster presented at 17th ENS 2007 June 16-20 Rhodes, Greece

20) Primary Biliary Cirrhosis (PBC), Multiple Sclerosis (MS) and Thyroiditis Hashimoto (TH) – A case report.

A. Galanopoulos, A. Mpasta, E. Alexiou, G. Gekas

Poster presented at 10th EFNS 2006, September 2-5, Glasgow, Scotland

21) Acute pseudobulbar palsy due to bilateral posterior limb capsular infarction

M. Vikelis, M. Xifaras, A. Basta, A. Kolovou, A. Galanopoulos, I. Markakis, G. Gekas

Poster presented at 9th EFNS 2005, September 2-5, Athens, Greece

22) Multiple cerebral hydatid cysts of cardiac origin

M. Vikelis, A. Galanopoulos, H. Kyriazis, M. Xifaras, A. Mpasta, N. Papageorgiou, M. Gerazounis, G. Gekas.

Poster presented at 15th ENS, 2005 June, Vienna, Austria,

23) Opsoclonus – Myoclonus Syndrome Associated With Anti-GAD Autoimmunity: Treatment With Intravenous Immune Globulin

I. Markakis, E. Kalampoki, E. Alexiou, A. Galanopoulos, A. Tsakiris, G. Gekas

Poster presented at 1st Aegean Meeting on Neurologic Therapeutics

Heraklion, Crete, 11-15 September 2004.

ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1) Gutamatergic alterations following cannabinoid administration.

A. Galanopoulos, A. Polissidis, O. Chouliara, K. Antoniou, Z. Papadopoulou-Daifoti

5^o Πανελλήνιο Συνέδριο Φαρμακολογίας με διεθνή συμμετοχή

Αθήνα. 23-24 Μαΐου 2008

2) Αρτηριοφλεβώδης δυσπλασία της σκληράς μήνιγγας του νωτιαίου μυελού. Ένα σπάνιο αίτιο μυελικής συνδρομής με συμπτωματολογία συνδρόμου πρόσθιας νωτιαίας αρτηρίας. Παρουσίαση περίπτωσης.

A. Γαλανόπουλος, Μ. Ξιφαράς, Μ. Δημητρακά, Γ. Γκέκας.

22^o Πανελλήνιο Συνέδριο Ελλήνων Νευρολόγων

Χανιά, 1-4 Μαΐου 2008

3) Σύνδρομο POEMS: Κλινική παρουσίαση περιστατικού και επιτυχής θεραπευτική αντιμετώπιση με αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.

A. Γαλανόπουλος, Ε. Αλεξίου, Ι. Μαρκάκης, Χ. Βλάμης, Π. Ρεπούσης, Γ. Γκέκας.

22^o Πανελλήνιο Συνέδριο Ελλήνων Νευρολόγων

Χανιά, 1-4 Μαΐου 2008

4) Βαρεία μυασθένεια, πρωτοπαθής χολική κίρρωση και θυρεοειδίτιδα Hashimoto. Παρουσίαση περιστατικού με σπάνια συνύπαρξη τριών αυτοάνοσων διαταραχών που δε σχετίζονται με τη λήψη D-πενικιλλαμίνης.

Α. Γαλανόπουλος, Μ. Ξιφαράς, Ε. Παπαγεωργίου, Γ. Γκέκας.

22^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελλήνων Νευρολόγων

Χανιά, 1-4 Μαΐου 2008

5) Κακοήθης κεραυνοβόλος απομυελίνωση σε ολόκληρο τον άξονα του ΚΝΣ. Πολλαπλή σκλήρυνση (MS) ή οξεία διάσπαρτη εγκεφαλομυελίτιδα (ADEM); Διαγνωστικός προβληματισμός και θεραπευτική προσέγγιση.

Α. Γαλανόπουλος, Κ. Μπέλης, Ε. Αλεξίου, Γ. Γκέκας.

21^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελλήνων Νευρολόγων

Αθήνα, 19-22 Απριλίου 2007

6) Αμφοτερόπλευρη πυραμιδική συνδρομή ως πρώτη κλινική εκδήλωση εκτεταμένου αυχενικού πλεγματοδούς (plexiform) νευροϊνώματος με πολλαπλές διεισδύσεις στο νωτιαίο μυελό. Παρουσίαση περίπτωσης.

Α. Γαλανόπουλος, Μ. Ξιφαράς, Χ. Διονυσάτος, Γ. Γκέκας.

21^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελλήνων Νευρολόγων

Αθήνα, 19-22 Απριλίου 2007

7) Βαρεία κρυπτοκοκκική μηνιγγοεγκεφαλίτιδα σε μη ανοσοκατασταλμένο ασθενή. Επιπλοκές και κλινική πορεία.

Ε. Καλαμπόκη, Ε. Αλεξίου, Α. Γαλανόπουλος, Γ. Γκέκας.

21^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελλήνων Νευρολόγων

Αθήνα, 19-22 Απριλίου 2007

8) Βραδέως αποθεραπευθείσα λοίμωξη του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) από ερπητοϊό σε νεαρή ασθενή με πραιοφάτως διαγνωσθείσα πρωτοπαθή χολική κίρρωση.

Ε. Αλεξίου, Α. Γαλανόπουλος, Ε. Καλαμπόκη, Ν. Νικολάου, Γ. Γκέκας

32^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο

Αθήνα, 9-13 Μαΐου 2006

9) Νευραλγία τριδύμου ως πρώτη κλινική εκδήλωση ακουστικού νετρινώματος. Περιγραφή περιπτώσεως.

Α. Γαλανόπουλος, Ε. Αλεξίου, Κ. Μπέλης, Γ. Γκέκας

20^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελλήνων Νευρολόγων με διεθνή συμμετοχή

Λάρισα, 16-19 Μαρτίου 2006

10) Βαρεία ηπατική νέκρωση μετά από χορήγηση ιντερφερόνης β-1α στην πολλαπλή σκλήρυνση

Δρακούλης Χ., Αλεξίου Ε., Γαλανόπουλος Α., Νικολάου Σ., Μαρκάκης Ι., Καλαμπόκη Ε., Γκέκας Γ.

31^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο,

Αθήνα, Μαΐος 2005

11) Πρωτοπαθής Χολική Κίρρωση και Πολλαπλή Σκλήρυνση

Γαλανόπουλος Α., Αλεξίου Ε., Μαρκάκης Ι., Καλαμπόκη Ε., Δρακούλης Χ., Παράση Α., Γκέκας Γ.

19^ο Συνέδριο Ελλήνων Νευρολόγων

Θεσσαλονίκη, 17-20 Μαρτίου 2005

12) Εχινικοκκίαση Κεντρικού Νευρικού Συστήματος με πολλαπλές ενδοκράνιες υδατίδες κύστεις. Παρουσίαση περίπτωσης».

Μ. Βικελής, Α. Γαλανόπουλος, Α. Μπάστα, Μ. Ξιφαράς, Γ. Γκέκας, Χ. Κυριαζής, Ν. Παπαγεωργίου, Μ. Γεραζούνης.

19^ο Συνέδριο Ελλήνων Νευρολόγων

Θεσσαλονίκη, 17-20 Μαρτίου 2005

13) Προκλινικός συμπεριφορικός φαρμακολογικός έλεγχος νεοσυντεθείσας ουσίας με συγγένεια στους κανναβινοειδείς υποδοχείς».

Α. Αντωνίου, Α. Γαλανόπουλος, Σ. Βλάχου, Β. Ναχιμία, Κ. Θερμού, Γ. Παναγής, Ζ. Νταϊφώτη, Μ. Μαρσέλος, Δ. Παπαχατζής και Χ. Σπυράκη.

7^η Επιστημονική Ημερίδα Φαρμακολογίας
Αθήνα, 26 Φεβρουαρίου 2005

14) Καλοήθης πτώση βλεφάρου στα πλαίσια διάσχισης της απονεύρωσης του ανεγκτήρος μυός

Καλαμπόκη Ε., Μαρκάκης Ι., Αλεξίου Ε., Ιωαννίδου Μ., Γαλανόπουλος Α., Ξιφαράς Μ., Τσακίρης Α., Γκέκας Γ.

4^ο Πειραιϊκό Ιατρικό Συνέδριο
Πειραιάς, 2-4 Δεκεμβρίου 2004

15) Επώδυνη διπλωπία απότοκος φαρμακογενούς αποπληξίας της υποφύσεως

Μαρκάκης Ι., Αλεξίου Ε., Ιωαννίδου Μ., Καλαμπόκη Ε., Γαλανόπουλος Α., Μπάστα Α., Ξιφαράς Μ., Γκέκας Γ.

20^ο Συνέδριο Ενόπλων Δυνάμεων
Θεσσαλονίκη 18-21 Νοεμβρίου 2004.

16) Εγκεφαλική Αυτοσωματική Επικρατητική Αρτηριοπάθεια με Υποφλοιώδη Έμφρακτα και Λευκοεγκεφαλοπάθεια (σύνδρομο CADASIL). Αναφορά περίπτωσης.

Βικελής Μ., Ξιφαράς Μ., Μπάστα Α., Γαλανόπουλος Α., Τσακίρης Α., Μητσιακώστας ΔΔ., Γκέκας Γ.

25^η Φθινοπωρινή Συνάντηση Ελλήνων Νευρολόγων
Κέρκυρα, 6-8 Νοεμβρίου 2004.

17) Αθροιστική κεφαλαλγία και αραχνοειδής κύστη του σύστοιχου κροταφικού λοβού

Βικελής Μ., Ξιφαράς Μ., Κολοβού Α., Γαλανόπουλος Α., Αλεξίου Ε., Γκέκας Γ.

24^η Εαρινή Συνάντηση Ελλήνων Νευρολόγων
Ξάνθη, 7-9 Μαΐου 2004.

18) Θρόμβωση άνω οβελιαίου φλεβώδους κόλπου και μυελοϋπερπλαστικό σύνδρομο

Βικελής Μ., Ξιφαράς Μ., Μπάστα Α., Κολοβού Α., Γαλανόπουλος Α., Αλεξίου Ε., Τσακίρης Α., Γκέκας Γ.

24^η Εαρινή Συνάντηση Ελλήνων Νευρολόγων
Ξάνθη, 7-9 Μαΐου 2004.

19) Επιδράσεις προσδεμάτων των υποδοχέων των κανναβινοειδών και ρυθμιστών των ενδογενών κανναβινοειδών στην ομοιοστάση της ηδονής : ο ρόλος των CB1 υποδοχέων

A. Galanopoulos, A. Polissidis, O. Chouliara, K. Antoniou, Z. Papadopoulou-Daifoti

18^η Ετήσια Συνάντηση της Ελληνικής Εταιρείας για τις Νευροεπιστήμες
Αθήνα, 17-19 Οκτωβρίου 2003

20) Μεταβολισμός του σιδήρου και σακχαρώδης διαβήτης

Γκιουλμπασάνης Ι., Μάινας Ε., Κοπανάκης Δ., Σκορδά Α., Παναγιώτου Ε., Γαλανόπουλος Α., Λατούφης Χ., Παρβουλέσκου Γ., Καΐλη-Παπαδοπούλου Ε., Αρτίκης Β., Βασιλικός Π.

19^ο Συνέδριο Ενόπλων Δυνάμεων
Θεσσαλονίκη, 7-10 Νοεμβρίου 2002

21) Μεταβολές των δημογραφικών χαρακτηριστικών των νοσηλευθέντων ασθενών της τελευταίας τριακονταετίας

Κοπανάκης Δ., Γκιουλμπασάνης Ι., Μάινας Ε., Σκορδά Λαμπρινή., Γαλανόπουλος Α., Φερεντίνου Ε., Λατούφης Χ., Χριστοφορίδου Μ., Βασιλικός Π.

8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογίας,
Αθήνα, 1-5 Οκτωβρίου 2002

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

Υπότροφος του Ιδρύματος Λάτση καθ' όλη τη διάρκεια των προπτυχιακών σπουδών στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών και των μεταπτυχιακών σπουδών στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

ΑΓΓΛΙΚΑ : PROFICIENCY in English (University of Michigan).
FIRST CERTIFICATE in English (University of Cambridge).

ΓΑΛΛΙΚΑ: DALF (Diplôme Approfondi de Langue Française).
CERTIFICAT DE LANGUE FRANÇAISE.

ΓΕΡΜΑΝΙΚΑ: Παρακολούθηση βασικών μαθημάτων Γερμανικής Γλώσσας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η πρώτη μου γνωριμία με το Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών χρονολογείται από το φθινόπωρο του 1994, όταν σαν τριτοετής φοιτητής της Ιατρικής Σχολής παρακολουθούσα τις διαλέξεις και τα εργαστήρια της Φαρμακολογίας. Από την πρώτη στιγμή, το αντικείμενο της Φαρμακολογίας με γοήτευσε επιστημονικά, ενώ η αίσθηση που αποκόμισα ήταν ότι το Εργαστήριο αυτό, παρά την παλαιότητα των κτιρίων του, απέπνεε ανθρώπινη ζεστασιά και ήταν στελεχωμένο με ερευνητές που δούλευαν με μεράκι και επιστημονική προσήλωση. Δεν μπορώ να κρύψω ότι, κατά το 3^ο Έτος της Ιατρικής, σκέφτηκα για πρώτη φορά ότι θα ήμουν πολύ τυχερός αν μπορούσα να ασχοληθώ με τη φαρμακολογική έρευνα στο μέλλον και να συνεργαστώ με μερικούς από τους τότε δασκάλους μου.

Όταν αποφοίτησα από την Ιατρική Σχολή το 1998, ακολούθησα την τυπική διαδρομή που ακολουθούν συνήθως οι νέοι ιατροί, με επιλογή Υπηρεσίας Υπαίθρου και αίτηση για την απόκτηση Ιατρικής Ειδικότητας. Παρά το γεγονός ότι η κλινική Ιατρική είναι συναρπαστική και η αίσθηση άμεσης προσφοράς στον άνθρωπο αναντικατάστατη, για μένα παρέμενε μεγάλο όνειρο να μπορέσω να ασχοληθώ με την προκλινική έρευνα. Άλλωστε, η έρευνα έχει σαν θεμελιώδη στόχο την ανακάλυψη μηχανισμών και ουσιών με απώτερο σκοπό την ανακούφιση του ανθρώπου από τις ασθένειες και την προσφορά καλύτερης ποιότητας ζωής στο ανθρώπινο είδος.

Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, αποφάσισα να επιλέξω μια ειδικότητα όχι και τόσο δημοφιλή στους αποφοίτους Ιατρικής, πλην όμως εξαιρετικά ενδιαφέρουσα όσον αφορά το επιστημονικό αντικείμενο και με ιδιαίτερες ερευνητικές προοπτικές: τη Νευρολογία. Παράλληλα, αναζητούσα μια καλή ευκαιρία για να ασχοληθώ με την έρευνα και η ευκαιρία αυτή μου δόθηκε το 2002, όταν έμαθα για το Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Νευροεπιστημών του Πανεπιστημίου της Κρήτης. Προσήλθα αμέσως στη συνέντευξη και η χαρά μου ήταν απερίγραπτη όταν με ενημέρωσαν ότι η αίτησή μου έγινε δεκτή. Δεν είχα καμία δυσκολία να αλλάξω την πόλη όπου θα εκπαιδευόμουν για το μέρος της ειδικότητας που αφορούσε στην Ψυχιατρική και έπρεπε να παρακολουθήσω τότε και να μετακομίσω στην Κρήτη.

Διέμεινα στην Κρήτη επί δύο χρόνια, όπου έκανα τα πρώτα μου βήματα και τελικά απόλαυσα κυριολεκτικά την επαφή μου με το

θεωρητικό και εργαστηριακό αντικείμενο των Νευροεπιστημών. Στα πλαίσια της τελευταίας εργαστηριακής άσκησης για την ολοκλήρωση του Μεταπτυχιακού μου, η κ. Θερμού, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας σήμερα, μου πρότεινε να επιστρέψω στην Αθήνα και να παρακολουθήσω τις εργασίες του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών. Δέχτηκα με πολλή χαρά, ιδιαίτερα καθώς θα είχα τη δυνατότητα να συνεχίσω την έρευνα στον τομέα των κανναβινοειδών, ερευνητικό πεδίο που ήδη είχα γνωρίσει από τη θητεία μου στην Κρήτη, ενώ η πρώτη μου επαφή στις αρχές του 2004, με την αείμνηστη Χριστίνα Σπυράκη, Διευθύντρια τότε του Εργαστηρίου και την σήμερα Ομότιμη Καθηγήτρια, Ζέτα Παπαδοπούλου-Νταϊφώτη, μου ενέπνευσαν αμέσως την εκτίμηση και το σεβασμό, καθώς με περίεβαλαν από την αρχή με εμπιστοσύνη και με έκαναν να νιώσω μέλος της ζεστής «οικογένειας» της Φαρμακολογίας Αθηνών. Πολύ σύντομα, ορίστηκε το θέμα της διδακτορικής μου διατριβής, αποφοίτησα από το Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Νευροεπιστημών της Κρήτης και εργάστηκα συστηματικά για τους σκοπούς της διατριβής αυτής.

Ασθάνομαι ιδιαίτερα χαρούμενος και τυχερός που μου δόθηκε η ευκαιρία να εργαστώ στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών. Η συμμετοχή μου στην έρευνα και η αίσθηση ότι συνεισέφερα κι εγώ ένα «πειραδάκι» στην εξέλιξη της επιστημονικής γνώσης, όσο μικρό ή μεγάλο κι αν είναι, είναι για μένα ανεκτίμητη. Στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας απέκτησα γνώσεις και εκπαιδεύτηκα σε τεχνικές πολύ χρήσιμες για την επιστημονική μου εξέλιξη. Διδάχτηκα να δουλεύω μεθοδικά, να μην απογοητεύομαι από απρόσμενες αποτυχίες και να βάζω μακροπρόθεσμους στόχους. Πάνω από όλα όμως συνεργάστηκα και γνώρισα ανθρώπους μοναδικούς και ιδιαίτερα αξιόλογους, σε επιστημονικό και ανθρώπινο επίπεδο, η επικοινωνία με τους οποίους αποτελεί για μένα την ακριβότερη παρακαταθήκη.

Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Την αείμνηστη **Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Χριστίνα Σπυράκη**, η οποία, με το επιστημονικό της κύρος, τη συγκρότηση της σκέψης και την αποφασιστικότητά της, σημάδεψε ανεξίτηλα την απόφασή μου να εμβαθύνω στην έρευνα και να κάνω τις πρώτες δύσκολες επιλογές που αφορούσαν στην επιλογή του θέματος και το σχεδιασμό των πειραμάτων. Η Χριστίνα Σπυράκη είχε μια μοναδική ικανότητα να ανοίγει δρόμους εκεί όπου τα αδιέξοδα φάνταζαν ανυπέρβλητα και να παρασύρει τους συνεργάτες της να εργαστούν δημιουργικά για το όραμά της, χωρίς να τους το επιβάλλει. Η πρόωρη απώλεια της Χριστίνας Σπυράκη στερεί την επιστημονική κοινότητα και το Εργαστήριό μας ειδικότερα από μια εμπνευσμένη δάσκαλο.

Την **Ομότιμη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Ζέτα Παπαδοπούλου-Νταϊφώτη**, η οποία δέχτηκε χωρίς δισταγμό να αναλάβει την επίβλεψή μου μετά την απώλεια της Καθηγήτριας Χριστίνας Σπυράκη. Η Καθ. Ζέτα Παπαδοπούλου-Νταϊφώτη συνδυάζει άψογα την επιστημονική υποστήριξη με υψηλές οργανωτικές ικανότητες, απαραίτητες για τη διεύθυνση ενός εργαστηρίου με πολυπληθές ανθρώπινο δυναμικό, όπως της Φαρμακολογίας. Από την πρώτη στιγμή με εμπιστεύτηκε και με υποστήριξε, λύνοντας άμεσα και πρακτικά όλα τα ζητήματα που τυχόν προέκυπταν. Οι συμβουλές της υπήρξαν πολύτιμες για μένα. Της είμαι εξαιρετικά ευγνώμων για τη στήριξη που μου παρείχε, ιδιαίτερα στις πιο δύσκολες στιγμές αυτής της διαδρομής, στις οποίες με βοήθησε καθοριστικά να προχωρήσω.

Την **Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Κατερίνα Αντωνίου**, η οποία συνέβαλε αποφασιστικά στο σχεδιασμό της πορείας, την εφαρμογή του πλάνου και τελικά την ολοκλήρωση της διατριβής μου. Η ερευνητική της εμπειρία είναι ανεκτίμητη και η ενέργειά της αστείρευτη. Παρά τα πολυσύνθετα ερευνητικά της ενδιαφέροντα και την απόσταση που μας χωρίζει από το Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, η κα Αντωνίου αφιέρωσε πολύ προσωπικό χρόνο στην ολοκλήρωση όλων των απαραίτητων σταδίων της διδακτορικής μου διατριβής. Το ενδιαφέρον της για την επιστημονική μου πορεία, όπως και για όλους τους συνεργάτες της, υπήρξε τέτοιο, που ποτέ δεν ένοιωσα μόνος οποιαδήποτε στιγμή οποιασδήποτε μέρας κατά τη διάρκεια των πολύωρων ερευνητικών εργασιών.

Τον **Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας Γεώργιο Παπαδόπουλο**, ο οποίος δέχτηκε ευγενικά να με συνεπιβλέψει και πάντοτε εισέπραττα από εκείνον το ειλικρινές του ενδιαφέρον για την επιστημονική μου πρόοδο.

Τον **Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας Νίκο Πιτσιόκα**, για το διδακτικό του ενδιαφέρον και τις γνώσεις που μου μετέδωσε, στα πειράματα που διεξήχθησαν στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής Θεσσαλίας στη Λάρισα.

Τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, **Καθηγητή Φαρμακολογίας Νίκο Σιταρά** και **Καθηγητή Νευρολογίας Ελευθέριο Σταμπουλή**, οι οποίοι δέχτηκαν ευγενικά να μελετήσουν και να σχολιάσουν τη διατριβή μου συμμετέχοντας στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή.

Την **Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Χριστίνα Δάλλα**, η οποία πρόθυμα δέχτηκε επίσης να συμμετάσχει στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή και επιπλέον για την άμεση και ουσιαστική

συνδρομή της σε διαδικαστικά και επιστημονικά ζητήματα που αντιμετώπισα. Ιδιαίτερα την ευχαριστώ, όπως και τον ψυχίατρο **Δρ. Νίκο Κόκρα**, καθώς είναι από τους πρώτους ανθρώπους που γνώρισα στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, που συνετέλεσαν ουσιαστικά στη σταδιακή εξοικείωσή μου με τους χώρους και τις τεχνικές του Εργαστηρίου και με υπομονή απαντούσαν πάντα σε κάθε ερώτηση ή απορία μου.

Την **Δρ. Πολυσιδίη Αλεξία, Φαρμακόλογο**, η οποία υπήρξε για μένα η πιο άμεση συνεργάτης, καθώς εργαστήκαμε σε κοινό πρόγραμμα για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα. Η εργατικότητα, η αποτελεσματικότητα και ο επαγγελματισμός της αποτελούν βασικά της χαρακτηριστικά. Οφείλω πολλά στη συνεργασία μας στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, καθώς λόγω της παράλληλης ενασχόλησής μου με το κλινικό έργο της Νευρολογίας, η οργάνωση και η βοήθειά της σε συνθήκες καθημερινότητας ήταν πρωταρχικής σημασίας.

Τον **Δρ. Πιτυκούτη Ποθητό**, Βιολόγο, για την πολύ καλή συνεργασία και τη «χημεία» που είχαμε, μοιραζόμενοι ατέλειωτες εργαστηριακές ώρες πάντα με πνεύμα συνεργασίας και αλληλοκατανόηση. Επίσης, το **Δημήτρη Μπεσίνη**, Ιατρό για το επιστημονικό του πάθος και τις πρωτότυπες ιδέες του.

Την **κα Δέσποινα Παπασάββα, Τεχνικό Εργαστηρίου**, για την πολύτιμη συνδρομή της στη διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς η επιδεξιότητα της στη διαχείριση των πειραματοζώων και στην επίλυση τεχνικών και όχι μόνο προβλημάτων είναι अपαραμίλλη.

Την **Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Κική Θερμού** και τον **Αναπληρωτή Καθηγητή Ψυχολογίας Γεώργιο Παναγή**, οι οποίοι με εμπήσαν στο συναρπαστικό κόσμο των Νευροεπιστημών και υπήρξαν για μένα πολύτιμοι δάσκαλοι.

Την οικογένειά μου και προπαντός **τη γυναίκα μου Σταυρούλα**, η οποία ανέλαβε μόνη της όλο το βάρος της οικογενειακής οργάνωσης και της ανατροφής των παιδιών, ανεχόμενη την πολύωρη απουσία μου από το σπίτι και **τις κόρες μου Βάσια και Δήμητρα** για την απέραντη και ανιδιοτελή αγάπη που μου δείχνουν κάθε στιγμή.

Τον **πατέρα μου Χρήστο, τη μητέρα μου Βασιλική και την αδελφή μου Μαρία**, για την αγάπη τους, την πίστη τους σε εμένα και την υποστήριξη που μου έχουν δώσει από τα παιδικά μου χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	iv
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	viii
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
Ιστορική Αναδρομή.....	3
Σύγχρονες θεραπευτικές εφαρμογές.....	5
Ενδοκανναβινοειδές σύστημα.....	8
Υποδοχείς των κανναβινοειδών.....	10
CB ₁ Υποδοχείς.....	11
CB ₂ Υποδοχείς.....	14
Άλλοι υποδοχείς κανναβινοειδών.....	17
Ενδοκανναβινοειδή.....	22
Ανανδαμίδιο (N-αραχιδονυλ-αιθανολαμίδιο, AEA).....	23
2-AG (2-αραχιδονυλ-γλυκερόλη).....	25
Νολαδινικός αιθέρας (νολαδίνη).....	28
Βιροδαμίνη.....	28
NADA (N-αραχιδονυλ-ντοπαμίνη).....	28
Προσδέματα των υποδοχέων των κανναβινοειδών.....	30
Αγωνιστές.....	30
Κλασικά κανναβινοειδή.....	30
Μη κλασικά κανναβινοειδή.....	31
Αμινοαλκυλοϊνδόλες.....	32
Εικοσανοειδή.....	32
Ανταγωνιστές.....	33
Παλίνδρομη ρύθμιση της συναπτικής διαβίβασης από τα κανναβινοειδή.....	35
Βραχυπρόθεσμη καταστολή της συναπτικής διαβίβασης που μεσολαβείται	

από τα κανναβινοειδή.....	36
Μακροπρόθεσμη καταστολή της συναπτικής διαβίβασης που μεσολαβείται από τα κανναβινοειδή.....	42
Γλουταμικό οξύ / Γλουταμικό.....	44
Σύνθεση και μεταβολισμός του γλουταμικού.....	45
Γλουταματεργικοί υποδοχείς.....	47
Ιοντοτροπικοί γλουταματεργικοί υποδοχείς.....	48
Μεταβοτροπικοί γλουταματεργικοί υποδοχείς.....	51
Αλληλεπιδράσεις μεταξύ κανναβινοειδών και γλουταμικού.....	54
Αλληλεπιδράσεις σε επίπεδο υποδοχέων.....	54
Αλληλεπιδράσεις σε επίπεδο εγκεφαλικών δομών.....	56
Ραβδωτό και Επικλινής Πυρήνας του Διαφράγματος.....	56
Φλοιός του εγκεφάλου.....	57
Γνωστικές λειτουργίες – Μάθηση και μνήμη.....	59
Α) Άδηλη μνήμη.....	60
Α1) Μη συνειρμική άδηλη μνήμη.....	60
Α1.i) Εθισμός.....	60
Α1.ii) Ευαισθητοποίηση.....	60
Α2) Συνειρμική άδηλη μνήμη.....	61
Α2.i) Κλασική εξαρτημένη μάθηση.....	61
Α2.ii) Συντελεστική εξαρτημένη μάθηση.....	61
Β) Έκδηλη μνήμη.....	62
Β1) Βραχυπρόθεσμη μνήμη και μνήμη εργασίας.....	62
Β2) Μακροπρόθεσμη μνήμη.....	64
Β2.i) Σημασιολογική μνήμη.....	65
Β2.ii) Επεισοδιακή μνήμη.....	65
Γνωστικές λειτουργίες και κανναβινοειδή.....	66
Μνήμη εργασίας και κανναβινοειδή.....	67

Δοκιμασία ακτινωτού λαβυρίνθου.....	68
Δοκιμασία λαβυρίνθου σε σχήμα T.....	68
Δοκιμασία υδάτινου λαβυρίνθου.....	69
Δοκιμασία καθυστερημένης αντιστοίχισης (ή μη αντιστοίχισης).....	69
Μακροπρόθεσμη / Βραχυπρόθεσμη μνήμη και κανναβινοειδή – Πειραματικές δοκιμασίες.....	71
Μελέτες ανοικτού πεδίου.....	71
Α. Δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου.....	71
Β. Δοκιμασία κοινωνικής αναγνώρισης.....	72
Γ. Δοκιμασία εξοικείωσης σε νέο περιβάλλον.....	72
Μελέτες «χωρικής» μνήμης.....	72
Α. Δοκιμασία ακτινωτού λαβυρίνθου.....	72
Β. Δοκιμασία υδάτινου λαβυρίνθου.....	73
Νευροβιολογικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην εγκατάσταση Μάθησης και Μνήμης . Ο ρόλος των κανναβινοειδών.....	74
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	77
ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	78
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	81
Πειραματόζωα.....	81
ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ.....	82
Α) Μελέτη συμπεριφοράς ανοικτού πεδίου.....	82
Β) Εφαρμογή του πειραματικού μοντέλου «μάθησης λόγω εξοικείωσης σε νέο περιβάλλον».....	83
Γ) Εφαρμογή του πειραματικού μοντέλου «αναγνώρισης νέου αντικειμένου».....	85
Δ) Εφαρμογή του πειραματικού μοντέλου «ακτινωτού υδάτινου λαβυρίνθου».....	88
ΝΕΥΡΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ.....	92

Προσέγγιση λειτουργίας διεγερτικών αμινοξέων σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές. Μέτρηση ιστικής συγκέντρωσης γλουταμικού (ex vivo μελέτες).....	92
Θυσία πειραματοζώων και απομόνωση εγκεφαλικών περιοχών.....	92
Νευροχημική Ανάλυση ιστικών συγκεντρώσεων με τη μέθοδο Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με Ηλεκτροχημικό Ανιχνευτή (HPLC-ED).....	92
In vivo προσέγγιση της λειτουργίας διεγερτικών αμινοξέων σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές –μέτρηση εξωκυττάριας συγκέντρωσης γλουταμικού με χρήση in vivo εγκεφαλικής μικροδιαπίδυσης.....	96
Παρασκευή ειδικών καθετήρων (probe).....	97
Χειρουργικές επεμβάσεις: στερεοταξική εμφύτευση ειδικών καθετήρων.....	98
Συλλογή δειγμάτων in vivo εγκεφαλικής μικροδιαπίδυσης.....	101
Θυσία και ιστολογική ανάλυση εγκεφάλων.....	102
Νευροχημική Ανάλυση – μέτρηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης γλουταμικού με τη μέθοδο HPLC-ED.....	103
Σχεδιασμός πειραμάτων.....	104
Χορήγηση φαρμάκων.....	105
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	106
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	108
<u>1ο Πείραμα:</u> Μελέτη συμπεριφοράς ανοικτού πεδίου. Η επίδραση αγωνιστών και ανταγωνιστών των CB ₁ υποδοχέων στην κινητικότητα.....	108
<u>2ο Πείραμα:</u> Η επίδραση του CB ₁ αγωνιστή WIN 55,212-2 και του ανταγωνιστή SR141716A στη συμπεριφορά «μάθησης λόγω εξοικείωσης σε νέο περιβάλλον».....	111
<u>3ο Πείραμα:</u> Μελέτη συμπεριφορικού μοντέλου «αναγνώρισης νέου Αντικειμένου». Η επίδραση του CB ₁ αγωνιστή WIN 55,212-2 και του ανταγωνιστή SR141716A σε παραμέτρους αναγνωριστικής μη-χωρικής μνήμης.....	114
<u>4ο Πείραμα:</u> Μελέτη συμπεριφοράς των επίμυων στον «ακτινωτό υδάτινο λαβύρινθο». Η επίδραση του CB ₁ αγωνιστή WIN 55,212-2 και του ανταγωνιστή SR141716A σε παραμέτρους χωρικής, «αναφορικής» και «ενεργού» μνήμης.....	121
<u>5ο Πείραμα:</u> Επίδραση της Δ ⁹ -THC και του WIN 55,212-2 στη γλουταματεργική λειτουργία συγκεκριμένων εγκεφαλικών περιοχών (ex vivo μελέτες).....	128

6 ^ο Πείραμα: In vivo δράση του CB ₁ αγωνιστή WIN 55,212-2 στην εξωκυττάρια συγκέντρωση του γλουταμικού.....	131
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	137
Χορήγηση κανναβινοειδών και συμπεριφορικές προσεγγίσεις.....	137
Χορήγηση κανναβινοειδών και νευροχημικές προσεγγίσεις.....	143
Ex vivo μελέτες.....	143
In vivo μελέτες.....	146
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	150
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	151
ABSTRACT.....	152
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	153

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κάνναβη είναι φυτό που αναπτύσσεται σε υγρό έδαφος, αυτοφυώς ή σε καλλιέργειες, ποώδες, ετήσιο και δίοικο (αρσενικό και θηλυκό). Διακρίνονται τρία είδη του γένους της κάνναβης:

α) Ημερη κάνναβη (*Cannabis sativa*)

β) Ινδική κάνναβη (*Cannabis indica*)

γ) Άγρια κάνναβη (*Cannabis ruderalis*)

Η ήμερη κάνναβη αποτελεί το πιο γνωστό και διαδεδομένο είδος, με τις περισσότερες εφαρμογές, το οποίο αρκετοί βοτανολόγοι σήμερα θεωρούν ότι συνιστά και το μοναδικό βιολογικό είδος του φυτού. Σύμφωνα με την άποψη αυτή, το είδος *Cannabis sativa* χαρακτηρίζεται από γονοτυπική πολυμορφία και φαινοτυπική αστάθεια, ώστε οι διάφορες παραλλαγές του δεν αποτελούν ξεχωριστά είδη, καθώς δύναται εύκολα να αλληλοδιασταυρωθούν.

Η κάνναβη έχει χρησιμοποιηθεί στην κλωστοϋφαντουργία για την κατασκευή υφασμάτων και σχοινιών, στην παραγωγή τροφίμων και χαρτιού, ως πρόσθετο σε χρώματα και πλαστικά, ως δομικό υλικό, ως καύσιμη ύλη, κα (Grinspoon & Bakalar 1995, Schultes 1969).

Η μαριχουάνα, η οποία παρασκευάζεται από άνθη και φύλλα κάνναβης και το κασίς, το οποίο δημιουργείται με αποξήρανση της ρητίνης του φυτού, συνιστούν τις δύο πιο γνωστές μορφές κάνναβης που έχουν χρησιμοποιηθεί από ανθρώπους για την ψυχοτρόπο δράση τους. Το συνολικό φάσμα των επιδράσεων των ουσιών αυτών στο ΚΝΣ καθώς και το κεντρικό ερώτημα της πιθανής συσχέτισής τους με φαινόμενα αντοχής και εξάρτησης έχουν απασχολήσει επί μακρόν την επιστημονική κοινότητα (de Fonseca & Schneider 2008).

Η μακρόχρονη χρήση κάνναβης έχει συνδεθεί με συμπτώματα όπως ήπιος τρόμος, εφίδρωση, μυική αδυναμία, διαταραχές ύπνου, άγχος και κατάθλιψη (Μαρσέλος 1997). Η λήψη της κατά την εφηβεία είναι πιθανό

να συνδέεται με γνωστικές δυσλειτουργίες που εμφανίζονται σε συνδυασμό με ψυχωτικού τύπου συμπτώματα (Murray et al. 2007).

Όσον αφορά στην εξάρτηση, αν και ο μεγάλος χρόνος ημιζωής των κανναβινοειδών αποκλείει την εκδήλωση έντονων στερητικών φαινομένων (Svizenska et al. 2008), πολλά από τα συμπτώματα που αναφέρθηκαν προηγουμένως είναι πιθανό να εμφανίζονται στα πλαίσια ενός λιγότερο ευδιάκριτου στερητικού συνδρόμου, κατά την ασταθή μακροχρόνια χρήση προϊόντων κάνναβης.

Ιστορική αναδρομή

Οι πρώτες αναφορές που διασώζονται σχετικά με τις θεραπευτικές ιδιότητες της κάνναβης χρονολογούνται από το 8500 π.Χ., σε κινεζικά κείμενα. Ως ευφοριογόνο, η κάνναβη έχει χρησιμοποιηθεί εδώ και 4000 χρόνια, ενώ οι φαρμακευτικές ιδιότητες του φυτού περιγράφονται για πρώτη φορά σε περσικό κείμενο του 600 π.Χ. (Μαρσέλος και Καραγιαννίδου 2005).

Η λέξη «κάνναβις» φαίνεται ότι χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Ηρόδοτο το 450 π.Χ., αν και οι πρώτες σημειώσεις για τη θεραπευτική χρήση της περιέχονται στο σύγγραμμα του Διοσκουρίδη *De Materia Medica*, περί το 60 π.Χ.

Ο Βρετανός παθολόγος William O'Shaughnessy θεωρείται ο «πατέρας» της διάδοσης της κάνναβης, ως θεραπευτικής ουσίας, στο Δυτικό Κόσμο (Iversen 2000), καθώς πρώτος περιέγραψε τις χρήσεις της στην Ινδία για τη θεραπευτική αντιμετώπιση συμπτωμάτων όπως η διάρροια, η δυσκοιλιότητα, οι σπασμοί, η ναυτία, ο έμετος, ο ρευματικός πόνος και επίσης νοσημάτων όπως το άσθμα, η επιληψία και ο τέτανος (O'Shaughnessy 1842).

Η κάνναβη καταχωρήθηκε για πρώτη φορά επίσημα στη Βρετανική Φαρμακοποιία το 1845, σε μορφές βάμματος και εκχύλισματος. Ωστόσο,

η εκτεταμένη εξωιατρική χρήση της λόγω των ψυχοτρόπων ιδιοτήτων της, καθώς και η δυσχέρεια παρασκευής τυποποιημένων μορφών, οδήγησαν στην απόσυρση των φαρμακευτικών παραγώγων της. Επικράτησε η άποψη ότι η κάνναβη δεν πρόσφερε θεραπευτικό όφελος (Baker & Pryce 2003) και η χρήση της τελικά απαγορεύτηκε (Misuse of Drugs Act, 1971).

Τα ελληνικά επιστημονικά συγγράμματα του 19ου αιώνα περιγράφουν την κάνναβη ως ένα φάρμακο με καταπραϋντικές και υπνωτικές ιδιότητες. Όπως και σε άλλα μέρη του κόσμου, η κάνναβη χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα από ομάδες πληθυσμού στην Ελλάδα εξωιατρικά, λόγω των ψυχοτρόπων ιδιοτήτων της, με την κατάχρηση να σημειώνει έξαρση στις αρχές του 20ου αιώνα. Η απαγόρευση της διάδοσης, χρήσης και πώλησης του κασις εφαρμόστηκε στην Ελλάδα το 1919, ως μέτρο καταστολής «της αλητείας και της επαιτείας» (Μαρσέλος 1997).

Η κάνναβη, ως φαρμακευτική ουσία, κατηγοριοποιήθηκε για πρώτη φορά στα φάρμακα που επιβάλλεται να βρίσκονται υπό διεθνή έλεγχο το 1961 και συμπεριλήφθηκε στη σχετική διεθνή σύμβαση του ΟΗΕ (Μαρσέλος 1997). Σήμερα, η κατοχή και η χρήση της δεν επιτρέπεται στις περισσότερες χώρες του κόσμου και τιμωρείται από το νόμο. Στην Ελλάδα, όπως και στις ΗΠΑ, τα προϊόντα της κάνναβης ταξινομούνται στην κατηγορία Α, η οποία περιλαμβάνει ουσίες με υψηλό κίνδυνο κατάχρησης όπως η ηρωίνη. Από την άλλη πλευρά, σε κάποιες χώρες όπως η Ολλανδία, η χρήση της επιτρέπεται υπό προϋποθέσεις. Οι αντικρουόμενες απόψεις για το βαθμό εξάρτησης που προκαλείται από την κάνναβη, καθώς και οι αναμφισβήτητες πλέον θεραπευτικές της ιδιότητες, έχουν τροφοδοτήσει μια μεγάλη και ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα συζήτηση σε επιστημονικό και πολιτικό επίπεδο, περί της ορθότητας ή μη της νομιμοποίησης της χρήσης προϊόντων κάνναβης.

Σύγχρονες Θεραπευτικές εφαρμογές

Η εμπειρική χρήση της κάνναβης επί πολλούς αιώνες εύλογα οδήγησε στην αναζήτηση των φαρμακολογικών της ιδιοτήτων, ιδιαίτερα στις τελευταίες δεκαετίες, κατά τις οποίες η συστηματική έρευνα υποστηρίχθηκε από την αλματώδη ανάπτυξη των εργαστηριακών τεχνικών.

Η απομόνωση της Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλης (Δ⁹-THC) ως της κύριας δραστικής ουσίας της κάνναβης ήταν μια πρώτη πολύ σημαντική ανακάλυψη. Η ταυτοποίηση και κλωνοποίηση των δύο πρώτων υποδοχέων των κανναβινοειδών (CB₁ και CB₂) οδήγησε στην υπόθεση ύπαρξης αυτοτελούς ενδοκανναβινοειδούς συστήματος, η οποία γρήγορα επιβεβαιώθηκε με την ανακάλυψη των ενδοκανναβινοειδών ουσιών.

Στα επόμενα βήματα της επιστημονικής έρευνας συγκαταλέγονται οι προσπάθειες απομόνωσης ή δημιουργίας νέων ουσιών, οι οποίες επηρεάζουν τη δραστηριότητα των υποδοχέων των κανναβινοειδών, η εισαγωγή πειραματικών μοντέλων μελέτης καθώς και η ανάδειξη πιθανών θεραπευτικών εφαρμογών.

Η ναντραδόλη (nandrol) αρχικά και η λεβοναντραδόλη (levonandrol) στη συνέχεια, ήταν οι πρώτες συνθετικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν τη δεκαετία του '80 στην κλινική πράξη, για την ελάττωση του πόνου, της ναυτίας και του εμέτου, σε ασθενείς που έπασχαν από καρκίνο και υποβάλλονταν σε χημειοθεραπεία. Ωστόσο, λόγω των ανεπιθύμητων ενεργειών που εμφάνιζαν από την ψυχική σφαίρα, αποσύρθηκαν (Iversen 2003).

Άλλα κανναβινοειδή μόρια τα οποία επίσης έχουν εγκριθεί από τις ρυθμιστικές αρχές τη δεκαετία του '80 και κυκλοφορούν ακόμα και σήμερα είναι η **δροναμπινόλη**, αγωνιστής των CB₁ και CB₂ υποδοχέων, με ενδείξεις τη ναυτία και τους εμέτους των χημειοθεραπευτικών (Croxford 2003) και την καχεξία και ανορεξία των ασθενών με AIDS

(Mechoulam and Hanu 2001, Pertwee 2000, Robson 2005) και το συνθετικό της ανάλογο **ναμπιλόνη**, το οποίο επίσης χορηγείται για την ανακούφιση των καρκινοπαθών από τη ναυτία και τους εμέτους που προκαλούν τα χημειοθεραπευτικά σχήματα. Ένα ακόμα σκεύασμα κυκλοφορεί σήμερα, το οποίο περιέχει ίσες ποσότητες **Δ⁹-THC** και ενός μη-ψυχοτρόπου παραγώγου, της **κανναβιδιόλης (CBD)**. Το σκευασμα αυτό εγκρίθηκε στον Καναδά το 2005 σε μορφή ψεκασμών, για τη συμπτωματική αντιμετώπιση του νευροπαθητικού πόνου της Σκλήρυνσης κατά Πλάκας (ΣΚΠ) και ως συμπληρωματική αναλγητική θεραπεία σε ενήλικες ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο. Το 2010 εγκρίθηκε στον Καναδά και τη Βρετανία για την αντιμετώπιση της σπαστικότητας στη ΣΚΠ, ενώ αργότερα η κυκλοφορία του επεκτάθηκε και σε άλλες χώρες (Pertwee 2012).

Παρά το ευνοϊκό προφίλ σχέσης κλινικού οφέλους / ανεπιθύμητων ενεργειών που προφανώς αναγνωρίζεται επί του παρόντος στα υπό κυκλοφορία κανναβινοειδή σκευάσματα, η πιθανότητα εμφάνισης δυνητικά επικίνδυνων ψυχιατρικών συμπτωμάτων εξακολουθεί να αποτελεί σοβαρό εμπόδιο στην περαιτέρω ανάπτυξη κλινικών εφαρμογών κανναβινεργικών ουσιών (Pertwee 2012).

Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση της **ριμοναμπάντης** (Rimonabant: SR141716A), ενός ανταγωνιστή/μερικού αγωνιστή του CB₁ κανναβινεργικού υποδοχέα. Η προσπάθεια κλινικής ανάπτυξης της ριμοναμπάντης βασίστηκε στην παρατήρηση ότι η ενεργοποίηση του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος μπορεί να σχετίζεται με αύξηση της όρεξης και ανάπτυξη παχυσαρκίας, οπότε ο ανταγωνισμός κανναβινεργικών υποδοχέων θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση του σωματικού βάρους (Pertwee 2012). Πράγματι, η μελέτη της **ριμοναμπάντης** έδειξε ότι η ουσία αυτή μπορεί να μειώσει την όρεξη για φαγητό και να αναστείλει τις ενισχυτικές ιδιότητες και την αναζήτηση εξαρτησιογόνων ουσιών όπως το αλκοόλ, η νικοτίνη, η ηρωίνη και η κοκαΐνη (Carai et al. 2005, Fernandez & Allison 2004, Padwal & Majumdar 2007, Van Gaal et al. 2005). Η ριμοναμπάντη πήρε έγκριση

κυκλοφορίας στην Ευρώπη το 2006 για τη θεραπεία της παχυσαρκίας· αποσύρθηκε ωστόσο το 2008 λόγω κινδύνου εμφάνισης σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών όπως η κατάθλιψη, το άγχος και ο αυτοκτονικός ιδεασμός. Στις Η.Π.Α. δεν εγκρίθηκε ποτέ η κυκλοφορία του φαρμάκου.

Η προσπάθεια μεγιστοποίησης του θεραπευτικού οφέλους ή/και ελαχιστοποίησης των ανεπιθύμητων ενεργειών των κανναβινεργικών φαρμάκων είναι συνεπώς πρωταρχικής σημασίας όσον αφορά στην ανάπτυξη και δημιουργία νέων κλινικών εφαρμογών. Έχουν διατυπωθεί αρκετές θεωρίες για τις στρατηγικές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να επιτευχθεί ο στόχος αυτός:

- Η μελέτη και αναπαραγωγή διαδικασιών «αυτοπροστασίας», οι οποίες περιλαμβάνουν αύξηση της ενεργοποίησης ομάδων υποδοχέων από ενδοκανναβινοειδή και οι οποίες έχουν παρατηρηθεί σε καταστάσεις όπως ο καρκίνος σε ανθρώπους και η ΣΚΠ, το εγκεφαλικό τραύμα, η νόσος Parkinson ο νευροπαθητικός ή φλεγμονώδης πόνος σε ζώα.
- Η άμεση ενεργοποίηση υποδοχέων που εκφράζονται σε συγκεκριμένους ιστούς, πχ. η ενδοθηλική χορήγηση κανναβινοειδούς θα μπορούσε να ελέγξει καλύτερα τον πόνο που σχετίζεται με οστικό καρκίνο και η τοπική εφαρμογή στο δέρμα θα μπορούσε να βελτιώσει την πρόγνωση του μελανώματος.
- Η εκλεκτική ενεργοποίηση κανναβινεργικών υποδοχέων εκτός ΚΝΣ, στην περιφέρεια, θα μπορούσε να δώσει σημαντικά θεραπευτικά οφέλη στην αντιμετώπιση του πόνου, σε συγκεκριμένες γαστρεντερολογικές και καρδιαγγειακές διαταραχές, όπως και σε διαδικασίες κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διασποράς που συνδέονται με καρκίνο, με ανάπτυξη κανναβινεργικών φαρμάκων που δε διέρχονται τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.
- Η εκλεκτική ενεργοποίηση των CB₂ υποδοχέων, με μικρές δόσεις CB₂ αγωνιστών, τέτοιες ώστε να ενεργοποιούνται ικανοποιητικά οι CB₂ χωρίς πρακτικά ενεργοποίηση των CB₁, θα μπορούσε να επιτύχει τα καλά

αποτελέσματα της CB₂ ενεργοποίησης πχ. στην ανακούφιση από τον πόνο και τον κνησμό σε ασθενείς με καρκίνο, χωρίς ψυχιατρικού τύπου ανεπιθύμητες ενέργειες, οι οποίες πιθανώς να εμφανίζονται σε ενεργοποίηση των CB₁.

- Η συμπληρωματική ή συνεργική (additive or synergistic) δράση κανναβινοειδών με άλλες ουσίες μπορεί να μεγεθύνει το κλινικό αποτέλεσμα και να βελτιώσει τη σχέση οφέλους/κόστους, όπως πχ. έχει φανεί στη συγχορήγηση κανναβινοειδών με οπιοειδή, όπου υπό προϋποθέσεις, είναι δυνατό να ενισχυθεί σημαντικά το συνολικό αναλγητικό αποτέλεσμα.

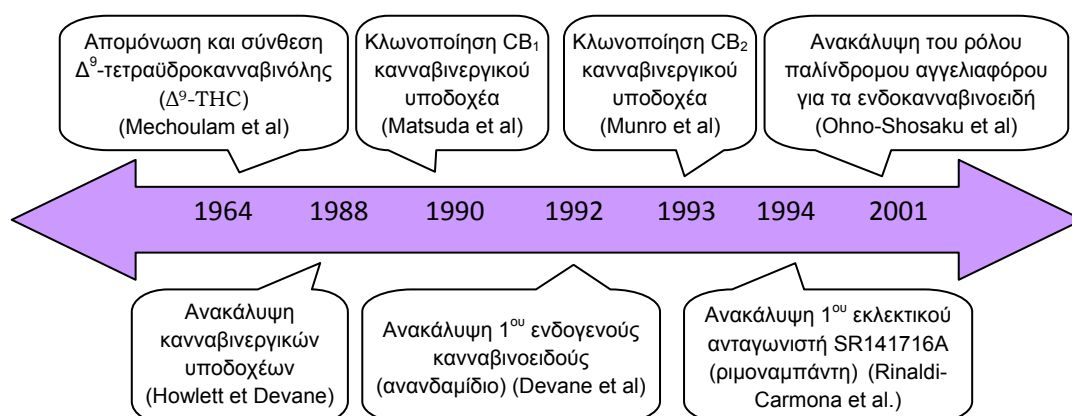
Η ενίσχυση της δράσης των κανναβινοειδών και η ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων ενεργειών θα μπορούσε να επεκτείνει σημαντικά το φάσμα των θεραπευτικών τους εφαρμογών. Μερικές καταστάσεις στις οποίες υπάρχουν δεδομένα κλινικής αποτελεσματικότητας είναι ο πόνος, η φλεγμονή, η οστεοπόρωση, η υπέρταση, το γλαύκωμα, το άσθμα, οι μεταβολικές διαταραχές, οι διαταραχές ύπνου, ο εθισμός και η εξάρτηση, η σπαστικότητα, η επιληψία, ως ανοσορρυθμιστικά, ως νευροπροστατευτικά σε νευροεκφυλιστικά νοσήματα όπως η νόσος Parkinson, η νόσος Huntington και η πλαγία αμυατροφική σκλήρυνση κα. (Grant and Cahn 2005, Mackie 2006, 2008, Maldonado et al. 2006, Martin 2002, Pertwee 2000, Porter and Felder 2001, Robson 2001, Williamson and Evans 2000).

Ενδοκανναβινοειδές σύστημα

Η εντατική έρευνα μετά τη δεκαετία του '60 και ιδιαίτερα κατά τα τελευταία 25 χρόνια οδήγησε στην απόδειξη της ύπαρξης ενδογενούς κανναβινοειδούς συστήματος (ενδοκανναβινοειδές σύστημα) με τη σταδιακή ανακάλυψη των δομών και των λειτουργιών του, αν και αρκετά σημεία παραμένουν αδιευκρίνιστα (Σχήμα 1). Το ενδοκανναβινοειδές

σύστημα είναι ένα νευρορρυθμιστικό σύστημα λιπιδίων με διακριτούς υποδοχείς, ενδογενή προσδέματα (τα ενδοκανναβινοειδή) και ένζυμα υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση και την απενεργοποίησή τους.

Για πρώτη φορά η λέξη «κανναβινοειδή» χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει μία κατηγορία χημικών ουσιών προερχόμενες από το φυτό *Cannabis sativa*. Συνολικά πάνω από 80 τέτοιες ουσίες έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα από εκχυλίσματα του φυτού (Ahmed et al 2008). Η Δ⁸-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ⁸-THC) και Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ⁹-THC), αποτελούν τις κύριες δραστικές ουσίες και απομονώθηκαν το 1964 από τους Mechoulam και Gaoni. Μεταξύ των δύο, η Δ⁹-THC περιέχεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στη μαριχουάνα και επίσης αποδείχτηκε ότι είναι πιο δραστική από τη Δ⁸-THC *in vivo*. Κατά συνέπεια, σήμερα θεωρείται ότι η ψυχοτρόπος δράση της κάνναβης οφείλεται κατά κύριο λόγο στην Δ⁹-THC (Pertwee 1988). Η Δ⁹-THC απορροφάται ταχέως και μεταβολίζεται στους πνεύμονες και το ήπαρ σε ένα ενεργό παράγωγο, την 11-υδροξυ- Δ⁹-THC (Abood & Martin 1992). Οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες των κανναβινοειδών ποικίλλουν, ενώ επηρεάζονται από παράγοντες όπως η φαρμακοτεχνική μορφή, η οδός και η συχνότητα χορήγησης, ο χρόνος έκθεσης, η συγκέντρωση και ο τρόπος μεταβολισμού (Huestis 2007).



Σχήμα 1: Τα πιο σημαντικά ορόσημα στην ανακάλυψη της λειτουργίας του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος.

Υποδοχείς των κανναβινοειδών

Μια από τις πρώτες θεωρίες που διατυπώθηκαν σχετικά με το μηχανισμό δράσης της Δ⁹-THC βασιζόταν στην υπόθεση ότι η δραστηριότητά της οφείλεται στις εξαιρετικά λιπόφιλες ιδιότητες του μορίου της, χάρη στις οποίες είναι ικανό να διαπερνά με ευκολία την κυτταρική μεμβράνη των νευρικών κυττάρων. Ωστόσο, η υψηλή λιποφιλικότητα δεν αρκεί για να τεκμηριωθεί συγκεκριμένος παθοφυσιολογικός μηχανισμός δράσης στο ΚΝΣ και τα αναμενόμενα αποτελέσματα με βάση τη θεωρία αυτή είναι αναπόφευκτα μη ειδικά (Hillard et al. 1985, Paton 1975, Roth & Williams 1979).

Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη ειδικών κανναβινεργικών υποδοχέων παρουσιάστηκαν από τον Howlett (1984), ο οποίος έδειξε ότι η κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP) καταστέλλεται σε κυτταροκαλλιέργειες νευροβλαστωμάτων από τη χορήγηση κανναβινοειδών. Στη συνέχεια και άλλες μελέτες υποστήριξαν ότι τα κανναβινοειδή ασκούν τη δράση τους μέσω υποδοχέων που συνδέονται με G_{i/o} πρωτεΐνες (Howlett 1985, Howlett & Fleming 1984, Howlett et al. 1986). Τουλάχιστον δύο τύποι υποδοχέων (CB₁ και CB₂) έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα, με βάση τη δομή τους, τις ιδιότητες δέσμευσης των προσδεμάτων τους και τα συστήματα μετάδοσης σημάτων (Howlett 2002). Έχουν δημοσιευτεί επίσης μελέτες που διερευνούν δράσεις των κανναβινοειδών οι οποίες δε φαίνεται να διαμεσολαβούνται μέσω των CB₁ ή CB₂ υποδοχέων, υπονοώντας την ύπαρξη επιπλέον υποδοχέων (Pertwee 2005). Η ύπαρξη ενός τρίτου τύπου υποδοχέα (CB₃, Frideri et al. 2003) έχει προταθεί, καθώς και ο χαρακτηρισμός αρκετών ακόμα ενδογενών πρωτεϊνών ως κανναβινεργικών υποδοχέων.

CB₁ υποδοχείς

Οι κανναβινεργικοί υποδοχείς CB₁ ανήκουν στην υπεροικογένεια των υποδοχέων που δεσμεύονται με G πρωτεΐνες (G-Protein Coupled Receptors: GPCR) και διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη επτά φορές (επταελικοειδείς διαμεμβρανικοί υποδοχείς). Οι CB₁ υποδοχείς αποτελούνται από:

- i) ένα αμινο-τελικό άκρο που βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο όπου υπάρχουν θέσεις γλυκοζυλίωσης
- ii) ένα καρβοξυ-τελικό άκρο ελεύθερο στο κυτταρόπλασμα και
- iii) επτά υδρόφοβες διαμεμβρανικές περιοχές που συνδέονται μεταξύ τους με εναλλασσόμενες εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια αγκύλες (Σχήμα 1).

Οι CB₁ υποδοχείς έχουν περιγραφεί στον άνθρωπο, στον πίθηκο, στο χοίρο, στο σκύλο, στον επίμου και στο μυ, καθώς και σε πτηνά, ψάρια, αμφίβια και ασπόνδυλα, όχι όμως σε έντομα (Bramblett et al. 1995, Onaini et al. 1996, Soderstrom et al 2000, Yamaguchi et al 1996, Cottone et al 2003, Elphick et al 2003). Η κατανομή τους στον εγκέφαλο του ανθρώπου είναι ευρύτατη και επίσης αρχικά είχε υποστηριχθεί ότι εντοπίζονται αποκλειστικά εντός του ΚΝΣ και απουσιάζουν από άλλους ιστούς. Ωστόσο, ο CB₁ υποδοχέας έχει εντοπιστεί πρόσφατα σε διάφορους ιστούς στην περιφέρεια, όπως στο καρδιαγγειακό και στο αναπαραγωγικό καθώς επίσης και στο γαστρεντερικό σύστημα (Crocì et al. 1998, Pertwee 1997, 2001b, Szabo et al. 2001, Wagner et al. 2001).

Παρά την υψηλή πυκνότητα των CB₁ υποδοχέων στον εγκέφαλο, έχουν εντοπιστεί διαφορές στην κατανομή ανά περιοχή. Μεγάλη συγκέντρωση CB₁ υποδοχέων βρέθηκε για παράδειγμα στον ιππόκαμπο, το μετωπιαίο φλοιό, το κέλυφος του φακοειδούς, τον κερκοφόρο πυρήνα, τη μέλαινα

ουσία, την ωχρά σφαίρα, μερικές οσφρητικές περιοχές, τον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος (κοιλιακό ραβδωτό), τον υποθάλαμο, την αμυγδαλή, την περί τον υδραγωγό φαιά ουσία και τα οπίσθια κέρατα του νωτιαίου μυελού (Tsou et al. 1998, Ahluwalia et al. 2000, Bridges et al. 2003, Farquhar-Smith et al. 2000, Hohmann & Herkenham 1999, Price et al. 2003, Salio et al. 2002). Πρόσφατα, CB₁ υποδοχείς έχουν εντοπιστεί σε αστροκύτταρα (Navarrete & Araque 2010) και μιτοχόνδρια (Bènard et al 2012).

Στον ιππόκαμπο, η υψηλή πυκνότητα CB₁ υποδοχέων που διαπιστώνεται, είναι πιθανό να σχετίζεται με τη διαταραχή διαδικασιών μνήμης και μάθησης που προκαλούνται από τα κανναβινοειδή (Herkenham et al. 1991a, Herkenham et al. 1990, Scallet 1991).

Στα βασικά γάγγλια, η παρουσία CB₁ υποδοχέων υποδεικνύει την εμπλοκή των κανναβινοειδών στη ρύθμιση και στον έλεγχο της κίνησης καθώς και σε διαδικασίες που αφορούν στη διαδικαστική μνήμη (procedural memory). Πράγματι, διάφορες μελέτες έχουν αναδείξει μεταβολές στην έκφραση και ικανότητα δέσμευσης των CB₁ υποδοχέων σε ασθενείς με νόσο του Parkinson και νόσο του Huntington (Glass et al. 1993, Richfield and Herkenham 1994, Sanudo-Pena et al. 1998).

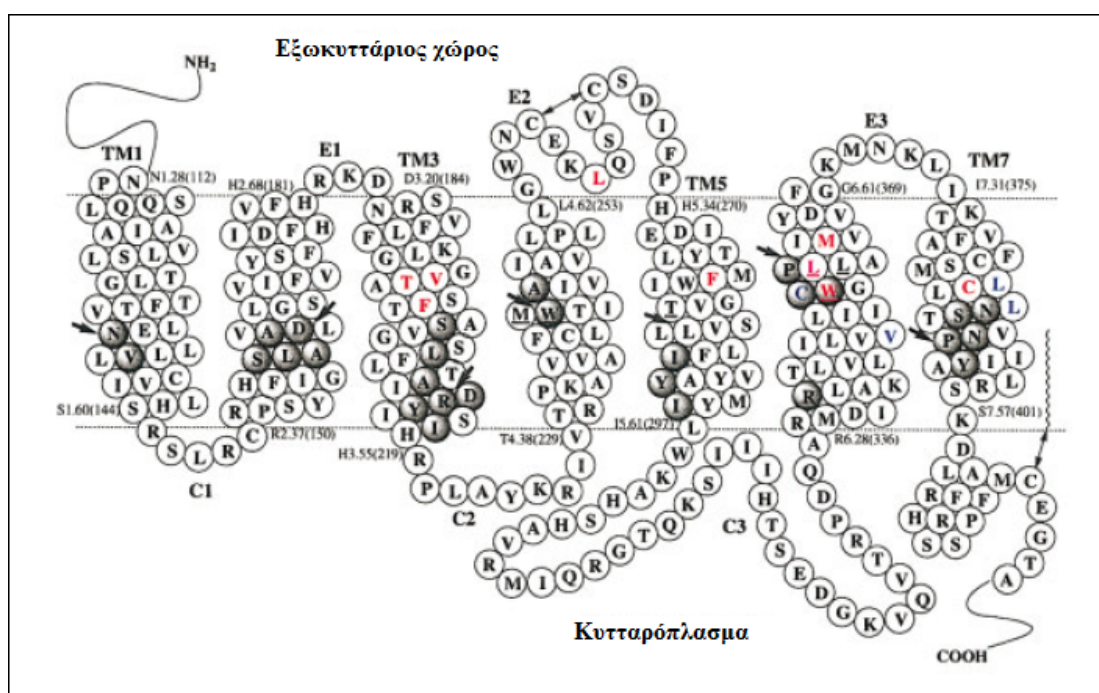
Στην παρεγκεφαλίδα, διαπιστώνεται υψηλή πυκνότητα CB₁ υποδοχέων σε επίμυες (Matsuda et al. 1993), γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με την εμφάνιση αταξίας και υποκινησίας μετά από οξεία χορήγηση Δ⁹-THC και άλλων κανναβινοειδών (Rodriguez de Fonseca et al. 1998). Στον άνθρωπο, αντιθέτως, διαπιστώνεται σχετικά χαμηλή πυκνότητα CB₁ υποδοχέων στην παρεγκεφαλίδα, εύρημα συμβατό με τα μικρότερης σοβαρότητας αντίστοιχα συμπτώματα μετά από χρήση μαρικουάνας (Ameri 1999; Herkenham et al. 1990).

Σε κυτταρικό επίπεδο, η κατανομή των CB₁ υποδοχέων δεν είναι ομοιογενής. Για παράδειγμα, στο φλοιό του εγκεφάλου, στον ιππόκαμπο και στην αμυγδαλή, υψηλή πυκνότητα παρατηρείται στα θετικά στη χολοκυστοκινίνη (CCK positive) ανασταλτικά κύτταρα, χαμηλή

πυκνότητα στα διεγερτικά κύτταρα, ενώ οι CB₁ υποδοχείς σχεδόν απουσιάζουν στους θετικούς στην παρβαλβουμίνη ανασταλτικούς νευρώνες (Ohno-Shosaku et al, 2012). Σε υποκυτταρικό επίπεδο επίσης διαπιστώνεται ανομοιογένεια στην κατανομή των CB₁ υποδοχέων, καθώς οι CB₁ υποδοχείς βρίσκονται εκλεκτικά συγκεντρωμένοι στα προσυναπτικά τελικά άκρα των νευραξόνων (Katona et al. 1999, Marsicano and Lutz 1999, Tsou et al. 1999) και σε πολύ μικρότερη έκταση έχουν ανιχνευθεί σε μετασυναπτικούς νευρώνες καθώς και στη γλοία (Rodriguez et al. 2001).

Η σύνδεση του CB₁ υποδοχέα με τις G πρωτεΐνες στις προσυναπτικές νευρωνικές απολήξεις προκαλεί αναστολή της αδενυλική κυκλάσης και επομένως μείωση της παραγωγής cAMP, ενώ διεγείρει την ενεργοποίηση μιτογόνου πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK). Επιπλέον, μέσω της δέσμευσης με G πρωτεΐνες τύπου G_{i/o} ο CB₁ υποδοχέας αλληλεπιδρά με συγκεκριμένους ιοντικούς διαύλους και προκαλεί διέγερση στους διαύλους καλίου τύπου A και D αλλά αναστολή στους διαύλους ασβεστίου τύπου N και P/Q (Howlett and Mukhopadhyay 2000; Pertwee 1997). Η μείωση της σύνθεσης της cAMP προκαλεί αναστολή της cAMP-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης (PKA), με αποτέλεσμα την ελάττωση της φωσφορυλίωσης του ιοντικού διαύλου καλίου και την αύξηση της ροής ιόντων καλίου προς το εξωτερικό του κυττάρου. Αντίθετα, η αναστολή των CB₁ υποδοχέων συνεπάγεται φωσφορυλίωση των διαύλων καλίου και με κατά συνέπεια αναστολή της ροής κατιόντων προς τα έξω. Η αναστολή των προσυναπτικών διαύλων ασβεστίου από τα κανναβινοειδή πιθανώς μειώνει την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών από προσυναπτικές απολήξεις που εκφράζουν CB₁ υποδοχείς. Έχει δειχθεί ότι τα κανναβινοειδή μπορούν να αναστέλλουν την απελευθέρωση γλουταμικού (Shen et al. 1996), ακετυλοχολίνης (Gifford et al. 1997) και νοραδρεναλίνης (Schlicker et al. 1997). Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι τα κανναβινοειδή μπορεί να συνδέονται και με G_s πρωτεΐνες οι οποίες προκαλούν ενεργοποίηση της αδενυλική κυκλάσης (Glass and Felder 1997).

Οι CB₁ υποδοχείς έχουν διατηρηθεί γονοτυπικά σε υψηλό βαθμό μεταξύ των σπονδυλωτών. Στον άνθρωπο, ο CB₁ υποδοχέας περιέχει μόνο ένα αμινοξύ λιγότερο στο αμινο-τελικό άκρο του, σε σύγκριση με τα άλλα θηλαστικά (472 έναντι 473), ενώ η ομολογία μεταξύ ανθρώπου και αρουραίου υπολογίζεται στο 93% σε επίπεδο νουκλεϊκών οξέων και 97% σε επίπεδο αμινοξέων (Elphick and Egertova 2001, Gerard et al 1991, Abood et al 1997). Η γονιδιακή θέση του υποδοχέα CB₁ βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 του ανθρώπου και στη θέση 6q14-q15 (Caenazzo et al. 1991, Hoehe et al. 1991).



Σχήμα 2: Η μοριακή δομή του CB₁ υποδοχέα (Shim et al. 2003).

CB₂ υποδοχείς

Ο CB₂ υποδοχέας, όπως και ο CB₁, συνδέεται με G_{i/o} πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η αδενυλική κυκλάση και η σύνθεση της cAMP σε διάφορους τύπους κυττάρων (Howlett 2002), ενώ ενεργοποιεί τον καταρράκτη αντιδράσεων των MAP κινάσεων (MAPK). Η σύνδεση ιοντικών διαύλων καλίου μέσω των G-πρωτεϊνών με τους CB₂, παίζει

σημαντικό ρόλο, όπως και στους CB₁, στην μετάδοση του σήματος (Ho et al. 1999, McAllister et al. 1999).

Η κλασική κατανομή των υποδοχέων των κανναβινοειδών τοποθετεί τους CB₂ στην περιφέρεια και το ανοσοποιητικό σύστημα, θεωρώντας τον εγκέφαλο αποκλειστικό πεδίο των CB₁ υποδοχέων. Αν και μια μερίδα ερευνητών είχε υποστηρίξει από παλαιότερα την παρουσία CB₂ υποδοχέων στο ΚΝΣ, άλλοι δεν μπόρεσαν να τους εντοπίσουν και έτσι η ύπαρξη τους εντός του ΚΝΣ θεωρήθηκε αμφίβολη (Carlisle et al. 2002, Chakrabarti et al. 1995, Derocq et al. 1995, Galiegue et al. 1995, Griffin et al. 1999, Schatz et al. 1997, Sugiura et al. 2000). Ωστόσο, πρόσφατα επιβεβαιώθηκε με τεχνική ανοσοφθορισμού η παρουσία CB₂ υποδοχέων εντός του ΚΝΣ, σε μικρογλοιακά κύτταρα και σε νευρώνες (Ashton et al. 2006, Gong et al. 2006, Skaper et al. 1996).

Στην παρεγκεφαλίδα, CB₂ υποδοχείς έχουν εντοπιστεί στα κοκκιώδη κύτταρα (Skaper et al. 1996) και επίσης σε κυτταρικά σώματα Purkinje και σε μικρότερο βαθμό στους δενδρίτες τους.

Στον ιππόκαμπο, έχουν βρεθεί CB₂ υποδοχείς σε πυραμιδικούς νευρώνες CA2 και CA3. Μέτρια πυκνότητα CB₂ ανιχνεύτηκε επίσης σε ανοσοθετικά κυτταρικά σώματα στην περί τον υδραγωγό φαιά ουσία, στη μέλαινα ουσία και άλλες κυτταρικές δομές του εγκεφαλικού στελέχους. Έχει διατυπωθεί ή άποψη ότι η ενεργοποίηση CB₂ υποδοχέων στο εγκεφαλικό στέλεχος μπορεί να έχει αποτέλεσμα στην ελάττωση του εμέτου, όπως συμβαίνει και με τη διέγερση των CB₁ (Van Sickle et al, 2005).

Άλλες εντοπίσεις των CB₂ στο ΚΝΣ αναφέρονται σε πυρήνες του θαλάμου, στον αμφιβληστροειδή χιτώνα ενήλικων επιμύων (Lu et al. 2000) στον πρόσθιο οσφρητικό πυρήνα και σε νευρώνες του οπτικού, κινητικού, απιοειδούς, τροχιακού/κογχικού και ακουστικού φλοιού.

Στην περιφέρεια, οι CB₂ υποδοχείς έχουν ευρεία κατανομή και ιδιαίτερα στο ανοσοποιητικό σύστημα. Τέτοιοι υποδοχείς έχουν

εντοπιστεί στα λευκοκύτταρα (Pertwee 2001, Skaper et al. 1996), το σπλήνα, τις αμυγδαλές, το θύμο αδένα και τα σιτευτικά κύτταρα (Berdyshev 2000, Munro et al. 1993, Sugiura and Waku 2000, Wilson and Nicoll 2001). Πρόσφατα, εντοπίστηκαν ανοσοχημικά στις μεγάλες εμύελες νευρικές ίνες του δέρματος, σε μικρές υποεπιδερμικές δέσμες αμύελων ινών και σε μεμονωμένες επιδερμικές νευρικές ίνες (Stander et al. 2005).

Αντίθετα με την κατά κανόνα προσυναπτική εντόπιση των CB₁ υποδοχέων στον εγκέφαλο, η ανοσοδραστικότητα των CB₂ υποδοχέων φαίνεται να συνάδει περισσότερο με μετασυναπτικό εντοπισμό (Gong et al. 2006, Onaivi et al. 2006)

Έχει υποστηριχθεί ότι οι κανναβινεργικοί υποδοχείς στο ανοσοποιητικό σύστημα παίζουν ρόλο στην απελευθέρωση των κυτταροκινών. Η ενεργοποίηση CB₂ υποδοχέων που εντοπίζονται σε B και T κύτταρα οδηγεί σε μειωμένη ανοσολογική απόκριση (Condie et al. 1996).

Άλλοι μηχανισμοί στους οποίους εμπλέκονται οι CB₂ υποδοχείς είναι ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση των νευρωνικών και μη νευρωνικών κυττάρων. Ο CB₂ υποδοχέας πιθανώς λειτουργεί ως “σήμα απο-διαφοροποίησης κυττάρων” ευνοώντας έναν μη-διαφοροποιημένο πολλαπλασιασμό (Fernandez-Ruiz et al. 2007). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, οι CB₂ υποδοχείς υπερεκφράζονται σε γλοιώματα (Sanchez et al. 2001) και όγκους μαστού (Caffarel et al. 2006). Από την άλλη πλευρά, μελέτες σε κύτταρα γλοιώματος ή αστροκυτώματος (Sanchez et al. 2001) και σε διάφορα μη νευρωνικά καρκινικά κύτταρα (Caffarel et al. 2006, Carracedo et al. 2006, Guzman 2003) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η διέγερση των CB₂ υποδοχέων συνδέεται με απόπτωση και αναστολή της ανάπτυξης όγκων σε μύες. Αυτές οι αντίθετες δράσεις του CB₂ υποδοχέα θα μπορούσαν να ενεργοποιηθούν εκλεκτικά από εξειδικευμένους CB₂ αγωνιστές οι οποίοι

θα προκαλούσαν είτε κυτταροπροστασία (Romero et al. 2002) ή απόπτωση (Guzman 2003).

Το γονίδιο για τον CB₂ υποδοχέα εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 1p36 (Raitio et al. 2005). Μεταξύ των ειδών, οι CB₂ υποδοχείς δείχνουν μικρότερη ομολογία συγκριτικά με τους CB₁. Για παράδειγμα, στον άνθρωπο και στον μυ οι CB₂ εμφανίζουν 82% ομοιότητα αμινοξέων (Shire et al 1995), ενώ οι αλληλουχίες μεταξύ μυ, επίμου και ανθρώπου διαφέρουν στο C-τελικό άκρο τους: η πρωτεΐνη του μυ περιέχει 13 αμινοξέα λιγότερα, ενώ η πρωτεΐνη του επίμου περιέχει 50 αμινοξέα περισσότερα από την αντίστοιχη του ανθρώπου (Brown et al 2002). Οι CB₁ και CB₂ υποδοχείς στον άνθρωπο παρουσιάζουν 44% ομολογία ως προς την αλυσίδα των αμινοξέων της πρωτεΐνης συνολικά (Munro et al. 1993).

Άλλοι υποδοχείς κανναβινοειδών

Η ύπαρξη και άλλων κανναβινεργικών υποδοχέων, εκτός των CB₁ και CB₂ έχει προταθεί, με βάση συγκεκριμένα ευρήματα που έχουν προκύψει από την εντατική έρευνα στη δομή και τη λειτουργία του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος. Τέτοια ευρήματα είναι τα εξής:

1. Η δράση των ενδοκανναβινοειδών δεν περιορίζεται στους CB₁ και CB₂ υποδοχείς.

Άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες μπορεί να είναι υποδοχείς που δεσμεύονται με G-πρωτεΐνη, ιοντικοί διαύλοι, υποδοχείς ιοντικών διαύλων (πχ. ο παροδικός υποδοχέας διαύλου κατιονικού δυναμικού: TRP) καθώς και πυρηνικοί υποδοχείς συγκαταλέγονται στις ουσίες οι οποίες φαίνεται να αλληλεπιδρούν με ενδοκανναβινοειδή. Για παράδειγμα, ο TRP-βανιλλοϊδικός υποδοχέας (TRPV) ενεργοποιείται από τα ενδοκανναβινοειδή ανανδαμίδιο (N-αραχυδονυλ-εθανολαμίδιο: AEA) και N-αραχυδονοϋλ-ντοπαμίνη (NADA, βλ. παρακάτω) (Zygmunt et al 1999, Huang et al 2002). Τα δύο αυτά ενδοκανναβινοειδή φαίνεται

επίσης ότι επιδρούν σε διαύλους ασβεστίου (Romano and Lograno 2006, Ross et al 2009, White et al 2001).

Η δράση των πυρηνικών υποδοχέων PPARs (υποδοχείς ενεργοποιημένου υπεροξυσωματικού πολλαπλασιαστή: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) ρυθμίζεται από τα ενδοκανναβινοειδή AEA και 2-AG (2-αραχυδονυλ-γλυκερόλη, βλ. παρακάτω) (Lenman and Fowler 2007, Rockwell et al 2006). Επίσης, η ενεργοποίηση των CB₁ υποδοχέων από την 2-AG φαίνεται ότι επάγει διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ PPAR γ και του πυρηνικού παράγοντα ενισχυτή κ-ελαφρών αλύσεων ενεργοποιημένων B κυττάρων (NF- κ B) (Du et al, 2011). Η αλληλεπίδραση μεταξύ κανναβινοειδών, ενδογενών και συνθετικών με υποδοχείς «δίκην διόδου» (Toll-like receptors: TLRs) βρίσκεται επίσης υπό έρευνα (Downer 2011), όπως επίσης και οι αλληλεπιδράσεις των ενδοκανναβινοειδών με συστήματα νευροδιαβιβαστών που εξαρτώνται από το GABA/γλουταμικό, βιογενείς αμίνες και οπιοειδή (Lopez-Moreno et al 2008).

2. Υπάρχουν ουσίες, πιθανά ενδοκανναβινοειδή, τα οποία δεν παρουσιάζουν ικανοποιητική χημική συγγένεια με τους υποδοχείς CB₁ και CB₂.

Ο μεταβολίτης του AEA N-αραχυδονυλ-γλυκίνη (NAGly), ο οποίος έχει εντοπιστεί στον εγκέφαλο του αρουραίου και του βοδιού, αλλά και σε άλλους ιστούς (Bradshaw et al 2009), μιμείται τα ενδοκανναβινοειδή στην καταστολή του τονικού φλεγμονώδους άλγους (Huang et al 2001), χωρίς να δεσμεύεται σε ικανοποιητικό βαθμό με τους CB₁ και CB₂ υποδοχείς. Επιπλέον, η NAGly επάγει αλλοστερικά τη λειτουργία των υποδοχέων γλυκίνης, όπως και η Δ^9 -THC και το AEA. Η NAGly επίσης, δρα στον υποδοχέα επαναπρόσληψης της γλυκίνης, ως αναστρέψιμος μη-συναγωνιστικός αναστολέας (Wiles et al 2006).

Μια ομάδα ερευνητών πρότεινε τελικά το 2006, ότι η NAGly είναι το ενδογενές πρόσδεμα για τον υποδοχέα GPR18 (Kohno et al, 2006)

3. Αγωνιστές κανναβινοειδών έχουν αποδείξει δράσεις σε γενετικά τροποποιημένους, CB₁/CB₂ knock-out, μυς.

Το συνθετικό κανναβινοειδές WIN 55,212 (βλ. παρακάτω), όπως και το ΑΕΑ, φαίνεται ότι μπορούν να επάγουν τη δραστηριότητα της γ-θειο-τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTPγS) σε εγκεφαλικές μεμβράνες CB₁ knock-out μυών, η οποία δεν μπορεί να ανασταλλεί από τη ριμοναμπάντη (Breivogel et al 2001, Monory et al 2002). Η ταυτότητα του υποδοχέα μέσω του οποίου διαμεσολαβείται αυτή η δράση παραμένει άγνωστη.

Το ενδοκανναβινοειδές ΑΕΑ επίσης, παράγει όλα τα συμπεριφορικά του αποτελέσματα (αναλγησία, καταληψία, μείωση κινητικής δραστηριότητας) σε CB₁ knock-out μυς (Di Marzo et al 2000). Η δράση αυτή, είναι πιθανό να ασκείται είτε μέσω του προαναφερθέντος «άγνωστου» υποδοχέα, είτε μέσω TRP διαύλων.

Τα συνθετικά κανναβινοειδή WIN 55,212-2 και CP 55,940 (βλ. παρακάτω) φαίνεται ότι είναι πιθανό να διεγείρουν έναν ακόμα, «άγνωστο» υποδοχέα, ο οποίος εντοπίζεται σε διεγερτικούς πυραμιδικούς νευράξονες του ιπποκάμπου. Η χορήγηση των αγωνιστών αυτών σε CB₁ knock-out πειραματόζωα, οδηγεί σε καταστολή της γλουταματεργικής νευροδιαβίβασης, η οποία αναστέλλεται από τον TRPV αναστολέα καψαζεπίνη (Hajos et al 2001).

Είναι γνωστό ότι τα κανναβινοειδή, συμπεριλαμβανομένου του ΑΕΑ, επιδρούν στο καρδιαγγειακό σύστημα μέσω περιφερικών CB₁ υποδοχέων (Ishac et al 1996, Jarai et al 1999, Wagner et al 1999). Η μη-φυσιολογική κανναβιδιόλη (abn-CBD), που συνιστά ένα συμπεριφορικά ανενεργό συνθετικό κανναβινοειδές, το ΑΕΑ και το σταθερό ανάλογο του μεθανανδαμίδιο προκάλεσαν υπόταση και αγγειοδιαστολή της μεσεντερίου σε μυς αγρίου τύπου, όπως και σε CB₁ knock-out, αλλά και σε CB₁/CB₂ knock-out (Jarai et al 1999). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά και την παρατήρηση ότι η abn-CBD δε δεσμεύεται στους CB₁ και CB₂ υποδοχείς, προτάθηκε η ύπαρξη ενός ενδοθηλιακού «abn-CBD

υποδοχέα», ο οποίος, σε αντίθεση με το «νέο» υποδοχέα που ενεργοποιεί τη GTPγS, αναστέλλεται από το SR141716A, όχι όμως από τον TRPV αναστολέα καφαζεπίνη (Zygmunt et al 1999). Ένα άλλο ανάλογο κανναβιδιόλης και εκλεκτικός αναστολέας του abn-CBD υποδοχέα, το O-1918, έδειξε ότι μπορεί να αντιστρέψει την αγγειοδιαστολή που προκαλούν η abn-CBD και το AEA, χωρίς να δεσμεύεται στους CB₁ και CB₂ υποδοχείς (Offertaller et al 2003). Ένας από τους ρόλους που φαίνεται να παίζει ο προτεινόμενος «abn-CBD υποδοχέας», σχετίζεται με τη μετανάστευση των μικρογλοιακών κυττάρων (Franklin and Stella 2003, Kreutz et al 2009, Walter et al 2003).

4. Προτεινόμενοι «νέοι» υποδοχείς κανναβινοειδών μέχρι σήμερα

Η παρατήρηση ότι η abn-CBD, το AEA και η NAGly αποτελούν πλήρεις αγωνιστές για τον υποδοχέα GPR18 οδήγησε τελικά στην υπόθεση ότι ο «abn-CBD» υποδοχέας είναι ο GPR18 υποδοχέας (Mc Hugh et al 2010, Mc Hugh et al 2011).

Η πρωτεΐνη GPR55 προτάθηκε επίσης ως ένας «νέος» κανναβινεργικός, ευαίσθητος στην λυσοφωσφατιδυλινοσιτόλη (LPI), υποδοχέας καθώς έχει αποδειχτεί ότι δεσμεύεται με τα ενδοκανναβινοειδή 2-AG και AEA, τις Δ⁹-THC και CBD και επίσης με το συνθετικό κανναβινοειδές CP-55940 (Rymler et al 2007).

Προκειμένου να αποφευχθεί η σύγχυση, όπως και ο πρόωρος ή μη οργανωμένος καθορισμός νέων υποδοχέων των κανναβινοειδών, η Επιτροπή Ονοματολογίας Υποδοχέων και Ταξινόμησης Φαρμάκων, Υποεπιτροπή Υποδοχέων των Κανναβινοειδών, της Διεθνούς Ένωσης Φαρμακολογίας (International Union of Pharmacology: IUPHAR), πρότεινε έναν αριθμό κριτηρίων, προκειμένου να ταξινομηθεί μια ουσία ως κανναβινεργικός υποδοχέας (Pertwee et al, 2010). Τα κριτήρια αυτά έχουν ως εξής:

1. Ο πιθανός υποδοχέας θα πρέπει να ενεργοποιείται στην ορθοστερική του θέση και με σημαντική ισχύ από ένα αναγνωρισμένο πρόσδεμα των CB₁/CB₂ υποδοχέων.
2. Ο πιθανός υποδοχέας θα πρέπει να ενεργοποιείται τουλάχιστον από έναν ενδογενή αγωνιστή των CB₁/CB₂ υποδοχέων σε «σχετικά φυσιολογικές» συγκεντρώσεις.
3. Αν πρόκειται για GPCR (G-protein coupled receptor), θα πρέπει να διαθέτει υψηλή ομοιότητα στην αλληλουχία αμινοξέων με τον CB₁ ή τον CB₂ υποδοχέα και επομένως να ανήκει στην ομάδα α -της Τάξης A των τύπου ροδοψίνης GPCRs.
4. Δεν πρέπει να είναι ένας «καλώς αναγνωρισμένος» μη-CB₁ ή μη-CB₂ υποδοχέας ή δίαυλος, ιδιαίτερα αν υπάρχουν ήδη ισχυρές αποδείξεις ότι i) ενεργοποιείται ενδογενώς από κάποιο μη-CB₁ ή μη-CB₂ πρόσδεμα, με ικανή ισχύ και τη σχετική ενδογενή δραστηριότητα και ii) δεν ενεργοποιείται ενδογενώς με ικανή ισχύ και τη σχετική ενδογενή δραστηριότητα από κανένα γνωστό ενδοκανναβινοειδές.
5. Θα πρέπει να εκφράζεται σε κύτταρα θηλαστικών τα οποία είναι γνωστό ότι εκτίθενται σε ενδογενώς απεκκρινόμενες συγκεντρώσεις μορίων ενδοκανναβινοειδών, ικανές να προκαλέσουν απάντηση.

Τα παραπάνω κριτήρια πληρούνται μόνο μερικώς για τους υποδοχείς GPR18 και GPR55. Το AEA, ένα αδιαμφοιβήτητο ενδοκανναβινοειδές – το πρώτο που ανακαλύφθηκε – και η Δ⁹-THC θεωρούνται πλήρεις αγωνιστές για τον GPR18, ενώ η NAGly, παράγωγο του AEA, περιγράφεται ως πιο ισχυρό από το AEA για τον GPR18, αν και η συγγένειά της για τους υποδοχείς CB₁ και CB₂ είναι φτωχή (McHugh et al 2011). Η θέση ενεργοποίησης του GPR18, ορθοστερική ή αλλοστερική, από τους αγωνιστές που αναφέρθηκαν, δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί.

Όσον αφορά στον υποδοχέα GPR55, τα στοιχεία που έχουν δημοσιευτεί σχετικά με την ενεργοποίησή του από το ΑΕΑ, είναι αμφιλεγόμενα. Κάποιοι ερευνητές δε διαπιστώνουν δράση του ΑΕΑ επάνω στον υποδοχέα (Karur et al 2009), ενώ άλλοι παρατήρησαν ότι το ΑΕΑ ενεργοποιεί τον GPR55, χωρίς ωστόσο να διευκρινίζεται αν η θέση ενεργοποίησης είναι ορθοστερική ή αλοστερική (Ryberg et al 2007).

Η ομολογία των GPR18 και GPR55 (3^ο κριτήριο) ως προς τους CB₁ και CB₂ υποδοχείς κρίνεται μικρή, λιγότερο από 15% (Pertwee et al 2010). Το δεύτερο σκέλος του 3^{ου} κριτηρίου επίσης δεν πληρείται, καθώς οι πρωτεΐνες GPR18 και GPR55 δεν αποτελούν μέλη της ομάδας α -, αλλά της ομάδας δ - της Τάξης A των τύπου ροδοψίνης GPCRs (Fredrikson et al 2003).

Τέλος, αναφορικά με το 5^ο κριτήριο της IUPHAR, η διάταξη των υποδοχέων μαζί με τους ενδογενείς αγωνιστές και τα αναβολίζοντα/καταβολίζοντα ένζυμα, στον ίδιο ιστό, στην περιφέρεια ή το ΚΝΣ, υποστηρίζει την ιδιότητα των GPR18 και GPR55 πρωτεϊνών ως κανναβινεργικών υποδοχέων (Bradshaw et al 2009, Di Marzo et al 1994, Howlett et al 2002, Porter et al 2002, Stella 2010).

Ενδοκανναβινοειδή

Μετά την ανακάλυψη του πρώτου και στη συνέχεια και του δεύτερου κανναβινεργικού υποδοχέα, η έρευνα στα κανναβινοειδή εστιάστηκε στην ανεύρεση ενδογενών ουσιών που θα μπορούσαν να παίζουν το ρόλο αγωνιστή/ανταγωνιστή στους συγκεκριμένους υποδοχείς. Τα ενδοκανναβινοειδή ανήκουν σε μια οικογένεια εικοσανοειδών (Devane et al. 1992, Sugiura et al. 1995) που προέρχονται από το αραχιδονικό οξύ. Το N-αραχιδονυλ-εθανολαμίδιο (ΑΕΑ ή ανανδαμίδιο) ήταν το πρώτο ενδοκανναβινοειδές που ανακαλύφθηκε το 1992, ενώ οι ομάδες των

Ohno-Shosaku et al και Wilson και Nicoll έδειξαν για πρώτη φορά το 2001 ότι η παλίνδρομη ρύθμιση της σηματοδότησης είναι ο βασικός μηχανισμός δράσης των ενδοκανναβινοειδών.

Η οικογένεια των ενδοκανναβινοειδών περιλαμβάνει τουλάχιστον πέντε ουσίες οι οποίες παρουσιάζουν συγγένεια για τους κανναβινεργικούς υποδοχείς: το ανανδαμίδιο (N-αραχιδονυλ-αιθανολαμίδιο, AEA), τη 2-αραχιδονυλ-γλυκερόλη (2-AG), το νολαδινικό αιθέρα ή νολαντίνη (2-αραχιδονυλ-γλυκεραιθέρας, 2-AGE), τη βιροδαμίνη (virodhamine, εστέρας του αραχιδονικού οξέος και της αιθανολαμίνης που μοιάζει με το AEA), και τη N-αραχιδονοϋλο-ντοπαμίνη (NADA).

Ανανδαμίδιο (N-αραχιδονυλ-αιθανολαμίδιο, AEA)

Το ανανδαμίδιο (N-αραχιδονυλ-αιθανολαμίδιο, AEA) είναι το πρώτο ενδοκανναβινοειδές που ανακαλύφθηκε. Το όνομά του προέρχεται από τη λέξη «ananda» που στα σανσκριτικά ισημαίνει «ευδαιμονία» (“internal bliss”) (Devane et al. 1992). Το AEA είναι μερικός αγωνιστής των κανναβινεργικών υποδοχέων CB₁ και CB₂ (Glass and Northup 1999) αλλά η δέσμευση με τους CB₂ είναι περίπου τέσσερις φορές λιγότερο ισχυρή συγκριτικά με τους CB₁ υποδοχείς (Felder et al. 1995) (Σχήμα 3). Το AEA είναι επίσης πλήρης αγωνιστής για τους βανιλλοϊδικούς υποδοχείς TRPV1, αλλά με σχετικά χαμηλή συγγένεια πρόσδεσης (Zygmunt et al. 1999).

Το AEA, παράγωγο του αραχιδονικού οξέος, συντίθεται από φωσφολιπίδια της μεμβράνης (πχ. φωσφατιδυλ-αιθανολαμίνη) αφού υποστούν ακετυλίωση και υδρόλυση από τα ένζυμα N-ακυλτρανσφεράση (NAT) και N-ακυλφωσφατιδυλ-αιθανολαμίνο-υδρολυτική φωσφολιπάση D (NAPE-PLD) (Fowler et al. 2003; Piomelli 2003), αν και μεταγενέστερες μελέτες με knock-out πειραματόζωα έδειξαν ότι η NAPE-PLD δεν είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του AEA (Okamoto et al 2007). Φαίνεται επίσης, ότι στη σειρά αντιδράσεων της σύνθεσης του

ΑΕΑ συμμετέχει η πρωτεϊνική κινάση A (PKA) (Cadas et al. 1996, Piomelli 2003), ενώ οι αντιδράσεις που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση του ΑΕΑ δεν μπορούν να θεωρηθούν πλήρως κατανοητές μέχρι σήμερα (Ohno-Shokaku et al 2012, Giuffrida et al. 1999, Kim et al. 2002, Okamoto et al. 2004, Stella and Piomelli 2001, Varma et al. 2001).

Το ΑΕΑ συντίθεται **“κατά απαίτηση ή κατά παραγγελία” (on demand)** και αμέσως απελευθερώνεται και εκδηλώνει τη δράση του. Το ΑΕΑ **δεν αποθηκεύεται** σε συναπτικά κυστίδια ή άλλες δομές (Van Der Stelt and Di Marzo 2004) (Σχήμα 3). Λόγω του μηχανισμού του, η συγκέντρωση του ΑΕΑ μπορεί να αυξηθεί κατά 5-12 φορές σε ελάχιστο χρόνο (Giuffrida et al. 1999; Kim et al. 2002; Stella and Piomelli 2001)

Μετά τη σύνθεσή του, το ΑΕΑ είτε διεγείρει τους CB₁ υποδοχείς του ίδιου κυττάρου (εάν υπάρχουν) όπου δημιουργήθηκε, μέσω διάχυσης, ή εκλύεται στον εξωκυττάριο χώρο και κατευθύνεται σε πιο απομακρυσμένους στόχους, τους CB₁ υποδοχείς των προσυναπτικών απολήξεων, που αποτελεί και τον κύριο μηχανισμό δράσης του (Ohno-Shokaku et al 2001).

Το ΑΕΑ είναι χημικά εξαιρετικά ασταθές, και υδρολύεται ταχύτατα από αμιδάσες, παράγοντας αιθανολαμίνη και αραχιδονικό οξύ (Deutsch and Chin 1993). Το κύριο ένζυμο αποδόμησης του ΑΕΑ θεωρείται η υδρολάση του αμιδίου των λιπαρών οξέων (FAAH), η οποία απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε το 1996 (Di Marzo et al. 1999).

Ένας άλλος μηχανισμός απενεργοποίησης του ΑΕΑ είναι μέσω επαναπρόσληψης στην προσυναπτική μεμβράνη. Η υπεύθυνη πρωτεΐνη είναι ένας διαμεμβρανικός μεταφορέας με ταχεία κινητική, ο οποίος διαθέτει υψηλή συγγένεια με το ΑΕΑ και ρυθμίζει τον καταβολισμό του, μεταφέροντάς το μόριο στο εσωτερικό του κυττάρου όπου συνδέεται με ένζυμο αποδόμησης όπως η FAAH (Beltramo et al 1997).

Τα τελευταία χρόνια έχουν συντεθεί διάφορες ουσίες με σκοπό να τροποποιήσουν τους μηχανισμούς απενεργοποίησης του ΑΕΑ, διεγερτικά ή ανασταλτικά, οι οποίες έχουν δυνητικά ρυθμιστικό ρόλο στο

ενδοκανναβινοειδές σύστημα και συνεπώς αποτελούν στόχο πιθανών θεραπευτικών εφαρμογών (Fowler 2006).

2-AG (2-αραχιδονυλ-γλυκερόλη)

Η 2-AG, είναι το δεύτερο ενδοκανναβινοειδές που ανακαλύφθηκε, αρχικά σε παρασκευάσματα εντέρου σκύλων (Mechoulam et al. 1995) και εγκεφάλου επιμύων (Sugiura et al. 1995). Η 2-AG θεωρείται πλήρης αγωνιστής για αμφότερους τους υποδοχείς CB₁ και CB₂ (Childers and Breivogel 1998) και επίσης βρίσκεται σε αρκετά υψηλότερη συγκέντρωση (~200 φορές) στον εγκέφαλο συγκριτικά με το AEA (Stella et al. 1997; Sugiura et al. 1995). Ως εκ τούτου, η 2-AG θεωρείται σήμερα από τους περισσότερους ερευνητές ως το κύριο ενδογενές κανναβινοειδές του εγκεφάλου (Sugiura and Waku 2000).

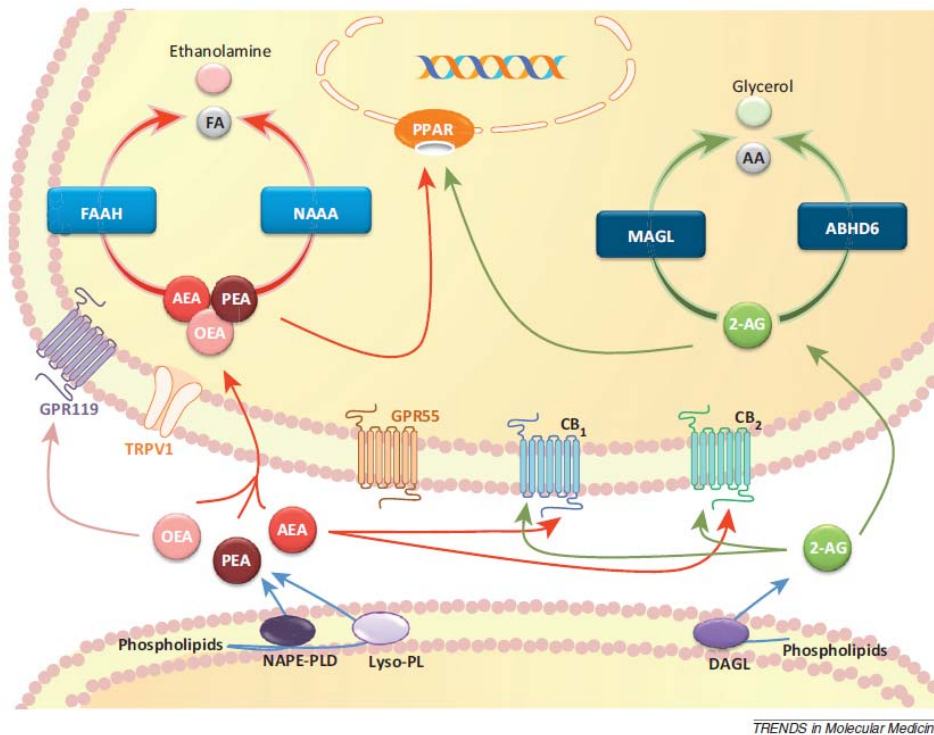
Όσον αφορά στη χημική συγγένεια με τους κανναβινεργικούς υποδοχείς, αρχικά θεωρήθηκε ότι η 2-AG και το AEA διαθέτουν παρόμοια χημική συγγένεια και με τους δύο υποδοχείς, CB₁ και CB₂, παρά το γεγονός ότι η 2-AG αποτελεί πλήρη ενώ το AEA μερικό αγωνιστή (Pertwee 1999). Αργότερα, κάποιοι ερευνητές θεώρησαν ότι το AEA διαθέτει μεγαλύτερη χημική συγγένεια με τους κανναβινεργικούς υποδοχείς κατά απόλυτη τιμή, ενώ άλλοι διαπίστωσαν ότι η 2-AG είναι περισσότερο δραστική από το AEA στην αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου (Sugiura et al 2000), εύρημα το οποίο αντιστρεφόταν με CB₂ παρά CB₁ ανταγωνισμό.

Οι βιοχημικές μελέτες έχουν αναδείξει διάφορα βιοσυνθετικά μονοπάτια για την 2-AG. Ο κύριος τρόπος βιοσύνθεσης φαίνεται ότι είναι από φωσφολιπίδια της μεμβράνης μέσω συνδυασμένης δράσης της φωσφολιπάσης C (PLC) και της διακυλγλυκερολικής λιπάσης (DGL) (Σχήμα 3). Δύο υπότυποι της DGL, με στενή μεταξύ τους συσχέτιση έχουν κλωνοποιηθεί, η DGL α και η DGL β (Bisogno et al, 2003).

Η μονοακυλγλυκερολική λιπάση (MGL), η οποία κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά σε λιπώδη ιστό μυ, θεωρείται το κύριο ένζυμο αποδόμησης της 2-AG, μέσω υδρόλυσης, αν και η FAAH μπορεί επίσης να απενεργοποιήσει την 2-AG (Sugiura et al, 2006, Dinh et al. 2002) (Σχήμα 3).

Η MGL φαίνεται ότι καταλύει το 85% της συνολικής υδρόλυσης της 2-AG σύμφωνα με μελέτη που χρησιμοποιεί πρωτεομική ανάλυση, ενώ το υπόλοιπο 15% καταλύεται από άλλα ένζυμα, όπως οι πρωτεΐνες ABHD6 και ABHD12 (Blankman et al 2007). Η διαφορετική κατανομή των δύο ενζύμων, καθώς η MGL εντοπίζεται προσυναπτικά ενώ η ABHD6 μετασυναπτικά, υπονοεί ότι οι λειτουργίες τους δεν αλληλοεπικαλύπτονται (Marrs et al 2010). Μια πρόσφατη μελέτη παρουσιάζει το ενδιαφέρον εύρημα ότι η μετάλλαξη του γονιδίου ABHD12 οδηγεί σε μια σπάνια νευροεκφυλιστική νόσο, η οποία ονομάστηκε PHARC (Polyneuropathy, Hearing Loss, Ataxia, Retinitis Pigmentosa, Cataract), υποδεικνύοντας ότι η πρωτεΐνη ABHD12 παίζει σημαντικό ρόλο στο Κεντρικό και Περιφερικό Νευρικό Σύστημα και στον οφθαλμό, παρά τη φαινομενικά μικρή συμμετοχή της στην υδρόλυση της 2-AG (Fiskerstrand et al 2010).

Η οξείδωση αποτελεί έναν ακόμα δρόμο καταβολισμού της 2-AG. Η κυκλοοξυγενάση θεωρείται το υπεύθυνο ένζυμο για αυτήν τη λειτουργία, μεταξύ των τριών ισομορφών της ωστόσο (COX-1, -2, -3), μόνο η COX-2 αναγνωρίζει εκλεκτικά την 2-AG ως υπόστρωμα (Vandevorde and Lambert 2007).



TRENDS in Molecular Medicine

Σχήμα 3: Συνοπτική περιγραφή του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος. Οι *N*-ακυλ-αιθανολαμίνες (NAE) – *N*-αραχιδονυλ-αιθανολαμίδιο (AEA), *N*-παλμιτοϋλ-αιθανολαμίνη (PEA), και *N*-ολεοϋλ-αιθανολαμίνη – συντίθενται από πρόδρομα μεμβρανικά μόρια *N*-ακυλ-φωσφατιδυλ-αιθανολαμίνης (NAPE), είτε άμεσα μέσω μιας NAPE-εκλεκτικής φωσφολιπάσης *D*, ή μέσω διαδοχικής δράσης λιπασών (της φωσφολιπάσης *C* και στη συνέχεια μιας φωσφατάσης ή της φωσφολιπάσης *A2* και τέλος της φωσφολιπάσης *D*). Η 2-αραχιδονυλ-γλυκερόλη (2-AG) παράγεται κυρίως από διακυλγλυκερόλες προερχόμενες από φωσφολιπίδια, με τη δράση των διακυλγλυκερολικών λιπασών α και β . Τα βιοενεργά αυτά λιπίδια μπορούν στη συνέχεια να ενεργοποιήσουν: i) Υποδοχείς συνδεδεμένους με *G*-πρωτεΐνες όπως οι CB_1 και CB_2 κανναβινεργικοί υποδοχείς (AEA, 2-AG), οι GPR119 (OEA) ή οι GPR55 υποδοχείς (πιθανώς PEA), ii) τους διαυλικούς υποδοχείς TRPV1 (AEA) και iii) τους υποδοχείς ενεργοποιημένου υπεροξυσωματικού πολλαπλασιαστή (PPARs) (AEA, OEA, PEA, 2-AG). Τα λιπίδια αυτά υδρολύονται μέσα στο κύτταρο από αρκετές λιπάσες. Τα δύο κύρια υδρολυτικά ένζυμα των NAE είναι οι αμιδάσες σερίνης FAAH και κυστεΐνης NAAA. Η 2-AG υδρολύεται από δύο υδρολάσες σερίνης, τη MAGL και την ABHD6 (Προσαρμογή από Alhouayek & Muccioli 2012).

Νολαδινικός αιθέρας (νολαδίνη, 2-αραχιδονυλ-γλυκερικός αιθέρας)

Το ενδοκανναβινοειδές νολαδινικός ή 2-αραχιδονυλ-γλυκερικός αιθέρας(νολαδίνη) ομοιάζει με την 2-AG αλλά διαθέτει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για τους CB₁ υποδοχείς συγκριτικά με τους CB₂ (Hanus et al. 2001) (Σχήμα 4). Υψηλά επίπεδα νολαδινικού αιθέρα ανιχνεύθηκαν στο θάλαμο και στον ιππόκαμπο ενώ μικρότερα επίπεδα ανιχνεύθηκαν στο νωτιαίο μυελό (Fezza et al. 2002).

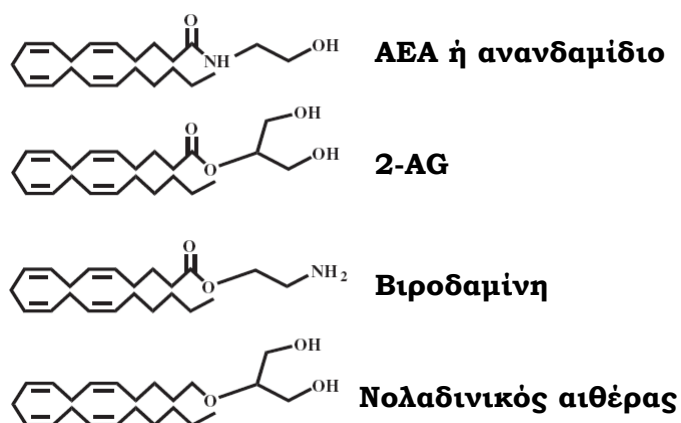
Βιροδαμίνη

Η βιροδαμίνη μοιάζει δομικά με το AEA, καθώς αποτελεί τον εστέρα του αραχιδονικού οξέος και του αιθανολαμιδίου (Porter et al. 2002) (Σχήμα 4). Δρα ως μερικός αγωνιστής των CB₁ και ως πλήρης αγωνιστής των CB₂ υποδοχέων, ενώ προσδιορίστηκε για πρώτη φορά στον εγκέφαλο του επίμουσ (Walker et al. 2002).

NADA (N-αραχιδονυλ-ντοπαμίνη)

Η N-αραχιδονυλ-ντοπαμίνη (NADA) θεωρείται κυρίως ενδογενής αγωνιστής των βανιλλοϊδικών υποδοχέων, παράγωγο του αραχιδονικού οξέος, αλλά παρουσιάζει αξιόλογη δραστικότητα και προς τους CB₁ υποδοχείς και συνεπώς μπορεί να συμπεριληφθεί στα ενδοκανναβινοειδή (Huang et al. 2002) (Σχήμα 4). Για πρώτη φορά ανιχνεύθηκε στον εγκέφαλο επιμύων και βοοειδών. Η ενεργοποίηση των CB₁ υποδοχέων με συστηματική χορήγηση NADA προκαλεί σε μεγάλο βαθμό τις κανναβινομιμητικές δράσεις, συμπεριλαμβανομένης και της αναλγησίας. Αντίθετα, η ενεργοποίηση των βανιλλοϊδικών υποδοχέων

προκαλεί υπεραλγησία στην περιφέρεια (Huang et al. 2002). Η κατανομή της ενδογενούς NADA στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου διαφέρει από την κατανομή του AEA, με τα πιο υψηλά επίπεδα της NADA να ανιχνεύονται κυρίως στο ραβδωτό και στον ιππόκαμπο. Μικρή ποσότητα NADA διαπιστώθηκε ακόμη στο ραχιαίο ριζικό γάγγλιο του βοοειδούς (Huang et al. 2002).



Σχήμα 4: Χημικές δομές των ενδογενών κανναβινοειδών

Τα ενδοκανναβινοειδή επάγουν φαρμακολογικές και συμπεριφορικές μεταβολές μετά από πειραματική χορήγηση σε ζώα, οι οποίες ομοιάζουν σε μεγάλο βαθμό με τις δράσεις των κανναβινομιμητικών ενώσεων. Το AEA για παράδειγμα, προκαλεί μία χαρακτηριστική τετράδα συμπεριφορών σε μυς, η οποία χαρακτηρίζεται από υποκινητικότητα, καταληψία, αναλγησία και υποθερμία μετά από ενδοπεριτοναϊκή, ενδορραχιαία ή ενδοφλέβια χορήγηση. Οι δράσεις του AEA έχουν ταχεία έναρξη αλλά μικρή διάρκεια, λόγω της ιδιαίτερα ταχείας ανακύκλησης της ουσίας, η οποία προσλαμβάνεται πολύ γρήγορα από τους νευρώνες ή τα αστροκύτταρα και σχεδόν άμεσα αποδομείται ενζυμικά (Calignano et al. 1998, Crawley et al. 1993, Frider and Mechoulam 1993, Smith et al. 1994).

Τα ενδοκανναβινοειδή εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η μνήμη και η μάθηση, το άγχος, η κινητικότητα, ο έλεγχος της όρεξης, ο έμετος

καθώς και σε αισθητικές, αυτόνομες και νευροενδοκρινείς δράσεις. Επίσης, επιδρούν σε λειτουργίες όπως ο μεταβολισμός, η πρόκληση υπότασης και βραδυκαρδίας, η ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης, η αναστολή της περαιτέρω αύξησης κυττάρων. Τα ενδοκανναβινοειδή παρουσιάζουν ακόμα αντιφλεγμονώδεις δράσεις αλλά και προφλεγμονώδεις ιδιότητες, π.χ., ενισχύοντας τη μετανάστευση ουδετερόφιλων, ηωσινόφιλων και φυσικών κυττάρων εξόντωσης (Alberich Jorda et al. 2004; Kishimoto et al. 2005; Oka et al. 2004; Oka et al. 2005).

Προσδέματα των υποδοχέων των κανναβινοειδών

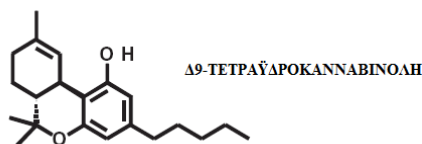
Αγωνιστές

Η ανακάλυψη και η σύνθεση ενός σημαντικού αριθμού κανναβινεργικών αγωνιστών με ποικίλες ιδιότητες βοήθησε ιδιαίτερα στην αποκρυπτογράφηση και χαρτογράφηση των κανναβινεργικών υποδοχέων και του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος. Οι κανναβινεργικοί αγωνιστές ταξινομούνται σήμερα σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με τη χημική δομή τους (Childers and Breivogel 1998): 1) τα κλασικά κανναβινοειδή, 2) τα μη κλασικά κανναβινοειδή, 3) τις αμινο-αλκυλοϊνδόλες και 4) τα εικοσανοειδή.

Κλασικά κανναβινοειδή

Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα τρικυκλικά παράγωγα του διβενζοπυρανόου στα οποία ανήκουν τα δύο φυσικά συστατικά της κάνναβης, Δ⁹-THC και Δ⁸-THC και τα συνθετικά ανάλογά τους όπως το HU 210 (Σχήμα 5). Η πρώτη γενιά κλασικών κανναβινοειδών δε διέθετε εκλεκτικότητα για τους CB₁ ή τους CB₂ υποδοχείς αλλά αργότερα

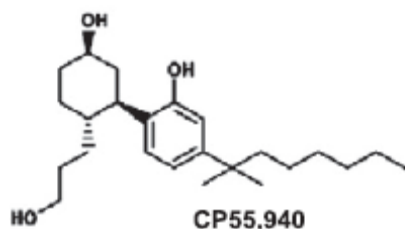
αναπτύχθηκαν νέα, εκλεκτικά παράγωγα, όπως οι CB₂-εκλεκτικοί αγωνιστές· π.χ., JWH-133 και HU-308 (Gareau et al. 1996, Hanus et al. 1999, Huffman et al. 1996).



Σχήμα 5: Η χημική δομή της Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλης- χαρακτηριστική της ομάδας των κλασικών κανναβινοειδών.

Μη κλασικά κανναβινοειδή

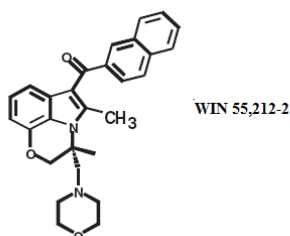
Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει δικυκλικά και τρικυκλικά ανάλογα της Δ⁹-THC με βασική διαφορά από τα κλασικά κανναβινοειδή την έλλειψη του δακτυλίου πυρανίου (Melvin et al. 1993). Κύριος εκπρόσωπος της κατηγορίας είναι ο κανναβινεργικός αγωνιστής CP-55,940, ο οποίος παρουσιάζει παρόμοια ικανότητα πρόσδεσης για τους CB₁ και CB₂ υποδοχείς και θεωρείται πλήρης αγωνιστής και για τους δύο. Διαθέτει υψηλή *in vivo* δραστηριότητα καθώς εκτιμάται ότι είναι 10 έως 50 φορές ισχυρότερος από την Δ⁹-THC σύμφωνα με μελέτες σε μύς (Compton et al. 1992). Για το λόγο αυτό, ο CP-55,940 φάνηκε ιδιαίτερα χρήσιμος στις μελέτες ανακάλυψης και ταυτοποίησης του CB₁ υποδοχέα (Devane et al. 1988).



Σχήμα 6: Η χημική δομή του CP 55,940- χαρακτηριστική της ομάδας των μη κλασικών κανναβινοειδών.

Αμινοαλκυλοϊνδόλες

Στην τρίτη κατηγορία κανναβινεργικών αγωνιστών ανήκουν τα μόρια που έχουν διαφορετική χημική δομή από τα υπόλοιπα κανναβινοειδή. Το WIN 55,212-2 (Σχήμα 7) αποτελεί τον κύριο εκπρόσωπο της κατηγορίας, με υψηλή συγγένεια για αμφοτέρους τους υποδοχείς των κανναβινοειδών, αν και εμφανίζει μέτρια εκλεκτικότητα υπέρ των CB₂ υποδοχέων. Άλλοι αγωνιστές της κατηγορίας παρουσιάζουν σημαντική εκλεκτικότητα για τους CB₂ κανναβινεργικούς υποδοχείς (π.χ. JWH-015) (Gallant et al. 1996, Showalter et al. 1996).



Σχήμα 7: Η χημική δομή του WIN 55,212-2-χαρακτηριστική της ομάδας των αμινοαλκυλοϊνδολών.

Εικοσανοειδή

Στα εικοσανοειδή ανήκουν τα παράγωγα του αραχιδονικού οξέος δηλαδή τα ενδοκανναβινοειδή AEA, 2-AG, βιροδαμίνη και νολαδινικός εθέρας, τα συνθετικά ανάλογα του AEA, όπως το μεθυλ-ανανδαμίδιο (AM356), το αραχιδονυλο-χλωροαιθυλαμίδιο (ACEA), το αραχιδονυλο-κυκλοπροπυλαμίδιο (ACPA), το O-689 και το O-1812 (Howlett et al. 2002; Porter et al. 2002).

Οι αγωνιστές των κανναβινεργικών υποδοχέων, όπως το WIN 55,212-2 και το CP-55,940 έχουν την ικανότητα να παράγουν την τετράδα συμπεριφορικών απαντήσεων η οποία θεωρείται χαρακτηριστική της κανναβινομιμητικής δράσης και περιλαμβάνει καταληψία, αναλγησία, υποκινητικότητα και υποθερμία (Pertwee and Ross 1991). Η συμπεριφορική αυτή τετράδα παράγεται επίσης από τα

ενδοκανναβινοειδή και αντιστρέφεται με τη χορήγηση εκλεκτικού ανταγωνιστή CB₁ υποδοχέων, όπως το SR141716A/ριμοναμπάντη, υποδεικνύοντας την εμπλοκή των CB₁ υποδοχέων στην εκδήλωση των συμπεριφορών αυτών (Rinaldi-Carmona et al. 1994). Τα περισσότερα προσδέματα των κανναβινεργικών υποδοχέων στις συνήθεις συγκεντρώσεις παρουσιάζουν μικρή ή μέτρια εκλεκτικότητα για έναν από τους δύο υποδοχείς, μερικά νέα ανάλογα ωστόσο έχουν δείξει σημαντική εκλεκτικότητα για τους CB₂ υποδοχείς (Huffman 2005). Οι CB₂-εκλεκτικοί αγωνιστές δεν παρουσιάζουν ψυχοτρόπο δράση και συνεπώς οι ουσίες αυτές θα μπορούσαν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν σε ποικίλες θεραπευτικές εφαρμογές, στην περιφέρεια και ίσως και στο ΚΝΣ (πχ. νευρολογικές διαταραχές) (Fernandez-Ruiz et al. 2007).

Ανταγωνιστές

Ο πρώτος εκλεκτικός ανταγωνιστής υποδοχέων των κανναβινοειδών που ταυτοποιήθηκε ήταν το SR141716A ή ριμοναμπάντη (Rinaldi-Carmona et al. 1994) το οποίο έδειξε ότι μπορεί να αναστέλλει *in vivo* τις δράσεις διάφορων αγωνιστών των κανναβινοειδών (Compton et al. 1996). σε χαμηλές (νανογραμμομοριακές) συγκεντρώσεις είναι ένας καθαρός ανταγωνιστής, με υψηλότερη αποτελεσματικότητα και εκλεκτικότητα για τους CB₁ συγκριτικά με τους CB₂ υποδοχείς. Πειραματικές μελέτες σε μοντέλα αναλγησίας έδειξαν ότι οι χαμηλές δόσεις SR141716A ανέστειλαν την προκαλούμενη από κανναβινοειδή αναλγησία, ενώ η χορήγηση του εκλεκτικού ανταγωνιστή των CB₂ υποδοχέων SR144528, δεν οδήγησε σε ανάλογο αποτέλεσμα (Calignano et al. 1998).

Στην περίπτωση που ο ανταγωνιστής SR141716A χορηγηθεί σε υψηλές δόσεις, η εκλεκτικότητα χάνεται και καταγράφεται σημαντική χημική συγγένεια και για τους δύο υποδοχείς, CB₁ και CB₂ (Pertwee 1999). Επίσης, ο SR141716A όπως και άλλοι κανναβινεργικοί ανταγωνιστές μπορούν υπό προϋποθέσεις να συμπεριφερθούν ως μερικοί αντίστροφοι

αγωνιστές. Η δράση αντίστροφου αγωνιστή συνδέεται με την πρόκληση αντίθετων εκδηλώσεων από εκείνες που εμφανίζονται με τη χορήγηση αγωνιστών των υποδοχέων, πχ. εμφάνιση υπεραλγησίας (Jaggat et al. 1998). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι το κανναβινοειδές σύστημα είναι τονικά ενεργό ώστε να μπορεί να ανασταλεί από τη δράση κάποιου ανταγωνιστή/αντίστροφου αγωνιστή. Αυτή η τονική δραστηριότητα μπορεί να οφείλεται σε μία σταθερή απελευθέρωση ενδοκανναβινοειδών ή σε ανεξάρτητη σταθερή ενεργοποίηση ενός υποσύνολου κανναβινεργικών υποδοχέων χωρίς τη μεσολάβηση ενδογενών αγωνιστών (Pertwee 2001).

Η τονική δραστηριότητα του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος έχει επιβεβαιωθεί από αρκετές αναφορές. Υψηλά επίπεδα ενδοκανναβινοειδών ανιχνεύτηκαν σε δομές που εμπλέκονται στη διαχείριση αλγογόνων ερεθισμάτων, όπως η περί τον υδραγωγό φαιά ουσία (Walker et al. 1999). Σε πειραματικό πρότυπο χρόνιου νευροπαθητικού πόνου καταγράφηκε επίσης αύξηση των κανναβινεργικών υποδοχέων (Siegling et al. 2001). Η παρατήρηση ότι η παχυσαρκία επηρεάζεται από τη λειτουργία του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος και τα κανναβινοειδή έχουν ορεξιογόνες ιδιότητες οδήγησε στην ανάπτυξη του ανταγωνιστή/αντίστροφου αγωνιστή SR141716A ως θεραπείας για την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας. Πράγματι, το SR141716A έδειξε σημαντική δραστηριότητα στη μείωση του σωματικού βάρους και πήρε έγκριση κυκλοφορίας από τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς στην Ευρώπη το 2006· αποσύρθηκε ωστόσο το 2008 λόγω πρόκλησης αυτοκτονικού ιδεασμού και άλλων ανεπιθύμητων ενεργειών από την ψυχική σφαίρα.

Άλλες ουσίες που έχουν χρησιμοποιηθεί ως ανταγωνιστές των CB₁ υποδοχέων και αποτελούν ανάλογα του SR141716A είναι το AM251 και το AM281 (Howlett et al. 2002). Κύριος εκπρόσωπος των CB₂ εκλεκτικών ανταγωνιστών είναι το μόριο AM630, το οποίο παρουσιάζει επίσης και δράσεις αντίστροφου αγωνιστή.

Η εξάρτηση και ο εθισμός αποτελούν επίσης δυνητικό θεραπευτικό πεδίο, εκτός από τον πόνο και την παχυσαρκία που αναφέρθηκαν, όπου οι ανταγωνιστές των CB₁ υποδοχέων μπορούν να βρουν κλινικές εφαρμογές. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που αποδεικνύουν με πειστικό τρόπο σε πειραματόζωα ότι CB₁ ανταγωνιστές μπορούν να αναστείλλουν την εθιστική δράση ουσιών όπως το αλκοόλ, η κοκαΐνη, η ηρωίνη, η μεθαμφεταμίνη και η νικοτίνη (Carai et al. 2005, Fernandez and Allison 2004, Padwal and Majumdar 2007, Van Gaal et al. 2005, Le Foll and Goldberg 2005, Vinklerova et al. 2002, Landa et al. 2006, Forget et al. 2005).

Παλίνδρομη ρύθμιση της συναπτικής διαβίβασης από τα ενδοκανναβινοειδή

Η ανακάλυψη ότι τα ενδοκανναβινοειδή μεταδίδουν παλίνδρομα συναπτικά μηνύματα (Ohno-Shosaku et al 2001, Wilson and Nicoll 2001) αποτέλεσε σημαντικό σταθμό στην έρευνα των κανναβινοειδών και του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος και βασίστηκε εν πολλοίς στην παρατήρηση ότι οι CB₁ υποδοχείς εντοπίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στις προσυναπτικές απολήξεις. Σήμερα, πολλές ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι τα ενδοκανναβινοειδή λειτουργούν ως παλίνδρομοι αγγελιαφόροι και παίζουν καθοριστικό ρόλο στη βραχυπρόθεσμη (short-term) και μακροπρόθεσμη (long-term) συναπτική πλαστικότητα. Η απελευθέρωση ενδοκανναβινοειδών από τους μετασυναπτικούς νευρώνες κατά κανόνα σχετίζεται με αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου ή/και ενεργοποίηση των G_{q/11}-συνδεδεμένων υποδοχέων. Τα ενδοκανναβινοειδή που απελευθερώνονται στη συνέχεια ενεργοποιούν τους προσυναπτικούς CB₁ υποδοχείς και καταστέλλουν τη συναπτική διαβίβαση παροδικά (**βραχυπρόθεσμη καταστολή της συναπτικής διαβίβασης που μεσολαβείται από τα ενδοκανναβινοειδή: endoCannaBinoid-mediated Short-Term Depression, eCB-STD**) ή μακροπρόθεσμα (**μακροπρόθεσμη**

καταστολή της συναπτικής διαβίβασης που μεσολαβείται από τα ενδοκανναβινοειδή: endoCannaBinoid-mediated Long-Term Depression, **eCB-LTD**) (Ohno-Shosaku et al 2012).

Βραχυπρόθεσμη καταστολή της συναπτικής διαβίβασης που μεσολαβείται από τα ενδοκανναβινοειδή (eCB-STD)

A. Βραχυπρόθεσμη καταστολή της συναπτικής διαβίβασης (STD) εξαρτώμενη από την Ca^{2+} -επαγόμενη απελευθέρωση ενδοκανναβινοειδών (CaER)

Σε αρκετές περιπτώσεις βραχυπρόθεσμης καταστολής της συναπτικής διαβίβασης (STD), η απελευθέρωση ενδοκανναβινοειδών επάγεται από μια σημαντική αύξηση του μετασυναπτικού Ca^{2+} , η οποία ονομάστηκε «βραχυπρόθεσμη καταστολή της συναπτικής διαβίβασης εξαρτώμενη από την Ca^{2+} -επαγόμενη απελευθέρωση ενδοκανναβινοειδών» (CaER). Σε αυτήν περιλαμβάνονται η «επαγόμενη από την εκπόλωση καταστολή της αναστολής» (depolarization-induced suppression of inhibition: DSI), η επαγόμενη από την εκπόλωση καταστολή της διέγερσης» (depolarization-induced suppression of excitation: DSE) και η προσυναπτική καταστολή που προκαλείται από τη ροή Ca^{2+} μέσω NMDA υποδοχέων του γλουταμικού (NMDARs).

Η DSI ανακαλύφθηκε στις αρχές της δεκαετίας του '90 πρώτα στην παρεγκεφαλίδα και στη συνέχεια και στον ιππόκαμπο. Το 1991 βρέθηκε ότι η εκπόλωση παρεγκεφαλιδικών κυττάρων Purkinje μπορούσε να προκαλέσει παροδική καταστολή των ανασταλτικών νευραξονικών προβολών στα εκπολωμένα κύτταρα (Llano et al 1991), ενώ ένα χρόνο αργότερα το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε σε κύτταρα CA1 ιπποκάμπου και ονομάστηκε «επαγόμενη από την εκπόλωση καταστολή της αναστολής» (DSI) (Pitler & Alger 1992). Καθώς η DSI επάγεται από μετασυναπτική αύξηση Ca^{2+} αλλά εκφράζεται προσυναπτικά, προτάθηκε ότι συμμετέχει ένα παλίνδρομο μήνυμα στην εκδήλωσή της.

Χρειάστηκαν άλλα 10 χρόνια μέχρι να αποδειχτεί ότι παλίνδρομα σήματα μεσολαβούνται από τα ενδοκανναβινοειδή για την εκδήλωση DSI στον ιππόκαμπο (Ohno-Shosaku et al 2001, Wilson & Nikoll 2001) και στην παρεγκεφαλίδα (Kretzer & Regehr 2001), ενώ αργότερα αποδείχτηκε ότι DSI μέσω ενδοκανναβινοειδών εμφανίζεται σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου συμπεριλαμβανομένων του ραβδωτού, του εγκεφαλικού φλοιού, της αμυγδαλής και του υποθαλάμου (Alger 2002, Chevaleyre et al 2006, Kano et al 2009).

Σχεδόν ταυτόχρονα με την ανακάλυψη της DSI, βρέθηκε ότι η εκπόλωση παρεγκεφαλιδικών κυττάρων Purkinje μπορεί να επάγει παροδική καταστολή διεγερτικής μεταβίβασης, φαινόμενο που ονομάστηκε «επαγόμενη από την εκπόλωση καταστολή της διέγερσης» (DSE) (Kretzer & Regehr 2001), μεσολαβείται με ανάλογο τρόπο από ενδοκανναβινοειδή και παρατηρείται σε πολλές δομές του εγκεφάλου όπως ο ιππόκαμπος, η παρεγκεφαλίδα, ο υποθάλαμος, η κοιλιακή καλυπτρική περιοχή (VTA) και ο ραχιαίος κοχλιακός πυρήνας (Alger 2002, Chevaleyre et al 2006, Kano et al 2009).

Ένας άλλος μηχανισμός που σχετίζεται με καταστολή ανασταλτικής διαβίβασης ανακαλυφθηκε το 2007 σε καλλιέργειες νευρώνων ιπποκάμπου, μέσω απευθείας διέγερσης των NMDARs (Hashimoto et al 2007). Ο μηχανισμός αυτός απαιτεί επίσης αύξηση της μετασυναπτικής ροής Ca^{2+} και παλίνδρομο μήνυμα από τα ενδοκανναβινοειδή, δεν επηρεάζεται ωστόσο από την αναστολή των τασεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} , υποδηλώνοντας ότι η ροή Ca^{2+} απευθείας μέσω των NMDARs επάγει την απελευθέρωση ενδοκανναβινοειδών (Σχήμα 8).

B. Βραχυπρόθεσμη καταστολή της συναπτικής διαβίβασης (STD) εξαρτώμενη από την επαγόμενη από υποδοχείς απελευθέρωση ενδοκανναβινοειδών (RER)

Πολλοί τύποι υποδοχέων που συνδέονται με $G_{q/11}$ πρωτεΐνες μπορούν να οδηγήσουν σε βραχυπρόθεσμη καταστολή της συναπτικής διαβίβασης που μεσολαβείται από τα ενδοκανναβινοειδή (eCB-STD) με τρόπο που δεν εξαρτάται από τη ροή Ca^{2+} . Σε αυτούς περιλαμβάνονται οι μεταβοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμικού της ομάδας I (βλ. κεφάλαιο «Γλουταματεργικοί Υποδοχείς»), οι μουσκαρινικοί υποδοχείς M_1/M_3 , οι υποδοχείς σεροτονίνης $5HT_2R$, υποδοχείς ορεξίνης και οκυτοκίνης. Σε αυτές τις μορφές eCB-STD η απελευθέρωση ενδοκανναβινοειδών επάγεται από ισχυρή ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών χωρίς να απαιτείται αύξηση μετασυναπτικού Ca^{2+} και ονομάστηκε «Βραχυπρόθεσμη καταστολή της συναπτικής διαβίβασης (STD) εξαρτώμενη από την επαγόμενη από υποδοχείς απελευθέρωση ενδοκανναβινοειδών» (RER) (Σχήμα 8).

Ο δεύτερος αυτός μηχανισμός eCB-STD ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 2001, όταν ενεργοποίηση της ομάδας I των μεταβοτροπικών υποδοχέων mGluRs από τον αγωνιστή DHPG (διυδροξυ-φαινυλ-γλυκίνη) οδήγησε σε παροδική καταστολή της διεγερτικής διαβίβασης σε παρεγκεφαλιδικά κύτταρα Purkinje (Maejima et al 2001). Η καταστολή αυτή δείχτηκε ότι μεσολαβείται από παλίνδρομα μηνύματα ενδοκανναβινοειδών και δεν αντιστρέφεται από χειρισμούς που εμποδίζουν τη μετασυναπτική αύξηση Ca^{2+} . Σήμερα είναι γνωστό ότι ο μηχανισμός αυτός, εκτός από την παραγκεφαλίδα, παρατηρείται και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο ιππόκαμπος, το ραβδωτό, ο επικλινής πυρήνας του διαφράγματος, ο έσω πυρήνας του τραπεζοειδούς σώματος και η περί τον υδραγωγό φαιά ουσία (Tanimura et al 2009).

Η δεύτερη κατηγορία υποδοχέων που σχετίζεται με το μηχανισμό αυτό περιγράφηκε το 2002 σε τομές υποκάμπου. Ο χολινεργικός αγωνιστής καρβαχόλη παρατηρήθηκε ότι προκαλεί καταστολή της ανασταλτικής

νευροδιαβίβασης σε πυραμιδικά κύτταρα CA1, με CB₁-εξαρτώμενο τρόπο, μέσω πιθανότατα ενεργοποίησης των μουσκαρινικών (mAChRs) μάλλον παρά των νικοτινικών υποδοχέων ακετυλοχολίνης (Kim et al 2002). Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς mAChRs περιλαμβάνουν πέντε υποτύπους (M₁-M₅). Οι M₁, M₃ και M₅ συνδέονται με G_{q/11} πρωτεΐνες, ενώ οι M₂ και M₄ συνδέονται σε G_{i/o}. Η έρευνα σε γενετικά τροποποιημένους μύς έδειξε καθαρά ότι οι μουσκαρινικοί υποδοχείς M₁ και M₃ είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση eCB-STD (Fukudome et al 2004). Η mAChR-επαγόμενη eCB-STD παρατηρήθηκε επίσης σε διεγερτικές συνάψεις ιπποκάμπου (Straiker & Mackie 2007) και σε ανασταλτικές συνάψεις ραβδωτού (Narushima et al 2007).

Άλλοι G_{q/11}-συνδεδεμένοι υποδοχείς που βρέθηκε ότι μπορούν να προκαλούν eCB-STD είναι οι 5-HT₂ υποδοχείς, οι οποίοι διαπιστώθηκε ότι προκαλούν καταστολή της διεγερτικής μεταβίβασης σε νευρώνες της κατώτερης ελαίας (Best & Regehr 2008) και επίσης υποδοχείς νευροπεπτιδίων, όπως της ορεξίνης-B σε διεγερτικές συνάψεις που καταλήγουν σε σεροτονινεργικούς νευρώνες του ραχιαίου πυρήνα της ραφής και της οκυτοκίνης σε διεγερτικές και ανασταλτικές συνάψεις μεγαλοκυτταρικών νευρώνων του υπεροπτικού πυρήνα.

Γ. Βραχυπρόθεσμη καταστολή της συναπτικής διαβίβασης (STD) εξαρτώμενη από Ca²⁺ - Υποβοηθούμενη από RER

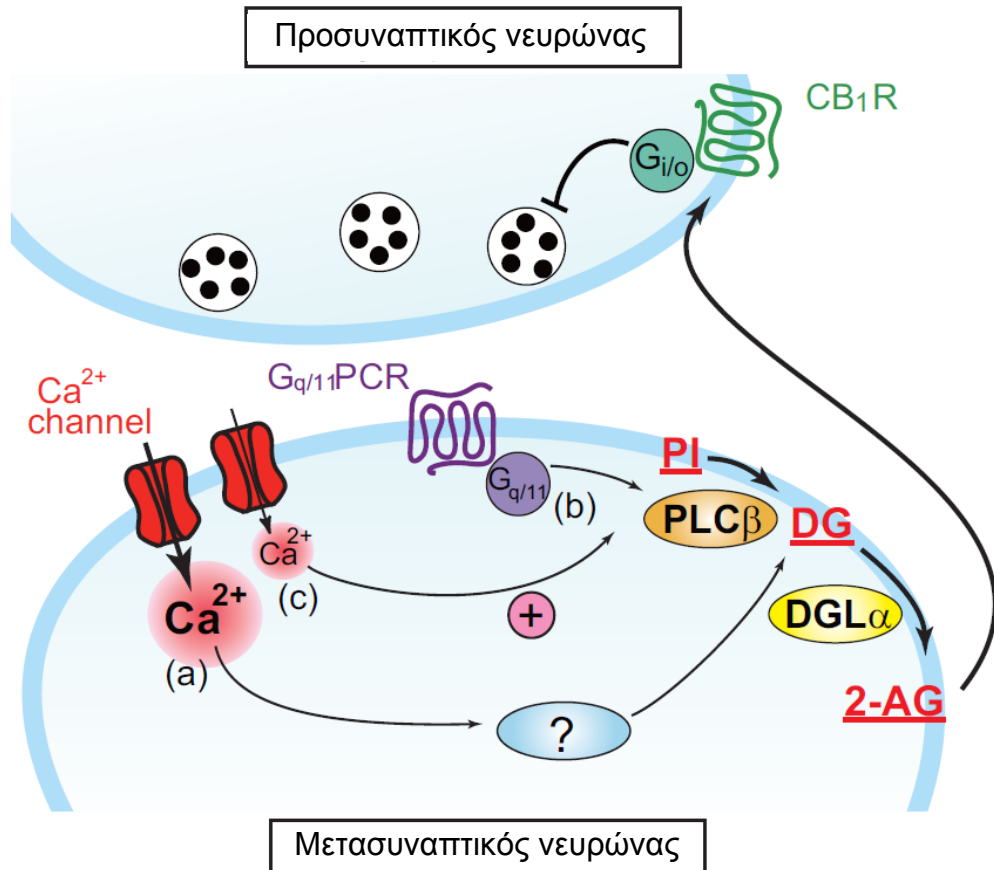
Η βραχυπρόθεσμη καταστολή της συναπτικής διαβίβασης που μεσολαμβάνεται από τα ενδοκανναβινοειδή (eCB-STD) μπορεί να συντελεστεί όταν μια μικρή αύξηση της μετασυναπτικής ροής Ca²⁺ συνδυαστεί με ασθενή διέγερση υποδοχέα, δύο φαινόμενα που εξελίσσονται σε επίπεδα κάτω από τον ουδό ενεργοποίησης της eCB-STD από το καθένα (Hashimoto et al 2005, Kim et al 2002, Maejima et al 2005, Narushima et al 2007). Το φαινόμενο αυτό προκύπτει από την ενίσχυση της RER λόγω της υπο-ουδικής αύξησης Ca²⁺ (Σχήμα 8).

Ο τρίτος αυτός μηχανισμός eCB-STD, ο οποίος συνδυάζει τους δύο προηγούμενους περιγράφηκε για πρώτη φορά σε καλλιέργειες νευρικών κυττάρων ιπποκάμπου, στους οποίους η mAChR-επαγόμενη ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης PLCβ μετρήθηκε με τη χρήση του ενεργοποιημένου από διακυλγλυκερόλη κατιοντικού διαύλου TRPC6 ως βιοδείκτη. Το επαγόμενο από μουσκαρινικούς αγωνιστές ιοντικό ρεύμα, το οποίο εξαρτάται από τη δραστηριότητα του ενζύμου PLCβ1, αποδείχτηκε ότι είναι εξαιρετικά ευαίσθητο σε συγκεντρώσεις ενδοκυττάρου Ca^{2+} εντός φυσιολογικών ορίων και ενισχύεται σημαντικά από την αύξηση των επιπέδων Ca^{2+} (Hashimoto et al 2005). Σε επόμενα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε περιοχές όπως η παρεγκεφαλίδα και ο ιππόκαμπος, η mGluR-επαγόμενη και η mAChR-επαγόμενη βραχυπρόθεσμη καταστολή της συναπτικής διαβίβασης που εξαρτάται από τα ενδοκανναβινοειδή βρέθηκε επίσης ότι επηρεάζεται από τα επίπεδα του ενδοκυττάρου Ca^{2+} (Hashimoto et al 2005, Maejima et al 2005). Μέχρι σήμερα δεν έχει διευκρινιστεί αν και η CaER ενισχύεται επίσης από την ενεργοποίηση $G_{q/11}$ -συνδεδεμένων υποδοχέων.

Η βραχυπρόθεσμη καταστολή της συναπτικής διαβίβασης που προκαλείται από την περιορισμένη αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων Ca^{2+} (σε υπομικρογραμμομοριακές τιμές) σε συνδυασμό με ήπια ενεργοποίηση υποδοχέων ονομάστηκε «βραχυπρόθεσμη καταστολή της συναπτικής διαβίβασης (STD) εξαρτώμενη από Ca^{2+} - Υποβοηθούμενη από RER» και θεωρείται ο μηχανισμός που πιθανότατα παίζει τον σημαντικότερο ρόλο στην πρόκληση STD σε φυσιολογικές συνθήκες (Nevian & Sakmann 2006).

Δ. Βραχυπρόθεσμη καταστολή της συναπτικής διαβίβασης επαγόμενη από τη συναπτική δραστηριότητα (Synaptically Driven eCB-STD)

Εκτός από τη μετασυναπτική εκπόλωση και/ή τη φαρμακολογική διέγερση των $G_{q/11}$ υποδοχέων, η συναπτική δραστηριότητα μπορεί επίσης να επάγει βραχυπρόθεσμη καταστολή της συναπτικής διαβίβασης που μεσολαβείται από τα ενδοκανναβινοειδή (eCB-STD). Η επαναληπτική ενεργοποίηση των διεγερτικών συναπτικών προβολών έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να προκαλέσει eCB-STD, η οποία ονομάστηκε «Βραχυπρόθεσμη καταστολή της συναπτικής διαβίβασης επαγόμενη από τη συναπτική δραστηριότητα». Η απελευθέρωση γλουταμικού σε επαρκείς ποσότητες από διεγερτικούς προσυναπτικούς νευράξονες μέσω επαναλαμβανόμενων διεγέρσεων οδηγεί σε μετασυναπτική εκπόλωση, αύξηση επιπέδων Ca^{2+} και ενεργοποίηση των μεταβοτροπικών υποδοχέων mGlu (Σχήμα 8). Όλες αυτές οι διαδικασίες μπορούν να προκαλέσουν απελευθέρωση ενδοκανναβινοειδών, τα οποία μάλιστα μπορούν να διαχυθούν ετεροσυναπτικά και να προκαλέσουν eCB-STD σε άλλες συνάψεις. Συμπερασματικά, η STD επαγόμενη από τη συναπτική δραστηριότητα μπορεί να σχετίζεται με CaER, RER ή Ca^{2+} -υποβοηθούμενη RER ανάλογα με τις συνθήκες διέγερσης και καταγραφής.



Σχήμα 8: Μοριακοί μηχανισμοί της Βραχυπρόθεσμης Καταστολής της συναπτικής διαβίβασης που μεσολαβείται από τα Ενδοκανναβινοειδή (eCB-STD). Όταν η συγκέντρωση Ca^{2+} αυξάνεται σε σημαντικό βαθμό λόγω ενεργοποίησης των τάσεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} ή των υποδοχέων NMDA, παράγεται 2-AG μέσω μηχανισμού που σχετίζεται με την DGLα. α) Το κρίσιμο ένζυμο αυτής της διαδικασίας, το οποίο θεωρείται ότι ενεργοποιείται από την αύξηση Ca^{2+} και συνθέτει διακυλ-γλυκερόλη, δεν έχει μέχρι σήμερα ταυτοποιηθεί. β) Όταν η φωσφολιπάση PLCβ διεγείρεται από την ενεργοποίηση των υποδοχέων που συνδέονται με πρωτεΐνες $G_{q/11}$, παράγεται διακυλ-γλυκερόλη και μετατρέπεται σε 2-AG από την DGLα. γ) Όταν η ατελής (υποουδική) ενεργοποίηση των $G_{q/11}$ -συνδεδεμένων υποδοχέων συνδυάζεται με μικρή αύξηση της συγκέντρωσης Ca^{2+} , η 2-AG παράγεται μέσω ενός PLCβ-εξαρτώμενου μηχανισμού, καθώς η επαγόμενη από υποδοχείς PLCβ διέγερση είναι Ca^{2+} εξαρτώμενη. Η 2-AG απελευθερώνεται από το μετασυναπτικό νευρώνα, ενεργοποιεί τους προσυναπτικούς CB_1 υποδοχείς και προκαλεί παροδική καταστολή της συναπτικής διαβίβασης. (Προσαρμογή από Ohno-Shosaku et al 2012)

Μακροπρόθεσμη καταστολή της συναπτικής διαβίβασης που μεσολαβείται από τα ενδοκανναβινοειδή (eCB-LTD)

Η μακροπρόθεσμη καταστολή της συναπτικής διαβίβασης που μεσολαβείται από τα ενδοκανναβινοειδή (eCB-LTD) έχει μέχρι σήμερα

παρατηρηθεί σε διεγερτικές συνάψεις του ραβδωτού, του επικλινούς πυρήνα του διαφράγματος, του εγκεφαλικού φλοιού, του ραχιαίου κοχλιακού πυρήνα, της παρεγκεφαλίδας και του ιπποκάμπου και σε ανασταλτικές συνάψεις του ιπποκάμπου, της αμυγδαλής και της κοιλιακής καλυπτρικής περιοχής (Heifets & Castillo 2009). Τα πειραματικά πρωτόκολλα που έχουν χρησιμοποιηθεί για την πρόκληση eCB-LTD περιλαμβάνουν επαναληπτικούς ερεθισμούς με χαμηλή (πχ. 1 Hz, 100 παλμοί), μέτρια (πχ. 10 Hz, 5 min) και υψηλή (πχ. 100 Hz, 1 sec) συχνότητα, ερεθισμούς σε θ- ρυθμό καθώς και συνδυαστικά πρωτόκολλα.

Γενικά, θεωρείται ότι οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στις διαδικασίες της μακροπρόθεσμης καταστολής της συναπτικής διαβίβασης που μεσολαβείται από τα ενδοκανναβινοειδή (eCB-LTD) ομοιάζουν με τους αντίστοιχους μηχανισμούς της βραχυπρόθεσμης καταστολής συναπτικής διαβίβασης (eCB- LTD). Η Ca^{2+} -εξαρτώμενη RER υποβοηθούμενη eCB-LTD φαίνεται ότι είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός μακροπρόθεσμης καταστολής στις περισσότερες εγκεφαλικές περιοχές, συμπεριλαμβανομένων του ραβδωτού, του επικλινούς πυρήνα του διαφράγματος, της παρεγκεφαλίδας, του προμετωπιαίου φλοιού και του αισθητικού φλοιού. Η συμμετοχή της RER είναι επίσης πιθανή σε μερικές περιπτώσεις (Heifets & Castillo 2009).

Η εμπλοκή του καταρράκτη αντιδράσεων της cAMP/PKA, μετά την ενεργοποίηση των CB_1 υποδοχέων, έχει προταθεί για συγκεκριμένους τύπους eCB-LTD. Φαίνεται ότι σε πολλές περιπτώσεις απαιτείται συνδυασμένη προσυναπτική δραστηριότητα και CB_1 ενεργοποίηση. Όπως περιγράφηκε σε συνάψεις διάμεσων νευρώνων – πυραμιδικών κυττάρων ιπποκάμπου, η προσυναπτική δραστηριότητα προκαλεί αύξηση Ca^{2+} και επακόλουθη ενεργοποίηση μιας ενεργοποιούμενης από Ca^{2+} φωσφατάσης, της καλσινευρίνης. Η μείωση της PKA δραστηριότητας από την ενεργοποίηση των CB_1 υποδοχέων οδηγεί την καλσινευρίνη σε μετατόπιση της δυναμικής ισορροπίας μεταξύ φωσφορυλίωσης και

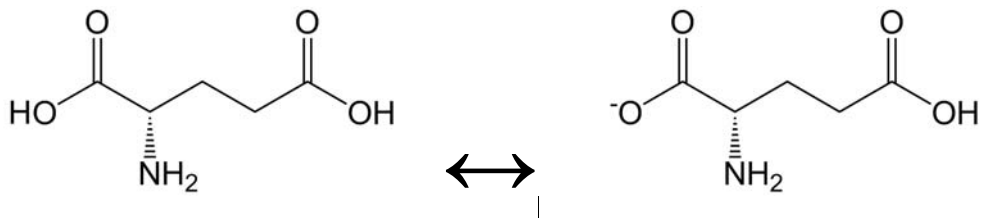
αποφωσφορυλίωσης προς την πλευρά της αποφωσφορυλίωσης. Η μείωση της φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών – στόχων προκαλεί καταστολή της συναπτικής διαβίβασης. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, οι προσυναπτικές απολήξεις δέχονται δύο διαφορετικά μηνύματα, ένα μετασυναπτικό (ενδοκανναβινοειδή) και ένα προσυναπτικό, τα οποία λαμβάνονται υπόψη για την επαγωγή LTD. Με τον τρόπο αυτό μόνο οι ενεργείς προσυναπτικές απολήξεις καταστέλλονται εκλεκτικά από τα ενδοκανναβινοειδή.

Γλουταμικό οξύ / γλουταμικό

Το γλουταμικό οξύ (glutamic acid) είναι ένα από τα 20 φυσιολογικά αμινοξέα, με μοριακό τύπο $C_5H_9NO_4$, χημικό τύπο όπως φαίνεται στο σχήμα 6 και μοριακό βάρος 147.1 g/mol. Το γλουταμικό οξύ είναι ένα από τα δύο αμινοξέα (το άλλο είναι το ασπαρτικό) που περιέχουν δύο καρβοξυλικές ομάδες και μία αμινομάδα (σχήμα 9). Η επιπλέον καρβοξυλική ομάδα είναι προσδεμένη στην πλάγια αλυσίδα της αμινομάδας και έχει την ιδιότητα να ιονίζεται αρνητικά, παράγοντας το ανιόν το οποίο είναι γνωστό ως γλουταμικό. Λόγω του γεγονότος ότι σε φυσιολογικές συνθήκες pH (7.35 με 7.45) το μόριο παίρνει την ιονισμένη μορφή του, ο όρος «γλουταμικό» έχει επικρατήσει του όρου «γλουταμικό οξύ».

Το γλουταμικό κατέχει κεντρικό ρόλο στη λειτουργία του εγκεφάλου. Θεωρείται ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής του ΚΝΣ, αφού καταλαμβάνει το 80-90% των συνόλου των εγκεφαλικών συνάψεων (Braitenberg 1998, Attwell & Laughlin 2001, Danbolt 2001).

Το γλουταμικό θεωρείται ένα μη-απαραίτητο αμινοξύ, αφού μπορεί να συντεθεί στον οργανισμό. Κύρια πηγή σύνθεσης του γλουταμικού είναι η γλυκόζη και το γλυκογόνο, μπορεί όμως να παραχθεί και από άλλα υποστρώματα που εισέρχονται στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων (κύκλος του Krebs), όπως και από το αμινοξύ γλουταμίνη, μέσω της δράσης του ενζύμου φωσφορική γλουταμινάση.



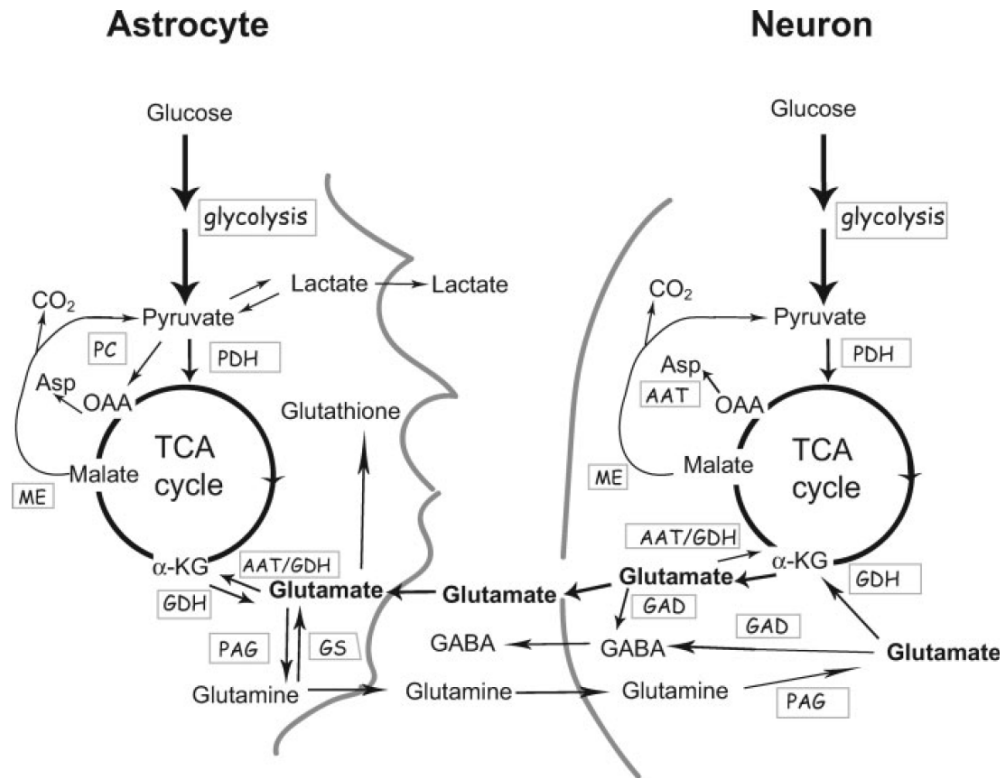
Σχήμα 9: Χημική δομή του γλουταμικού. Το γλουταμικό οξύ σε φυσιολογικές συνθήκες pH (7.35 – 7.45) ιονίζεται αρνητικά σε γλουταμικό

Σύνθεση και μεταβολισμός του γλουταμικού

Το γλουταμικό συντίθεται βασικά μέσω της γλυκόζης ή του γλυκογόνου στα αστροκύτταρα της νευρογλοίας (Gibbs et al, 2008). Τα αστροκύτταρα, σε αντίθεση με τους νευρώνες, έχουν την ικανότητα να καρβοξυλιώνουν το πυροσταφυλικό σε οξαλοξικό, μια αντίδραση που καταλύεται από την ειδική για τα αστροκύτταρα πυροσταφυλική καρβοξυλάση (Shank et al. 1985, Yu et al. 1983). Στη συνέχεια, το πυροσταφυλικό συνδέεται με ακετυλο-συνένζυμο-A (ακετυλο-CoA) και εισέρχεται στον κύκλο του Krebs. Πρόδρομο μόριο του γλουταμικού στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων είναι το α-κετογλουταρικό, το οποίο μετατρέπεται σε γλουταμικό με τη δράση της αμινοτρανσφεράσης του ασπαρτικού (Σχήμα 10). Το γλουταμικό στη συνέχεια μπορεί να επιστρέψει στον κύκλο του Krebs και να οξειδωθεί σε CO₂ και H₂O, μέσω μετατροπής σε α-κετογλουταρικό, μαλονικό και πυροσταφυλικό (Hertz & Hertz 2003, McKenna et al 1996, Yu et al 1982), ή να μεταρπει σε γλυκογόνο (Huang et al 1994, Schmoll et al 1995). Άλλοι μεταβολικοί δρόμοι για το γλουταμικό εμπεριέχουν τη μετατροπή του σε νευροδιαβιβαστές και μεταβολικούς παράγοντες, όπως το GABA και η γλουταθειόνη (Mc Kenna 2007). Η σύνθεση του γλουταμικού μάλιστα, μπορεί να προχωρά παράλληλα και σε διαφορετικό ρυθμό με την αποδόμησή του, με αποτέλεσμα τα επίπεδα του γλουταμικού να

αυξάνονται σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές και έπειτα να μειώνονται (Gibbs et al 2007, Hertz & Hertz 2003).

Ο ρόλος των αστροκυττάρων στο μεταβολισμό και την ομοιόσταση του γλουταμικού είναι κυρίαρχος. Εκτός από τη σύνθεση και την αποδόμηση του, μια άλλη, πολύ σημαντική λειτουργία των νευρογλοιακών αυτών κυττάρων είναι η επαναπρόσληψη των μορίων του γλουταμικού που εκλύονται στις συνάψεις κατά τη νευρωνική διαβίβαση (Danbolt 2001). Τα επίπεδα γλουταμικού στη σύναψη από χαμηλά ($\approx 1-10 \mu\text{M}$) που είναι στην τονική φάση, αυξάνονται δραματικά κατά τη νευρική ώση ($\approx 100-1000 \mu\text{M}$) και εναπόκειται στα αστροκύτταρα να απομακρύνουν τάχιστα την περισσή ποσότητα, η οποία σε αντίθετη περίπτωση θα καταστεί τοξική για τους νευρώνες. Το γλουταμικό επαναπροσλαμβάνεται στα αστροκύτταρα και στη συνέχεια κατά το 1/3 διασπάται οξειδωτικά παρέχοντας ενέργεια για το κύτταρο, ενώ κατά τα υπόλοιπα 2/3 μετατρέπεται σε γλουταμίνη (Hertz 2004) μέσω της ειδικής αστροκυτταρικής συνθετάσης της γλουταμίνης (Norenberg et Martinez-Hernandez 1979). Η γλουταμίνη έπειτα απελευθερώνεται και προσλαμβάνεται κυρίως από τους νευρώνες, όπου υδρολύεται από τη γλουταμινάση για να παραχθεί εκ νέου γλουταμικό στον λεγόμενο «κύκλο γλουταμικού-γλουταμίνης» (Σχήμα 10).



Σχήμα 10: Μεταβολισμός του γλουταμικού στο νευρικό σύστημα. Διακρίνεται χαρακτηριστικά ο κεντρικός ρόλος του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων στις μεταβολικές διαδικασίες και ο κύκλος γλουταμικού-γλουταμίνης μεταξύ νευρώνα και αστροκυττάρου.

Γλουτατεργικοί υποδοχείς

Ανάλογα με το μηχανισμό διέγερσης, διακρίνουμε δύο μεγάλες κατηγορίες γλουτατεργικών υποδοχέων, τους ιοντοτροπικούς και τους μεταβοτροπικούς.

Ιοντοτροπικοί γλουταματεργικοί υποδοχείς

Οι ιοντοτροπικοί γλουταματεργικοί υποδοχείς είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν ιοντικά κανάλια με εξαρτώμενη από ιοντικά προσδέματα κινητική. Ιοντοτροπικοί υποδοχείς εντοπίζονται στη μεγάλη πλειοψηφία των διεγερτικών συνάψεων του ΚΝΣ.

Οι τρεις κύριες κατηγορίες ιοντοτροπικών υποδοχέων πήραν τα ονόματά τους από τα ιοντικά προσδέματα που σχετίζονται με τη διέγερσή τους:

- α) NMDA – υποδοχέας** (διεγείρεται από το Ν-μεθυλο-D-ασπαρτικό οξύ)
- β) AMPA υποδοχέας** (διεγείρεται από το α-αμινο-3-υδροξυ-5-μεθυλο-4-ισοξαζολο-προπιονικό οξύ). Αρχικά ονομαζόταν υποδοχέας κισκαλικού
- γ) υποδοχέας καϊνικού** (διεγείρεται από το καϊνικό οξύ)

Η εκτεταμένη έρευνα έχει οδηγήσει τα τελευταία χρόνια στην ανακάλυψη πολλών νέων τύπων υποδοχέων και έτσι σήμερα αναγνωρίζουμε συνολικά 18 υπότυπους. Λόγω της ανακάλυψης πολλών νέων μορφών σε μικρό χρονικό διάστημα, η ονοματοδοσία τους δεν έγινε από την αρχή οργανωμένα· ωστόσο, σήμερα καταβάλλεται προσπάθεια να ακολουθηθεί ένας ενιαίος τρόπος ορισμού όλων των τύπων ιοντοτροπικών υποδοχέων, σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση Βασικών και Κλινικών Φαρμακολογικών Ονομασιών (IUFHAR Nomenclature, Collingridge et al 2009, Πίνακας 1)

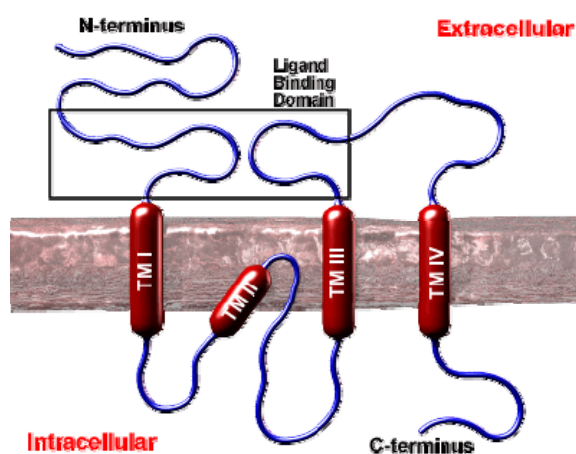
Όνομασία UPHAR	Σύμβολο HUGO	Συνήθεις ονομασίες	Οικογένεια υποδοχέα
GluA1	GRIA1	GluR1, GluRA	AMPA
GluA2	GRIA2	GluR2, GluRB	AMPA
GluA3	GRIA3	GluR3, GluRC	AMPA
GluA4	GRIA4	GluR4, GluRD	AMPA
GluK1	GRIK1	GluR5	Καϊνικού
GluK2	GRIK2	GluR6	Καϊνικού
GluK3	GRIK3	GluR7	Καϊνικού
GluK4	GRIK4	KA1	Καϊνικού
GluK5	GRIK5	KA2	Καϊνικού
GluN1	GRIN1	NMDAR1, NR1, GluR ϵ 1	NMDA
GluN2A	GRIN2A	NMDAR2A, NR2A, GluR ϵ 1	NMDA
GluN2B	GRIN2B	NMDAR2B, NR2B, GluR ϵ 2	NMDA
GluN2C	GRIN2C	NMDAR2C, NR2C, GluR ϵ 3	NMDA
GluN2D	GRIN2D	NMDAR2D, NR2D, GluR ϵ 4	NMDA
GluN3A	GRIN3A	NR3A	NMDA
GluN3B	GRIN3B	NR3B	NMDA
GluD1	GRID1	δ 1, GluR delta-1	delta
GluD2	GRID2	δ 2, GluR delta-2	delta

Πίνακας 1: Ιοντοτροπικοί γλουταματεργικοί υποδοχείς

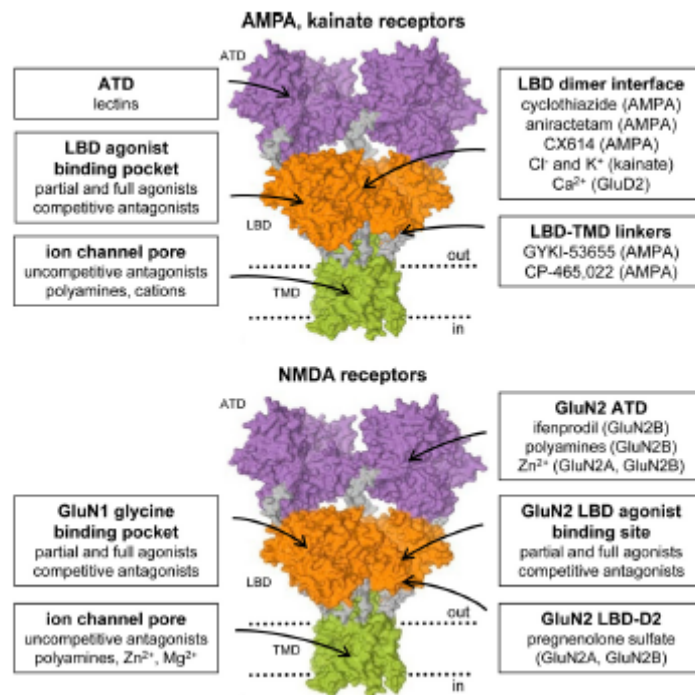
Οι ιοντοτροπικοί γλουταματεργικοί υποδοχείς είναι τετραμερή πρωτεϊνικά συμπλέγματα τα οποία αποτελούνται από 4 υπομονάδες που περιβάλλουν τον ιοντικό δίαυλο. Οι πρωτεϊνικές υπομονάδες κάθε συμπλέγματος ανήκουν αυστηρά σε μια κατηγορία υποδοχέων (NMDA, AMPA, καϊνικού). Κάθε υπομονάδα έχει 3 διαμεμβρανικές περιοχές και μια καμπύλη επανεισόδου (M2) που καταλήγει σε ένα καρβοξυ-τελικό άκρο που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (σχήμα 11). Η θέση του καρβοξυ-τελικού άκρου στο κυτταρόπλασμα είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς αλληλεπιδρά με ενδοκυττάριας κυκλοφορούσες ή τοποθετημένες σε σταθερή θέση πρωτεΐνες, οι οποίες ασκούν ρυθμιστικό ρόλο τόσο στη θέση του υποδοχέα στη μετασυναπτική μεμβράνη όσο και στον κύκλο της λειτουργίας του (Traynelis et al 2010). Η εξωτερική περιοχή σύνδεσης του υποδοχέα, σε όλους τους ιοντοτροπικούς υποδοχείς, έχει το σχήμα κελύφους, τα δύο μέρη του οποίου περιβάλλουν το μόριο του αγωνιστή, καθώς αυτός εισέρχεται και συνδέεται με συγκεκριμένες

περιοχές του υποδοχέα. Η σύνδεση του αγωνιστή προκαλεί κλείσιμο του κελύφους και περιστροφή των προτεϊνικών ελίκων της διαμεμβρανικής περιοχής, με αποτέλεσμα να ανοίξει ο διάυλος. Στους AMPA υποδοχείς, οι πλήρεις αγωνιστές προκαλούν περισσότερο «ερμητικό» κλείσιμο σε σχέση με τους μερικούς αγωνιστές (Jin et al 2003). Κάθε υπομονάδα με τετραμερή δομή τυπικά συνδέεται πάντα στον ίδιο αγωνιστή, οι NMDA υποδοχείς ωστόσο είναι μοναδικοί στο ότι απαιτείται σύνδεση και του γλουταμικού (στις υπομονάδες GluN2) όσο και της γλυκίνης ή της D-σερίνης (στις υπομονάδες GluN1), ώστε να ανοίξει ο διάυλος (Kleckner et al, 1988) (Σχήμα 12).

Το αμινο-τελικό άκρο του ιοντοτροπικού υποδοχέα επίσης διαμορφώνεται σε σχήμα κελύφους· στην περίπτωση αυτή όμως η σύνδεση γίνεται με ουσίες που ρυθμίζουν το άνοιγμα του διαύλου, παρά με αγωνιστές (Kumar et al 2009, Jin et al 2009, Karakas et al 2009) (Σχήμα 12).



Σχήμα 11: Τυπική δομή ιοντοτροπικού γλουταματεργικού υποδοχέα και η σύνδεσή του με την κυτταρική μεμβράνη



Σχήμα 12: Ιονοτροπικοί γλουταματεργικοί υποδοχείς και θέσεις σύνδεσης διαφορών προσδεμάτων (Προσαρμογή από Traynelis et al 2010).

Μεταβοτροπικοί γλουταματεργικοί υποδοχείς

Οι μεταβοτροπικοί γλουταματεργικοί υποδοχείς χαρακτηρίζονται από την ιδιότητά τους να συνδέονται με G-πρωτεΐνες και να τροποποιούν με τον τρόπο αυτό την καθυστερημένη συναπτική διαβίβαση μέσω κυκλώματος ενδοκυττάρων δευτέρων μηνυμάτων (Hollmann et Heinemann 1994, Nakanishi et al 1998).

Η δυνατότητα του γλουταμικού να ενεργοποιεί υποδοχείς που είναι συνδεδεμένοι σε ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες αποκαλύφθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του '80 σε καλλιέργειες ραβδωτού, με προκλητή σύνθεση και αύξηση της μονο-, δι- και τριφωσφορικής ινοσιτόλης (Sladeczek et al 1985). Τα αποτελέσματα αυτά επαναλήφθηκαν και σε άλλα πειράματα που ακολούθησαν για την επιβεβαίωση και περιγραφή των μεταβοτροπικών γλουταματεργικών υποδοχέων. Σήμερα, είναι γνωστοί 8 τύποι υποδοχέων, οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο της

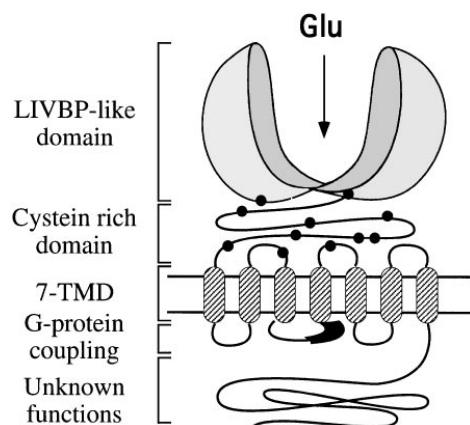
μοριακής κλωνοποίησης και καλούνται «μεταβοτροπικοί γλουταματεργικοί υποδοχείς 1 ως 8» (mGlu1 – mGlu8 ή mGluR1 – mGluR8). Οι 8 αυτοί μεταβοτροπικοί υποδοχείς ταξινομούνται σε 3 κατηγορίες, ανάλογα με τις ομοιότητες που παρουσιάζουν κατά πρώτο λόγο στην αλληλουχία των αμινοξέων τους, αλλά και στους μηχανισμούς μετάδοσης του σήματος και τη σχετιζόμενη φαρμακολογία τους (Πίνακας 2). Γενικά, θεωρείται ότι οι υποδοχείς της ίδιας υποομάδας παρουσιάζουν περίπου 75% ομολογία, ενώ υποδοχείς από διαφορετικές υποομάδες παρουσιάζουν ομολογία στα επίπεδα του 45% (Cohn et Pin 1997).

Η **ομάδα I** περιλαμβάνει τους υποδοχείς mGlu1 και mGlu5, οι οποίοι εξαρτώνται από τη φωσφοϊνοσιτιδική υδρόλυση και ενεργοποιούνται εκλεκτικά από την 3,5-διυδροξυ-φαινυλ-γλυκίνη (3,5-DHPG). Η **ομάδα II** περιλαμβάνει τους υποδοχείς mGlu2 και mGlu3, οι οποίοι έχουν ως εκλεκτικό αγωνιστή τον LY379268 και είναι αντασταλτικά συνδεδεμένοι με την αδενυλική κυκλάση. Η **ομάδα III** περιλαμβάνει τους υποδοχείς mGlu4, mGlu6, mGlu7 και mGlu8, οι οποίοι συνδέονται επίσης ανασταλτικά με την αδενυλική κυκλάση και ενεργοποιούνται από το 2-αμινο-4-φωσφονοβουτυρικό.

Τύπος υποδοχέα	Τρόπος ενεργοποίησης	Κατηγορία
mGlu1	3,5-διυδροξυ-φαινυλ-γλυκίνη (3,5-DHPG) φωσφοϊνοσιτιδική υδρόλυση	I
mGlu2	LY379268 Αδενυλική κυκλάση	II
mGlu3	LY379268 Αδενυλική κυκλάση	II
mGlu4	2-αμινο-4-φωσφονοβουτυρικό Αδενυλική κυκλάση	III
mGlu5	3,5-διυδροξυ-φαινυλ-γλυκίνη (3,5-DHPG) φωσφοϊνοσιτιδική υδρόλυση	I
mGlu6	2-αμινο-4-φωσφονοβουτυρικό Αδενυλική κυκλάση	III
mGlu7	2-αμινο-4-φωσφονοβουτυρικό Αδενυλική κυκλάση	III
mGlu8	2-αμινο-4-φωσφονοβουτυρικό Αδενυλική κυκλάση	III

Πίνακας 2: Μεταβοτροπικοί γλουταματεργικοί υποδοχείς ανάλογα με τον τύπο, την κατηγορία και τον τρόπο ενεργοποίησης

Η στερεοταξική δομή των μεταβοτροπικών υποδοχέων περιλαμβάνει μια ευμεγέθη εξωκυττάρια αμινο-τελική περιοχή, 3 εξωκυττάρια και 3 ενδοκυττάρια αγκύλες και μια κυτταροπλασματική καρβοξυ-τελική ουρά, που διαχωρίζονται από 7 υψηλά υδρόφοβες περιοχές, οι οποίες προσδένονται στην διπλή στιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης (Masu et al 1991) (σχήμα 13). Το σημείο πρόσδεσης του γλουταμικού βρίσκεται στο αμινο-τελικό κλάσμα του υποδοχέα (O'Hara et al. 1993, Okamoto et al. 1998, Jingami et al. 2003), ενώ οι ενδοκυττάρια περιοχές αλληλεπιδρούν με τις G-πρωτεΐνες προκειμένου να ενεργοποιηθούν οι διαδικασίες μετάδοσης του σήματος (Pin et al. 1994, Gomeza et al. 1996)



Σχήμα 13: Η δομή ενός μεταβοτροπικού γλουταματεργικού υποδοχέα (Προσαρμογή από Cohn et Pin 1997).

Αλληλεπιδράσεις μεταξύ κανναβινοειδών και γλουταμικού

Αλληλεπιδράσεις σε επίπεδο υποδοχέων

Μία από τις σημαντικές λειτουργίες των μεταβοτροπικών υποδοχέων του γλουταμικού είναι η ρύθμιση της συναπτικής νευροδιαβίβασης (Cohn et Pin 1997, Anwyl 1999). Για παράδειγμα, εκλεκτικοί αγωνιστές και για τις 3 κατηγορίες υποδοχέων αναστέλλουν τη γλουταματεργική διαβίβαση σε πολλές συνάψεις.

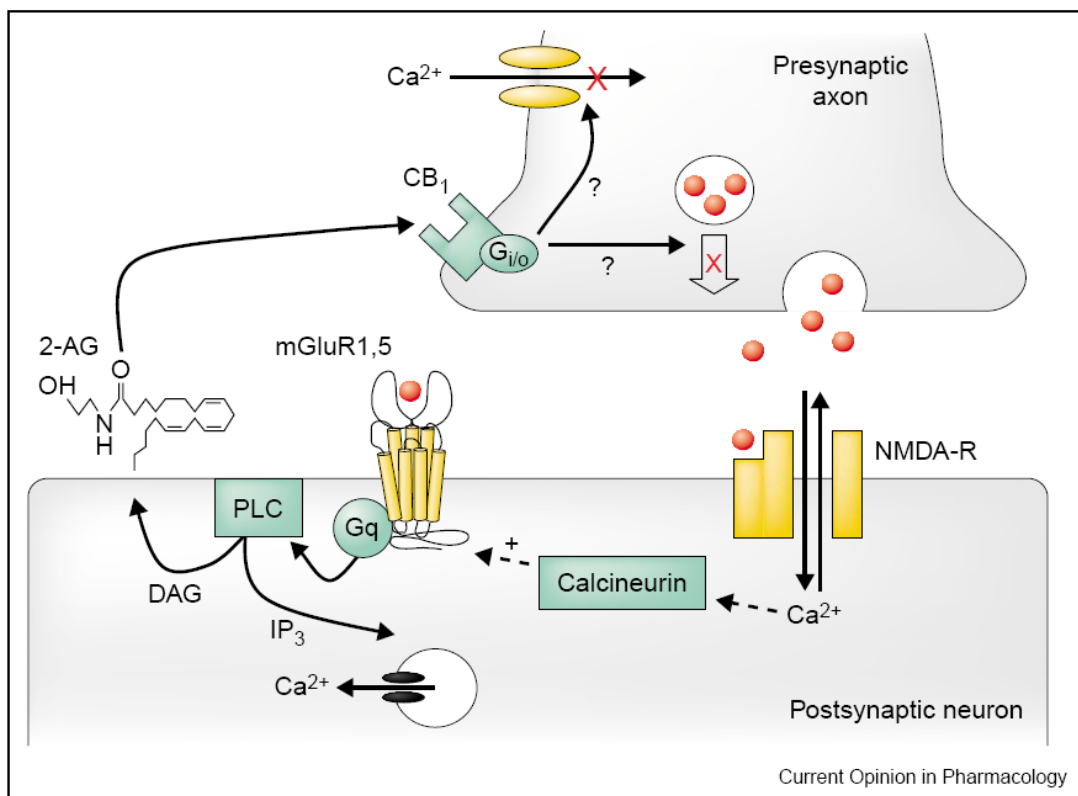
Στις οικογένειες μεταβοτροπικών υποδοχέων II και III, ο μηχανισμός με τον οποίο πραγματοποιείται η αναστολή είναι σχετικά απλός: Η διέγερση προσυναπτικών αυτοϋποδοχέων από το γλουταματεργικό αγωνιστή προκαλεί μείωση της συναπτικής διαβίβασης, μέσω ελάττωσης της εισόδου Ca^{++} στο κύτταρο από τους τασεοεξαρτώμενους διαύλους, είτε μέσω άμεσης διακοπής της λειτουργίας των συναπτικών κυστιδίων.

Για την κατηγορία I των μεταβοτροπικών υποδοχέων ωστόσο, τα πράγματα είναι πιο περίπλοκα: Εκλεκτικοί αγωνιστές, όπως η 3,5 DHPG (3,5-διυδροξυ-φαινυλ-γλυκίνη), προκαλούν επίσης μείωση της συναπτικής διαβίβασης, παρά την απουσία προσυναπτικών μεταβοτροπικών υποδοχέων (Doherty & Dingledine 1997). Στις περιπτώσεις αυτές, το παλίνδρομο μήνυμα που απαιτείται προς τον προσυναπτικό νευρώνα φαίνεται ότι δίνεται από ένα διαφορετικό νευροδιαβιβαστή, ο οποίος υποστηρίχθηκε ότι είναι ενδοκανναβινοειδές (Doherty & Dingledine 2003).

Πράγματι, η διέγερση των mGlu1 ή mGlu5 της κατηγορίας I, οδηγεί στην ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης (PLC), με αποτέλεσμα την παραγωγή ενδοκανναβινοειδούς ανανδαμιδίου ή 2-AG, το οποίο

ενεργοποιώντας τον προσυναπτικό CB₁ υποδοχέα, ελαττώνει τελικά τη συναπτική δραστηριότητα (σχήμα 14).

Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια με άλλα πειράματα, τα οποία κατέδειξαν την ύπαρξη, αποκλειστικά προσυναπτικά, CB₁ υποδοχέων, καθώς και το ρόλο τους στην παλίδρομη ρύθμιση mGlu1 και mGlu5 συνάψεων (Ohno-Shosaku et al 2002, Irving et al 2000, Katona et al 1999).



Σχήμα 14: Παλίνδρομη ρύθμιση της συναπτικής διέγερσης γλουταματεργικών μεταβοτροπικών υποδοχέων της κατηγορίας I, μέσω ενεργοποίησης του συστήματος των ενδοκανναβινοειδών και διέγερσης του CB₁ προσυναπτικού υποδοχέα (Προσαρμογή από Doherty et Dingledine 2003)

Αλληλεπιδράσεις σε επίπεδο εγκεφαλικών δομών

Η αναγνώριση του γλουταμικού ως του βασικού διεγερτικού νευροδιαβαστή του εγκεφάλου, ο οποίος εμπλέκεται σε διαδικασίες μάθησης και μνήμης μέσω μηχανισμών συναπτικής πλαστικότητας και ο εντοπισμός CB₁ υποδοχέων σε απολήξεις γλουταματεργικών νευρώνων (Katona et al 2006, Kawamura et al 2006) οδήγησε την έρευνα στην εντατικότερη διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του γλουταματεργικού και ενδοκανναβινοειδούς συστήματος σε διάφορες εγκεφαλικές περιοχές, όπως το ραβδωτό, ο επικλινής πυρήνας του διαφράγματος και ο εγκεφαλικός φλοιός.

Ραβδωτό (Striatum) και Επικλινής πυρήνας του Διαφράγματος (Nucleus Accumbens)

Το ραβδωτό, στη ραχιαία μοίρα του, δέχεται διεγερτικές γλουταματεργικές προβολές από δομές του εγκεφάλου όπως ο αισθητικοκινητικός φλοιός, ο θάλαμος και η αμυγδαλή, οι οποίες καταλήγουν στα μεσαία ακανθώδη κύτταρα (Van de Stelt & Di Marzo 2003). Το κοιλιακό ραβδωτό (επικλινής πυρήνας του διαφράγματος: Nucleus Accumbens, NAc) δέχεται επίσης γλουταματεργικές προβολές από τον προμεταιχμιακό φλοιό. Οι απολήξεις των γλουταματεργικών νευραξόνων είναι πλούσιες σε CB₁ υποδοχείς, οι οποίοι ρυθμίζουν παλίνδρομα τη συναπτική διαβίβαση. Στα μεσαία ακανθώδη κύτταρα του ραβδωτού καταλήγουν επίσης ανασταλτικές GABAεργικές προβολές καθώς και ντοπαμινεργικές προβολές από τη μέλαινα ουσία.

Οι CB₁ υποδοχείς θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ελάττωση των φλοιοραβδωτών διεγερτικών σημάτων (Gerdeman & Lovinger 2001) και στην εγκατάσταση μακροπρόθεσμης καταστολής της διέγερσης (LTD) (Gerdeman et al., 2002). Αντίθετα, η ενεργοποίηση

υποδοχέων TRPV1 ενισχύει τη γλουταματεργική λειτουργία (Musella et al 2009) μέσω προσυναπτικής ενεργοποίησης. Επομένως, οι υποδοχείς CB₁ και TRPV1 φαίνεται ότι ρυθμίζουν τη γλουταματεργική διαβίβαση στο ραβδωτό δρώντας σε αντίθετες κατευθύνσεις, αν και ο ρόλος των CB₁ παρουσιάζεται περισσότερο σημαντικός σε πειράματα με FAAH knockout μυς (Musella et al 2009). Επιπροσθέτως, οι φλοιικές γλουταματεργικές προβολές στο ραβδωτό ρυθμίζουν την απελευθέρωση ντοπαμίνης και αντιστρόφως· τα επίπεδα ντοπαμίνης φαίνεται ότι επηρεάζουν τη γλουταματεργική λειτουργία (Moss & Bolam 2008).

Η εξωγενής χορήγηση κανναβινοειδών όπως η Δ⁹-THC και το WIN 55,212-2 μειώνει τη γλουταματεργική νευροδιαβίβαση στο ραβδωτό και τον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος όπως έχει φανεί ξεκάθαρα από ανεξάρτητα πειράματα (Polissidis et al 2012, Galanopoulos et al 2011, Sano et al 2008, Adermark et al 2009, Cannizzaro et al 2006, Pintor et al 2006, Fujiwara & Egashira 2004).

Φλοιός του εγκεφάλου (Cortex)

Παρά το γεγονός ότι η νευρωνική πλαστικότητα που εξαρτάται από τη γλουταματεργική διαβίβαση και ρυθμίζεται από τα κανναβινοειδή έχει μελετηθεί αρκετά, οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση γλουταμικού και κανναβινοειδών παραμένουν εν πολλοίς αδιευκρίνιστοι (El Khoury et al 2012). Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται κυρίως στην πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ συστημάτων νευροδιαβιβαστών στην περιοχή του φλοιού. Η λειτουργία των διάμεσων GABAεργικών νευρώνων, για παράδειγμα, επηρεάζει άμεσα τη γλουταματεργική πλαστικότητα στο φλοιό. Η διεγερτική και η ανασταλτική δραστηριότητα φαίνεται ότι λειτουργούν σε μια δυναμική ισορροπία, ώστε να ρυθμίζονται και να βελτιστοποιούνται οι εκτελεστικές λειτουργίες με τρόπο που εξαρτάται άμεσα από το σκοπό (Ali 2009). Το κύκλωμα της ντοπαμίνης επίσης ρυθμίζει ποικιλοτρόπως τις διεγερτικές και τις ανασταλτικές συνάψεις (Tseng and O'Donnell 2004). Ενδιαφέρον

παρουσιάζει το γεγονός ότι υπάρχουν διαφορετικές κατηγορίες διαμέσων φλοιικών νευρώνων που είναι υπεύθυνοι για εξειδικευμένες λειτουργίες και στους οποίους εντοπίζονται εκλεκτικά CB₁ υποδοχείς (Mendez and Bacci 2011). Ως συνέπεια αυτού, η πλαστικότητα των ενδοκανναβινοειδών φάνηκε σε μερικά αλλά όχι σε όλα τα δίκτυα των διαμέσων νευρώνων (Galarreta et al. 2008, Hill et al. 2007).

Εκτός από τους CB₁, οι TRPV1 υποδοχείς εκφράζονται επίσης στο φλοιό, όπου εντοπίζονται σε πυραμιδικούς νευρώνες (Toth et al., 2005). Πρόσφατα έχει δειχτεί ότι οι CB₁ και οι TRPV1 υποδοχείς συνδέονται με μείωση και αύξηση αντίστοιχα της απελευθέρωσης γλουταμικού από τη γλοία (Bari et al 2011), υπονοώντας πιθανή εμπλοκή των TRPV1 υποδοχέων στη ρύθμιση της δραστηριότητας και της πλαστικότητας του φλοιού.

Η εξωγενής χορήγηση Δ⁹-THC ή WIN 55,212-2 σε πειραματόζωα ή σε καλλιέργειες φλοιικών κυττάρων, είτε συστηματικά (ενδοπεριτοναϊκά) είτε με τοπική έγχυση στο φλοιό, έχει δείξει ότι προκαλεί αύξηση των εξωκυττάρων επιπέδων γλουταμικού (Polissidis et al 2012, Galanopoulos et al 2011, Ferraro et al 2009, Antonelli et al 2006, Antonelli et al 2004, Pistis et al 2002, Tomasini et al 2002, Ferraro et al 2001). Η προγεννητική έκθεση σε κανναβινοειδή, μετά από χορήγηση κανναβινοειδών σε εγκυμονούντα θήλεα πειραματόζωα, έδειξε ότι προκαλεί μείωση των βασικών επιπέδων γλουταματεργικής διαβίβασης, χωρίς να αναστέλλεται η αύξηση των επιπέδων του εξωκυττάρου γλουταμικού που προκαλείται από την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση κανναβινοειδών μετά τη γέννηση (Antonelli et al 2006, Antonelli et al 2004).

Όσον αφορά στην αλληλεπίδραση κανναβινοειδών και γλουταμικού σε ανθρώπους, σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 17 εφήβους χρήστες μαρικουάνας, διαπιστώθηκε, με τεχνική μαγνητικής φασματοσκοπίας, μείωση των επιπέδων γλουταμικού και N-ακετυλ-ασπαρτικού στην έλικα του προσαγωγίου (Prescot et al 2011).

Γνωστικές λειτουργίες – Μνήμη και μάθηση

Οι γνωστικές λειτουργίες συνιστούν ένα σύνολο ανώτερων νοητικών λειτουργιών που χαρακτηρίζουν το ανθρώπινο είδος. Στις γνωστικές λειτουργίες μεταξύ άλλων ανήκουν η μνήμη, η ικανότητα του λόγου (language), η προσοχή, οι εκτελεστικές λειτουργίες (σύνθετες λειτουργίες που οδηγούν σε προσαρμοσμένη απάντηση σε μία καινούρια κατάσταση) (Lezak et al, 2004), η ικανότητα επιτέλεσης πράξεων (ευπραξία, praxic abilities) και η οπτικοχωρική ικανότητα-ικανότητα προσανατολισμού στο χώρο και εύρεσης του ορθού δρόμου.

Η **σκέψη** συνιστά μια στοχο-κατευθυνόμενη ροή ιδεών, συμβόλων και συνειρμών, που ξεκινά από ένα πρόβλημα ή έργο και οδηγεί σε ένα ρεαλιστικά κατευθυνόμενο συμπέρασμα (Kaplan et al, 1994). Η σκέψη αποτελεί μια σύνθετη νοητική διεργασία που συνδυάζει πολλές «πρωτοβάθμιες» γνωστικές λειτουργίες (ικανότητα λόγου, μνήμη, προσοχή, εκτελεστικές λειτουργίες, κα). Οι διαταραχές της σκέψης εμφανίζονται στη σχιζοφρένεια και τις άλλες ψυχικές διαταραχές και διακρίνονται σε: α) διαταραχές της δομής, β) διαταραχές της ροής, γ) διαταραχές του περιεχομένου και δ) διαταραχές του ελέγχου της σκέψης.

Κεντρικό ρόλο στις γνωστικές λειτουργίες κατέχει η **μνήμη**, η οποία εκφράζει την κωδικοποίηση, αποθήκευση και ανάκληση γνώσεων και πληροφοριών. **Μάθηση** είναι η διαδικασία μέσα από την οποία προσλαμβάνονται οι πληροφορίες που απαρτίζουν τη μνήμη. Η μελέτη μοντέλων μνήμης και μάθησης αποτελεί το κυριάρχο εργαλείο αξιολόγησης των γνωστικών λειτουργιών σε πειραματόζωα.

Η **μνήμη**, με βάση τις διαδικασίες αποθήκευσης και ανάκλησης, μπορεί να διακριθεί σε δύο μορφές:

Α) Άδηλη (μη δηλωτική ή υπονοούμενη) μνήμη, η οποία ανακαλείται με μη συνειδητό τρόπο. Τυπικά παραδείγματα άδηλης μνήμης αποτελούν η απόκτηση κινητικών ή αντιληπτικών ικανοτήτων με

τη μάθηση καθώς και η εκμάθηση συγκεκριμένων κανόνων και διαδικασιών. Η εγκατάσταση της άδηλης μνήμης γίνεται αργά και προοδευτικά, μέσα από την επανάληψη και την εμπειρία. Η άδηλη μνήμη θεωρείται περισσότερο συμπαγής και στενά συνδεδεμένη με τις συνθήκες του αρχικού ερεθίσματος και συνεπώς λιγότερο ευπρόσβλητη (Kandel et al 2012).

Η άδηλη μνήμη μπορεί με τη σειρά της να ταξινομηθεί σε δύο μορφές:

A1) Μη συνειρμική άδηλη μνήμη, η οποία αναφέρεται στην εκμάθηση των συνεπειών ενός μονήρους ερεθίσματος. Η μη συνειρμική άδηλη μνήμη χαρακτηρίζεται κυρίως από 2 τύπους:

A1.i) Εθισμός, ο οποίος αντιπροσωπεύει την μείωση της απάντησης σε ένα ερέθισμα που επαναλαμβάνεται. Τυπικό παράδειγμα εθισμού αποτελεί η αντίδραση (ξάφνιασμα) των ανθρώπων όταν έρθουν για πρώτη φορά σε επαφή με έναν κρότο, όπως συμβαίνει κατά την έναρξη εορτασμού ενός γεγονότος με βεγγαλικά, η οποία σταδιακά μειώνεται καθώς εξοικειώνονται στο ακουστικό αυτό ερέθισμα.

A1.ii) Ευαισθητοποίηση (ή ψευδοεξαρτημένη μάθηση), η οποία συνίσταται σε αύξηση της απάντησης σε ευρύ φάσμα ερεθισμάτων, μετά από την εφαρμογή ενός έντονου ή επώδυνου ερεθίσματος. Για παράδειγμα, ένα «ευαισθητοποιημένο» ζώο μπορεί να αντιδράσει υπερβολικά σε ένα ήπιο απτικό ή ακουστικό ερέθισμα, αν προηγουμένως έχει δεχτεί ένα αλγογόνο τσίμπημα. Επιπλέον, το ερέθισμα ευαισθητοποίησης δύναται να αντιστρέψει τα αποτελέσματα του εθισμού, μια διαδικασία που καλείται **απεθισμός**. Έτσι, στην περίπτωση που η αντίδραση ξαφνιάσματος, όπως περιγράφηκε παραπάνω, έχει μειωθεί λόγω εθισμού, μπορεί να επανέλθει στα αρχικά επίπεδα, αν το υποκείμενο δεχτεί ένα ισχυρό τσίμπημα.

A2) Συνειρμική άδηλη μνήμη, στην οποία η μάθηση συντελείται μέσω σύζευξης δύο ερεθισμάτων (**κλασική εξαρτημένη μάθηση**) ή ενός

ερεθίσματος και μιας συμπεριφοράς (**συντελεστική εξαρτημένη μάθηση**)

A2_i) Η κλασική εξαρτημένη μάθηση βασίζεται στη σύζευξη δύο ερεθισμάτων, ενός *εξαρτημένου* και ενός *μη εξαρτημένου* ερεθίσματος. Το *εξαρτημένο* ερέθισμα, το οποίο μπορεί να είναι φωτεινό, ηχητικό, απτικό, αρχικά δεν προκαλεί εμφανή απάντηση, ή προκαλεί ασθενή αντίδραση, άσχετη με την απάντηση που τελικά θα μάθει το υποκείμενο. Αντίθετα, το *μη εξαρτημένο* ερέθισμα, όπως η χορήγηση τροφής ή μια ηλεκτρική εκκένωση, συνδέεται με την εμφάνιση εμφανούς, ισχυρής και σταθερής απάντησης, που είναι η πρόκληση σιελόρροιας και η απόσυρση του άκρου αντίστοιχα. Οι αντιδράσεις σε *μη εξαρτημένα* ερεθίσματα είναι ενστικτώδεις και δεν απαιτούν μάθηση. Όταν ωστόσο ένα *εξαρτημένο* ακολουθείται από ένα *μη εξαρτημένο* ερέθισμα, το *εξαρτημένο* ερέθισμα θα οδηγήσει σταδιακά σε μια νέα ή διαφορετική απάντηση η οποία καλείται *εξαρτημένη απάντηση*.

A2_i) Η συντελεστική εξαρτημένη μάθηση βασίζεται στη σύζευξη ερεθίσματος – συμπεριφοράς. Πειραματικά παρατηρείται όταν μία, μέσα από μια ποικιλία συμπεριφορών τις οποίες αναμένεται να εκδηλώσει το ζώο, συνδέεται χρονικά με ένα μη εξαρτημένο ερέθισμα, οπότε το υποκείμενο μαθαίνει να αναπαράγει τη συμπεριφορά, αν πρόκειται για ερέθισμα ενίσχυσης, όπως η τροφή, ή αντίθετα να την αποφεύγει, αν πρόκειται για ερέθισμα αποστροφής, όπως η ηλεκτρική εκκένωση. Για παράδειγμα, ένα πειραματόζωο που περιφέρεται σε έναν κλωβό, όπου βρίσκεται ένας μοχλός η πίεση του οποίου χορηγεί τροφή, μέσω συντελεστικής εξαρτημένης μάθησης οδηγείται σταδιακά σε περισσότερα πατήματα του μοχλού.

Οι διαφορετικές μορφές άδηλες μνήμης σχετίζονται με αντίστοιχες περιοχές του εγκεφάλου. Για παράδειγμα, η άδηλη μνήμη η οποία διαμορφώνεται από συναισθηματικά ερεθίσματα, όπως ο φόβος, συνδέεται με περιοχές του εγκεφάλου όπως η **αμυγδαλή**. Η εγκατάσταση μνήμης διά της συντελεστικής εξαρτημένης μάθησης

διενεργείται μέσω του **ραβδωτού σώματος** και της **παρεγκεφαλίδας**. Οι μνημονικές πληροφορίες που σχετίζονται με τους μηχανισμούς της κλασικής εξαρτημένης μάθησης, του εθισμού και της ευαισθητοποίησης, εμπλέκουν τις κινητικές και αισθητικές οδούς μάθησης, με τη συμμετοχή περιοχών όπως ο **προμετωπιαίος φλοιός** και ο **ιππόκαμπος**.

Β) Έκδηλη (δηλωτική ή εκπεφρασμένη) μνήμη, η οποία περιλαμβάνει γεγονότα και πληροφορίες που είναι δυνατό να ανακληθούν με συνειδητό τρόπο. Η έκδηλη μνήμη είναι πολυσύνθετη και χαρακτηρίζεται από μεγάλη μεταβλητότητα (Kandel et al 2012). Μπορεί να ταξινομηθεί στους εξής τύπους ανάλογα με το περιεχόμενο και το χρόνο εγκατάστασης:

B1) Βραχυπρόθεσμη μνήμη και μνήμη εργασίας (Short-term and working memory)

Μια πολύ σημαντική ιδιότητα της μνήμης είναι η ικανότητα δέσμευσης νέων πληροφοριών για μικρό χρονικό διάστημα (συνήθως μέχρι 30 sec) ώστε αυτές να είναι δυνατόν να επεξεργαστούν περαιτέρω. Η προσωρινή διατήρηση των πληροφοριών αυτών επιτυγχάνεται μέσω της **βραχυπρόθεσμης μνήμης (short-term memory = STM)**.

Η ενεργητική επεξεργασία των νέων πληροφοριών γίνεται με τη **μνήμη εργασίας (working memory = WM)**. Η μνήμη εργασίας αντιπροσωπεύει την ικανότητα ταυτόχρονης προώθησης και αποθήκευσης πληροφοριών (Daneman & Carpenter 1980). Συνεπώς, η μνήμη εργασίας θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει υψηλότερου επιπέδου γνωστικές διεργασίες και αξιολογείται με περισσότερες σύνθετες δοκιμασίες σε σύγκριση με τη **βραχυπρόθεσμη μνήμη** (Unsworth et al, 2009).

Η **μνήμη εργασίας ή «ενεργός» μνήμη (working memory)** απαρτίζεται από 4 επιμέρους συστήματα (Baddeley and Hitch, 1974), (Baddeley 1986, 2000):

i) Το κεντρικό εκτελεστικό σύστημα ή σύστημα ελέγχου της προσοχής (ΚΕΣ), το οποίο εδράζεται στον **προμετωπιαίο φλοιό** και εστιάζει ενεργητικά σε συγκεκριμένα συμβάντα του περιβάλλοντος. Το κεντρικό εκτελεστικό σύστημα έχει περιορισμένη χωρητικότητα και περιλαμβάνει συνήθως μέχρι 12 θέματα.

Το κεντρικό εκτελεστικό σύστημα ρυθμίζει τη ροή προς τα δύο υποσυστήματα που είναι υπεύθυνα για την προσωρινή διατήρηση των πληροφοριών, δηλαδή:

ii) το κύκλωμα σύνθεσης του λόγου (articulation loop) στο οποίο διατηρούνται μνήμες λέξεων και αριθμών μέσω της φωνητικής ή μη φωνητικής επανάληψης με τη συμμετοχή των περιοχών Broca και κατώτερου αριστερού βρεγματικού φλοιού αντίστοιχα. Για παράδειγμα, μέσω της συνεχούς επανάληψης ενός τηλεφωνικού αριθμού και της καταχώρησής του στο συγκεκριμένο κύκλωμα, καθίσταται εφικτή η συγκράτησή του στη μνήμη (εργασίας), μέχρι τη στιγμή της τηλεφωνικής κλήσης.

iii) το οπτικοχωρικό σχεδιαστήριο (visuospatial sketchpad) στο οποίο αποθηκεύονται προσωρινά, επίσης μέσω της επανάληψης, τα οπτικά χαρακτηριστικά και η θέση των αντικειμένων, με τη συμμετοχή του εξωτερικού ραβδωτού και περιοχών του βρεγματικού φλοιού αντίστοιχα.

iv) ο επεισοδιακός ρυθμιστικός μηχανισμός (episodic buffer), ο οποίος προστέθηκε αργότερα στα προηγούμενα δύο συστήματα (Baddeley 2000) προκειμένου να υποστηριχθεί η σύνδεση πληροφοριών για την ενσωμάτωση αυτοβιογραφικών γεγονότων. Ο επεισοδιακός ρυθμιστικός μηχανισμός έχει μικρή χωρητικότητα και πολυδιάστατη δυναμική κωδικοποίησης (xψφ)

Τα υποσυστήματα της **ενεργού μνήμης** που δέχονται πληροφορίες από το κεντρικό εκτελεστικό σύστημα συνιστούν τη **βραχυπρόθεσμη μνήμη**, με τρόπο που πολλοί ερευνητές έχουν υποστηρίξει την απλή σχέση: $WM = ΚΕΣ + STM$ (Colom et al, 2006). Άλλοι ωστόσο πιστεύουν

ότι τα δύο είδη αυτά μνήμης είναι δύσκολο και πρακτικά αδύνατο να διαχωριστούν (Unsworth & Engle, 2007).

Οι πληροφορίες που προωθούνται μέσα από τα δύο βασικά συστήματα ενεργού μνήμης διά της επανάληψης, είναι δυνατό να καταλήξουν και να καταχωρηθούν τελικά στη **μακροπρόθεσμη μνήμη (long-term memory)**.

B2) Η Μακροπρόθεσμη μνήμη (long-term memory = LTM) αναφέρεται στις πληροφορίες που διατηρούνται από μερικές μέρες μέχρι και πολλά χρόνια, συμπεριλαμβανομένων και των αναμνήσεων της παιδικής ηλικίας. Η μακροπρόθεσμη μνήμη χαρακτηρίζεται από τέσσερα λειτουργικά στάδια:

Η **κωδικοποίηση** των νέων πληροφοριών συνίσταται στον τρόπο με τον οποίο οι πληροφορίες αυτές εντοπίζονται και προσλαμβάνονται από το άτομο κατά την πρώτη επαφή. Η έκταση και η ποιότητα της κωδικοποίησης κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην επίτευξη της κατά το δυνατό καλύτερης μετέπειτα ανάμνησης. Αυτό πραγματοποιείται όταν οι νέες πληροφορίες είναι ικανές να προσελκύσουν το ενδιαφέρον, ώστε το άτομο να επιδεικνύει τη δέουσα προσοχή και να καταβάλει προσπάθεια να συνδέσει την πληροφορία με ήδη εγκατεστημένες εμπειρίες και γνώσεις.

Η **σταθεροποίηση** των πληροφοριών, που συντελείται με διαδικασίες μετατροπής των εύθραυστων νεοαποκτηθέντων στοιχείων σε μορφές κατάλληλες για μακροπρόθεσμη αποθήκευση.

Η **αποθήκευση** των πληροφοριών σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές, όπου μπορούν να διατηρηθούν για πολλά χρόνια. Η μακροπρόθεσμη αποθήκευση φαίνεται να έχει απεριόριστη χωρητικότητα, σε αντίθεση με τη βραχυπρόθεσμη μνήμη, της οποίας η χωρητικότητα είναι πολύ περιορισμένη.

Τέλος, η **ανάκληση** αναφέρεται σε διαδικασίες που επιτρέπουν τη συνειδητή επαναφορά της αποθηκευμένης πληροφορίας. Η ανάκληση

προϋποθέτει συνδυασμούς διαφορετικών πληροφοριών οι οποίες βρίσκονται αποθηκευμένες σε ξεχωριστές περιοχές.

Η ανάκληση αποθηκευμένων πληροφοριών καθίσταται περισσότερο αποτελεσματική όταν πραγματοποιείται στο ίδιο λειτουργικό περιβάλλον όπου αποκτήθηκαν οι πληροφορίες και υποβοηθείται από νύξεις (cues) οι οποίες υπήρχαν επίσης κατά τη διαδικασία της μάθησης. Η ανάκληση των πληροφοριών εξαρτάται άμεσα από τη λειτουργία της βραχυπρόθεσμης μνήμης.

Δύο είναι τα βασικά είδη της μακροπρόθεσμης μνήμης, **η σημασιολογική μνήμη (semantic memory)** και **η επεισοδιακή (αυτοβιογραφική) μνήμη** (Tulving et al 1972):

B2*i*) Η σημασιολογική μνήμη (semantic memory) περιλαμβάνει τη γνώση αντικειμένων, γεγονότων και αφηρημένων εννοιών καθώς και τη σημασία των λέξεων. Οι ονομασίες των αντικειμένων, οι ορισμοί των συμβόλων και η λεκτική συνοχή ανήκουν επίσης στη σημασιολογική μνήμη (Kandell et al 2012).

Η σημασιολογική μνήμη χαρακτηρίζεται από μοναδική οργάνωση και αρχιτεκτονική. Παρουσιάζει ιδιαίτερη ευελιξία και εμπλουτίζεται με τους συνειρμούς. Πάνω στην αρχική γνώση ενός αντικειμένου, επιπροστίθενται με το χρόνο πληροφορίες που αφορούν στις ιδιότητές του, τη σχέση του με άλλα αντικείμενα και καταστάσεις, κτλ. Για το λόγο αυτό, η σημασιολογική μνήμη δεν έχει αυστηρά καθορισμένη περιοχή αποθήκευσης, αλλά απαρτίζεται από, εξειδικευμένες πληροφορίες, οι οποίες εγγράφονται σε διαφορετικές λειτουργικές περιοχές του φλοιού.

B2*ii*) Η επεισοδιακή (αυτοβιογραφική) μνήμη αναφέρεται στα γεγονότα (επεισόδια) που το κάθε άτομο έχει βιώσει, τα οποία τοποθετούνται σε συγκεκριμένη διάσταση του χώρου και του χρόνου (Joubert 2007).

Τα γεγονότα που συγκροτούν την αυτοβιογραφική μνήμη φαίνεται ότι αποθηκεύονται σε συνειρμικές περιοχές των **μετωπιαίων λοβών**. Αυτές

οι **προμετωπίαιες περιοχές** συνεργάζονται με άλλες περιοχές του νεοφλοιού για την ανάκληση του χρόνου και του χώρου όπου ένα συγκεκριμένο γεγονός έλαβε χώρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η **επεισοδιακή (αυτοβιογραφική) μνήμη** εμπεριέχει και διαστάσεις πρόσφατης- βραχυπρόθεσμης μνήμης γεγονός που εκτιμάται από το διάστημα που διαμεσολαβείται μεταξύ της ύπαρξης των γεγονότων (επεισοδίων) και της ανάκλησής τους.

Γνωστικές λειτουργίες και κανναβινοειδή

Η επίδραση των κανναβινοειδών στις γνωστικές λειτουργίες έχει αναγνωριστεί τουλάχιστον από τη δεκαετία του '70 (Tart 1970). Τόσο η οξεία, όσο και η χρόνια χρήση κάνναβης συνδέονται με δοσο-εξαρτώμενες διαταραχές στην προσοχή, στην μνήμη εργασίας, στην εκμάθηση λέξεων και στη μακροπρόθεσμη μνήμη σε πειραματόζωα (Castellano et al 2003, Zanettini et al 2011) και σε ανθρώπους (Solowij et al 2008, Bolla et al 2002). Εκτός από την ελάττωση της ικανότητας μάθησης, οι βαρείς χρήστες κάνναβης παρουσιάζουν μειωμένη νοητική ευελιξία, αυξημένη εμμονή και μειωμένη ικανότητα διατήρησης της προσοχής (Lundqvist 2005). Η μακρόχρονη χρήση συνοδεύεται από διαταραχές της μνήμης και της προσοχής οι οποίες πιθανώς να καθίστανται σοβαρότερες όσο η χρήση εξακολουθεί για περισσότερα έτη, είναι δυνατό ωστόσο συχνά να είναι αναστρέψιμες, αν και σε μερικές περιπτώσεις τα συμπτώματα επιμένουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα μετά τη διακοπή (Crean et al 2011, Solowij et al 2002).

Η επίδραση των κανναβινοειδών πάνω στις γνωστικές λειτουργίες έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα με πολλά συμπεριφορικά μοντέλα πειραματοζώων, τα οποία, αξιολογούν διάφορους τομείς των διαδικασιών μνήμης και μάθησης όπως είναι η μνήμη εργασίας (working memory) και τα στάδια της μακροπρόθεσμης μνήμης (long-term memory): απόκτηση-κωδικοποίηση, εγκατάσταση, αποθήκευση και ανάκληση.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης τα τελευταία χρόνια οι μελέτες των κανναβινοειδών πάνω σε διαδικασίες που σχετίζονται με τη λήθη-απώλεια μνήμης, μέσα από δοκιμασίες που αξιολογούν τη μείωση/εξάλειψη «κεκτημένων» ή ήδη μαθημένων συμπεριφορών.

Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα, εκτός από τις γνωστικές λειτουργίες, αναμφίβολα σχετίζεται με πολλές συμπεριφορικές εκδηλώσεις και παθοφυσιολογικές διαδικασίες, μερικές από τις οποίες είναι η κινητικότητα, η πρόσληψη τροφής, η ανταμοιβή, ο πόνος και συναισθηματικές αντιδράσεις όπως η αγωνία, το άγχος και ο φόβος. Οι επιδράσεις των κανναβινοειδών στις λειτουργίες αυτές πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όταν αξιολογούνται διαδικασίες μνήμης και μάθησης, καθώς είναι δυνατό να παρεμβάλλονται και να επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα της δοκιμασίας (Zanettini et al 2011). Για παράδειγμα, μια συμπεριφορά μειωμένης αναγνώρισης νέου αντικειμένου μετά από χορήγηση κανναβινοειδών μπορεί να υποδηλώνει ελαττωμένη μάθηση, θα πρέπει ωστόσο να αποκλειστεί η πιθανότητα να οφείλεται σε μειωμένη κινητικότητα ή σε αύξηση του άγχους. Επίσης, σε δοκιμασίες καθυστερημένης αντιστοίχισης οι οποίες περιλαμβάνουν πρόσληψη τροφής, θα πρέπει να διευκρινιστεί αν το αποτέλεσμα οφείλεται στη μάθηση ή στην κινητοποίηση από το ενισχυτικό ερέθισμα της τροφής.

Μνήμη εργασίας και κανναβινοειδή - Πειραματικές δοκιμασίες

Η μνήμη εργασίας είναι μια γνωστική λειτουργία της οποίας η προσβολή είναι ιδιαίτερα εμφανής σε χρήστες κάνναβης, όπως και η πρόσφατη επεισοδιακή μνήμη, με καταγραφή χαμηλών επιδόσεων στις αντίστοιχες δοκιμασίες (Ranganathan & D'Souza 2006). Στα πειραματόζωα, οι δοκιμασίες που έχουν χρησιμοποιηθεί αξιολογούν σχεδόν αποκλειστικά «χωρικού τύπου» εκμάθηση (spatial learning), ενώ τα αποτελέσματα που έχουν δημοσιευτεί για τη βραχυπρόθεσμη μνήμη

είναι επίσης περισσότερο σαφή σε σχέση με τα αντίστοιχα των δοκιμασιών μακροπρόθεσμης μνήμης.

Δοκιμασία ακτινωτού λαβυρίνθου

Η κλασική εκδοχή της δοκιμασίας περιλαμβάνει έναν οκτάκτινο λαβύρινθο, σε κάθε άκρο του οποίου είναι τοποθετημένη μια ποσότητα τροφής. Η επαναληπτική είσοδος του πειραματόζωου στον ίδιο βραχίονα εκφράζει λάθη μνήμης εργασίας. Η συστηματική χορήγηση Δ⁹-THC ή των CB₁ αγωνιστών WIN 55,212-2 ή CP-55,940 σε τρωκτικά, αυξάνει τον αριθμό των λαθών (Molina-Holgado et al 1993, Lichtman et al 1995, Lichtman & Martin 1996, Mishima et al 2001). Είναι αξιοσημείωτο ότι, οι Nakamura et al (1991) βρήκαν ότι η Δ⁹-THC, σε χορήγηση 30 min πριν από τη δοκιμασία, ελαττώνει την επίδοση των ζώων στην περίπτωση που παρεμβληθεί ένα πολύ σύντομο διάλειμμα (5 sec) μεταξύ 4^{ου} και 5^{ου} βραχίονα, όχι όμως αν το διάλειμμα είναι μεγαλύτερο (1h). Το εύρημα αυτό σαφώς υποδηλώνει ένα περισσότερο εμφανές αποτέλεσμα στη μνήμη εργασίας σε σύγκριση με τη μακροπρόθεσμη μνήμη. Ωστόσο, σε μια παρόμοια δοκιμασία οι Silva de Melo et al (2005) κατέλειξαν σε αντίθετα αποτελέσματα, με τη Δ⁹-THC σε συστηματική ή σε εντός του έσω προμετωπιαίου λοβού χορήγηση, να προσβάλλει εκλεκτικά τη μακροπρόθεσμη μνήμη.

Δοκιμασία λαβυρίνθου σε σχήμα T

Η δοκιμασία αυτή επίσης αξιολογεί χωρική μνήμη εργασίας, με την τοποθέτηση του πειραματόζωου σε λαβύρινθο που διαθέτει δύο βραχίονες, εκ των οποίων ο ένας, συγκεκριμένα εκείνος όπου δεν είχε εισέλθει το ζώο στην προηγούμενη τοποθέτηση, περιέχει τροφή. Η συστηματική χορήγηση Δ⁹-THC (Jentsch et al 1998, Nava et al 2001, Varvel et al 2005) ή η εντός του ιπποκάμπου χορήγηση WIN 55,212-2

(Suenaga et al 2008) σε τρωκτικά, βλάπτει τη μνήμη εργασίας, αποτέλεσμα που αντιστρέφεται από CB₁ ανταγωνιστές.

Δοκιμασία υδάτινου λαβυρίνθου

Η δοκιμασία υδάτινου λαβυρίνθου, στην τυπική εκδοχή της περιλαμβάνει εκμάθηση ανεύρεσης μιας πλατφόρμας από τα πειραματόζωα, η οποία είναι μη ορατή και βρίσκεται σε ένα άκρο του λαβυρίνθου ο οποίος περιέχει θολό νερό. Τα λάθη «μνήμης εργασίας» αντιπροσωπεύουν τις διαδοχικές εσφαλμένες προσπάθειες του ζώου να εισέλθει σε βραχίονα όπου δεν βρίσκεται η πλατφόρμα (Pitsikas & Algeri, 1992). Η δοκιμασία υδάτινου λαβυρίνθου δε χρησιμοποιεί την τροφή ως ερέθισμα για την είσοδο του ζώου στους βραχίονες και αυτό θεωρείται συγκριτικό πλεονέκτημα σε σχέση με τον απλό ακτινωτό λαβύρινθο και τον λαβύρινθο σε σχήμα T, αφού δεν παρεμβάλλεται το κίνητρο ανταμοιβής από τη λήψη τροφής (Pitsikas & Algeri, 1992).

Σε μια περισσότερο εξειδικευμένη για τη μελέτη της μνήμης εργασίας εκδοχή, η πλατφόρμα αλλάζει θέση κάθε μέρα, ενώ το πειραματόζωο, μετά την ανεύρεση της πλατφόρμας, τοποθετείται πολύ σύντομα εκ νέου στο λαβύρινθο. Η Δ⁹-THC, όταν χορηγηθεί πριν από τη δοκιμασία, επιδρά αρνητικά στη μνήμη εργασίας με CB₁-εξαρτώμενο τρόπο, χωρίς να επηρεάζει την κινητικότητα (Varvel et al 2001).

Δοκιμασία καθυστερημένης αντιστοίχισης (ή μη-αντιστοίχισης) [Delayed-Match (or non-Match) to-Sample Instrumental Task: DMTS, DNMS]

Η κλασική εκδοχή αυτής της δοκιμασίας έχει ως εξής: Το πειραματόζωο αρχικά εκτίθεται σε δύο όμοιους μοχλούς ο ένας εκ των οποίων εκτείνεται ως δείγμα. Αν το ζώο πιέσει το μοχλό-δείγμα, εκείνος συρρικνώνεται όπως πριν. Αφού μεσολαβήσει ένα χρονικό διάστημα, οι δύο μοχλοί εκτείνονται ταυτόχρονα, ενώ το πειραματόζωο λαμβάνει τροφή αν πιέσει τον αντίστοιχο (ή τον αναντίστοιχο) μοχλό του δείγματος

(Deadwyler et al 1996, Mallet & Beninger 1998). Η δοκιμασία αυτή έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλη έκταση για πειράματα μνήμης εργασίας σε τρωκτικά και σε πρωτεύοντα, με κυμαινόμενο χρονικό διάστημα μεταξύ των φάσεων που περιγράφηκαν. Η χορήγηση Δ⁹-THC, AEA ή WIN 55,212-2 πριν τη δοκιμασία μειώνει την επίδοση (Aigner et al 1988, Heyser et al 1993, Mallet & Beninger 1998, Hampson & Deadwyler 2000, Deadwyler et al 2007, Goonawardena et al 2010, Panlilio et al 2011) σε τρωκτικά και σε πιθήκους με τρόπο που φαίνεται να εξαρτάται από τη διάρκεια του ενδιάμεσου διαλείμματος. Το εύρημα αυτό συνοδεύεται από ελάττωση της ηλεκτροφυσιολογικής δραστηριότητας των πυραμιδικών νευρώνων του ιπποκάμπου. Η προχορήγηση SR141716A (1,5 mg/kg) επαναφέρει τη δοκιμασία και την ηλεκτρική δραστηριότητα των πυραμιδικών νευρώνων σε φυσιολογικά επίπεδα, ενώ η χορήγηση μόνου του SR141716A σε υψηλές δόσεις (IP, 2mg/ml) δύναται να οδηγήσει σε ενίσχυση της μνήμης εργασίας (Deadwyler & Hampson 2008). Το τελευταίο αποτέλεσμα ωστόσο, δεν επαναλαμβάνεται σταθερά από το Εργαστήριο που αναφέρθηκε για πρώτη φορά και δεν επιβεβαιώθηκε από τη μελέτη των Mallet & Beninger (1998) όπου χρησιμοποιήθηκε το SR141716A στην ίδια δόση, πιθανώς λόγω «φαινομένου οροφής», οπότε ίσως απαιτείται επιμήκυνση του ενδιάμεσου χρονικού διαστήματος.

Μακροπρόθεσμη/βραχυπρόθεσμη μνήμη και κανναβινοειδή- Πειραματικές δοκιμασίες

Μελέτες ανοικτού πεδίου

A. Δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου

Η κλασική δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου περιλαμβάνει δύο φάσεις, όπου στην πρώτη φάση το πειραματόζωο εκτίθεται σε ένα αντικείμενο και στη δεύτερη αντικρύζει το αντικείμενο αυτό μαζί με ένα νέο αντικείμενο· ο χρόνος που δαπανά στην εξερεύνηση του νέου αντικειμένου σε σχέση με το «παλιό» εκφράζει ένα δείκτη μνήμης. Η συστηματική ή εντός του υποκάμπου, οξεία ή επαναλαμβανόμενη, χορήγηση Δ⁹-THC ή WIN 55,212-2 οδήγησε σε ελάττωση της αναγνώρισης νέου αντικειμένου σε επίμυες (Barna et al 2007, Quinn et al 2008, Schneider et al 2008). Σε μια άλλη μελέτη ωστόσο, η οξεία συστηματική χορήγηση Δ⁹-THC δεν επηρέασε τη δοκιμασία σε ενήλικους επίμυες (Ciccocioppo et al 2002). Η διενέργεια της αντίστοιχης δοκιμασίας σε CB₁-knockout ζώα οδήγησε σε επίταση της μνήμης (Maccarone et al, 2002, Reibaud et al 1999).

Μια εκδοχή της δοκιμασίας αναγνώρισης αντικειμένου εστιάζει στη χωρική μνήμη, με την τοποθέτηση δύο αντικειμένων κατά την πρώτη φάση και διατήρηση των ίδιων αντικειμένων στη δεύτερη φάση, με τοποθέτηση όμως του ενός από τα δύο σε διαφορετική θέση. Οι Suenaga και Ichitani (2008) βρήκαν ότι, η τοπική χορήγηση WIN 55,212-2 (1-2μg/πλευρά στον υποκάμφο, 10 min πριν την τελική έκθεση στα αντικείμενα), δεν επηρέασε τη μνήμη στην κλασική δοκιμασία, αλλά ελάττωσε τη χωρική μνήμη στην αντίστοιχη εκδοχή του πειράματος.

B. Δοκιμασία κοινωνικής αναγνώρισης

Η δοκιμασία κοινωνικής αναγνώρισης είναι παρόμοια με τη δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου, αλλά χρησιμοποιεί conspecifics, πχ μέσω αναγνώρισης οικείων οσμών. Μια τυπική δοκιμασία αξιολογεί την τάση ηλικιωμένων τρωκτικών να εξερευνούν μη οικεία νεαρά άτομα που βρέθηκαν στο χώρο τους, στα οποία αφιερώνουν σταδιακά λιγότερο χρόνο. Σε πειράματα με σχετικά μακρά μεσοδιαστήματα (15-30min), η χορήγηση WIN 55,212-2 ελαττώνει τη μάθηση με CB₁-εξαρτώμενο τρόπο (Schneider & Koch 2002, Schneider et al 2008). Ο CB₁ ανταγωνιστής SR141716A όχι μόνο αναστέλλει την προσβολή της μνήμης, αλλά την ενισχύει επίσης (Terranova et al 1996).

Γ. Δοκιμασία εξοικείωσης σε νέο περιβάλλον

Η δοκιμασία αυτή βασίζεται στην παρατήρηση ότι τα τρωκτικά εμφανίζουν έντονη κινητική δραστηριότητα όταν βρίσκονται σε νέο περιβάλλον, η οποία σταδιακά μειώνεται λόγω της εξοικείωσής τους στο χώρο που τοποθετούνται. Η κινητικότητα αυτή μπορεί να αξιολογηθεί με τις παραμέτρους συνολικής οριζόντιας απόστασης και κάθετων ανορθώσεων (Mogensen et al 2003). Οι Degroot et al (2005) βρήκαν ότι, αν υποβληθούν CB₁ knockout μυσ στη δοκιμασία αυτή, εμφανίζουν μεγαλύτερη εξοικείωση από τα «άγριου τύπου» ζώα.

Μελέτες «χωρικής» μνήμης

Δοκιμασία ακτινωτού λαβυρίνθου

Η δοκιμασία ακτινωτού λαβυρίνθου, σε μια τροποποιημένη της μορφή, εστιάζει περισσότερο στη μακροπρόθεσμη μνήμη, με την απομάκρυνση του πειραματοζώου από το λαβύρινθο μετά την είσοδό του στον έβδομο βραχίονα και την επανατοποθέτησή του μετά από ένα κυμαινόμενο χρονικό διάστημα (Lichtman 2000). Ο CB₁ ανταγωνιστής

SR141716A, σε δόση 3 mg/kg πριν την πρώτη τοποθέτηση στον λαβύρινθο, ελαττώνει τα λάθη μετά από χρονικό διάστημα 6h (Lichtman 2000), όχι όμως αν δοθεί μετά την πρώτη τοποθέτηση (Wise et al 2007) ή πριν τη δεύτερη τοποθέτηση (Lichtman 2000), υπονοώντας ότι το SR141716A ενισχύει το στάδιο της απόκτησης, όχι όμως και τη σταθεροποίηση ή την ανάκληση. Εντούτοις, σε άλλες μελέτες, η ενίσχυση του CB₁ ανταγωνιστή SR141716A επιβεβαιώνεται όχι μόνο στο στάδιο της απόκτησης αλλά και της σταθεροποίησης της μνήμης (Wolf & Leander 2003, Wise et al 2008).

Δοκιμασία υδάτινου λαβυρίνθου

Η απόκτηση μακροπρόθεσμης μνήμης (αναφορικής μνήμης: reference memory) με τη διαδικασία του υδάτινου λαβυρίνθου αξιολογείται με βάση τη μείωση της συνολικής διαδρομής που διανύει το ζώο ή το συνολικό χρόνο μέχρι να φτάσει στην πλατφόρμα. Η οξεία συστηματική χορήγηση Δ⁹-THC (8 mg/kg ip), πριν τη φάση εκπαίδευσης, διαταράσσει την απόκτηση νέας πληροφορίας χωρίς να επηρεάζει την κινητικότητα. Το αποτέλεσμα αυτό αναστρέφεται από προχορήγηση του CB₁ ανταγωνιστή SR141716A (DaSilva & Takahashi 2002). Προβλήματα στην εκμάθηση του χώρου έχουν επίσης αναφερθεί σε επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε επαναληπτικά Δ⁹-THC (Moore et al. 2010) ή οξέως Δ⁸-THC (Diana et al 2003), ή συνθετικός αγωνιστής όπως το HU-210, όχι όμως και η ναμπιλόνη (Diana et al 2003). Ωστόσο, στα πειράματα αυτά δε μελετήθηκε το πιθανό αποτέλεσμα από τον αποκλεισμό των CB₁ υποδοχέων. Ένα άλλο συνθετικό κανναβινοειδές, το WIN 55,212-2 σε δόσεις 1 και 3 mg/kg, έδειξε ότι μπορεί να μειώσει την απόκτηση νέας πληροφορίας και μνήμης, αποτέλεσμα το οποίο δε φαίνεται να αντιστρέφεται από τους CB₁ ανταγωνιστές, υπονοώντας ότι το WIN 55,212-2 μπορεί να προσβάλλει τη μνήμη με περισσότερους από έναν μηχανισμούς (Robinson et al 2010).

Η δοκιμασία του υδάτινου λαβυρίνθου έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της Δ⁹-THC στη διαδικασία ανάκλησης των μνημονικών εντυπώσεων. Για το σκοπό αυτό, πειραματόζωα τα οποία έχουν ήδη φτάσει σε ένα επίπεδο εκπαίδευσης, υποβάλλονται σε χορήγηση κανναβινοειδούς πριν από την εκτέλεση του πειράματος. Δύο εργαστήρια ανακοίνωσαν ότι, η Δ⁹-THC, σε δόσεις που ήταν αναμενόμενο να επηρεάσουν την απόκτηση της νέας πληροφορίας, δεν προσέβαλαν την ανάκληση της μνήμης στο μοντέλο του υδάτινου λαβυρίνθου (Mishima et al 2001, Varvel et al 2001, 2007). Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν την άποψη ότι, η αναφορική μνήμη, εφόσον εδραιωθεί, δεν είναι πλέον διαθέσιμη για τροποποιήσεις από τα κανναβινοειδή.

Νευροβιολογικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην εγκατάσταση Μάθησης και Μνήμης. Ο ρόλος των κανναβινοειδών

Στα κυκλώματα των νευρικών κυττάρων, η αποθήκευση της μνήμης καθορίζεται από τις εξαρτώμενες από τη δραστηριότητα τροποποιήσεις της συναπτικής διαβίβασης, όπως η **μακροπρόθεσμη ενίσχυση της συναπτικής διαβίβασης (Long-Term Potentiation: LTP)** και η **μακροπρόθεσμη καταστολή της συναπτικής διαβίβασης (Long-Term Depression: LTD)**, που αποτελούν τις δύο κύριες μορφές συναπτικής πλαστικότητας του εγκεφάλου. Η εγκατάσταση τόσο της LTP όσο και της LTD βασίζεται στο γεγονός ότι μια βραχεία περίοδος συναπτικής δραστηριότητας (είτε υψηλής είτε χαμηλής συχνότητας ερεθισμού) δύναται να οδηγήσει σε μόνιμες μεταβολές της συναπτικής διαβίβασης, οι οποίες μπορούν να διατηρηθούν για τουλάχιστον μερικές ώρες ή περισσότερο.

Η μοναδική ιδιότητα της συναπτικής πλαστικότητας ώθησε τους επιστήμονες από παλαιά στην υπόθεση ότι οι LTP και LTD αποτελούν το κυτταρικό υπόστρωμα της μάθησης (Bliss & Gardner-Medwin 1973, Bliss & Lomo 1973). Με βάση την υπόθεση αυτή, οι ερευνητικές προσπάθειες εστιάστηκαν εντατικά στην επιβεβαίωση της λειτουργίας τέτοιων μηχανισμών κατά τη διάρκεια των διαδικασιών μνήμης και

μάθησης· αποδείχτηκε ωστόσο εξαιρετικά δύσκολη η άμεση συσχέτιση εγκατάστασης LTP και LTD με κλασικές δοκιμασίες μάθησης και εκπαίδευσης (Akirav 2011).

Οι μηχανισμοί συναπτικής πλαστικότητας έχουν μελετηθεί στον ιππόκαμπο, περισσότερο από κάθε άλλη περιοχή. Οι Schaffer-CA1 συνάψεις του ιπποκάμπου αποτελούν το μοντέλο στο οποίο έχουν διεξαχθεί οι περισσότερες μελέτες, καθώς είναι γνωστός ο ρόλος της CA1 περιοχής στη χωρική μνήμη (Behr et al 2009). Οι LTP και LTD θεωρείται ότι εμπλέκονται στην εγκατάσταση μνήμης μέσω των γλουταματεργικών συνάψεων του ιπποκάμπου. Τα κανναβινοειδή φαίνεται ότι δρουν μειώνοντας την απελευθέρωση γλουταμικού σε επίπεδα χαμηλότερα από εκείνα που απαιτούνται για την ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων και την επακόλουθη επαγωγή LTP ή LTD (Shen et al 1996, Misner & Sullivan 1999). Οι CB₁ υποδοχείς επίσης, είναι ικανοί να ρυθμίζουν τόσο την ανασταλτική όσο και τη διεγερτική συναπτική διαβίβαση στον ιππόκαμπο και συνεπώς να ασκούν υψηλό έλεγχο της συναπτικής πλαστικότητας.

Η ενεργοποίηση των κανναβινεργικών υποδοχέων αναστέλλει την επαγωγή LTP και LTD σε τομές ιπποκάμπου, όπως έχει φανεί σε πειράματα που έχουν χρησιμοποιήσει τα κανναβινοειδή Δ⁹-THC, HU-210, WIN 55,212-2, 2-AG και ανανδαμίδιο (Nowicky et al 1987, Collins et al 1994, 1995, Terranova et al 1995, Misner & Sullivan 1999). Οι δράσεις αυτές αντιστρέφονται με τη χορήγηση ενός CB₁ ανταγωνιστή, όπως το SR141716A. Σε οξέως αναισθητοποιημένους επίμυες, επίσης έχει βρεθεί ότι η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του CB₁ αγωνιστή WIN 55,212-2 και του CB₁ ανταγωνιστή AM251 εμποδίζει την εγκατάσταση LTP χωρίς να επηρεάζει ωστόσο την LTD (Abush & Akirav 2010). Ελάττωση της LTP από τη χορήγηση AM251 έχει βρεθεί και από τους de Oliveira Alvares et al (2006) σε τομές ιπποκάμπου. Σε άλλα πειράματα ωστόσο, ο ανταγωνισμός των CB₁ υποδοχέων οδήγησε σε ενίσχυση της LTP (Slanina et al 2005) όπως επίσης και η μελέτη CB₁ knockout μυών (Bohme et al 2000), σε συμφωνία με την συντριπτική πλειοψηφία των

μελετών, οι οποίες διαπιστώνουν ελάττωση της LTP από τα κανναβινοειδή με CB₁ εξαρτώμενο τρόπο. Οι διαφορές αυτές αποδίδονται κυρίως σε μεθοδολογικές διαφορές μεταξύ των πειραμάτων.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Τα ερωτήματα της παρούσας μελέτης συνδέονται με τη σχετικά πρόσφατη ανακάλυψη του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος και το ανανεωμένο ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για τις θεραπευτικές ιδιότητες των κανναβινοειδών. Οι δυνητικές χρήσεις των κανναβινοειδών για θεραπευτικούς σκοπούς προς το παρόν περιορίζονται σημαντικά λόγω των ανεπιθύμητων ενεργειών τους, κυρίως από την ψυχική σφαίρα. Οι ψυχοτρόπες ιδιότητες των κανναβινοειδών έχουν μελετηθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια· οι γνώσεις μας ωστόσο για την επίδραση των ουσιών αυτών στο φάσμα των γνωστικών λειτουργιών και των νευροβιολογικών συστημάτων που σχετίζονται με αυτές είναι ακόμα ελάχιστες.

Ο **σκοπός** της παρούσας εργασίας αφορά στη μελέτη συγκεκριμένων συμπεριφορικών και νευροχημικών μεταβλητών μετά από τη χορήγηση κανναβινοειδών. Ειδικότερα μελετήθηκαν οι επιδράσεις των αγωνιστών των CB1 υποδοχέων των κανναβινοειδών σε λειτουργίες μνήμης και μάθησης και στο γλουταματεργικό σύστημα.

Μελέτες κινητικότητας της ερευνητικής μας ομάδας έχουν δείξει ότι η χορήγηση των αγωνιστών των κανναβινοειδών, Δ⁹-THC και WIN 55,212-2, προκαλεί ένα διφασικό μοντέλο συμπεριφοράς (Polissidis et al, 2009; 2011). Ειδικότερα, μετά από εξέταση μιας ευρείας δοσολογικής κλίμακας αναδείχθηκε ότι οι μικρές δόσεις, Δ⁹-THC και WIN 55,212-2 προκαλούν υπερκινητικότητα ενώ οι μεγαλύτερες δόσεις, προκαλούν υποκινητικότητα. Για την προσέγγιση συμπεριφορικών δοκιμασιών που σχετίζονται με τις ευαίσθητες διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης, χρησιμοποιήθηκαν κατά κανόνα συγκριτικά μικρότερες δόσεις του WIN 55,212-2, οι οποίες δεν αναμένεται να προκαλέσουν υποκινητικότητα - καταστολή.

Νευροχημικές μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας έχουν ήδη δείξει την αλληλεπίδραση του ντοπαμινεργικού συστήματος με το σύστημα των

κανναβινοειδών (Polissidis et al, 2011, 2012). Λαμβάνοντας υπόψιν ότι το γλουταμικό είναι ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής του ΚΝΣ ο οποίος εμπλέκεται σε διαδικασίες που σχετίζονται με τη μνήμη και τη μάθηση και αλληλεπιδρά με άλλα νευροδιαβιβαστικά συστήματα, στη παρούσα εργασία επίσης μελετήσαμε την επίδραση των WIN 55,212-2 και Δ⁹-THC στο γλουταματεργικό σύστημα σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές.

Σε όλα τα συμπεριφορικά πειράματα καθώς και στα νευροχημικά, χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας των CB₁ υποδοχέων SR 141716A, μόνος και σε συνδυασμό με τα χορηγούμενα κανναβινοειδή, προκειμένου να διαπιστωθεί αν η όποια αποδειχθείσα δράση των τελευταίων διαμεσολαβείται μέσω των υποδοχέων CB₁.

Το **αντικείμενο** της διδακτορικής διατριβής αφορά στη μελέτη :

A) της επίδρασης των αγωνιστών των CB₁ υποδοχέων, σε συμπεριφορικές μεταβλητές χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα πειραματικά μοντέλα μνήμης και μάθησης.

B) των μεταβολών που προκαλεί η χορήγηση των αγωνιστών των CB₁ υποδοχέων στη γλουταματεργική λειτουργία σε περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος όπως το ραβδωτό σώμα, ο επικλινής πυρήνας του διαφράγματος και ο προμετωπιαίος φλοιός.

Οι ειδικότεροι **στόχοι** της διδακτορικής διατριβής είναι:

A) Συμπεριφορική προσέγγιση διαδικασιών μνήμης και μάθησης

A1) η παρουσίαση της μεταβολής που προκαλεί η χορήγηση WIN 55,212-2 στην κινητικότητα των πειραματοζώων σε ανοιχτό πεδίο.

A2) η επίδραση της χορήγησης WIN 55,212-2 στη μάθηση «**Λόγω εξοικείωσης σε νέο περιβάλλον**», χρησιμοποιώντας μία συσκευή ανοικτού κλωβού κινητικότητας.

A3) η μελέτη των πιθανών μεταβολών που προκαλεί η χορήγηση WIN 55,212-2 στη μη-χωρική μνήμη των πειραματοζώων μέσω της χρήσης του μοντέλου: «**αναγνώρισης νέου αντικειμένου**».

A4) η μελέτη της επίδρασης του WIN 55,212-2 στη συμπεριφορά των πειραματοζώων κατά τη δοκιμασία του “**ακτινωτού υδάτινου λαβυρίνθου**”, η οποία ελέγχει παραμέτρους χωρικής, αναφορικής και ενεργού μνήμης.

Σε όλες τις συμπεριφορικές δοκιμασίες, ελέγχθηκε με χρήση ανταγωνιστή (**SR141716A**), αν οι μεταβολές που διαπιστώθηκαν διενεργούνται μέσω του υποδοχέα CB₁ των κανναβινοειδών.

B) Προσέγγιση του γλουταματεργικού συστήματος

B1) Η δόσο-εξαρτώμενη επίδραση της χορήγησης του κανναβινοειδούς **Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλη (THC)** και του αγωνιστή των CB₁ υποδοχέων, **WIN 55,212-2** στη ιστική συγκέντρωση του γλουταμικού στις εγκεφαλικές περιοχές: ραβδωτό σώμα, επικλινή πυρήνα του διαφράγματος, προμετωπιαίο φλοιό, αμυγδαλή και ιππόκαμπος (*ex vivo* μελέτες).

B2) Η *in vivo* δράση του CB₁ αγωνιστή **WIN 55,212-2** στην εξωκυττάρια συγκέντρωση του γλουταμικού στις εγκεφαλικές περιοχές: ραβδωτό σώμα, επικλινή πυρήνα του διαφράγματος και προμετωπιαίο φλοιό. Ακολούθησε η μελέτη της διαφοροποίησης της έκλυσης του γλουταμικού μετά από συγχορήγηση του CB₁ ανταγωνιστή, **SR141716A** με τον CB₁ αγωνιστή, **WIN 55,212-2** στις ίδιες περιοχές.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Πειραματόζωα

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί επίμυες της σειράς Sprague-Dawley, ηλικίας 2,5 με 3 μηνών και βάρους 250-300 g, προερχόμενοι από το Ινστιτούτο Pasteur (Εικόνα 1). Οι επίμυες παρέμεναν για εγκλιματισμό στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας τουλάχιστον μία εβδομάδα πριν την έναρξη των πειραματικών διαδικασιών. Διαβίωναν στο στάβλο πειραματοζώων του εργαστηρίου με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (22 ± 2 °C) και κύκλου φωτισμού (12 h φως και 12 h σκοτάδι, με την έναρξη της φωτεινής περιόδου στις 07.00 π.μ.) σε ομάδες των 6 ζώων ανά κλωβό, ο οποίος ήταν κατασκευασμένος από Plexiglas με διαστάσεις 60x39x19 cm. Τα πειραματόζωα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και ζωοτροφή εμπορίου. Όλα τα πειράματα συμπεριφοράς διεξήχθησαν σε σταθερή θερμοκρασία, κατά τη διάρκεια της φωτεινής περιόδου του κύκλου φωτισμού και καθημερινά ξεκινούσαν μια ώρα μετά την έναρξη της φωτεινής περιόδου ενώ ολοκληρώνονταν τουλάχιστον μια ώρα πριν την έναρξη της σκοτεινής φάσης.



Εικόνα 1: Επίμυς Sprague-Dawley

Όλα τα πειραματόζωα υποβάλλονταν σε καθημερινή διαδικασία εξοικείωσης με τον ερευνητή διάρκειας περίπου 5 λεπτών, για χρονικό διάστημα 3-4 ημερών πριν την έναρξη των πειραματικών διαδικασιών. Επίσης, πριν από κάθε πειραματικό χειρισμό τα πειραματόζωα υποβάλλονταν σε διαδικασία εξοικείωσης με το χώρο διεξαγωγής των πειραμάτων για περίπου 40 λεπτά.

ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

A. Μελέτη συμπεριφοράς ανοικτού πεδίου

Το συγκεκριμένο πειραματικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της κινητικής δραστηριότητας μετά από τη χορήγηση κανναβινοειδών.

Κατά την εφαρμογή αυτής της μεθόδου, όλα τα πειραματόζωα, όπως ήδη αναφέρθηκε, καταρχήν εξοικειώθηκαν με το χώρο διεξαγωγής των πειραμάτων. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ένα διαφανή κλωβό ανοικτού πεδίου, μια κυβική (40 x 40 x 40 cm) διάταξη από Plexiglas.

Η καταγραφή της κινητικότητας έγινε με αυτόματο ηλεκτρονικό σύστημα (ENV515, Activity Monitor, version 5, Med Associates Inc., USA) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Πειραματική διάταξη του πρότυπου μέτρησης της κινητικής δραστηριότητας σε κλωβό με φωτοκύτταρα (ENV515, Activity Monitor, version 5, Med Associates). Ο επίμυς τη στιγμή της λήψης εκδηλώνει κάθετη κινητικότητα (ανόρθωση).

Το συγκεκριμένο πρόγραμμα παρέχει αυτοματοποιημένα, με τη χρήση ενός μεγάλου αριθμού φωτοκυττάρων σε 2 σειρές (μία χαμηλά προς το δάπεδο και μία πιο ψηλά, για να μπορούν να καταγράφονται οι κατακόρυφες κινήσεις), μια σειρά καταγραφών σε χρονική σειρά, που απαρτίζονται από διάφορους συμπεριφορικούς δείκτες, όπως συχνότητα εμφάνισης κάθετης κινητικότητας/ανορθώσεις, διάρκεια κάθετης κινητικότητας, απόσταση λόγω οριζόντιας κινητικότητας, διάρκεια οριζόντιας κινητικότητας, διάρκεια απραξίας, διάρκεια στερεοτυπικής

απόκριση κ.α. (Pollisidis et al 2009, 2010, 2012). Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης μελέτης χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες α) του αριθμού ανορθώσεων (vertical counts), ο οποίος εκφράζει την κατακόρυφη δραστηριότητα και β) της συνολικής απόστασης που διανύθηκε (ambulatory distance), ο οποίος αντανakλά την οριζόντια δραστηριότητα.

Μια ομάδα πειραματοζώων (n=100) χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της κινητικότητας σε κλωβό ανοικτού πεδίου μετά από χορήγηση αγωνιστών των κανναβινοειδών. Εκτιμώντας τη διφασική δράση των κανναβινοειδών στην κινητική συμπεριφορά (διεγερτική στις μικρές δόσεις και κατασταλτική στις υψηλές δόσεις) επιλέχθηκαν αντίστοιχες δόσεις αντιπροσωπευτικές για τις υπόλοιπες συμπεριφορικές και νευροχημικές προσεγγίσεις

Πρωτόκολλο εκτίμησης κινητικής δραστηριότητας

Χορήγηση	Δόσεις
έκδοχο/WIN 55,212-2	0.03, 0.1 και 0.3 mg/kg (i.p.)
SR 141716A /έκδοχο	0.03 mg/kg (i.p.)
SR 141716A/WIN 55,212-2	0.03 και 0.3mg/kg (i.p.)
έκδοχο/έκδοχο	

B. Εφαρμογή του πειραματικού μοντέλου “μάθησης λόγω εξοικείωσης σε νέο περιβάλλον”

Αυτό το μοντέλο πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της «μη-συνειρμικής» (non-associative) μνήμης και μάθησης καθώς και για την εκτίμηση της διατήρησης αυτής της μάθησης σε συνθήκες εξοικείωσης σε νέο περιβάλλον (Degroot et al 2005, Mogensen et al, 2003). Η λογική του μοντέλου βασίζεται στην παρατήρηση ότι, καθώς τα ζώα εξοικειώνονται σε ένα καινούριο περιβάλλον, η κινητική τους

δραστηριότητα σταδιακά μειώνεται. Συνεπώς, η εξοικείωση διαπιστώνεται και αξιολογείται μέσω της καταγραφής της κινητικότητας των πειραματοζώων.

Για τα πειράματα εξοικείωσης σε νέο περιβάλλον χρησιμοποιήθηκε μια ομάδα πειραματοζώων (n=50), τα οποία υποβλήθηκαν σε χειρισμούς για 4 συνεχόμενες μέρες. Κατά τις 3 πρώτες μέρες, τα πειραματοζώα τοποθετήθηκαν σε πειραματικό κλωβό όπως αυτός ήδη έχει περιγραφεί, επί 15 min/ημέρα. Την 4^η ημέρα τα πειραματοζώα υποβλήθηκαν σε χορήγηση κανναβινοειδών και εκδόχων και στη συνέχεια τοποθετούνταν στον πειραματικό κλωβό, όπου γινόταν 15λεπτη καταγραφή της κινητικής δραστηριότητας.

Η καταγραφή της κινητικότητας πραγματοποιήθηκε με ένα αυτόματο ηλεκτρονικό σύστημα, όπως έχει ήδη περιγραφεί (ENV515, Activity Monitor, version 5, Med Associates Inc., USA) (Εικόνα 2).

Πρωτόκολλο εκτίμησης “Μάθησης λόγω εξοικείωσης σε νέο περιβάλλον”

Χορήγηση	Δόσεις
έκδοχο/WIN 55,212-2	0.03, 0.1 και 0.3 mg/kg (i.p.)
SR 141716A /έκδοχο	0.03 mg/kg (i.p.)
SR 141716A/WIN 55,212-2	0.03 και 0.3mg/kg (i.p.)
έκδοχο/έκδοχο	

Γ. Εφαρμογή πειραματικού μοντέλου “αναγνώρισης νέου αντικειμένου”

Το μοντέλο αυτό βασίζεται στο πρωτόκολλο που αρχικά περιγράφηκε από τους Ennaceur και Delacour (1988) με ελάχιστες τροποποιήσεις, το οποίο έχει έκτοτε χρησιμοποιηθεί ευρέως ως ένα μοντέλο αξιολόγησης της αναγνωριστικής (μη-χωρικής) μνήμης μέσω της αυθόρμητης εξερευνητικής δραστηριότητας (Papalexi et al 2005, Pitisikas et al, 2011). Στην παρούσα εργασία το πρότυπο αυτό χρησιμοποιήθηκε για τη μέλετη της επίδρασης των κανναβινοειδών τα οποία χορηγήθηκαν σε μικρές δόσεις οι οποίες δεν επηρεάζουν την κινητική συμπεριφορά.

Το μοντέλο περιλαμβάνει καταρχήν την εξοικείωση των επίμυων (n=170) σε έναν κλωβό παρατήρησης, διαστάσεων 40 x 40 x40cm. Η εξοικείωση αυτή επιτυγχάνεται με την εισαγωγή κάθε πειραματόζωου στον κλωβό επί 3 min τη φορά, 2 φορές / ημέρα με μεσοδιάστημα 60 min, για 3 συνεχόμενες ημέρες.

Την ημέρα του πειράματος (πρώτη φάση, T₁) κάθε πειραματόζωο τίθεται για 3 min στον κλωβό, όπου έχουν τοποθετηθεί 2 άγνωστα πανομοιότυπα αντικείμενα. Το πειραματόζωο αφήνεται να περιεργαστεί τα αντικείμενα και καταγράφεται ο χρόνος αλληλεπίδρασης με αυτά. Αξιολογούνται οι προσπάθειες του ζώου για όσφρηση, εξερεύνηση του αντικειμένου και γενικότερα όλες οι συμπεριφορές που προσανατολίζονται στο αντικείμενο. Δεν αξιολογούνται η συμπτωματική στάση παρακείμενα, ή η ανάπαυση επί του αντικειμένου, ούτε οι τυχαίες επαφές που μπορεί να έχει το ζώο καθώς κινείται (εικόνα 3).



Εικόνα 3: Εξερεύνηση αντικειμένου από το πειραματόζωο. Αξιολογούνται οι οσφρητικές προσπάθειες και γενικότερα όλες οι συμπεριφορές που προσανατολίζονται στο αντικείμενο. Δεν αξιολογούνται η συμπτωματική στάση παρακείμενα, η ανάπαυση επί του αντικειμένου, ούτε οι τυχαίες επαφές που μπορεί να έχει το ζώο καθώς κινείται.

Η δεύτερη φάση (T_2) του πειράματος περιλαμβάνει 3 εκδοχές, (T_{2a} , T_{2b} , T_{2c}), για την αξιολόγηση 3 διαφορετικών συμπεριφορικών παραμέτρων (Pitsikas et al, Clarke et al, 2008):

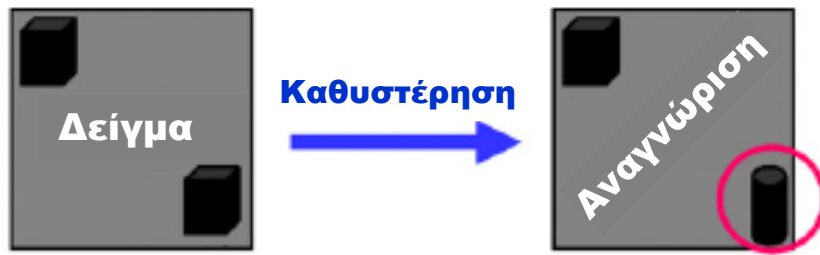
- i. την εγκατάσταση βραχυπρόθεσμης μνήμης (T_{2a})
 - ii. την εγκατάσταση μακροπρόθεσμης μνήμης (ικανότητα αποθήκευσης) (T_{2b}) και
 - iii. την ανάκληση μνημονικών εντυπώσεων (retrieval) (T_{2c}).
-
- i. Φάση T_{2a} : Αμέσως μετά την πρώτη φάση χορηγείται ενδοπεριτοναϊκά το φάρμακο ή το έκδοχο. Έπειτα από 1 ώρα, το πειραματόζωο επανατοποθετείται για 3 min στον κλωβό (δεύτερη φάση), στον οποίο το ένα αντικείμενο παραμένει το ίδιο, το δεύτερο αντικείμενο όμως έχει αντικατασταθεί από ένα νέο, διαφορετικό αντικείμενο.

- ii. Φάση T_{2b}: Αμέσως μετά την πρώτη φάση χορηγείται ενδοπεριτοναϊκά το φάρμακο ή το έκδοχο. Έπειτα από 24 ώρες, το πειραματόζωο μεταφέρεται για 3 min στον κλωβό, στον οποίο είναι τοποθετημένα το παλιό και το νέο αντικείμενο.
- iii. Φάση T_{2c}: Στη φάση αυτή, οι φαρμακολογικοί χειρισμοί γίνονται την επόμενη μέρα ώστε να ολοκληρώνονται κατά τη συμπλήρωση ενός 24ωρου από την πρώτη φάση. Το πειραματόζωο τοποθετείται στον κλωβό για χρονικό διάστημα 3 min, στον οποίο βρίσκονται ένα παλιό και ένα νέο αντικείμενο όπως και προηγουμένως.

Σε όλες τις περιπτώσεις της δεύτερης φάσης, στον πειραματικό κλωβό τοποθετούνται ένα παλιό και ένα καινούριο αντικείμενο, στις ίδιες ακριβώς θέσεις με την πρώτη φάση (εικόνα 4). Όλα τα αντικείμενα καθαρίζονται σχολαστικά πριν από κάθε δοκιμασία, προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα καθοδήγησης του πειραματοζώου από προηγούμενες οσμές.

Ο χρόνος που καταναλώνει το πειραματόζωο στην εξερεύνηση καθενός αντικειμένου καταγράφεται, τόσο στην πρώτη, όσο και στη δεύτερη φάση του πειράματος. Στη συνέχεια προσδιορίζεται ο δείκτης D για τη δεύτερη φάση [$D = \frac{N-F}{N+F}$, όπου N (New) είναι ο χρόνος εξερεύνησης του νέου, ενώ F (Familiar) είναι ο χρόνος εξερεύνησης του «οικείου», ήδη γνωστού από την πρώτη φάση αντικειμένου], ο οποίος εκφράζει τη «μη χωρική μνήμη» του πειραματόζωου για το «οικείο» αντικείμενο.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, λόγω της εξαιρετικής απλότητας του μοντέλου, η δοκιμασία «αναγνώρισης αντικειμένου» είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε αμιγείς πειραματικές παρεμβάσεις αμνησιακού τύπου, σε σύγκριση με άλλες δοκιμασίες, στις οποίες διερευνώνται περισσότερο σύνθετες μαθησιακές διαδικασίες, όπως συμβαίνει με τη δοκιμασία του υδάτινου ή του ακτινωτού λαβυρίνθου (Dere et al, 2007).



Εικόνα 4: Πειραματική διάταξη του μοντέλου “αναγνώρισης νέου αντικειμένου”, στην οποία εξετάζεται, η συμπεριφορά διάκρισης μεταξύ ενός νέου από ένα οικείο αντικείμενο. Ο κύκλος καταδεικνύει υψηλότερη εξερεύνηση του νέου αντικειμένου.

Πρωτόκολλο εκτίμησης “Αναγνώρισης νέου αντικειμένου”

Χορήγηση	Δόσεις
έκδοχο/WIN 55,212-2	0.03, 0.1 και 0.3 mg/kg (i.p.)
SR 141716A /έκδοχο	0.03 mg/kg (i.p.)
SR 141716A/WIN 55,212-2	0.03 και 0.3mg/kg (i.p.)
έκδοχο/έκδοχο	

Δ. Εφαρμογή πειραματικού μοντέλου “ακτινωτού υδάτινου λαβυρίνθου (radial water maze test)”

Το πειραματικό αυτό μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για την αξιολόγηση της «αναφορικής» όσο και της «ενεργού» χωρικής μνήμης (Jarrard et al, 1984, Pitsikas et Algeri, 1992).

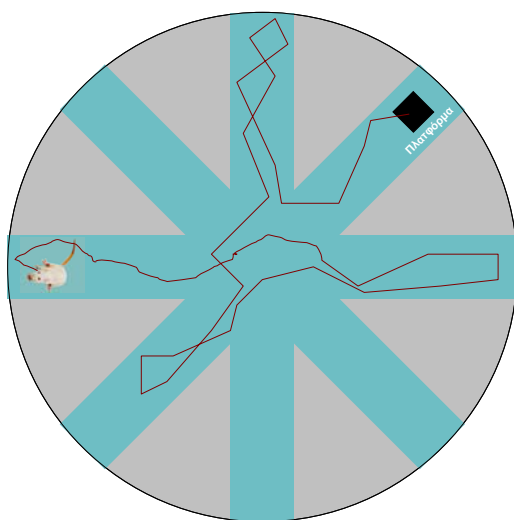
Η συσκευή του ακτινωτού υδάτινου λαβυρίνθου αποτελείται από μια κυκλική μεταλλική γαλβανισμένη δεξαμενή (145 cm πλάτος x 40 cm

ύψος), μέσα στην οποία διαμορφώνονται ακτινωτά οκτώ βραχίονες (κανάλια) με τη χρήση plexiglass, με ελεύθερη επικοινωνία μεταξύ τους (Pitsikas et Algeri, 1992). Κάθε κανάλι έχει μήκος 50 cm και πλάτος 17 cm. Η δεξαμενή πληρώνεται με νερό, το οποίο γίνεται θολό με την προσθήκη γάλακτος και διατηρείται σε θερμοκρασία 27 ± 1 °C. Μια πλατφόρμα διαφυγής τοποθετείται στο άκρο ενός από τους βραχίονες (πχ. στο κανάλι 1), 2 cm κάτω από την επιφάνεια του νερού, έτσι ώστε να μην είναι ορατή. Γύρω από τη δεξαμενή τοποθετούνται χαρακτηριστικά βοηθητικά σημεία (cues) και κατά τη διάρκεια του πειράματος τα 8 κανάλια του λαβυρίνθου παραμένουν σε μια σταθερή θέση σε σχέση με τα σημεία αυτά. Η πλατφόρμα διαφυγής παραμένει επίσης σε σταθερή θέση σε συγκεκριμένο βραχίονα για όλη τη διάρκεια του πειράματος για κάθε ζώο (Pitsikas et al, 2007).

Η δοκιμασία πραγματοποιείται δύο φορές ανά ημέρα. Στην πρώτη δοκιμασία το πειραματόζωο βυθίζεται στο νερό, με το κεφάλι να βλέπει στον κυκλικό τοίχο της δεξαμενής, στο άκρο ενός από τους 7 βραχίονες που δεν περιέχουν την πλατφόρμα (θέση έναρξης). Οι θέσεις έναρξης αλλάζουν με τυχαίο τρόπο για κάθε πειραματόζωο και για κάθε διαφορετική μέρα, υπό την προϋπόθεση ότι κανένα κανάλι δε χρησιμοποιείται 2 φορές ως θέση έναρξης για το ίδιο πειραματόζωο και ποτέ δεν τοποθετείται το πειραματόζωο στο κανάλι που περιέχει την πλατφόρμα κατά την έναρξη. Προκειμένου να περιοριστεί στο ελάχιστο η πιθανότητα επηρεασμού των αποτελεσμάτων από τη θέση της πλατφόρμας, αυτή διαφοροποιείται επίσης, από ζώο σε ζώο με τυχαίο τρόπο. Για παράδειγμα, σε μερικά πειραματόζωα η πλατφόρμα τοποθετείται σε όλη τη διάρκεια του πειράματος στο κανάλι 1, σε άλλα στο κανάλι 2, κ.ο.κ.

Κάθε πειραματόζωο αφήνεται στο νερό για 90 sec, προκειμένου να βρει την πλατφόρμα διαφυγής. Αν δεν τα καταφέρει σε αυτό το χρόνο, οδηγείται από τον ερευνητή στη πλατφόρμα. Στη συνέχεια, αφήνεται στην πλατφόρμα για 10 sec και ακολούθως επιστρέφει στον κλωβό διαβίωσης για 30 sec (εικόνα 5).

Ακολουθεί η δεύτερη δοκιμασία: Το πειραματόζωο τοποθετείται ξανά στον υδάτινο λαβύρινθο, σε άλλη θέση έναρξης αυτή τη φορά και αφήνεται για 90 sec ώστε να βρει μόνο του ή οδηγείται μετά το πέρας του χρόνου στην πλατφόρμα, η οποία φυσικά παραμένει στην ίδια σταθερή θέση. Κάθε πειραματόζωο εκτελεί τις 2 δοκιμασίες για 4 συνεχόμενες μέρες.



Εικόνα 5: Ακτινωτός υδάτινος λαβύρινθος με 8 βραχίονες (κανάλια). Το πειραματόζωο τοποθετείται στο άκρο ενός βραχίονα με το κεφάλι προς τον κυκλικό τοίχο της δεξαμενής και αφήνεται να εξερευνήσει το λαβύρινθο για 90 sec, προκειμένου να ανακαλύψει την πλατφόρμα διαφυγής, η οποία είναι τοποθετημένη πάντα στο ίδιο κανάλι.

Οι επιλογές των διαφορετικών καναλιών που κάνει το πειραματόζωο (θεωρείται ότι το ζώο «επιλέγει» ένα κανάλι όταν ολόκληρο το σώμα του εισέλθει σε αυτό) καταγράφονται για κάθε δοκιμασία ιεραρχικά από τον ερευνητή, από την πρώτη ως την τελευταία, προκειμένου να αποτυπωθούν με όλες τις προσπάθειες και να αναδειχτούν τα λάθη του. Με τον τρόπο αυτό τα λάθη μπορούν να ταξινομηθούν σε λάθη α) «αναφορικής» ή «μη-δηλωτικής» μνήμης (reference memory), που συνίστανται στις αρχικές επιλογές του ζώου να εισέλθει σε κανάλι χωρίς πλατφόρμα και β) σε λάθη «ενεργού» μνήμης ή «δηλωτικής» μνήμης (working memory), τα οποία συνίστανται στις επαναλαμβανόμενες

εισόδους του ζώου σε κανάλια χωρίς πλατφόρμα στα οποία όμως έχει ήδη εισέλθει. Η επανάληψη της εισόδου σε κανάλι λανθασμένης επιλογής «μη-δηλωτικής» μνήμης εκφράζει το συνδυαστικό αποτέλεσμα λαθών τόσο της «μη-δηλωτικής» όσο και της «δηλωτικής» μνήμης (Okaichi et al, 1989). Η ημερήσια επίδοση κάθε ζώου προκύπτει από τον υπολογισμό του μέσου όρου (για συνολικά λανθασμένες επιλογές, για λανθασμένες επιλογές μνήμης αναφοράς και ενεργού μνήμης) για τις δοκιμασίες της κάθε μέρας.

Την ημέρα 5, τα πειραματόζωα (n=60) υποβάλλονται σε «μονήρη δοκιμασία χωρικής διερεύνησης» (single spatial probe trial). Η δοκιμασία αυτή συνίσταται στην αφαίρεση της πλατφόρμας από το κανάλι όπου βρισκόταν τις 4 προηγούμενες μέρες και τη μεταφορά του κάθε ζώου στον υδάτινο λαβύρινθο, όπου αφήνεται για 60 sec προκειμένου να την αναζητήσει. Ο χρόνος που αφιερώνει το πειραματόζωο στην αναζήτηση εντός των διαφορετικών καναλιών υπολογίζεται ως ποσοστό επί των 60 sec. Αν το ζώο επιδείξει εμμένουσα προτίμηση να εξερευνά τον βραχίονα της δεξαμενής όπου βρισκόταν προηγουμένως η πλατφόρμα, μπορεί να θεωρηθεί ότι έχει ανταπεξέλθει τη χωρική δοκιμασία με επιτυχία και θυμάται (Gage et al, 1984).

Τα πειραματόζωα υποβάλλονταν καθημερινά σε ένα σταθερό φαρμακολογικό χειρισμό για την ανάδειξη της επίδρασης των κανναβινοειδών στη διαδικασία μάθησης και μνήμης όπως αυτή εκτιμάται με τη χρήση του συγκεκριμένου μοντέλου.

Πρωτόκολλο εκτίμησης συμπεριφοράς “ακτινωτού υδάτινου λαβυρίνθου”

Χορήγηση	Δόσεις
έκδοχο/WIN 55,212-2	0.03, 0.1 και 0.3 mg/kg (i.p.)
SR 141716A /έκδοχο	0.03 mg/kg (i.p.)
SR 141716A/WIN 55,212-2	0.03 και 0.3mg/kg (i.p.)
έκδοχο/έκδοχο	

ΝΕΥΡΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

A. Προσέγγιση λειτουργίας διεγερτικών αμινοξέων σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές. Μέτρηση ιστικής συγκέντρωσης γλουταμικού (*ex vivo* μελέτες)

Θυσία πειραματοζώων και απομόνωση εγκεφαλικών περιοχών

Χορηγήθηκαν οι υπό εξέταση ουσίες (αγωνιστές των υποδοχέων των κανναβινοειδών) και μία ώρα αργότερα τα πειραματοζώα (n=50) θυσιάστηκαν σε ξεχωριστό χώρο με αποκεφαλισμό. Αμέσως μετά απομονώθηκε ο εγκέφαλος και ελήφθησαν συγκεκριμένες περιοχές όπως ο ιππόκαμπος, ο προμετωπιαίος φλοιός, το ραχιαίο ραβδωτό σώμα, ο επικλινής πυρήνας του διαφράγματος, η αμυγδαλή και ο υποθάλαμος. Ακολούθησε προετοιμασία των δειγμάτων και προσδιορισμός του αμινοξέος γλουταμικό. Ειδικότερα, οι εγκεφαλικές περιοχές απομονώθηκαν σε πάγο, ζυγίστηκαν και ομογενοποιήθηκαν σε 500 μl (1000 μl για τον ιππόκαμπο) HClO₄ 0.2 N, το οποίο περιείχε 7.9 mM Na₂S₂O₅ και 1.3 mM Na₂EDTA. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 14000 rpm για 30 λεπτά στους 4 °C και το υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε και διατηρήθηκε σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) έως την φάση της ανάλυσης. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με Ηλεκτροχημικό Ανιχνευτή (HPLC-ED) συνδεδεμένο με ειδικό πρόγραμμα στον ηλεκτρονικό υπολογιστή (H/Y). Σε όλα τα δείγματα προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις του αμινοξέος γλουταμικό.

Νευροχημική ανάλυση ιστικών συγκεντρώσεων με τη μέθοδο Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με Ηλεκτροχημικό Ανιχνευτή (HPLC-ED)

Η HPLC-ED επιτυγχάνει τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των αμινοξέων που μας ενδιαφέρουν. Για αυτόν το σκοπό, χρησιμοποιήθηκε

η τεχνική της αντίστροφης φάσης-ζεύγους ιόντων υπό ισοκρατικές συνθήκες (Galanopoulos et al, 2011; Bekris et al. 2005; Dalla et al. 2005; Dalla et al. 2008; Drossopoulou et al. 2004; Kokras et al. 2008; Papadopoulou-Daifotis et al. 1995). Ως μη πολική, στατική φάση χρησιμοποιούνται χημικά προσδεδεμένα αλκύλια σε πηκτική διοξειδίου του πυρίτου (alkyl-bonded silica) και συγκεκριμένα για τα παρόντα πειράματα στήλες Hypersil ODS, διαστάσεων 250 x 4.6 mm και σωματιδίων 5 μm (Thermo Electron Chesire, UK). Ως πολική, κινητή φάση χρησιμοποιείται μείγμα οργανικού διαλύτη και ρυθμιστικού διαλύματος. Συγκεκριμένα, ο οργανικός διαλύτης είναι ακετονιτρίλιο (Merck KGaA, Darmstadt, Γερμανία) σε ποσοστό 5%, ενώ το υπόλοιπο 95% αποτελείται από φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο περιείχε 50μM Na₂EDTA (Riedel-De Haën, Γερμανία). Η παρασκευή της κινητής φάσης γινόταν καθημερινά και ακολουθούσε απαέρωση και διήθησή της με τη χρήση αντλίας κενού.

Ο προσδιορισμός του γλουταμικού στα δείγματα πραγματοποιήθηκε σε ένα σύστημα HPLC με αντλία LKB και αμπερομετρικό ανιχνευτή BAS-LC4B. Οι αμπερομετρικοί ανιχνευτές σταθερού δυναμικού είναι ιδανικοί για την ανάλυση ουσιών που οξειδώνονται ή ανάγονται εύκολα στο ηλεκτρόδιο εργασίας, στην τιμή του δυναμικού που επιλέγεται. Όταν το εφαρμοζόμενο δυναμικό έχει κατάλληλη τιμή, τότε είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί η μεταφορά ηλεκτρονίων από ή προς τα σωματίδια του διαλύματος, οπότε προκύπτει ηλεκτρικό σήμα. Το επαγόμενο ρεύμα είναι ανάλογο προς τη συγκέντρωση της προς ανάλυση ουσίας. Στον ηλεκτροχημικό ανιχνευτή βρίσκεται προσαρμοσμένο το ηλεκτρόδιο εργασίας υαλώδους άνθρακα και το ηλεκτρόδιο αναφοράς (Ag/AgCl). Το επιθυμητό δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας, ως προς το ηλεκτρόδιο αναφοράς, ρυθμίζεται στον ανιχνευτή στα +800 mV. Η ροή της αντλίας είναι ρυθμισμένη στα 0,2 ml/min και η κλίμακα ευαισθησίας (Range) ρυθμίζεται στα 50-500 nA, ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των ουσιών στα υπό εξέταση δείγματα. Τέλος, ένας H/Y που διαθέτει ειδικό πρόγραμμα μετατροπής της ηλεκτροχημικής δραστηριότητας σε ψηφιακή μορφή

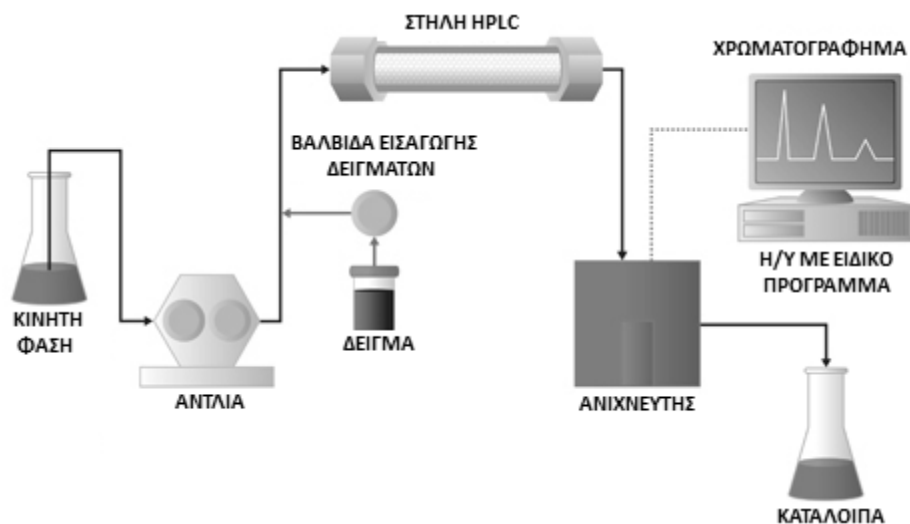
«Chromatography Station for Windows» (DataApex Ltd., Πράγα, Τσεχία) είναι συνδεδεμένος με το σύστημα του HPLC (Εικόνα 6).

Κάθε δείγμα, είτε πρόκειται για πρότυπο διάλυμα είτε για πειραματικό υλικό, υφίσταται παραγοντοποίηση πριν την εισαγωγή του στο σύστημα HPLC ως εξής: 10μl του δείγματος τοποθετούνται μέσα σε φιαλίδιο φυγοκέντρησης μαζί με 10 μl ρυθμιστικού διαλύματος Borax (Sigma-Aldrich, USA) και 1 μl ορθο-φθαλ-διαλδεΐδης (Sigma-Aldrich), η οποία συνιστά το αντιδραστήριο παραγοντοποίησης. Τα τρία υλικά αφήνονται στη συνέχεια να αντιδράσουν μεταξύ τους για 10 min σε συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου. Το μίγμα ακολούθως ενίεται στο βρόχο της βαλβίδας εισαγωγής.

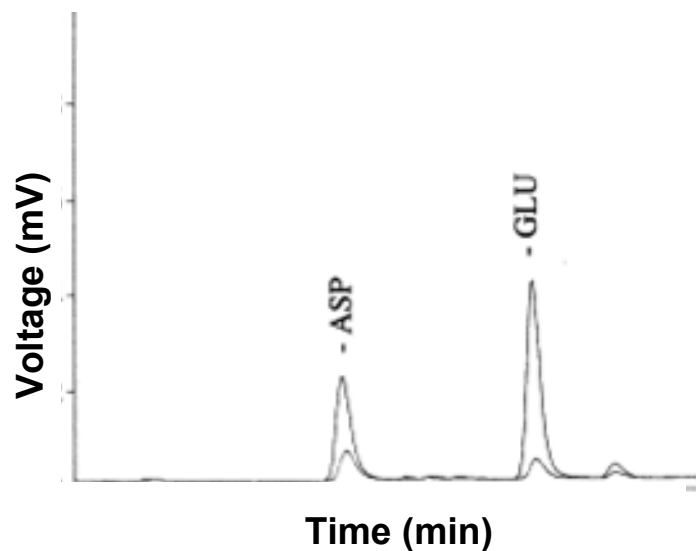
Η ευαισθησία της ανάλυσης εξετάζεται για κάθε σειρά δειγμάτων χρησιμοποιώντας εξωτερικά πρότυπα διαλύματα (external standards). Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάζονται καθημερινά με διαδοχικές αραιώσεις από πυκνά διαλύματα παρακαταθήκης (stock) τα οποία φυλάσσονται στους -80 °C.

Καθημερινά ενίονται στη βαλβίδα εισαγωγής του συστήματος (με όγκο βρόγχου 27 μl) τουλάχιστον τέσσερα πρότυπα διαλύματα (2 από δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις- 60 μl το καθένα), αφού βεβαίως υποστούν παραγοντοποίηση, από τα οποία προκύπτουν τέσσερα αντίστοιχα χρωματογραφήματα (Εικόνα 7). Κάθε ουσία στο πρότυπο διάλυμα με γνωστή συγκέντρωση παράγει μία κορυφή, το εμβαδόν της οποίας χρησιμοποιείται για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης. Στη συνέχεια ενίονται διαδοχικά 60 μl κάθε υπό ανάλυση δείγμα και λαμβάνονται αντίστοιχα χρωματογραφήματα. Η διάρκεια του κάθε χρωματογραφήματος είναι περίπου 15-20 λεπτά, ανάλογα με το ποσοστό ακετονιτριλίου της κινητής φάσης. Ο προσδιορισμός της ποσότητας των ουσιών υπολογίζεται με τη σύγκριση του εμβαδού τους με την πρότυπη καμπύλη. Οι ποσότητες των κάθε ουσιών όπως επάγεται από τα χρωματογραφήματα εκφράζονται σε pg/27 μl (ο τελικός όγκος εγχύσεων)

και το όριο ανίχνευσης για την κάθε ουσία είναι 1 pg/27 μl. Οι τελικές τιμές υπολογίζονται σε mg/g ιστού από τον οποίο προήλθε το δείγμα.



Εικόνα 6: Βασικά μέρη ενός συστήματος HPLC



Εικόνα 7: Ενδεικτικό χρωματογράφημα ανάλυσης αμινοξέων σε πρότυπο διάλυμα με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ηλεκτρονικό ανιχνευτή.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Χορήγηση	Δόσεις	ex vivo εκτίμηση της γλουταματεργικής δραστηριότητας
WIN 55,212-2	0.1 και 1mg/kg (i.p.)	Ραβδωτό σώμα, επικλινής πυρήνας του διαφράγματος, προμετωπιαίος φλοιό, ιππόκαμπος, αμυγδαλή Υπόθαλαμος
Δ ⁹ -THC	0.75 και 3mg/kg (i.p.)	>>
Έκδοχο		>>

B. In vivo προσέγγιση της λειτουργίας διεγερτικών αμινοξέων σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές -μέτρηση εξωκυττάριας συγκέντρωσης γλουταμικού με τη χρήση της *in vivo* εγκεφαλικής μικροδιαπίδυσης

Η *in vivo* εγκεφαλική μικροδιαπίδυση είναι μια μέθοδος που επιτρέπει την ανάλυση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης νευροδιαβιβαστών από οποιαδήποτε περιοχή του εγκεφάλου. Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε πειραματόζωα που κινούνται ελεύθερα και να αξιοποιηθεί για τη μελέτη της νευροχημείας της συμπεριφοράς.

Η μέθοδος της *in vivo* εγκεφαλικής μικροδιαπίδυσης βασίζεται στο φαινόμενο της παθητικής διάχυσης, όπου η ημιπερατή μεμβράνη η οποία διαχωρίζει δύο υγρά διαμερίσματα- το εξωκυττάριο υγρό και το τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) επιτρέπει την ανταλλαγή της υπό ανίχνευση ουσίας λόγω διαφοράς συγκέντρωσης. Το τεχνητό ENY χορηγείται στον εγκέφαλο με σταθερή ροή μέσω ενός καθετήρα (probe) που εμφυτεύεται με στερεοταξική χειρουργική στον εγκέφαλο του πειραματοζώου.

Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η ελαχιστοποίηση της ιστικής βλάβης και η μη άσκηση μηχανικής πίεσης στον ιστό της υπό μελέτη εγκεφαλικής περιοχής, η διατήρηση της ηλεκτρολυτικής ισορροπίας και ιδιαίτερα, η ανίχνευση της υπό μελέτη ουσίας-νευροδιαβιβαστή σε ενεργό, ελεύθερα κινούμενο πειραματόζωο (Di Chiara 1991, Westernick 1995).

Παρασκευή ειδικών καθετήρων (probe)

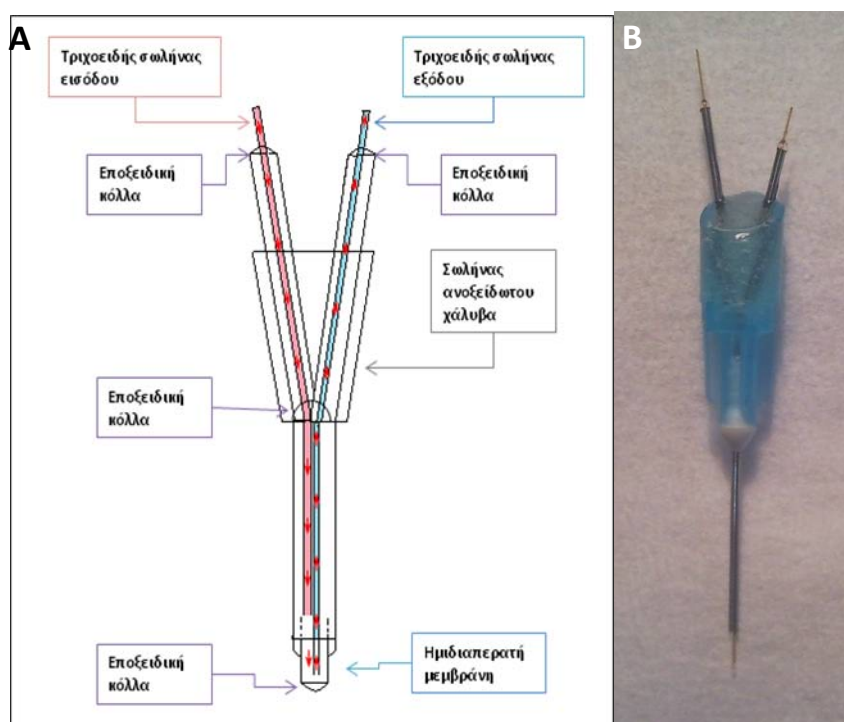
Ο καθετήρας που χρησιμοποιήθηκε είναι κάθετος και ομοκεντρικός. Αποτελείται από τέσσερα κύρια μέρη: α) έναν τριχοειδή σωλήνα εισόδου και β) έναν τριχοειδή σωλήνα εξόδου από συντετηγμένο διοξείδιο του πυριτίου, γ) ένα σωλήνα ανοξειδωτού χάλυβα και δ) μια ημιπερατή μεμβράνη (Εικόνα 8).

Οι σωλήνες εισόδου/εξόδου, ο σωλήνας ανοξειδωτού χάλυβα και η μεμβράνη ενώνονται μεταξύ τους με εποξειδική κόλλα και ο τριχοειδής σωλήνας συντετηγμένου διοξειδίου του πυριτίου διατρέχει εσωτερικά όλο το μήκος της κατασκευής. Το ελεύθερο άκρο της μεμβράνης στεγανοποιείται με εποξεική κόλλα. Η κατασκευή παραμένει τουλάχιστον 24 ώρες πριν τη χρήση για πλήρη στεγανοποίηση.

Ο σωλήνας εισόδου συνδέει τον καθετήρα με μια αντλία σταθερής ροής. Με αυτόν τον τρόπο, το τεχνητό ENY προωθείται στον καθετήρα και μέσω αυτού στον εξωκυττάριο χώρο του εγκεφάλου. Στον εξωκυττάριο χώρο συντελείται ανταλλαγή μορίων μεταξύ του τεχνητού ENY και του ENY του πειραματόζωου δια μέσου της ημιπερατής μεμβράνης. Η μεμβράνη πρέπει να είναι αδρανής, βιοσυμβατή και να έχει καλή ανάκτηση του νευροδιαβιβαστή που μελετάται (Παναγής 2002). Το μήκος της εκτειθέμενης μεμβράνης στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν προσδιορίστηκε στα 2 mm στο ραβδωτό σώμα, 2 mm στον επικλινή πυρήνα και 4 mm στο προμετωπιαίο φλοιό, ενώ ο τύπος της μεμβράνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν υλικό πολυακρilonιτριλίου.

Ο καθετήρας της μικροδιαπίδυσης μετά την τοποθέτηση της μεμβράνης φυλάσσεται σε κλειστό χώρο με περιβάλλον αυξημένης υγρασίας και χρησιμοποιείται μέσα στις επόμενες 24 ώρες ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα φθοράς της μεμβράνης από ξηρότητα και μείωση της σχετικής της ανάκτησης.

Πριν τη χρήση του καθετήρα, ελέγχεται η σωστή λειτουργία του, διαβιβάζοντας με μία σύριγγα τεχνητό ΕΝΥ από το σωλήνα εισόδου και βλέποντας το υγρό να εξέρχεται από το σωλήνα εξόδου, χωρίς να υπάρχουν διαρροές από τη μεμβράνη. Έπειτα, ο καθετήρας παραμένει για 15 λεπτά σε διάλυμα 50% αιθανόλης για αποστείρωση και μετά σε τεχνητό ΕΝΥ για να ξεπλυθεί μέχρι να πραγματοποιηθεί η εμφύτευση.



Εικόνα 8: (A) Αναπαράσταση ενός συγκεντρικού καθετήρα κάθειου τύπου. Τα βέλη δείχνουν την πορεία του τεχνητού ΕΝΥ, (B) Φωτογραφία του ειδικά παρασκευασμένου καθετήρα μικροδιαπίδυσης που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της *in vivo* μικροδιαπίδυσης.

Χειρουργικές επεμβάσεις: στερεοταξική εμφύτευση ειδικών καθετήρων (probe)

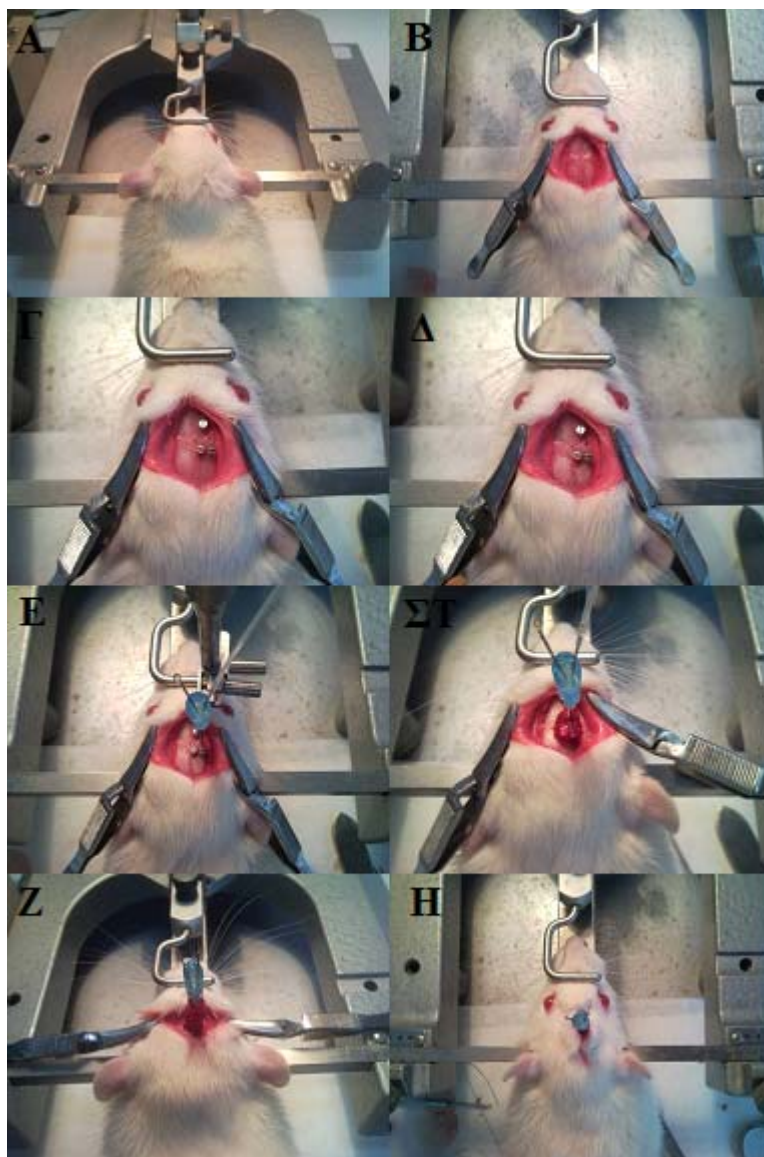
Όλες οι χειρουργικές επεμβάσεις έγιναν υπό την επίρεια γενικής αναισθησίας. Όλα τα πειραματόζωα πριν από την χειρουργική επέμβαση αναισθητοποιήθηκαν με ενδομυϊκή ένεση ξυλαζίνης (10mg/kg)

(Rompun, Bayer), με την οποία προκαλείται μυοχάλαση και υδροχλωρικής κεταμίνης (100mg/kg) (Ketaset, Fort Dodge) με την οποία προκαλείται αναισθησία και αναλγησία. Για την αποφυγή έντονης βραδυκαρδίας και καρδιακής ανακοπής λόγω της αναισθησίας και για τη μείωση των βρογχικών εκκρίσεων, πριν την αναισθησία χορηγήθηκε ενδομυϊκά διάλυμα θειϊκής ατροπίνης (0,6mg/kg) (Atropine, Demo).

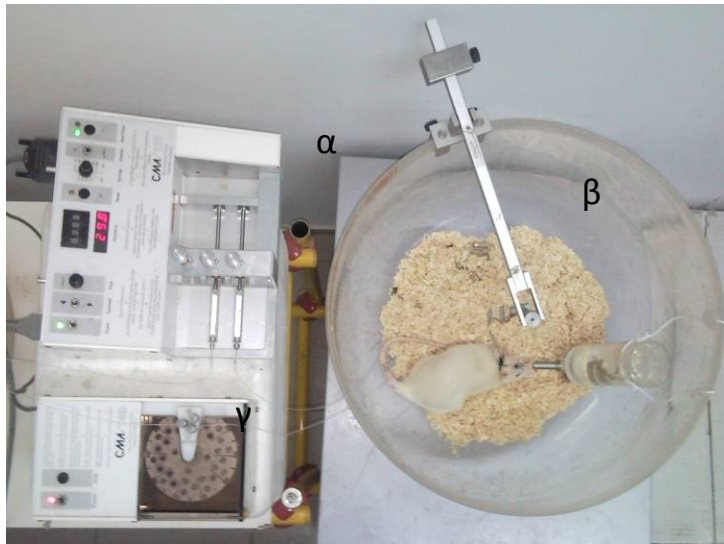
Η διαδικασία της χειρουργικής επέμβασης είχε ως εξής: κάθε πειραματόζωο τοποθετήθηκε σε στερεοταξική συσκευή (David Kopf Instruments) με ειδική υποδοχή για τον καθετήρα, προσαρμοσμένη σε βραχίονα μετρονομημένο σε χιλιοστόμετρα με κλίμακα βερνιέρου. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η εμφύτευση του ειδικού καθετήρα (probe) στον εγκέφαλο (Εικόνα 11). Οι καθετήρες εμφυτεύθηκαν σε τρεις περιοχές: στο ραβδωτό σώμα, στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος και στον προμετωπιαίο φλοιό και οι συντεταγμένες, με σημείο αναφοράς το βρέγμα, ήταν οι εξής: Προσθοπίσθια (AP) +0,5 mm, Πλάγια (ML) ± 3 mm από τη μέση γραμμή και Ραχαιοκοιλιακά (DV) -7 mm από την επιφάνεια του κρανίου, AP +1,6 mm, ML $\pm 1,2$ mm, DV -8,3 mm και AP +3,2 mm, ML $\pm 0,6$ mm, DV -6,2 mm αντίστοιχα, σύμφωνα με το στερεοταξικό άτλαντα των Paxinos and Watson (1998). Μικρές αποκλίσεις από τις συγκεκριμένες συντεταγμένες θεωρούνταν ανεκτές, από τη στιγμή που ο καθετήρας κατέληγε εντός της καθορισμένης περιοχής.

Οι καθετήρες είχαν διάμετρο βελόνας 23G και μήκος 15 mm. Μετά την εμφύτευση, οι καθετήρες σταθεροποιούνταν με τρεις ανοξειδωτους μικροκοχλίες, οι οποίοι είχαν τοποθετηθεί πάνω στο κρανίο μαζί με ακρυλικό πολυμερές. Μετά την εμφύτευση και τη σταθεροποίηση των καθετήρων γινόταν συρραφή του δέρματος με ράμματα μεταξιού (Εικόνα 9). Έπειτα, το πειραματόζωο μεταφερόταν από το χειρουργείο στο δωμάτιο διεξαγωγής του πειράματος μικροδιαπίδυσης και τοποθετείτο σε ειδικό κλωβό όπου συνδεόταν με πλαστικό αυχενικό κολάρο (Εικόνα 10).

Ο καθετήρας συνδεόταν μέσω ενός σωλήνα πολυαιθυλενίου με σύριγγα Hamilton (1 ml όγκος) που ήταν προσαρμοσμένη σε αντλία σταθερής ροής (CMA-100, Carnegie Medicin, Sweden). Η παροχή του τεχνητού ΕΝΥ ρυθμιζόταν στο 0.5μl/λεπτό και το πειραματόζωο ανάρρωνε για 24 ώρες.



Εικόνα 9: Σειρά βημάτων στη στερεοταξική εμφύτευση ειδικού καθετήρα σε επίμους (A-H): A: Τοποθέτηση του επίμους στη στερεοταξική συσκευή, B: Τομή του δέρματος του κρανίου με χειρουργικό νυστέρι, Γ: Ενσφήνωση τριών ανοξείδωτων μικροκοχλίων στο κρανίο, Δ: Διάνοιξη μικρής οπής στο κρανίο για την είσοδο του καθετήρα, Ε: Εμφύτευση του καθετήρα στο εγκέφαλο του επίμους, ΣΤ-Ζ: Σταθεροποίηση του συστήματος μικροκοχλίες-καθετήρας με ακρυλικό πολυμερές, Η: Συρραφή του δέρματος.



Εικόνα 10: Η πειραματική διάταξη της *in vivo* εγκεφαλικής μικροδιαπίδυσης: (α) αντλία σταθερής ροής, (β) ειδικός κλωβός μεστρωμένη και (γ) αυτόματος συλλέκτης δειγμάτων.

Συλλογή δειγμάτων *in vivo* εγκεφαλικής μικροδιαπίδυσης

Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την εμφύτευση του καθετήρα αυξάνεται η ροή του τεχνητού ΕΝΥ στο 1μl/λεπτό και η αντλία λειτουργεί σε αυτή την ροή για 2 h, μέχρις ότου εξισορροπήσει στις νέες συνθήκες.

Μετά την πάροδο των 2 h, με αυτόματο συλλέκτη δειγμάτων (CMA-100, Carnegie Medicin, Sweden) συλλέχθηκαν 10 δείγματα, ανά 30 min το καθένα για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των αμινοξέων. Τα πρώτα 3 δείγματα που συλλέχθηκαν αποτέλεσαν τα δείγματα ελέγχου (βασική έκλυση αμινοξέων), ενώ πριν τη συλλογή του 4^{ου} δειγματος χορηγήθηκε το υπό εξέταση φάρμακο και ακολούθησε η συλλογή των υπόλοιπων δειγμάτων. Σε πειράματα ανταγωνισμού, ο ανταγωνιστής χορηγήθηκε 5 λεπτά πριν τον αγωνιστή· επομένως, με βάση το χρόνο συλλογής, στο 25ο λεπτό του τρίτου δειγματος. Οι μετρήσεις αυτές έδωσαν αποτέλεσμα για δόσο- και χρονοεξαρτώμενη δράση των υπό έλεγχο ουσιών.

Το τεχνητό ΕΝΥ που χρησιμοποιήθηκε (Ringer's solution) παρασκευάστηκε με βάση προηγούμενες μελέτες ανίχνευσης νευροδιαβιβαστών και μεταβολιτών τους με τη μέθοδο της εγκεφαλικής μικροδιαπίδυσης (Anagnostakis και Spyraiki 1994, Marazioti et al,

2008; Polissidis et al, 2012) ως εξής: 147mM NaCl, 3mM KCl, 1.3mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM Na₃PO₄, pH=7.4.

Τα δείγματα συλλέγονταν σε πλαστικά φιαλίδια και φυλάσσονταν στους -80°C μέχρι την ανάλυσή τους.

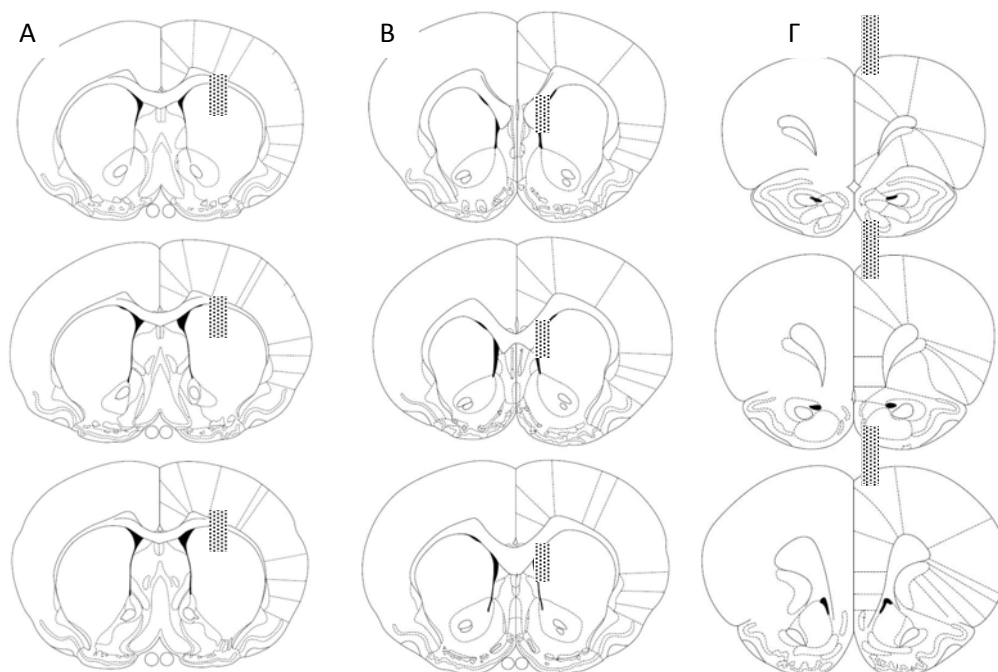
Η επίδραση των υπό εξέταση ουσιών στη μεταβολή της εξωκυττάριας συγκέντρωσης του γλουταμικού υπολογίστηκε θεωρώντας ως βασική μέτρηση τη μέση τιμή της συγκέντρωσης των πρώτων τριών δειγμάτων. Η μέση τιμή των βασικών επιπέδων ορίστηκε ως 100 και στα ακόλουθα δείγματα εκφράστηκε η συγκέντρωση ως η επί τοις εκατό (%) μεταβολή συγκριτικά με τη μέση τιμή των βασικών επιπέδων.

Χρησιμοποιήθηκαν κυρίως 6-7 πειραματόζωα ανά ομάδα φαρμακολογικού χειρισμού (βλέπε ακόλουθο πειραματικό πρωτόκολλο).

Θυσία και ιστολογική ανάλυση εγκεφάλων

Μετά το πέρας του πειράματος, ακολούθησε αναισθησία με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση νατριούχου πεντοβαρβιτάλης (Vetoquinol, Cedex, France) (200 mg/kg) και ο εγκέφαλος απομακρύνθηκε προκειμένου να γίνει ιστολογική επιβεβαίωση της θέσης εμφύτευσης του καθετήρα. Διατηρήθηκαν οι συγκεκριμένοι εγκέφαλοι στους -20 °C μέχρι την ανάλυση. Οι εγκέφαλοι τεμαχίστηκαν σε μετωπιαίες τομές πάχους 40μm με την βοήθεια ψυκτικού μικροτόμου (-20°C, Leitz cryostat, Leica, CM1850, Nussloch, Germany) στο επίπεδο του ραβδωτού, του επικλινούς πυρήνα του διαφράγματος ή του προμετωπιαίου φλοιού ανάλογα με το πείραμα στο οποίο είχαν συμπεριληφθεί. Οι ληφθείσες τομές τοποθετήθηκαν σε ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες. Ακολούθησε παρατήρηση των πλακών στο οπτικό μικροσκόπιο για εξακρίβωση της θέσης εμφύτευσης του καθετήρα. Μόνο τα ζώα με επιτυχή εμφύτευση του καθετήρα περιελήφθησαν στη στατιστική

ανάλυση.



Εικόνα 11: Γραφική αναπαράσταση των περιοχών εμφύτευσης του καθετήρα για (A) το ραβδωτό σώμα, (B) τον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος και (Γ) τον προμετωπιαίο φλοιό [από Paxinos and Watson, 4^η έκδοση, 1998].

Νευροχημική ανάλυση - μέτρηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης γλουταμικού με τη μέθοδο HPLC-ED

Ακολούθησε προσδιορισμός του γλουταμικού με τη χρήση HPLC-ED, όπως ήδη περιγράφηκε παραπάνω .

Πειραματικό πρωτόκολλο

Χορήγηση	Δόσεις	in vivo εκτίμηση γλουταματεργικής δραστηριότητας
Έκδοχο/ WIN 55,212-2	0.1 και 1mg/kg (i.p.)	Ραβδωτό σώμα, επικλινής πυρήνας του διαφράγματος, προμετωπιαίος φλοιός
SR 141716A /έκδοχο	0.03 mg/kg (i.p.)	>>
SR 141716 ^A /WIN 55,212-2	0.03 / 0.1 και 1mg/kg	>>
Έκδοχο /έκδοχο		>>

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

- 1)** Η πρώτη σειρά πειραμάτων διαδικασία έχει σαν στόχο να διερευνήσει την επίδραση ενός συνθετικού CB_1 αγωνιστή (WIN 55,212-2) στην κινητικότητα των πειραματοζώων σε συνθήκες ανοικτού πεδίου.
- 2)** Η δεύτερη πειραματική διαδικασία αφορά στη μελέτη της «μάθησης λόγω εξοικείωσης σε νέο περιβάλλον» και της μεταβολής που προκαλεί η χορήγηση WIN 55,212-2 στις παραμέτρους που σχετίζονται με τη συγκεκριμένη συμπεριφορά μάθησης. Επίσης, μελετήθηκε η δράση του ανταγωνιστή των CB_1 υποδοχέων ριμοναμπάντη (SR141716A) στο ίδιο πειραματικό μοντέλο, καθώς και η δυνατότητα του ανταγωνιστή αυτού να αναστρέψει την πιθανή μεταβολή στη μάθηση που προκαλείται από το WIN 55,212-2.
- 3)** Η τρίτη πειραματική σειρά στοχεύει στην αξιολόγηση της αναγνωριστικής «μη-χωρικής» μνήμης των πειραματοζώων με τη χρήση του μοντέλου «αναγνώρισης νέου αντικειμένου». Το μοντέλο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση τόσο της βραχυπρόθεσμης, όσο και της μακροπρόθεσμης μνήμης αλλά και της ικανότητας ανάκλησης μνημονικών εντυπώσεων. Μελετήθηκε η πιθανή επίδραση του CB_1 αγωνιστή WIN 55,212-2, του CB_1 ανταγωνιστή SR141716A καθώς και του συνδυασμού τους στις αναφερθείσες μνημονικές παραμέτρους.
- 4)** Η τέταρτη σειρά πειραμάτων αφορά στη διερεύνηση της επίδρασης των ουσιών WIN 55,212-2, SR141716A και του συνδυασμού τους σε συμπεριφορές που σχετίζονται με τη χωρική, «αναφορική» ή «δηλωτική» και «ενεργό» ή «μη-δηλωτική» μνήμη. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο του «ακτινωτού υδάτινου λαβυρίνθου», το οποίο έχει τη δυνατότητα να εξετάζει αυτές τις γνωστικές παραμέτρους ξεχωριστά ή σε συνδυασμό στο ίδιο πειραματοζώο.

Οι τέσσερις αυτές πειραματικές σειρές σχεδιάστηκαν με στόχο την κατά το δυνατό περισσότερο λεπτομερή και αναλυτική προσέγγιση των

σύνθετων γνωστικών λειτουργιών που σχετίζονται με τη μνήμη και τη μάθηση.

5) Η πέμπτη πειραματική σειρά συνίσταται στη μελέτη της δραστηριότητας του γλουταμικού σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές που σχετίζονται με τη μνήμη και τη μάθηση, μέσω της ανάλυσης της μεταβολής που επιφέρει στις ιστικές συγκεντρώσεις του γλουταμικού (ex vivo), η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του συνθετικού αναλόγου WIN 55,212-2.

6) Η έκτη σειρά πειραμάτων στοχεύει στη μελέτη της γλουταματεργικής λειτουργίας in vivo με την τεχνική της εγκεφαλικής μικροδιαπίδυσης και τις μεταβολές που επιτελούνται σε αυτή από την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του CB₁ αγωνιστή WIN 55,212-2, του ανταγωνιστή SR141716A και του συνδυασμού τους.

Χορήγηση φαρμάκων

Οι ακόλουθες ουσίες χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας (Πίνακας 4):

Πίνακας 4: Συνοπτική παρουσίαση φαρμάκων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

ΦΑΡΜΑΚΟ	ΔΡΑΣΕΙΣ	ΔΟΣΕΙΣ (mg/kg, i.p.)	ΕΚΔΟΧΟ
Δ ⁹ -THC	Μερικός CB ₁ αγωνιστής	0.75 και 3	5% DMSO, 5% Cremofor EL, 90% NaCl 0,9%
WIN 55, 212-2	Ισχυρός CB ₁ αγωνιστής	0.03, 0.1, 0.3 και 1	5% DMSO, 5% Cremofor EL, 90% 0,9% NaCl
SR141716A (Ριμοναμπάντη)	Μερικός αντίστροφος CB ₁ ανταγωνιστής	0.03, 0.3 και 1	5% DMSO, 5% Cremofor EL, 90% NaCl 0,9%

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Η στατιστική ανάλυση όλων των αποτελεσμάτων των ανωτέρω πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα SPSS 17.0 για Windows. Στατιστικά σημαντικό θεωρήθηκε ένα αποτέλεσμα όταν η τιμή της πιθανότητας p ήταν μικρότερη του 0.05 ($p\text{-value} < 0.05$)

1ο Πείραμα: Για τη στατιστική επεξεργασία της μελέτης κινητικότητας των πειραματοζώων σε συνθήκες ανοικτού πεδίου, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση μεταβλητότητας κατά μία διεύθυνση (one-way ANOVA) με παράγοντα ελέγχου τη χορήγηση του φαρμάκου (σύγκριση ομάδας ελέγχου με την ομάδα WIN 55,212-2). Οι επιμέρους post-hoc αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του κριτηρίου LSD.

2ο Πείραμα: Η στατιστική επεξεργασία των συμπεριφορικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη του μοντέλου «μάθησης λόγω εξοικείωσης σε νέο περιβάλλον» πραγματοποιήθηκε σε δύο φάσεις. Καταρχήν, πραγματοποιήθηκε μία ανάλυση μεταβλητότητας κατά έναν παράγοντα με παναλαμβανόνες μετρήσεις στο χρόνο για να διερευνηθεί η εξοικείωση των πειραματοζώων στον ανοικτό κλωβό κινητικότητας. Στη συνέχεια για την ημέρα 4 πραγματοποιήθηκε η ανάλυση μεταβλητότητας κατά μία διεύθυνση (one-way ANOVA), ακολουθούμενη από LSD post-hoc αναλύσεις, με παράγοντα ελέγχου τη χορήγηση του φαρμάκου (σύγκριση ομάδας ελέγχου με την ομάδα WIN 55,212-2, την ομάδα SR141716A και την ομάδα WIN 55,212-2 + SR141716A) για να διερευνηθεί η εγκάτασταση της μάθησης λόγω εξοικείωσης μετά από το φαρμακολογικό χειρισμό.

3ο Πείραμα: Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων από την εφαρμογή του συμπεριφορικού μοντέλου «αναγνώρισης νέου αντικειμένου» πραγματοποιήθηκε με ανάλυση μεταβλητότητας κατά μία

διεύθυνση (one-way ANOVA) σε όλες τις υποπεριπτώσεις του πειράματος, με παράγοντα ελέγχου τη χορήγηση του φαρμάκου (σύγκριση ομάδας ελέγχου με την ομάδα WIN 55,212-2, την ομάδα SR141716A και την ομάδα WIN 55,212-2 + SR141716A). Οι επακόλουθες post-hoc αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του κριτηρίου LSD.

4ο Πείραμα: Για τη στατιστική επεξεργασία των τελικών δεδομένων που προέκυψαν από την εφαρμογή του συμπεριφορικού μοντέλου «ακτινωτού υδάτινου λαβυρίνθου» πραγματοποιήθηκε με ανάλυση μεταβλητότητας κατά μία διεύθυνση (one-way ANOVA), σε όλες τις εκδοχές της πειραματικής διαδικασίας, με παράγοντα ελέγχου τη χορήγηση του φαρμάκου (σύγκριση ομάδας ελέγχου με την ομάδα WIN 55,212-2, την ομάδα SR141716A και την ομάδα WIN 55,212-2 + SR141716A). Ακολούθησαν επιμέρους LSD post-hoc αναλύσεις.

5ο Πείραμα: Η στατιστική επεξεργασία των νευροχημικών παραμέτρων μεταβολής των *ex vivo* συγκεντρώσεων του γλουταμικού και του ασπαρτικού πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της ανάλυσης μεταβλητότητας κατά μία διεύθυνση (one-way ANOVA) με παράγοντα ελέγχου τη χορήγηση του φαρμάκου (σύγκριση ομάδας ελέγχου με την ομάδα WIN 55,212-2 και την ομάδα Δ⁹-THC). Οι επιμέρους post-hoc αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του κριτηρίου LSD.

6ο Πείραμα: Για τη στατιστική ανάλυση των νευροχημικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τα πειράματα *in vivo* εγκεφαλικής μικροδιαπίδυσης χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (repeated measures two-way ANOVA) με παράγοντες ελέγχου τη χορήγηση του φαρμάκου (σύγκριση ομάδας ελέγχου με την ομάδα WIN 55,212-2, την ομάδα SR141716A και την ομάδα WIN 55,212-2 + SR141716A) και το χρόνο καταγραφής των δεδομένων (ανά 30 min επαναλαμβανόμενες μετρήσεις σε κάθε πείραμα).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1ο Πείραμα : Μελέτη συμπεριφοράς ανοικτού πεδίου. Η επίδραση αγωνιστών και ανταγωνιστών των CB₁ υποδοχέων στην κινητικότητα

Χορήγηση WIN 55,212-2

Η χορήγηση του CB₁ αγωνιστή WIN 55,212-2 οδήγησε σε μερική ελάττωση της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας. Συγκεκριμένα:

- Οριζόντια δραστηριότητα: Το WIN 55,212-2 μείωσε στατιστικά σημαντικά τη διανυθείσα απόσταση στη δόση των 0.3 mg/kg βάρους (one-way ANOVA, $F_{(3,42)} = 4.22$, $p = 0.01$). Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 0.03 mg/kg, και 0.1 mg/kg δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μεταβολή (Διάγραμμα 1A)
- Κάθετη δραστηριότητα: Η χορήγηση WIN 55,212-2 οδήγησε επίσης σε αριθμητική ελάττωση των καταγραφέντων ανορθώσεων στη δόση των 0.3 mg/kg, χωρίς όμως να επιτευχθεί εδώ στατιστική σημαντικότητα (Διάγραμμα 1B).

Η χορήγηση υψηλότερης δόσης WIN 55,212-2 (1 mg/kg) οδήγησε σε σοβαρή πτώση της κινητικότητας, αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες παρατηρήσεις του Εργαστηρίου μας, σχετίζεται με το διφασικό προφίλ δράσης των κανναβινοειδών και αποδίδεται σε καταστολή (Chouliara et al. 2006; Polissidis, Galanopoulos et al, 2012). Προκειμένου να αποφευχθεί η σύγχυση μεταξύ της εξοικείωσης του πειραματόζωου σε νέο περιβάλλον και της καταστολής, ως δύο παραγόντων οι οποίοι δύνανται να σχετίζονται με μείωση της παρατηρούμενης κινητικότητας, η δόση του 1 mg/kg αποκλείστηκε από τα περισσότερα συμπεριφορικά πειράματα.

Χορήγηση SR141716A

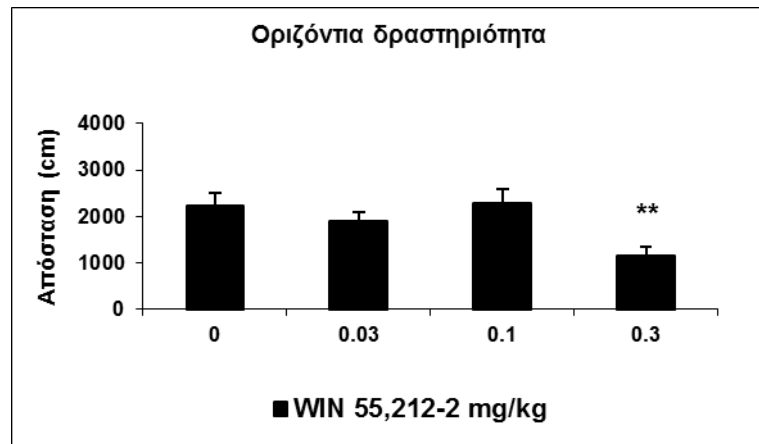
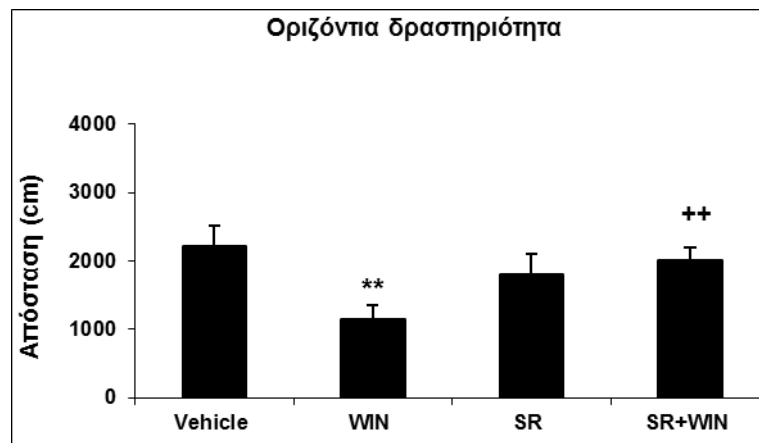
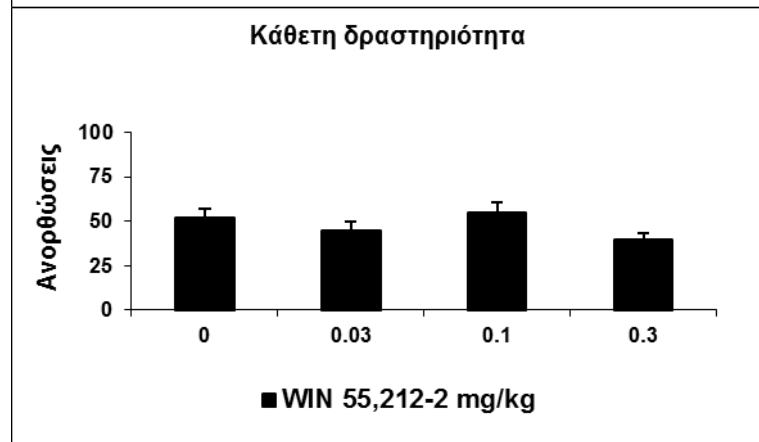
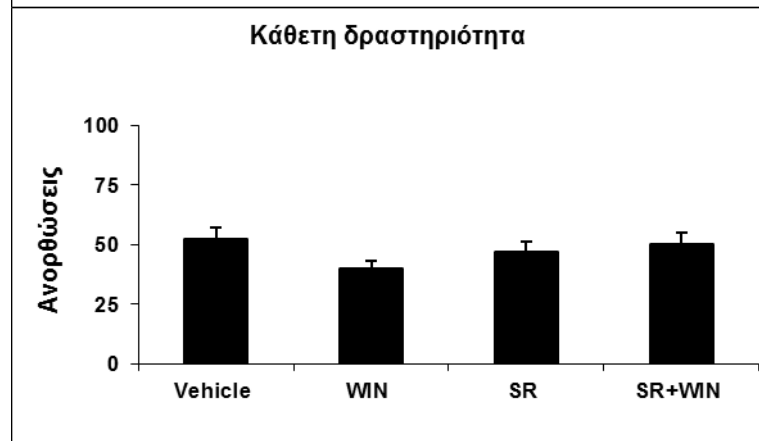
Η χορήγηση του μερικού αγωνιστή/ανταγωνιστή των CB₁ υποδοχέων SR141716A σε δόση 0.03 mg/kg δεν έδειξε στατιστικά σημαντική δράση

στην οριζόντια ή στην κάθετη δραστηριότητα των επίμυων (Διαγράμματα 1Γ & 1Δ).

Χορήγηση WIN 55,212-2 και SR141716A

Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του CB₁ ανταγωνιστή SR141716A, σε δόση 0.03 mg/kg, 10 min πριν τη χορήγηση του αγωνιστή WIN 55,212-2, ανέστρεψε την επαγόμενη από τον τελευταίο μείωση της κινητικότητας. Συγκεκριμένα:

- Οριζόντια δραστηριότητα: Η προ-χορήγηση SR141716A σε επίμυες που έλαβαν επίσης WIN 55,212-2 σε δόση 0.3 mg/kg, ανέστειλε την μείωση της διανυόμενης απόστασης που προκαλεί η δόση αυτή [one way ANOVA, $F_{(3,42)} = 4.22$, $p=0.01$] (Διάγραμμα 1Γ).
- Κάθετη δραστηριότητα: Η προ-χορήγηση SR141716A σε επίμυες που λαμβάνουν WIN 55,212-2 σε δόση 0.3 mg/kg, εξάλειψε την τάση ελάττωσης του αριθμού των ανορθώσεων, χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ελέγχου (Διάγραμμα 1Δ).

A**B****Γ****Δ**

Διάγραμμα 1: Αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα σε χορήγηση WIN 55,212-2, SR141716A και WIN 55,212-2 + SR141716A. Οι δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα συγχορήγησης WIN 55,212-2 και SR141716A (Διαγράμματα Γ, Δ) ήταν 0.3mg/kg για το WIN 55,212-2 και 0.03 mg/kg για το SR141716A.

A, Γ: Μέση τιμή διανυθείσας απόστασης (cm) ± τυπικό σφάλμα.

B, Δ: Μέση τιμή αριθμού ανορθώσεων ± τυπικό σφάλμα.

***p≤0.01: στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ομάδων εκδόχου vs WIN*

++p≤0.01: στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ομάδων WIN vs WIN + SR

2ο Πείραμα : Η επίδραση του CB₁ αγωνιστή WIN 55,212-2 και του ανταγωνιστή SR141716A στη συμπεριφορά «μάθησης λόγω εξοικείωσης σε νέο περιβάλλον»

Η τοποθέτηση των επίμυων στον πειραματικό κλωβό επί 3 συνεχόμενες μέρες οδήγησε στη σταδιακή εξοικείωσή τους με το χώρο, όπως διαπιστώνεται με τη στατιστικά σημαντική μείωση τόσο της διανυόμενης οριζόντιας απόστασης όσο και των κάθετων ανορθώσεων ανά μέρα [repeated ANOVA, $F_{(2,124)}=14.16$, $p<0.001$ και $F_{(2,110)}=15.08$, $p<0.001$, αντίστοιχα] (Διαγράμματα 2A & 2B)

Χορήγηση WIN 55,212-2

Η χορήγηση του CB₁ αγωνιστή WIN 55,212-2 είχε ως αποτέλεσμα τη μερική αύξηση της κινητικής δραστηριότητας κατά την 4^η μέρα του πειράματος. Συγκεκριμένα:

- Οριζόντια δραστηριότητα: Το WIN 55,212-2 αύξησε στατιστικά σημαντικά τη διανυθείσα απόσταση στη δόση των 0.3 mg/kg βάρους (one-way ANOVA, $F_{(3,32)}=3.42$, $p=0.036$). Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 0.03 mg/kg, και 0.1 mg/kg δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μεταβολή (Διάγραμμα 2Γ)
- Κάθετη δραστηριότητα: Η χορήγηση WIN 55,212-2 δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μεταβολή (Διάγραμμα 2Δ).

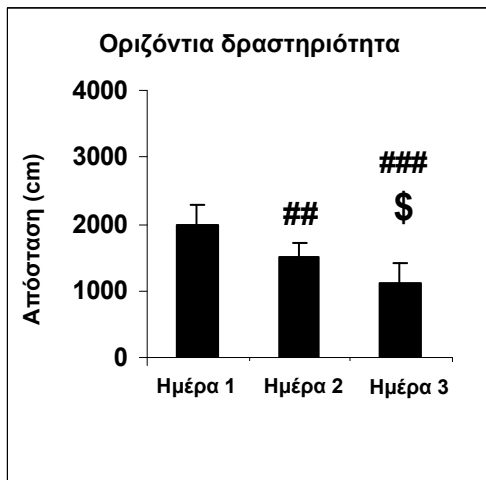
Χορήγηση SR141716A

Η χορήγηση του μερικού αγωνιστή/ανταγωνιστή των CB₁ υποδοχέων SR141716A σε δόση 0.03 mg/kg δεν έδειξε στατιστικά σημαντική δράση στην οριζόντια ή στην κάθετη δραστηριότητα των επίμυων (Διαγράμματα 2E & 2ΣΤ).

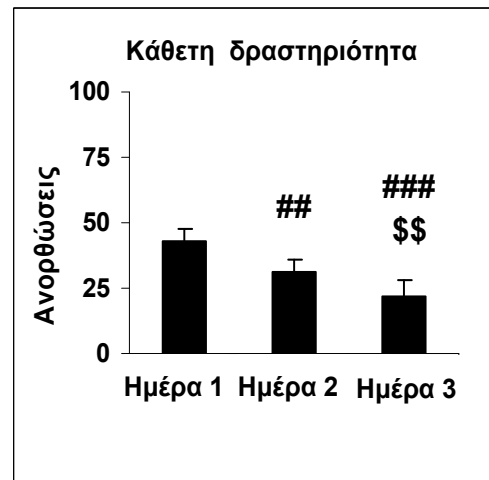
Χορήγηση WIN 55,212-2 και SR141716A

Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του CB₁ ανταγωνιστή SR141716A, σε δόση 0.03 mg/kg, 10 min πριν τη χορήγηση του αγωνιστή WIN 55,212-2, ανέστρεψε την επαγόμενη από τον τελευταίο μείωση της κινητικότητας. Συγκεκριμένα:

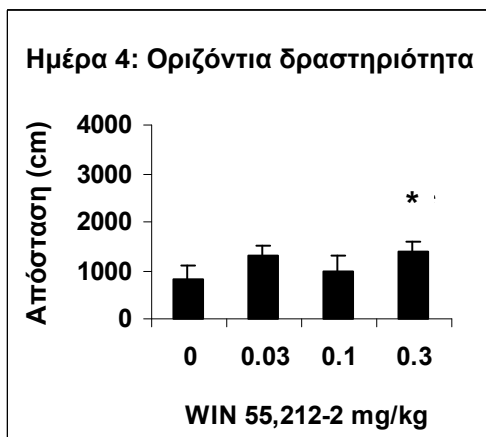
- Οριζόντια δραστηριότητα: Η προ-χορήγηση SR141716A σε επίμυες που έλαβαν ακολούθως WIN 55,212-2 σε δόση 0.3 mg/kg, ανέστειλε την μείωση της διανυόμενης απόστασης που προκαλεί η δόση αυτή [one way ANOVA, $F_{(3,36)}=6.73$, $p=0.001$] (Διάγραμμα 2E).
- Κάθετη δραστηριότητα: Η προ-χορήγηση SR141716A σε επίμυες στους οποίους συχορηγήθηκε WIN 55,212-2 σε δόση 0.3 mg/kg, δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντικές μεταβολές (Διάγραμμα 2ΣΤ).



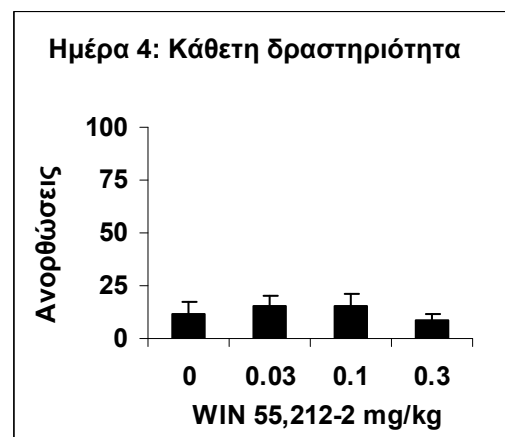
A



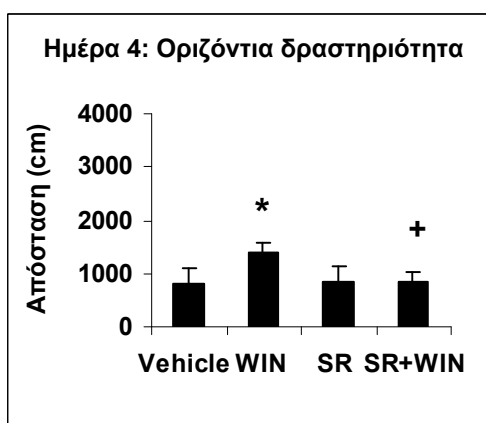
B



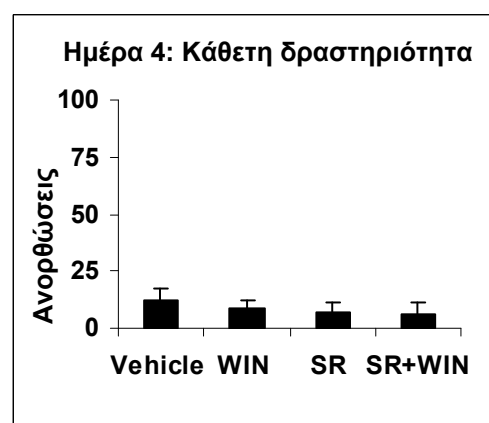
Γ



Δ



E



ΣΤ

Διάγραμμα 2: Αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα κατά τις 4 μέρες του πειράματος. Οι φαρμακολογικοί χειρισμοί (χορήγηση WIN 55,212-2, SR141716A και WIN 55,212-2 + SR141716A) πραγματοποιήθηκαν την 4^η μέρα. Οι δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα συγχορήγησης WIN 55,212-2 και SR141716A (Διαγράμματα E, Z) ήταν 0.3mg/kg για το WIN 55,212-2 και 0.03 mg/kg για το SR141716A.

A, Γ, E: Μέση τιμή διανυθείσας απόστασης (cm) ± τυπικό σφάλμα κατά τις 3 πρώτες μέρες του πειράματος (**A**) και την 4^η μέρα των φαρμακολογικών χειρισμών (**Γ, E**).

B, Δ, ΣΤ: Μέση τιμή αριθμού ανορθώσεων ± τυπικό σφάλμα κατά τις 3 πρώτες μέρες του πειράματος (**B**) και την 4^η μέρα των φαρμακολογικών χειρισμών (**Δ, ΣΤ**).

* $p \leq 0.05$: στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ομάδων εκδόχου vs WIN

+ $p \leq 0.001$: στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ομάδων WIN vs WIN + SR

$p \leq 0.01$: στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ημέρας 2 και ημέρας 1

$p \leq 0.01$: στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ημέρας 3 και ημέρας 1

\$ $p \leq 0.05$: στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ημέρας 3 και ημέρας 2

\$\$ $p \leq 0.01$: στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ημέρας 3 και ημέρας 2

3ο Πείραμα : Μελέτη συμπεριφορικού μοντέλου «αναγνώρισης νέου αντικειμένου». Η επίδραση του CB₁ αγωνιστή WIN 55,212-2 και του ανταγωνιστή SR141716A σε παραμέτρους αναγνωριστικής μη-χωρικής μνήμης

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε μια ομάδα από 100 επίμυες, οι οποίοι αρχικά εξοικειώθηκαν με τον πειραματικό κλωβό, με την παραμονή τους μέσα σε αυτόν επί 3 min, 2 φορές/ημέρα (με μεσοδιάστημα 60 min), επί 3 συνεχόμενες μέρες. Την 4^η μέρα, το πείραμα ξεκίνησε με τη φάση T₁, η οποία ήταν κοινή για όλα τα πειραματόζωα:

Φάση T₁

Κάθε ζώο μεταφέρθηκε στον πειραματικό κλωβό για 3 min, στον οποίο τώρα βρίσκονταν 2 άγνωστα πανομοιότυπα αντικείμενα και καταγράφηκε ο χρόνος που δαπάνησε το ζώο στην εξερεύνηση καθενός αντικειμένου.

Στη συνέχεια, τα ζώα χωρίστηκαν σε 3 ομάδες και πραγματοποιήθηκαν οι αντίστοιχες δοκιμασίες της φάσης T₂.

Φάση T_{2a} (Φάση ελέγχου βραχυπρόθεσμης αναγνωριστικής μνήμης)

Χορήγηση WIN 55,212-2

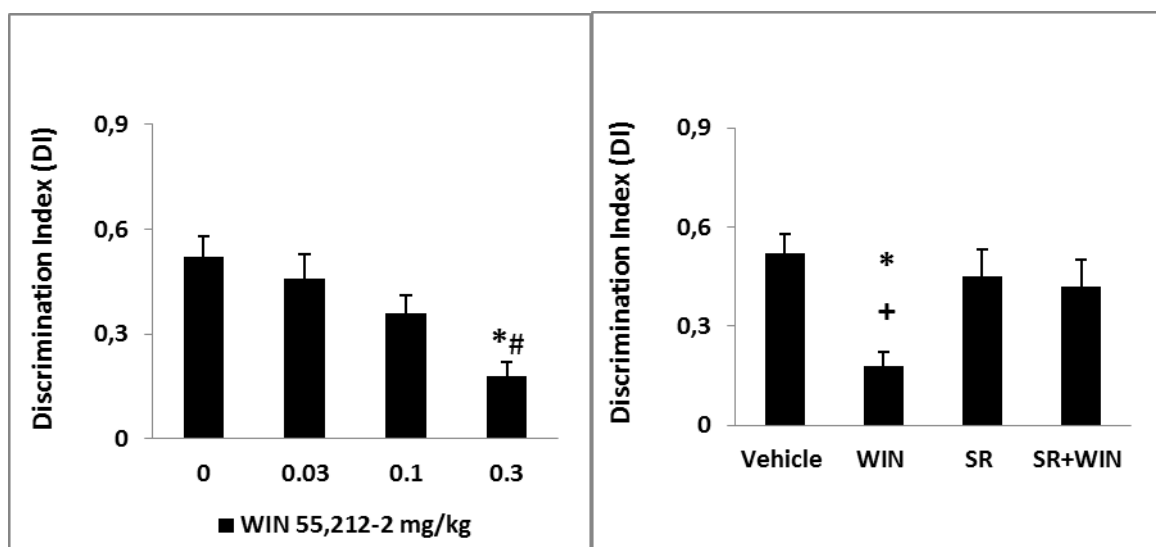
Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του CB₁ αγωνιστή WIN 55,212-2 οδήγησε σε δόσοεξαρτώμενη μείωση της ικανότητας διάκρισης μεταξύ του οικείου (Familiar, F) και του νέου (New, N) αντικειμένου, σε σχέση με την ομάδα του εκδόχου. Ο δείκτης ικανότητας διάκρισης (Discrimination Index, DI) σημείωσε σταδιακή πτώση στις ομάδες του ενεργού φαρμάκου, με την ανάλυση μεταβλητότητας (one-way ANOVA) να αναδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά της ομάδας που έλαβε την υψηλότερη δόση (0.3 mg/kg) σε σχέση με την ομάδα εκδόχου και την ομάδα της χαμηλότερης δόσης (0.03 mg/kg) [$F_{(3,39)} = 2.910$, $p = 0.05$] (Διάγραμμα 3A).

Χορήγηση SR141716A

Η χορήγηση του ανταγωνιστή των CB₁ υποδοχέων SR141716A σε δόση 0.03 mg/kg δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μεταβολή στο δείκτη DI (Διάγραμμα 3A).

Χορήγηση WIN 55,212-2 και SR141716A

Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του SR141716A, σε δόση 0.03 mg/kg, 10 min πριν τη χορήγηση της δόσης 0,3 mg/kg WIN 55,212-2, αναστρέφει την επαγόμενη από το τελευταίο μείωση του δείκτη ικανότητας διάκρισης DI ($F_{(3,32)} = 3,279$, $p = 0.042$) (Διάγραμμα 3A).



Διάγραμμα 3A: Μεταβολή του δείκτη ικανότητας διάκρισης DI με την αύξηση της χορηγούμενης δόσης του WIN 55,212-2, κατά τον έλεγχο της βραχυπρόθεσμης μνήμης. Η δράση του CB₁ ανταγωνιστή SR141716A σε δόση 0.03 mg/kg δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μεταβολή του DI, κατόρθωσε ωστόσο να αναστείλλει τη δράση του WIN 55,212-2 0.3 mg/kg

* $p < 0.05$: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ομάδων εκδόχου vs WIN 0.3mg/kg

$p < 0.05$: στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ομάδων WIN 0.03 mg/kg vs. WIN 0.3 mg/kg

+ $p < 0.05$: στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ομάδων WIN 0.3 mg/kg vs WIN 0.3 mg/kg + SR 0.03 mg/kg

Φάση T_{2b} (Φάση ελέγχου μακροπρόθεσμης αναγνωριστικής μνήμης)

Χορήγηση WIN 55,212-2

Κατά τη φάση ελέγχου της μακροπρόθεσμης μνήμης, η οποία αντιπροσωπεύει την ικανότητα αποθήκευσης νέων πληροφοριών, η συστηματική χορήγηση του WIN 55,212-2 οδήγησε επίσης σε δοσοεξαρτώμενη μείωση της ικανότητας αναγνώρισης του οικείου προς το ζώο αντικειμένου. Ο δείκτης DI παρουσίασε σταδιακή πτώση, με καταγραφή στατιστικά σημαντική διαφοράς μεταξύ των ομάδων WIN 0.3

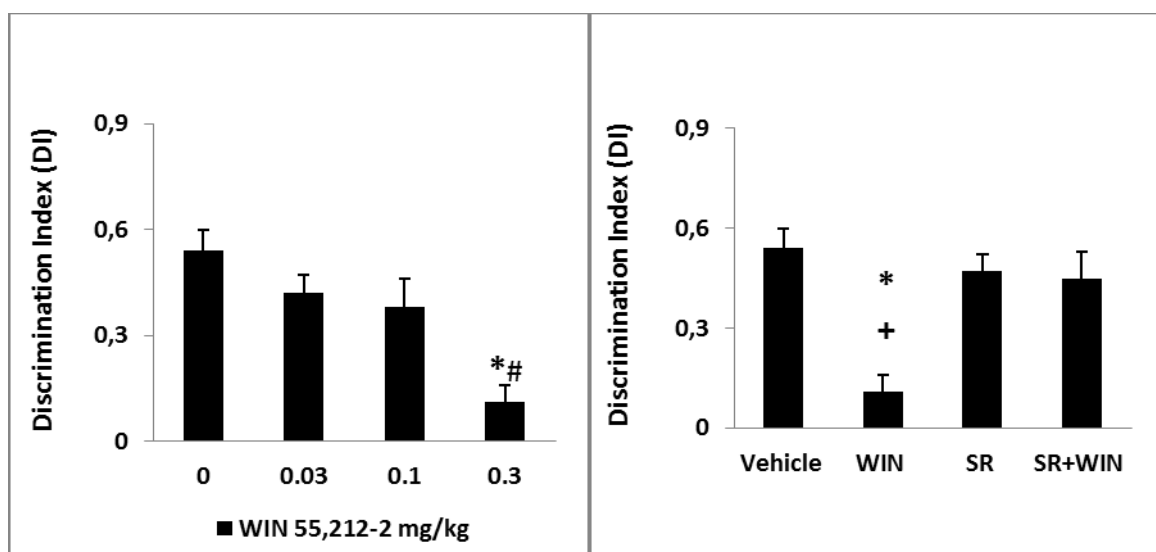
mg/kg και WIN 0.03 mg/kg και των ομάδων WIN 0.3 mg/kg και εκδόχου [one-way ANOVA, ($F_{(3,37)} = 3.01, p=0.05$)](Διάγραμμα 3B).

Χορήγηση SR141716A

Η χορήγηση του ανταγωνιστή των CB₁ υποδοχέων SR141716A σε δόση 0.03 mg/kg δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μεταβολή στο δείκτη DI (Διάγραμμα 3B).

Χορήγηση WIN 55,212-2 και SR141716A

Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του SR141716A, σε δόση 0.03 mg/kg, 10 min πριν τη χορήγηση της δόσης 0.3 mg/kg WIN 55,212-2, οδήγησε στην αναστροφή της διαπιστωθείσας δράσης του τελευταίου, ως προς τη μείωση του δείκτη ικανότητας διάκρισης νέου αντικειμένου DI [$F_{(3,30)} = 3,376, p=0.036$] (Διάγραμμα 3B).



Διάγραμμα 3B: Διαφοροποίηση στην ικανότητα αποθήκευσης μακροπρόθεσμης μνήμης, όπως εκφράζεται με τη μεταβολή του δείκτη DI στις αυξανόμενες δόσεις του WIN 55,212-2. Η δράση του CB₁ ανταγωνιστή SR141716A σε δόση 0.03 mg/kg δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μεταβολή του DI, κατόρθωσε ωστόσο να αναστείλλει τη δράση του WIN 0.3 mg/kg

* $p \leq 0.05$: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ομάδων εκδόχου vs WIN 0.3 mg/kg

$p \leq 0.05$: στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ομάδων WIN 0.03 mg/kg vs. WIN 0.3 mg/kg

+ $p < 0.05$: στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ομάδων WIN 0.3 mg/kg vs WIN 0.3 mg/kg + SR 0.03 mg/kg

Φάση T_{2c} (Φάση ελέγχου ανάκλησης αναγνωριστικού μνημονικού περιεχομένου)

Χορήγηση WIN 55,212-2

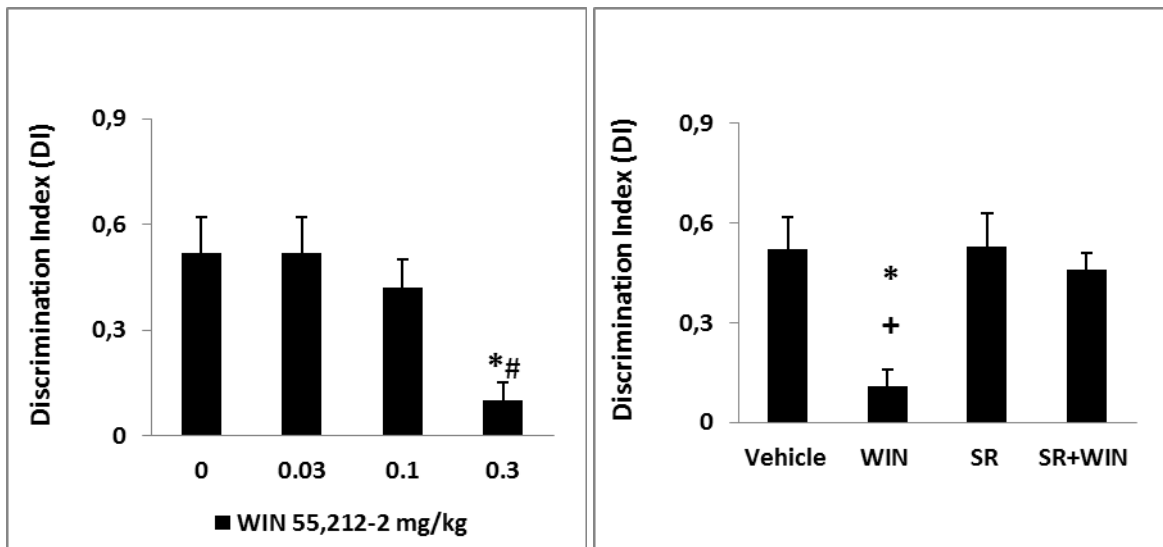
Κατά τη φάση ελέγχου της ικανότητας ανάκλησης του περιεχομένου της μνήμης (retrieval), η χορήγηση του WIN 55,212-2 είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας διάκρισης του νέου από το οικείο αντικείμενο. Ο δείκτης DI κατέγραψε πτώση, ενώ η ανάλυση μεταβλητότητας ANOVA κατά τον παράγοντα «φαρμακευτική χορήγηση» έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων WIN 0.3 mg/kg και WIN 0.03 mg/kg και των ομάδων WIN 0.3 mg/kg και εκδόχου [$F_{(3,36)} = 3.21, p=0.043$](Διάγραμμα 3Γ).

Χορήγηση SR141716A

Η χορήγηση του CB₁ ανταγωνιστή SR141716A σε δόση 0.03 mg/kg δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μεταβολή στο δείκτη DI (Διάγραμμα 3Γ).

Χορήγηση WIN 55,212-2 και SR141716A

Η δράση του WIN 55,212-2, σε δόση 0.3 mg/kg, ως προς τη μείωση της τιμής του δείκτη ικανότητας διάκρισης DI, αναστέλλεται αν προηγηθεί ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση SR141716A, σε δόση 0.03 mg/kg, 10 min πριν τη χορήγηση του WIN (one-way ANOVA, $F_{(3,30)} = 3.016, p=0.047$) (Διάγραμμα 3Γ).



Διάγραμμα 3Γ: Μεταβολή του δείκτη ικανότητας διάκρισης DI ανάλογα με τη δόση του WIN 55,212-2, στον υποπληθυσμό πειραματοζώων που αξιολογήθηκε ως προς την ικανότητα ανάκλησης μνημονικής πληροφορίας. Η δράση του CB₁ ανταγωνιστή SR141716A σε δόση 0.03 mg/kg δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μεταβολή του DI, κατόρθωσε ωστόσο να αναστείλει τη δράση του WIN 0.3 mg/kg.

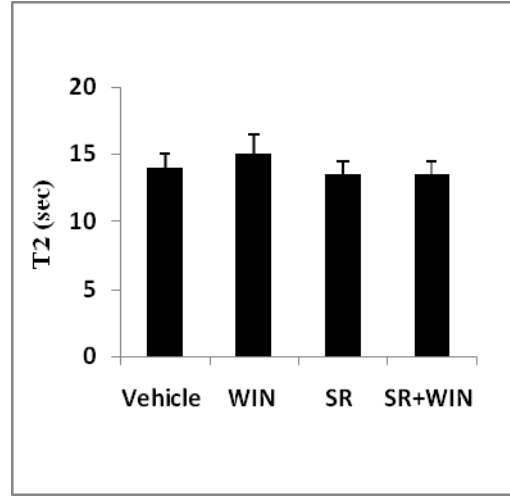
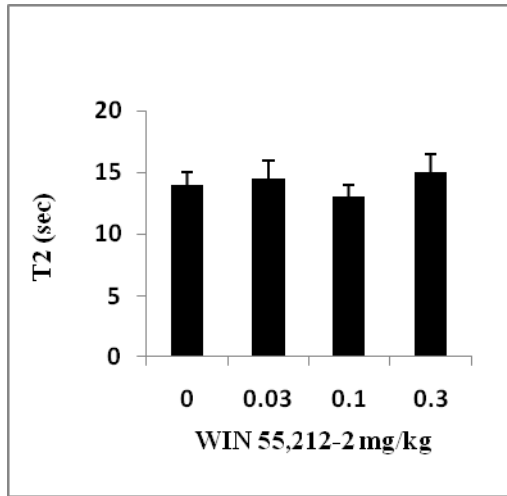
* $p < 0.05$: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ομάδων εκδόχου vs WIN 0.3 mg/kg

$p < 0.05$: στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ομάδων WIN 0.03 mg/kg vs. WIN 0.3 mg/kg

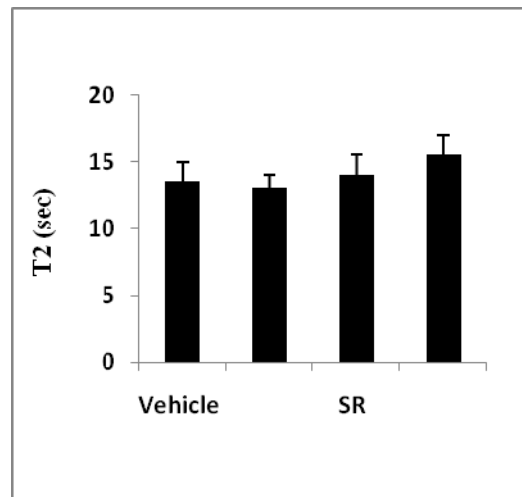
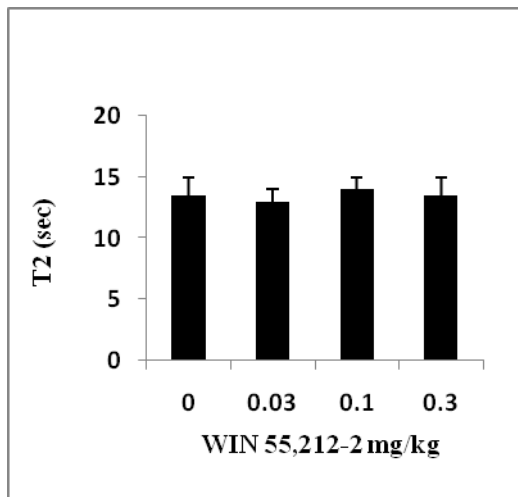
+ $p < 0.05$: στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ομάδων WIN 0.3 mg/kg vs WIN 0.3 mg/kg + SR 0.03 mg/kg

Ας σημειωθεί ότι ο συνολικός χρόνος εξερεύνησης κατά τη επανατοποθέτηση των πειραματοζώων, φάση T2 δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών ομάδων που χρησιμοποιήθηκαν. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει την ικανοποιητική απόκριση των πειραματοζώων ως προς παραμέτρους κινητικής δραστηριότητας (Διάγραμμα 3Δ).

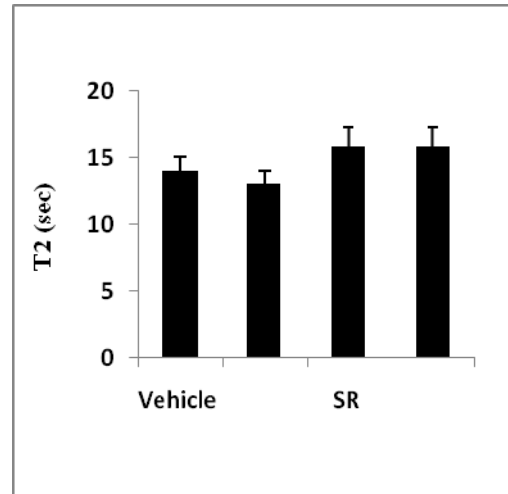
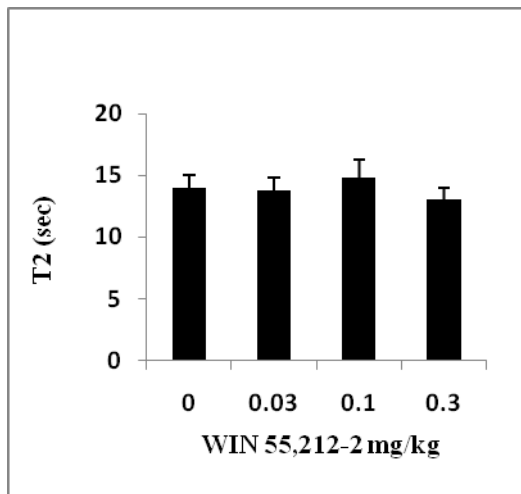
A) Βραχυπρόθεσμη μνήμη αναγνώρισης αντικειμένου



B) Μακροπρόθεσμη μνήμη αναγνώρισης αντικειμένου(αποθήκευση)



Γ) Ανάκληση κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας αναγνώρισης αντικειμένου



Διάγραμμα 3Δ:

Χρόνος που δαπανήθηκε από τα πειραματόζωα κατά τη διάρκεια της φάσης T2 (M.O.±S.E.M) στη δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου μετά από χορήγηση εκδόχου, WIN 55,212-2,(WIN), SR141716A (SR) ή SR+WIN. (Α) Βραχυπρόθεσμη μνήμη (Β) Μακροπρόθεσμη μνήμη (αποθήκευση) και (Γ) Διαδικασία ανάκλησης μετά από χορήγηση WIN 0, 0.03, 0.1 and 0.3 mg/kg, i.p. και χορήγηση WIN (0 και 0.3 mg/kg), SR (0.03mg/kg) και SR+WIN i.p.

4ο Πείραμα : Μελέτη συμπεριφοράς των επίμυων στον «ακτινωτό υδάτινο λαβύρινθο». Η επίδραση του CB₁ αγωνιστή WIN 55,212-2 και του ανταγωνιστή SR141716A σε παραμέτρους χωρικής, «αναφορικής» και «ενεργού» μνήμης

Στο πείραμα αυτό αξιολογούνται τα λάθη που κάνει κάθε πειραματόζωο στην επιλογή του καναλιού όπου βρίσκεται η πλατφόρμα. Για καθεμιά από τις 4 πρώτες μέρες του πειράματος, οι εξαρχής λανθασμένες επιλογές ταξινομούνται ως σφάλματα «αναφορικής» ή «μη-δηλωτικής» μνήμης, οι επαναληπτικές εισοδοι στο ίδιο λανθασμένο κανάλι θεωρούνται σφάλματα της «ενεργού» ή «δηλωτικής μνήμης», ενώ καταγράφεται και το άθροισμα όλων των λαθών ως σφάλμα συνολικά της χωρικής μνήμης. Την 5η μέρα καταγράφεται το ποσοστό του χρόνου των 60 sec που δαπανά το ζώο στο κανάλι όπου πριν βρισκόταν η πλατφόρμα, επιβεβαιώνοντας με τον τρόπο αυτό το βαθμό στον οποίο ανέπτυξε χωρική μνήμη.

«Αναφορική» Μνήμη (Reference Memory)

Χορήγηση WIN 55,212-2

Καταγράφηκε συνολικά η τάση εκτέλεσης περισσότερων λαθών στις ομάδες στις οποίες χορηγήθηκε ο CB₁ αγωνιστής WIN 55,212-2, με περισσότερο ξεκάθαρο τρόπο στις μεγαλύτερες δόσεις. Τα αριθμητικά περισσότερα λάθη συγκριτικά με το έκδοχο σημειώθηκαν τις ημέρες 2

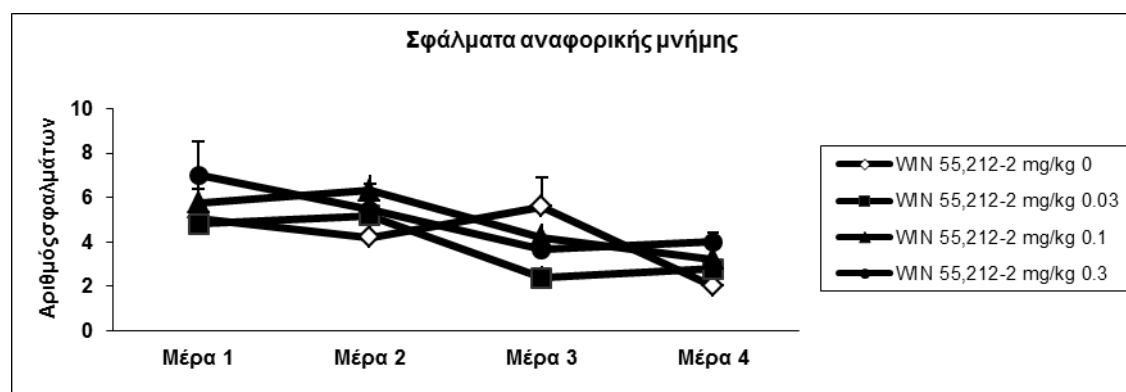
και 4 του πειράματος (Διάγραμμα 4Ai). Ας σημειωθεί ότι κατά τη χορήγηση της κατασταλτικής δόσης WIN 1mg/kg παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση λαθών.

Χορήγηση SR141716A

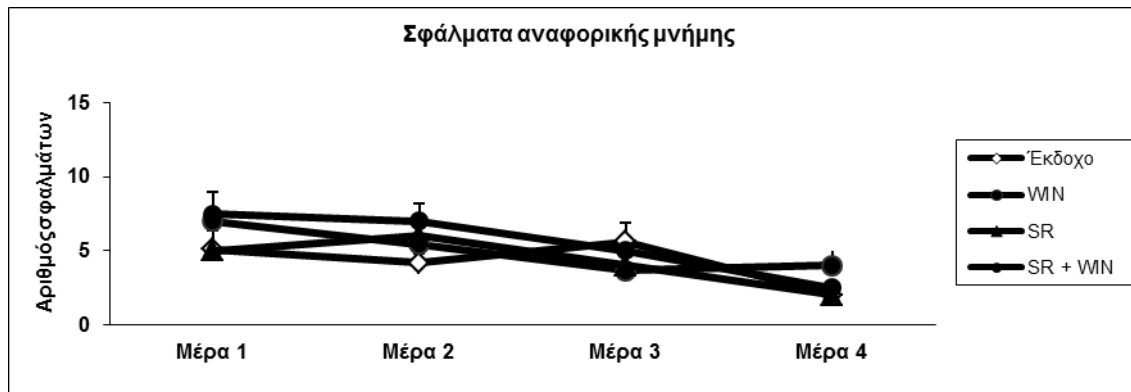
Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του CB₁ ανταγωνιστή SR141716A σε δόση 0.03 mg/kg δεν προκάλεσε αξιόλογη διαφοροποίηση στον αριθμό των λαθών που υπέπεσαν τα πειραματόζωα κατά τις 4 μέρες του πειράματος (Διάγραμμα 4Aii)

Χορήγηση WIN 55,212-2 και SR141716A

Η συγχορήγηση SR141716A σε δόση 0.03 mg/kg, 10 min προτού το πειραματόζωο λάβει την ip ένεση WIN 0.3 mg/kg, τείνει να αμβλύνει τις διαφορές μεταξύ ομάδας εκδόχου και ενεργού θεραπείας, χωρίς στατιστική σημαντικότητα (Διάγραμμα 4Aii).



Διάγραμμα 4Ai: Αριθμός σφαλμάτων «αναφορικής μνήμης» που υπέπεσαν κατά μέσο όρο τα πειραματόζωα, ανάλογα με τη δόση WIN 55,212-2 που τους χορηγήθηκε, στις 4 μέρες του πειράματος.



Διάγραμμα 4Aii: Αριθμός σφαλμάτων «αναφορικής μνήμης» που υπέπεσαν κατά μέσο όρο τα πειραματόζωα, με τη χορήγηση του CB₁ ανταγωνιστή SR141716A, σε δόση 0.03mg/kg, ή σε συνδυασμό του με τη χορήγηση WIN 0.3 mg/kg

«Ενεργός» Μνήμη (Μνήμη Εργασίας: Working Memory)

Χορήγηση WIN 55,212-2

Η χορήγηση του CB₁ αγωνιστή WIN 55,212-2 δεν μετέβαλλε ουσιαστικά τον αριθμό των σφαλμάτων που υπέπεσαν τα ζώα σε καμία δόση. Η ενδοπεριτοναϊκή λήψη του συγκεκριμένου κανναβινεργικού αγωνιστή δε φαίνεται επομένως να επηρεάζει τη λειτουργία της «ενεργού» μνήμης ή μνήμης «εργασίας» στους επίμυες (Διάγραμμα 4Bι)

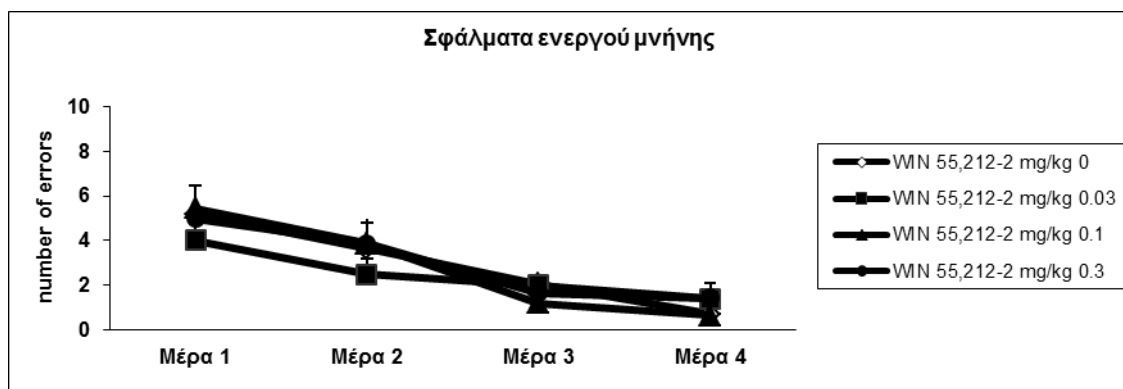
Χορήγηση SR141716A

Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του CB₁ ανταγωνιστή SR141716A σε δόση 0.03 mg/kg δεν προκάλεσε αξιόλογη διαφοροποίηση στον αριθμό των λαθών που υπέπεσαν τα πειραματόζωα κατά τις 4 μέρες του πειράματος (Διάγραμμα 4Bii)

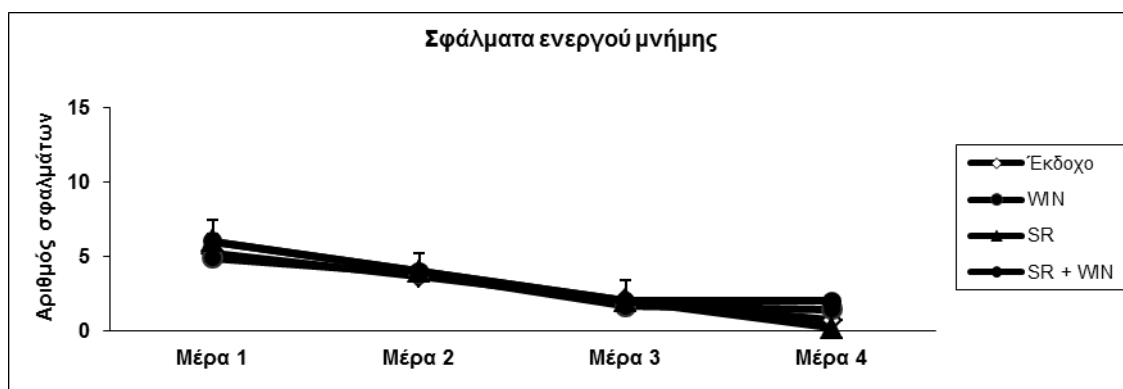
Χορήγηση WIN 55,212-2 και SR141716A

Η συγχορήγηση SR141716A σε δόση 0.03 mg/kg, 10 min προτού το πειραματόζωο λάβει την ip ένεση WIN 0.3 mg/kg, δεν προκάλεσε σημαντική διαφοροποίηση στον αριθμό των λαθών που υπέπεσαν τα ζώα

σε σχέση με το έκδοχο ή τις μονοθεραπείες με καθένα από τα φάρμακα αυτά (Διάγραμμα 4Bii).



Διάγραμμα 4Bi: Αριθμός σφαλμάτων «ενεργού» μνήμης που υπέπεσαν κατά μέσο όρο τα πειραματόζωα, ανάλογα με τη δόση WIN 55,212-2 που τους χορηγήθηκε, στις 4 μέρες του πειράματος



Διάγραμμα 4Bii: Αριθμός σφαλμάτων «ενεργού» μνήμης που υπέπεσαν κατά μέσο όρο τα πειραματόζωα, με τη χορήγηση του CB₁ ανταγωνιστή SR141716A, σε δόση 0.03mg/kg ή σε συνδυασμό του με τη χορήγηση WIN 0.3 mg/kg.

«Χωρική» Μνήμη (Spatial Memory)

Για την εκτίμηση της «χωρικής» μνήμης ως σύνολο αξιολογήθηκε το συνολικό αθροισμα των λαθών, είτε αφορούσαν αναφορική είτε ενεργό μνήμη.

Χορήγηση WIN 55,212-2

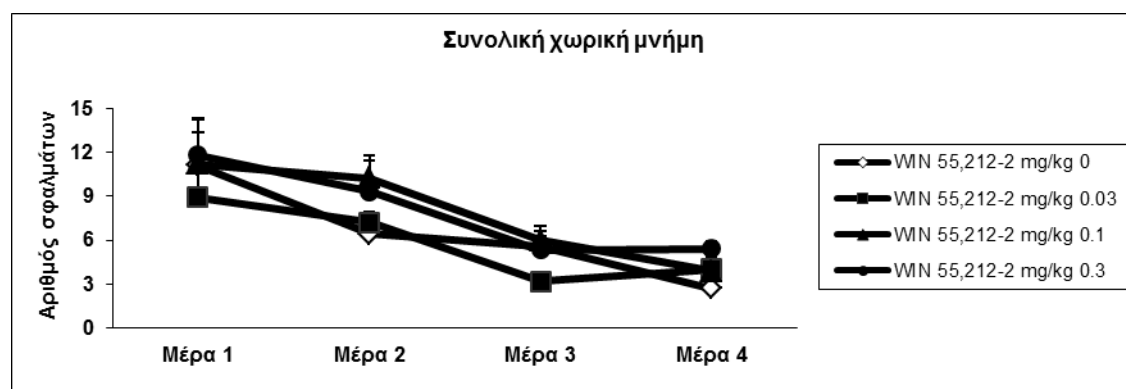
Καταγράφηκε συνολικά η τάση πραγματοποίησης περισσότερων λαθών στις ομάδες στις οποίες χορηγήθηκε ο CB₁ αγωνιστής WIN 55,212-2, εύρημα περισσότερο σαφές στις μεγαλύτερες δόσεις. Τα αριθμητικά περισσότερα λάθη σε σύγκριση με το έκδοχο σημειώθηκαν τις ημέρες 2 και 4 του πειράματος (Διάγραμμα 4Γi). Ας σημειωθεί ότι η μεγαλύτερη αύξηση λαθών σύμφωνα με τα πιλοτικά μας πειράματα παρατηρήθηκε κατά την υψηλότερη δόση WIN 1mg/kg (τα αποτελέσματα αυτά δεν εμφανίζονται στα γραφήματά μας για τους λόγους που ήδη αναπτύχθηκαν).

Χορήγηση SR141716A

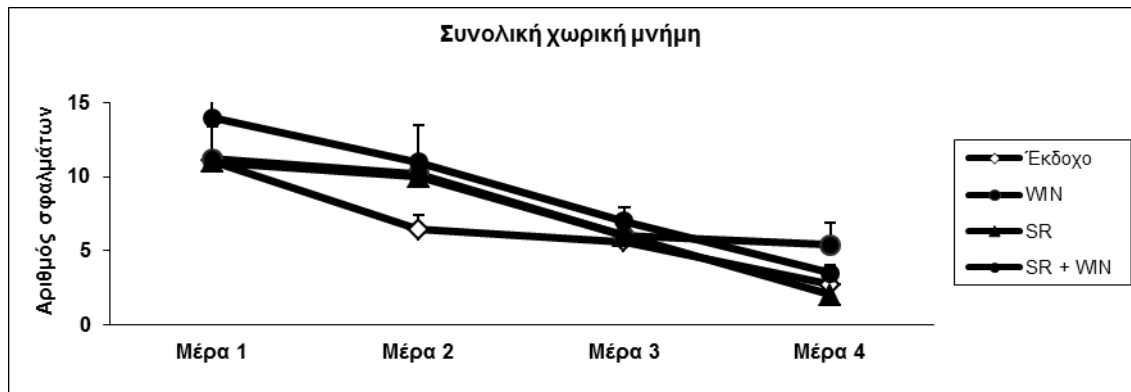
Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του CB₁ ανταγωνιστή SR141716A σε δόση 0.03 mg/kg δεν προκάλεσε αξιόλογη διαφοροποίηση στον αριθμό των λαθών που υπέπεσαν τα πειραματόζωα κατά τις 4 μέρες του πειράματος (Διάγραμμα 4Γii)

Χορήγηση WIN 55,212-2 και SR141716A

Η συγχορήγηση SR141716A σε δόση 0.03 mg/kg, 10 min προτού το πειραματόζωο λάβει την ip ένεση WIN 0.3 mg/kg, τείνει προς την επαναφορά της τιμής της ομάδας WIN προς τα επίπεδα τιμών του εκδόχου, χωρίς ωστόσο ανάδειξη στατιστικής σημαντικότητας (Διάγραμμα 4Γii).



Διάγραμμα 4Γi: Αριθμός των συνολικών σφαλμάτων που υπέπεσαν κατά μέσο όρο τα πειραματόζωα, ανάλογα με τη δόση WIN 55,212-2 που τους χορηγήθηκε, στις 4 μέρες του πειράματος



Διάγραμμα 4Γii: Αριθμός των συνολικών σφαλμάτων στα οποία υπέπεσαν κατά μέσο όρο τα πειραματόζωα, με τη χορήγηση του CB₁ ανταγωνιστή SR141716A, σε δόση 0.03mg/kg ή σε συνδυασμό με τη χορήγηση WIN 0.3 mg/kg

Μονήρης Δοκιμασία Χωρικής Διερεύνησης (Single Spatial Probe Trial)

Χορήγηση WIN 55,212-2

Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση WIN 55,212-2, στη δόση των 0.3 mg/kg, μείωσε στατιστικά σημαντικά το μέσο ποσοστό του χρόνου παραμονής των πειραματοζώων στο κανάλι, σύμφωνα με την ανάλυση μεταβλητότητας one-way ANOVA, σε σχέση με το έκδοχο και τη χαμηλότερη δόση (0.03 mg/kg) του WIN [$F_{(3,33)} = 5.21$, $p = 0.005$], (Διάγραμμα 4Δi).

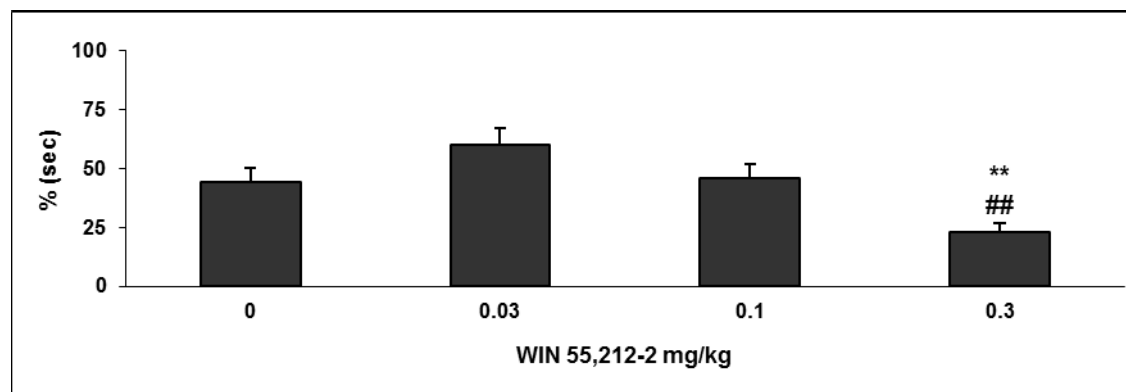
Χορήγηση SR141716A

Η χορήγηση του ανταγωνιστή των CB₁ υποδοχέων SR141716A σε δόση 0.03 mg/kg δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μεταβολή στο ποσοστό του χρόνου παραμονής των πειραματοζώων στο κανάλι όπου βρισκόταν η πλατφόρμα (Διάγραμμα 4Δii).

Χορήγηση WIN 55,212-2 και SR141716A

Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του SR141716A, σε δόση 0.03 mg/kg, 10 min πριν τη χορήγηση της δόσης 0.3 mg/kg WIN 55,212-2, οδήγησε στην αναστροφή της διαπιστωθείσας δράσης του τελευταίου, ως προς τη

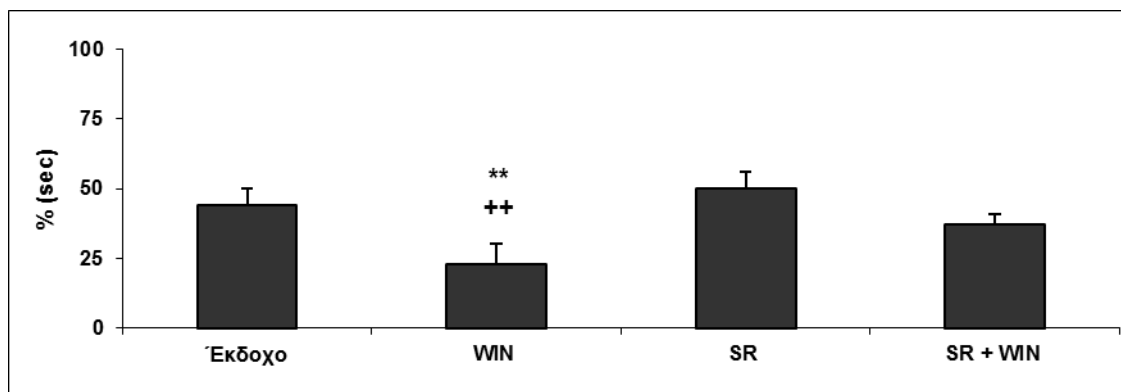
μείωση του ποσοστού παραμονής των πειραματοζώων στην πλατφόρμα [one-way ANOVA, $F_{(3,33)} = 4.26$, $p = 0.011$], (Διάγραμμα 4Δii)



Διάγραμμα 4Δi: Μεταβολή του μέσου ποσοστού (\pm SE) παραμονής των πειραματοζώων στο κανάλι όπου προηγουμένως βρισκόταν η πλατφόρμα, ανάλογα με τη δόση του WIN 55,212-2 που χορηγήθηκε.

** $p = 0.005$: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ομάδων εκδόχου vs WIN 0.3 mg/kg

$p = 0.005$: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ομάδων WIN 0.03 mg/kg vs. WIN 0.3 mg/kg



Διάγραμμα 4Δii: Η δράση του CB₁ ανταγωνιστή SR141716A, σε δόση 0.03 mg/kg, δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μεταβολή του μέσου χρόνου παραμονής των πειραματοζώων στο κανάλι, κατόρθωσε ωστόσο να αναστείλει τη δράση του WIN 0.3 mg/kg.

** $p = 0.011$: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ομάδων εκδόχου vs WIN 0.3 mg/kg

++ $p = 0.011$: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ομάδων WIN 0.3 mg/kg vs WIN 0.3 mg/kg + SR 0.03 mg/kg

5ο Πείραμα: Επίδραση της Δ⁹-THC και του WIN 55,212-2 στη γλουταματεργική λειτουργία συγκεκριμένων εγκεφαλικών περιοχών (ex vivo μελέτες)

Τα αποτελέσματα των κινητικών μελετών έδειξαν ότι το προφίλ της χορήγησης των κανναβινοειδών φαίνεται να ακολουθεί μια διφασική εικόνα που χαρακτηρίζεται από χαμηλές μη υποκινητικές δόσεις και υψηλότερες κατασταλτικές. Ακολουθώντας, οι νευροχημικές μας μελέτες εστιάστηκαν κυρίως σε δύο δοσολογικά σχήματα: μία μικρή δόση και μία υψηλότερη κατασταλτική.

Χορήγηση Δ⁹-THC

Προμετωπιαίος φλοιός

Η ανάλυση μεταβλητότητας (analysis of variance, ANOVA) με παράγοντα το δοσολογικό σχήμα (0.75 και 3mg/kg Δ⁹-THC ή έκδοχο) έδειξε αύξηση των επιπέδων του γλουταμικού μόνο μετά τη χορήγηση της χαμηλής δόσης Δ⁹-THC [$F_{(2,24)}=4.54$, $p=0.022$] (Πίνακας 5).

Ραχιαίο Ραβδωτό σώμα

Η ανάλυση μεταβλητότητας έδειξε αύξηση των επιπέδων του γλουταμικού μετά τη χορήγηση και των δύο δόσεων Δ⁹-THC [$F_{(2,24)}=16.7$, $p<0.001$] (Πίνακας 5).

Επικλιής πυρήνας του διαφράγματος

Η ανάλυση μεταβλητότητας έδειξε όπως και στο ραχιαίο ραβδωτό αύξηση των επιπέδων του γλουταμικού μετά τη χορήγηση και των δύο δόσεων Δ⁹-THC [$F_{(2,24)}=14.9$, $p<0.001$] (Πίνακας 5).

Ιππόκαμπος

Η ανάλυση μεταβλητότητας στον ιππόκαμπο έδειξε αύξηση των επιπέδων του γλουταμικού μετά τη χορήγηση Δ⁹-THC [$F_{(2,22)}=6.3$,

$p < 0.007$], η οποία ήταν πιο έκδηλη κατά την χαμηλότερη δόση (Πίνακας 5).

Αμυγδαλή

Η ανάλυση μεταβλητότητας στην αμυγδαλή δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές μεταβολές (Πίνακας 5).

Υποθάλαμος

Η ανάλυση μεταβλητότητας στον υποθάλαμο δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές μεταβολές (Πίνακας 5).

	Δ⁹-THC					
	Προμετωπιαίος φλοιός	Ραχιαίο ραβδωτό	Επικλινής Πυρήνας	Ιππόκαμπος	Αμυγδαλή	Υποθάλαμος
0	8.18±0.99	3.51 ± 0.38	3.01 ± 0.23	8.5 ± 0.5	4.07± 0.34	5.1 ± 0.47
0.75	12.7±1.2**	6.04±0.32***	4.94 ± 0.47**	12.5 ± 2.13**	4.97 ± 0.53	6.6 ± 0.59
3	9.4±0.75	5.90±0.29***	5.72 ± 0.46***	10.65 ± 0.7#	4.65 ± 0.36	5.4 ± 0.4

Πίνακας 5. Μέσες Τιμές (\pm τυπικό σφάλμα) ιστικών επιπέδων γλουταμικού ανά περιοχή μετά από χορήγηση Δ⁹-THC. Οι συγκεντρώσεις γλουταμικού μετρώνται σε ng/ml και οι δόσεις Δ⁹-THC σε mg/kg βάρους.

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ # $p \approx 0.05$

Χορήγηση WIN 55,212-2

Προμετωπιαίος φλοιός

Η ανάλυση μεταβλητότητας (analysis of variance, ANOVA) με παράγοντα το δοσολογικό σχήμα (0.1 και 1mg/kg WIN ή έκδοχο) έδειξε μία αύξηση των επιπέδων του γλουταμικού ειδικότερα μετά τη χορήγηση της υψηλής δόσης η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Πίνακας 6).

Ραχιαίο Ραβδωτό σώμα

Η ανάλυση μεταβλητότητας έδειξε αύξηση των επιπέδων του γλουταμικού μετά τη χορήγηση και των δύο δόσεων WIN [$F_{(2,21)}=4.3$, $p<0.037$] (Πίνακας 6).

Επικλινής πυρήνας του διαφράγματος

Η ανάλυση μεταβλητότητας έδειξε αύξηση των επιπέδων του γλουταμικού μετά τη χορήγηση της υψηλότερης δόσης WIN [$F_{(2,22)}=7.33$, $p=0.004$] (Πίνακας 6).

Ιππόκαμπος

Η ανάλυση μεταβλητότητας στον ιππόκαμπο έδειξε μία αύξηση των επιπέδων του γλουταμικού μετά τη χορήγηση WIN ειδικά κατά την χαμηλότερη δόση η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Αμυγδαλή

Η ανάλυση μεταβλητότητας έδειξε μείωση των επιπέδων του γλουταμικού μετά τη χορήγηση WIN 55,212-2 ειδικά κατά την υψηλότερη δόση [$F_{(2,24)}=5.87$, $p=0.009$] (Πίνακας 6).

Υποθάλαμος

Η ανάλυση μεταβλητότητας έδειξε μείωση των επιπέδων του γλουταμικού μετά τη χορήγηση WIN 55,212-2 ειδικά κατά την υψηλότερη δόση [$F_{(2,21)}=4.98$, $p=0.037$] (Πίνακας 6).

WIN 55,212-2

	Προμετωπιαί ος φλοιός	Ραχιαίο ραβδωτό	Επικλινής Πυρήνας	Ιππόκαμπος	Αμυγδαλή	Υποθάλαμος
0	7.5 ± 0.47	3.75 ± 0.33	2.8 ± 0.19	8.5 ± 0.5	4.17 ± 0.33	5.1 ± 0.47
0.1	7.65 ± 0.48	5.6 ± 0.55*	2.8 ± 0.11	9.86 ± 0.4*	4.34 ± 0.31	4.45 ± 0.30
1	8.9 ± 0.71	5.01 ± 0.47*	3.65 ± 0.15**	7.8 ± 0.7	3.06 ± 0.15**	3.73 ± 0.26*

Πίνακας 6. Μέσες Τιμές (\pm τυπικό σφάλμα) ιστικών επιπέδων γλουταμικού ανά περιοχή μετά από χορήγηση WIN 55,212-2. Οι συγκεντρώσεις γλουταμικού μετρώνται σε ng/ml και οι δόσεις WIN 55,212-2 σε mg/kg βάρους

*p \leq 0.05, **p \leq 0.01, #p \approx 0.05

6ο Πείραμα: In vivo δράση του CB₁ αγωνιστή WIN 55,212-2 στην εξωκυττάρια συγκέντρωση του γλουταμικού

Προμετωπιαίος φλοιός

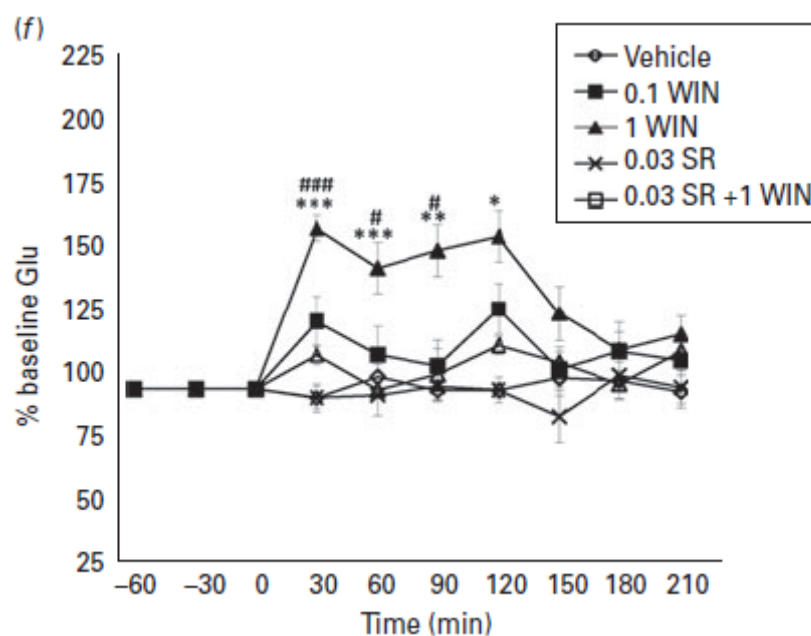
Η εφαρμογή της ανάλυσης μεταβλητότητας ANOVA κατά 2 διευθύνσεις με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις στο χρόνο ανέδειξε στατιστική σημαντικότητα όσον αφορά τη χορήγηση του φαρμάκου ($F_{2,12}=13.78$, $p=0.003$).

Επίσης, τα επίπεδα του γλουταμικού μετά τη χορήγηση WIN παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τα βασικά επίπεδα (μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα: $0.92 \pm 0.13 \mu\text{M}$) κατά τους χρόνους 30, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 min ($F_{1,12} = 67.66, 47.73, 15.67, 16.17, 7.75, 28.32, 41.18, p < 0.001, 0.001, p = 0.003, 0.003, 0.021, p < 0.001, p < 0.001$, αντίστοιχα) και επίσης στατιστικά σημαντική συσχέτιση του χρόνου με τη χορήγηση στα χρονικά σημεία 30, 60, 90, 120, 180 και 210 min ($F_{2,12} = 26.64, 41.54, 6.31, 6.89, 11.22, 11.97, p < 0.001, p < 0.001, p = 0.019, p = 0.015, p = 0.004, p = 0.003$, αντίστοιχα).

Ξεχωριστές αναλύσεις μεταβλητότητας ANOVA με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις σε κάθε ομάδα, έδειξαν αύξηση των επιπέδων γλουταμικού στις χρονικές στιγμές 30, 60, 90 και 120 min μετά τη χορήγηση της

υψηλής δόσης WIN55,212-2 (1 mg/kg, $F_{1,4}=47.98, 45.23, 11.84, 7.57,$
 $p<0.001, p<0.001, p=0.003, p=0.05,$ αντίστοιχα) (Διάγραμμα 6A).

Οι αναλύσεις μεταβλητότητας ANOVA κατά ένα παράγοντα (χορήγηση φαρμάκου), για κάθε χρονικό σημείο ελέγχου του πειράματος, ανέδειξαν στατιστική σημαντικότητα στους χρόνους 30, 60, 90 και 120 min ($(F_{3,15}=13.12, 4.22, 4.70, 4.63, p=0.001, 0.023, 0.019, 0.029,$ αντίστοιχα), με στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων που έλαβαν α) μόνο WIN55,212-2 (1 mg/kg) και β) SR-141716A (0.03 mg/kg) + WIN55,212-2 (1 mg/kg), αποδεικνύοντας με τον τρόπο αυτό την αντιστροφή της επαγόμενης από το WIN55,212-2 αύξησης της γλουταματεργικής έκλυσης (Διάγραμμα 6A). Η χορήγηση μόνο του SR-141716A (0.03 mg/kg) δεν προκάλεσε μεταβολή στη συγκέντρωση του γλουταμικού συγκριτικά με τα βασικά επίπεδα.



Διάγραμμα 6A: Εξωκυτάρια επίπεδα γλουταμικού στον προμετωπιαίο φλοιό μετά την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση (χρονικό σημείο: 0 min) των δοσολογικών σχημάτων που φαίνονται στο διάγραμμα. Η συγκέντρωση του γλουταμικού ανά

χρονικό σημείο ελέγχου εκφράζεται με το ποσοστό % της μέσης συγκέντρωσης των προ της χορήγησης του φαρμάκου μετρήσεων (βασικά επίπεδα= $0.99 \pm 0.15 \mu\text{M}$)

** $p < 0.05$: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ομάδων εκδόχου vs WIN*

*** $p < 0.01$: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ομάδων εκδόχου vs WIN*

**** $p < 0.001$: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ομάδων εκδόχου vs WIN*

$p < 0.05$: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ομάδων WIN vs SR+WIN

$p < 0.01$: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ομάδων WIN vs SR+WIN

$p < 0.001$: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ομάδων WIN vs SR+WIN

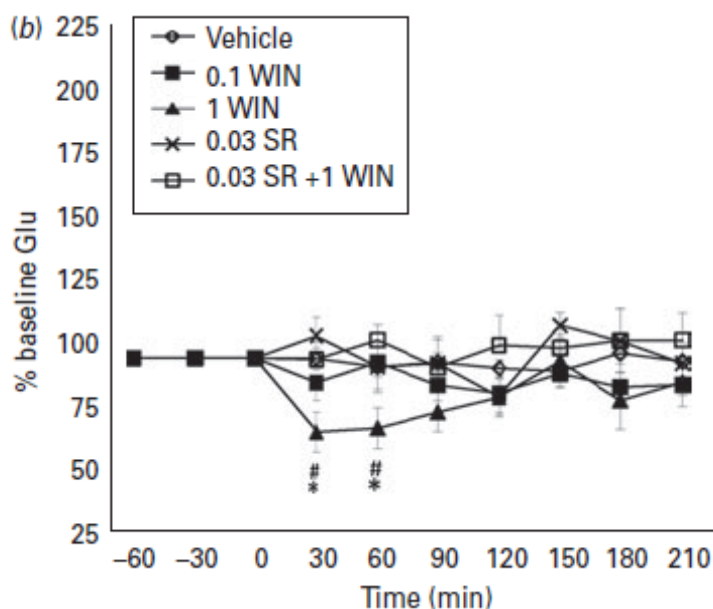
Ραβδωτό σώμα

Η ανάλυση μεταβλητότητας ANOVA κατά 2 διευθύνσεις για επαναλαμβανόμενες στο χρόνο μετρήσεις ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των βασικών επιπέδων (μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα: $1.68 \pm 0.29 \mu\text{M}$) και της συγκέντρωσης γλουταμικού μετά τη χορήγηση του φαρμάκου στους χρόνους 30, 60, 90 και 120 min ($F_{1,19}=8.62, 12.79, 4.81, 5.50, p=0.008, 0.002, 0.04, 0.03$, αντίστοιχα) και επίσης στατιστικά σημαντική συσχέτιση του χρονικού σημείου με τους φαρμακολογικούς χειρισμούς στους χρόνους 30 και 60 min ($F_{2,19}=3.71, 4.12, p=0.05, 0.033$, αντίστοιχα).

Επιμέρους επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ανάλυσης μεταβλητότητας ANOVA σε κάθε θεραπευτική ομάδα, έδειξαν μείωση των επιπέδων γλουταμικού στις χρονικές στιγμές 30 και 60 min μετά τη χορήγηση της υψηλής δόσης WIN55,212-2 (1 mg/kg, $F_{1,6}=6.38, 12.08, p=0.045, 0.013$ αντίστοιχα) (Διάγραμμα 6B).

Οι αναλύσεις μεταβλητότητας ANOVA κατά ένα παράγοντα (χορήγηση φαρμάκου), ως προς το χρονικό σημείο του πειράματος, ανέδειξαν στατιστική σημαντικότητα στους χρόνους 30 και 60 min ($F_{5,30}=3.22, 3.81, p=0.033, 0.011$, αντίστοιχα), με στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων α) WIN55,212-2 και β) SR-141716A (0.03 mg/kg) + WIN55,212-2 αποδεικνύοντας με τον τρόπο αυτό την αντιστροφή της

επαγόμενης από το WIN55,212-2 μείωσης της γλουταματεργικής έκλυσης. Η χορήγηση του SR-141716A (0.03 mg/kg) σε μονοθεραπεία δεν προκάλεσε μεταβολή στη συγκέντρωση του γλουταμικού συγκριτικά με τα βασικά επίπεδα.



Διάγραμμα 6B: Εξωκυττάρια επίπεδα γλουταμικού στο ραβδωτό σώμα μετά την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση (χρονικό σημείο: 0 min) των θεραπευτικών σχημάτων που φαίνονται στο διάγραμμα. Η συγκέντρωση του γλουταμικού ανά χρονικό σημείο ελέγχου εκφράζεται με το ποσοστό % της μέσης συγκέντρωσης των προ της χορήγησης του φαρμάκου μετρήσεων (βασικά επίπεδα= $1.68 \pm 0.29 \mu\text{M}$)

* $p < 0.05$: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ομάδων εκδόχου vs WIN

$p < 0.05$: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ομάδων WIN vs SR+WIN

Επικλινής πυρήνας του διαφράγματος

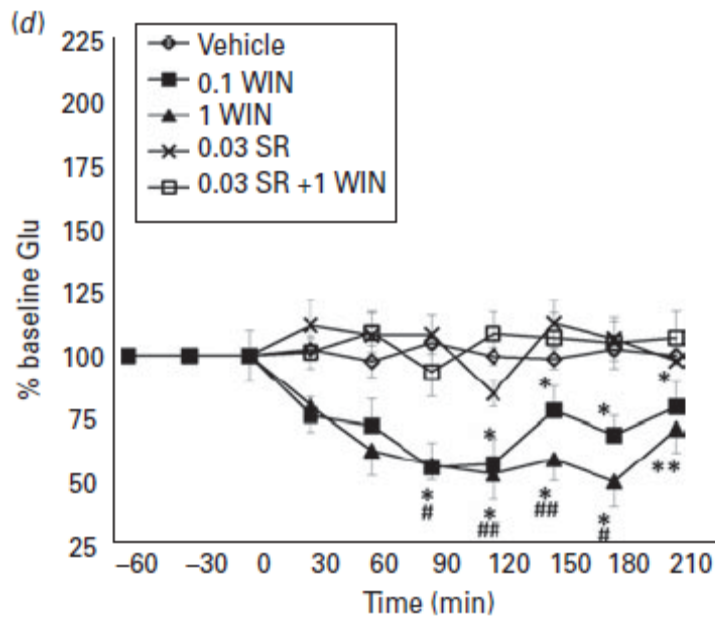
Η εφαρμογή της ανάλυσης μεταβλητότητας ANOVA κατά 2 διευθύνσεις με την τεχνική επαναλαμβανόμενων στο χρόνο μετρήσεων ανέδειξε στατιστική σημαντικότητα όσον αφορά στο συνολικό αποτέλεσμα της θεραπείας ($F_{2,12}=5.326$, $p=0.024$).

Επίσης, τα επίπεδα του γλουταμικού μετά τη θεραπεία, παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τα βασικά επίπεδα (μέση τιμή \pm

τυπικό σφάλμα: $0.99 \pm 0.15 \mu\text{M}$) κατά τους χρόνους 90, 120, 150, 180 και 210 min ($F_{1,12}=25.22, 23.60, 15.87, 21.50, 6.80, p<0.001, p=0.001, 0.002, 0.001, 0.024$, αντίστοιχα) και επιπλέον στατιστικά σημαντική συσχέτιση του χρονικού σημείου με τους φαρμακολογικούς χειρισμούς στους χρόνους 90, 120, 150 και 180 min ($F_{2,12}=9.27, 5.43, 4.40, 6.90, p=0.004, 0.023, 0.039, 0.011$, αντίστοιχα).

Η ιδιαίτερη ανάλυση ANOVA με την τεχνική των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων ανά θεραπευτική ομάδα έδειξε μείωση των επιπέδων γλουταμικού στις χρονικές στιγμές 120, 150, 180 και 210 min μετά από τη χορήγηση της μικρότερης δόσης WIN55,212-2 (0.1 mg/kg; $F_{1,5}=62.91, 13.07, 7.7, 7.54, p=0.015, 0.022, 0.05, 0.05$, αντίστοιχα) και επίσης στις χρονικές στιγμές 90, 120, 150, 180 και 210 min μετά από την υψηλότερη δόση του WIN55,212-2 (1 mg/kg; $F_{1,5}=12.39, 7.53, 15.37, 12.16, 26.89, p=0.024, 0.05, 0.017, 0.025, 0.007$, αντίστοιχα) (Διάγραμμα 6Γ)

Επίσης, η ανάλυση μεταβλητότητας ANOVA κατά μία διεύθυνση (χορήγηση φαρμάκου) ανέδειξε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα χρονικά σημεία 90, 120, 150 και 180 min ($F_{5,23}=3.85, 5.46, 5.46, 3.24, p=0.019, 0.004, 0.004, 0.033$, αντίστοιχα) με στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των θεραπευτικών ομάδων α) WIN 55,212-2 και β) SR141716A (0.03 mg/kg) + WIN 55,212-2 (στις δόσεις όπου πραγματοποιήθηκε συγχορήγηση), αποδεικνύοντας με τον τρόπο αυτό ότι ο CB_1 ανταγωνιστής SR141716A μπορεί να αναστρέφει την εξωκυτάρια μείωση του γλουταμικού που επάγεται από τη χορήγηση του WIN 55,212-2 (Διάγραμμα 6B). Η χρήση του CB_1 ανταγωνιστή SR141716A σε μονοθεραπεία δεν επέφερε αλλαγή στην εξωκυτάρια συγκέντρωση του γλουταμικού σε σχέση με τα βασικά επίπεδα.



Διάγραμμα 6Γ: Εξωκυτάρια επίπεδα γλουταμικού στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος μετά την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση (χρονικό σημείο: 0 min) των θεραπευτικών σχημάτων που φαίνονται στο διάγραμμα. Η συγκέντρωση του γλουταμικού ανά χρονικό σημείο ελέγχου εκφράζεται με το ποσοστό % της μέσης συγκέντρωσης των προ της χορήγησης του φαρμάκου μετρήσεων (βασικά επίπεδα= $0.99 \pm 0.15 \mu\text{M}$)

* $p < 0.05$: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ομάδων εκδόκου vs WIN

** $p < 0.01$: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ομάδων εκδόκου vs WIN

$p < 0.05$: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ομάδων WIN vs SR+WIN

$p < 0.01$: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ομάδων WIN vs SR+WIN

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας αφορούσε στη μελέτη συγκεκριμένων συμπεριφορικών και νευροχημικών μεταβλητών μετά από τη χορήγηση κανναβινοειδών. Ειδικότερα μελετήθηκαν οι επιδράσεις των αγωνιστών των CB₁ υποδοχέων των κανναβινοειδών σε λειτουργίες μνήμης και μάθησης και στο γλουταματεργικό σύστημα. Για το σκοπό της μελέτης αυτής χρησιμοποιήθηκαν το WIN 55-212,2 και η Δ⁹-THC, το κύριο ψυχοδραστικό συστατικό της κάνναβης.

Οι συγκεκριμένες ουσίες (Δ⁹-THC και WIN 55-212,2) μετά από οξεία συστηματική χορήγηση προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές στις συμπεριφορικές δοκιμασίες μνήμης και μάθησης και επίσης *ex vivo* και *in vivo* μεταβολές στη γλουταματεργική λειτουργία σε διαφορετικές εγκεφαλικές περιοχές.

Χορήγηση κανναβινοειδών και συμπεριφορικές προσεγγίσεις

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που παρουσιάσαμε οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο αγωνιστής των CB₁ υποδοχέων WIN 55,212-2 (σε δόσεις που πρακτικά δεν επηρεάζουν την κινητικότητα) προσβάλλει την ικανότητα μνήμης σε διάφορα επίπεδα. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να διαμεσολαβούνται από τον υποδοχέα CB₁ των κανναβινοειδών, καθώς η προχορήγηση του CB₁ ανταγωνιστή SR141716A αντέστρεψε τις συμπεριφορικές εκδηλώσεις που προκαλούνται από τη δράση του WIN 55,212-2.

Πιο συγκεκριμένα, η οξεία χορήγηση WIN 55,212-2 σε δόση 0.3 mg/kg βάρους, η οποία δεν ανέστειλε την αυθόρμητη κάθετη κινητικότητα, απέτρεψε την εγκατάσταση εξοικείωσης σε νέο περιβάλλον, η οποία αποτελεί δείκτη της μη-συνειρμικής μνήμης. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι σε μη-εξοικειωμένους επίμυες, η

συγκεκριμένη δόση του WIN 55,212-2 μπορεί να οδηγήσει σε μερική καταστολή της κινητικότητας, ενώ σε εξοικειωμένα πειραματοζώα αντίθετα, η κινητική δραστηριότητα δεν επηρεάζεται (Polissidis et al, 2010). Είναι αρκετά ενδιαφέρουσα συνεπώς η συγκεκριμένη δράση στην συγκεκριμένη πειραματική προσέγγιση μη-συνειρμικής μνήμης όπου η ίδια δόση 0.3 mg/kg οδηγεί σε αύξηση της κινητικότητας σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, καθώς η εξοικείωση σε νέο περιβάλλον αναστέλλεται. Τα ευρήματα αυτά συνάδουν με τα αποτελέσματα από τους Degroot et al (2005), σύμφωνα με τα οποία CB₁-knockout μύες επέδειξαν αυξημένη ικανότητα εξοικείωσης σε νέο περιβάλλον. Θα θέλαμε να σημειωθεί ότι δεν υπάρχουν άλλα ευρήματα στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με τη δράση των κανναβινοειδών σε εκφάνσεις της μη-συνειρμικής μνήμης. Η περαιτέρω μελέτη της μη-συνειρμικής μνήμης και μάθησης ειδικά στο ερευνητικό πεδίο των κανναβινοειδών, αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της εμπλοκής της μαζί με χαρακτηριστικά συνειρμικής μνήμης και μάθησης σε ανώτερες γνωστικές λειτουργίες και της εμφάνισης του δυσλειτουργικού της φαινοτύπου σε νευρολογικές και ψυχιατρικές διαταραχές (Poon & Yung, 2006). Με βάση τα συγκεκριμένα προαναφερθέντα ευρήματα, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι η ενεργοποίηση των CB₁ υποδοχέων προσβάλλει μη-συνειρμικά στοιχεία της μνήμης, όπως συμπεραίνεται από την αναστολή της μείωσης της κινητικής αντίδρασης λόγω εξοικείωσης και μάλιστα σε δόσεις οι οποίες πρακτικά δεν επηρεάζουν την κινητικότητα.

Τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου υποδεικνύουν ότι, η υψηλότερη δόση WIN 55,212-2 (0.3 mg/kg) που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα που περιγράφηκαν προηγουμένως, ελάττωσε την επίδοση των επίμυων. Η δράση του WIN 55,212-2 ήταν CB₁-εξαρτώμενη, αφού η προχορήγηση του ανταγωνιστή SR141716A αντέστρεψε το αποτέλεσμα αυτό.

Σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα γνωστά στοιχεία, η χορήγηση σχετικά υψηλών δόσεων CB₁ αγωνιστών που προάγουν υποκινησία επιβαρύνει την αναγνωριστική μνήμη των πειραματοζώων (Barna et al 2007, Quinn

et al 2008, Schneider et al 2008). Τα αποτελέσματα των δικών μας πειραμάτων υποδεικνύουν για πρώτη φορά με βάση όσα γνωρίζουμε, ότι σχετικά χαμηλές δόσεις WIN 55,212-2, οι οποίες μόνο οριακά δύνανται να επηρεάζουν την κινητικότητα, επιβαρύνουν τη λειτουργία της βραχυπρόθεσμης και μακροπρόθεσμης μνήμης επηρεάζοντας τα διαφορετικά στάδια της, όπως η αποθήκευση και η ανάκληση στη δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου. Προσβολή της βραχυπρόθεσμης μνήμης έχει επίσης υποστηριχθεί από τους Schneider et al (2008), μετά από χορήγηση υψηλότερης δόσης (1.2 mg/kg) WIN 55,212-2. Θα πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι στη συγκεκριμένη μελέτη το φάρμακο χορηγήθηκε 30 min πριν από την πρώτη φάση της δοκιμασίας, ενώ το μεταξύ των δύο φάσεων διάστημα ήταν 15 min. Στη συγκεκριμένη μελέτη ελέγχθηκε η επίδραση μίας υψηλής κατασταλτικής δράσης κανναβινοειδούς στη διαδικασία απόκτησης αναγνωριστικής μάθησης. Οι Baek et al (2009) έδειξαν ότι η μνήμη που σχετίζεται με την αναγνώριση νέου αντικειμένου μειώνεται, αν το WIN 55,212-2 χορηγηθεί σε δόση 1 mg/kg αμέσως μετά την πρώτη φάση και με μεσοδιάστημα μεταξύ των δύο φάσεων 30 min, έχοντας προηγηθεί η απαραίτητη εξοικείωση στο περιβάλλον του πειράματος. Σε πειράματα όπου η χορήγηση του WIN 55,212-2 δεν έγινε συστηματικά, αλλά με τοπική έγχυση σε κύτταρα CA1 του ιπποκάμπου, αμέσως μετά την πρώτη φάση της δοκιμασίας και αφού είχε προηγηθεί επαρκής εξοικείωση στον πειραματικό κλωβό τις προηγούμενες μέρες, οι Clarke et al έδειξαν (2008) ότι το WIN 55,212-2 προσβάλλει τη διατήρηση μακροπρόθεσμης μνήμης, όταν η δεύτερη φάση πραγματοποιηθεί μετά από 24h, ενώ δεν επηρεάζει τη μνήμη στην περίπτωση που η δεύτερη φάση λάβει χώρα 180 min μετά την πρώτη. Μάλιστα, με επιπλέον πειράματα δείχτηκε ότι το αποτέλεσμα αυτό δεν είναι πιθανό να οφείλεται σε άλλο πιθανώς εμπλεκόμενο φαινόμενο όπως η εκδήλωση άγχους. Σε μια άλλη μελέτη, στην οποία το μεσοδιάστημα μεταξύ των δύο φάσεων ήταν 20 min, οι Suenaga και Ichitani (2008) έδειξαν ότι η έγχυση του CB₁ αγωνιστή WIN 55,212-2 στον ιππόκαμπο πριν την πρώτη φάση του πειράματος δεν επηρέασε τη βραχυπρόθεσμη μνήμη αναγνώρισης αντικειμένου.

Οι Ciccocioppo et al (2002) αντίθετα, έδειξαν ότι η μνήμη αναγνώρισης νέου αντικειμένου προσβάλλεται μόνο σε υψηλές, κατασταλτικές για την κινητικότητα δόσεις Δ⁹-THC (10mg/kg), με CB₁-εξαρτώμενο τρόπο, αφού το αποτέλεσμα αυτό αντιστρέφεται με τη χορήγηση του ανταγωνιστή SR141716A. Ομοίως, οι Swartzwelder et al (2012) δεν εντόπισαν επιβλαβείς δράσεις της χαμηλής δόσης Δ⁹-THC (1mg/kg) στη δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου κατά τη διάρκεια της φάσης T₂, σε πειράματα όπου το ενεργό φάρμακο χορηγήθηκε αμέσως μετά τη φάση T₁ και το μεσοδιάστημα μεταξύ των φάσεων ήταν 24h. Οι Campolongo et al (2013) επίσης, παρουσίασαν αποτελέσματα επιβάρυνσης της βραχυπρόθεσμης και παράλληλα βελτίωσης της μακροπρόθεσμης μνήμης αναγνώρισης (χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ αποθήκευσης και ανάκλησης), ύστερα από χορήγηση 0.3 mg/kg WIN 55,212-2 μετά τη φάση εκπαίδευσης, ανάλογα με το αν οι επίμυες ήταν ήδη εξοικειωμένοι στον κλωβό του πειράματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι, στα πειράματά μας τα ζώα διήλθαν μια περίοδο εξοικείωσης (3 min/μέρα για 3 συνεχόμενες μέρες) κατά την οποία καταγράφηκε βαθμιαία πώση της κινητικής δραστηριότητας, προκειμένου να εγκλιματιστούν στον πειραματικό κλωβό. Η εγκατάσταση εξοικείωσης ωστόσο, δεν ήταν τόσο ισχυρή όσο στις μελέτες των Campolongo et al (2013).

Είναι προφανές ότι, αν και οι περισσότερες μελέτες υποδεικνύουν επιβάρυνση της μνήμης και των διαδικασιών μάθησης στην αναγνώριση αντικειμένου από τα κανναβινοειδή, δεν υπάρχει ξεκάθαρη εικόνα όσον αφορά στην επίδραση των ουσιών αυτών στη δοκιμασία αναγνώρισης νέων αντικειμένων. Οι διαφορές που εντοπίζονται μεταξύ των διαφόρων πειραμάτων είναι δυνατό να οφείλονται σε διαφορετικές μεθοδολογικές προσεγγίσεις, διαφορετικές οδούς χορήγησης, διαφορετικές δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν, στο σχήμα φαρμακευτικής παρέμβασης (πχ πριν ή μετά τη φάση εκπαίδευσης) όπως επίσης και στο μεσοδιάστημα μεταξύ των δύο φάσεων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου βασίζεται στην αυθόρμητη εξερευνητική δραστηριότητα, η μελέτη της οποίας απαιτεί επιλογή των κατάλληλων δόσεων προκειμένου να αποφευχθεί η επικάλυψη αποτελεσμάτων που

οφείλονται στην ελάττωση της κινητικότητας αφενός και στην επίδραση στη μάθηση και την ικανότητα αναγνώρισης νέων αντικειμένων αφετέρου. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζουμε, σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές, υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η ενεργοποίηση των CB₁ υποδοχέων, ακόμα και σε χαμηλές δόσεις που δεν επηρεάζουν την κάθετη κινητικότητα, η οποία αποτελεί δείκτη εξερεύνησης και συναισθηματικής αντίδρασης (Antonίου et al 1996, 2008, Thiel et al 1998), καθίσταται επιβλαβής για όλα τα στάδια μνήμης και μάθησης που σχετίζονται με την αναγνώριση νέου αντικειμένου, συμπεριλαμβανομένων της εγκατάστασης-σταθεροποίησης, της αποθήκευσης και της ανάκλησης βραχυπρόθεσμης και μακροπρόθεσμης μνήμης. Όπως προκύπτει από τα στοιχεία που παρατέθηκαν στην παρούσα εργασία, η σχετικά χαμηλή δόση του WIN 55,212-2 που χρησιμοποιήθηκε, λόγω των ιδιοτήτων της, είναι πιθανώς ιδιαίτερα σημαντική για τη μελέτη της μνήμης που συνδέεται με αναγνώριση αντικειμένου, τόσο βραχυπρόθεσμης όσο και μακροπρόθεσμης.

Όσον αφορά στη δοκιμασία υδάτινου ακτινωτού λαβυρίνθου, η οποία θεωρείται ιδιαίτερα ευαίσθητη στην αξιολόγηση των ικανοτήτων «χωρικής» μάθησης και μνήμης, η υποξεία χορήγηση χαμηλών δόσεων του CB₁ αγωνιστή WIN 55,212-2 δεν επηρέασε την ικανότητα των πειραματοζώων για «χωρικού τύπου» μάθηση. Τα αποτελέσματα της «μονήρους δοκιμασίας χωρικής διερεύνησης» ωστόσο, υποδηλώνουν ότι το WIN 55,212-2, στη μεγαλύτερη από τις δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν (0.3mg/kg), ελάττωσε την ικανότητα διατήρησης μνημονικών εντυπώσεων σε επίμυες, εύρημα το οποίο αντιστρέφεται με την προχορήγηση του CB₁ ανταγωνιστή SR141716A. Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν και επεκτείνουν προηγούμενα δεδομένα, τα οποία δείχνουν ότι η χορήγηση Δ⁹-THC και συνθετικών CB₁ αγωνιστών είναι επιβλαβής για τη χωρική μνήμη (Lichtman et al 1995, Mishima et al 2001, Zanettini et al 2011, Akirav 2011). Σήμερα υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι η προσβολή της χωρικής μνήμης από τα κανναβινοειδή, ιδιαίτερα σε μεγάλες δόσεις, συνδέεται άμεσα με τον εκλεκτικό

αποκλεισμό των διαδικασιών της «μνήμης εργασίας» και ιδιαίτερα εκείνων που σχετίζονται με την απόκτηση και ανάκληση της πληροφορίας (Mishima et al 2001, Lichtman et al 1995, Lichtman & Martin 1996, Wise et al 2009).

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας και λαμβάνοντας υπόψη τις διαθέσιμες αναφορές σχετικά με τη δράση των κανναβινοειδών στο μοντέλο του υδάτινου ακτινωτού λαβυρίνθου, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι η βλαπτική επίδραση των ουσιών αυτών σε τομείς της χωρικής μνήμης εξαρτάται άμεσα από τη χορηγούμενη δόση, καθώς φαίνεται ότι σχετικά χαμηλές δόσεις κανναβινοειδών επιβαρύνουν σημαντικά τη χωρική μνήμη σε τρωκτικά ενώ μεγαλύτερες δόσεις κανναβινοειδών προσβάλλουν τη μνήμη εργασίας και αναφοράς στη χωρική μνήμη στα στάδια της απόκτησης, της σταθεροποίησης και της ανάκλησης της πληροφορίας, μέσω ενεργοποίησης των CB₁ υποδοχέων.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα που παρουσιάζουμε δείχνουν ξεκάθαρα ότι σχετικά μικρές δόσεις κανναβινοειδών που δεν επηρεάζουν σημαντικά την κινητικότητα προσβάλλουν:

- τη μη συνειρμική μνήμη
- τις διαφορετικές εκφάνσεις της αναγνωριστικής μνήμης βραχυπρόθεσμης και μακροπρόθεσμης (συγκεκριμένα της αποθήκευσης και ανάκλησης)
- της χωρική μνήμη όπως αυτή καταγράφεται στη μονήρη δοκιμασία χωρικής διερεύνησης.

Η συγκεκριμένη μελέτη με τα ευρήματά της ουσιαστικά συνεισφέρει στο ερευνητικό πεδίο που αφορά στις δράσεις των κανναβινοειδών στο ΚΝΣ. Ιδιαίτερη έμφαση και σπουδαιότητα αποκτούν τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής μελέτης επειδή έχουν εστιαστεί στο ρόλο των μικρών δόσεων των κανναβινοειδών στις διαδικασίες της μνήμης και μάθησης, δεδομένης της αρκετής βιβλιογραφίας που είναι διαθέσιμη, η οποία όμως έχει μελετήσει κυρίως υψηλές κατασταλτικές δόσεις. Επιπλέον, η μελέτη της επίδρασης των μικρών δόσεων των ουσιών που

διεγείρουν τους CB1 υποδοχείς στις γνωστικές λειτουργίες αποκτά ιδιαίτερη «μεταφραστική αξία» για τη χρήση/κατάχρηση ουσιών όπως η κάνναβη, τις επιδράσεις της στη ψυχική σφαίρα και γενικότερα στην ψυχική υγεία.

Περαιτέρω μελέτες σαφώς απαιτούνται και ειδικότερα όσον αφορά στην επίδραση της χρόνιας χορήγησης μικρών δόσεων της Δ⁹-THC (το κύριο ψυχοδραστικό συστατικό της κάνναβης), των αγωνιστών των CB₁, αλλά και των CB₂ υποδοχέων σύμφωνα με τα τελευταία δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας, στις διαφορετικές εκφάνσεις της μνήμης και μάθησης και στις ανώτερες εκτελεστικές λειτουργίες. Οι μελέτες αυτές θα συνεισφέρουν ουσιαστικά στη μελέτη του νευροβιολογικού υποστρώματος της κατάχρησης ουσιών αλλά και στη διερεύνηση της ιδιαίτερα ενδιαφέρουσας αλληλεπίδρασης μεταξύ της μακροχρόνιας χρήσης κάνναβης και την εμφάνιση γνωστικών/συναισθηματικών διαταραχών και ψυχωσικού τύπου συμπτωματολογίας.

Χορήγηση κανναβινοειδών και νευροχημικές προσεγγίσεις

***Ex vivo* μελέτες**

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας έδειξαν ότι η Δ⁹-THC και το WIN 55,212-2 οδήγησαν γενικά σε αύξηση των επιπέδων γλουταμικού στον προμετωπιαίο φλοιό, το ραχιαίο ραβδωτό, τον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος και τον ιππόκαμπο, ενώ το WIN 55,212-2 μείωσε τη συγκέντρωση γλουταμικού στην αμυγδαλή (μεγαλύτερη δόση) και στον υποθάλαμο (και στις δύο δόσεις).

Ειδικότερα, η επίδραση της Δ⁹-THC στα ιστικά επίπεδα του γλουταμικού φαίνεται να είναι αυξητική στις περιοχές που μελετήθηκαν. Στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος η αύξηση των επιπέδων γλουταμικού ήταν δοσοεξαρτώμενη, ενώ στον προμετωπιαίο φλοιό, στο

ραχιαίο ραβδωτό και στον ιππόκαμπο η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε με τη μικρότερη δόση (0.75 mg/kg), επιβεβαιώνοντας μερικώς το διφασικό προφίλ δράσης που έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Tzavara et al 2003, Poddar & Dewey 1980).

Η χορήγηση του WIN 55,212-2 έδειξε ένα διαφορετικό προφίλ αποτελεσματικότητας στη μεταβολή των επιπέδων γλουταμικού. Στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος, αύξηση καταγράφηκε μόνο με τη μεγαλύτερη δόση (1 mg/kg), στο ραχιαίο ραβδωτό και με τις δύο δόσεις (0.1 και 1 mg/kg), ενώ στον προμετωπιαίο φλοιό παρατηρήθηκε αριθμητική αύξηση στη μεγαλύτερη δόση, η οποία δεν έφτασε τα επίπεδα της στατιστικής σημαντικότητας. Μη στατιστικά σημαντική αύξηση καταγράφηκε και στον ιππόκαμπο με τη μικρότερη δόση του WIN 55,212-2. Οι μοναδικές περιοχές που καταγράφηκε μείωση της συγκέντρωσης γλουταμικού ήταν η αμυγδαλή και ο υποθάλαμος με τη χορήγηση της υψηλότερης δόσης WIN 55,212-2.

Οι μεταβολές στα επίπεδα γλουταμικού που απομονώνεται από ιστικά παρασκευάσματα εκφράζουν πιθανότατα αλλαγές στην εξωκυτάρια συγκέντρωση ή/και στη γλουταματεργική νευροδιαβίβαση σε προσυναπτικό και μετασυναπτικό επίπεδο. Τα ιστικά επίπεδα και η εξωκυτάρια συγκέντρωση του γλουταμικού αντιπροσωπεύουν πιθανώς διαφορετικές δεξαμενές γλουταματεργικής λειτουργίας, στις οποίες μεταβολικές και νευροδιαβιβαστικές διεργασίες σε νευρώνες και αστροκύτταρα παίζουν ρυθμιστικό ρόλο με δυναμικό τρόπο (Gibbs et al 2008, 2007, Mc Kenna 2007, Hertz et al 2003, Baker et al 2002, Danbolt 2001). Θα μπορούσε να υποστηριχθεί ωστόσο, ότι οι παρατηρούμενες διαφορές στα ιστικά επίπεδα γλουταμικού μετά από φαρμακολογικούς χειρισμούς, αντικατοπτρίζουν μεταβολές συγκέντρωσης κατά την απελευθέρωση αλλά και την επαναπρόσληψη του γλουταμικού (Galanopoulos et al 2011). Προσπαθώντας ακόμη περισσότερο να διευκρινίσουμε το συγκεκριμένο σημείο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η αυξημένη ή μειωμένη ιστική συγκέντρωση του γλουταμικού ανά εγκεφαλική περιοχή πιθανώς δεν αντανάκλα και την

αντίστοιχη εξωκυττάρια συγκέντρωσή του λόγω των σύνθετων μηχανισμών επαναπρόσληψης και έκλυσης του γλουταμικού όπως έχουν ήδη περιγραφεί. Επιπλέον θα μπορούσε υποστηριχθεί ότι η αυξημένη ιστική συγκέντρωση λόγω χορήγησης κανναβινοειδών πιθανώς και να αντανakλά μειωμένη εξωκυττάρια συγκέντρωση λόγω των μηχανισμών της επαναπρόσληψης. Σε συμφωνία με το σκεπτικό και την συζήτηση των αποτελεσμάτων μας, αρκετές *in vivo* μελέτες έχουν καταρχήν δείξει ότι οι κανναβινεργικοί αγωνιστές μπορούν να τροποποιήσουν τη γλουταματεργική λειτουργία με εξαρτώμενο από την εγκεφαλική περιοχή τρόπο. Επιπλέον, μερικές από τις μελέτες αυτές έδειξαν ότι η ενεργοποίηση των CB₁ υποδοχέων αναστέλλει την απελευθέρωση γλουταμικού προσυναπτικά στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος, στο ραβδωτό και στον ιππόκαμπο (Sano et al 2008, Gerdeman & Lovinger 2001, Kim et al 2008). Τα ευρήματα αυτά συνδέονται με το ρόλο του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος στη συναπτική πλαστικότητα, συγκεκριμένα στις διαδικασίες της «μακροπρόθεσμης ενδυνάμωσης της συναπτικής διαβίβασης» (LTP) και της «μακροπρόθεσμης καταστολής της συναπτικής διαβίβασης» (LTD), στις οποίες εμπλέκεται η γλουταματεργική λειτουργία (Abush & Akirav 2010).

Ένα ενδιαφέρον εύρημα αφορά στις διαφορές που διαπιστώθηκαν στη μεταβολή των επιπέδων γλουταμικού από τη χορήγηση της Δ⁹-THC και του WIN 55,212-2 υποδηλώνοντας ότι η επίδραση των κανναβινοειδών στο μεταβολισμό του γλουταμικού είναι ουσιο-εξαρτώμενη. Πράγματι, το WIN 55,212-2 είναι ένας πλήρης CB₁ αγωνιστής ενώ η Δ⁹-THC είναι μερικός CB₁ αγωνιστής, με πιθανώς διαφορετικό μηχανισμό δράσης (Compton et al 1992). Η Δ⁹-THC ενδέχεται επίσης να αλληλεπιδρά και με τη λειτουργία του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος, μεταβάλλοντας κατά συνέπεια το μήνυμα των ενδογενών κανναβινοειδών (Straiker et al 2005). Τέλος, τα διαφορετικά αποτελέσματα που καταγράφηκαν στις δύο δόσεις που χορηγήθηκαν, ιδιαίτερα με το WIN 55,212-2 και η καταγραφή αύξησης των επιπέδων γλουταμικού σε μερικές περιοχές και μείωσης σε άλλες (αμυγδαλή και υποθάλαμος με το WIN 55,212-2)

αναδεικνύουν τη δυσκολία τεκμηρίωσης δοσοεξαρτώμενου αποτελέσματος, επιβεβαιώνουν μερικώς το διφασικό προφίλ δράσης των κανναβινοειδών (Tzavara et al 2003, Poddar & Dewey 1980, Davis et al 1978, Drews et al 2005, Rodvelt et al 2007, Sanudo-Pena et al 2000, Sulcova et al. 1998) και οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι κανναβινομιμητικές δράσεις είναι δοσο- και τοπο-εξαρτώμενες.

Τα αποτελέσματα των *ex vivo* μελετών μας έδειξαν ότι οι αγωνιστές των CB1 υποδοχέων Δ⁹-THC και WIN55,212-2 επηρέασαν την γλουταματεργική λειτουργία σε αρκετές εγκεφαλικές περιοχές που σχετίζονται με κινητικές λειτουργίες, συναισθηματικού τύπου αποκρίσεις, το σύστημα ανταμοιβής, τη μνήμη και τη μάθηση και τη νευροπλαστικότητα. Ιδιαίτερη σημασία αποκτά η παρατήρηση ότι οι μεταβολές στη γλουταματεργική λειτουργία παρατηρούνται ακόμη και σε χαμηλές δόσεις οι οποίες δεν χαρακτηρίζονται από καταστολή ή σημαντική δράση στις διαδικασίες μνήμης και μάθησης.

Δεδομένης της πρώτης προσέγγισης της γλουταματεργικής λειτουργίας χρησιμοποιώντας την ιστική συγκέντρωση επιλέξαμε στη συνέχεια συγκεκριμένες περιοχές για να μελετήσουμε τις μεταβολές της εξωκυττάριας συγκέντρωσης του γλουταμικού μετά από τη χορήγηση του WIN55,212-2.

***In vivo* μελέτες**

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας έδειξαν ότι το WIN55,212-2 μείωσε τα επίπεδα γλουταμικού στις υποφλοιώδεις περιοχές του επικλινούς πυρήνα του διαφράγματος (NAc) και ραβδωτού σώματος, ενώ ταυτόχρονα αύξησε τα επίπεδα γλουταμικού στον προμετωπιαίο φλοιό (PFC).

Ειδικότερα, παρατηρήθηκε μείωση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης του γλουταμικού μετά από τη χορήγηση της υψηλότερης δόσης στο ραβδωτό και μετά από τη χορήγηση και των δύο δόσεων στον επικλινή

πυρήνα του διαφράγματος. Η μείωση των επιπέδων γλουταμικού και στις δύο περιοχές είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα προηγούμενων ηλεκτροφυσιολογικών μελετών (Gerdeman & Lovinger 2001, Robbe et al 2001). Η ανασταλτική δράση των κανναβινοειδών έχει παρατηρηθεί στην παρεγκεφαλίδα, τον ιππόκαμπο, την αμυγδαλή και την μέλαινα ουσία (Azad et al 2003, Levenes et al 1998, Piomelli 2008, Shen et al 1996, Szabo et al 2000). Οι νευροχημικές μεταβολές στα επίπεδα του γλουταμικού που εντοπίστηκαν στα πειράματά μας συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα των συμπεριφορικών μελετών και τις βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την επίδραση των κανναβινοειδών στις γνωστικές λειτουργίες και ιδιαίτερα τη μνήμη. Στο ραβδωτό για παράδειγμα, έχει εντοπιστεί στατιστικά σημαντική συσχέτιση της μείωσης των επιπέδων γλουταμικού, όπως μετράται με τεχνική μαγνητικής φασματοσκοπίας, με τη έκπτωση των γνωστικών λειτουργιών των ηλικιωμένων (Zahr et al, 2008). Στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος, η τοπική χορήγηση ανταγωνιστών των υποδοχέων NMDA και AMPA σε πειραματόζωα, έχει οδηγήσει σε ελάττωση της βραχυπρόθεσμης χωρικής μνήμης σε δοκιμασίες υδάτινου λαβυρίνθου Morris (Ferreti et al 2007).

Στον προμετωπιαίο φλοιό (PFC) αντίθετα, η χορήγηση WIN 55,212-2 ειδικά κατά την υψηλότερη δόση, οδήγησε σε αύξηση των εξωκυττάρων επιπέδων του γλουταμικού. Το εύρημα αυτό υποστηρίζεται από προηγούμενες μελέτες· οι Pistis et al (2002) διαπίστωσαν αύξηση της συγκέντρωσης του γλουταμικού στον προμετωπιαίο φλοιό αναισθητοποιημένων επίμυων μετά από χορήγηση Δ⁹-THC ενώ οι Ferraro et al (2001) έδειξαν ότι το WIN 55,212-2, στις μεγαλύτερες αλλά και στις μικρότερες δόσεις, επίσης αυξάνει τα επίπεδα γλουταμικού. Σε άλλες μελέτες έχει φανεί ότι η Δ⁹-THC προκαλεί αύξηση των εξωκυττάρων επιπέδων γλουταμικού στον προμετωπιαίο φλοιό. Οι Pistis et al (2002) κατέληξαν σε αυτό το συμπέρασμα μετά από ενδοφλέβια χορήγηση Δ⁹-THC σε αναισθητοποιημένα ζώα, όπου λόγω της οδού χορήγησης, η τελική βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου στο ΚΝΣ ήταν μεγαλύτερη. Η επαγόμενη από τα κανναβινοειδή αύξηση του

γλουταμικού στον PFC είναι πιθανό να οφείλεται σε άμεσο, απευθείας ερεθισμό των τελικών απολήξεων παρακείμενων νευραξόνων, ή ακόμα σε ενίσχυση των γλουταματεργικών προβολών που προέρχονται από σχετιζόμενες φλοιώδεις ή υποφλοιώδεις περιοχές (Pistis et al 2002). Έχει υποστηριχθεί όμως και το αντίθετο, ότι τα κανναβινοειδή μειώνουν τα επίπεδα γλουταμικού στον προμετωπιαίο φλοιό, όπως φάνηκε σε μία μελέτη όπου το WIN 55,212-2 και το CP-55940 κατέστειλαν το μετασυναπτικό ρεύμα ιόντων σε τομές φλοιού. Τα διαφορετικά αποτελέσματα μεταξύ των μελετών είναι πιθανό να οφείλονται κυρίως σε μεθοδολογικές διαφορές (Auclair et al 2000).

Οι μεταβολές των επιπέδων γλουταμικού στον προμετωπιαίο φλοιό συνδέονται άμεσα με τις γνωστικές λειτουργίες και ιδιαίτερα τη μνήμη. Αξίζει να σημειωθεί ότι, φαρμακευτικές ουσίες οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των ανταγωνιστών των υποδοχέων NMDA του γλουταμικού έχουν δείξει σημαντικές επιδράσεις στις γνωστικές λειτουργίες. Η κεταμίνη, για παράδειγμα, μειώνει την επίδοση ανθρώπων υγιών εθελοντών σε δοκιμασίες λεκτικής και εξωλεκτικής δηλωτικής μνήμης (Parwani et al 2005, Newcomer et al 1999), όπως και σε δοκιμασίες ροής του λόγου και επίλυσης προβλημάτων (Krystal et al 1999). Η μεμαντίνη αντίθετα, ένας μη-συναγωνιστικός ανταγωνιστής των NMDA υποδοχέων, μέτριας συγγένειας και με ταχύτερη κινητική από την κεταμίνη (Parsons et al 2007), έχει αποδείξει σε κλινικές μελέτες ότι μπορεί να βελτιώσει τις γνωστικές λειτουργίες σε σύγκριση με την ομάδα εικονικού φαρμάκου και κυκλοφορεί με επίσημη ένδειξη από τις Ρυθμιστικές Αρχές ως αντιανοϊκό φάρμακο.

Σε ασθενείς με νόσο Alzheimer έχουν διαπιστωθεί σημαντικές διαταραχές της γλουταματεργικής διαβίβασης στον προμετωπιαίο φλοιό, όπως προκύπτει πχ. από τη μεγάλη ελάττωση των μεταφορέων των αποθηκευτικών κυστιδίων του γλουταμικού (VGLUT1 και VGLUT2) (Kashani et al 2008). Σε Ήπια Γνωστική Διαταραχή (MCI) ωστόσο, έχει παρατηρηθεί αύξηση (upregulation) των προσυναπτικών γλουταματεργικών κομβίων, η συγκέντρωση των οποίων προοδευτικά

ελαττώνεται καθώς η νόσος προχωρά (Bell et al 2007). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η έκπτωση των γνωστικών λειτουργιών που παρατηρείται στη νόσο Alzheimer είναι πιθανό να συνδέεται με μείωση της γλουταματεργικής συναπτικής διαβίβασης.

Προκειμένου να εξηγηθεί η φαινομενική αντίφαση μεταξύ των αυξημένων εξωκυττάρων επιπέδων γλουταμικού και της μειωμένης γλουταματεργικής συναπτικής διαβίβασης που διαπιστώνεται σε χορήγηση κανναβινοειδών και σε παθολογικές καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από προσβολή της μνήμης, έχουν διατυπωθεί πολλές υποθέσεις. Είναι πιθανό η αύξηση των εξωκυττάρων επιπέδων γλουταμικού να συνδέεται με ελάττωση της νευρωνικής συναπτικής διαβίβασης σε περιοχές όπως ο προμετωπιαίος φλοιός, λαμβάνοντας υπόψη τον κεντρικό ρόλο των αστροκυττάρων στο μεταβολισμό του γλουταμικού καθώς και τη συμμετοχή και άλλων μηχανισμών απελευθέρωσης γλουταμικού στον εξωκυτταρίο χώρο, όπως η αντλία κυστίνης-γλουταμικού (Gibbs et al 2008, 2007, Mc Kenna 2007, Hertz et al 2003, Baker et al 2002, Danbolt 2001).

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας που ήδη περιγράφηκαν και τη διαθέσιμη βιβλιογραφία, ο κανναβινεργικός αγωνιστής WIN 55,212-2 φαίνεται ότι μπορεί να τροποποιεί τη γλουταματεργική διαβίβαση προς δύο αντίθετες κατευθύνσεις: αυξάνοντας τα επίπεδα γλουταμικού στο φλοιό και ελαττώνοντάς τα στις υποφλοιώδεις περιοχές, δράσεις οι οποίες είναι αμφότερες CB₁ εξαρτώμενες.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η συγκεκριμένη πειραματική εργασία κατέληξε στα παρακάτω συμπεράσματα σχετικά με τον ρόλο των CB1 υποδοχέων σε διαδικασίες μνήμης και μάθησης και στο γλουταματεργικό σύστημα.

- Μικρές δόσεις του WIN 55,212-2, οι οποίες δεν επηρεάζουν σημαντικά την κινητικότητα, προσβάλουν τη μη συνειρμική μνήμη, τις διαφορετικές εκφάνσεις της αναγνωριστικής μνήμης (βραχυπρόθεσμης και μακροπρόθεσμης) και τη χωρική μνήμη.
- Χαμηλές, μη κατασταλτικές και υψηλότερες κατασταλτικές δόσεις του WIN 55,212-2 και Δ⁹-THC επηρεάζουν τη γλουταματεργική διαβίβαση, όπως αυτή εκτιμήθηκε από την ιστική συγκέντρωση και τα εξωκυττάρια επίπεδα γλουταμικού in vivo σε αρκετές εγκεφαλικές περιοχές· η επίδραση αυτή φαίνεται να εξαρτάται από τη δόση, την περιοχή και το φαρμακολογικό προφίλ της ουσίας. Ειδικότερα, η χορήγηση του WIN 55,212-2 προκάλεσε αύξηση των εξωκυττάρων συγκεντρώσεων του γλουταμικού στον προμετωπιαίο φλοιό σε αντίθεση με την μείωση των επιπέδων σε υποφλοιώδεις περιοχές.
- Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν την εμπλοκή των CB1 υποδοχέων, ακόμη και σε χαμηλές δόσεις διέγερσής τους, σε διαδικασίες μνήμης και μάθησης και στις μεταβολές του γλουταματεργικού συστήματος σε περιοχές που σχετίζονται με κινητικές λειτουργίες, με το κύκλωμα ανταμοιβής, με τη νευροπλαστικότητα και τις γνωστικές λειτουργίες.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα εξωγενώς χορηγούμενα κανναβινοειδή και το ενδογενές κανναβινοειδές σύστημα εμπλέκονται σε αρκετές φυσιολογικές λειτουργίες και διαταραχές του ΚΝΣ. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας αφορούσε στη μελέτη συγκεκριμένων συμπεριφορικών και νευροχημικών μεταβλητών μετά από τη χορήγηση κανναβινοειδών. Ειδικότερα, μελετήθηκαν οι επιδράσεις των αγωνιστών των CB1 υποδοχέων των κανναβινοειδών σε λειτουργίες μνήμης και μάθησης και στο γλουταματεργικό σύστημα. Για το σκοπό της μελέτης αυτής χρησιμοποιήθηκαν το WIN 55-212,2 και η Δ⁹-THC, το κύριο ψυχοδραστικό συστατικό της κάνναβης.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι μικρές δόσεις του WIN 55,212-2, οι οποίες δεν επηρεάζουν σημαντικά την κινητικότητα, προσβάλλουν τη μη συνειρμική μνήμη, τις διαφορετικές εκφάνσεις της αναγνωριστικής μνήμης και τη χωρική μνήμη.

Σχετικά με τη γλουταματεργική επίδραση, οι χαμηλές μη κατασταλτικές και υψηλότερες κατασταλτικές δόσεις του WIN 55,212-2 και Δ⁹-THC μετέβαλαν την ισοκίνη συγκέντρωση του γλουταμικού, σε αρκετές εγκεφαλικές περιοχές. Ειδικότερα η χορήγηση του WIN 55,212-2 προκάλεσε αύξηση των εξωκυττάρων συγκεντρώσεων του γλουταμικού στον προμετωπιαίο φλοιό σε αντίθεση με την μείωση των επίπεδων σε υποφλοιώδεις περιοχές.

Οι συγκεκριμένες ουσίες (Δ⁹-THC και WIN 55-212,2) μετά από οξεία συστηματική χορήγηση προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές στις συμπεριφορικές δοκιμασίες μνήμης και μάθησης και επίσης *ex vivo* και *in vivo* μεταβολές στη γλουταματεργική λειτουργία σε διαφορετικές εγκεφαλικές περιοχές που σχετίζονται με κινητικές λειτουργίες, το κύκλωμα ανταμοιβής, τη νευροπλαστικότητα και τις γνωστικές λειτουργίες.

ABSTRACT

Exogenous cannabinoids and the endocannabinoid system are both involved in several functions and disorders of CNS. The present study aimed to investigate specific behavioural and neurochemical changes following cannabinoid administration. In particular, the interactions between agonists of CB₁ receptors and processes of memory and learning, as well as with the glutamatergic system, were investigated. The synthetic cannabinoid WIN 55-212,2 and also Δ⁹-THC, the main psychoactive compound of cannabis, were used for the goals of this study.

Our study results showed that, low doses of WIN 55,212-2, which are not expected to affect locomotion, impair non-associative memory, different aspects of recognition memory and spatial memory as well.

Concerning glutamatergic interactions, both low, non-hypolocomotor and higher, hypolocomotor doses of WIN 55,212-2 and Δ⁹-THC altered glutamate tissue concentrations in several brain regions. More specifically, WIN 55,212-2 increased extracellular glutamate levels in the prefrontal cortex, opposingly to the glutamate decrease in subcortical areas.

In conclusion, cannabinoids used in the present study (Δ⁹-THC and WIN 55-212,2), following an acute, systemic protocol of administration, induced significant changes in behavioural tasks of memory and learning and also ex vivo and in vivo alterations in glutamatergic functions in different brain regions relating with motor activity, the reward circuitry, neural plasticity and cognition.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahmed SA, Ross SA, Slade D, Radwan MM, Zulfiqar F, Matsumoto RR, Xu YT, Viard E, Speth RC, Karamyan VT, ElSohly MA (2008) Cannabinoid ester constituents from high-potency Cannabis sativa. *J Nat Prod.* Apr;71(4):536-42
- Aboud ME, Ditto KE, Noel MA, Showalter VM, Tao Q (1997) Isolation and expression of a mouse CB1 cannabinoid receptor gene. Comparison of binding properties with those of native CB1 receptors in mouse brain and N18TG2 neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol.* Jan 24;53(2):207-14
- Aboud ME, Martin BR (1992) Neurobiology of Marijuana Abuse. *Trends in Pharmacological Sciences* 13: 201-206
- Abush H, Akirav I. (2010) Cannabinoids modulate hippocampal memory and plasticity. *Hippocampus.* Oct;20(10):1126-38.
- Adermark L, Talani G, Lovinger DM.(2009) Endocannabinoid-dependent plasticity at GABAergic and glutamatergic synapses in the striatum is regulated by synaptic activity. *Eur J Neurosci.* Jan;29(1):32-41
- Ahluwalia J, Urban L, Capogna M, Bevan S, Nagy I (2000) Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience* 100: 685-8
- Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H, Walker JM (1984) Endogenous opioids: biology and function. *Annu Rev Neurosci* 7: 223-55
- Akirav I. (2011) The role of cannabinoids in modulating emotional and non-emotional memory processes in the hippocampus. *Front Behav Neurosci.* ;5:34.
- Al-Hayani A, Wease KN, Ross RA, Pertwee RG, Davies SN (2001) The endogenous cannabinoid anandamide activates vanilloid receptors in the rat hippocampal slice. *Neuropharmacology* 41: 1000-5
- Alberich Jorda M, Rayman N, Tas M, Verbakel SE, Battista N, van Lom K, Lowenberg B, Maccarrone M, Delwel R (2004) The peripheral cannabinoid receptor Cb2, frequently expressed on AML blasts, either induces a neutrophilic differentiation block or confers abnormal migration properties in a ligand-dependent manner. *Blood* 104: 526-34
- Alger BE (2002) Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol* 68: 247-86
- Ameri A (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol* 58: 315-48
- Antonelli T, Tomasini MC, Tattoli M, Cassano T, Finetti S, Mazzoni E, Trabace L, Carratù MR, Cuomo V, Tanganelli S, Ferraro L. (2006) Prenatal exposure to the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 and carbon monoxide reduces extracellular glutamate levels in primary rat cerebral cortex cell cultures. *Neurochem Int.* Nov;49(6):568-76.
- Antoniou K, Galanopoulos A, Vlachou S, Kourouli T, Nahmias V, Thermos K, Panagis G, Daifoti Z, Marselos M, Papahatjis D, Spyraiki C (2005) Behavioral pharmacological properties of a novel cannabinoid 1',1'-dithiolane delta8-THC analog, AMG-3. *Behav Pharmacol.* 2005 Sep;16(5-6):499-510

- Antoniou K, Kafetzopoulos E (1992) Behavioral effects of amphetamine and apomorphine after striatal lesions in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 43: 705-22
- Antoniou K, Kafetzopoulos E, Papadopoulou-Daifoti Z, Hyphantis T, Marselos M (1998) D-amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 189-96
- Antoniou K, Papathanasiou G, Panagis G, Nomikos GG, Hyphantis T, Papadopoulou-Daifoti Z (2004) Individual responses to novelty predict qualitative differences in d-amphetamine-induced open field but not reward-related behaviors in rats. *Neuroscience* 123: 613-23
- Antoniou K, Papathanasiou G, Papalexi E, Hyphantis T, Nomikos GG, Spyraiki C, Papadopoulou-Daifoti Z (2008) Individual responses to novelty are associated with differences in behavioral and neurochemical profiles. *Behav Brain Res* 187: 462-72
- Arbuthnott GW, Fairbrother IS, Butcher SP (1990) Brain microdialysis studies on the control of dopamine release and metabolism in vivo. *J Neurosci Methods* 34: 73-81
- Ashton JC, Friberg D, Darlington CL, Smith PF (2006) Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neurosci Lett* 396: 113-6
- Attwell D, Laughlin SB. (2001) An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* Oct;21(10):1133-45.
- Auclair N, Otani S, Soubrie P, Crepel F (2000) Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* Jun;83(6):3287-93.
- Azad SC, Eder M, Marsicano G, Lutz B, Zieglgänsberger W, Rammes G (2003) Activation of the cannabinoid receptor type 1 decreases glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the lateral amygdala of the mouse. *Learn Mem.* Mar-Apr;10(2):116-28.
- Baker D, Pryce G (2003) The therapeutic potential of cannabis in multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* 12: 561-7
- Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR (2006) In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends in Pharmacological Sciences* 27: 1-4
- Baker DA, Xi ZX, Shen H, Swanson CJ, Kalivas PW. (2002) The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate. *J Neurosci.* 2002
- Banerjee SP, Snyder SH, Mechoulam R (1975) Cannabinoids: influence on neurotransmitter uptake in rat brain synaptosomes. *J Pharmacol Exp Ther* 194: 74-81
- Bardo MT (1998) Neuropharmacological mechanisms of drug reward: beyond dopamine in the nucleus accumbens. *Crit Rev Neurobiol* 12: 37-67
- Bénard G, Massa F, Puente N, Lourenço J, Bellocchio L, Soria-Gómez E, Matias I, Delamarre A, Metna-Laurent M, Cannich A, Hebert-Chatelain E, Mulle C, Ortega-Gutiérrez S, Martín-Fontecha M, Klugmann M, Guggenhuber S, Lutz B, Gertsch J, Chaouloff F, López-Rodríguez ML, Grandes P, Rossignol R, Marsicano G. (2012) *Nat Neurosci.* Mar 4;15(4):558-64.
- Mitochondrial CB₁ receptors regulate neuronal energy metabolism.
- Begg M, Pacher P, Batkai S, Osei-Hyiaman D, Offertaler L, Mo FM, Liu J, Kunos G (2005) Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther* 106: 133-45

- Bell KF, Bennett DA, Cuello AC (2007) Paradoxical upregulation of glutamatergic presynaptic boutons during mild cognitive impairment. *J Neurosci*. Oct 3;27(40):10810-7.
- Bell RM, Malick JB (1976) Enkephalins and endorphins: a major discovery. *JAMA* 236: 2887-8
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D (1997) Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 277: 1094-7
- Berdyshev EV (2000) Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. *Chem Phys Lipids* 108: 169-90
- Best AR, Regehr WG (2008) Serotonin evokes endocannabinoid release and retrogradely suppresses excitatory synapses. *J Neurosci*. Jun 18;28(25):6508-15
- Bevins RA, Bardo MT (1999) Conditioned increase in place preference by access to novel objects: antagonism by MK-801. *Behav Brain Res* 99: 53-60
- Boultadakis A, Georgiadou G, Pitsikas N (2010) Effects of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on different memory components as assessed in the object recognition task in the rat. *Behav Brain Res*. Feb 11;207(1):208-14.
- Boultadakis A, Pitsikas N (2010) Effects of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on recognition and spatial memory deficits produced by different NMDA receptor antagonists in the rat. *Neuropsychopharmacology*. Nov;35(12):2357-66.
- Brabant C, Quertemont E, Tirelli E (2005) Evidence that the relations between novelty-induced activity, locomotor stimulation and place preference induced by cocaine qualitatively depend upon the dose: a multiple regression analysis in inbred C57BL/6J mice. *Behav Brain Res* 158: 201-10
- Braida D, Iosue S, Pegorini S, Sala M (2004) Delta9-tetrahydrocannabinol-induced conditioned place preference and intracerebroventricular self-administration in rats. *Eur J Pharmacol* 506: 63-9
- Bramblett RD, Panu AM, Ballesteros JA, Reggio PH (1995) Construction of a 3D model of the cannabinoid CB1 receptor: determination of helix ends and helix orientation. *Life Sci* 56: 1971-82
- Bridges D, Rice AS, Egertova M, Elphick MR, Winter J, Michael GJ (2003) Localisation of cannabinoid receptor 1 in rat dorsal root ganglion using in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Neuroscience* 119: 803-12
- Brown SM, Wager-Miller J, Mackie K (2002) Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta*. Jul 19;1576(3):255-64.
- Cadas H, Gaillet S, Beltramo M, Venance L, Piomelli D (1996) Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J Neurosci* 16: 3934-42
- Cadogan AK, Alexander SP, Boyd EA, Kendall DA (1997) Influence of cannabinoids on electrically evoked dopamine release and cyclic AMP generation in the rat striatum. *J Neurochem* 69: 1131-7
- Caenazzo L, Hoehe MR, Hsieh WT, Berrettini WH, Bonner TI, Gershon ES (1991) HindIII identifies a two allele DNA polymorphism of the human cannabinoid receptor gene (CNR). *Nucleic Acids Res* 19: 4798
- Caffarel MM, Sarrio D, Palacios J, Guzman M, Sanchez C (2006) Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation. *Cancer Res* 66: 6615-21

- Caille S, Parsons LH (2006) Cannabinoid modulation of opiate reinforcement through the ventral striatopallidal pathway. *Neuropsychopharmacology* 31: 804-13
- Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D (1998) Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 394: 277-81
- Campolongo P, Morena M, Scaccianoce S, Trezza V, Chiarotti F, Schelling G, Cuomo V, Roozendaal B. (2013) Novelty-induced emotional arousal modulates cannabinoid effects on recognition memory and adrenocortical activity. *Neuropsychopharmacology*. Jun;38(7):1276-86
- Cannizzaro C, D'Amico M, Preziosi P, Martire M. (2006) Presynaptic effects of anandamide and WIN55,212-2 on glutamatergic nerve endings isolated from rat hippocampus. *Neurochem Int*. Feb;48(3):159-65.
- Carai MA, Colombo G, Gessa GL (2005) Rimonabant: the first therapeutically relevant cannabinoid antagonist. *Life Sci* 77: 2339-50
- Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral GA (2002) Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int Immunopharmacol* 2: 69-82
- Carracedo A, Lorente M, Egia A, Blazquez C, Garcia S, Giroux V, Malicet C, Villuendas R, Gironella M, Gonzalez-Feria L, Piris MA, Iovanna JL, Guzman M, Velasco G (2006) The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Cell* 9: 301-12
- Carrier EJ, Kearn CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ (2004) Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 65: 999-1007
- Castaneda E, Moss DE, Oddie SD, Wishaw IQ (1991) THC does not affect striatal dopamine release: microdialysis in freely moving rats. *Pharmacol Biochem Behav* 40: 587-91
- Chakrabarti A, Onaivi ES, Chaudhuri G (1995) Cloning and sequencing of a cDNA encoding the mouse brain-type cannabinoid receptor protein. *DNA Seq* 5: 385-8
- Chau-Pham TT (1978) The opiate receptors and the discovery of opioid-like peptides. *Drug Metab Rev* 7: 255-94
- Cheer JF, Wassum KM, Heien ML, Phillips PE, Wightman RM (2004) Cannabinoids enhance subsecond dopamine release in the nucleus accumbens of awake rats. *J Neurosci* 24: 4393-400
- Chen J, Paredes W, Lowinson JH, Gardner EL (1990a) Delta 9-tetrahydrocannabinol enhances presynaptic dopamine efflux in medial prefrontal cortex. *Eur J Pharmacol* 190: 259-62
- Chen JP, Paredes W, Lowinson JH, Gardner EL (1991) Strain-specific facilitation of dopamine efflux by delta 9-tetrahydrocannabinol in the nucleus accumbens of rat: an in vivo microdialysis study. *Neurosci Lett* 129: 136-80
- Chen K, Kandel DB, Davies M (1997) Relationships between frequency and quantity of marijuana use and last year proxy dependence among adolescents and adults in the United States. *Drug Alcohol Depend* 46: 53-67
- Childers SR, Breivogel CS (1998) Cannabis and endogenous cannabinoid systems. *Drug Alcohol Depend* 51: 173-87
- Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M. (2009) A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*. Jan;56(1):2-5.

- Compton DR, Aceto MD, Lowe J, Martin BR (1996) In vivo characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist (SR141716A): inhibition of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced responses and apparent agonist activity. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 586-94
- Compton DR, Johnson MR, Melvin LS, Martin BR (1992) Pharmacological profile of a series of bicyclic cannabinoid analogs: classification as cannabimimetic agents. *J Pharmacol Exp Ther* 260: 201-9
- Condie R, Herring A, Koh WS, Lee M, Kaminski NE (1996) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase-mediated signal transduction and interleukin 2 (IL-2) expression in the murine T-cell line, EL4.IL-2. *J Biol Chem* 271: 13175-83
- Cools AR, Ellenbroek BA, Gingras MA, Engbersen A, Heeren D (1997) Differences in vulnerability and susceptibility to dexamphetamine in Nijmegen high and low responders to novelty: a dose-effect analysis of spatio-temporal programming of behaviour. *Psychopharmacology (Berl)* 132: 181-7
- Crawley JN, Corwin RL, Robinson JK, Felder CC, Devane WA, Axelrod J (1993) Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia in vivo in rodents. *Pharmacol Biochem Behav* 46: 967-72
- Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V (2006) Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139: 1405-15
- Croci T, Manara L, Aureggi G, Guagnini F, Rinaldi-Carmona M, Maffrand JP, Le Fur G, Mukenge S, Ferla G (1998) In vitro functional evidence of neuronal cannabinoid CB1 receptors in human ileum. *Br J Pharmacol* 125: 1393-5
- Croxford JL (2003) Therapeutic potential of cannabinoids in CNS disease. *CNS Drugs* 17: 179-202
- Dalla C, Antoniou K, Drossopoulou G, Xagoraris M, Kokras N, Sfikakis A, Papadopoulou-Daifoti Z (2005) Chronic mild stress impact: are females more vulnerable? *Neuroscience* 135: 703-14
- Dalla C, Antoniou K, Kokras N, Drossopoulou G, Papathanasiou G, Bekris S, Daskas S, Papadopoulou-Daifoti Z (2008) Sex differences in the effects of two stress paradigms on dopaminergic neurotransmission. *Physiol Behav* 93: 595-605
- Danbolt NC. (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol. Sep*;65(1):1-105
- Davis RE, Midalia ND, Curnow DH (1978) Illegal drugs and nutrition in undergraduate students. *Med J Aust* 1: 617-20
- de Fonseca FR, Schneider M (2008) The endogenous cannabinoid system and drug addiction: 20 years after the discovery of the CB1 receptor. *Addict Biol* 13: 143-6
- Degroot A, Salhoff C, Davis RJ, Nomikos GG (2005) Genetic deletion of CB1 receptors improves non-associative learning. *Behav Brain Res.* 2005 Jul 1;162(1):161-4.
- De Vries TJ, Homberg JR, Binnekade R, Raaso H, Schoffelmeer AN (2003) Cannabinoid modulation of the reinforcing and motivational properties of heroin and heroin-associated cues in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 168: 164-9
- Dellu F, Piazza PV, Mayo W, Le Moal M, Simon H (1996) Novelty-seeking in rats--biobehavioral characteristics and possible relationship with the sensation-seeking trait in man. *Neuropsychobiology* 34: 136-45

- Deroche-Gamonet V, Le Moal M, Piazza PV, Soubrie P (2001) SR141716, a CB1 receptor antagonist, decreases the sensitivity to the reinforcing effects of electrical brain stimulation in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 157: 254-9
- Derocq JM, Segui M, Marchand J, Le Fur G, Casellas P (1995) Cannabinoids enhance human B-cell growth at low nanomolar concentrations. *FEBS Lett* 369: 177-82
- Deutsch DG, Chin SA (1993) Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem Pharmacol* 46: 791-6
- Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34: 605-13
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258: 1946-9
- Di Chiara G (1999) Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *Eur J Pharmacol* 375: 13-30
- Di Chiara G, Imperato A (1986) Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens by opiates, alcohol, and barbiturates: studies with transcranial dialysis in freely moving rats. *Ann N Y Acad Sci* 473: 367-81
- Di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5274-8
- Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L, Melck D, Martin BR (1999) Cannabimimetic fatty acid derivatives: the anandamide family and other endocannabinoids. *Curr Med Chem* 6: 721-44
- Di Marzo V, Petrosino S (2007) Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol* 18: 129-40
- Diana MA, Levenes C, Mackie K, Marty A (2002) Short-term retrograde inhibition of GABAergic synaptic currents in rat Purkinje cells is mediated by endogenous cannabinoids. *J Neurosci* 22: 200-8
- Dinh TP, Freund TF, Piomelli D (2002) A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids* 121: 149-58
- Downer EJ (2011) Cannabinoids and innate immunity: taking a toll on neuroinflammation. *ScientificWorldJournal*. Apr 5;11:855-65
- Drews E, Schneider M, Koch M (2005) Effects of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on operant behavior and locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 80: 145-50
- Driscoll CD, Chen JS, Riley EP (1982) Passive avoidance performance in rats prenatally exposed to alcohol during various periods of gestation. *Neurobehav Toxicol Teratol* 4: 99-103
- Egertova M, Elphick MR (2000) Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J Comp Neurol* 422: 159-71
- El Khoury MA, Gorgievski V, Moutsimilli L, Giros B, Tzavara ET. (2012) Interactions between the cannabinoid and dopaminergic systems: evidence from animal studies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. Jul 2;38(1):36-50.

- Elphick MR, Egertová M. (2001) The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Mar 29;356(1407):381-408.
- Elphick MR, Satou Y, Satoh N. (2003) The invertebrate ancestry of endocannabinoid signalling: an orthologue of vertebrate cannabinoid receptors in the urochordate *Ciona intestinalis*. *Gene.* Jan 2;302(1-2):95-101
- Fadda P, Scherma M, Spano MS, Salis P, Melis V, Fattore L, Fratta W (2006) Cannabinoid self-administration increases dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuroreport* 17: 1629-32
- Farquhar-Smith WP, Egertova M, Bradbury EJ, McMahon SB, Rice AS, Elphick MR (2000) Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol Cell Neurosci* 15: 510-21
- Fattore L, Cossu G, Martellotta CM, Fratta W (2001) Intravenous self-administration of the cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55,212-2 in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 156: 410-6
- Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 48: 443-50
- Fernandez-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolon RM, Ramos JA, Guzman M (2007) Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends in Pharmacological Sciences* 28: 39-45
- Fernandez JR, Allison DB (2004) Rimonabant Sanofi-Synthelabo. *Curr Opin Investig Drugs* 5: 430-5
- Ferrari F, Ottani A, Giuliani D (1999) Influence of the cannabinoid agonist HU 210 on cocaine- and CQP 201-403-induced behavioural effects in rat. *Life Sci* 65: 823-31
- Ferraro L, Tomasini MC, Beggiano S, Gaetani S, Cassano T, Cuomo V, Amoroso S, Tanganelli S, Antonelli T (2009) Short- and long-term consequences of prenatal exposure to the cannabinoid agonist WIN55,212-2 on rat glutamate transmission and cognitive functions. *J Neural Transm.* Aug;116(8):1017-2
- Ferraro L, Tomasini MC, Gessa GL, Bebe BW, Tanganelli S, Antonelli T. (2001) The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 regulates glutamate transmission in rat cerebral cortex: an in vivo and in vitro study. *Cereb Cortex.* Aug;11(8):728-33.
- Fezza F, Bisogno T, Minassi A, Appendino G, Mechoulam R, Di Marzo V (2002) Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues. *FEBS Lett* 513: 294-8
- Forget B, Hamon M, Thiebot MH (2005) Cannabinoid CB1 receptors are involved in motivational effects of nicotine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 181: 722-34
- Fowler CJ (2006) The cannabinoid system and its pharmacological manipulation--a review, with emphasis upon the uptake and hydrolysis of anandamide. *Fundam Clin Pharmacol* 20: 549-62
- Fowler CJ, Tiger G, Lopez-Rodriguez ML, Viso A, Ortega-Gutierrez S, Ramos JA (2003) Inhibition of fatty acid amidohydrolase, the enzyme responsible for the metabolism of the endocannabinoid anandamide, by analogues of arachidonoyl-serotonin. *J Enzyme Inhib Med Chem* 18: 225-31

- Freiman I, Szabo B (2005) Cannabinoids depress excitatory neurotransmission between the subthalamic nucleus and the globus pallidus. *Neuroscience* 133: 305-13
- French ED, Dillon K, Wu X (1997) Cannabinoids excite dopamine neurons in the ventral tegmentum and substantia nigra. *Neuroreport* 8: 649-52
- Fride E, Ffox A, Rosenberg E, Faigenboim M, Cohen V, Barda L, Blau H, Mechoulam R (2003) Milk intake and survival in newborn cannabinoid CB1 receptor knockout mice: evidence for a "CB3" receptor. *Eur J Pharmacol* 461: 27-34
- Fride E, Mechoulam R (1993) Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent. *Eur J Pharmacol* 231: 313-4
- Fujiwara M, Egashira N. (2004) New perspectives in the studies on endocannabinoid and cannabis: abnormal behaviors associate with CB1 cannabinoid receptor and development of therapeutic application. *J Pharmacol Sci.* Dec;96(4):362-6
- Fukudome Y, Ohno-Shosaku T, Matsui M, Omori Y, Fukaya M, Tsubokawa H, Taketo MM, Watanabe M, Manabe T, Kano M. (2004) Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling. *Eur J Neurosci.* May;19(10):2682-92.
- Galanopoulos A, Polissidis A, Georgiadou G, Marselos M, Papadopoulou-Daifoti Z, Nomikos GG, Pitsikas N, Antoniou K WIN 55,212-2 impairs non-associative, recognition and spatial memory in rats via CB1 receptor stimulation. *Behav Brain Res* (approved for publication)
- Galanopoulos A, Polissidis A, Papadopoulou-Daifoti Z, Nomikos GG, Antoniou K (2011) $\Delta(9)$ -THC and WIN55,212-2 affect brain tissue levels of excitatory amino acids in a phenotype-, compound-, dose-, and region-specific manner. *Behav Brain Res.* Oct 10;224(1):65-72.
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1995) Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 232: 54-61
- Gallant M, Dufresne C, Gareau Y, Guay D, Leblanc Y, Prasit P, Rochette C, Sawyer N, Slipetz DM, Tremblay N, Metters KM, Labelle M (1996) New class of potent ligands for the human peripheral cannabinoid receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 6: 2263-68
- Gaoni Y, Mechoulam R (1964) Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 86:1646-47
- Gardner EL (2002) Addictive potential of cannabinoids: the underlying neurobiology. *Chem Phys Lipids* 121: 267-90
- Gardner EL (2005) Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 263-84
- Gardner EL, Vorel SR (1998) Cannabinoid transmission and reward-related events. *Neurobiol Dis* 5: 502-33
- Gareau Y, Dufresne C, Gallant M, Rochette C, Sawyer N, Slipetz DM, Tremblay N, Weech PK, Metters KM, Labelle M (1996) Structure activity relationships of tetrahydrocannabinol analogues on human cannabinoid receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 6: 189-194
- Gelfand EV, Cannon CP (2006) Rimonabant: a cannabinoid receptor type 1 blocker for management of multiple cardiometabolic risk factors. *J Am Coll Cardiol* 47: 1919-26

- Gérard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. (1991) Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J.* 1991 Oct 1;279 (Pt 1):129-34.
- Gerdeman G, Lovinger DM (2001) CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol.* Jan;85(1):468-71
- Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM. (2002) Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci.* May;5(5):446-51.
- Gibbs ME, Hutchinson D, Hertz L. (2008) Astrocytic involvement in learning and memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev.* Jul;32(5):927-44
- Gibbs ME, Lloyd HG, Santa T, Hertz L.(2007) Glycogen is a preferred glutamate precursor during learning in 1-day-old chick: biochemical and behavioral evidence. *J Neurosci Res.* Nov 15;85(15):3326-33.
- Gifford AN, Tang Y, Gatley SJ, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A (1997) Effect of the cannabinoid receptor SPECT agent, AM 281, on hippocampal acetylcholine release from rat brain slices. *Neurosci Lett* 238: 84-6
- Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D (1999) Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* 2: 358-63
- Glass M, Faull RL, Dragunow M (1993) Loss of cannabinoid receptors in the substantia nigra in Huntington's disease. *Neuroscience* 56: 523-7
- Glass M, Felder CC (1997) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci* 17: 5327-33
- Glass M, Northup JK (1999) Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. *Mol Pharmacol* 56: 1362-9
- Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR (2006) Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 1071: 10-23
- Gorriti MA, Ferrer B, del Arco I, Bermudez-Silva FJ, de Diego Y, Fernandez-Espejo E, Navarro M, Rodriguez de Fonseca F (2005) Acute delta9-tetrahydrocannabinol exposure facilitates quinpirole-induced hyperlocomotion. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 71-7
- Gorriti MA, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Palomo T (1999) Chronic (-)-delta9-tetrahydrocannabinol treatment induces sensitization to the psychomotor effects of amphetamine in rats. *Eur J Pharmacol* 365: 133-42
- Grant I, Cahn BR (2005) Cannabis and endocannabinoid modulators: Therapeutic promises and challenges. *Clin Neurosci Res* 5: 185-199
- Griffin G, Wray EJ, Tao Q, McAllister SD, Rorrer WK, Aung MM, Martin BR, Aboud ME (1999) Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system. *Eur J Pharmacol* 377: 117-25
- Grinspoon L, Bakalar JB (1995) Marijuana as medicine. A plea for reconsideration. *JAMA.* Jun 21;273(23):1875-6
- Guzman M (2003) Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 3: 745-55
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R (2001) 2-arachidonoyl glyceryl ether, an endogenous

- agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3662-5
- Hanus L, Breuer A, Tchilibon S, Shiloah S, Goldenberg D, Horowitz M, Pertwee RG, Ross RA, Mechoulam R, Fride E (1999) HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14228-33
- Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Kano M (2007) Ca(2+)-assisted receptor-driven endocannabinoid release: mechanisms that associate presynaptic and postsynaptic activities. *Curr Opin Neurobiol.* Jun;17(3):360-5
- Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Tsubokawa H, Ogata H, Emoto K, Maejima T, Araishi K, Shin HS, Kano M. (2005) Phospholipase Cbeta serves as a coincidence detector through its Ca2+ dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. *Neuron.* Jan 20;45(2):257-68.
- Hattendorf C, Hattendorf M, Coper H, Fernandes M (1977) Interaction between delta(9)-tetrahydrocannabinol and d-amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* 54: 177-82
- Heifets BD, Castillo PE. (2009) Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol.* 71:283-306
- Herkenham M, Lynn AB, de Costa BR, Richfield EK (1991a) Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res* 547: 267-74
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1991b) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11: 563-83
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1932-6
- Hernandez-Tristan R, Arevalo C, Canals S, Leret ML (2000) The effects of acute treatment with delta9-THC on exploratory behaviour and memory in the rat. *J Physiol Biochem* 56: 17-24
- Hershkowitz M, Szechtman H (1979) Pretreatment with delta 1-tetrahydrocannabinol and psychoactive drugs: effects on uptake of biogenic amines and on behavior. *Eur J Pharmacol* 59: 267-76
- Hertz L. (2004) Intercellular metabolic compartmentation in the brain: past, present and future. *Neurochem Int.* Jul-Aug;45(2-3):285-96.
- Hertz L, Hertz E. (2003) Cataplerotic TCA cycle flux determined as glutamate-sustained oxygen consumption in primary cultures of astrocytes. *Neurochem Int.* Sep-Oct;43(4-5):355-61.
- Hillard CJ, Harris RA, Bloom AS (1985) Effects of the cannabinoids on physical properties of brain membranes and phospholipid vesicles: fluorescence studies. *J Pharmacol Exp Ther* 232: 579-88
- Ho BY, Uezono Y, Takada S, Takase I, Izumi F (1999) Coupling of the expressed cannabinoid CB1 and CB2 receptors to phospholipase C and G protein-coupled inwardly rectifying K+ channels. *Receptors Channels* 6: 363-74
- Hoehe MR, Caenazzo L, Martinez MM, Hsieh WT, Modi WS, Gershon ES, Bonner TI (1991) Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15. *New Biol* 3: 880-5
- Hohmann AG, Herkenham M (1999) Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root

- ganglia: a double-label in situ hybridization study. *Neuroscience* 90: 923-31
- Howlett AC (1984) Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantradol compounds. *Life Sci* 35: 1803-10
- Howlett AC (1985) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* 27: 429-36
- Howlett AC (2002) The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 619-31
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54: 161-202
- Howlett AC, Fleming RM (1984) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* 26: 532-8
- Howlett AC, Mukhopadhyay S (2000) Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem Phys Lipids* 108: 53-70
- Howlett AC, Qualy JM, Khachatrian LL (1986) Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol* 29: 307-13
- Hsu EH, Schroeder JP, Packard MG (2002) The amygdala mediates memory consolidation for an amphetamine conditioned place preference. *Behav Brain Res* 129: 93-100
- Huang R, Kala G, Murthy RK, Hertz L (1994) Effects of chronic exposure to ammonia on glutamate and glutamine interconversion and compartmentation in homogeneous primary cultures of mouse astrocytes. *Neurochem Res*. Mar;19(3):257-65.
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8400-5
- Huestis MA (2007) Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chem Biodivers* 4: 1770-804
- Huffman JW (2005) CB2 receptor ligands. *Mini Rev Med Chem* 5: 641-9
- Huffman JW, Yu S, Showalter V, Abood ME, Wiley JL, Compton DR, Martin BR, Bramblett RD, Reggio PH (1996) Synthesis and pharmacology of a very potent cannabinoid lacking a phenolic hydroxyl with high affinity for the CB2 receptor. *J Med Chem* 39: 3875-7
- Hungund BL, Basavarajappa BS, Vadasz C, Kunos G, Rodriguez de Fonseca F, Colombo G, Serra S, Parsons L, Koob GF (2002) Ethanol, endocannabinoids, and the cannabinoidergic signaling system. *Alcohol Clin Exp Res* 26: 565-74
- Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME, Kunos G (1996) Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol* 118: 2023-8
- Iversen L (2003) Cannabis and the brain. *Brain* 126: 1252-70
- Jaggari SI, Hasnie FS, Sellaturay S, Rice AS (1998) The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain* 76: 189-99

- Jentsch JD, Wise A, Katz Z, Roth RH (1998) Alpha-noradrenergic receptor modulation of the phencyclidine- and delta9-tetrahydrocannabinol-induced increases in dopamine utilization in rat prefrontal cortex. *Synapse* 28: 21-6
- Jin R, Banke TG, Mayer ML, Traynelis SF, Gouaux E (2003) Structural basis for partial agonist action at ionotropic glutamate receptors. *Nat Neurosci.* Aug;6(8):803-10
- Johnson KM, Ho BT, Dewey WL (1976) Effects of delta9-tetrahydrocannabinol on neurotransmitter accumulation and release mechanisms in rat forebrain synaptosomes. *Life Sci* 19: 347-56
- Justinova Z, Tanda G, Redhi GH, Goldberg SR (2003) Self-administration of delta9-tetrahydrocannabinol (THC) by drug naive squirrel monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* 169: 135-40
- Kalivas PW, Duffy P (1990) Effect of acute and daily neurotensin and enkephalin treatments on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 10: 2940-9
- Kalivas PW, Volkow ND (2005) The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 162: 1403-13
- Kano M, Hashimoto K (2009) Synapse elimination in the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* Apr;19(2):154-6
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto Y, Uchigashima M, Watanabe M. (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev.* Jan;89(1):309-80
- Kashani A, Lericard E, Poirel O, Videau C, David JP, Fallet-Bianco C, Simon A, Delacourte A, Giros B, Epelbaum J, Betancur C, El Mestikawy S (2008) Loss of VGLUT1 and VGLUT2 in the prefrontal cortex is correlated with cognitive decline in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging.* Nov;29(11):1619-30.
- Katona I, Sperlagh B, Sik A, Kafalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF (1999) Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* 19: 4544-58
- Kim J, Isokawa M, Ledent C, Alger BE (2002) Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus. *J Neurosci* 22: 10182-91
- Kim HJ, Waataja JJ, Thayer SA (2008) Cannabinoids inhibit network-driven synapse loss between hippocampal neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther.* Jun;325(3):850-8.
- Kishimoto S, Muramatsu M, Gokoh M, Oka S, Waku K, Sugiura T (2005) Endogenous cannabinoid receptor ligand induces the migration of human natural killer cells. *J Biochem* 137: 217-23
- Kiyatkin EA, Stein EA (1996) Conditioned changes in nucleus accumbens dopamine signal established by intravenous cocaine in rats. *Neurosci Lett* 211: 73-6
- Koob GF (1992) Neural mechanisms of drug reinforcement. *Ann N Y Acad Sci* 654: 171-91
- Krasnova IN, Li SM, Wood WH, McCoy MT, Prabhu VV, Becker KG, Katz JL, Cadet JL (2008) Transcriptional responses to reinforcing effects of cocaine in the rat hippocampus and cortex. *Genes Brain Behav* 7: 193-202
- Kreitzer AC, Regehr WG (2001a) Cerebellar depolarization-induced suppression of inhibition is mediated by endogenous cannabinoids. *J Neurosci* 21: RC174

- Kreitzer AC, Regehr WG (2001b) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* 29: 717-27
- Krystal JH, D'Souza DC, Karper LP, Bennett A, Abi-Dargham A, Abi-Saab D, Cassello K, Bowers MB Jr, Vegso S, Heninger GR, Charney DS (1999) Interactive effects of subanesthetic ketamine and haloperidol in healthy humans. *Psychopharmacology (Berl)*. Jul;145(2):193-204.
- Lamarque S, Taghzouti K, Simon H (2001) Chronic treatment with Delta(9)-tetrahydrocannabinol enhances the locomotor response to amphetamine and heroin. Implications for vulnerability to drug addiction. *Neuropharmacology* 41: 118-29
- Le Foll B, Goldberg SR (2005) Cannabinoid CB1 receptor antagonists as promising new medications for drug dependence. *J Pharmacol Exp Ther* 312: 875-83
- Lecca D, Cacciapaglia F, Valentini V, Di Chiara G (2006) Monitoring extracellular dopamine in the rat nucleus accumbens shell and core during acquisition and maintenance of intravenous WIN 55,212-2 self-administration. *Psychopharmacology (Berl)* 188: 63-74
- Lévénés C, Daniel H, Soubrié P, Crépel F (1998) Cannabinoids decrease excitatory synaptic transmission and impair long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells. *J Physiol*. Aug 1;510 (Pt 3):867-79.
- Lichtman AH, Dimen KR, Martin BR. (1995) Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. Jun;119(3):282-90.
- Lichtman AH, Martin BR (1996) Delta 9-tetrahydrocannabinol impairs spatial memory through a cannabinoid receptor mechanism. *Psychopharmacology (Berl)*. 1996 Jul;126(2):125-31.
- Llano I, Leresche N, Marty A (1991) Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron* 6: 565-74
- Lopez-Moreno JA, Gonzalez-Cuevas G, Moreno G, Navarro M (2008) The pharmacology of the endocannabinoid system: functional and structural interactions with other neurotransmitter systems and their repercussions in behavioral addiction. *Addict Biol* 13: 160-87
- Lu Q, Straiker A, Maguire G (2000) Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina. *Vis Neurosci* 17: 91-5
- McKenna MC. (2007) The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res*. Nov 15;85(15):3347-58.
- McKenna MC, Sonnewald U, Huang X, Stevenson J, Zielke HR (1996) Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J Neurochem*. Jan;66(1):386-93.
- McKenna MC, Tildon JT, Stevenson JH, Huang X. (1996) New insights into the compartmentation of glutamate and glutamine in cultured rat brain astrocytes. *Dev Neurosci*. 18(5-6):380-90.
- McKenna MC, Tildon JT, Stevenson JH, Huang X, Kingwell KG (1995) Regulation of mitochondrial and cytosolic malic enzymes from cultured rat brain astrocytes. *Neurochem Res*. Dec;20(12):1491-501.
- Mackie K (2006) Cannabinoid receptors as therapeutic targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 101-22
- Mackie K (2008) Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Mol Cell Endocrinol* 286: S60-5
- Maejima T, Hashimoto K, Yoshida T, Aiba A, Kano M. (2001) Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron*. Aug 16;31(3):463-75.

- Maejima T, Oka S, Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Aiba A, Wu D, Waku K, Sugiura T, Kano M. (2005) Synaptically driven endocannabinoid release requires Ca²⁺-assisted metabotropic glutamate receptor subtype 1 to phospholipase C β 4 signaling cascade in the cerebellum. *J Neurosci*. Jul 20;25(29):6826-35.
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992) Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 48: 655-68
- Mailleux P, Verslijpe M, Vanderhaeghen JJ (1992) Initial observations on the distribution of cannabinoid receptor binding sites in the human adult basal ganglia using autoradiography. *Neurosci Lett* 139: 7-9
- Maldonado R (2002) Study of cannabinoid dependence in animals. *Pharmacol Ther* 95: 153-64
- Maldonado R (2003) The neurobiology of addiction. *J Neural Transm Suppl*: 1-14
- Maldonado R, Rodriguez de Fonseca F (2002) Cannabinoid addiction: behavioral models and neural correlates. *J Neurosci* 22: 3326-31
- Maldonado R, Valverde O, Berrendero F (2006) Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci* 29: 225-32
- Malone DT, Taylor DA (1999) Modulation by fluoxetine of striatal dopamine release following Delta9-tetrahydrocannabinol: a microdialysis study in conscious rats. *Br J Pharmacol* 128: 21-6
- Marsicano G, Lutz B (1999) Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci* 11: 4213-25
- Martellotta MC, Cossu G, Fattore L, Gessa GL, Fratta W (1998) Self-administration of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 in drug-naive mice. *Neuroscience* 85: 327-30
- Martin BR (2002) Identification of the endogenous cannabinoid system through integrative pharmacological approaches. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 790-6
- Mato S, Chevaleyre V, Robbe D, Pazos A, Castillo PE, Manzoni OJ (2004) A single in-vivo exposure to delta 9THC blocks endocannabinoid-mediated synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 7: 585-6
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 6284: 561-64.
- Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ (1993) Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol* 327: 535-50
- McAllister SD, Griffin G, Satin LS, Abood ME (1999) Cannabinoid receptors can activate and inhibit G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in a xenopus oocyte expression system. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 618-26
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50: 83-90
- Mechoulam R, Hanu L (2001) The cannabinoids: an overview. Therapeutic implications in vomiting and nausea after cancer chemotherapy, in appetite promotion, in multiple sclerosis and in neuroprotection. *Pain Res Manag* 6: 67-73

- Melvin LS, Milne GM, Johnson MR, Subramaniam B, Wilken GH, Howlett AC (1993) Structure-activity relationships for cannabinoid receptor-binding and analgesic activity: studies of bicyclic cannabinoid analogs. *Mol Pharmacol* 44: 1008-15
- Meyers RA, Zavala AR, Speer CM, Neisewander JL (2006) Dorsal hippocampus inhibition disrupts acquisition and expression, but not consolidation, of cocaine conditioned place preference. *Behav Neurosci* 120: 401-12
- Mishima K, Egashira N, Hirose N, Fujii M, Matsumoto Y, Iwasaki K, Fujiwara M (2001) Characteristics of learning and memory impairment induced by delta9-tetrahydrocannabinol in rats. *Jpn J Pharmacol*. Dec;87(4):297-308.
- Miura H, Qiao H, Ohta T (2002) Influence of aging and social isolation on changes in brain monoamine turnover and biosynthesis of rats elicited by novelty stress. *Synapse* 46: 116-24
- Moreira FA, Guimaraes FS (2005) Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. *Eur J Pharmacol* 512: 199-205
- Moreno M, Lopez-Moreno JA, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M (2005) Behavioural effects of quinpirole following withdrawal of chronic treatment with the CB1 agonist, HU-210, in rats. *Behav Pharmacol* 16: 441-6
- Moss J, Bolam JP. (2008) A dopaminergic axon lattice in the striatum and its relationship with cortical and thalamic terminals. *J Neurosci*. Oct 29;28(44):11221-30.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365: 61-5
- Murray RM, Morrison PD, Henquet C, Di Forti M (2007) Cannabis, the mind and society: the hash realities. *Nat Rev Neurosci* 8: 885-95
- Muschamp JW, Sivity SM (2002) Behavioral sensitization to amphetamine follows chronic administration of the CB1 agonist WIN 55,212-2 in Lewis rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73: 835-42
- Musella A, De Chiara V, Rossi S, Prosperetti C, Bernardi G, Maccarrone M, Centonze D.(2009) RPV1 channels facilitate glutamate transmission in the striatum. *Mol Cell Neurosci*. Jan;40(1):89-97
- Navarrete M, Araque A (2010) Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron*. Oct 6;68(1):113-26.
- Navarro M, Carrera MR, Fratta W, Valverde O, Cossu G, Fattore L, Chowen JA, Gomez R, del Arco I, Villanua MA, Maldonado R, Koob GF, Rodriguez de Fonseca F (2001) Functional interaction between opioid and cannabinoid receptors in drug self-administration. *J Neurosci* 21: 5344-50
- Navarro M, Fernandez-Ruiz JJ, de Miguel R, Hernandez ML, Cebeira M, Ramos JA (1993a) An acute dose of delta 9-tetrahydrocannabinol affects behavioral and neurochemical indices of mesolimbic dopaminergic activity. *Behav Brain Res* 57: 37-46
- Navarro M, Fernandez-Ruiz JJ, De Miguel R, Hernandez ML, Cebeira M, Ramos JA (1993b) Motor disturbances induced by an acute dose of delta 9-tetrahydrocannabinol: possible involvement of nigrostriatal dopaminergic alterations. *Pharmacol Biochem Behav* 45: 291-8
- Narushima M, Uchigashima M, Fukaya M, Matsui M, Manabe T, Hashimoto K, Watanabe M, Kano M (2007) Tonic enhancement of endocannabinoid-mediated retrograde suppression of inhibition by

- cholinergic interneuron activity in the striatum. *J Neurosci.* Jan 17;27(3):496-506
- Nevian T, Sakmann B. (2006) Spine Ca²⁺ signaling in spike-timing-dependent plasticity. *J Neurosci.* Oct 25;26(43):11001-13
- Newcomer JW, Farber NB, Jevtovic-Todorovic V, Selke G, Melson AK, Hershey T, Craft S, Olney JW (1999) Ketamine-induced NMDA receptor hypofunction as a model of memory impairment and psychosis. *Neuropsychopharmacology.* Feb;20(2):106-18.
- Ng Cheong Ton JM, Gerhardt GA, Friedemann M, Etgen AM, Rose GM, Sharpless NS, Gardner EL (1988) The effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on potassium-evoked release of dopamine in the rat caudate nucleus: an in vivo electrochemical and in vivo microdialysis study. *Brain Res* 451: 59-68
- Nomikos GG, Spyraiki C (1988) Cocaine-induced place conditioning: importance of route of administration and other procedural variables. *Psychopharmacology (Berl)* 94: 119-25
- Norenberg MD, Martinez-Hernandez A (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* Feb 2;161(2):303-10.
- Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* 29: 729-38
- Ohno-Shosaku T, Tanimura A, Hashimoto Y, Kano M (2012) Endocannabinoids and retrograde modulation of synaptic transmission. *Neuroscientist.* Apr;18(2):119-32
- Oka S, Ikeda S, Kishimoto S, Gokoh M, Yanagimoto S, Waku K, Sugiura T (2004) 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces the migration of EoL-1 human eosinophilic leukemia cells and human peripheral blood eosinophils. *J Leukoc Biol* 76: 1002-9
- Oka S, Yanagimoto S, Ikeda S, Gokoh M, Kishimoto S, Waku K, Ishima Y, Sugiura T (2005) Evidence for the involvement of the cannabinoid CB2 receptor and its endogenous ligand 2-arachidonoylglycerol in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced acute inflammation in mouse ear. *J Biol Chem* 280: 18488-97
- Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N (2004) Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem* 279: 5298-305
- Onaivi ES, Chakrabarti A, Chaudhuri G (1996) Cannabinoid receptor genes. *Prog Neurobiol* 48: 275-305
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Hope B, Iwasaki S, Arinami T, Teasenfitz L, Uhl GR (2006) Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci* 1074: 514-36
- Padwal RS, Majumdar SR (2007) Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. *Lancet* 369: 71-7
- Panagis G, Vlachou S, Nomikos GG (2008) Behavioral Pharmacology of Cannabinoids with a Focus on Preclinical Models for Studying Reinforcing and Dependence-Producing Properties. *Current Drug Abuse Reviews:* 350-374
- Panlilio LV, Solinas M, Matthews SA, Goldberg SR (2007) Previous exposure to THC alters the reinforcing efficacy and anxiety-related effects of cocaine in rats. *Neuropsychopharmacology* 32: 646-57

- Papadopoulou-Daifotis Z, Antoniou K, Vamvakidis A, Kalliteraki I, Varonos D (1995) Neurochemical changes in dopamine and serotonin turnover rate in discrete regions of rat brain after the administration of glycinergic compounds. *Acta Ther* 21: 5–18
- Parsons CG, Stöffler A, Danysz W (2007) Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology*. Nov;53(6):699-723
- Parwani A, Weiler MA, Blaxton TA, Warfel D, Hardin M, Frey K, Lahti AC (2005) The effects of a subanesthetic dose of ketamine on verbal memory in normal volunteers. *Psychopharmacology (Berl)*. Dec;183(3):265-74. Epub 2005 Oct 12.
- Patel S, Hillard CJ (2003) Cannabinoid-induced Fos expression within A10 dopaminergic neurons. *Brain Res* 963: 15-25
- Paton WD (1975) Pharmacology of marijuana. *Annu Rev Pharmacol* 15: 191-220
- Pawlak CR, Ho YJ, Schwarting RK (2008) Animal models of human psychopathology based on individual differences in novelty-seeking and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 32: 1544-68
- Pertwee RG (2012) Targeting the endocannabinoid system with cannabinoid receptor agonists: pharmacological strategies and therapeutic possibilities. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. Dec 5;367(1607):3353-63
- Pertwee RG (1988) The central neuropharmacology of psychotropic cannabinoids. *Pharmacol Ther* 36: 189-261
- Pertwee RG (1997) Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 74: 129-80
- Pertwee RG (1999) Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 6: 635-64
- Pertwee RG (2000) Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development. *Expert Opin Investig Drugs* 9: 1553-71
- Pertwee RG (2001a) Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol* 63: 569-611
- Pertwee RG (2001b) Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* 48: 859-67
- Pertwee RG (2005) Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*: 1-51
- Pertwee RG, Ross TM (1991) Drugs which stimulate or facilitate central cholinergic transmission interact synergistically with delta-9-tetrahydrocannabinol to produce marked catalepsy in mice. *Neuropharmacology* 30: 67-71
- Pertwee RG, Thomas A, Stevenson LA, Maor Y, Mechoulam R (2005) Evidence that (-)-7-hydroxy-4'-dimethylheptyl-cannabidiol activates a non-CB(1), non-CB(2), non-TRPV1 target in the mouse vas deferens. *Neuropharmacology* 48: 1139-46
- Petitot F, Jeantaud B, Bertrand P, Imperato A (1999) Cannabinoid penetration into mouse brain as determined by ex vivo binding. *Eur J Pharmacol* 374: 417-21
- Pierce RC, Kumaresan V (2006) The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev* 30: 215-38
- Pintor A, Tebano MT, Martire A, Grieco R, Galluzzo M, Scattoni ML, Pèzzola A, Coccurello R, Felici F, Cuomo V, Piomelli D, Calamandrei G, Popoli

- P. (2006) The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 attenuates the effects induced by quinolinic acid in the rat striatum. *Neuropharmacology*. Oct;51(5):1004-12
- Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4: 873-84
- Piomelli D, Beltramo M, Glasnapp S, Lin SY, Goutopoulos A, Xie XQ, Makriyannis A (1999) Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5802-7
- Pistis M, Ferraro L, Pira L, Flore G, Tanganelli S, Gessa GL, Devoto P (2002) Delta(9)-tetrahydrocannabinol decreases extracellular GABA and increases extracellular glutamate and dopamine levels in the rat prefrontal cortex: an in vivo microdialysis study. *Brain Res* 948: 155-8
- Pitler TA, Alger BE (1992) Cholinergic excitation of GABAergic interneurons in the rat hippocampal slice. *J Physiol* 450: 127-42
- Pitsikas N. (2009) The nitric oxide (NO) donor molsidomine antagonizes scopolamine and L-NAME-induced performance deficits in a spatial memory task in the rat. *Behav Brain Res*. Jun 8;200(1):160-4
- Pitsikas N, Algeri S (1992) Deterioration of spatial and nonspatial reference and working memory in aged rats: protective effect of life-long calorie restriction. *Neurobiol Aging*. May-Jun;13(3):369-73
- Pitsikas N, Boultsadakis A (2009) Pre-training administration of anesthetic ketamine differentially affects rats' spatial and non-spatial recognition memory. *Neuropharmacology*. Jul;57(1):1-7
- Pitsikas N, Boultsadakis A, Sakellaridis N (2008) Effects of sub-anesthetic doses of ketamine on rats' spatial and non-spatial recognition memory. *Neuroscience*. Jun 23;154(2):454-60
- Pitsikas N, Brambilla A, Borsini F (1993) DAU 6215, a novel 5-HT₃ receptor antagonist, improves performance in the aged rat in the Morris water maze task. *Neurobiol Aging*. Nov-Dec;14(6):561-4
- Pitsikas N, Sakellaridis N (2006) Crocus sativus L. extracts antagonize memory impairments in different behavioural tasks in the rat. *Behav Brain Res*. Oct 2;173(1):112-5.
- Pitsikas N, Zisopoulou S, Tarantilis PA, Kanakis CD, Polissiou MG, Sakellaridis N (2007) Effects of the active constituents of Crocus sativus L., crocins on recognition and spatial rats' memory. *Behav Brain Res*. Nov 2;183(2):141-6.
- Poddar MK, Dewey WL (1980) Effects of cannabinoids on catecholamine uptake and release in hypothalamic and striatal synaptosomes. *J Pharmacol Exp Ther* 214: 63-7
- Polissidis A, Chouliara O, Galanopoulos A, Marselos M, Papadopoulou-Daifoti Z, Antoniou K (2009) Behavioural and dopaminergic alterations induced by a low dose of WIN 55,212-2 in a conditioned place preference procedure. *Life Sci* Jul 31;85(5-6):248-54.
- Polissidis A, Chouliara O, Galanopoulos A, Rentesi G, Dosi M, Hyphantis T, Marselos M, Papadopoulou-Daifoti Z, Nomikos GG, Spyraiki C, Tzavara ET, Antoniou K (2010) Individual differences in the effects of cannabinoids on motor activity, dopaminergic activity and DARPP-32 phosphorylation in distinct regions of the brain. *Int J Neuropsychopharmacol*. Oct;13(9):1175-91.
- Polissidis A, Galanopoulos A, Naxakis G, Papahatjis D, Papadopoulou-Daifoti Z, Antoniou K (2013) The cannabinoid CB1 receptor biphasically modulates motor activity and regulates dopamine and glutamate

- release region dependently. *Int J Neuropsychopharmacol.* Mar;16(2):393-403.
- Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G (1995) Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 12304-8
- Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G (1996) Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature* 382: 255-7
- Porter AC, Felder CC (2001) The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther* 90: 45-60
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 1020-4
- Prado-Alcala R, Wise RA (1984) Brain stimulation reward and dopamine terminal fields. I. Caudate-putamen, nucleus accumbens and amygdala. *Brain Res* 297: 265-73
- Prescot AP, Locatelli AE, Renshaw PF, Yurgelun-Todd DA (2011) Neurochemical alterations in adolescent chronic marijuana smokers: a proton MRS study. *Neuroimage.* Jul 1;57(1):69-75.
- Price TJ, Helesic G, Parghi D, Hargreaves KM, Flores CM (2003) The neuronal distribution of cannabinoid receptor type 1 in the trigeminal ganglion of the rat. *Neuroscience* 120: 155-62
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia A-S, McNamara JO, Williams SM (2004) *Neuroscience*. Sinauer Associates, Inc., pp 832
- Raitio KH, Salo OM, Nevalainen T, Poso A, Jarvinen T (2005) Targeting the cannabinoid CB2 receptor: mutations, modeling and development of CB2 selective ligands. *Curr Med Chem* 12: 1217-37
- Richfield EK, Herkenham M (1994) Selective vulnerability in Huntington's disease: preferential loss of cannabinoid receptors in lateral globus pallidus. *Ann Neurol* 36: 577-84
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Neliat G, Caput D, et al. (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 350: 240-4
- Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Shire D, Bouaboula M, Oustric D, Barth F, Casellas P, Ferrara P, Le Fur G (1996) Characterization of two cloned human CB1 cannabinoid receptor isoforms. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 871-8
- Robbe D, Alonso G, Duchamp F, Bockaert J, Manzoni OJ (2001) Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *J Neurosci.* Jan 1;21(1):109-16.
- Robinson TE, Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18: 247-91
- Robson P (2001) Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids. *Br J Psychiatry* 178: 107-15
- Robson P (2005) Human studies of cannabinoids and medicinal cannabis. *Handb Exp Pharmacol*: 719-56

- Rodriguez de Fonseca F, Del Arco I, Martin-Calderon JL, Gorriti MA, Navarro M (1998) Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity. *Neurobiol Dis* 5: 483-501
- Rodriguez De Fonseca F, Fernandez-Ruiz JJ, Murphy LL, Cebeira M, Steger RW, Bartke A, Ramos JA (1992) Acute effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on dopaminergic activity in several rat brain areas. *Pharmacol Biochem Behav* 42: 269-75
- Rodriguez JJ, Mackie K, Pickel VM (2001) Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J Neurosci* 21: 823-33
- Rodvelt KR, Bumgarner DM, Putnam WC, Miller DK (2007) WIN-55,212-2 and SR-141716A alter nicotine-induced changes in locomotor activity, but do not alter nicotine-evoked [3H]dopamine release. *Life Sci* 80: 337-44
- Romano MR, Lograno MD (2006) Cannabinoid agonists induce relaxation in the bovine ophthalmic artery: evidences for CB1 receptors, nitric oxide and potassium channels. *Br J Pharmacol. Apr*;147(8):917-25.
- Romero J, de Miguel R, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ (1998) The activation of cannabinoid receptors in striatonigral GABAergic neurons inhibited GABA uptake. *Life Sci* 62: 351-63
- Romero J, Lastres-Becker I, de Miguel R, Berrendero F, Ramos JA, Fernandez-Ruiz J (2002) The endogenous cannabinoid system and the basal ganglia. biochemical, pharmacological, and therapeutic aspects. *Pharmacol Ther* 95: 137-52
- Ross RA. (2009) The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol Sci.* 2009 Mar;30(3):156-63
- Roth SH, Williams PJ (1979) The non-specific membrane binding properties of delta9-tetrahydrocannabinol and the effects of various solubilizers. *J Pharm Pharmacol* 31: 224-30
- Salio C, Doly S, Fischer J, Franzoni MF, Conrath M (2002) Neuronal and astrocytic localization of the cannabinoid receptor-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 329: 13-6
- Sanchez C, de Ceballos ML, Gomez del Pulgar T, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, Galve-Roperh I, Huffman JW, Ramon y Cajal S, Guzman M (2001) Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res* 61: 5784-9
- Sano K, Mishima K, Koushi E, Orito K, Egashira N, Irie K, Takasaki K, Katsurabayashi S, Iwasaki K, Uchida N, Egawa T, Kitamura Y, Nishimura R, Fujiwara M (2008) Delta 9-tetrahydrocannabinol-induced catalepsy-like immobilization is mediated by decreased 5-HT neurotransmission in the nucleus accumbens due to the action of glutamate-containing neurons. *Neuroscience.* Jan 24;151(2):320-8
- Santiago M, Westerink BH (1991) The regulation of dopamine release from nigrostriatal neurons in conscious rats: the role of somatodendritic autoreceptors. *Eur J Pharmacol* 204: 79-85
- Sanudo-Pena MC, Patrick SL, Khen S, Patrick RL, Tsou K, Walker JM (1998) Cannabinoid effects in basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 248: 171-4
- Sanudo-Pena MC, Romero J, Seale GE, Fernandez-Ruiz JJ, Walker JM (2000) Activational role of cannabinoids on movement. *Eur J Pharmacol* 391: 269-74
- Scallet AC (1991) Neurotoxicology of cannabis and THC: a review of chronic exposure studies in animals. *Pharmacol Biochem Behav* 40: 671-6

- Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski NE (1997) Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylyl cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol* 142: 278-87
- Schlicker E, Kathmann M (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 22: 565-72
- Schlicker E, Timm J, Zentner J, Gothert M (1997) Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 356: 583-9
- Schmoll D, Führmann E, Gebhardt R, Hamprecht B. (1995) Significant amounts of glycogen are synthesized from 3-carbon compounds in astroglial primary cultures from mice with participation of the mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase isoenzyme. *Eur J Biochem.* Jan 15;227(1-2):308-15.
- Schultes RE (1969) Hallucinogens of plant origin. *Science.* Jan 17;163(3864):245-54.
- Sellings LH, Clarke PB (2003) Segregation of amphetamine reward and locomotor stimulation between nucleus accumbens medial shell and core. *J Neurosci* 23: 6295-303
- Shank RP, Bennett GS, Freytag SO, Campbell GL. (1985) Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools. *Brain Res.* Mar 11;329(1-2):364-7.
- Shen M, Piser TM, Seybold VS, Thayer SA (1996) Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci* 16: 4322-34
- Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P (1995) An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem* 270: 3726-31
- Showalter VM, Compton DR, Martin BR, Abood ME (1996) Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 989-99
- Siegling A, Hofmann HA, Denzer D, Mauler F, De Vry J (2001) Cannabinoid CB(1) receptor upregulation in a rat model of chronic neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 415: R5-7
- Skaper SD, 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: 3984-9
- Smith PB, Compton DR, Welch SP, Razdan RK, Mechoulam R, Martin BR (1994) The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid, in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 270: 219-27
- Solinas M, Justinova Z, Goldberg SR, Tanda G (2006) Anandamide administration alone and after inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) increases dopamine levels in the nucleus accumbens shell in rats. *J Neurochem* 98: 408-19
- Solinas M, Tanda G, Justinova Z, Wertheim CE, Yasar S, Piomelli D, Vadivel SK, Makriyannis A, Goldberg SR (2007) The endogenous cannabinoid anandamide produces delta-9-tetrahydrocannabinol-like

- discriminative and neurochemical effects that are enhanced by inhibition of fatty acid amide hydrolase but not by inhibition of anandamide transport. *J Pharmacol Exp Ther* 321: 370-80
- Soria G, Castane A, Berrendero F, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2004) Adenosine A2A receptors are involved in physical dependence and place conditioning induced by THC. *Eur J Neurosci* 20: 2203-13
- Spanagel R, Heilig M (2005) Addiction and its brain science. *Addiction* 100: 1813-22
- Spyraki C, Fibiger HC (1988) A role for the mesolimbic dopamine system in the reinforcing properties of diazepam. *Psychopharmacology (Berl)* 94: 133-7
- Spyraki C, Fibiger HC, Phillips AG (1982) Cocaine-induced place preference conditioning: lack of effects of neuroleptics and 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res* 253: 195-203
- Stander S, Schmelz M, Metze D, Luger T, Rukwied R (2005) Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. *J Dermatol Sci* 38: 177-88
- Stefano GB, Salzet B, Rialas CM, Pope M, Kustka A, Neenan K, Pryor S, Salzet M (1997) Morphine- and anandamide-stimulated nitric oxide production inhibits presynaptic dopamine release. *Brain Res* 763: 63-8
- Steffens M, Engler C, Zentner J, Feuerstein TJ (2004) Cannabinoid CB1 receptor-mediated modulation of evoked dopamine release and of adenylyl cyclase activity in the human neocortex. *Br J Pharmacol* 141: 1193-203
- Steimer T, la Fleur S, Schulz PE (1997) Neuroendocrine correlates of emotional reactivity and coping in male rats from the Roman high (RHA/Verh)- and low (RLA/Verh)-avoidance lines. *Behav Genet* 27: 503-12
- Straiker A, Mackie K. Metabotropic suppression of excitation in murine autaptic hippocampal neurons. (2007) *J Physiol. Feb 1;578(Pt 3):773-85.*
- Straiker A, Mackie K. (2005) Depolarization-induced suppression of excitation in murine autaptic hippocampal neurones. *J Physiol. Dec 1;569(Pt 2):501-17.*
- Stella N, Piomelli D (2001) Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons. *Eur J Pharmacol* 425: 189-96
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388: 773-8
- Sugiura T, Kondo S, Kishimoto S, Miyashita T, Nakane S, Kodaka T, Suhara Y, Takayama H, Waku K (2000) Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. *J Biol Chem* 275: 605-12
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215: 89-97
- Sugiura T, Waku K (2000) 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids* 108: 89-106

- Sulcova E, Mechoulam R, Fride E (1998) Biphasic effects of anandamide. *Pharmacol Biochem Behav* 59: 347-52
- 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: 501-11
- Szabo B, Muller T, Koch H (1999) Effects of cannabinoids on dopamine release in the corpus striatum and the nucleus accumbens in vitro. *J Neurochem* 73: 1084-9
- Szabo B, Nordheim U, Niederhoffer N (2001) Effects of cannabinoids on sympathetic and parasympathetic neuroeffector transmission in the rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 819-26
- Szabo B, Wallmichrath I, Mathonia P, Pfreundtner C (2000) Cannabinoids inhibit excitatory neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience*. 97(1):89-97.
- Tanda G, Goldberg SR (2003) Cannabinoids: reward, dependence, and underlying neurochemical mechanisms--a review of recent preclinical data. *Psychopharmacology (Berl)* 169: 115-34
- Tanda G, Munzar P, Goldberg SR (2000) Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys. *Nat Neurosci* 3: 1073-4
- Tanda G, Pontieri FE, Di Chiara G (1997) Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science* 276: 2048-50
- Tanimura A, Kawata S, Hashimoto K, Kano M. (2009) Not glutamate but endocannabinoids mediate retrograde suppression of cerebellar parallel fiber to Purkinje cell synaptic transmission in young adult rodents. *Neuropharmacology*. Aug;57(2):157-63
- Tavares JV, Drevets WC, Sahakian BJ (2003) Cognition in mania and depression. *Psychol Med* 33: 959-67
- Thiel CM, Muller CP, Huston JP, Schwarting RK (1999) High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience* 93: 243-51
- Thiemann G, van der Stelt M, Petrosino S, Molleman A, Di Marzo V, Hasenohrl RU (2008) The role of the CB1 cannabinoid receptor and its endogenous ligands, anandamide and 2-arachidonoylglycerol, in amphetamine-induced behavioural sensitization. *Behav Brain Res* 187: 289-96
- Tomasini MC, Ferraro L, Bebe BW, Tanganelli S, Cassano T, Cuomo V, Antonelli T (2002) Delta(9)-tetrahydrocannabinol increases endogenous extracellular glutamate levels in primary cultures of rat cerebral cortex neurons: involvement of CB(1) receptors. *J Neurosci Res*. May 15;68(4):449-53
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*. Sep;62(3):405-96
- Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83: 393-411
- Tsou K, Mackie K, Sanudo-Pena MC, Walker JM (1999) Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 93: 969-75

- Tzavara ET, Wade M, Nomikos GG (2003) Biphasic effects of cannabinoids on acetylcholine release in the hippocampus: site and mechanism of action. *J Neurosci* 23: 9374-84
- Van Der Stelt M, Di Marzo V (2004) Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur J Biochem* 271: 1827-34
- Van der Stelt M, Di Marzo V (2003) The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *Eur J Pharmacol*. Nov 7;480(1-3):133-50
- Van Etten ML, Anthony JC (1999) Comparative epidemiology of initial drug opportunities and transitions to first use: marijuana, cocaine, hallucinogens and heroin. *Drug Alcohol Depend* 54: 117-25
- Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rossner S (2005) Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 365: 1389-97
- Varma N, Carlson GC, Ledent C, Alger BE (2001) Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus. *J Neurosci* 21: RC188
- Varvel SA, Martin BR, Lichtman AH (2007) Lack of behavioral sensitization after repeated exposure to THC in mice and comparison to methamphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* 193: 511-9
- Vlachou S, Nomikos GG, Stephens DN, Panagis G (2007) Lack of evidence for appetitive effects of Delta 9-tetrahydrocannabinol in the intracranial self-stimulation and conditioned place preference procedures in rodents. *Behav Pharmacol* 18: 311-9
- Wagner JA, Jarai Z, Batkai S, Kunos G (2001) Hemodynamic effects of cannabinoids: coronary and cerebral vasodilation mediated by cannabinoid CB(1) receptors. *Eur J Pharmacol* 423: 203-10
- Walker JM, Huang SM, Strangman NM, Tsou K, Sanudo-Pena MC (1999) Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12198-203
- Walker JM, Krey JF, Chu CJ, Huang SM (2002) Endocannabinoids and related fatty acid derivatives in pain modulation. *Chem Phys Lipids* 121: 159-72
- Westlake TM, Howlett AC, Bonner TI, Matsuda LA, Herkenham M (1994) Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience* 63: 637-52
- Williamson EM, Evans FJ (2000) Cannabinoids in clinical practice. *Drugs* 60: 1303-14
- Wilson RI, Nicoll RA (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410: 588-92
- Wilson RI, Nicoll RA (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296: 678-82
- Wise LE, Shelton CC, Cravatt BF, Martin BR, Lichtman AH (2007) Assessment of anandamide's pharmacological effects in mice deficient of both fatty acid amide hydrolase and cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* 557: 44-8
- Wise LE, Thorpe AJ, Lichtman AH (2009) Hippocampal CB(1) receptors mediate the memory impairing effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Neuropsychopharmacology*. Aug;34(9):2072-80

- Wise RA (1987) The role of reward pathways in the development of drug dependence. *Pharmacol Ther* 35: 227-63
- Wise RA (1996) Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol* 6: 243-51
- Wise RA (2002) Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron* 36: 229-40
- Wiskerke J, Pattij T, Schoffelmeer AN, De Vries TJ (2008) The role of CB1 receptors in psychostimulant addiction. *Addict Biol* 13: 225-38
- Yu AC, Hertz E, Hertz L. (1983) Effects of barbiturates on energy and intermediary metabolism in cultured astrocytes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 7(4-6):691-6.
- Zanettini C, Panlilio LV, Alicki M, Goldberg SR, Haller J, Yasar S.(2011) Effects of endocannabinoid system modulation on cognitive and emotional behavior. *Front Behav Neurosci*. 5:57.
- Zangen A, Solinas M, Ikemoto S, Goldberg SR, Wise RA (2006) Two brain sites for cannabinoid reward. *J Neurosci* 26: 4901-7
- Zuckerman M (1986) Sensation seeking and the endogenous deficit theory of drug abuse. *NIDA Res Monogr* 74: 59-70
- Zuckerman M (1990) The psychophysiology of sensation seeking. *J Pers* 58: 313-45
- Zuckerman M, Neeb M (1979) Sensation seeking and psychopathology. *Psychiatry Res* 1: 255-64
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400: 452-7
- Μαρσέλος Μ (1997) Εξαρτησιογόνες Ουσίες. τυπωθήτω, Αθήνα
- Μαρσέλος Μ, Καραγιαννίδου Α (2005) Cannabis sativa: Μύθοι, ιστορία και παρόν για ένα φυτό με φίλους και εχθρούς. τυπωθήτω, τυπωθήτω
- Παναγής Γ (2002) Νευροεπιστήμη της συμπεριφοράς. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης