

Received: 2011.04.28
Accepted: 2011.08.12
Published: 2011.09.16

Rola układu kannabinoidowego w patogenezie oraz poszukiwaniu nowych możliwości farmakoterapii zespołu zależności alkoholowej*

The role of the cannabinoid system in the pathogenesis and treatment of alcohol dependence

Bogusława Pietrzak, Agnieszka Dunaj, Karolina Piątkowska

Zakład Farmakodynamiki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Streszczenie

Brak zadowalającej skuteczności terapii zespołu zależności alkoholowej (ZZA) wciąż wyznacza nowe kierunki badań. W ostatnim okresie koncentrują się one na transmisji kannabinoidowej. Wyniki wskazują na istotną interakcję między transmisją kannabinoidową i dopaminergiczną w aktywacji limbicznego układu nagrody. Mechanizmy procesów prowadzących do rozwoju uzależnienia są bardzo złożone i wciąż za mało poznane. Endogenne kannabinoidy wydają się mieć znaczący udział w funkcjonowaniu tego układu, zarówno bezpośredni, jak i pośrednio wpływając na poziom innych neuroprzebieżników. Wpływ alkoholu na przebieżnictwo kannabinoidowe jest również bardzo złożony i dotyczy też zmian na poziomie molekularnym. W badaniach eksperymentalnych wykazano istotny udział receptorów CB1 w neurochemicznych mechanizmach kontroli picia alkoholu. SR141716 (rimonabant) – antagonist receptorów CB1 istotnie zmniejsza dobrowolne spożycie alkoholu przez zwierzęta w różnych modelach doświadczalnych. Bardzo obiecujące wyniki badań przedklinicznych nie znalazły zadowalającego potwierdzenia w przeprowadzonych w ostatnich latach badaniach klinicznych. Podkreśla się potrzebę podejmowania kolejnych prób klinicznych w tym kierunku..

Słowa kluczowe:

zespół zależności alkoholowej • farmakoterapia • układ kannabinoidowy • rimonabant • badania przedkliniczne i kliniczne

Summary

The lack of satisfactory results of alcohol dependence treatment force us to search for new directions of research. Recent studies concentrate on endocannabinoid transmission. The results show an interplay between the endocannabinoid and dopaminergic signaling in activation of the limbic reward system. The mechanisms leading to development of dependence are very complex and poorly recognized. Endogenous cannabinoids seem to have an important role in the functioning of this system, both directly and indirectly affecting the level of different neurotransmitters. The effect of alcohol on the endocannabinoid system is also complex and involves changes at the molecular level. Experimental studies have demonstrated an important role of the CB1 receptors in the neurochemical mechanism of alcohol consumption and its regulation. SR141716 (rimonabant), a CB1 receptor antagonist, significantly lowers voluntary alcohol intake and motivation for its consumption in various experimental studies. Very encouraging results of preclinical studies were not completely confirmed in the clinical studies. However, further clinical studies are still necessary.

* Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 503-3011-1.

Key words: alcohol dependence • pharmacotherapy • cannabinoid system • rimonabant • preclinical and clinical studies

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=959461>

Word count: 4647

Tables: –

Figures: –

References: 88

Adres autorki: dr hab. farm. Bogusława Pietrzak, Zakład Farmakodynamiki UM w Łodzi, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź; e-mail: boguslawa.pietrzak@umed.lodz.pl

Wykaz skrótów: **Δ9-THC** – (-)-trans-Δ9-tetrahydrokannabinol; **AC** – cykloza adenylanowa; **AEA** – arachidoniloetanolamid; **ARC** – jądro łukowate (arcuate nucleus); **CB1 i CB2** – receptory kannabinoidowe typu 1 i 2; **COX-2** – enzym cyklooksygenaza; **CPu** – część ogoniasta skorupy (caudate putamen); **DA** – dopamina; **FAAH** – hydrolaza amidów kwasów tłuszczowych (fatty acid amide hydrolase); **GABA** – kwas γ-aminomasłowy; **GTP** – guanozyno-5'-trójfosforan; **KO** – myszy pozbawione receptora CB1 (knockout); **LH** – boczne podwzgórze (lateral hypothalamus); **MAPK** – rodzina kinaz aktywowanych mitogenami (mitogen-activated protein kinase); **MAPKK** – kinaza kinaz aktywowanych przez mitogeny (mitogen-activated protein kinase kinase); **Nac** – jądro półleżące przegrody (nucleus accumbens); **PAG** – substancja szara okołowodociągowa (periaqueductal grey); **PI-3K** – kinazy 3-fosfatydyloinozytolu; **PKA** – kinaza białkowa typu A (protein kinase A); **PVN** – jądro trzykomorowe (paraventricular nucleus); **RVM** – brzuszno-dogłowa część rdzenia przedłużonego (rostromedial medulla); **sP** – szczury preferujące alkohol (Sardinian alcohol-preferring rats); **VMN** – jądro brzuszno-przyśrodkowe podwzgórze (ventromedial nucleus of the hypothalamus); **VTA** – obszar nakrywki brzusznej śródmózgowia (ventral tegmental area); **WHP** – warszawska linia szczurów wysoko preferujących alkohol (Warsaw high preferring); **ZZA** – zespół zależności alkoholowej.

Wśród wielu różnych substancji wpływających na aktywność neurochemiczną mózgu w rozwoju zależności alkoholowej najbardziej istotne znaczenie prawdopodobnie mają: dopamina (DA), β-endorfina, serotonina (5-HT), kwas γ-aminomasłowy (GABA), aminokwasy pobudzające, a wyniki badań ostatnich lat wskazują też na znaczący udział transmisji kannabinoidowej [5,8,11,52,68].

Terminem kannabinoidy określa się grupę prawie 60, głównie silnie lipofilowych substancji, występujących w roślinie o nazwie konopie siewne (*Cannabis sativa*) oraz w ich syntetycznych analogach o zbliżonej budowie i biologicznej aktywności. Najpopularniejsze surowce pozyskiwane z konopi znane od tysięcy lat to haszysz i marihuana. Przełomem w badaniach nad konopiami było odkrycie w latach 60 ub.w. struktury cząsteczki (-)-trans-Δ9-tetrahydrokannabinolu (Δ9-THC), który jest głównym związkiem odpowiedzialnym za aktywność biologiczną marihuany i haszyszu.

Oprócz Δ9-THC, którego jest najwięcej (0,1–2,7% w marihuanie, 4–10% w haszyszu) w *Cannabis sativa* wykryto m.in. kanabinol, kanabidiol, kanabigerol, kanabuchromen [29].

Dotychczas poznano dobrze dwa typy receptorów kannabinoidowych opisywane jako CB1 i CB2, chociaż wiadomo, że są też inne.

RECEPTORY KANNABINOIDOWE – CB1

Receptory CB1 występują w wielu rejonach mózgu i są jednymi z najliczniej reprezentowanych receptorów neuronalnych.

Największą gęstość receptorów kannabinoidowych CB1 stwierdza się w mózdku oraz jądrach podstawy mózgu, na które składają się: istota czarna (*substantia nigra*), gałka biała (*globus pallidus*), jądro wewnątrzkomorowe i boczna część prażkowie. Obecność receptorów CB1 w tych strukturach tłumaczy silne zaburzenia koordynacji ruchowej u gryzoni na skutek ostrego zatrucia kannabinoidami [1,39]. Istnieją gatunkowe różnice w ekspresji receptorów CB1 w mózdku, np. u człowieka jest ona mniejsza niż u szczura, co tłumaczy brak zaburzeń motorycznych u ludzi po zastosowaniu marihuany [37,82].

Z dużą gęstością receptorów CB1 w warstwie I i IV kory mózgu, układzie limbicznym oraz warstwie komórek piramidowych hipokampa wiąże się wpływ kannabinoidów na stan emocjonalny, procesy pamięciowe, zmniejszenie sprawności ruchowej czy ich działania przeciwdrgawkowe. W jądrze półleżącym przegrody, podstawowej strukturze układu nagrody, związanej z mechanizmem rozwoju uzależnienia, stwierdzono umiarkowaną gęstość receptorów kannabinoidowych typu 1. Natomiast w obszarach, takich jak pień mózgu, rdzeń przedłużony czy podwzgórze występują one rzadko, bądź wcale, co wiąże się ze

stosunkowo niewielką toksycznością pojedynczych dawek marihuany [39,40,41].

RECEPTORY KANNABINOIDOWE – CB2

Gen kodujący ludzki receptor kannabinoidowy CB2 sklonowano w 1993 r., następnie zlokalizowano go w chromosomie 1p36 [73]. Umieszczenie receptorów CB2 różni się w dużym stopniu od CB1, a najdokładniej opisywana jest ich obecność w komórkach i narządach związanych z układem immunologicznym [67]. Wykazano, że selektywni antagoniści receptora CB2 kannabinoidowego, hamują lub znoszą większość efektów immunosupresyjnych kannabinoidów [53].

Receptory kannabinoidowe opisano u wielu gatunków, a początkowo uważano, że receptory CB1 mają wyłącznie ośrodkowe umiejscowienie, podczas gdy CB2 – obwodowe. W ostatnim czasie receptory CB1 zlokalizowano również w tkankach obwodowych, takich jak: układ sercowo-naczyniowy, rozrodczy czy pokarmowy, natomiast receptory CB2 wykryto też w ośrodkowym układzie nerwowym; w komórkach mikrogleju oraz neuronach [81].

MECHANIZMY PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU PRZEZ RECEPTORY KANNABINOIDOWE

Każdy z receptorów CB1 i CB2 to pojedynczy łańcuch polipeptydowy z siedmioma hydrofobowymi domenami transbłonowymi TM I–TM VII, które przechodzą przez błonę cytoplazmatyczną. Agoniści tych receptorów mogą się przyłączać do pętli e2 w receptorach CB1 i CB2 oraz do trzeciej domeny transbłonowej w receptorze CB1. W receptorze CB1 w trzeciej pętli wewnętrznej znajdują się miejsca wiązania swoistego inhibitorowego białka błonowego Gi lub/i Go wiążącego GTP [9].

Dzięki technikom komputerowego modelowania molekularnego, stworzono przestrzenny model ludzkiego receptora CB1. Zaobserwowano, że możliwe jest występowanie w N-końcowej zewnątrzkomórkowej domenie miejsca wiążącego Ca^{2+} . Natomiast miejsce wiążące ligand usytuowane jest w rejonie hydrofobowym. Przypuszczalnie fenolowa grupa hydroksylowa liganda tworzy wiązania wodorowe z grupą karboksylową alaniny w pozycji 198 łańcucha białkowego receptora [72].

Wiadomo, że receptory CB1 i CB2 są sprzężone z białkiem Gi i Go, ujemnie z cyklazą adenylanową (AC), a dodatnio z kinazami MAP (kinazy aktywowane miogenami; mitogen-activated protein kinases – MAPK). Pobudzenie receptora CB1 wywołuje aktywację białka Gi/Go, które pośredniczy w stymulacji kaskady MAPK i w hamowaniu aktywności AC, prowadzącym do spadku stężenia cAMP. Ponadto białko Gi/Go bezpośrednio sprzęga receptor CB1 z kanałami wapniowymi (typ L, N i P/Q) hamując ich aktywność oraz z kanałami potasowym typu Ir (przewodzące zgodnie z gradientem elektrochemicznym), powodując ich aktywację. Aktywność kanałów potasowych typu A jest także zależna od białka Gi/Go, lecz ich pobudzenie zachodzi w następstwie hamowania AC. Obniżenie poziomu cAMP w komórce prowadzi do zahamowania aktywności zależnej od cAMP kinazy białkowej typu A (PKA), w wyniku czego fosforylacja kanału przez PKA zmniejsza się, a to zwiększa wpływ jonów potasowych [26,71].

Szlaki przekazywania sygnału poprzez aktywację receptorów kannabinoidowych związane z AC i kanałami jonowymi prawdopodobnie mają istotne znaczenie w regulacji uwalniania neuroprzekaźników. Wykazano, że kannabinoidy hamując presynaptyczne kanały wapniowe zmniejszają uwalnianie z zakończeń presynaptycznych wiele neuroprzekaźników, takich jak glutamina, acetylocholina czy noradrenalina [28,81].

Trzecim systemem przekazywanym receptorów kannabinoidowych jest kaskada MAPK. Stwierdzono, że kannabinoidy są silnymi aktywatorami fosforylacji tych kinaz, a selektywny antagonist receptoru CB1 – SR 141716 blokuje ten proces. Uważa się, że w procesie aktywacji MAPK, związanym z pobudzeniem receptora CB1, biorą udział podjednostki β i γ białka Gi/Go. Jednym z podstawowych etapów aktywacji kaskady MAPK jest aktywacja kinazy białkowej Raf-1, która jest zależna od białka Ras i/lub kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI-3K). Podjednostki $\beta\gamma$ białek G, na skutek aktywacji kinaz tyrozynowych, mogą stymulować GTP-azę Ras. W przypadku receptorów kannabinoidowych, które nie wykazują wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej, pośredniczącej w aktywacji białka Ras, bardziej prawdopodobny jest szlak transmisji sygnału od receptora CB1 przez kinazę PI-3K. Aktywne MAPK przemieszczają się do jądra komórkowego, gdzie fosforylują czynniki transkrypcyjne [42,43].

Przekazywanie aktywacji receptorów CB2 przez MAPK odbywa się poprzez podjednostki β i γ białka G, a jednym z elementów tego szlaku, w odróżnieniu od receptora CB1, jest kinaza białkowa C. Poza kinazą typu C w molekularny szlak przekazywania sygnału od CB2 do MAPK może być zaangażowane białko p21/Ras, Raf-1 oraz kinaza MEK (MAPKK) [43].

Wpływ kannabinoidów na komórki układu odpornościowego przez receptory CB2 wiąże się głównie z regulacją procesów odpowiedzi immunologicznej [67]. Obecny stan wiedzy wskazuje na to, że w odróżnieniu od receptora CB1, aktywacja receptora CB2 nie wpływa na kanały jonowe.

BIOLOGICZNE SKUTKI DZIAŁANIA KANNABINOIDÓW

Rozmieszczenie receptorów kannabinoidowych koreponduje ze skutkami behawioralnymi, jakie one wywołują. Obecność dużej liczby receptorów CB1 w hipokampie koreluje z niekorzystnym wpływem kannabinoidów na procesy pamięciowe oraz funkcje poznawcze. Przewlekła ekspozycja na Δ^9 -THC wpływa na funkcję hipokampa, zaangażowanego w procesy uczenia się i zapamiętywania zarówno u ludzi jak i u zwierząt doświadczalnych [12,80].

Występowanie receptorów CB1 w jądrach podstawnych (*ganglia basales*) oraz skutki pobudzenia tych struktur, sugerują znaczącą rolę endogennych kannabinoidów w kontroli motoryki mięśni. Wykazano obniżoną aktywność receptorów CB1 w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona czy Huntingtona [84].

W latach 90. ub.w. pojawiły się sugestie, że hipofunkcja układu glutaminergicznego oraz hiperfunkcja układu dopaminergicznego, leżące u podstaw schizofrenii, mogą być skutkiem zwiększonej aktywności układu

kannabinoidowego. U chorych stwierdza się sensytyzację receptorów CB1 w korze przedczołowej oraz zwiększone stężenie anandamidu i palmitoiloetanolamidu (ale nie 2-AG) w płynie mózgowo-rdzeniowym. Wykazano również, że zmiany stężenia anandamidu we krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym są skorelowane ze skutecznością farmakoterapii schizofrenii, a polimorfizm genu kodującego receptor CB1, może być jednym z genetycznych uwarunkowań choroby [84].

Ze względu na obecność receptorów CB1 w strukturach kontrolujących pobieranie pokarmu, takich jak: boczne podwzgórze (lateral hypothalamus – LH), jądro trykomorowe (paraventricular nucleus – PVN) oraz jądro łukowate (arcuate nucleus – ARC), kannabinoidy uczestniczą w regulacji łaknienia. Stymulacja podwzgórzowych receptorów CB1 wpływa na regulowaną neuropeptydami homeostazę energetyczną, spożycie pokarmu oraz lipogenezę w tkankach trzewnych [42]. Poza tym duża gęstość receptorów CB1 w układzie mezolimbicznym wskazuje na udział kannabinoidów w regulacji apetytu poprzez procesy motywacyjne i aktywację behawioralną w odpowiedzi na czynniki nagradzające [84]. Pobudzanie ośrodkowych receptorów CB1 w jądrze półleżącym przegrody (NcA) wzmacnia dopaminergiczne szlaki neuronalne w układzie nagrody, a w ten sposób zwiększa motywację do jedzenia, palenia tytoniu czy przyjęcia narkotyku prowadząc zwykle do nadużywania i rozwoju uzależnienia [56].

Receptory CB1 wykazują również dużą ekspresję w obszarach zaangażowanych w regulowanie odczuwania bólu [70]. Endogenni agonści receptorów CB1, anandamid (AEA) oraz 2-AG wywołują analgezję na poziomie rdzenia kręgowego i mózgu oraz przez obwodowe receptory CB1 umiejscowione na zakończeniach nerwów czuciowych [69]. Strukturami ponadrdzeniowymi, szczególnie bogatymi w receptory CB1, są: brzuszno-dogłowa część rdzenia przedłużonego (rostromedial medulla – RVM) i substancja szara okołowodociągowa (periaqueductal grey – PAG), wchodzące w skład zstępującego układu antynocycyptycznego. Kannabinoidy w PAG hamują przewodzenie GABA-ergiczne, powodując odhamowanie neuronów pobudzających (głównie glutaminergicznych), a w wyniku aktywacji dróg zstępujących inicjują antynocycępcę [48]. Kannabinoidy znoszą ostry i przewlekły ból o różnej etiologii; bóle pooperacyjne, nowotworowe, migrenowe, neuropatyczne czy reumatyczne, jednak ośrodkowe działania niepożądane ograniczają ich terapeutyczne zastosowanie [29,48].

Receptory CB1 są obecne również w strukturach mózgu odpowiedzialnych za percepcję i ekspresję emocji: w ciele migdałowatym, przegrodzie, hipokampie, korze czołowej i przedczołowej, PAG oraz w jądrze półleżącym [84]. Wynikiem ich stymulacji są zmiany stężeń przekazywanych z reakcją lękową. Kannabinoidy hamują uwalnianie kwasu glutaminowego, który jest aminokwasem pobudzającym w hipokampie, PAG i w ciele migdałowatym, a także NA, DA, 5-HT oraz anksjogennych neuropeptydów w obszarach korowo-limbicznych.

Stwierdzono ponadto interakcję kannabinoidów z układem opioidowym, który może pośredniczyć w działaniu przeciwlękowym, podobnie jak receptor serotonergiczny

5-HT1A [19,59,84]. Jednakże kannabinoidy zmniejszają aktywność neuronów GABA-ergicznych w ciele migdałowatym i hipokampie, prowadząc do odhamowania transmisji glutaminergicznej i dopaminergicznej w korze czołowej oraz ciele migdałowatym, co może z kolei indukować reakcje lękowe [84].

LIGANDY RECEPTORÓW KANNABINOIDOWYCH

Odkrycie receptorów kannabinoidowych i poznanie ich budowy, zlokalizowanie genów kodujących białka receptorowe przyspieszyło badania nad syntezą nowych, swoistych agonistów i antagonistów oraz poszukiwaniem endogennych związków wykazujących powinowactwo do tych receptorów [57,58].

Pierwszy arachidonoiloetanolamid (AEA), wyizolowano w 1992 roku z mózgu świni [21] i nazwano anandamidem od sanskryckiego słowa *ananda* – rozkosz, wewnętrzny błogostan. Wykazuje on większe powinowactwo do receptora CB1 niż CB2, przy czym jest częściowym agonistą receptora CB1. W kilka lat później wyizolowano z mózgu szczura 2-arachidonoiloglicerol (2-AG) [78]. Ma on mniejsze powinowactwo do receptora CB1 niż anandamid, jest natomiast pełnym jego agonistą i występuje w mózgu w większej ilości niż anandamid. Trzeci wyizolowany związek eter noladyny (eter arachidonylo-glicerolowy) jest agonistą receptora CB1 o małym powinowactwie, ale większej trwałości wynikającej z budowy chemicznej. Zidentyfikowano również endokannabinoid o właściwościach antagonisty receptora CB1; jest nim wirodhamina – ester kwasu arachidonowego z etanolaminą.

Endokannabinoidy nie są magazynowane jak klasyczne neuroprzekazniki, lecz wytwarzane „na żądanie” w odpowiedzi na depolaryzację błon i napływ jonów wapniowych, a pochodzą głównie z hydrolizy fosfolipidów błonowych. Anandamid powstaje w procesie hydrolizy N-arachidonoilofosfatydyloetanolaminy (NArPE). NArPE jest wytwarzana z udziałem N-acetylotransferazy z fosfatydylo-etanolaminy i fosfatydylocholino (1,2-diarachidonoilo-3-fosfatydylocholino lub 1-arachidonoilo-2-acylo-3-fosfatydylocholino). Podczas procesu hydrolizy NArPE, katalizowanym przez fosfolipazę D, powstaje anandamid oraz kwas fosfatydowy [20,22,79].

Proces inaktywacji endokannabinoidów przebiega dwustopniowo. Z przestrzeni pozakomórkowej są wychwytywane z udziałem swoistego transportera, którego obecność stwierdzono m.in. w neuronach i astrocytach [65]. Jest on podatny na działanie swoistych inhibitorów oraz tlenu azotu, który zwiększa jego aktywność. AEA i 2-AG są następnie rozkładane wewnątrzkomórkowo przez hydrolazę amidów kwasów tłuszczowych (fatty acid amide hydrolase - FAAH), a 2-AG także przez lipazę monoacyloglicerolu. Hydrolityczny rozkład AEA prowadzi do powstania etanolaminy i kwasu arachidonowego, a podczas rozkładu 2-AG powstaje kwas arachidonowy i glicerol [20,22]. W badaniach *in vitro* wykazano, że AEA jest też substratem cyklooksygenazy 2 (COX-2), lipooksygenaz oraz cytochromu P-450, a 2-AG głównie COX-2 [33].

Do receptorów kannabinoidowych powinowactwo wykazują też inne substancje endogenne o budowie zbliżonej do AEA,

działające na receptory CB1, np. homo- γ -linoleniloetanolamid i dokozatetraenoiloetanolamid. Podobnie do kannabinoidów działają również palmitoiloetanolamid (PEA) i *cis*-9-oktadekenoamid (oleamid) [29]. W 1994 r. odkryto aktywnego antagonistę receptora CB1 - SR141716, a kolejne lata badań zaowocowały odkryciem nowych antagonistów receptorów CB1 - LY320135 i CB2 - SR1444528 [2].

ROLA UKŁADU ENDOKANNABINOIDOWEGO W MECHANIZMIE ROZWOJU UZALEŻNIENIU OD ALKOHOLU

Wpływ etanolu na stężenie endokannabinoidów

W badaniach eksperymentalnych wykazano, że podczas przewlekłego podawania alkoholu zwiększa się w mózgu zwierząt synteza AEA oraz 2-AG. Obserwuje się również istotne zmniejszenie stężenia N-ArPE, prekursora anandamidu [6]. Zaobserwowano też zmiany składu endokannabinoidów w strukturach mózgu związanych z reakcjami nagradzającymi. W śródmózgowiu szczurów zmniejszyło się stężenie AEA oraz 2-AG, podczas gdy stężenie AEA w głównym obszarze odpowiedzialnym za właściwości wzmacniające alkoholu - układzie limbicznym przodomózgowia, wzrastało. Z kolei stężenie 2-AG w tej strukturze zmniejszyło się po 48 h od odstawienia alkoholu, a dodatkowy jego spadek zaobserwowano na skutek ponownego dostępu zwierząt do alkoholu [36].

W badaniu wpływu alkoholu na stężenie anandamidu i FAAH w korze mózgowej myszy, wykazano 47% wzrost stężenia AEA, który po 24 h od odstawienia alkoholu powrócił do wartości kontrolnych. Korelowało to z niższą (o 21%) w porównaniu do grupy kontrolnej aktywnością FAAH [86].

Zaobserwowano również, że przewlekłe podawanie alkoholu prowadzi do (zależnego od czasu i dawki) wzrostu zewnątrzkomórkowego anandamidu w wyniku hamowania jego transportera. Mechanizm ten wydaje się niezależny od receptorów CB1, ponieważ u myszy pozbawionych receptora CB1 („knockout” – KO) zachowana jest prawidłowa aktywność transportera. Podczas długotrwałej ekspozycji na alkohol rozwija się tolerancja, co zmniejsza wpływ ostrej dawki etanolu na aktywność transportera AEA [8]. Wydaje się zatem, że proces transportu anandamidu może odgrywać ważną rolę w rozwoju długotrwałej komórkowej tolerancji na etanol.

Skutki długotrwałego wpływu etanolu na aktywność receptorów kannabinoidowych

W badaniach doświadczalnych wykazano również zmniejszenie liczby oraz wrażliwości receptorów CB1 w mózgach myszy poddawanych długotrwałej ekspozycji na etanol. Desensytyzacja tych receptorów jest następstwem zwiększonej ich stymulacji przez anandamid oraz 2-AG, których synteza podczas przewlekłej ekspozycji na alkohol wzrasta [35,46].

Zbadano gęstość receptorów CB1 oraz ich powinowactwo do endogennych agonistów u myszy z różną preferencją do alkoholu. Zaobserwowano, że u myszy preferujących alkohol (C57BL/6) gęstość receptorów CB1 była o 25% niższa w porównaniu do linii zwierząt DBA/2

– niepreferujących. Występowały też różnice w powinowactwie do receptora CB1; u myszy linii DBA/2 było ono znacząco wyższe [5,45].

Vinod i wsp. oceniali wpływ długotrwałej ekspozycji na etanol oraz jego odstawienia na gęstość receptorów w różnych strukturach mózgu wykorzystując w tym celu radioligand [3H]CP55,940. Oceniono również wiązanie [35S]GTP γ S stymulowane agonistą receptora CB1, poprzez pomiar stężenia GDP. Do zbadania aktywacji białka G zależnej od stymulacji receptora kannabinoidowego zastosowano jego agonistę CP55,940. We wszystkich badanych strukturach mózgu (kora, hipokamp, prążkowie i mózdzek) gęstość receptorów CB1 zwierząt alkoholizowanych była niższa (31–39%) w stosunku do grupy kontrolnej. Zaobserwowano również, w tych samych strukturach, obniżenie (29–40%) aktywacji białka Gi/o zależnej od receptora CB1. Natomiast w okresie abstynencyjnym stwierdzono, zwłaszcza w hipokampie, zwiększoną gęstość receptorów CB1 oraz aktywację białka G [86].

Zmniejszenie wiązania [35S]GTP γ S stymulowanego agonistą receptora CB1, obserwowane w strukturach mózgu alkoholizowanych myszy, wydaje się związane z desensytyzacją receptorów CB1 oraz poziomem endokannabinoidów. Interesujący jest powrót liczby receptorów do poziomu wyjściowego (jak w grupie kontrolnej) po 24 h od odstawienia etanolu.

Wpływ etanolu na ekspresję genów kodujących receptory CB1

Wiadomo, że zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe odgrywają istotną rolę w rozwoju zależności alkoholowej [13,38]. W wyniku długotrwałego działania alkoholu, zaobserwowano zmiany ekspresji genów receptora CB1 w wybranych obszarach mózgu szczurów. Ortiz i wsp. wykazali, że u szczurów typu Wistar po 52 dniach wymuszonego spożywania etanolu (10% v/v) zmniejszyła się o 24% ekspresja genów receptora CB1 w części ogoniastej skorupy (caudate putamen – CPu), w jądrze brzuszno-przyśrodkowym podwzgórza (ventromedial nucleus of the hypothalamus – VMN) o 43%, w obszarach CA1 i CA2 hipokampa odpowiednio o 27 i 22%, natomiast w zakręcie zębatym (dentate gyrus – DG) zanotowano wzrost ekspresji o 30% [66]. Wyniki te różniły się od uzyskanych wcześniej przez inną grupę badaczy, którzy podczas długotrwałego podawania etanolu, nie zaobserwowali zmian w ekspresji genów i wiązaniu receptora CB1 [34]. Powodem tych różnic mogły być różnice metodyczne dotyczące czasu ekspozycji na alkohol oraz jego dawki.

CPu jest związana z ruchowymi oraz emocjonalnymi zachowaniami w przebiegu zespołu abstynencyjnego, występującego po przerwaniu długotrwałego stosowania substancji uzależniających, w tym etanolu [64]. W strukturze tej obserwowano zmiany w ekspresji genów receptorów opioidowych, co może być związane ze zwiększoną wrażliwością na opioidy oraz etanol [60]. W jądrze brzuszno-przyśrodkowym podwzgórza – VMN, związanym z regulacją zachowania, przyjmowaniem pokarmu [49] oraz reprodukcją [55] zaobserwowano, u szczurów alkoholizowanych, zwiększoną gęstość receptorów kannabinoidowych oraz zwiększoną ekspresję odpowiednich genów.

Hipokamp jest główną strukturą odpowiedzialną za procesy pamięciowe oraz funkcje poznawcze. Aktywacja receptorów kannabinoidowych w obrębie hipokampa hamuje wydzielanie wielu neuroprzekaźników; acetylocholin, GABA, glutaminy, noradrenaliny [23], co może wpływać na plastyczność synaptyczną i zaburzać procesy pamięciowe. Długotrwałe zmiany ekspresji genów receptorów kannabinoidowych w obszarach hipokampa, podczas przewlekłego spożywania alkoholu, mogą być przyczyną zaburzeń procesów uczenia się i pamięci obserwowanych w przebiegu uzależnienia od etanolu [62].

Podsumowując – wyniki powyższych badań wykazujące zmienność ekspresji genów receptorów kannabinoidowych CB1 u alkoholizowanych szczurów, w strukturach mózgu zaangażowanych w patogenezę uzależnienia, wskazują na udział transmisji kannabinoidowej w neurobiologicznych mechanizmach tego procesu.

ROLA KANNABINOIDÓW W FUNKCJONOWANIU STRUKTUR UKŁADU NAGRODY

Funkcjonalnym podłożem układu nagrody oraz wzmocnienia pozytywnego wywołwanego przez substancje uzależniające, w tym alkohol, są neurony dopaminergiczne przekazujące projekcje z brzuszno-obszaru nakrywki (VTA) śródmózgowia do jądra półleżącego (NAc) i do innych miejsc przodomózgowia (forebrain), włączając prążkowie grzbietowe (dorsal striatum). Pozostają one pod złożoną kontrolą również innych układów neurotransyjnych. Do VTA, oprócz neuronów dopaminergicznych, docierają GABA-ergiczne, które dalej dają projekcje do NAc, kory przedczołowej, jądra migdałowatego i innych części przodomózgowia. Natomiast projekcje glutaminia-nergiczne z kory przedczołowej przekazywane są „zwrotnie” do NAc i VTA [50].

Mechanizmami modulującymi proces wzmocnienia pozytywnego są: hamujący wpływ kwasu γ -aminomasłowego (GABA) i opioidów oraz pobudzający poprzez receptory NMDA, AMPA i kainowe oraz receptory nikotynowe i kannabinoidowe CB1. Uwalnianie dopaminy w NAc, decydujące o wzmocnieniu pozytywnym, regulują również receptory serotoninergetyczne 5-HT₃ [50].

W VTA receptory CB1 są umiejscowione na glutaminia-nergicznych oraz GABA-ergicznych neuronach presynaptycznych, natomiast nie występują na neuronach dopaminergicznych. Aktywacja receptorów CB1 w VTA przez endokannabinoidy powoduje zahamowanie uwalniania GABA, co w efekcie uwalnia spod ich hamującego wpływu neurony dopaminergiczne. Aktywacja tych ostatnich ułatwia „wyrzut endokannabinoidów” działających jako rodzaj wstecznego neuroprzekaźnika (retrograde neurotransmitter) na presynaptycznie zlokalizowane receptory CB1, zmniejszając zarówno pobudzający (przez glutaminę), jak i hamujący (przez GABA) wpływ na neurony dopaminergiczne w VTA [3]. Mimo że mechanizm ten poznano przed kilkunastu laty, to dopiero w 2001 roku ustalono, że rolę wstecznego neuroprzekaźnika odgrywają właśnie endokannabinoidy [51].

W NAc, endokannabinoidy hamują neurony glutaminia-nergiczne poprzez działanie zwrotne na presynaptyczne

receptory CB1 umiejscowione na ich zakończeniach. Takie hamowanie wydzielania glutaminy prowadzi do aktywacji neuronów dopaminowych VTA przez pośrednie hamowanie neuronów GABA-ergicznych mających początek w NAc, i dających projekcje do VTA. Podkreśla się, że projekcje glutaminia-nergiczne z kory przedczołowej, będące również pod modulującym wpływem receptorów CB1, mogą mieć ważne znaczenie w regulowaniu procesów motywacyjnych skłaniających do poszukiwania środka uzależniającego, w tym alkoholu [4,25,85].

Mechanizmy procesów prowadzących do rozwoju uzależnienia są bardzo złożone i wciąż za mało poznane. Endogenne kannabinoidy wydają się mieć znaczący udział w odpowiedzi tego układu na nagradzające właściwości środków psychoaktywnych, zarówno bezpośrednio jak i pośrednio wpływając na poziom innych przekaźników.

Wykazano, że indukowany alkoholem wzrost stężenia dopaminy w dializacie z jądra półleżącego u myszy linii C57BL/6J (preferujących alkohol) był całkowicie zahamowany przez uprzednie podanie zwierzętom rimonabantu, antagonisty receptora CB1, oraz u myszy KO. Natomiast alkohol (1,5 g/kg m.c.) podany myszom typu dzikiego znacząco zwiększył stężenie dopaminy w dializacie z tej struktury [47]. Obserwacje te wskazują na istotną interakcję między transmisją kannabinoidową i dopaminergiczną w aktywacji limbicznego układu nagrody, a przez to na udział tej transmisji we wzmacniających właściwościach alkoholu.

ANTAGONIŚCI RECEPTORÓW CB1, A SPOŻYCIE ALKOHOLU – BADANIA PRZEDKLINICZNE

Jednorazowe podanie CP55,940 bądź innego agonisty receptora CB1 – WIN 55,212-2, znacząco pobudzało dobrowolne picie alkoholu u szczurów linii sP, preferujących alkohol, natomiast podanie antagonisty SR141716A w dawce 0,3 mg/kg m.c./dobę, hamowało ten efekt [17].

Wyniki innych badań z różnych laboratoriów wykazały zmniejszenie dobrowolnego spożycia alkoholu przez wyselekcjonowane linie gryzoni, którym podawano antagonistę receptorów kannabinoidowych CB1 – rimonabant (SR141716). Zmniejszał on dobrowolne spożycie alkoholu u myszy linii C57BL/6 preferujących alkohol [2,54], u preferujących szczurów sP (Sardinian alcohol-preferring rats) [16], u szczurów samopodających alkohol (long evans rats) [27] oraz u preferujących alkohol kongenicznych odmian myszy [46]. W badaniu wpływu antagonisty CB1 – SR141716 na picie alkoholu przez szczury linii WHP (Warsaw high preffering) również wykazano znamienne zmniejszenie spożycia alkoholu przez gryzonie [24].

Arnone i wsp. w badaniu u myszy linii C57BL/6 z genetycznie uwarunkowaną preferencją do alkoholu wykazali, że rimonabant w dawkach 0,3–3,0 mg/kg m.c. znacząco zmniejszał dobrowolne picie alkoholu, nie wpływał natomiast na picie wody [2].

Colombo i wsp. obserwowali zmniejszenie dobrowolnego spożycia alkoholu przez samce szczurów linii sP (preferujących) po podaniu rimonabantu w dawkach 2,5–10,0 mg/kg m.c., odpowiednio o 40–50% [16].

Podobne wyniki otrzymano badając wpływ antagonisty receptorów CB1 w dawkach 2,5, 5,0 i 10,0 mg/kg m.c., na picie alkoholu (w wolnym wyborze) przez szczury linii WHP. Wykazano, że lek podany jednorazowo w każdej z dawek zmniejszał istotnie picie alkoholu, w dawkach 5 i 10 mg/kg m.c. redukował także spożycie pokarmu, a w dawce 2,5 mg/kg m.c. zwiększał spożycie wody [24].

Zróznicowany wpływ na spożycie etanolu i pokarmu wydaje się dawkozależny. Lek bardziej zmniejsza spożycie etanolu, natomiast wpływ na spożycie pokarmu obserwowano w wyższych jego dawkach 5 i 10 mg/kg m.c. Statystycznie istotne zmniejszenie picia alkoholu po podaniu niskiej dawki leku (2,5 mg/kg m.c.) przy jednoczesnym braku wpływu na spożycie pokarmu, może świadczyć o ograniczonej selektywności działania rimonabantu.

W innym badaniu wykazano, że rimonabant w jednorazowej dawce zmniejszał samopodawanie alkoholu u przewlekle alkoholizowanych szczurów typu Wistar [47], natomiast podawany dootrzewnowo albo doustnie (1, 3, 10 mg/kg m.c./dobę) jednocześnie z alkoholem bądź w przerwach picia, nie wykazywał takiego działania, a nawet zwiększał jego preferencję.

Natomiast Lallemand i wsp. obserwowali, że SR141716A zastosowany po długotrwałym wziewnym podawaniu alkoholu, a także w przerwach długotrwałego alkoholizowania oraz w modelu wolnego wyboru alkohol/woda powodował znaczące zmniejszenie picia alkoholu [54].

Podobne wyniki uzyskano w innych badaniach, w których ostre podanie agonisty receptora CB1 – CP55,940 zwiększyło spożycie alkoholu przez szczury typu Wistar, a wcześniejsze podanie rimonabantu hamowało to działanie [30,31].

Serra i wsp. wykazali, że rimonabant w jednorazowej dawce łagodził objawy abstynencyjne u szczurów linii sP, które przez 15 dni piły 10% v/v etanol, a po tym czasie zostały go pozbawione [76].

Badania funkcji receptorów CB1 u myszy preferujących i niepreferujących alkoholu wzmacniają hipotezę, że inaktywacja lub desensytyzacja receptorów CB1 hamuje dobrowolne spożycie alkoholu [46,66]. Wydaje się, że zwierzęta z genetyczną predyspozycją do preferencji alkoholu cechuje zwiększona wrażliwość endogennego układu kannabinoidowego na działanie alkoholu [38]. Myszy KO wykazywały znacznie obniżoną dobrowolną konsumpcję alkoholu. Dodatkowo stwierdzono istotne różnice w zależności od płci: samice myszy typu dzikiego spożywały więcej alkoholu niż samce, natomiast różnic takich nie obserwowano u myszy KO [47].

Wykazano, że istnieje też zależność preferencji alkoholu od wieku myszy. Młode myszy typu dzikiego (6–10-tygodniowe) linii C57BL/6J wykazywały większą skłonność do alkoholu oraz dobrowolne jego spożycie w porównaniu do myszy KO. Antagonista receptora CB1 SR141716A zmniejszał dobrowolne spożycie alkoholu u młodych myszy typu dzikiego, czego nie obserwowano u starszych myszy typu dzikiego (26–48-tygodniowe) oraz u myszy KO [87].

Nassilla i wsp. badali udział receptorów CB1 w regulacji dobrowolnego spożycia alkoholu oraz ostrych skutkach jego

działania. Wykazali, że myszy KO cechowała zmniejszona konsumpcja i preferencja alkoholu, podczas gdy wrażliwość na alkohol i objawy abstynencyjne były nasilone. Zwierzęta te były bardziej wrażliwe na hipotermiczny, uspokajający i nasenny wpływ jednorazowych dawek etanolu. Ponadto objawy zespołu abstynencyjnego były również silniej wyrażone, co korelowało ze zmniejszonym samopodawaniem przez nie etanolu w porównaniu do myszy typu dzikiego [61].

Gryzonie wyselekcjonowane w kierunku niskiego spożycia alkoholu wykazują silniejsze objawy abstynencyjne po odstawieniu alkoholu w porównaniu do linii dużo pijących [13,14,18]. Analiza rekombinowanych odmian zwierząt z wrodzonymi nasilonymi objawami abstynencyjnymi, wskazała na ilościowe cechy umiejscowione na chromosomie 4 w bliskim sąsiedztwie genów kodujących receptor CB1 [10].

Wyniki powyższych badań wskazują na istotny udział receptorów CB1 w neurochemicznych mechanizmach konsumpcji alkoholu i regulowaniu jego picia, a brak lub dysfunkcja tych receptorów zwiększa wrażliwość na etanol oraz nasila objawy abstynencyjne.

W korze przedczołowej szczurów preferujących alkohol stwierdzono zmniejszoną ekspresję i aktywność FAAH – głównego enzymu w metabolizmie kannabinoidów, z kompensacyjnym zmniejszeniem gęstości receptorów CB1 i osłabieniem transmisji. Natomiast iniekcje do kory przedczołowej inhibitorów FAAH (URB597) zwiększały samopodawanie alkoholu u szczurów typu Wistar [38]. Można zatem sądzić, że aktywność FAAH może decydować o poziomie transmisji endokannabinoidowej, a także o fenotypie zwierząt w kierunku wysokiej/niskiej dobrovolnej konsumpcji alkoholu.

BADANIA KLINICZNE

W odpowiedzi na zachęcające wyniki badań na modelach zwierzęcych podjęto próby kliniczne. W pierwszym podwójnie kontrolowanym badaniu podawano rimonabant w dawce 20 mg/dobę przez 12 tygodni uzależnionym, po niedawnej detoksykacji [77]. Do badania włączono 260 pacjentów z 15-letnią historią alkoholową (w tym 208, tj. 80,6% mężczyzn). Terapię ukończyła większość pacjentów, tj.: 94 z 131 (71,8%) w grupie rimonabantu i 79 z 127 (62,2%) w grupie kontrolnej. Biorąc pod uwagę wskaźnik nawrotów do picia, obserwowano korzystne efekty terapii rimonabantem, jednakże różnice między grupami nie były istotne statystycznie; 41,5% pacjentów otrzymujących rimonabant powróciło do picia pod koniec badania, w porównaniu do 47,7% z grupy kontrolnej otrzymującej placebo. Efekty były bardziej wyraźne, ale również statystycznie nieistotne, wśród pacjentów, którzy powrócili do ostrego picia, tj.: odpowiednio 27,7% (rimonabant) i 35,6% (placebo).

Bezpieczeństwo i tolerancję leku uznano za dobrą, nasilenie działań niepożądanych było podobne w obu grupach. Brak zadowalającej skuteczności rimonabantu w przeprowadzonym badaniu autorzy próbują tłumaczyć stosunkowo krótkim czasem jego trwania oraz wysokim współczynnikiem odpowiedzi w grupie placebo [77].

W 2010 roku grupa amerykańskich badaczy podjęła się oceny wpływu rimonabantu na picie alkoholu przez ciężko uzależnionych. W 3-tygodniowym badaniu udział wzięło 49 osób, nieodczuwających żadnej potrzeby podjęcia terapii. Po tygodniu podstawowych przygotowań, przez kolejne 2 tygodnie, uczestnicy otrzymywali 20 mg rimonabantu na dobę lub placebo w warunkach podwójnie ślepej próby. Przez 3 tygodnie, pacjenci zgłaszali telefonicznie dzienne spożycie alkoholu, a następnie brali udział w tzw. paradymacie dobrowolnego jego dawkowania. Początkowo otrzymywali tzw. dawkę inicjującą (priming dose) alkoholu, po czym wybierali pomiędzy możliwością wypicia 8 kolejnych drinków alkoholowych lub otrzymania 3 dolarów za każdą nieskonsumowaną dawkę alkoholu. Metoda ta (paradygmatu dobrowolnego dawkowania alkoholu) została już wcześniej wykorzystana w badaniu wpływu naltreksonu na ilość spożytego alkoholu przez osoby uzależnione i sprawdziła się wykazując istotną różnicę [63].

W badaniu zlecono jednoczesne sporządzenie biochemicznego profilu wydzielania wewnętrznego (badano poziom ACTH, kortyzolu oraz maksymalne stężenie alkoholu we krwi) oraz zastosowano system skali oceny własnej, określający obecność lub/i nasilenie objawów uzależnienia.

Wykazano, że rimonabant nie zmniejszył spożycia alkoholu u badanych, nie wpłynął na dobrowolne spożycie, ani też na wyniki przeprowadzonych badań biochemicznych. Autorzy w podsumowaniu wnioskuje, że podawanie 20 mg rimonabantu na dobę przez 2 tygodnie nie ma wpływu na picie u pacjentów ciężko uzależnionych od alkoholu [32].

Ciekawym wydaje się to, iż około 50% uczestników pod koniec badania zgłosiło, że uświadomiło sobie swój problem alkoholowy i zapragnęło ograniczyć picie. Jednakże w projekcie procedur badawczych nie przewidziano oceny zmian preferencji w tym zakresie.

Rozpatrywano wiele aspektów braku skutecznego działania leku, a w pierwszej kolejności wykluczono wynikający z nieprawidłowego jego stosowania. Stężenie rimonabantu było kontrolowane i utrzymane na prawidłowym poziomie zarówno w grupie przyjmującej lek, u wolontariuszy oraz u pacjentów otyłych leczonych dawką 20 mg [83]. Podkreślano zbyt małą liczebność grup; do uzyskania istotnego efektu terapii i zaobserwowania podstawowych zależności, niezbędna jest zdecydowanie większa liczba uczestników oraz dłuższy czas badania.

Na uwagę zasługuje stwierdzenie, że dawka użyta w badaniu (20 mg/dobę) wywołuje niekompletną blokadę receptora CB1 [44], w przeciwieństwie do dawki podawanej zwierzętom laboratoryjnym (3–10 mg/kg m.c.), która powodowała prawie całkowite wysycenie receptora CB1 i w konsekwencji zmniejszenie spożycia alkoholu. Stąd można przypuszczać, że wyższe dawki rimonabantu zastosowane u ludzi, mogłyby znacząco zmniejszać potrzebę picia. Niestety, ryzyko działań niepożądanych związane z przyjmowaniem wyższych dawek leku, wyklucza ich zastosowanie.

Badanie zostało zaprojektowane analogicznie do przeprowadzonego wcześniej z naltreksonem, stosowanym także w minimalizowaniu spożycia alkoholu [63]. Oba leki są inhibitorami sygnalizacji mezo limbicznego układu nagrody, co zostało potwierdzone na modelach zwierzęcych, w których zastosowano porównywalny zakres dawek każdego z leków. U osób uzależnionych naltrekson zastosowany w dawkach 50–150 mg/dobę, zmniejsza spożycie alkoholu, a niemal całkowita blokada receptora μ opioidowego następuje już po dawce 50 mg [88]. Rimonabant w dawce 20 mg/dobę blokuje jedynie częściowo receptor CB1, co sugeruje, że istotne zmniejszenie motywacji do picia alkoholu może następować wówczas, gdy dojdzie do pełnego zablokowania sygnalizacji związanej z układem nagrody, zarówno przez peptydy opioidowe, jak i endokannabinoidy [15].

Należy również wziąć pod uwagę, że do badania zakwalifikowano pacjentów ciężko uzależnionych od alkoholu, którzy nie przejawiali żadnej chęci do zmniejszenia jego picia. Należałoby włączyć do badania pacjentów uzależnionych, ale deklarujących chęć podjęcia terapii, chociaż we wcześniejszej próbie obejmującej pacjentów po niedawnej detoksykacji, lek również nie wywierał spodziewanego efektu [77].

Zaprezentowane wyniki badań klinicznych, mimo że mało zadowalające, nie dyskwalifikują układu endokannabinoidowego jako potencjalnego punktu uchwytu dla farmakoterapii uzależnionych od alkoholu. W odniesieniu do wielu wcześniej badanych leków, łącznie z naltreksonem i akamprozatem uzyskiwano również bardzo dobre wyniki na zwierzęcych modelach doświadczalnych, a wyniki badań klinicznych nie zawsze spełniały oczekiwania [75]. Mimo to, są one obecnie uznane za leki o potwierdzonej skuteczności klinicznej, rekomendowane po uwzględnieniu klasyfikacji typologicznej pacjentów. Dlatego też wydaje się uzasadnione podejmowanie w tym kierunku dalszych prób klinicznych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Ameri A.: The effects of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol.*, 1999; 58: 315–348
- [2] Arnone M., Maruani J., Chaperon F., Thiebot M., Poncelet M., Soubrie P., Le Fur G.: Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR 141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology*, 1997; 132: 104–106
- [3] Basavarajappa B.S.: Neuropharmacology of the endocannabinoid signaling system-molecular mechanisms, biological actions and synaptic plasticity. *Curr. Neuropharmacol.*, 2007; 5: 81–97
- [4] Basavarajappa B.S.: The endocannabinoid signaling system: a potential target for next-generation therapeutics for Alcoholism. *Mini. Rev. Med. Chem.*, 2007; 7: 769–779
- [5] Basavarajappa B.S., Hungund B.L.: Cannabinoid receptor agonist stimulated [³⁵S]guanosine triphosphate binding in the brain of C57BL/6 and DBA/2 mice. *J. Neurosci. Res.*, 2001; 64: 429–436
- [6] Basavarajappa B.S., Hungund B.L.: Chronic ethanol increases the cannabinoid receptor agonist anandamide and its precursor N-arachidonoylphosphatidylethanolamine in SK-N-SH cells. *J. Neurochem.*, 2002; 72: 522–528
- [7] Basavarajappa B.S., Hungund B.L.: Neuromodulatory role of the endocannabinoid signaling system in alcoholism: an overview. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids*, 2002; 66: 287–299
- [8] Basavarajappa B.S., Saito M., Coopera T.B., Hungund B.L.: Chronic ethanol inhibits the anandamide transport and increases extracellular anandamide levels in cerebellar granule neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, 2003; 466: 73–83

- [9] Breivogel C.S., Griffin G., Di Marzo V., Martin B.R.: Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol. Pharmacol.*, 2001; 60: 155–163
- [10] Buck K.J., Metten P., Belknap J.K., Crabbe J.C.: Quantitative trait *loci* involved in genetic predisposition to acute alcohol withdrawal in mice. *J. Neurosci.*, 1997; 17: 3946–3955
- [11] Caille S., Alvarez-Jaimes L., Polis I., Stouffer D.G., Parsons L.H.: Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self-administration. *J. Neurosci.*, 2007, 27: 3695–3702
- [12] Chan G.C., Hinds T.R., Impey S., Storm D.R.: Hippocampal neurotoxicity of Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *J. Neurosci.*, 1998; 18: 5322–5332
- [13] Chester J.A., Blose A.M., Froehlich J.C.: Further evidence of an inverse genetic relationship between innate differences in alcohol preference and alcohol withdrawal magnitude in multiple selectively bred rat lines. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 2003; 27: 377–387
- [14] Chester J.A., Risinger F.O., Cunningham C.L.: Ethanol reward and aversion in mice bred for sensitivity to ethanol withdrawal. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 1998; 22: 468–473
- [15] Cippitelli A., Bilbao A., Hansson A.C., Del A.I., Sommer W., Heiling M., Massi M., Bermudez-Silva F.J., Navarro M., Ciccocioppo R., de Fonseca F.R.: Cannabinoid CB1 receptor antagonism reduces conditioned reinstatement of ethanol-seeking behavior in rats. *Eur. J. Neurosci.*, 2005, 21: 2243–2251
- [16] Colombo G., Agabio R., Fa M., Guano L., Lobina C., Loche A., Reali R., Gessa G.: Reduction of voluntary ethanol intake in ethanol preferring sP rats by the cannabinoid antagonist SR-141716. *Alcohol Alcohol.*, 1998; 33: 126–130
- [17] Colombo G., Serra S., Brunetti G., Gomez R., Melis S., Vacca G., Carai M.M., Gessa L.: Stimulation of voluntary ethanol intake by cannabinoid receptor agonists in ethanol-preferring sP rats. *Psychopharmacology*, 2002; 159: 181–187
- [18] Crabbe J.C., Gallaher E.S., Phillips T.J., Belknap J.K.: Genetic determinants of sensitivity to ethanol in inbred mice. *Behav. Neurosci.*, 1994; 108: 186–195
- [19] De Miguel R., Hernandez-Tristan R.: Cannabinoid effects on anxiety-related behaviours and hypothalamic neurotransmitters. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2001; 70: 123–131
- [20] Deutsch D.G., Chin S.A.: Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem. Pharmacol.*, 1993; 46: 791–796
- [21] Devane W.A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R.G., Stevenson L.A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R.: Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 1992; 258: 1946–1949
- [22] Di Marzo V., Fontana A., Cadas H., Schinelli S., Cimino G., Schwartz J.C., Piomelli D.: Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 1994; 372: 686–691
- [23] Doherty J., Dingleline R.: Functional interactions between cannabinoid and metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2003; 3: 46–53
- [24] Dyr W., Ligieja J., Kostowski W.: Wpływ antagonisty receptora kabinoidowego SR 141716 na picie alkoholu przez szczury linii WHP. *Alkoholizm i Narkomania*, 2008; 21: 45–54
- [25] Economidou D., Mattioli L., Cifani C., Perfumi M., Massi M., Cuomo V., Trabace L., Ciccocioppo R.: Effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR-141716A on ethanol self-administration and ethanol-seeking behaviour in rats. *Psychopharmacology*, 2006; 183: 394–403
- [26] Elphick M.R., Egertova M.: The neurobiology and evolution of cannabinoid signaling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2001, 356: 381–408
- [27] Freedland C.S., Sharpe A.L., Samson H.H., Porrino L.J.: Effects of SR141716A on ethanol and sucrose self-administration. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 2001; 25: 277–282
- [28] Freund T.F., Katona I., Piomelli D.: Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.*, 2003, 83: 1017–1066
- [29] Frider E.: Endocannabinoids in the central nervous system—an overview. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids*, 2002; 66: 221–233
- [30] Gallate J.E., McGregor I.S.: The motivation for beer in rats: effects of ritanserin, naloxone and SR 141716. *Psychopharmacology*, 1999; 142: 302–308
- [31] Gallate J.E., Saharov T., Mallet P.E., McGregor I.S.: Increased motivation for beer in rats following administration of a cannabinoid CB1 receptor agonist. *Eur. J. Pharmacol.*, 1999; 370: 233–240
- [32] George D.T., Herion D.W., Jones C.L., Phillips M.J., Hersh J., Hill D., Heilig M., Ramchandani V.A., Geyer C., Spero D.E., Singley E.D., O'Malley S.S., Bishai R., Rawlings R.R., Kunos G.: Rimonabant (SR141716) has no effect on alcohol self-administration or endocrine measures in nontreatment-seeking heavy alcohol drinkers. *Psychopharmacology*, 2010; 208: 37–44
- [33] Giuffrida A., Beltramo M., Piomelli D.: Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001, 298: 7–14
- [34] Gonzalez S., Fernandez-Ruiz J., Sparpaglione V., Parolaro V., Ramos J.A.: Chronic exposure to morphine, cocaine or ethanol in rats produced different effects in brain cannabinoid CB1 receptor binding and mRNA levels. *Drug Alcohol Depend.*, 2002; 66: 77–84
- [35] Gonzalez S., Grazia Cascio M., Fernandez-Ruiz J., Fezza F., Di Marzo V., Ramos J.A.: Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine. *Brain Res.*, 2002; 954:73–81
- [36] González S., Valenti M., De Miguel R., Fezza F., Fernández-Ruiz J., Di Marzo V., Ramos J.A.: Changes in endocannabinoid contents in reward-related brain regions of alcohol-exposed rats, and their possible relevance to alcohol relapse. *Br. J. Pharmacol.*, 2004; 143: 455–464
- [37] Grotenhermen F.: Pharmacokinetic and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin. Pharmacokinet.*, 2003, 42: 327–360
- [38] Hansson A.C., Bermudez-Silva F.J., Malinen H., Hyytiä P., Sanchez-Vera I., Rimondini R., Rodriguez de Fonseca F., Kunos G., Sommer W.H., Heilig M.: Genetic impairment of frontocortical endocannabinoid degradation and high alcohol preference. *Neuropsychopharmacology*, 2007; 32: 117–126
- [39] Herkenham M., Lynn A.B., de Costa B.R., Richfield E.K.: Neuronal localization of cannabinoid receptors in basal ganglia of the rat. *Brain Res.*, 1991; 547: 267–274
- [40] Herkenham M., Lynn A.B., Johnson M., Melvin L.S., de Costa B.R., Rice K.C.: Characterization and location of cannabinoid receptors in the rat brain: a quantitative *in vitro* autoradiographic study. *J. Neurosci.*, 1991; 11: 563–583
- [41] Herkenham M., Lynn A.B., Little M.D., Johnson M., Melvin L.S., de Costa B.R., Rice K.C.: Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990; 87: 1932–1936
- [42] Horvath T.L.: Endocannabinoids and the regulation of body fat: the smoke is clearing. *J. Clin. Invest.*, 2003; 112: 323–326
- [43] Howlett A.C., Mukhopadhyay S.: Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Phys. Lipids*, 2000; 108: 53–70
- [44] Huestis M.A., Gorelick D.A., Heisman S.J., Preston K.L., Nelson R.A., Moolchan E.T., Frank R.A.: Blockade of effects of smoked marijuana by the CB1-selective cannabinoid receptor antagonist SR141716. *Arch. Gen. Psychiatry*, 2001, 58: 322–328
- [45] Hungund B.L., Basavarajappa B.S.: Distinct differences in the cannabinoid receptor binding in the brain of C57BL/6 and DBA/2 mice, selected for their differences in voluntary ethanol consumption. *J. Neurosci. Res.*, 2000; 60: 122–128
- [46] Hungund B.L., Basavarajappa B.S., Vadasz C., Kunos G., Rodriguez de Fonseca F., Colombo G., Serra S., Parsons L., Koob G.F.: Ethanol, endocannabinoids and cannabinoidergic signaling system. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 2002; 26: 565–574
- [47] Hungund B.L., Szakall I., Adam A., Basavarajappa B.S., Vadasz C.: Cannabinoid CB1 receptor knockout mice exhibit markedly reduced voluntary alcohol consumption and lack alcohol-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *J. Neurochem.*, 2003, 84: 698–704
- [48] Iversen L., Chapman V.: Cannabinoids: a real prospect for pain relief? *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2002; 2: 50–55
- [49] Jamshidi N., Taylor D.A.: Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br. J. Pharmacol.*, 2001; 134: 1151–1154
- [50] Johnson B.A.: Update on neuropharmacological treatments for alcoholism: Scientific basis and clinical findings. *Rew. Biochem. Pharmacol.*, 2008; 75: 34–56
- [51] Kano M., Ohno-Shosaku T., Maejima T.: Retrograde signaling at central synapses via endogenous cannabinoids. *Mol. Psychiatry*, 2002; 7: 234–235
- [52] Kenna G.A.; McGeary J.E.; Swift R.M.: Pharmacotherapy, pharmacogenomics, and the future of alcohol dependence treatment, part 2. *Clinical Reviews. Am. J. Health Syst. Pharm.*, 2004; 15: 2380–2388
- [53] Klein T.W., Lane B., Newton C.A., Friedman H.: The cannabinoid system and cytokine network. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 2000; 225: 1–8

- [54] Lallemand F., Soubrie P.H., De Witte P.H.: Effects of CB1 cannabinoid receptor blockade on ethanol preference after chronic ethanol administration. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 2001; 25: 1317–1323
- [55] Li Y., McGivern R.F., Nagahara A.H., Handa R.J.: Alterations in the estrogen sensitivity of hypothalamic proenkephalin mRNA expression with age and prenatal exposure to ethanol. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1997; 47: 215–222
- [56] Maldonado R., Valverde O.: Participation of the opioid system in cannabinoid-induced antinociception and emotional-like responses. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 2003; 13: 401–410
- [57] Martin B.R.: Identification of the endogenous cannabinoid system through integrative pharmacological approaches. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2002; 301: 790–796
- [58] Martin B.R., Compton D.R., Thomas B.F., Prescott W.R., Little P.J., Razdan R.K., Johnson M.R., Melvin L.S., Mechoulam R., Ward S.J.: Behavioral, biochemical, and molecular modeling evaluations of cannabinoid analogs. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1991; 40: 471–478
- [59] Martin M., Ledent C., Parmentier M., Maldonado R., Valverde O.: Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology*, 2002; 159: 379–387
- [60] Martín S., Manzanares J., Corchero J., García-Lecumberri C., Crespo J.A., Fuentes J.A., Ambrosio E.: Differential basal proenkephalin gene expression in dorsal striatum and nucleus accumbens, and vulnerability to morphine self administration in Fischer 344 and Lewis rats. *Brain Res.*, 1999; 821: 350–355
- [61] Naassila M., Pierrefiche O., Ledent C., Daoust M.: Decreased alcohol self-administration and increased alcohol sensitivity and withdrawal in CB1 receptor knockout mice. *Neuropharmacology*, 2004; 46: 243–253
- [62] Nestler E.J.: Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 2002; 78: 637–647
- [63] O'Malley S.S., Krishnan-Sarin S., Farren C., Sinha R., Kreek M.J.: Naltrexone decreases craving and alcohol self-administration in alcohol-dependent subjects and activates the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Psychopharmacology*, 2002; 160: 19–29
- [64] Oliva J.M., Ortiz S., Palomo T., Manzanares J.: Behavioural and gene transcription alterations induced by spontaneous cannabinoid withdrawal in mice. *J. Neurochem.*, 2003; 85: 94–104
- [65] Ortas G., Ligresti A., De Petrocellis L., Morera E., Di Marzo V.: Novel selective and metabolically stable inhibitors of anandamide cellular uptake. *Biochem. Pharmacol.*, 2003; 65: 1473–1481
- [66] Ortiz S., Oliva J.M., Perez-Rial S., Palomo T., Manzanares J.: Chronic ethanol consumption regulates cannabinoid CB1 receptor gene expression in selected regions of rat brain. *Alcohol Alcohol.*, 2004; 39: 88–92
- [67] Pandey R., Mousawy K., Nagarkatti M., Nagarkatti P.: Endocannabinoids and immune regulation. *Pharmacol. Res.*, 2009; 60: 85–92
- [68] Parolaro D., Viganò D., Realini N., Rubino T.: Role of endocannabinoids in regulating drug dependence. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, 2007; 3: 711–721
- [69] Perrot S.: Cannabis: the analgesic and anti-inflammatory medication of the future? *Joint Bone Spine*, 2004; 71: 7–8
- [70] Pertwee R.G.: Cannabinoid receptors and pain. *Prog. Neurobiol.*, 2001; 63: 569–611
- [71] Pertwee R.G.: Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol. Ther.*, 1997; 74: 129–180
- [72] Pertwee R.G., Ross R.A.: Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 2002; 66: 101–121
- [73] Raitio K.H., Salo O.M., Nevalainen T., Poso A., Järvinen T.: Targeting the cannabinoid CB2 receptor: mutations, modeling and development of CB2 selective ligands. *Curr. Med. Chem.*, 2005; 12: 1217–1237
- [74] Rodríguez de Fonseca F., Roberts A.J., Bilbao A., Koob G.F., Navarro M.: Cannabinoid receptor antagonist SR141716A decreases operant ethanol self administration in rats exposed to ethanol-vapor chambers. *Zhongguo. Yao. Li. Xue. Bao.*, 1999; 20: 1109–1114
- [75] Rosner S., Leucht S., Leher P., Soyka M.: Acamprosate supports abstinence, naltrexone prevents excessive drinking: evidence from a meta-analysis with unreported outcomes. *J. Psychopharmacol.*, 2008; 22: 11–23
- [76] Serra S., Brunetti G., Pani M., Vacca G., Carai M.A., Gessa G.L., Colombo G.: Blockade by the cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR 141716, of alcohol deprivation effect in alcohol-preferring rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 2002; 443: 95–97
- [77] Soyka M., Koller G., Schmidt P., Lesch O.M., Leweke M., Fehr C., Gann H., Mann K.F. ACTOL Study Investigators.: Cannabinoid receptor 1 blocker rimonabant (SR 141716) for treatment of alcohol dependence: results from a placebo-controlled, double-blind trial. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 2008; 28: 317–324
- [78] Stella N., Schweitzer P., Piomelli D.: A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 1997; 388: 773–778
- [79] Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Tonegawa T., Nakane S., Yamashita A., Ishima Y., Waku K.: Transacetylase-mediated and phosphodiesterase-mediated synthesis of N-arachidonylethanolamine an endogenous cannabinoid-receptor ligand, in rat brain microsomes. Comparison with synthesis from free arachidonic acid and ethanolamine. *Eur. J. Biochem.*, 1996; 240: 53–62
- [80] Sullivan J.M.: Cellular and molecular mechanisms underlying learning and memory impairments produced by cannabinoids. *Learn. Mem.*, 2000; 7: 132–139
- [81] Svíženská I., Dubový P., Šulcová A.: Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures – a short review. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2008; 90: 501–511
- [82] Tsou K., Brown S., Sanudo-Pena M.C., Mackie K., Walker J.M.: Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 1998; 83: 393–411
- [83] Turpault S., Kanamaluru V., Lockwood G.F., Bonnet D., Newton J.: Rimonabant pharmacokinetics in the healthy and obese subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2006; 79: 50
- [84] Van der Stelt M., Di Marzo V.: The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *Eur. J. Pharmacol.*, 2003; 480: 133–150
- [85] Vinod K.Y., Yalamanchili R., Thanos P.K., Vadasz C., Cooper T.B., Volkow N.D., Hungund B.L.: Genetic and pharmacological manipulations of the CB1 receptor alter ethanol preference and dependence in ethanol preferring and nonpreferring mice. *Synapse*, 2008; 62: 574–581
- [86] Vinod K.Y., Yalamanchili R., Xie S., Cooper T.B., Hungund B.L.: Effect of chronic ethanol exposure and its withdrawal on the endocannabinoid system. *Neurochem. Int.*, 2006; 49: 619–625
- [87] Wang L., Liu J., Harvey-White J., Zimmer A., Kunos G.: Endocannabinoid signaling via CB1 receptors is involved in ethanol preference and its age-dependent decline in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 1393–1398
- [88] Weerts E.M., Kim Y.K., Wand G.S., Dannals R.F., Lee J.S., Frost J.J., McCaul M.E.: Differences in delta- and mu-opioid receptor blockade measured by positron emission tomography in naltrexon-treated recently abstinent alcohol-dependent subjects. *Neuropsychopharmacology*, 2008; 33: 653–665

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.