

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΗ
ΨΥΧΟΔΡΑΣΤΙΚΗΣ ΕΝΩΣΗΣ ΚΑΝΝΑΒΙΔΙΟΛΗΣ (CBD) ΣΕ
ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ**

ΚΑΡΑΛΑΖΟΥ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ, ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΥΠΕΥΘΥΝΗ: ΚΑΘ. Θ.ΧΟΛΗ-ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ



ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2013

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΑΡΑΛΑΖΟΥ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ, ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΗ
ΨΥΧΟΔΡΑΣΤΙΚΗΣ ΕΝΩΣΗΣ ΚΑΝΝΑΒΙΔΙΟΛΗΣ (CBD) ΣΕ
ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ**

εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τομέα Οργανικής Χημείας και
Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του
Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγήτρια ΘΕΟΔΩΡΑ ΧΟΛΗ-ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ- Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
Καθηγητής ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΥΡΙΑΚΙΔΗΣ- Μέλος εξεταστικής επιτροπής
Αναπλ. Καθηγητής ΘΩΜΑΣ ΓΙΑΝΝΑΚΟΥΡΟΣ- Μέλος εξεταστικής επιτροπής

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή που ορίστηκε σύμφωνα με τη Γ.Σ.Ε.Σ. 254/4-3-2013, για τη κρίση της Διπλωματικής Εργασίας της Καραλάζου Παρασκευής, Ιατρού Βιοπαθολόγου, συνήλθε σε συνεδρίαση στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης την 5/3/2013, όπου παρακολούθησε την υποστήριξη της εργασίας με τίτλο ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΗ ΨΥΧΟΔΡΑΣΤΙΚΗΣ ΕΝΩΣΗΣ ΚΑΝΝΑΒΙΔΙΟΛΗΣ (CBD) ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ και την ενέκρινε με βαθμό 10.

Περιεχόμενα

	Σελ.
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	III
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	IV
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
A1. ΚΑΝΝΑΒΗΣ-ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ	1
A2. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ	3
A3. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ	8
A.3.1. Ρύθμιση της αδενυλικής κυκλάσης	10
A.3.2. Ρύθμιση διαύλων ιόντων	11
α) δίαυλοι ασβεστίου	11
β) δίαυλοι καλίου	12
A.3.3. Ρύθμιση της κινάσης εστιακής προσκόλλησης (FAK)	12
A.3.4. Μεταγωγή σήματος μέσω ενεργοποιηθήσας από μιτογόνα πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK)	12
A.3.5. Ρύθμιση της κινάσης της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3K)/ πρωτεϊνικής κινάσης B (PKB/Akt)	15
A.3.6. Κεραμίδιο: ένα νέο μηνυματοφόρο μόριο	16
A4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ CB ₂ R ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΤΥΧΗ	18
A5. ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ ΠΟΥ ΔΕΝ ΟΦΕΙΛΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ CB ₁ Rs	19
A6. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ	20
A7. ΤΑ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟ ΜΕΣΟ	21
A8. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ	23
A.8.1. Αλληλεπίδραση με αυξητικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό	23
A.8.2. Ενεργοποίηση μεταγωγικών μονοπατιών που προάγουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό	25
A9. ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ	26
A10. ΤΑ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	28
A.10.1. Κανναβινοειδή και καρκίνοι του εγκεφάλου(γλοιώματα)	30
A.10.2. Κανναβινοειδή και καρκίνος του προστάτη	36
A.10.3. Κανναβινοειδή και καρκίνος του μαστού	38
A.10.4. Κανναβινοειδή και καρκίνος του πνεύμονα	41
A.10.5. Κανναβινοειδή και καρκίνος του δέρματος	43
A.10.6. Κανναβινοειδή και καρκίνος του παγκρέατος	45
A.10.7. Κανναβινοειδή και λεμφώματα-λευχαιμία	46
A.10.8. Κανναβινοειδή και καρκίνοι του εντέρου	49

A11. ΚΑΝΝΑΒΙΔΙΟΛΗ (CBD)	52
A12. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΝΝΑΒΙΔΙΟΛΗΣ	54
A.12.1. Αντιεπιληπτική δράση	54
A.12.2. Ηρεμιστική-αγχολυτική δράση	54
A.12.3. Αντιψυχωσική δράση	55
A.12.4. Δράση στις κινητικές διαταραχές	56
A.12.5. Αντιοξειδωτική και νευροπροστατευτική δράση	57
A.12.6. Αντιφλεγμονώδη δράση	58
A.12.7. Δράση στο διαβήτη	59
A.12.8. Αντιεμετική δράση	59
A.12.9. Αντικαρκινική δράση	60
B. ΣΚΟΠΟΣ	64
Γ. ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ	65
Γ1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	65
Γ2. ΥΛΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	66
Γ.2.1. Τεχνική παρασκευής πλήρους θρεπτικού μέσου κυττάρων	67
Γ.2.2. Τεχνική ψύξης των κυττάρων	67
Γ.2.3. Τεχνική απόψυξης των κυττάρων	68
Γ.2.4. Τεχνική ανακαλλιέργειας των κυττάρων	68
Γ.2.5. Τεχνική μέτρησης των κυττάρων σε πλάκα Neubauer	70
Γ3. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	72
Γ.3.1. Φάρμακα	72
Γ.3.2. Δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας in vitro (MTT & SRB)	74
Γ.3.3. Σύγκριση των δοκιμασιών MTT - SRB	75
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	76
Δ.1. Πείραμα 1	76
Δ.2. Πείραμα 2	114
Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	130
ΣΤ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	131
Η. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	135

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας, του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, του Τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, κάτω από την καθοδήγηση της καθηγήτριας κας Χολής -Παπαδοπούλου Θεοδώρας, σε συνεργασία με το εργαστήριο Κυτταροκαλλιιεργειών, Μοριακού Modeling και Σχεδιασμού Φαρμάκων του Συμεωνίδειου Ερευνητικού Κέντρου του «Θεαγενείου» Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης, όπου υπεύθυνος είναι ο διδάκτορας Χημείας, κος Γερομιχαλός Γεώργιος.

Θέμα της εργασίας αυτής είναι τα κανναβινοειδή και οι ιδιότητές τους και πιο συγκεκριμένα τα φυτικά κανναβινοειδή με κυρίαρχη την κανναβιδιόλη και οι πιθανές αντικαρκινικές της δράσεις. Γίνεται μια συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας των τελευταίων ετών, καταγράφονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων που έγιναν και οδηγούμαστε σε συμπεράσματα για τον μελλοντικό ρόλο των κανναβινοειδών στη θεραπεία του καρκίνου.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα:

- Την καθηγήτριά μου, κα Χολή-Παπαδοπούλου Θεοδώρα, για την άμεση στήριξη και καθοδήγησή της, καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αυτής. Την ευχαριστώ θερμά που με παρότρυνε να ασχοληθώ με ένα τόσο γοητευτικό και ενδιαφέρον θέμα. Η καθηγήτριά μου, αποτελεί για μένα πρότυπο δασκάλου και καθηγητή.
- Τον διδάκτορα Χημείας, κο Γερομιχαλό Γεώργιο, από το Α.Ν.Θ. Θεαγένειο, όχι μόνο για τη συνεισφορά του στα υλικά, αλλά κυρίως για την άριστη συνεργασία μας, τις πολύτιμες υποδείξεις και διορθώσεις του.
- Την υποψήφια διδάκτορα, κα Τσιτουρούδη Φανή και τη διδάκτορα, κα Παπαχρήστου Ελένη, για την πολύτιμη βοήθειά τους και την εμπειρία τους, στην διάρκεια των πειραμάτων.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

2-AG	2-arachidonoylglycerol	2-αραχιδονοϋλγλυκερόλη
5-HT	serotonine	σεροτονίνη
AC	adenyl cyclase	αδενυλική κυκλάση
ACF	aberrant crypt foci	έκτοπες αδενικές κύστεις
AD	Alzheimer disease	νόσος Alzheimer
AEA	anandamide	ανανδαμίδα
Akt/PKB	protein kinase B	πρωτεϊνική κινάση B
AMPA	2-amino-3-(3-hydroxy-5methyl-isoxazol-4yl) propanoic acid	2-αμινο-3-(3-υδροξυ-5μεθυλ-ισοξασολ-4υλ)προπανοϊκό οξύ
AOM	azoxymethane	αζοξυμεθάνη
ATF-4	activated tumor factor-5	ενεργοποιημένος μεταγραφικός παράγων-4
cAMP	cyclic AMP	κυκλικό AMP
CBC	cannabichromene	κανναβιχρωμένη
CBD	cannabidiol	κανναβιδιόλη
CBG	cannabigerol	κανναβιγερόλη
CBN	cannabinol	κανναβινόλη
CB₁R	cannabinoid receptor type 1	υποδοχέας κανναβινοειδών τύπου 1
CB₂R	cannabinoid receptor type 2	υποδοχέας κανναβινοειδών τύπου 2
CBRs	cannabinoid receptors	υποδοχείς κανναβινοειδών
COX-2	cyclooxygenase-2	κυκλο-οξυγενάση 2
D8-THC	D8-tetrahydrocannabinol	Δ8-τετραϋδροκανναβινόλη
D9-THC	D9-tetrahydrocannabinol	Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	θρεπτικό μέσο
DMSO	dimethylsulfoxide	διμεθυλσουλφοξείδιο
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EGF	epidermal growth factor	επιδερμ. αυξητ. παράγων

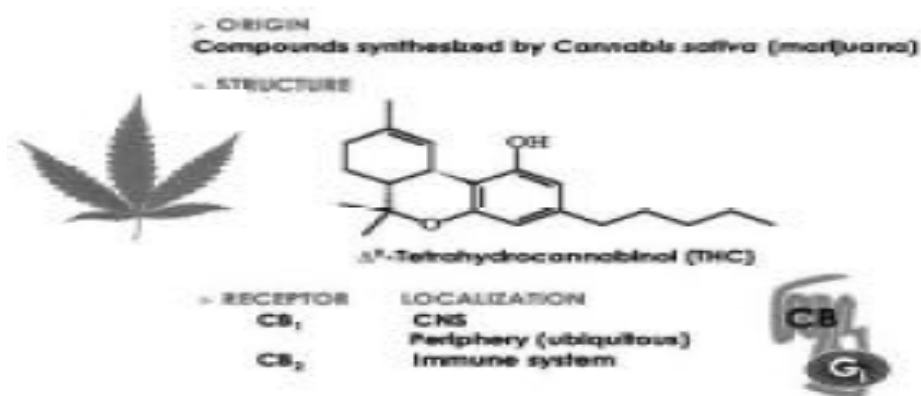
EGFR	epidermal growth factor receptor	υποδοχέας του EGFR
ERK	extracellular signal-regulated kinase	ρυθμιζόμενη από εξωκυττάρια σήματα κινάση
ER stress	endoplasmic reticulum stress	στρες ενδοπλασματικού δικτύου
FAAH	fatty acid amidohydrolase	αμιδοϋδρολάση των λιπαρών οξέων
FAK	focal adhension kinase	κινάση εστιακής προσκόλλησης
FAN	factor associated with neutral sphingomyelinase	παράγων σχετιζόμενος με την ουδέτερη σφιγγομυελινάση
FBS	fetal bovine serum	εμβρυϊκός ορός βοός
GABA	g-aminobutyric acid	γ-αμινοβουτυρικό οξύ
GIRK	G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel	διάυλος K⁺ εσωτερικής ανόρθωσης συνδεδεμένος με G πρωτεΐνες
GM	growth medium	θρεπτικό μέσο
GPCRs	G-protein-coupled receptors	συζευγμένοι με πρωτεΐνες υποδοχείς
GPR55	orphan G-protein-coupled receptor 55	<ορφανός> υποδοχέας συζευγμένος με G πρωτεΐνη
GSK-3β	glycogen synthase kinase 3β	κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3β
HD	Huntington disease	Νόσος Huntington
IFN-γ	intterferon-γ	ιντερφερόνη-γ
IP3K	phosphatidylinositol-3-kinase	κινάση της 3 φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης
JNK	c-Jun kinase	c-Jun κινάση
MAPK	mitogen-activated protein kinase	ενεργοποιηθήσα από μιτογόνα πρωτεΐν. κινάση

mAChR	muscarinic acetylcholine receptors	μουσκαρινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης
mGluR	metabotropic glutamate receptor	μεταβοτρόποι υποδοχείς γλουταμινικού
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	(3-(4,5-διφαινυλθειαιζολ-2)- 2,5-διφαινυλτετραζόλιο βρωμίδιο
NMDA	N-methyl-D-aspartate acid	N-μεθυλο-D-ασπαρικό οξύ
NO	nitric oxide	νιτρικό οξείδιο
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1	αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1
PBS 10X		συμπυκνωμένο δ/μα πλύσης
PD	Parkinson disease	νόσος Parkinson
PGE2	prostaglandin E2	προσταγλανδίνη E2
PKA	protein kinase A	πρωτεϊνική κινάση A
PKB	protein kinase B	πρωτεϊνική κινάση B
PTX	pertussis toxin	τοξίνη του κοκκύτη
ROS	reactive oxygen species	δραστικές ενώσεις οξυγόνου
SF	survival factor	κλάσμα επιβίωσης
SRB	sulforhodamine B	σουλφοροδαμίνη B
TACE	tumor necrosis factor-converting enzyme	μετατρεπτικό ένζυμο του παράγοντα νεκρώσεως όγκου
TGF	transforming growth factor	μετατρεπτικός αυξητικός παράγων
THCV	tetrahydrocannabivarin	τετραϋδροκανναβιβαρίνη
TNF-a	tumor necrosis factor-a	παράγων νεκρώσεως όγκου
TRPV1	transient receptor potential vanilloid 1	υποδοχέας βανιλλοειδών τύπου 1

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

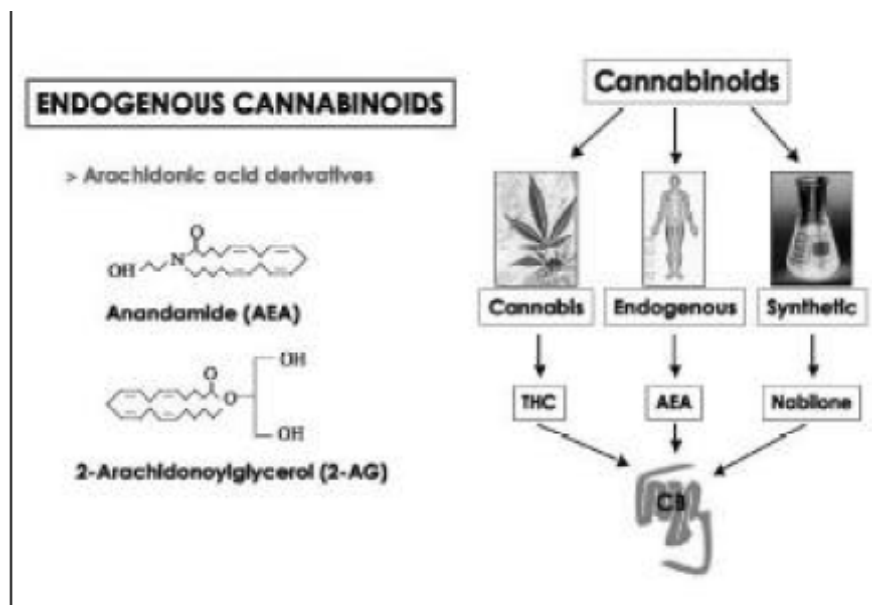
A1. ΚΑΝΝΑΒΗΣ - ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ

Το φυτό της κάνναβης χρησιμοποιείται εδώ και χιλιάδες χρόνια για την πρόκληση ευφορίας, λόγω των ψυχοτρόπων ιδιοτήτων του. Παράλληλα, έχει χρησιμοποιηθεί ήδη από τον 4^ο αιώνα π.Χ. για τις θεραπευτικές του ιδιότητες (Hollister, 1986). Τα άνθη και τα φύλλα του φυτού εκκρίνουν μια ρητίνη που περιέχει ανάμεσα σε 400 χημικές ουσίες περίπου 60 τερπενοφαινολικά συστατικά, τα οποία καλούνται **κανναβινοειδή**. Ο μηχανισμός δράσης της κάνναβης παρέμενε άγνωστος, μέχρι την απομόνωση του κύριου ψυχοδραστικού συστατικού της, της Δ9-τετραϋδρο-κανναβινόλης (D9-THC) (Gaoni και Mechoulam, 1964). Το φυτό της κάνναβης, εκτός από την Δ9-THC περιέχει ορισμένες λιγότερο ισχυρές ουσίες, όπως τα ψυχοδραστικά Δ8-τετραϋδροκανναβινόλη (D8-THC) και κανναβινόλη (CBN) και το μη ψυχοδραστικό κανναβιδιόλη (CBD), (Russo και McPartland, 2003), αλλά και άλλες όπως κανναβιχρωμένη (CBC), κανναβιγερόλη (CBG), τετραϋδρο-κανναβιβαρίνη (THCV) κ.ά. (Donald I. Abrams και Manuel Guzman, 2009). **(εικόνα 1)**.



Εικόνα 1: Τα κανναβινοειδή είναι μια ομάδα τερπενοφαινολικών συστατικών. Η Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ9-THC), είναι το κύριο ψυχοδραστικό φυτοκανναβινοειδές, που απομονώθηκε από είδη κάνναβης. Τα κανναβινοειδή συνδέονται στους δυο υποδοχείς, CB₁R και CB₂R, για να παράγουν τις φυσιολογικές τους δράσεις, (Donald I. Abrams και Manuel Guzman, 2009).

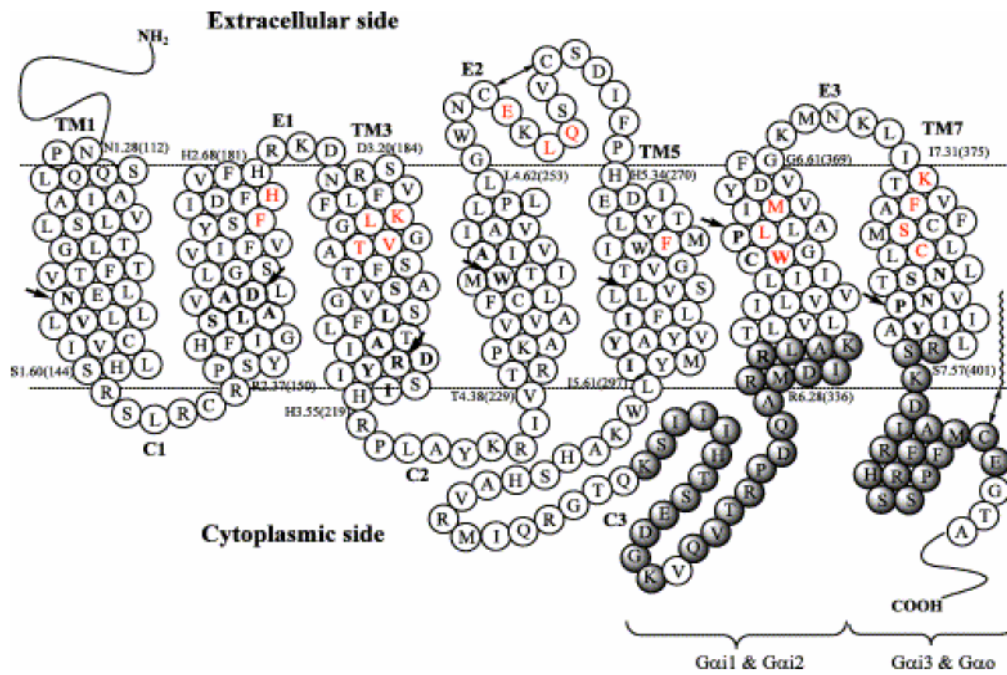
Σημαντική ώθηση στην έρευνα για το νευροβιολογικό υπόστρωμα της δράσης των κανναβινοειδών δόθηκε με την ανακάλυψη ενδογενών ουσιών (ενδοκανναβινοειδών, όπως η ανανδαμίδη και η 2-αραχιδονοϋλγλυκερόλη), που μιμούνται τις δράσεις της κάνναβης, το χαρακτηρισμό και την κλωνοποίηση συγκεκριμένων υποδοχέων κανναβινοειδών (CB₁Rs και CB₂Rs) και τη σύνθεση εκλεκτικών αγωνιστών και ανταγωνιστών γι' αυτούς τους υποδοχείς, **(εικόνα 2)**. Οι περισσότερες δράσεις των κανναβινοειδών διαμεσολαβούνται από τους υποδοχείς CB1 που βρίσκονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Παρόλα αυτά, αρκετά ευρήματα συνηγορούν στο ότι στις δράσεις αυτές συμμετέχουν άλλοι νευροδιαβιβαστές που επηρεάζονται από τους CB1 υποδοχείς, όπως η ακετυλοχολίνη, η ντοπαμίνη, η νοραδρεναλίνη και τα οπιοειδή (Wilson και Nicoll, 2002).



Εικόνα 2: Τα ενδογενή κανναβινοειδή, ανανδαμίδη (AEA) και 2-αραχιδονοϋλγλυκερόλη (2-AG), λειτουργούν σαν νευροδιαβιβαστές. Έχουν επίσης παραχθεί συνθετικά κανναβινοειδή σαν φαρμακευτικές ενώσεις. Τα κανναβινοειδή ασκούν τις δράσεις τους συνδεδεμένα σε ειδικούς υποδοχείς (CBRs), που συζεύγνυνται με G_i/o πρωτεΐνες, (Donald I. Abrams και Manuel Guzman, 2009).

Α2.ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ.

Μόλις το 1988 εντοπίστηκαν για πρώτη φορά οι ειδικές θέσεις πρόσδεσης για τα κανναβινοειδή σε εγκέφαλο ποντικού (Devane και συν.,1988). Οι υποδοχείς αυτοί εντοπίστηκαν αρχικά σε νευρικό ιστό σε μια προσπάθεια να ερμηνευτούν οι ψυχοδιεγερτικές δράσεις της κάνναβης, ενώ πολύ σύντομα διαπιστώθηκε η έκφρασή τους και σε άλλους ιστούς. Μέχρι σήμερα έχουν κλωνοποιηθεί και πλήρως χαρακτηρισθεί δυο τύποι υποδοχέων κανναβινοειδών, οι υποδοχείς κανναβινοειδών τύπου 1 (CB₁Rs), οι οποίοι κλωνοποιήθηκαν αρχικά από εγκεφαλικό φλοιό επίμυος (Matsuda και συν., 1991) και οι υποδοχείς κανναβινοειδών τύπου 2 (CB₂Rs) από ανθρώπινα κύτταρα προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (Munro και συν.,1993). Μέσω αυτών των υποδοχέων διαμεσολαβούνται οι περισσότερες δράσεις των κανναβινοειδών (συνθετικών, ενδογενών, από φυτά). Έχει επίσης απομονωθεί από ανθρώπινο πνεύμονα ένας τύπος CB₁R που προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του CB₁mRNA και ονομάστηκε CB_{1A}R (Shire και συν.,1995), ενώ υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για την ύπαρξη άλλων τουλάχιστον τριών τύπων υποδοχέων από πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε ποντικούς από τους οποίους λείπουν οι CB₁Rs και CB₂Rs (Machie και Stella, 2006). **Οι CB₁Rs και οι CB₂Rs** ανήκουν στην υπεροικογένεια των υποδοχέων που είναι συζευγμένοι με G πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors, GPCRs). Έχουν την χαρακτηριστική διαμόρφωση, με επτά διαμεμβρανικές έλικες να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και τη θέση δέσμευσης των ενδοκανναβινοειδών να βρίσκεται σε μια κοιλότητα που σχηματίζεται από τις διαμεμβρανικές έλικες. Το αμινοτελικό άκρο βρίσκεται στην εξωκυττάρια πλευρά της μεμβράνης και το καρβοξυτελικό στην κυτταροπλασματική πλευρά (**εικόνα 3**). Είναι οι πιο συχνά απαντώμενοι υποδοχείς αυτής της υπεροικογένειας στο νευρικό σύστημα.



Εικόνα 3: Δισδιάστατη δομή του ανθρώπινου υποδοχέα CB_1R . Τα πιο σημαντικά κατάλοιπα έχουν επισημανθεί.

Οι CB_1Rs εντοπίζονται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα, όπως θα αναλυθεί και στη συνέχεια, καθώς και στις περιφερικές νευρικές απολήξεις, αλλά και σε άλλους εξωνευρικούς ιστούς, όπως στο γεννητικό σύστημα (όρχεις, ωοθήκες, μήτρα) (Das SK και συν., 1995, Gerard CM και συν., 1991), στον οφθαλμό, στο αγγειακό ενδοθή-λιο, στο σπλήνα, στον πνεύμονα, στις λείες μυϊκές ίνες, στα επινεφρίδια, κ.ά.

Οι CB_2Rs βρίσκονται κυρίως σε κύτταρα (B-λεμφοκύτταρα, T-λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, NK κύτταρα, ουδετερόφιλα) και ιστούς (σπλήνας, λεμφαδένες, αμυγδαλές) του ανοσοποιητικού συστήματος, γεγονός που υποδηλώνει το ρόλο τους στην ανοσολογική ρύθμιση.

Η ομολογία ως προς την αμινοξική αλληλουχία μεταξύ των δυο τύπων υποδοχέων είναι 68% για τις διαμεμβρανικές περιοχές τους και 44% για την συνολική πρωτεΐνη. Ενώ οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν την απουσία των CB_2Rs σε υγιή εγκέφαλο, νέα μελέτη οδήγησε στην εντόπιση τέτοιων υποδοχέων σε περιοχές όπως το εγκεφαλικό στέλεχος. Οι υποδοχείς αυτοί είναι ενεργοί και ενεργοποίησή τους οδηγεί σε ρύθμιση του εμέτου. Εκτός αυτού, τα μικρογλοιακά κύτταρα, ως αντιπρόσωποι του ανοσοποιητικού συστήματος στον εγκέφαλο, εκφράζουν και αυτά CB_2Rs , ενώ σημαντικά μεγαλύτερη είναι η έκφρασή τους σε παθολογικές καταστάσεις όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας και η νόσος Alzheimer.

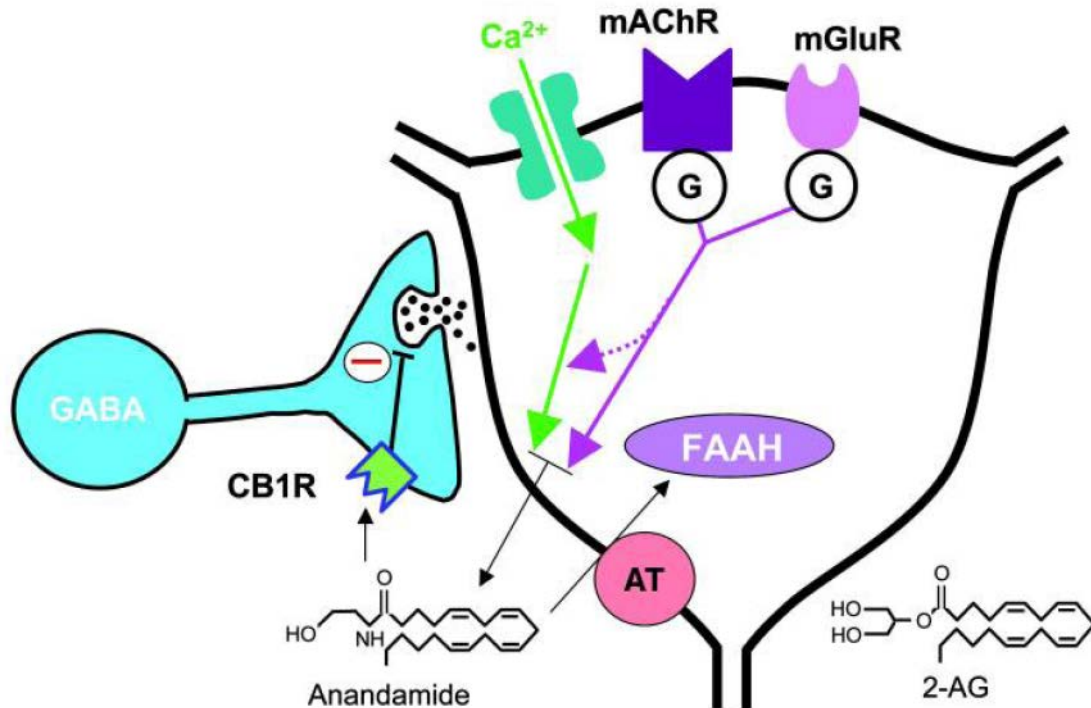
Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι υπάρχουν και άλλοι υποδοχείς κανναβινοειδών, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα αυτό του υποδοχέα GPR55 (Baker και συν., 2006).

Ο GPR55 είναι ένας ορφανός GPCR που έχει χαμηλό ποσοστό ομολογίας με τους CB₁Rs και CB₂Rs, ενώ εκφράζεται στον όρχι σε επίπεδα 15 φορές μεγαλύτερα από αυτά του εγκεφάλου. Δεν φαίνεται να είναι συζευγμένος με Gi ή Go πρωτεΐνες, γεγονός που υποδηλώνει ότι ενεργοποιεί διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια από αυτά των CB₁Rs και CB₂Rs.

Η κατανομή των **CB₁Rs** στον νευρικό ιστό αποδείχθηκε χρήσιμη για την κατανόηση και πρόβλεψη των δράσεων των κανναβινοειδών και έχει χαρτογραφηθεί διεξοδικά στον ενήλικα εγκέφαλο με ποσοτική αυτοραδιογραφία, in situ υβριδισμό και ανοσοϊστοχημεία (Herkenham και συν., 1991; Tsou και συν., 1998). Η υψηλή συγκέντρωση CB₁Rs στον φλοιό, τα βασικά γάγγλια, τον ιππόκαμπο, την παρεγκεφαλίδα συμπίπτει με την έκπτωση των ανώτερων νοητικών λειτουργιών, τη διαταραχή της μνήμης και την ελάττωση της κινητικότητας που παρατηρούνται μετά από χρήση κάνναβης, ενώ τα χαμηλά επίπεδά τους στο στέλεχος συμβαδίζουν με την παρατήρηση ότι τα κανναβινοειδή δεν ασκούν σημαντική επίδραση στην αναπνοή.

Οι CB₁Rs εκφράζονται κυρίως σε νευρικά κύτταρα, ενώ σε χαμηλά ποσά και σε αστρογλοιακά, ολιγοδενδρογλοιακά και προγονικά νευρικά κύτταρα.

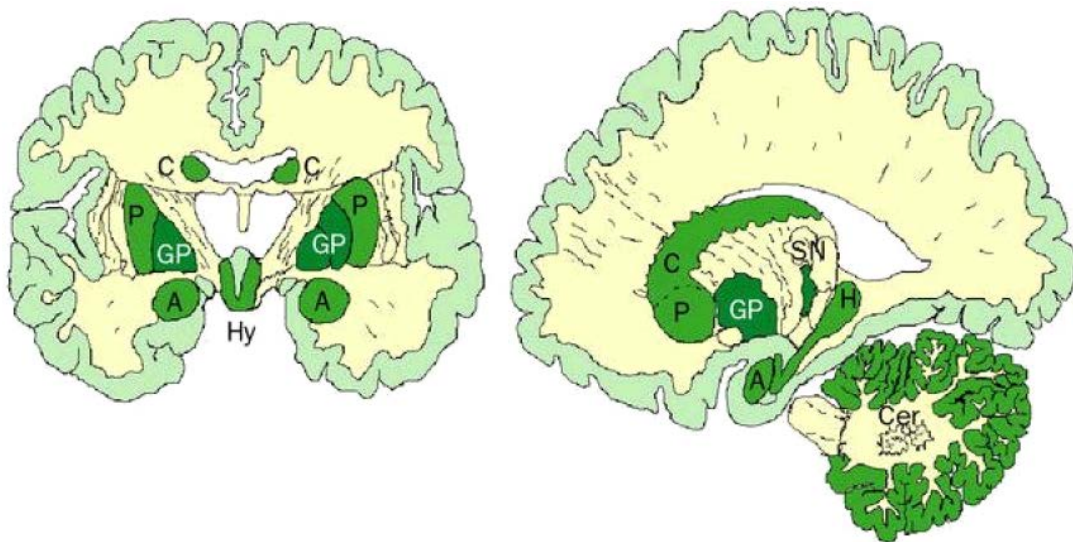
Το χαρακτηριστικό των CB₁Rs είναι ότι εντοπίζονται κυρίως **προσυναπτικά**, στις νευρικές απολήξεις και τους τελικούς νευράξονες των νευρικών κυττάρων (επίσης έχει διαπιστωθεί εντόπιση στα κυτταρικά σώματα ή τους δενδρίτες) (Katona και συν., 1999). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι τα ενδογενή κανναβινοειδή συντίθενται από μετασυναπτικά κύτταρα, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι CBRs ρυθμίζουν την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών και λειτουργούν ως παλίνδρομοι μηνυματοφόροι (**εικόνα 4**). Η διαπίστωση ότι οι CB₁Rs είναι κυρίως προσυναπτικοί επιβεβαιώθηκε μετά από παρατήρηση των νευρικών απολήξεων με ηλεκτρονική μικροσκοπία, αλλά και από παρατηρήσεις σχετικά με την έκφρασή τους.



Εικόνα 4: Παλίνδρομη σηματοδότηση από τα ενδοκανναβινοειδή. Η ανανδαμίδα και η 2-αραχιδονοϋλγλυκερόλη συντίθενται από μετασυναπτικά κύτταρα, π.χ. τα πυραμιδικά κύτταρα του ιπποκάμπου. Η σύνθεση ξεκινά από μια αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου μέσω τασεοελεγχόμενων διαύλων ή από ενεργοποίηση συζευγμένων με G πρωτεΐνες υποδοχών (μεταβοτρόποι υποδοχείς γλουταμινικού τύπου I- mGluR, μουσκαρινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης- mAChR). Τα ενδοκανναβινοειδή απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο και ενεργοποιούν τους CB₁Rs, οι οποίοι είναι συγκεντρωμένοι σε συγκεκριμένες νευρικές απολήξεις, όπως στους CCK-ανοσοθετικούς GABAεργικούς διάμεσους νευρώνες του ιπποκάμπου. Ενεργοποίηση των CB₁Rs προκαλεί προσυναπτική αναστολή της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών μέσω αναστολής τασεοελεγχόμενων διαύλων ασβεστίου, παρεμβολή στην απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστικών κυστιδίων και ενεργοποίηση των διαύλων καλίου. Στη συνέχεια τα ενδοκανναβινοειδή προσλαμβάνονται είτε από τα προσυναπτικά είτε από τα μετασυναπτικά κύτταρα και από ειδικές πρωτεΐνες-μεταφορείς. Το ένζυμο αποκοδόμησης αμιδοϋδρολάση των λιπαρών οξέων βρίσκεται σε μετασυναπτικά κύτταρα, ενώ η λιπάση των μονογλυκεριδίων στις προσυναπτικές νευρικές απολήξεις (Alger, 2004).

Όπως θα δούμε και στη συνέχεια, ενεργοποίηση των προσυναπτικών υποδοχέων κανναβινοειδών οδηγεί σε αναστολή των τασεοελεγχόμενων διαύλων ασβεστίου και ενεργοποίηση των διαύλων καλίου κι έτσι ελαττώνεται η πιθανότητα απελευθέρωσης ανασταλτικών (GABA) ή διεγερτικών (γλουταμινικό) νευροδιαβιβαστών.

Η πρώτη αυτοραδιογραφική μελέτη της κατανομής των CB₁Rs σε εγκέφαλο επίμυος πραγματοποιήθηκε το 1991 (Herkenham και συν.,1991), έδειξε δε εξαιρετικά υψηλή συγκέντρωση των CB1 στην **μέλαινα ουσία**, την **ωχρά σφαίρα**, τον **ιππόκαμπο**, την **παρεγκεφαλίδα**, και τον **φλοιό του εγκεφάλου (εικόνα 5)**. Όλα τα πειράματα που ακολούθησαν έδειξαν παρόμοια κατανομή, ενώ αυτοραδιογραφικές μελέτες σε τομές ανθρώπινου εγκεφάλου συμφώνησαν με τα προηγούμενα ευρήματα, ιδιαίτερα εάν ληφθούν υπόψιν οι εξελικτικές μεταβολές στον ανθρώπινο εγκέφαλο σε σχέση με αυτόν του επίμυος.



Εικόνα 5: Η έκφραση του CB₁R στον ενήλικο εγκέφαλο ποικίλλει ανάλογα με την περιοχή. Με διάφορες εντάσεις του πράσινου χρώματος απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις του CB₁R ανά περιοχή. Η συγκέντρωση του CB1 είναι πολύ υψηλή στην ωχρά σφαίρα (GP) και τη μέλαινα ουσία (SN), μέτρια στην παρεγκεφαλίδα (Cer), τον ιππόκαμπο (H), τον κερκοφόρο πυρήνα (C), το κέλυφος (P), τον υποθάλαμο (Hy) και την αμυγδαλή (A), ενώ χαμηλή είναι στον φλοιό και πολύ χαμηλή στη λευκή ουσία.

Α3. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ.

Οι υποδοχείς των κανναβινοειδών (CBRs) ανήκουν στην υπεροικογένεια των επταελλικοειδών υποδοχέων που είναι συζευγμένοι με G πρωτεΐνες (G-protein Coupled Receptors, GPCRs). Ένωση των ενδογενών κανναβινοειδών ή εξωγενώς χορηγούμενων κανναβινοειδών αγωνιστών με τους CBRs οδηγεί σε αλλαγή στη διαμόρφωση του υποδοχέα, με αποτέλεσμα να ευνοείται η πρόσδεση και ενεργοποίηση G πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες που συζευγνύονται με τους CBRs ανήκουν στην οικογένεια των **Gi/o πρωτεϊνών**, αφού η τοξίνη του κοκκύτη αναστέλλει τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος από αυτούς (Felder και συν., 1995). Οι CB₁Rs και CB₂Rs, αν και ανήκουν στην ίδια κατηγορία υποδοχέων, δεν ενεργοποιούν τα ίδια μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Για παράδειγμα, και όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια, οι CB₂Rs δεν αλληλεπιδρούν ή αλληλεπιδρούν φτωχά με διαύλους ιόντων, ενώ οι CB₁Rs αλληλεπιδρούν με μια ποικιλία διαύλων ιόντων (Felder και συν., 1995).

Η δέσμευση του μηνυματοφόρου μορίου (π.χ. ανανδαμίδη) στον υποδοχέα οδηγεί σε αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα, με αποτέλεσμα η Gi/o πρωτεΐνη να αναγνωρίζει και να προσδέεται σε ειδικό κυτταροπλασματικό τμήμα του υποδοχέα. Κάθε Gi/o πρωτεΐνη είναι μια περιφερική μεμβρανική πρωτεΐνη και αποτελείται, όπως και οι Gs πρωτεΐνες, από τρεις υπομονάδες, τις α, β, και γ. Όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται σε ανενεργό μορφή οι τρεις υπομονάδες δημιουργούν σύμπλοκο (σύμπλεγμα αβγ) και η α υπομονάδα είναι ενωμένη με ένα μόριο GDP. Το σύμπλοκο κανναβινοειδούς-υποδοχέα επάγει τη δέσμευση της πρωτεΐνης Gi/o, με αποτέλεσμα να ευνοείται η ανταλλαγή του GDP με GTP από την υπομονάδα α και η υπομονάδα α-GTP να αποδεσμεύεται από τις βγ, οι οποίες παραμένουν ενωμένες. Έτσι προκύπτουν δύο ανεξάρτητα τμήματα της πρωτεΐνης G και το καθένα από αυτά αλληλεπιδρά με διαφορετικά μόρια-στόχους του κυττάρου. Αξίζει να σημειωθεί ότι κάθε σύμπλοκο κανναβινοειδούς-υποδοχέα ενεργοποιεί πολλά μόρια Gi πρωτεΐνης, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται ενίσχυση του αρχικού σήματος.

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει γνωστό ότι οι GPCRs αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και δημιουργούν διμερή ή ολιγομερή (Gomes και συν., 2001), αλλά και μέλη των GPCRs που ανήκουν σε διαφορετική οικογένεια (π.χ. CBRs και υποδοχείς οπιοειδών) είναι

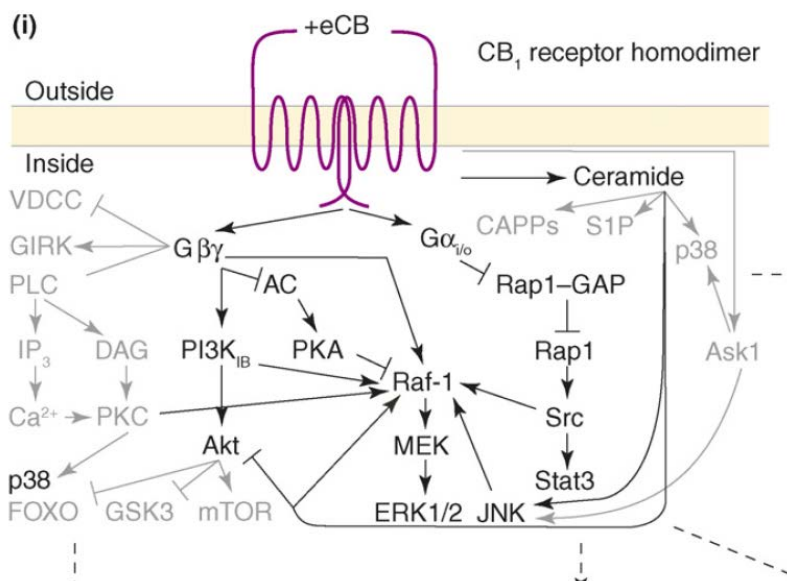
δυνατό να αλληλεπιδράσουν και να δώσουν ετεροδιμερή ή ετεροπολυμερή, (εικόνα 6). Το αποτέλεσμα είναι ότι το σύμπλοκο έχει μοναδικές ιδιότητες, εντελώς διαφορετικές από αυτές των μονομερών που το συνθέτουν και έτσι αυξάνεται η ποικιλία των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται. Φαίνεται ότι και οι CB₁Rs είναι ικανοί να δημιουργήσουν ομο- ή ετεροδιμερή in vivo, όπως δείχθηκε με χρήση ανοσοϊστοχημείας (Wager-Miller J. και συν.,2002). Ενδέχεται δε τα CB₁R διμερή να είναι η κυρίαρχη λειτουργική μονάδα στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

Εκτός αυτού, οι CB₁Rs είναι δυνατό να ενεργοποιούν διάφορους άλλους τύπους υποδοχέων (π.χ. υποδοχείς με δραστηριότητα κινάσης της τυροσίνης) και να τους <χρησιμοποιούν>, ώστε να ενεργοποιήσουν διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια.

Επίσης, σε συνθήκες όπου εμποδίζεται η πρόσδεσή τους με Gi/o πρωτεΐνες (όπως π.χ. μετά από προσθήκη PTX) μπορούν να αλληλεπιδράσουν με Gs πρωτεΐνες.

Σε πολλά από τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που διεγείρει ο CB₁ δεν έχει καμιά επίδραση η ενεργοποίηση του CB₂, π.χ. η αναστολή διαύλων ασβεστίου ή καλίου, γεγονός που ενδέχεται να οφείλεται στη σχετικά χαμηλή ομοιότητά τους ως προς την πρωτοταγή τους δομή, ιδιαίτερα όσον αφορά στην κυτταροπλασματική περιοχή τους, η οποία είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τα ενδοκυττάρια μόρια.

Αποτέλεσμα αυτού είναι η διαφορετική αλληλεπίδραση των CBRs με τις G πρωτεΐνες, π.χ. τόσο οι CB₁Rs, όσο και οι CB₂Rs, έχουν την ίδια συγγένεια για τις Gi πρωτεΐνες, η συγγένεια όμως του CB₁R για την G_o είναι δεκαπλάσια από αυτή του CB₂R (Glass M. Και συν.,1999).



Εικόνα 6: Τα κυριότερα σηματοδοτικά μονοπάτια που ακολουθούν μετά από ενεργοποίηση των CB₁Rs. Διακρίνεται η δυνατότητα δημιουργίας CBRs ομοδιμερών. Οι CB₁Rs

έχουν την ικανότητα, όπως και άλλα μέλη της υπερικογένειας των GPCRs, να δημιουργούν όμο- ή ετεροδιμερή και να μεταβάλλονται έτσι οι ιδιότητές τους (Gomes I και οι συν., 2001). Μετά την ενεργοποίησή τους οι CB₁Rs υφίστανται φωσφορυλίωση και εσωτερίκευση, η οποία ενδέχεται να ακολουθείται από ανακύκλωση του υποδοχέα στην μεμβράνη (Harkany και συν., 2007).

A3.1. Ρύθμιση της αδενυλικής κυκλάσης.

Η ρύθμιση του μεμβρανικού ενζύμου αδενυλική κυκλάση (AC) αποτελεί μια από τις πιο γνωστές και μελετημένες δράσεις των κανναβινοειδών, που ήταν γνωστή πριν ακόμα περιγραφούν οι υποδοχείς τους (Howlett, 1984). **Η ενεργοποίηση των CBRs οδηγεί σε αναστολή της AC**, όπως έχει δειχθεί σε μια σειρά από πειράματα τόσο σε νευρικά κύτταρα που εκφράζουν τον CB₁R, όσο και σε λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον CB₂R. Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο βγ που απελευθερώνεται μετά την ενεργοποίηση της Gi πρωτεΐνης, ενώνεται με την υπομονάδα α-GTP της Gs, η οποία είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί την AC. Έτσι αναστέλλεται η ενεργοποίηση της AC που διαμεσολαβείται από την α_s υπομονάδα. Αναστολή της ενεργοποίησης της AC οδηγεί σε ελάττωση της παραγωγής του κυκλικού AMP (στο εξής cAMP). Η ελάττωση του cAMP που διαμεσολαβείται από τους CBRs είναι ευαίσθητη στην τοξίνη του κοκκύτη, που δηλώνει ότι απαιτείται η συμβολή της Gi/o πρωτεΐνης γι' αυτή τη δράση (A.C.Howlett και συν., 1986).

Έχει, ωστόσο αναφερθεί και ενεργοποίηση της AC μετά από ενεργοποίηση των CBRs και αυτό οφείλεται σε ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Gs (Bonhaus και συν., 1998) από αυτούς. Επίσης, στα πλαίσια της αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο ειδών GPCRs, η μεταγωγή του σήματος ενδέχεται να είναι εντελώς διαφορετική σε σχέση με αυτήν που προκύπτει από ενεργοποίηση του καθενός από τους δυο υποδοχείς ξεχωριστά. Π.χ συνύπαρξη και ταυτόχρονη ενεργοποίηση των CB1 και D2- υποδοχέων στον ίδιο κυτταρικό πληθυσμό οδηγεί σε μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση και συνεπακόλουθη δημιουργία ετεροδιμερούς συμπλόκου μεταξύ των CB1 και D2- υποδοχέων, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η πρωτεΐνη Gs και να αυξάνεται το cAMP (Glass M. και συν., 1997). Επιπλέον η ισομορφή της AC που εκφράζεται από συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στο αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των CB₁Rs. Π.χ. η ωχρά σφαίρα περιέχει mRNA που κωδικοποιεί

την ισομορφή AC-II. Στην περιοχή αυτή βρέθηκε ότι ενεργοποίηση των CB1 προκαλεί αύξηση του cAMP (Maneuf και Brotchie, 1997).

Το cAMP αποτελεί δεύτερο μηνυματοφόρο μόριο, που δρα σαν αλλοστερικός τροποποιητής της πρωτεϊνικής κινάσης A. Η ενεργοποιημένη κινάση με τη σειρά της θα φωσφορυλιώσει πολλά υποστρώματα (κινάσες, φωσφατάσες, υποδοχείς, διαύλους ιόντων, μεταγραφικούς παράγοντες κλπ.), οδηγώντας είτε στην ενεργοποίησή τους είτε στην απενεργοποίησή τους. Η ελάττωση της παραγωγής του cAMP που διαμεσολαβείται από τα κανναβινοειδή προκαλεί τα ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A.

A3.2. Ρύθμιση διαύλων ιόντων

α). Δίαυλοι ασβεστίου

Η ανανδαμίδη, αλλά και άλλοι αγωνιστές κανναβινοειδών αναστέλλουν τους τασεοελεγχόμενους διαύλους ασβεστίου τύπου L, N, Q και P (Mackie και συν., 1995). Η αναστολή αυτή αίρεται από την τοξίνη του κοκκύτη, ενώ είναι ανεξάρτητη από τη ρύθμιση των επιπέδων του cAMP (Mackie και συν., 1993), υποδεικνύοντας ότι μια **Ga_o** πρωτεΐνη είναι ο άμεσος διαμεσολαβητής αυτής της απόκρισης (Gudermann T. και συν., 1997).

Η αναστολή των διαύλων ασβεστίου μέσω διέγερσης των προσυναπτικών CB₁Rs οδηγεί σε ελάττωση της πιθανότητας απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών (γ-αμινοβουτυρικό-GABA, γλουταμινικό, νοραδρεναλίνη, ακετυλοχολίνη) από τις προσυναπτικές νευρικές απολήξεις (Katona και συν., 1999; Gifford και Ashby, 1996). Αυτό συμβαίνει λόγω άμβλυνσης της εκπόλωσης της μεμβράνης και της εξωκύττωσης. Το φυσιολογικό αποτέλεσμα αυτής της αναστολής εξαρτάται από τους κυτταρικούς πληθυσμούς που ενεργοποιούνται.

Για παράδειγμα στον υπόκαμπο, η προσυναπτική αναστολή που διαμεσολαβείται από τους CB₁Rs έχει σχετισθεί με την ικανότητα των κανναβινοειδών να αναστέλλουν την μακροχρόνια ενδυνάμωση (Terranova P. και συν., 1995) και έτσι να επηρεάζουν τη μάθηση και τη μνήμη.

Στα λεία μυϊκά κύτταρα των εγκεφαλικών αρτηριών, τα οποία επίσης εκφράζουν CB₁Rs, ενεργοποίηση των CB₁Rs οδηγεί σε αναστολή των L-τύπου διαύλων ασβεσ-

τίου (Gebremedhin D.,1999), που σχετίζεται με την ικανότητα της ανανδαμίδης να διαστέλλει τα προηγουμένως βρισκόμενα σε συστολή εγκεφαλικά αγγεία.

Γενικότερα η αναστολή των διαύλων ασβεστίου από τα κανναβινοειδή οδηγεί σε διάφορες βιολογικές αποκρίσεις, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι η ενεργοποίηση μέσω των CB₂Rs δεν έχει καμία επίδραση στους διαύλους ασβεστίου.

β). Δίαυλοι καλίου

Ενεργοποίηση των CB₁Rs οδηγεί σε ενίσχυση της δραστηριότητας των συζευγμένων με G πρωτεΐνες διαύλων καλίου εσωτερικής ανόρθωσης (G-protein coupled inwardly rectifying potassium channels, GIRK/Kir) (Mackie και συν.,1995), των A τύπου διαύλων καλίου (Deadwyler και συν.,1996), ενώ αναστέλλει τη διάνοιξη των D τύπου διαύλων καλίου (Muller-Vahl KR. και συν.,1999). Η δράση αυτή οφείλεται σε ελαττωμένη φωσφορυλίωση των διαύλων καλίου, η οποία προκύπτει από την αναστολή της δράσης της πρωτεϊνικής κινάσης A.

A3.3. Ρύθμιση της κινάσης εστιακής προσκόλλησης (focal adhesion kinase, FAK).

Ενεργοποίηση των CB₁Rs οδηγεί σε διέγερση της φωσφορυλίωσης της FAK (Derkinderen και συν., 2001). Η διέγερση αυτή μεσολαβείται και εξαρτάται από την ενεργοποίηση της Gi πρωτεΐνης με την συνεπακόλουθη αναστολή της παραγωγής cAMP και αναστολή της ενεργοποίησης της AC. Η FAK προκαλεί αλλαγές στον κυτταροσκελετό και μπορεί να σχετίζεται με τη συναπτική πλαστικότητα.

A3.4. Μεταγωγή σήματος μέσω ενεργοποιηθίσας από μιτογόνα πρωτεϊνικής κινάσης (Mitogen-Activated Protein Kinase, MAP kinase, MAPK).

Οι MAP κινάσες είναι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης, οι οποίες ανταποκρίνονται σε εξωκυττάρια ερεθίσματα (μιτογόνα) και ρυθμίζουν διάφορες κυτταρικές δραστηριότητες, όπως γονιδιακή έκφραση, μίτωση, διαφοροποίηση και κυτταρική επιβίωση/απόπτωση.

Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηρισθεί τέσσερις κατηγορίες MAP κινασών:

1. Extracellular signal-regulated kinases (**ERKs**) 1,2: ενεργοποιούνται κυρίως από αυξητικούς παράγοντες και ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση.
2. c-Jun N-terminal kinases (**JNKs**): είναι αλλιώς γνωστές ως κινάσες που ενεργοποιούνται από το στρες.
3. **p38-MAPK**: ενεργοποιούνται και αυτές από το στρες και μαζί με τις προηγούμενες ρυθμίζουν κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση.
4. **ERK5** και **ERK7**: συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Το βασικό μονοπάτι ενεργοποίησης της MAP κινάσης εν συντομία περιλαμβάνει την ενεργοποίηση, μετά την σύζευξη του υποδοχέα με τον προσδέτη του και την προσκόλληση πρωτεϊνών-συνδετήρων, της **Ras** GTPάσης, που στη συνέχεια ενεργοποιεί την **RAF** κινάση. Αυτή με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την **MEK**, η οποία ενεργοποιεί την **MAP κινάση**. Η MAP κινάση με την σειρά της φωσφορυλιώνει πολλές πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στην μετάφραση του mRNA και έτσι τροποποιεί την μετάφραση. Επιπλέον, φωσφορυλιώνει πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες, επηρεάζοντας έτσι την γονιδιακή έκφραση πολλών γονιδίων (π.χ. φωσφορυλιώνει τον c-myc). Έτσι π.χ. σε φυσιολογικά κύτταρα διαρκής ενεργοποίηση των ERK1/ERK2 είναι απαραίτητη για την μετάβαση από την φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου και αυτό επιτυγχάνεται μέσω επαγωγής θετικών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου και απενεργοποίησης αντιπολλαπλασιαστικών γονιδίων. Η ενεργοποίηση της MAP κινάσης αίρεται από ειδικές φωσφατάσες, τις MAPK φωσφατάσες.

Ο υποδοχέας που συνήθως ενεργοποιεί αυτά τα μονοπάτια ανήκει στην υπεροικογένεια των διαμεμβρανικών υποδοχέων με δραστηριότητα κινάσης της τυροσίνης. **Για τους υποδοχείς των κανναβινοειδών έχει βρεθεί ότι και αυτοί ενεργοποιούν τις ERK** (Wartmann και συν., 1995; Bouaboula και συν., 1996), **JNK**

και p38 MAPK, χωρίς ωστόσο ο μηχανισμός αυτής της επαγωγής να είναι απολύτως διευκρινισμένος.

Δεδομένης της δομής των υποδοχέων των κανναβινοειδών (GPCRs), δεν πιστεύεται ότι έχουν ενδογενή δραστικότητα κινάσης της τυροσίνης. Ο πρώτος πιθανολογούμενος μηχανισμός ενεργοποίησης του ERK_{1/2} μονοπατιού είναι μέσω **ενεργοποίησης της PI₃K**, η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την Raf (Sanchez και συν., 2003). Ένας άλλος μηχανισμός που θα αναλυθεί στη συνέχεια περιλαμβάνει την **διαενεργοποίηση** (transactivation), μέσω ενεργοποίησης των CBRs, υποδοχέων με δραστηριότητα κινάσης της τυροσίνης (π.χ. EGF-R). Τέλος, το μηνυματοφόρο μόριο **κεραμίδιο**, του οποίου την συγκέντρωση αυξάνει η ενεργοποίηση των CBRs, ενεργοποιεί την Raf GTPάση, η οποία είναι μέλος της σηματοδοτικής οδού που οδηγεί σε ενεργοποίηση του ERK_{1/2}.

Οι CB₁Rs ενεργοποιούν τις JNK και τις p38 κινάσες μέσω **G_{βγ}, PI₃K και Ras εξαρτώμενου μηχανισμού**, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις συμμετέχει και η **διαενεργοποίηση** του PDGF (Rueda και συν., 2000). Οι JNK κινάσες, αφού ενεργοποιηθούν, φωσφορυλιώνουν μεταγραφικούς παράγοντες (c-Jun, ATF2, Elk-1) και μέσω αυτών ελέγχουν την έκφραση γονιδίων, τα οποία συμβάλλουν στην απάντηση στο στρες και συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο, την επιδιόρθωση του DNA ή την απόπτωση (Minden και Karin, 1998).

Ανεξαρτήτως του μηχανισμού ενεργοποίησης των MAP κινασών μέσω των CB₁ και CB₂Rs, οι τελικοί στόχοι τους εντοπίζονται σε πολλά κυτταρικά διαμερίσματα, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής επιφάνειας, του κυτταρικού σκελετού και του πυρήνα. Οι MAP κινάσες φωσφορυλιώνουν πολλά μόρια-στόχους που σχετίζονται με κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Είναι πιθανό ότι η ενεργοποίηση των ERK επάγει την ενεργοποίηση πολλών μεταγραφικών παραγόντων και γονιδίων, μεταξύ αυτών και του krox 24 (Bouaboula M. και συν., 1995), ενώ η in vivo ενεργοποίηση των c-fos, και c-jun έχει αναφερθεί μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση Δ9-THC σε ποντίκια (Mailleux P. και συν., 1994).

Αν και ο καταρράκτης των MAP κινασών θεωρείται ότι προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν περιπτώσεις όπου η ενεργοποίησή του διαμεσολαβεί τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, καθώς και τον κυτταρικό θάνατο (αποπτωτικό και μη αποπτωτικό) πολλών

ειδών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των νευρικών (Galve-Roperh και συν., 2000).

Φαίνεται τελικά ότι η **σχέση μεταξύ της ενεργοποίησης του MAPK καταρράκτη και της κυτταρικής τύχης εξαρτάται από τη διάρκεια του ερεθίσματος, καθώς και από την ρύθμιση της ισορροπίας των δραστηριοτήτων των ERK, JNK, p38 κινασών.**

A3.5. Ρύθμιση της κινάσης της 3 φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3K)/ πρωτεϊνικής κινάσης B (PKB/Akt).

Η PI₃K είναι μία οικογένεια πρωτεϊνών που ρυθμίζουν κυτταρικές λειτουργίες όπως η αύξηση, η επιβίωση και ο καρκινικός μετασχηματισμός. Διαθέτει διττή ενζυμική δραστηριότητα, καθώς φωσφορυλιώνει λιπίδια, αλλά και πρωτεΐνες. Ένα από τα μόρια στα οποία η PI₃K έχει άμεση δράση είναι η πρωτεϊνική κινάση B (PKB).

Η PKB (γνωστή και ως ενεργοποιημένη Akt) είναι μία κινάση σερίνης-θρεονίνης, η οποία παίζει ρόλο τόσο στη **ρύθμιση του μεταβολισμού** (διεγείρει την πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα, τη σύνθεση γλυκογόνου μέσω φωσφορυλίωσης της κινάσης της συνθάσης του γλυκογόνου 3β <GSK-3β>, τη γλυκόλυση και την πρωτεϊνοσύνθεση), όσο και στην **κυτταρική επιβίωση** (φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί παράγοντες που προάγουν την απόπτωση, όπως την Bad, την κασπάση 9, αλλά και τους μεταγραφικούς παράγοντες Forkhead) (Cardone και συν., 1998; Brunet και συν., 1999) σε διάφορες κατηγορίες κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των νευρικών. Μελέτες σε κύτταρα που είτε εξέφραζαν φυσικά τον CB₁R είτε διαμολύνθηκαν με αυτόν (Gomez del Pulgar και συν., 2000) έδειξαν ότι ενεργοποίηση των CB₁Rs οδηγεί σε ενεργοποίηση της Akt/PKB, η οποία οφείλεται στην μέσω του συμπλόκου Gβγ ενεργοποίηση της PI3K. Και ο CB₂R, όμως, έχει την ίδια επίδραση στην PKB (Sanchez G. Και συν., 2003). Αλλά και σε in vivo πειράματα οξεία χορήγηση THC σε ποντικούς ενίσχυσε τη φωσφορυλίωση της Akt στον ιπόκαμπο, την παρεγκεφαλίδα, το ραβδωτό σώμα και τον μετωπιαίο φλοιό (Ozaita A. Και συν., 2007). Αυτά τα δεδομένα συμφωνούν με αποτελέσματα από καλλιέργειες νευρογλοιακών κυττάρων, στις οποίες έκθεση σε κανναβινοειδή αύξησε την οξειδωση της γλυκόζης και τη γλυκογονοσύνθεση, δράση η οποία εξαρτάται από την ενεργοποίηση της PI₃K.

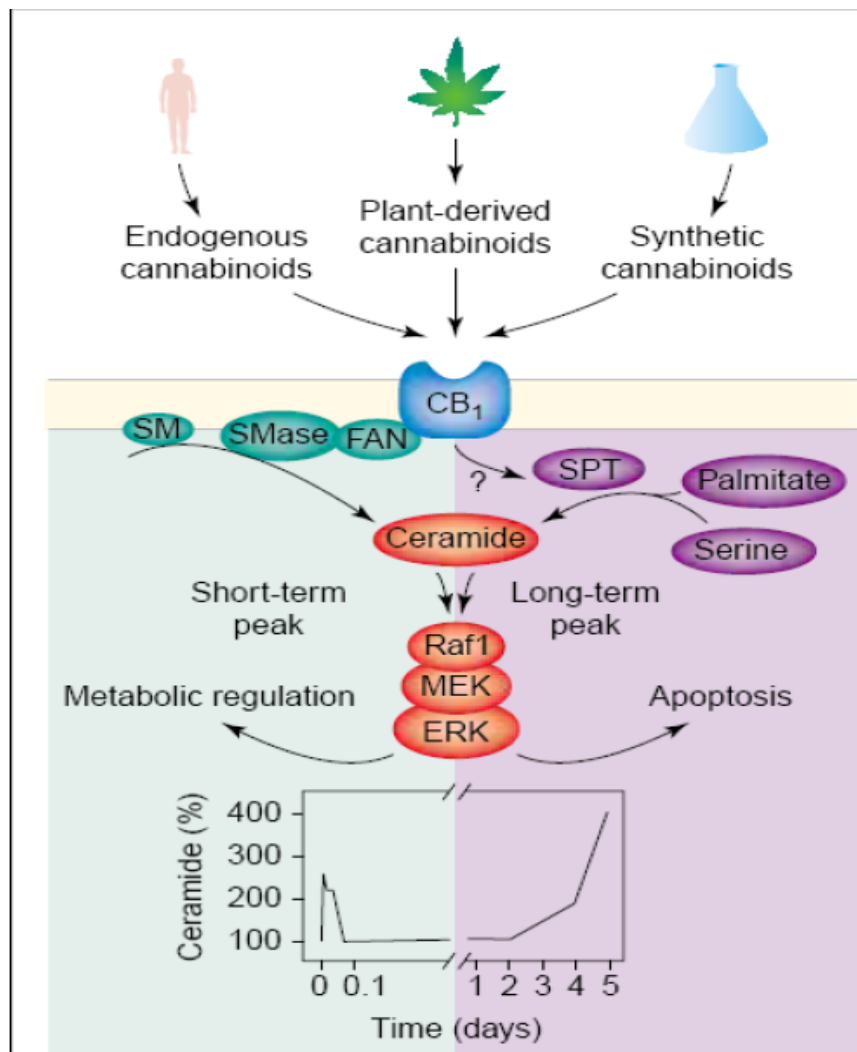
A3.6.Κεραμίδιο: ένα νέο μηνυματοφόρο μόριο.

Το κεραμίδιο (Ceramide) είναι ένα σφιγγολιπίδιο που πρωταπομονώθηκε το 1874 από τον Thudichum και παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της κυτταρικής τύχης (Kolesnick και Krönke, 1998) διαφόρων ειδών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των νευρικών. Παράγεται από την επίδραση ποικίλων ερεθισμάτων (προσδέτες που ενώνονται με υποδοχείς, απόσυρση αυξητικού παράγοντα, θεραπεία με χημειοθεραπευτικά, υψηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας ή οξειδωτικών ουσιών) και ανάλογα με το κύτταρο-στόχο επάγει διαφορετικές βιολογικές αντιδράσεις, συμπεριλαμβανομένης της απόπτωσης, διακοπής του κυτταρικού κύκλου, διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού. Έκθεση των νευρικών κυττάρων σε ποικίλα ερεθίσματα προκαλεί μεταβολή της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης κεραμιδίου, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται αλλαγές στην αύξηση και ανάπτυξή τους.

Έχει βρεθεί ότι τα κανναβινοειδή, είτε φυσικά, είτε συνθετικά, προάγουν την παραγωγή κεραμιδίου σε μια σειρά από κυτταρικές σειρές (Blazquez και συν., 1999 ; Galve-Roperh και συν., 2000). Ενεργοποίηση των υποδοχέων των κανναβινοειδών οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης του κεραμιδίου, η οποία ακολουθεί δυο κορυφές: μία μετά από λίγα λεπτά (5 λεπτά με μέγιστη αύξηση στα 15 λεπτά μετά την έκθεση) και μία μετά 2-3 μέρες (μετά από παρατεταμένη έκθεση σε κανναβινοειδή) **(εικόνα 7)**. Η ταχεία και παροδική παραγωγή κεραμιδίου οφείλεται στην ενεργοποίηση **ουδέτερων σφιγγομυελινάσων**, οι οποίες υδρολύουν την σφιγγομυελίνη σε κεραμίδιο και φωσφορυλοχολίνη (Kolesnick και συν., 1998). Οι σφιγγομυελινάσες συνδέονται με τους CB₁Rs μέσω μιας πρωτεΐνης-προσαρμοστή (adaptor), του παράγοντα που σχετίζεται με την ενεργοποίηση της ουδέτερης σφιγγομυελινάσης (factor associated with neutral sphingomyelinase activation, FAN) (Sanchez και συν., 2001). Η δράση αυτή των CB₁Rs είναι επομένως ανεξάρτητη της ενεργοποίησης των Gi/o πρωτεϊνών. Η παρατεταμένη παραγωγή και συσσώρευση κεραμιδίου οφείλεται στη de novo σύνθεσή του μέσω ενεργοποίησης της **παλμιτοϋλοτρανσφεράσης της σερίνης** (Guzman και συν., 2001).

Η οξεία παραγωγή κεραμιδίου σχετίζεται με τη ρύθμιση μεταβολικών λειτουργιών: διέγερση της χρήσης γλυκόζης μέσω ενεργοποίησης του ERK καταρράκτη και παραγωγή κετονικών σωμάτων μέσω ενεργοποίησης της παλμιτοϋλοτρανσφεράσης της καρνιτίνης (Blazquez και συν., 1999). Παρατεταμένη συσσώρευση κεραμιδίου επάγει

την **απόπτωση σε κύτταρα γλοιώματος** μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού Raf-1/MEK/ERK (Galve-Roperth και συν.,2000) και αναδεικνύει τη συμμετοχή του κεραμιδίου, αλλά και του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος στον καθορισμό της κυτταρικής τύχης.

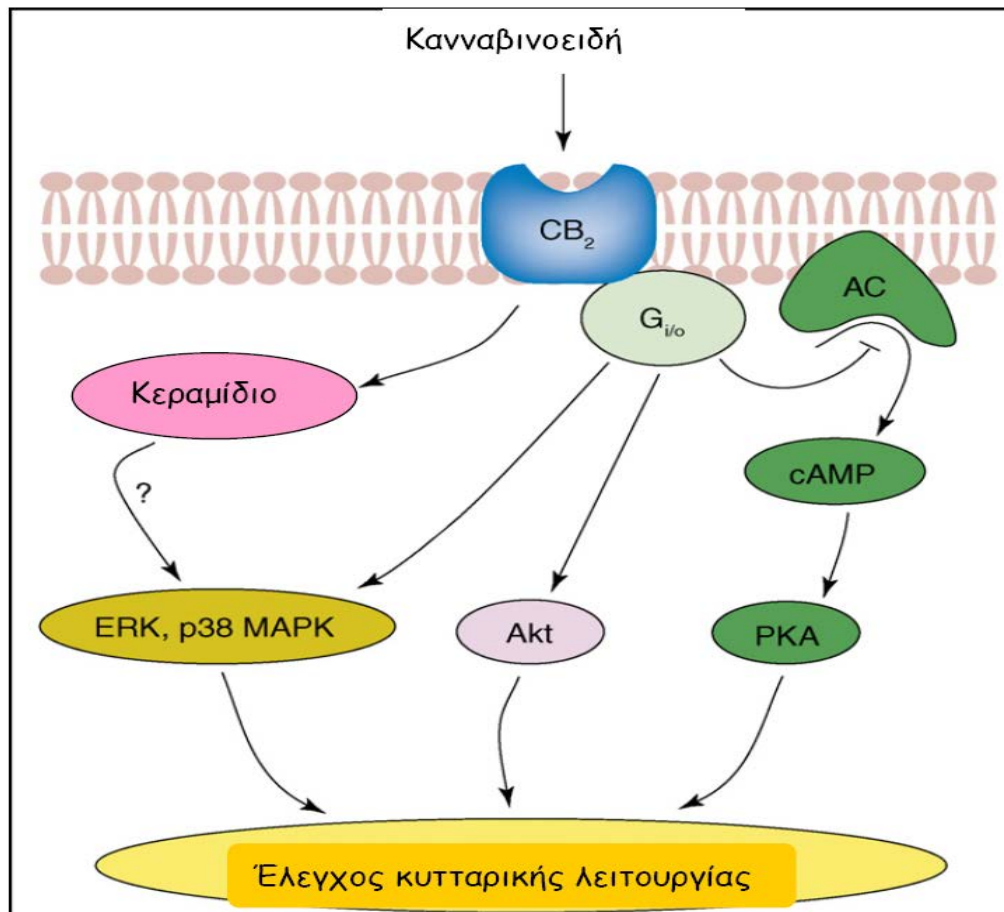


Εικόνα 7: Ο CB₁R διαμεσολαβεί την συσσώρευση κεραμιδίου στο κύτταρο. Ενεργοποίησή του παράγει δυο κορυφές: η πρώτη σχετίζεται με τη διάσπαση της σφιγγομυελίνης από υδρολυτικά ένζυμα που ενεργοποιούνται μέσω πρωτεϊνών-συνδετήρων. Η παραγωγή κεραμιδίου που οφείλεται σε παρατεταμένη έκθεση σε κανναβινοειδή γίνεται μέσω *de novo* σύνθεσης κεραμιδίου. Οι βιολογικές αποκρίσεις διαφέρουν ανάλογα με τον μηχανισμό παραγωγής (μεταβολική ρύθμιση, επαγωγή απόπτωσης). Το διάγραμμα δείχνει την κινητική και την μεγέθυνση των δύο κορυφών κεραμιδίου σε κύτταρα γλοιώματος που εκτίθενται πάνω από 5 μέρες σε Δ9-THC (Guzman και συν., 2001).

Το φαινομενικά παράδοξο είναι ότι το κεραμίδιο είναι ικανό να προάγει τόσο τη ρύθμιση του μεταβολισμού, όσο και την απόπτωση μέσω ενός κοινού μηχανισμού, της ενεργοποίησης δηλαδή του ERK μονοπατιού. Πράγματι η ενεργοποίηση του ERK μονοπατιού είναι υπεύθυνη για τη διττή δράση του κεραμιδίου, ενώ **πρόσφατα δεδομένα αναδεικνύουν τον ERK καταρράκτη ως αναστολέα της κυτταρικής αύξησης και επαγωγέα της απόπτωσης όταν ενεργοποιείται παρατεταμένα**, π.χ. η παρατεταμένη ενεργοποίηση του ERK μονοπατιού είναι εν μέρει υπεύθυνη για τον θάνατο νευρώνων μετά εγκεφαλική ισχαιμία ή τοξικότητα από γλουταμινικό (Alessandrini και συν., 1999).

A4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ CB₂R ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΤΥΧΗ.

Οι αρχικές μελέτες αναφορικά με την ιστική κατανομή των CB₂Rs δεν μπόρεσαν να τους εντοπίσουν στον εγκέφαλο κι έτσι υποστήριξαν ότι αυτός ο τύπος υποδοχέα εκφράζεται αποκλειστικά σε περιφερικούς ιστούς, ιδιαίτερα στην μεθόριο ζώνη του σπλήνα (Mackie και συν., 2006; Pertwee και συν., 2005). Ακολούθως, οι CB₂Rs ανιχνεύθηκαν σε πολλούς άλλους ιστούς και κυτταρικούς τύπους του ανοσοποιητικού συστήματος (Howlett και συν., 2002), ενώ αναφέρονται παραδοσιακά ως **περιφερικοί CBRs, (εικόνα 8)**. Η κλασική άποψη ότι οι CB₂Rs είναι απόντες από το κεντρικό νευρικό σύστημα συγκρούεται με πρόσφατα δεδομένα που δείχνουν ότι οι CB₂Rs είναι παρόντες τόσο σε καλλιέργειες νευρωνικών κυττάρων, αλλά και στο νευρικό σύστημα πολλών θηλαστικών, όπως των τρωκτικών, των πιθήκων και του ανθρώπου σε φυσιολογικές συνθήκες. Παραδείγματος χάριν οι CB₂Rs εκφράζονται σε νευρογλοιακά κύτταρα (μικρογλοία και αστροκύτταρα) (Stella, 2004), σε καλλιέργειες νευρικών (Palazuelos J. Και συν., 2006) και ολιγοδενδρογλοιακών προγονικών κυττάρων (Molina Holgado και συν., 2002), καθώς και σε μικρογλοιακά (Maresz και συν., 2005) και νευρικά προγονικά κύτταρα (Palazuelos και συν., 2006) φυσιολογικού εγκεφάλου ποντικού *in vivo*. Έχουν ανιχνευθεί επίσης και στους νευρώνες του εγκεφαλικού στελέχους (Van Sickle και συν., 2005).



Εικόνα 8: Σηματοδοτικά μονοπάτια που διεγείρει η ενεργοποίηση του CB₂R. Ο CB₂R είναι και αυτός συζευγμένος με G_{i/o} πρωτεΐνη και ρυθμίζει διάφορα μόρια: μονοπάτι αδενυλικής κυκλάσης (AC), κυκλικού AMP και πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA): MAP κινάσες (ERK, p38 MAPK): Akt μονοπάτι: παραγωγή κεραμιδίου (J. Fernandez-Ruiz και συν., 2006).

Α5. ΔΡΑΣΕΙΣ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ ΠΟΥ ΔΕΝ ΟΦΕΙΛΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ CBRs.

Υπάρχουν στοιχεία ότι εκτός από τους CB₁Rs και CB₂Rs υπάρχουν και άλλοι μοριακοί στόχοι μέσω των οποίων τα ενδοκανναβινοειδή παράγουν βιολογική δραστηριότητα. Συγκεκριμένα, ένας άλλος υποδοχέας-στόχος της ανανδαμίδης είναι ο υποδοχέας βανιλλοειδών τύπου 1 (VR1), μια πρωτεΐνη που διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη έξι φορές. Ο VR1 ενεργοποιείται από προσδέτες όπως η καψαϊκίνη, αλλά και από ερεθίσματα όπως η θερμότητα και τα οξέα. Η άποψη που επικρατεί σήμερα είναι

ότι η ανανδαμίδα εκτός από ενδοκανναβινοειδές είναι και ενδοβανιλλοειδές, που προκαλεί μια σειρά από κυτταρικές αποκρίσεις, όπως ενεργοποίηση μη ειδικών ιοντικών διαύλων, ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A, αύξηση του ενδοκυτταρίου Ca^{2+} μιτοχονδριακή αποσύζευξη (Pertwee, 2005).

A6. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ.

Τα κανναβινοειδή ασκούν δράση σε όλα τα συστήματα του οργανισμού. Συνδυάζουν πολλές από τις ιδιότητες της αλκοόλης, των ηρεμιστικών, των οπιοειδών και των παραισθησιογόνων. Είναι αγχολυτικά, κατασταλτικά, αναλγητικά, διεγείρουν την όρεξη και έχουν πολλές συστηματικές δράσεις. Επιπλέον παρουσιάζουν πολύ χαμηλή οξεία τοξικότητα: ποτέ δεν έχουν αναφερθεί θάνατοι εξαιτίας οξείας κατανάλωσης κάνναβης.

Η πιο χαρακτηριστική δράση της κάνναβης (και ένας από τους βασικούς λόγους κατανάλωσης κάνναβης) είναι ότι προκαλεί ευφορία, ελάττωση του άγχους, της κατάθλιψης και της έντασης, καθώς και αυξημένη κοινωνικοποίηση. Η επίτευξη ευφορίας συμβαίνει μετά λίγα λεπτά από το κάπνισμα και φτάνει σε ένα πλατό που διαρκεί δυο ώρες ή και περισσότερο ανάλογα με τη δόση. Παρόλα αυτά, η κάνναβη μπορεί επίσης να προκαλέσει δυσφορικές αντιδράσεις, όπως άγχος και πανικό, παράνοια και ψύχωση. Και αυτές οι αντιδράσεις είναι δοσοεξαρτώμενες και πιο συνήθεις σε νέους χρήστες και σε αγχώδη και ψυχολογικά ευάλωτα άτομα. Εξάλλου είναι γνωστή η συσχέτιση της χρήσης κάνναβης με την επιδείνωση της σχιζοφρένειας.

Η κάνναβη προκαλεί διαταραχές στην αντίληψη. Τα χρώματα φαίνονται πιο ανοιχτά, η μουσική πιο ζωντανή, τα αισθήματα πιο έντονα και σημαντικά. Η αντίληψη του χώρου διαταράσσεται όπως επίσης και η αντίληψη του χρόνου, ενώ σε υψηλές δόσεις παρατηρούνται και ψευδαισθήσεις. Επιπλέον παρατηρείται διαταραχή στην νοητική και ψυχοκινητική επίδοση: διαταραχή της κινητικής συνέργειας, ελλείματα στη βραχυρόνια μνήμη, δυσκολία συγκέντρωσης και ανικανότητα εκτέλεσης σύνθετων εργασιών που απαιτούν διάσπαση της προσοχής. Επηρεάζεται όμως και η ικανότητα οδήγησης.

Παρόλο, λοιπόν, που τα κανναβινοειδή θεωρούνται γενικά κατασταλτικές ουσίες, υπάρχουν αναφορές και για διεγερτικές τους δράσεις: κατανάλωση κάνναβης επάγει επιθετική συμπεριφορά, υπεραλγησία, αυξημένη κινητική δραστηριότητα, αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος (Sulcova και συν., 1998). Σε κυτταρικό επίπεδο έχει ήδη αναφερθεί η θετική επίδρασή τους στην παραγωγή του cAMP και την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου, που ενδέχεται να είναι υπεύθυνες για τις παραπάνω δράσεις. Η διττή (διεγερτική και ανασταλτική) δράση των κανναβινοειδών εξαρτάται από τη συγκέντρωση του φαρμάκου: υψηλές συγκεντρώσεις έχουν ανασταλτική δράση, ενώ χαμηλές συγκεντρώσεις διεγερτική.

Αν και δεν έχουν διαπιστωθεί μακροσκοπικές αλλοιώσεις στον εγκέφαλο ατόμων που είναι χρόνιοι χρήστες μαριχουάνας, επιδημιολογικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η συχνή χρήση κάνναβης οδηγεί σε μακροχρόνια επιδείνωση των νοητικών λειτουργιών (Block, 1996).

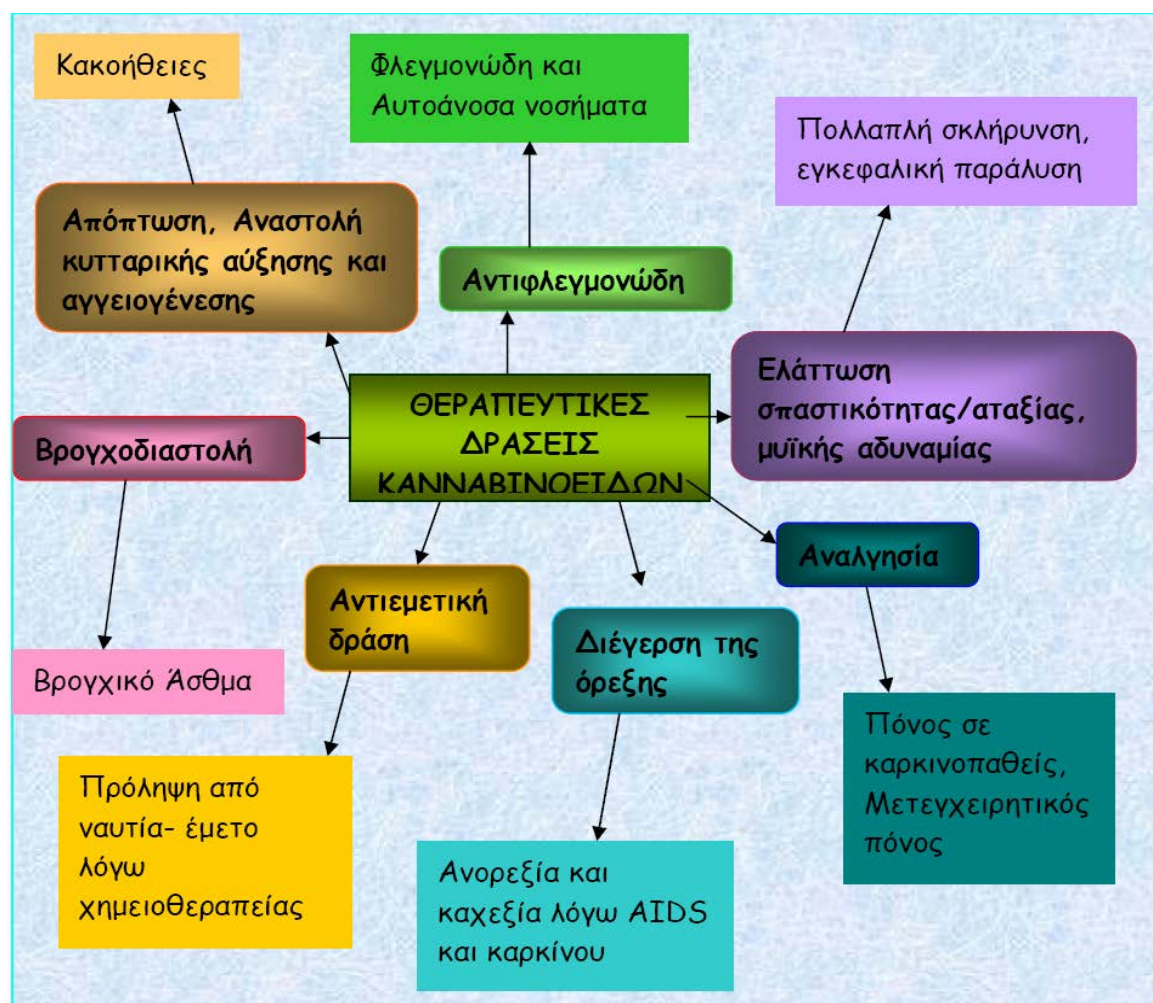
Α7. ΤΑ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟ ΜΕΣΟ.

Τα κανναβινοειδή χρησιμοποιούνται στην ιατρική πράξη εδώ και πάνω από έναν αιώνα. Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα αποτελεί φυσιολογικό ρυθμιστή των περισσότερων συστημάτων και γι' αυτόν τον λόγο είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικό μέσον για την αντιμετώπιση μιας πληθώρας παθολογικών καταστάσεων (**εικόνα 12**). Οι νευροπροστατευτικές ιδιότητες των κανναβινοειδών τα καθιστούν χρήσιμα φάρμακα για την αντιμετώπιση **νευροεκφυλιστικών νόσων** των ενηλίκων, όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας, η νόσος Parkinson, η χορεία του Huntington (Piomelli και συν., 2000). Επιπλέον στην Αμερική έχουν εγκριθεί από τον F.D.A. (United States Food and Drug Administration) φάρμακα όπως η από του στόματος χορηγούμενη Δ9-THC (δροναβινόλη, Marinol), καθώς και το συνθετικό του ανάλογο ναβιλόνη (Cesamet) για την αντιμετώπιση όχι μόνο του **πόνου**, αλλά και της **καχεξίας** και του **εμέτου** που σχετίζονται με το σύνδρομο της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας και τη χημειοθεραπεία για κακοήθειες (Walsh και συν., 2003). Πρόσφατα κυκλοφόρησε στην Αμερική το πρώτο κανναβινοειδές σκεύασμα για την αντιμετώ-

πιση της **παχυσαρκίας**, που είναι ένας εξειδικευμένος ανταγωνιστής για τους CB₁Rs (SR141716, Rimonbant).

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στην θεραπευτική τους αξία ως **αντινεοπλασματικά φάρμακα**, καθώς μια σειρά από μελέτες σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων έδειξε ότι η χορήγηση ουσιών με κανναβινοειδή δράση ανέστειλε την ανάπτυξή τους (Sánchez και υν., 1998). Επιπλέον, χορήγηση κανναβινοειδών αγωνιστών σε πειραματόζωα με γλοίωμα, έναν από τους κακοηθέστερους όγκους, οδήγησε σε συρρίκνωση του όγκου (Galve-Roperh και συν., 2000).

Η καταλληλότητα των κανναβινοειδών για την αντιμετώπιση των διαφόρων παθολογικών καταστάσεων (με εξαίρεση τη χρήση τους ως αντιεμετικά) ελέγχεται ακόμα, ενώ εκτός των ψυχοδιεγερτικών παρενεργειών πρέπει να αναφερθεί ότι χρόνια χρήση μικρών δόσεων κανναβινοειδών είναι νευροτοξική.



Εικόνα 12: Τα κανναβινοειδή ως δυνητικά θεραπευτικό μέσον.

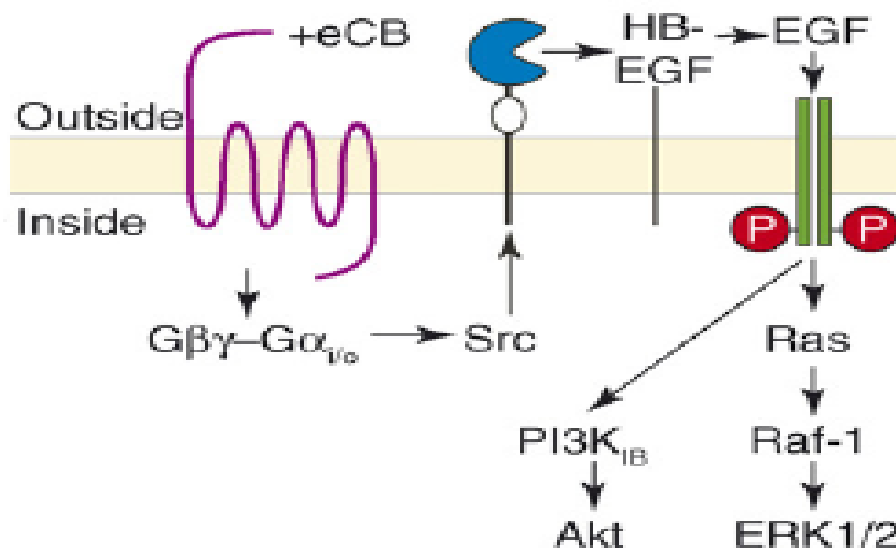
A8. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ.

A8.1. Αλληλεπίδραση με αυξητικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό.

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για τη στόχευση του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος **στη θεραπεία του καρκίνου** είναι ιδιαίτερα αυξημένο. Διάφορες *in vitro* και *in vivo* μελέτες, δείχνουν ότι η ενεργοποίηση των **CB₁Rs** προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, επαγωγή της απόπτωσής τους, αναστολή της αγγειογένεσης και της μετάστασης. Σε μια μελέτη για την οποία χρησιμοποιήθηκαν **καρκινικά κύτταρα μαστού**, τα οποία βρέθηκε ότι εξέφραζαν υψηλά επίπεδα CB₁Rs, χορήγηση THC ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (De Petrocellis και συν., 1998) μέσω αναστολής της έκφρασης των υποδοχέων προλακτίνης σε επίπεδο μετάφρασης. Κάτι ανάλογο συνέβη και με **κύτταρα προστατικού καρκίνου**, στα οποία ανεστάλη η έκφραση του υποδοχέα Trk (Melck και συν., 2000). Τα φαινόμενα αυτά οφείλονται στην αναστολή της AC με τη συνακόλουθη αναστολή της πρωτεϊνικής κινάσης A και ενεργοποίηση του ERK μονοπατιού. Εκτός αυτού, είναι γνωστή η δράση των κανναβινοειδών στην αναστολή πολλαπλασιασμού γονιδίων, όπως του K-ras (Bifulco και συν., 2001).

Παρόλα αυτά, έχει δειχθεί ότι κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ενεργοποίηση των CB₁Rs μπορεί να οδηγήσει σε πολλαπλασιασμό και αυξημένα ποσοστά επιβίωσης καρκινικών κυττάρων. Σε χαμηλές μικρομοριακές συγκεντρώσεις τα κανναβινοειδή συνήθως λειτουργούν ως ανοσοκατασταλτικά και αντιμιτωτικά ερεθίσματα, το οποίο έχει συσχετισθεί, τουλάχιστον μερικώς, με παρατεταμένη ενεργοποίηση του Raf-1-ERK1/2 μονοπατιού. Όταν, όμως η έκθεση στα κανναβινοειδή είναι βραχείας διάρκειας ή οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται είναι νανομοριακές, διεγείρεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και αυξάνονται τα ποσοστά επιβίωσης σε μία ποικιλία καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν τον EGF (Hart και συν., 2004).

Και γι' αυτό το αποτέλεσμα είναι υπεύθυνη η ενεργοποίηση του μονοπατιού της MAPK και της Akt/PKB, η οποία δεν μεσολαβείται από την PI3K. Αντίθετα, ενεργοποίηση του CB₁R οδηγεί σε ενεργοποίηση της κυτταροπλασματικής κινάσης Src, η οποία φωσφορυλιώνει το μετατρεπτικό ένζυμο του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TACE ή ADAM17), το οποίο ανήκει στην οικογένεια των μεταλλοπρωτεασών. Το ένζυμο ενεργοποιεί τους EGFR μέσω πρωτεολυτικής διάσπασης EGF-like πρόδρομων μορίων (π.χ. προαμφιρεγκιουλίνη, proHB-EGF, proTGFα). Η ταχεία φωσφορυλίωσή του οδηγεί σε φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης-συνδετήρα Src homology 2 domain-containing (Shc), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού της ERK και της Akt/PKB (εικόνα 9).



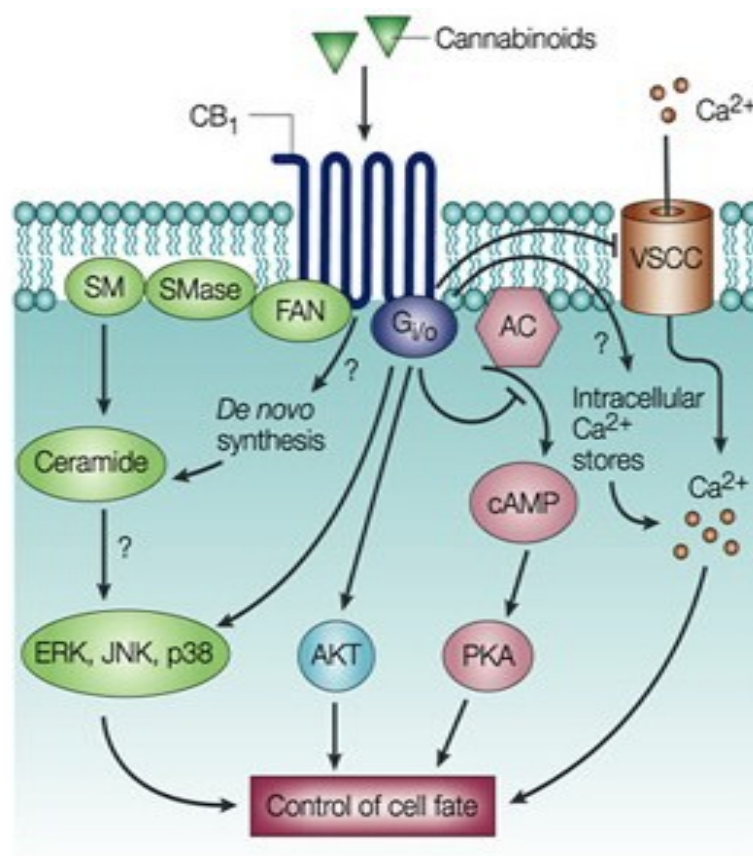
Εικόνα 9: Η μέσω κανναβινοειδών διαενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του EGFR, το οποίο οδηγεί σε επιβίωση και κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Harkany και συν., 2007).

Ο παραπάνω μηχανισμός δράσης των κανναβινοειδών μέσω διαενεργοποίησης ενός υποδοχέα με δραστηκότητα κινάσης της τυροσίνης, εν προκειμένω του EGFR, δείχνει ότι η σηματοδότηση μέσω ανανδαμίδης ή εξωγενώς χορηγούμενων κανναβινοειδών εξαρτάται τόσο από το κυτταρικό περιοχόμενο, όσο και από τις συνθήκες χορήγησής τους (συγκέντρωση και διάρκεια χορήγησης), ενώ προτείνει έναν μηχανισμό μέσω του οποίου τα κανναβινοειδή προάγουν τον πολλαπλασιασμό των προγονικών νευρικών κυττάρων.

A8.2.Ενεργοποίηση μεταγωγικών μονοπατιών που προάγουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό.

Τα μονοπάτια που ενεργοποιούν οι CBRs και τα οποία διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είναι τα εξής:

1. Το μονοπάτι της PI₃K/PKB
2. Το μονοπάτι της ERK
3. Το μονοπάτι του cAMP/PKA , **(εικόνα 10).**



Εικόνα 10: Μεταγωγικά μονοπάτια που ενεργοποιούν οι CB₁Rs και τα οποία ελέγχουν την κυτταρική τύχη (Guzman και συν., 2003).

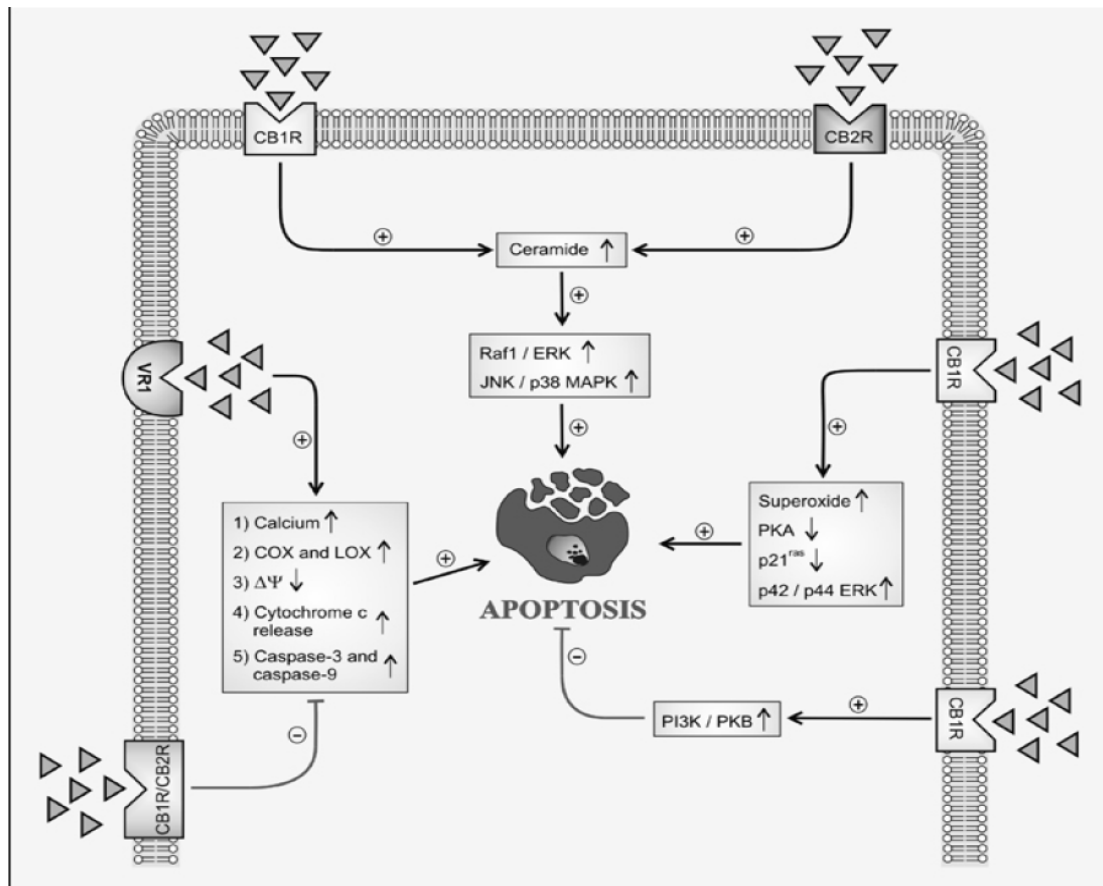
Μέσω ενεργοποίησης αυτών των κινασών φωσφορυλιώνεται μία πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων και πρωτεϊνών που προάγουν την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό.

A9. ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ.

Η ενεργοποίηση των **CB₁Rs** και **CB₂Rs** προκαλεί την ενεργοποίηση πολλών σηματοδοτικών μεταγωγικών μονοπατιών, ορισμένα από τα οποία ρυθμίζουν την συναπτική διαβίβαση, άλλα διαμορφώνουν τον κυτταρικό μεταβολισμό ή είναι ικανά ακόμα και να καθορίσουν την κυτταρική τύχη. Αναλύθηκε ήδη ο ρόλος του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τόσο των φυσιολογικών κυττάρων, όσο και των καρκινικών. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετές μελέτες οι οποίες συνδέουν τα κανναβινοειδή με αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, (απόπτωση).

Η παραγωγή του **κεραμιδίου**, ενός δευτέρου μηνυματοφόρου μορίου που έχει δειχθεί ότι είναι ένας προαποπτωτικός παράγων, επάγεται από τα κανναβινοειδή και έχει δειχθεί ότι αποτελεί έναν μηχανισμό ρύθμισης της κυτταρικής τύχης σε μία πλειάδα κυττάρων, (Goswami και Dawson, 2000). Μέσω όμως του ίδιου μηχανισμού μπορεί να προάγουν και την επιβίωση. Τα κανναβινοειδή λοιπόν προστατεύουν (νευροπροστατευτικές ιδιότητες) τους νευρώνες, τα φυσιολογικά αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα από την απόπτωση, ενώ μεταμορφωμένα νευρογλοιακά κύτταρα είναι επιρρεπή σε απόπτωση.

Επιπλέον γνωρίζουμε ότι τα κανναβινοειδή ενεργοποιούν και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία **οδηγούν καρκινικά κύτταρα σε απόπτωση (εικόνα 11)**. Για παράδειγμα, σε μια πρόσφατη μελέτη καρκινικών κυττάρων από **καρκίνο παχέος εντέρου** τα κανναβινοειδή προκάλεσαν αναστολή των RAS-MAPK/ERK και PI3K-AKT σηματοδοτικών μονοπατιών επιβίωσης, η οποία ενεργοποίησε την προαποπτωτική πρωτεΐνη BAD της οικογένειας Bcl-2.

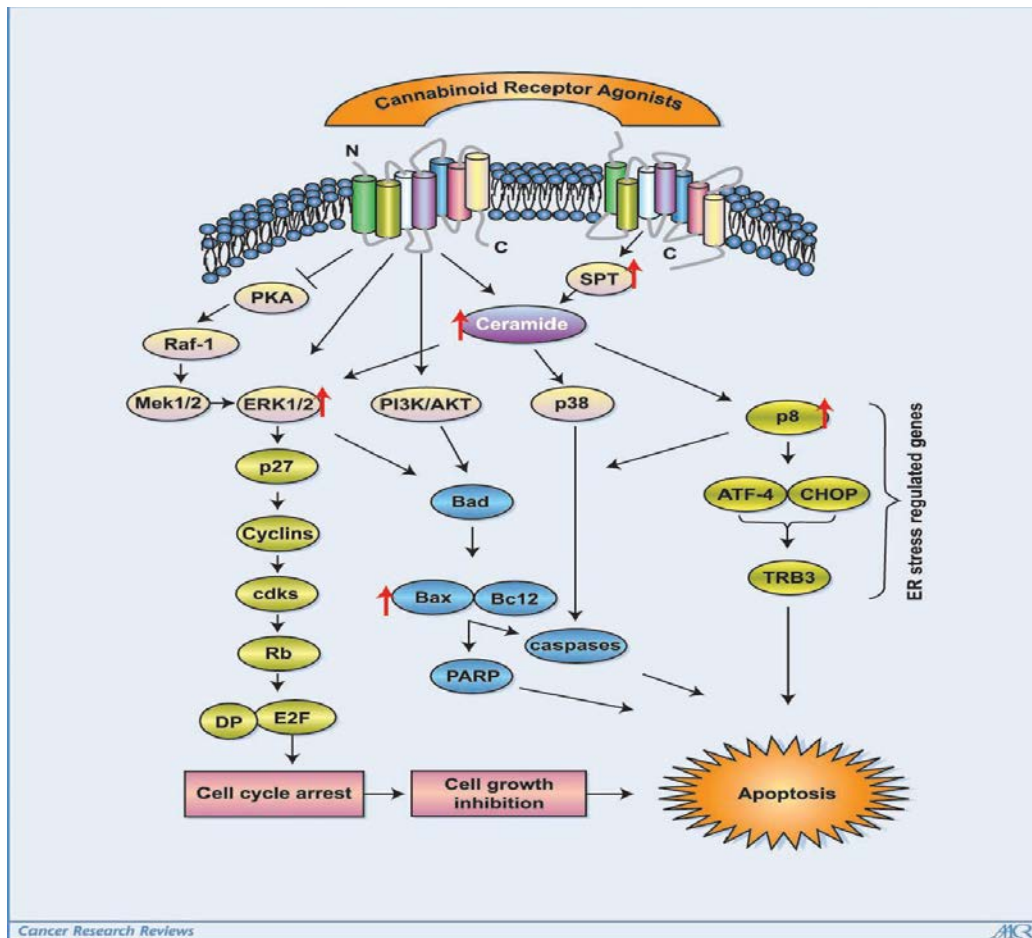


Εικόνα 11: Μηχανισμοί επαγωγής της απόπτωσης μέσω ενεργοποίησης των CBRs. Η πρόσδεση της εξωκυττάριας ανανδαμίδης (τρίγωνα) στους CB_1R s και τους CB_2R s ενεργοποιεί διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Ενεργοποίηση είτε των CB_1R είτε των CB_2R αυξάνει τα ενδοκυττάρια επίπεδα κεραμιδίου, το οποίο ενεργοποιεί τον Raf1/ERK καταρράκτη, αλλά και τις JNK/p38 MAP κινάσες, οδηγώντας τα κύτταρα σε απόπτωση. Επιπλέον η πρόσδεση της ανανδαμίδης στον CB_1R μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ιόντων υπεροξειδίου, την αναστολή της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) και της πρωτεΐνης p21ras (προϊόντος του K-gas ογκογονιδίου), καθώς και σε ενεργοποίηση της p42/p44 ERK. Όλα τα παραπάνω μόρια οδηγούν τελικά σε απόπτωση. Εναλλακτικά, η ανανδαμίδα είναι ικανή να ενεργοποιήσει τους VR1 προσδεδεμένοι στην ενδοκυττάρια πλευρά τους, διεγείροντας μια σειρά από προαποπτωτικά συμβάντα, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης του ενδοκυττάριου ασβεστίου, ενεργοποίηση του καταρράκτη του αραχιδονικού οξέος μέσω των μονοπατιών της κυκλοξυγενάσης και της λιποξυγενάσης, πτώση του μιτοχονδριακού δυναμικού ($\Delta\Psi$), αύξηση της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c και ενεργοποίηση των κασπασών 3 και 9. Αυτές οι δράσεις της ανανδαμίδης στους VR1 παρεμποδίζονται από την ταυτόχρονη ενεργοποίηση των CB_1R ή CB_2R .

Α10. ΤΑ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Ο καρκίνος είναι μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από μη ελεγχόμενη διαίρεση των κυττάρων και την ικανότητά τους να διασπείρονται. Αυτή η μη ρυθμιζόμενη αύξηση προκαλείται από καταστροφή στο DNA, κάτι που συμβαίνει λόγω μεταλλάξεων, ανωμαλίες στον κυτταρικό κύκλο και στον αποπτωτικό μηχανισμό. Έτσι, συστατικά που μπορούν να ρυθμίσουν την απόπτωση για να διατηρήσουν ένα σταθερό κυτταρικό πληθυσμό, συμμετέχοντας σε ένα ή περισσότερα σηματοδοτικά μονοπάτια, οδηγώντας έτσι στην επαγωγή της απόπτωσης, μπορεί να είναι χρήσιμα για στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου. Στις αρχές της δεκαετίας του 1970, μελέτες έδειξαν ότι τα κανναβινοειδή αναστέλλουν την αύξηση του όγκου και αυξάνουν τη διάρκεια ζωής των ποντικών που πάσχουν από Lewis αδenoκαρκίνωμα του πνεύμονα, (Guzman M, 2003). Στις επακόλουθες μελέτες αναλύθηκαν **οι μοριακοί μηχανισμοί** για αυτές τις επιδράσεις, και βρέθηκε ότι τα κανναβινοειδή ανέστειλαν την αύξηση του όγκου και προκάλεσαν απόπτωση, ρυθμίζοντας διαφορετικά σηματοδοτικά κυτταρικά μονοπάτια, στα γλοιώματα, στα λεμφώματα και στα προστατικά, του μαστού, του πνεύμονα, του δέρματος και του παγκρέατος καρκινικά κύτταρα, (Carracedo A, και συν., 2006), (Gustafsson K, και συν., 2006), (Sarfaraz S, και συν., 2006), (Ligresti A, και συν., 2006), (Blazquez C, και συν., 2006), (Carracedo A, και συν., 2006).

Οι επιδράσεις των κανναβινοειδών στα διάφορα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια, φαίνονται στην **(εικόνα 13)**.



Εικόνα 13 : Σχηματική αναπαράσταση των σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του υποδοχέα των κανναβινοειδών, (CBR) επαγόμενη από τους αγωνιστές του. Μετά τη σύνδεση στον υποδοχέα, οι αγωνιστές των CBRs, αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω αναστολής της εξαρτώμενης από cAMP πρωτεϊνικής κινάσης, η οποία ενεργοποιεί τις πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από μιτογόνα (MAPK). Διέγερση της σύνθεσης κεραμίδης διαμέσω ενεργοποίησης της παμιτοϋλτρανσφεράσης της σερίνης (SPT) ενεργοποιεί την p8, οδηγώντας στην συνεπακόλουθη επαγωγή της απόπτωσης. Οι αγωνιστές των CBRs ενεργοποιούν επίσης τα μονοπάτια MAPKs και PI3K/Akt. Η ενεργοποίηση του ERK1/2 οδηγεί στην επαγωγή του αναστολέα της κινάσης της κυκλίνης p27/KIP1, με ταυτόχρονο συντονισμό των ρυθμιστικών μορίων του κυτταρικού κύκλου, με αποτέλεσμα διακοπή στη φάση G1 του κύκλου και απόπτωση. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί βασίζονται στη διαθέσιμη βιβλιογραφία και είναι κυτταρο-ειδικοί, επίσης όλα τα μονοπάτια δεν εκκινούνται ταυτόχρονα. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για την πλήρη κατανόηση του λεπτομερή μηχανισμού δράσης, μετά από ενεργοποίηση των CBRs από τους αγωνιστές τους (Sami Sarfaraz, και συν., 2008).

Είναι αξιοσημείωτο ότι σε αντίθεση με τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες, μερικά κανναβινοειδή σε χαμηλές δόσεις έχει δειχθεί ότι αυξάνουν το μέγεθος των καρκινικών κυττάρων in vitro, (Preet A, και συν., 2007). Αν και τα παρατηρούμενα αποτελέσματα των κανναβινοειδών είναι περίπλοκα και μερικές φορές αντικρουόμενα, υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι τα κανναβινοειδή μπορούν να ερευνηθούν σαν χημειοθεραπευτικά συστατικά για τη θεραπεία του καρκίνου.

A10.1.Κανναβινοειδή και καρκίνοι του εγκεφάλου (γλοιώματα).

Το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, είναι μια από τις πιο θανατηφόρες μορφές καρκίνου, και η πιο συχνή κατηγορία των κακοήθων όγκων του εγκεφάλου. Η αντικαρκινική δράση δυο αγωνιστών των υποδοχέων των κανναβινοειδών, D9-THC και WIN-55,212-2 (ένα μίγμα CB1/CB2 αγωνιστών), φάνηκε ότι ασκείται μέσω της συσσώρευσης της κεραμίδης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την συνεπακόλουθη ενεργοποίηση της κινάσης ERK1/2, (Carracedo A, και συν., 2006). Αναφέρθηκε ακόμη, ότι τα κανναβινοειδή απενεργοποιούν την κινάση της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, (PI3K), την πρωτεϊνική κινάση B (Akt), και τα ERK σηματοδοτικά μονοπάτια και ενεργοποιούν την προαποπτωτική λειτουργία της πρωτεΐνης Bad, οδηγώντας στην επαγωγή της απόπτωσης, (Ellert-Miklaszewska A, και συν., 2005). Έχει δειχθεί επίσης ότι η εκλεκτική ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα από το JWH-133 προκαλεί απόπτωση στα κύτταρα του γλοιώματος, δια μέσω της de novo αύξησης της σύνθεσης κεραμίδης, (Sarfaraz S, και συν., 2006).

Ακόμη, ο ρόλος της πρωτεΐνης 8, p8, που ρυθμίζεται από το στρες, (γνωστή ως υποψήφια μετάστασης-1), και οι επόμενοι στόχοι της, όπως για παράδειγμα η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα 4 (ATF-4), η σύνδεση της ομόλογης πρωτεΐνης στη θέση CAAT(του ενισχυτή) και η επαγόμενη από τον κυτταρικό θάνατο κινάση (TRB3), είναι ένας μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης των κανναβινοειδών (Carracedo A, και συν., 2006).

Η φάση I κλινικών δοκιμών σε εννέα ασθενείς με υποτροπιάζουσα μορφή πολύμορφου γλοιοβλαστώματος, ανέδειξε ένα σχετικά ασφαλές προφίλ της D9-THC μαζί με αντιπολλαπλασιαστική δράση στα καρκινικά κύτταρα (Guzman M, και συν., 2006).

Ο Massi και οι συνεργάτες του (Massi P, και συν., 2006) έδειξαν ότι η θεραπεία με κανναβιδιόλη (CBD), προκαλεί απόπτωση στα κύτταρα του γλοιώματος *in vitro* και υποστροφή του όγκου *in vivo* διαμέσω ενεργοποίησης των κασπασών και των αντιδραστικών ενώσεων του οξυγόνου (ROS), με τρόπο μη εξαρτώμενο από υποδοχείς.

Ανασκοπήσεις:

Σε μια ανασκόπηση του 2002, ο Guzman et al, (Guzman M, και συν., 2002) συμπέραναν ότι: *‘η χορήγηση των κανναβινοειδών προκαλεί μείωση των κακοήθων γλοιωμάτων στα τρωκτικά με έναν τρόπο που μπορεί να περιλαμβάνει σταθερή γένεση κεραμίδης και ενεργοποίησης της κινάσης ERK. Αντίθετα, τα περισσότερα από τα πειραματικά δεδομένα, δείχνουν ότι τα κανναβινοειδή μπορεί να προστατεύουν τους φυσιολογικούς νευρώνες από τοξικές προσβολές, όπως γλουταμινεργική υπερδιέγερση, ισχαιμία και οξειδωτική καταστροφή. Σε ότι αφορά τα κύτταρα της ανοσίας, χαμηλές δόσεις κανναβινοειδών μπορεί να ενισχύσουν τον πολλαπλασιασμό, ενώ υψηλές δόσεις συνήθως προκαλούν διακοπή της αύξησης ή απόπτωση.’*

Το 2003 ο Guzman (Guzman M., και συν., 2003) πρόσθεσε, τα εξής: *‘τα κανναβινοειδή, τα ενεργά συστατικά της ημερης κάνναβης και τα παράγωγά τους έχουν καταπραϋντική δράση σε ασθενείς με καρκίνο, εμποδίζοντας την ναυτία, τον έμετο και τον πόνο και διεγείροντας την όρεξη. Επιπρόσθετα, αυτά τα συστατικά φάνηκε ότι αναστέλλουν την αύξηση των καρκινικών κυττάρων στις καλλιέργειες και στα ζωικά μοντέλα, ρυθμίζοντας μονοπάτια-κλειδιά κυτταρικής σηματοδότησης. Τα κανναβινοειδή γίνονται συνήθως καλά ανεκτά και δεν παράγουν τις γενικευμένες τοξικές ενέργειες των συμβατικών χημειοθεραπειών’.*

Ο Goncharov et al, (Goncharov I, και συν., 2005) βρήκαν ότι η D9-THC αυξάνει το θάνατο των κυττάρων του γλοιώματος, που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες.

Μελετώντας τα αποτελέσματά της στα ανθρώπινα κύτταρα του γλοιώματος, ο Massi et al (Massi P, και συν., 2004) ανέφεραν ότι: *‘η CBD ήταν ικανή να παράγει μια σημαντική αντικαρκινική δραστηριότητα *in vitro* και *in vivo*, υποθέτοντας μια πιθανή χρήση της CBD σαν αντικαρκινικό φάρμακο’.*

Ο Velasco et al (Velasco G, και συν., 2004) τόνισαν ότι: *‘τα κανναβινοειδή προκαλούν απόπτωση των κυττάρων του γλοιώματος στην καλλιέργεια, διαμέσω σταθερής συσσώρευσης κεραμίδης, ενεργοποίησης της εξωκυττάριας κινάσης ERK και αναστολή της Akt. Ακόμη, η θεραπεία με κανναβινοειδή αναστέλλει την αγγειογένεση των γλοιωμάτων *in vivo*. Είναι αξιοσημείωτο, ότι τα κανναβινοειδή σκοτώνουν εκλεκτικά τα κύτταρα του*

γλοιώματος, αλλά μπορούν να προστατέψουν τα μη μεταμορφωμένα νευρογλοιακά κύτταρα από το θάνατο’.

Ο Blazquez et al, (Blázquez C, και συν.,2004) βρήκαν ότι: *‘τα κανναβινοειδή αναστέλλουν το μονοπάτι του αγγειοενδοθηλιακού παράγοντα στα γλοιώματα*’, οδηγώντας σε μειωμένο μέγεθος όγκου.

Ο Contassot et al, (Contassot E, και συν.,2004) παρατήρησαν ότι: *‘η AEA προκάλεσε απόπτωση στις παλιές αλλά και στις πρόσφατες κυτταρικές σειρές γλοιώματος, μέσω παρεκκλίνουσας έκφρασης του υποδοχέα βανιλλοειδών VR1. Αντίθετα με τον ρόλο τους στον THC-προκαλούμενο θάνατο, και οι υποδοχείς, CB1,CB2, προστάτεψαν μερικώς το γλοιώμα από την απόπτωση που προκαλείται από την AEA.*’

Ο Vaccani et al, (Vaccani A, και συν.,2005) παρατήρησαν ότι η CBD αναστέλλει την μετανάστευση των ανθρωπίνων κυττάρων του γλοιώματος, χωρίς εμφανές αποτέλεσμα των ανταγωνιστών των CB1, CB2 υποδοχέων, καταλήγοντας στο συμπέρασμα *‘αυτά τα αποτελέσματα ενισχύουν τα δεδομένα των αντικαρκινικών ιδιοτήτων της CBD, αποδεικνύοντας την ικανότητά της να περιορίζει την μετάσταση του όγκου*’.

Ο Sanchez et al, (Sanchez C, και συν.,2001) ανέφεραν ότι: *‘η αύξηση του γλοιώματος στα τρωκτικά, (μια από τις κακοηθέστερες μορφές καρκίνου), αναστέλλεται από ψυχοδραστικά κανναβινοειδή*’ και ότι *‘η τοπική χορήγηση του εκλεκτικού CB2 αγωνιστή..... προκαλεί μια σημαντική μείωση των κακοήθων όγκων*’.

Ο Jacobsson et al,(Jacobsson SO, και συν.,2001) συμπέραναν ότι: *‘ τα αντιπολλαπλασιαστικά αποτελέσματα των κανναβινοειδών στα κύτταρα γλοιώματος τρωκτικού, επιφέρονται με έναν μηχανισμό που περιλαμβάνει συνδυασμένη δράση τόσο των υποδοχέων βανιλλοειδών, όσο και ,σε μικρότερη έκταση των υποδοχέων κανναβινοειδών.*’

Ο Gomez del Pulgar et al,(Gomez del Pulgar T, και συν.,2002) βρήκαν ότι η THC προκαλεί το θάνατο των κυττάρων του γλοιώματος, εξ’ αιτίας της τοπικής σύνθεσης κεραμίδης και επιβεβαίωσαν ένα νευροπροστατευτικό αποτέλεσμα των κανναβινοειδών στα αστροκύτταρα.

Ο Duntsch et al, (Duntsch C, και συν.,2006) εξέτασαν τον KM-233, έναν εκλεκτικό αγωνιστή του υποδοχέα CB2, συγκρίνοντάς τον με τη D9-THC και βρήκαν ότι και οι δυο ενώσεις είναι το ίδιο αποτελεσματικές.

Ο Held-Feindt et al,(Held-Feindt J, και συν.,2006) τόνισαν ότι: *‘οι αγωνιστές του CB1 υποδοχέα, μειώνουν τα αυξημένα επίπεδα του κυκλικού AMP και μειώνουν ελαφρώς*

τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων του γλοιώματος *in vitro*, αλλά δεν παράγουν απόπτωση. Συμπεραίνουμε ότι η θεραπεία με κανναβινοειδή των ανθρωπίνων γλοιωμάτων, στοχεύει όχι μόνο τους υποδοχείς στον ίδιο όγκο, αλλά επίσης και σε άλλους κυτταρικούς τύπους.'

Ο De Lago et al, (De Lago E, και συν.,2006) βρήκαν ότι οι αναστολείς της επαναπρόσληψης ανανδαμίδης, προκάλεσαν γρήγορα τοξικότητα στα C6 κύτταρα του γλοιώματος.

Ο Massi et al, (Massi P, και συν.,2006) βρήκαν ότι 'η αντιπολλαπλασιαστική δράση της CBD στα ανθρώπινα κύτταρα του γλοιώματος και στα μη μεταμορφωμένα κύτταρα είναι διαφορετική και φαίνεται να σχετίζεται στενά με την εκλεκτική ικανότητα της CBD στην πρόκληση παραγωγής ROS και ενεργοποίηση των κασπασών στα καρκινικά κύτταρα'.

Ο Aguado et al,(Aguado T, και συν.,2007) ανέφεραν ότι: 'τα κανναβινοειδή στοχεύουν τα κύτταρα του γλοιώματος που μοιάζουν με βλάστες, προάγουν τη διαφοροποίησή τους, και αναστέλλουν τη γλοιοματογένεση, υποστηρίζοντας με αυτόν τον τρόπο την πιθανή τους χρήση στη διαχείριση των κακοήθων γλοιωμάτων'.

Ο Lorente et al, (Lorente M, και συν.,2009) σημείωσαν ότι : 'η D9-THC το κύριο ενεργό συστατικό της μαριχουάνας, και άλλα κανναβινοειδή αναστέλλουν την αύξηση του όγκου σε ζωικά μοντέλα καρκίνου, μεταξύ των οποίων είναι και το γλοίωμα, ένα αποτέλεσμα που στηρίζεται τουλάχιστον εν μέρη στην ικανότητα αυτών των συστατικών να προκαλούν απόπτωση των καρκινικών κυττάρων'

Ο Wu et al, (Wu X, και συν.,2012) τόνισαν 'τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων κανναβινοειδών CB1, CB2 ήταν αυξημένα σε ανθρώπινους ιστούς με γλοίωμα. Οι αλλαγές στα περιχόμενα της ανανδαμίδης και της 2-AG στα διαφορετικά στάδια γλοιώματος, μπορούν να τις χαρακτηρίσουν σαν πιθανούς ενδογενείς βιοδείκτες για την νευρογλοιακή κακοήθεια των ιστών'.

Ο McAllister et al, (McAllister SD, και συν., 2005) βρήκαν ότι τα κανναβινοειδή (D9-THC και WIN,55-212,2) αναστέλλουν εκλεκτικά τον πολλαπλασιασμό και προκαλούν το θάνατο των ανθρωπίνων κυττάρων πολύμορφου γλοιοβλαστώματος στην καλλιέργεια.

Ο Guzmán et al, (Guzmán M, και συν., 2006) διενήργησαν κλινική δοκιμασία με ενδοκρανιακές ενέσεις THC σε όγκους πολύμορφου γλοιοβλαστώματος, βρίσκοντας τη διαδικασία ασφαλή και τονίζοντας 'την πιθανή δράση στα καρκινικά κύτταρα'.

Ο Galanti et al (Galanti G, και συν.,2008) συμπέραναν ότι : *‘η D9-THC φαίνεται ότι επηρεάζει σημαντικά τη βιωσιμότητα των GBM κυττάρων (του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος), διαμέσω ενός μηχανισμού που φαίνεται ότι προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου, εξ’αιτίας της μειωμένης έκφρασης του E2F1 και της κυκλίνης A. Έτσι υπέθεσαν ότι η D9-THC και τα άλλα κανναβινοειδή θα έχουν μελλοντικά κλινική εφαρμογή σαν θεραπευτικά μέσα για τους όγκους του εγκεφάλου’.*

Στις ανασκοπήσεις του 2008, οι Parolaro και Massi (Parolaro D, και συν.,2008) συμπέραναν ότι: *‘τα κανναβινοειδή φαίνεται ότι είναι εκλεκτικά αντικαρκινικά συστατικά, καθώς σκοτώνουν κύτταρα γλοιώματος χωρίς να επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των μη μεταμορφωμένων ομολόγων. Μια πιλοτική κλινική μελέτη σε ασθενείς με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα επιβεβαίωσε το καλό, ασφαλές τους προφίλ, συγχρόνως και την αξιοσημείωτη αντικαρκινική τους δράση.’*

Ο Calatozzolo et al, (Calatozzolo C, και συν.,2007) τόνισαν :

‘ τον πιθανό ρόλο των κανναβινοειδών, κυρίως των CB2 αγωνιστών , που στερούνται ψυχοδραστικές παρενέργειες στη θεραπεία των γλοιοβλαστωμάτων, επειδή είναι όλα θετικά, αν και ασθενώς, στους CB2 υποδοχείς’.

Μελετώντας τα αποτελέσματα των THC και CBD στις ανθρώπινες κυτταροκαλλιέργειες γλοιοβλαστωμάτων, ο Marcu et al (Marcu JP, και συν.,2010) ανέφεραν ότι: *‘η D9-THC και η CBD έδρασαν συνεργικά στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η θεραπεία των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος με τα δυο συστατικά οδήγησε σε σημαντικές ρυθμίσεις του κυτταρικού κύκλου, στην παραγωγή αντιδραστικών ενώσεων του οξυγόνου (ROS), και σε απόπτωση, όπως επίσης και σε ειδικές ρυθμίσεις της εξωκυττάριας κινάσης (ERK) και των δραστηριοτήτων των κασπασών.*

Αυτές οι συγκεκριμένες αλλαγές δεν παρατηρήθηκαν με κάθε ένα από τα δυο συστατικά ξεχωριστά, υποδεικνύοντας ότι τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος επηρεάστηκαν από την συνδυασμένη θεραπεία κι όχι από την μεμονωμένη. Τα αποτελέσματά μας υποθέτουν ότι η προσθήκη της CBD στη D9-THC μπορεί να βελτιώσει τη συνολική αποτελεσματικότητα της D9-THC στη θεραπεία του γλοιοβλαστώματος στους ασθενείς με καρκίνο.’

Ο Petersen et al, (Petersen G, και συν., 2005) σύγκριναν τον μεταβολισμό των ενδοκανναβινοειδών σε ιστούς από δυο τύπους εγκεφαλικού καρκινώματος, με μη-καρκινικό εγκεφαλικό ιστό και συμπέραναν ότι: *‘τα αυξημένα επίπεδα της 2-AG, της*

AEA και των άλλων N-ακυλεθανολαμινών, που προσδιορίστηκαν στους δυο τύπους του εγκεφαλικού ιστού, μπορεί πιθανώς να δρουν σαν ενδογενείς αντικαρκινικοί μεσολαβητές, διεγείροντας τόσο μηχανισμούς που εξαρτώνται από υποδοχείς κανναβινοειδών, όσο και μηχανισμούς που δεν εξαρτώνται από υποδοχείς κανναβινοειδών.

Ο Rubovitch et al, (Rubovitch V, και συν., 2002) επιβεβαίωσαν τη διέγερση της πρόσληψης των ιόντων Ca^{2+} , στα κύτταρα νευροβλαστώματος, διαμέσω αγωνιστών του CB1 υποδοχέα.

Μελετώντας τους παιδιατρικούς καρκίνους, ο Ellert-Miklaszewska et al, (Ellert-Miklaszewska A, και συν., 2007) ανέφεραν ότι: *‘η έκφραση του CB2 υποδοχέα εξαρτάται πρωταρχικά από την ιστοπαθολογική προέλευση των κυττάρων με καρκίνο του εγκεφάλου και το στάδιο διαφοροποίησης, αντανακλώντας το στάδιο του καρκίνου’.*

Σε μια ανασκόπηση του 2007, οι Cudaback & Stella (Cudaback E, και συν., 2007) ανέφεραν *‘δεδομένα που υποστηρίζουν τη χρήση των κανναβινοειδών στη θεραπεία των καρκίνων του εγκεφάλου’.*

Ο Velasco et al, (Velasco G, και συν., 2007) συμπέραναν ότι: *‘τα κανναβινοειδή αναστέλλουν την αύξηση διαφορετικών τύπων καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβάνοντας κύτταρα γλοιώματος, σε ζώα του εργαστηρίου. Αυτό το επιτυγχάνουν, ρυθμίζοντας μονοπάτια-κλειδιά κυτταρικής σηματοδότησης, κυρίως την απάντηση στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ER stress), παράγοντας με τον τρόπο αυτό αντικαρκινικές δράσεις, όπως τον αποπτωτικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων και την αναστολή της αγγειογένεσης του όγκου. Είναι ενδιαφέρον, ότι τα κανναβινοειδή φαίνεται ότι είναι εκλεκτικά αντικαρκινικά συστατικά, καθώς σκοτώνουν τα κύτταρα του γλοιώματος, αλλά όχι τα μη μεταμορφωμένα αστρογλοιακά ομόλογά τους. Στην βάση αυτών των προκλινικών ευρημάτων, έγινε πρόσφατα, μια πιλοτική κλινική μελέτη της D9-THC σε ασθενείς με υποτροπιάζον πολύμορφο γλοιοβλάστωμα. Το καλό ασφαλές προφίλ της D9-THC, μαζί με την πιθανή της δράση στην αναστολή της αύξησης των καρκινικών κυττάρων, δικαιολογεί την προετοιμασία για μελλοντικές μελέτες με σκοπό την εκτίμηση της πιθανής αντικαρκινικής δράσης των κανναβινοειδών’.*

Ο Salazar et al, (Salazar M, και συν., 2009) ανέφεραν ότι: *‘η THC μπορεί να προάγει τον αυτοφαγικό θάνατο των ανθρώπινων και των μυϊκών καρκινικών κυττάρων και παρέχει δεδομένα ότι η χορήγηση των κανναβινοειδών μπορεί να είναι μια αποτελεσματική θεραπευτική στρατηγική για τη στόχευση των ανθρώπινων καρκίνων’.*

A10.2.Κανναβινοειδή και καρκίνος του προστάτη

Η παρουσία των υποδοχέων των κανναβινοειδών έγινε εμφανής στον προστατικό ιστό και στα προστατικά καρκινικά κύτταρα PC-3. Ωστόσο, φάνηκε ότι η θεραπεία των PC-3 κυττάρων με D9-THC προκάλεσε απόπτωση με έναν μη δοσοεξαρτώμενο τρόπο, (Ruiz I, και συν., 1999). Μια άλλη μελέτη από την ίδια ομάδα ερευνητών ανέφερε ότι η ενεργοποίηση των υποδοχέων στα PC-3 κύτταρα ενεργοποίησε το PI3K/Akt μονοπάτι με συνακόλουθη συμμετοχή του Raf-1/ERK1/2 και επαγωγή του αυξητικού παράγοντα των νευρών, (Nithipatikom K, και συν.,2004). Πρόσφατα βρέθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης και των δυο υποδοχέων CB1 και CB2 είναι σημαντικά υψηλότερα στα ανθρώπινα προστατικά καρκινικά κύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά προστατικά επιθηλιακά κύτταρα. Βασισμένα σε αυτήν την παρατήρηση, τα LNCaP κύτταρα επεξεργάστηκαν με WIN-55,212-2, που είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή της αύξησης του μεγέθους και επαγωγή της απόπτωσης, (Sarfaraz S, και συν., 2006), με μια διακοπή των κυττάρων στη φάση G₀-G₁ του κυτταρικού κύκλου. Αυτή η WIN-55,212-2- επαγόμενη διακοπή του κυτταρικού κύκλου σχετίστηκε με μια συνεπακόλουθη ενεργοποίηση του ERK1/2 μονοπατιού, (Sarfaraz S, και συν.,2006).

Για να καθιερωθεί η σχέση των *in vivo* με τα *in vitro* ευρήματα, αποδείχθηκε ότι στα WIN-55,212-θεραπευμένα ποντίκια με το αλλομόσχευμα CWR22Rv1, υπήρξε σημαντική μείωση στην αύξηση του όγκου, με σημαντική μείωση της έκκρισης του ειδικού προστατικού αντιγόνου στον ορό (Sarfaraz S, και συν.,2007). Ο Nithipatikom και οι συνεργάτες του, (Nithipatikom K, και συν.,2004) έδειξαν ότι η αυξημένη ενδογενής 2-AG και το σταθερό της ανάλογο noladin ανέστειλαν τη διήθηση των μη εξαρτώμενων από ανδρογόνα προστατικών καρκινικών κυττάρων PC-3 και DU-145. Τα αντιπολλαπλασιαστικά και αποπτωτικά αποτελέσματα του ενδογενούς κανναβινοειδούς ανανδαμίδη στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές LNCaP, DU145, και PC3 βρέθηκε ότι ασκούνται διαμέσω απενεργοποίησης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), και συσσώρευση της κεραμίδης (Mimeault M, και συν., 2003).

Το ανάλογο της ανανδαμίδης, η ®-μεθανανδαμίδη, φάνηκε να έχει μια μιτογόνο επίδραση στα LNCaP κύτταρα σε πολύ χαμηλές δόσεις, (Sanchez MG, και συν., 2003).

Ανασκοπήσεις:

Ο Mimeault et al, (Mimeault M, και συν., 2003) αφού μελέτησαν τον προστατικό καρκίνο ανέφεραν ότι: *‘οι πιθανές αντιπολλαπλασιαστικές και κυτταροτοξικές δράσεις της ανανδαμίδης στα μεταστατικά προστατικά καρκινικά κύτταρα, μπορεί να αποτελέσουν τη βάση για το σχεδιασμό νέων θεραπευτικών φαρμάκων, για την αποτελεσματική θεραπεία των υποτροπιάζοντων και διηθητικών προστατικών καρκίνων.’*

Ο Chung et al, (Chung SC, και συν., 2009) βρήκαν ότι η υψηλή ανοσοαπάντηση του CB1 υποδοχέα κανναβινοειδών, συσχετίζεται με τη σοβαρότητα της ασθένειας και την εξέλιξη στον προστατικό καρκίνο.

Ο Fowler et al, (Fowler CJ, και συν., 2010) σημείωσαν ότι η υψηλή έκφραση του CB1 υποδοχέα στους όγκους, κατά τη διάγνωση, συσχετίστηκε με φτωχότερη πρόγνωση.

Ο Sarfaraz et al, (Sarfaraz S, και συν., 2005) συμπέραναν ότι *‘ο WIN-55,212-2 και άλλοι αγωνιστές των υποδοχέων των κανναβινοειδών, θα μπορούσαν να αναπτυχθούν σαν νέα θεραπευτικά συστατικά για τη θεραπεία του προστατικού καρκίνου.’*

Ο Sarfaraz et al, (Sarfaraz S, και συν., 2006) αργότερα σημείωσαν ότι ο WIN-55,212-2 αγωνιστής του υποδοχέα των κανναβινοειδών, προκάλεσε απόπτωση στα ανθρώπινα προστατικά καρκινικά κύτταρα.

Ο Sreevalsan et al, (Sreevalsan S, και συν., 2011) ανέφεραν ότι η πρόκληση απόπτωσης από τα κανναβινοειδή στα προστατικά και ορθοκολικά καρκινικά κύτταρα είναι εξαρτώμενη από τη φωσφατάση.

Ο Nithipatikom et al, (Nithipatikom K, και συν., 2004) σημείωσαν ότι: *‘η κυτταρική 2-AG δρώντας διαμέσω του CB1 υποδοχέα, είναι ένας ενδογενής αναστολέας των διηθητικών προστατικών καρκινικών κυττάρων’.*

Ο Olea-Herrero (Olea-Herrero N, και συν., 2009) σημείωσε *‘τη συμμετοχή του σηματοδοτικού μονοπατιού μέσω του CB2 υποδοχέα, στην in vivo και in vitro αναστολή της αύξησης των προστατικών καρκινικών κυττάρων και υποθέτει ότι οι CB2 αγωνιστές έχουν πιθανό θεραπευτικό ενδιαφέρον και αξίζει να διερευνηθούν στην*

προσπάθεια αντιμετώπισης του προστατικού καρκίνου'. Ο ίδιος αργότερα (Olea-Herrero N, και συν., 2009) ανέφερε ότι: ' οι CB2 αγωνιστές μπορεί να προσφέρουν μια νέα προσέγγιση στη θεραπεία του προστατικού καρκίνου, μειώνοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων'.

Ο Díaz-Laviada(Diaz-Laviada I., 2011) συμπέρανε ότι: ' συσσωρευμένες αποδείξεις υποδεικνύουν ότι το ενδοκανναβινοειδές σύστημα απορυθμίζεται στον προστατικό καρκίνο, δείχνοντας ότι έχει έναν ρόλο στην ομοιοστάση του προστάτη. Η υπερέκφραση αρκετών συστατικών του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος συσχετίζεται με το στάδιο και την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη, παρέχοντας έτσι ένα νέο θεραπευτικό στόχο για τον καρκίνο του προστάτη. Επιπλέον, αρκετά κανναβινοειδή εμφανίζουν αντικαρκινικές ιδιότητες ενάντια στον καρκίνο του προστάτη, μειώνοντας τον πολλαπλασιασμό των προστατικών καρκινικών κυττάρων, και την κυτταρική μετανάστευση... οι θεραπευτικές δυνατότητες των κανναβινοειδών ενάντια στον καρκίνο του προστάτη είναι πολλά υποσχόμενες'.

A10.3.Κανναβινοειδή και καρκίνος του μαστού

Έχει δειχθεί ότι η ανανδαμίδη, αναστέλλει ισχυρά και εκλεκτικά, τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του μαστού. Αυτή η αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα της ανανδαμίδης, συνοδεύεται από μια μείωση των κυττάρων στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, και καταστολή του υποδοχέα της προλακτίνης, (Ligresti A, και συν.,2006). Ο Ligresti, ο Moriello και οι συνεργάτες τους, μελέτησαν τις αντικαρκινικές ιδιότητες πέντε φυσικών κανναβινοειδών, κανναβιδιόλη, κανναβιγερόλη, κανναβιχρωμένη, κανναβιδιόλη με καρβοξυλομάδα, και Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη και κατέληξαν στο ότι η κανναβιδιόλη είναι ο πιο ισχυρός αναστολέας της αύξησης των καρκινικών κυττάρων του μαστού.

Τόσο η κανναβιδιόλη, όσο και το εκχύλισμα εμπλουτισμένο σε κανναβιδιόλη, ανέστειλαν την αύξηση των MDA-MB-231 κυττάρων καρκινώματος μαστού στα ποντίκια χωρίς θύμο. Σε άλλη μελέτη, η @-μεθανανδαμίδη μείωσε τον αριθμό και το μέγεθος των μεταστατικών οζιδίων και αυτό το αποτέλεσμα αναστρέφονταν από τον ανταγωνιστή του CB1 υποδοχέα SR141716A.

Τα επεξεργασμένα κύτταρα με α -μεθανανδαμίδη, παρουσίασαν μειωμένη φωσφορυλίωση της εστιακής πρωτεϊνικής κινάσης σχετιζόμενης με την προσκόλληση, και της Src, καθώς και των κινασών της τυροσίνης σχετιζομένων με την μετανάστευση και προσκόλληση, υποδεικνύοντας ότι η ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα μπορεί να αντιπροσωπεύει μια καινούργια θεραπευτική στρατηγική για τον περιορισμό της αύξησης του καρκινώματος του μαστού και την αναστολή της μεταστατικής του διάχυσης *in vivo*, (Grimaldi C, και συν.,2006).

Σε αντίθεση με αυτά τα ευρήματα, ο **McKallip και οι συνεργάτες του** είχαν δείξει (με τις μελέτες τους) νωρίτερα, ότι η Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη αυξάνει το μέγεθος του καρκίνου του μαστού και την μετάσταση ειδικά στα κύτταρα που εκφράζουν χαμηλά επίπεδα υποδοχέων κανναβινοειδών, καταστέλλοντας την αντικαρκινική απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος, υποδεικνύοντας ότι η έκθεση στα κανναβινοειδή μπορεί να αυξήσει τη συχνότητα του καρκίνου του μαστού όπως και άλλων καρκίνων που δεν εκφράζουν υποδοχείς κανναβινοειδών.

Ανασκοπήσεις:

Ο Di Marzo et al, (Di Marzo V, και συν., 2001) σημείωσαν ότι: *‘η αντιπολλαπλασιαστική δράση της ανανδαμίδης στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού, ενισχύθηκε από την παλμιτοϋλαιθανολαμίδη’*.

Ο De Petrocellis et al,(De Petrocellis L, και συν., 2002) θεώρησαν ότι αυτό το αποτέλεσμα μεσολαβείται από τους CB1 και TRPV1 υποδοχείς.

Ο Grimaldi et al, (Grimaldi C, και συν., 2006) συμπέραναν ότι: *‘οι αγωνιστές του CB1 υποδοχέα αναστέλλουν τη διήθηση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων, ρυθμίζοντας τη φωσφορυλίωση του FAK και ότι η ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα μπορεί να αντιπροσωπεύει μια καινούργια θεραπευτική στρατηγική για τον περιορισμό της αύξησης του καρκινώματος του μαστού και για την αναστολή της *in vivo* μεταστατικής του διήθησης’*.

Ο Mc Allister et al, (McAllister SD, και συν., 2007) ανέφεραν ότι : *‘η CBD αποτελεί το πρώτο μη τοξικό εξωγενές συστατικό που μπορεί να μειώσει σημαντικά την έκφραση της Id-1 στα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα του μαστού, οδηγώντας σε μια μείωση της επιθετικότητας του όγκου’*.

Ο Qamri et al, (Qamri Z, και συν., 2009) μελέτησαν τον CB2 συνθετικό αγωνιστή JWH-133 και τον CB1, CB2 αγωνιστή WIN-55,212-2 στα καρκινικά κύτταρα του μαστού κι αναφέρουν : *‘τα ποντίκια που θεραπεύθηκαν με JWH-133 ή WIN-55,212-2 έδειξαν μια 40% έως 50% μείωση στην αύξηση του όγκου και μια μείωση από 65% έως 80% στην μετάσταση στον πνεύμονα. Αυτά τα αποτελέσματα αναστράφησαν από τους CB1, CB2 ανταγωνιστές AM251 και SR144528, υποδεικνύοντας πιθανή συμμετοχή των CB1, CB2 υποδοχέων. Παρατηρήσαμε ότι ο JWH-133 και ο WIN-55,212-2 ασκούν την κατασταλτική τους δράση στον καρκίνο του μαστού δια μέσω μιας συντονισμένης ρύθμισης των σηματοδοτικών μονοπατιών της κυκλοοξυγενάσης-2/προσταγλανδίνης E2 και πρόκλησης απόπτωσης. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι οι CB1, CB2 υποδοχείς θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών ενάντια στην αύξηση και μετάσταση του καρκίνου του μαστού.’*

Μελετώντας ένα μοντέλο καρκίνου του μαστού στα ποντίκια, ο Caffarel et al, (Caffarel MM, και συν., 2010) αναφέρουν ότι: *‘τόσο η D9-THC, το πιο άφθονο και ισχυρό κανναβινοειδές στην μαριχουάνα, όσο και ο JWH-133, ένας μη ψυχοδραστικός εκλεκτικός αγωνιστής του CB2 υποδοχέα, μείωσαν την αύξηση του όγκου, τον αριθμό των καρκινικών κυττάρων και την ποσότητα/σοβαρότητα των μεταστάσεων στον πνεύμονα στα MMTV-neu ποντίκια. Ιστολογικές αναλύσεις των όγκων αποκάλυψαν ότι τα κανναβινοειδή αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, προκαλούν απόπτωση και εμποδίζουν την αγγειογένεση στο όγκο.*

Η αντικαρκινική δράση των κανναβινοειδών στηρίζεται τουλάχιστον μερικά, στην αναστολή του Akt προκαρκινικού μονοπατιού. Επίσης βρέθηκε ότι το 91% των ErbB2 θετικών όγκων, εκφράζουν τον μη ψυχοδραστικό υποδοχέα κανναβινοειδών CB2...Μαζί τα δυο αυτά αποτελέσματα αποτελούν ένα δυνατό προκλινικό δεδομένο που ενισχύει τη χρήση των θεραπειών που βασίζονται στα κανναβινοειδή για τη διαχείριση των ErbB2- θετικών καρκίνων του μαστού.’

Ο Caffarel et al, (Caffarel MM, και συν., 2006) οι οποίοι βρήκαν ότι η D9-THC αναστέλλει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού, αργότερα σημείωσαν (Caffarel MM, και συν., 2008) ότι: *‘τα κανναβινοειδή ρυθμίζουν το JunD...και η ενεργοποίηση του JunD μειώνει τον πολλαπλα-*

σιασμό των καρκινικών κυττάρων, και οδηγεί σε έναν νέο στόχο για την αναστολή της προόδου του καρκίνου του μαστού.’

Ο McAllister et al, (McAllister SD, και συν., 2011) ανέφεραν ότι: ‘η CBD αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων του μαστού διαμέσω διαφορικής ρύθμισης των μονοπατιών της εξωκυττάριας ρυθμιστικής κινάσης (ERK) και των αντιδραστικών ενώσεων του οξυγόνου (ROS) και ότι και τα δυο μονοπάτια οδηγούν σε μια μείωση της έκφρασης της Id-1. Ακόμη, εμείς αποδείξαμε ότι η CBD ενεργοποιεί τον προδιαφοροποιητικό παράγοντα Id-2. Χρησιμοποιώντας ανοσο-συμβατά ποντίκια, δείξαμε ότι η θεραπεία με CBD μειώνει σημαντικά την πρωταρχική καρκινική μάζα, όπως επίσης και το μέγεθος και τον αριθμό των μεταστατικών εστιών στον πνεύμονα σε δυο μοντέλα μετάστασης. Τα δεδομένα μας υποστηρίζουν την αποτελεσματικότητα της CBD σε προκλινικά μοντέλα καρκίνου του μαστού.’

Ο Shrivastava et al, (Shrivastava A, και συν., 2011) ανέφεραν ότι: ‘ο CBD προκαλούμενος θάνατος των καρκινικών κυττάρων του μαστού, είναι ανεξάρτητος από την ενεργοποίηση υποδοχέων κανναβινοειδών και βανιλλοειδών.... Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκάλυψε μορφολογίες συνεπείς με την συνύπαρξη αυτοφαγίας και απόπτωσης... τονίζοντας την αξία της συνεχιζόμενης έρευνας γύρω από την πιθανή χρήση της CBD σαν αντινεοπλασματικό φάρμακο’.

Ωστόσο ο Takeda et al, (Takeda S, και συν., 2009) σημείωσαν ότι : ‘η THC διεγείρει την αύξηση των MCF-7 καρκινικών κυττάρων του μαστού, ρυθμίζοντας τους αναστολείς της COX-2 και την αρωματάση’.

A10.4.Κανναβινοειδή και καρκίνος του πνεύμονα

Ο Guzman και οι συνεργάτες του (Guzman M, 2003), ανέφεραν για πρώτη φορά ότι η αύξηση του μεγέθους του Lewis αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα επιβραδύνθηκε από τη χορήγηση της Δ9-τετραϋδροκανναβινόλης και βρέθηκε (από μελέτες in vitro) ότι ο υπεύθυνος μηχανισμός για αυτά τα αποτελέσματα είναι η αναστολή της σύνθεσης του DNA.

Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι συγκεντρώσεις της Δ9-τετραϋδροκανναβινόλης ανάλογες με αυτές που ανιχνεύθηκαν στον ορό ασθενών μετά από χορήγηση Δ9-τετραϋδρο-

κανναβινόλης, επιτάχυναν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα (Preet A, και συν., 2007).

Η θεραπεία της κυτταρικής σειράς NCI-H292 καρκινώματος του πνεύμονα με νανομοριακές συγκεντρώσεις της Δ9-τετραϋδροκανναβινόλης οδήγησε σε επιταχυνόμενο κυτταρικό πολλαπλασιασμό ο οποίος ήταν εξαρτώμενος από την EGFR-εξαρτώμενη ενεργοποίηση του ERK1/2, καθώς και της PKB/Akt σηματοδότησης, (Preet A, και συν., 2007).

Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η θεραπεία με Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη ανέστειλε τη φωσφορυλίωση που επάγεται από τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα του ERK1/2, της c-Jun-NH₂ κινάσης1/2, και της Akt στα A549 ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα και επίσης κατέστειλε την μετάσταση σε ποντίκια με σοβαρή ανοσοανεπάρκεια (Preet A, και συν., 2007).

Ανασκοπήσεις:

Μελετώντας καρκίνους του πνεύμονα στα ποντίκια, ο Preet et al, (Preet A, και συν., 2008) βρήκαν ότι: *‘Τα δείγματα των όγκων από πειραματόζωα θεραπευμένα με THC, αποκάλυψαν τις αντιπολλαπλασιαστικές και αντιαγγειογενετικές δράσεις της THC. Η μελέτη μας υποθέτει ότι τα κανναβινοειδή όπως η THC θα πρέπει να ερευνηθούν σαν νέα θεραπευτικά μόρια στον έλεγχο της αύξησης και μετάστασης συγκεκριμένων καρκίνων του πνεύμονα.’*

Ο Ramer et al (Ramer R, και συν., 2012) αναφέρουν ότι: *‘τα κανναβινοειδή παράγουν ICAM-1, και ως εκ τούτου βοηθούν στην παραγωγή TIMP-1 και συνεπακόλουθα μειώνουν τη διηθητικότητα των καρκινικών κυττάρων.’*

Ο Ramer et al, (Ramer R, και συν., 2010) μελετώντας τις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές καλλιέργειες του πνεύμονα σημείωσαν ότι: *‘η CBD προκαλεί μια σημαντική αναστολή της διήθησης των A549 κυττάρων, συνοδευόμενη από μια μειωμένη έκφραση και έκκριση του PAI-1. Τα αποτελέσματα της CBD στην έκκριση του PAI-1 και στη διήθηση καταστέλλονται από ανταγωνιστές των CB1 και CB2 υποδοχέων όπως επίσης και του βανιλλοειδούς υποδοχέα TRPV1. Ανασυνδυασμένο ανθρώπινο PAI-1 και PAI-1 siRNA οδήγησαν σε μια δόσοεξαρτώμενη αύξηση και ελάττωση της διηθητικότητας, υποδεικνύοντας ένα σημαντικό ρόλο του PAI-1 στη διηθητικότητα των A549 κυττάρων.’*

Ο Αθανασίου και οι συνεργάτες του (Athanasiou A, και συν., 2007) αναφέρουν ότι: *‘η μικροσκόπηση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα (H460), έδειξε ότι το ενδογενές κανναβινοειδές ανανδαμίδη (AEA), το φυτοκανναβινοειδές (THC) και ένα συνθετικό κανναβινοειδές (HU 210), όλα προκάλεσαν μορφολογικές αλλαγές χαρακτηριστικές της απόπτωσης’.*

Ο Preet et al, (Preet A, και συν., 2011) μελετώντας κυτταρικές καλλιέργειες μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα βρήκαν ότι: *‘η επεξεργασία των NSCLC κυτταρικών σειρών (A549, SW-1573) με CB1/CB2 και εκλεκτικούς αγωνιστές του CB2, τον WIN55,212-2 και JWH-015, εξασθένησε την in vitro χημειοταξία και χημειοδιηθητικότητα σε αυτά τα κύτταρα. Επίσης παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο σύμπλοκο εστιακής προσκόλλησης που παίζει σημαντικό ρόλο στην μετάσταση μετά την επεξεργασία με JWH-015, WIN55,212-2. Ακόμη προεπεξεργασία με CB1/CB2 εκλεκτικούς ανταγωνιστές, AM251 και AM630, πριν από τον JWH-015, WIN55,212-2, εξασθένησε την μεσολαβούμενη από τους αγωνιστές αναστολή της in vitro χημειοταξίας και χημειοδιήθησης.*

Επίσης και οι δυο CB1, CB2 αγωνιστές WIN55,212-2, JWH-015 ανέστειλαν σημαντικά την in vivo αύξηση και την μετάσταση του καρκίνου του πνεύμονα (~50%).

A10.5.Κανναβινοειδή και καρκίνος του δέρματος

Το μελάνωμα είναι υπεύθυνο για τον μεγαλύτερο αριθμό των θανάτων που σχετίζονται με τον καρκίνο του δέρματος παγκοσμίως. Αναφέρθηκε ότι οι CB1 και CB2 υποδοχείς εκφράζονται στο φυσιολογικό δέρμα, αλλά και στους όγκους του δέρματος των ποντικών και των ανθρώπων. Οι μελέτες in vitro, έδειξαν ότι η ενεργοποίηση των υποδοχέων των κανναβινοειδών προκάλεσε τον αποπτωτικό θάνατο των ογκογενετικών επιδερμικών κυττάρων, χωρίς να επηρεάζονται τα μη μεταλλαγμένα επιδερμικά κύτταρα. Η χορήγηση του WIN-55,212-2 ή του εκλεκτικού CB2 αγωνιστή JWH-133 φάνηκε να προκαλεί μείωση του μεγέθους των κακοήθων όγκων στα ποντίκια (Blazquez C, και συν., 2006). Άλλη μελέτη έδειξε ότι η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων μείωσε το μέγεθος του όγκου, την αγγειογένεση και την μετάσταση

του μελανώματος στα ποντίκια, και ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό, δια μέσω αναστολής του Akt μονοπατιού και υποφωσφορυλίωση του ρετινοβλαστώματος στα κύτταρα του μελανώματος.

Ανασκοπήσεις:

Σε μια μελέτη καρκίνων του δέρματος, ο Casanova et al, (Casanova ML, και συν., 2003) βρήκαν ότι: *‘σε πειράματα με κυτταροκαλλιέργειες, η φαρμακολογική ενεργοποίηση των υποδοχέων κανναβινοειδών, προκάλεσε τον αποπτωτικό θάνατο των ογκογενετικών επιδερμικών κυττάρων, ενώ η ζωτικότητα των μη μεταμορφωμένων επιδερμικών κυττάρων παρέμεινε ανεπηρέαστη. Η τοπική χορήγηση του μίγματος του CB1/CB2 αγωνιστή, WIN-55,212-2, ή του εκλεκτικού CB2 αγωνιστή JWH-133, προκάλεσε μια αξιολογούμενη αναστολή της αύξησης των κακοήθων όγκων, που δημιουργούνται από την ένεση επιδερμικών καρκινικών κυττάρων μέσα σε ποντίκια. Οι όγκοι που θεραπεύθηκαν με κανναβινοειδή εμφάνισαν έναν αυξημένο αριθμό αποπτωτικών κυττάρων. Αυτό συνοδεύτηκε από εξασθένιση της αγγείωσης του όγκου, όπως επιβεβαιώθηκε από την αλλαγμένη μορφολογία των αιμοφόρων αγγείων, και την μειωμένη έκφραση των προαγγειογενετικών παραγόντων’.*

Ο Blázquez et al (Blázquez C, και συν., 2006) ανέφεραν ότι: *‘η ενεργοποίηση των CB1, CB2 υποδοχέων, μείωσε την αύξηση, τον πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση και την μετάσταση και αύξησε την απόπτωση των μελανωμάτων στα ποντίκια’.*

Ο Zheng et al (Zheng D, και συν., 2008) τόνισαν ότι: *‘οι CB1/CB2 υποδοχείς παίζουν έναν ρόλο-κλειδί στην ανάπτυξη φλεγμονής που εξαρτάται από την UV και καρκίνο του δέρματος.’*

Ο Zhao et al, (Zhao ZG, και συν., 2010) τόνισαν ότι: *‘η υψηλή έκφραση του CB2 υποδοχέα στα πλακώδη κύτταρα του καρκινώματος, δείχνει την ύπαρξη ενός σημαντικού ρόλου του CB2 στην ογκογένεση και ανάπτυξη καρκινώματος πλακωδών κυττάρων’.*

Ο Scuderi et al, (Scuderi MR, και συν., 2011) τόνισαν τις: *‘αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις του αγωνιστή των κανναβινοειδών WIN στα ανθρώπινα κύτταρα του μελανώματος’.*

Ο Luca et al, (Luca T, και συν., 2009) τόνισαν ότι ο αγωνιστής WIN-55,212-2 του CB1/CB2 υποδοχέα, μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων του σαρκώματος Kaposi in vitro.

A10.6.Κανναβινοειδή και καρκίνος του παγκρέατος

Ο καρκίνος του παγκρέατος είναι μια από τις πιο μοιραίες μορφές καρκίνου και για αυτό αναζητούνται συνεχώς νέες τεχνικές για τη βελτίωση της πρόγνωσης αυτής της θανατηφόρας ασθένειας. Πρόσφατα φάνηκε σε μια μελέτη ότι η χορήγηση κανναβινοειδών οδηγεί σε απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του παγκρέατος διαμέσω του CB2 υποδοχέα, και ενεργοποίηση των εξαρτώμενων από την κεραμίδη p8, ATF-4 και TRB3 γονιδίων που σχετίζονται με το στρες (Carracedo A, και συν.,2006). Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι ο προκαλούμενος κυτταρικός θάνατος από τον AM251 ανταγωνιστή του CB1 υποδοχέα, στα παγκρεατικά MIAPaCa-2 κύτταρα, συνέβει με τρόπο μη εξαρτώμενο από τον υποδοχέα, (Fogli S, και συν.,2006). Αν και οι δυο μελέτες περιγράφουν αντίθετο μηχανισμό δράσης των κανναβινοειδών, και οι δυο υπογραμμίζουν τη σημασία των κανναβινοειδών για τη θεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος.

Ανασκοπήσεις:

Ο Fogli et al, μελετώντας τα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα βρήκαν ότι τα κανναβινοειδή *‘εμφανίζουν μια σημαντική κυτταροτοξική δράση , διαμέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου από υποδοχείς’*.

Ο Carracedo et al, (Carracedo A, και συν., 2006) συμπέραναν ότι : *‘τα κανναβινοειδή οδηγούν στην απόπτωση των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων, διαμέσω ενός υποδοχέα CB2 , την εξαρτώμενη από την de novo συντιθέμενη κεραμίδη , την ενεργοποίηση της p8 και από τα γονίδια ATF-4 και TRB3 που σχετίζονται με το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ER stress). Αυτά τα ευρήματα μπορεί να συνεισφέρουν για να τεθεί η βάση για μια νέα θεραπευτική προσέγγιση του παγκρεατικού καρκίνου’*.

Ο Michalski et al, (Michalski CW, και συν., 2008) ανέφεραν ότι: *‘τα κανναβινοειδή εμφανίζουν αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες σε μια ποικιλία κακοήθων όγκων, περιλαμβάνοντας το αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου (PDAC)..... αλλαγές στα επίπεδα των ενζύμων που μεταβολίζουν τα ενδοκανναβινοειδή και τους υποδοχείς των κανναβινοειδών στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα μπορεί να επηρεάσουν την πρόγνωση και την ένταση του πόνου στους ασθενείς με PDAC’.*

Ο Donadelli et al, (Donadelli M, και συν., 2011) τόνισαν ότι: *‘η συνδυασμένη θεραπεία με (gemcitabine/κανναβινοειδή), αναστέλλει σημαντικά την αύξηση των ανθρώπινων παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων, που μεταμοσχεύθηκαν σε ποντίκια, χωρίς εμφανή τοξικά αποτελέσματα’.*

A10.7.Κανναβινοειδή και λευχαιμία-λεμφώματα

Μελέτες έδειξαν ότι η έκθεση των λεμφωμάτων των ποντικιών EL-4, LSA και P815 στη D9-THC in vitro, οδήγησε σε μια σημαντική μείωση στην κυτταρική βιωσιμότητα και αύξηση στην απόπτωση και ότι τα ποντίκια με όγκο EL-4 παρουσίασαν in vivo μια σημαντική μείωση στο μέγεθος του όγκου, αύξηση στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, και τελικά αύξηση στην επιβίωση τους, (Flygare J, και συν., 2005). Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν από τον Flygare και την ομάδα του, που θεράπευσαν τα κύτταρα του λεμφώματος της οριακής ζώνης (MCL), με συνδυαστικά μόρια υποδοχέων κανναβινοειδών και βρήκαν μια μείωση στην κυτταρική βιωσιμότητα, ενώ τα κύτταρα του μάρτυρα (control) με έλλειψη CB1 δεν επηρεάστηκαν. Πρόσφατα, ο Gustafsson και η ομάδα του, (Gustafsson K, και συν., 2006), ανακοίνωσαν ότι η προκαλούμενη απόπτωση μέσω του υποδοχέα των κανναβινοειδών, επαγόμενη από την ®-μεθανανδαμίδη και WIN-55,212-2 στο λέμφωμα οριακής ζώνης σχετίστηκε με τη συσσώρευση κεραμίδης και p38. Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η στόχευση των CB1, CB2 υποδοχέων από τους αγωνιστές τους, μπορεί να έχει θεραπευτική ισχύ για τη θεραπεία του λεμφώματος.

Ανασκοπήσεις:

Ο Joseph et al, (Joseph J, και συν., 2004) ανέφεραν ότι η ανανδαμίδα αναστέλλει την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και των T λεμφοκυττάρων διαμέσω ενεργοποίησης των CB1 υποδοχέων.

Ο Piszcz et al, (Piszcz JA, και συν., 2007) βρήκαν : *‘αυθεντικά δεδομένα για την ύπαρξη υποδοχέων κανναβινοειδών στα B-λεμφοκύτταρα στους ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Οι υποδοχείς φαίνεται ότι είναι μια νέα δομή που μπορεί να τροποποιήσει την πορεία της ασθένειας και μπορεί να θεωρηθεί σαν νέος στόχος στη θεραπεία της λευχαιμίας.’*

Ο Liu et al (Liu WM, και συν., 2008) συμπέραναν ότι: *‘μια συνδυαστική προσέγγιση με THC και γνωστά κυτταροτοξικά συστατικά μπορεί να ενισχύσουν τον κυτταρικό θάνατο in vitro’.*

Ο Jia et al (Jia W, και συν., 2006) ανέφεραν ότι η D9-THC προκαλεί απόπτωση στα Τα κύτταρα λευχαιμίας Jurkat.

Ο Herrera et al, (Herrera B, και συν., 2005) θεώρησαν ότι τα δεδομένα τους *‘υποστηρίζουν έναν ρόλο για τις πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα, στην επαγόμενη από CB2 υποδοχέα απόπτωση, των ανθρώπινων κυττάρων της λευχαιμίας’.*

Ο McKallip et al, (McKallip RJ, και συν., 2006) σημείωσαν ότι: *‘έκθεση των κυττάρων λευχαιμίας στην κανναβιδιόλη οδηγεί σε μια εξαρτώμενη από τον υποδοχέα των κανναβινοειδών CB2 μείωση στην κυτταρική βιωσιμότητα και πρόκληση απόπτωσης. Επίσης η θεραπεία με CBD οδήγησε σε μια σημαντική μείωση στο βάρος του όγκου και σε μια αύξηση στους αποπτωτικούς όγκους in vivo’.*

Ωστόσο ο Joosten et al, (Joosten M, και συν., 2002) πιθανολογούν ότι μια υπεραφθονία στους CB2 υποδοχείς στα διαγονιδιακά ποντίκια, μπορεί να αυξήσει την προδιάθεση στην λευχαιμία, και ο Jorda et al (Jorda MA, και συν., 2002) συμπέραναν ότι : *‘μία κύρια λειτουργία του CB2 υποδοχέα, ο οποίος εκφράζεται σε μυελοειδή κύτταρα λευχαιμίας ή σε φυσιολογικά σπληνοκύτταρα είναι η διέγερση της μετανάστευσης’.*

Σε μια μελέτη λεμφοβλαστωμάτων, ο McKallip et al, (McKallip RJ, και συν., 2002) βρήκαν ότι: *‘τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ήταν ευαίσθητα στην απόπτωση που*

προκαλείται από την THC, HU-210, ανανδαμίδη και τον CB2 εκλεκτικό αγωνιστή JWH-015. Αυτό το αποτέλεσμα ασκείται, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω των CB2 υποδοχέων, επειδή προθεραπεία με τον CB2 ανταγωνιστή SR144528, αναστρέφει μερικώς την απόπτωση που προκαλείται από την THC. Ακόμη, επειδή οι CB2 αγωνιστές δεν έχουν ψυχοδραστικά αποτελέσματα, μπορεί να χρησιμοποιηθούν σαν καινούργια αντικαρκινικά φάρμακα για την εκλεκτική στόχευση και θάνατο όγκων ανοσολογικής προέλευσης.'

Ο Islam et al, (Islam TC, και συν., 2003) τόνισαν ότι: *'βρέθηκε υψηλή έκφραση του γονιδίου του υποδοχέα των κανναβινοειδών CB1, σε όλες τις περιπτώσεις λεμφωμάτων κυττάρων του μανδύα, που αναλύθηκαν.'*

Ο Rayman et al, (Rayman N, και συν., 2011) βρήκαν ότι η έκφραση του περιφερικού υποδοχέα κανναβινοειδούς CB2, δεν έχει καμιά επίδραση στην κλινική εξέλιξη, σε ότι αφορά τη διήθηση των λεμφωμάτων μεγάλων Β-λεμφοκυττάρων. Ο Rayman et al, (Rayman N, και συν., 2007) συμπέραναν ότι: *'η έκφραση του CB2 υποδοχέα μπορεί να μην είναι φυσιολογική στα Μη-Hodgkins λεμφώματα.'*

Ο Flygare et al, (Flygare J, και συν., 2005) συμπέραναν ότι: *'οι υποδοχείς των κανναβινοειδών μπορεί να θεωρούνται σαν πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι στο λέμφωμα των κυττάρων του μανδύα.'* Ο Gustafsson et al συμπέραναν ότι: *'η στόχευση των CB1/CB2 μπορεί να έχει θεραπευτική ισχύ για τη θεραπεία του λεμφώματος των κυττάρων του μανδύα.'*

Ο Wasik et al, (Wasik AM, και συν., 2011) τόνισαν ότι: *'στο λέμφωμα των κυττάρων του μανδύα, τα κανναβινοειδή κυρίως μειώνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προκαλούν κυτταρικό θάνατο. Η σηματοδότηση στο θάνατο έχει μερικώς χαρακτηριστεί.'*

A10.8.Κανναβιβοειδή και καρκίνοι του εντέρου.

Ανασκοπήσεις:

Μελετώντας την επίδραση αγωνιστών και ανταγωνιστών των υποδοχέων κανναβινοειδών σε διάφορους τύπους ορθοκολικών καρκινικών κυττάρων, ο Ligresti et al, (Ligresti A, και συν., 2003) βρήκαν ότι: *‘η ανανδαμίδη, η 2-AG, και ο CBR αγωνιστής HU-210, ανέστειλλαν δυναμικά τον πολλαπλασιασμό των CaCo-2 κυττάρων. Αυτό το αποτέλεσμα μπλοκάρεται από τον CB1 ανταγωνιστή SR141716A, αλλά όχι από τον CB2 ανταγωνιστή SR144528 και το ίδιο αποτέλεσμα προκαλείται από τους CB1 αλλά όχι από τους CB2 εκλεκτικούς αγωνιστές. Στα κύτταρα DLD-1, και οι δυο τύποι υποδοχέων CB1, CB2, συμμετέχουν στην αναστολή του πολλαπλασιασμού.’*

Ο Gustafsson et al, (Gustafsson SB, και συν., 2009) αφού μελέτησαν έναν αριθμό συνθετικών κανναβινοειδών στα ανθρώπινα ορθοκολικά καρκινικά κύτταρα in vitro, τόνισαν ότι : *‘τα συστατικά που εξετάστηκαν παράγουν κυτταροτοξικές, παρά αντιπολλαπλασιαστικές ενέργειες, με έναν μηχανισμό που δεν περιλαμβάνει CB υποδοχείς’.*

Ο Santoro et al, (Santoro A, και συν., 2009) ανέφεραν ότι : *‘η ένωση rimonabant (SR141716) είναι ικανή να αναστείλλει την αύξηση των ορθοκολικών καρκινικών κυττάρων σε διαφορετικά στάδια παθογένεσης του ορθοκολικού καρκίνου, προκαλώντας μιτωτική καταστροφή in vitro’.*

Ο Gazzero et al , (Gazzerro P, και συν., 2010) ανέφεραν ότι: *‘η συνδυασμένη συνεργική επίδραση της SR141716 και της oxaliplatin , βελτιώνει το μπλοκάρισμα του πολλαπλασιασμού των ορθοκολικών καρκινικών κυττάρων’.*

Ο Thapa et al, (Thapa D, και συν., 2010) βρήκαν ότι τα ανάλογα εξαϋδροκανναβινόλης, δεν είχαν χημική συγγένεια με τους υποδοχείς, αλλά ωστόσο προκάλεσαν απόπτωση στα ανθρώπινα ορθοκολικά καρκινικά κύτταρα, επίσης βρήκαν ότι ανέστειλλαν τον πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση, (Thapa D, και συν., 2011).

Ο Gustafsson et al, (Gustafsson SB, και συν., 2011) συμπέραναν ότι: *‘το επίπεδο της έκφρασης του CB1 υποδοχέα στον ορθοκολικό καρκίνο, συσχετίζεται με το στάδιο του καρκίνου με τρόπο που εξαρτάται από τον βαθμό της CpG υπερμεθυλίωσης. Ένας*

υψηλός CB_1R είναι ενδεικτικός φτωχότερης πρόγνωσης στο στάδιο II μικροδορυφορικών σταθερών όγκων των ασθενών’.

Ο Aviello et al, (Aviello G, και συν., 2012) ανέφεραν ότι : ‘η CBD μείωσε τον ACF, τους πολύποδες και τους όγκους και αντιστάθμισε τις επαγόμενες από AOM αλλαγές στη φωσφο-Akt και caspase-3. Στις ορθοκολικές κυτταρικές σειρές καρκινώματος, η CBD προστάτευσε το DNA από οξειδωτική καταστροφή, αύξησε τα επίπεδα των ενδοκανναβινοειδών και μείωσε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με τρόπο ευαίσθητο στους ανταγωνιστές των CB_1 , TRPV1, PPAR γ υποδοχέων. Συμπεραίνουμε ότι η CBD ασκεί χημειοπροστατευτική δράση in vivo και μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με διάφορους μηχανισμούς.’

Σε μια μελέτη της έκφρασης του γονιδίου του CB_1 υποδοχέα, στους ασθενείς με καρκίνο του εντέρου, ο Bedoya et al (Bedoya F, και συν., 2009) αναφέρουν ότι: ‘παρατηρήθηκε ένας μεγάλος αριθμός ασθενών με μετάλλαξη στο γονίδιο CNR1. Αυτά τα αρχικά ευρήματα, τονίζουν τη σημασία περαιτέρω ερευνών, σχετικά με τη χρήση των αναλόγων κανναβινοειδών ως συνδυαστικά μόρια υποδοχέων, για την ανάλυση πιθανών θεραπευτικών αποτελεσμάτων’.

Ο Cianchi et al, (Cianchi F, και συν., 2008) ανέφεραν ότι : ‘η ενεργοποίηση είτε του CB_1 , είτε του CB_2 υποδοχέα προκαλεί απόπτωση διαμέσω de novo σύνθεσης κεραμίδης στα ορθοκολικά καρκινικά κύτταρα’.

Ο Greenhough et al, (Greenhough A, και συν., 2007) πρότειναν ‘έναν σημαντικό ρόλο για τους CB_1 υποδοχείς και την πρωτεΐνη Bad στη ρύθμιση της απόπτωσης στα ορθοκολικά καρκινικά κύτταρα’.

Ο Patsos et al (Patsos HA, και συν., 2005) συμπέραναν ότι : ‘η ανανδαμίδη μπορεί να αποβεί ένα χρήσιμο χημειοπροστατευτικό/θεραπευτικό συστατικό για τον ορθοκολικό καρκίνο, καθώς στοχεύει κύτταρα τα οποία είναι υψηλοί εκφραστές του COX-2 και μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στην εκρίζωση των καρκινικών κυττάρων που έχουν γίνει ανθεκτικά στην απόπτωση.’

Ο Izzo et al (Izzo AA, και συν., 2008) ανέφεραν ότι : ‘η φαρμακολογική ενίσχυση των επιπέδων των κανναβινοειδών (δια μέσω αναστολής της υδρόλυσης των ενδοκανναβινοειδών) μειώνει τις προκαρκινικές αλλοιώσεις στο έντερο του ποντικού’ και τόνισαν (Izzo AA, 2007) ότι ‘τα πρόσφατα δεδομένα δίνουν έμφαση στον κρίσιμο ρόλο του CB_2 υποδοχέα σαν έναν σημαντικό στόχο ικανό να αντιμετωπίσει την υπερκινητικότητα

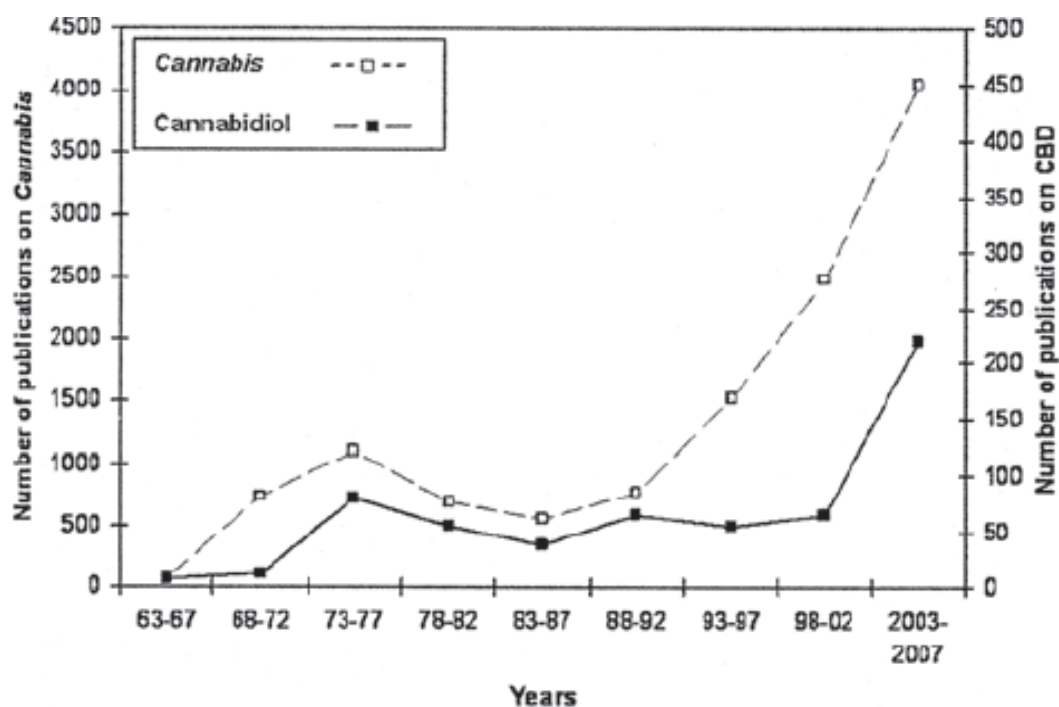
σε παθολογικές καταστάσεις, τη φλεγμονή του εντέρου και πιθανώς τον καρκίνο του εντέρου.

Ο Izzo & Camilleri (Izzo AA, και συν., 2009) τόνισαν ότι: *‘οι μελέτες στα επιθηλιακά κύτταρα έδειξαν ότι τα κανναβινοειδή εμφανίζουν αντιπολλαπλασιαστικές, αντιμεταστατικές και αντιαποπτωτικές δράσεις, όπως επίσης μειώνουν την απελευθέρωση της κυτοκίνης και προάγουν την επούλωση των πληγών. In vivo, τα κανναβινοειδή, διαμέσω άμεσης ή έμμεσης ενεργοποίησης του CB1 και/ή CB2 υποδοχέων εμφανίζουν προστατευτικές ενέργειες σε μοντέλα φλεγμονής του εντέρου και καρκίνου του εντέρου. Η φαρμακολογική αύξηση των επιπέδων των ενδοκανναβινοειδών μπορεί να είναι μια υποσχόμενη στρατηγική για την αντιμετώπιση της φλεγμονής και του καρκίνου του εντέρου.*

A11. ΚΑΝΝΑΒΙΔΙΟΛΗ (CBD)

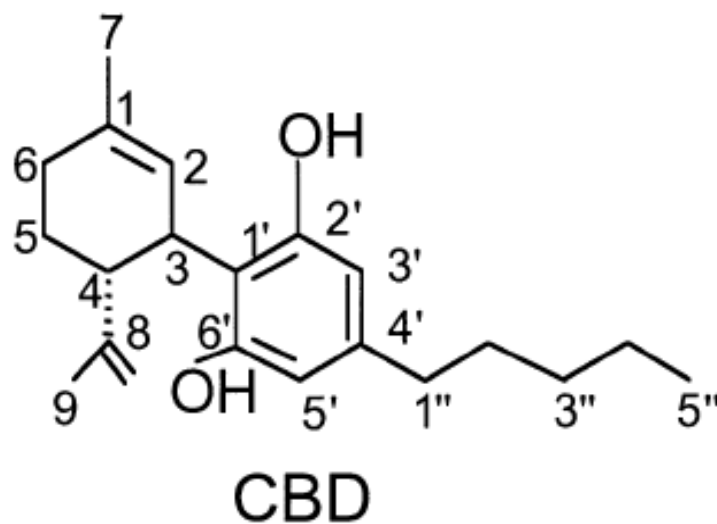
Παρόλου που η κανναβιδιόλη (CBD) απομονώθηκε από το εκχύλισμα της μαριχουάνας το 1940 από τον Adams και συν., για 25 χρόνια περίπου δεν ανακοινώθηκε κάτι επιπλέον εκτός από τον τρόπο απομόνωσής της. Μόλις το 1963 η ακριβής χημική της δομή διευκρινίσθηκε από τον Mechoulam and Shvo.

Η εξέλιξη του αριθμού των δημοσιεύσεων για την κανναβιδιόλη (CBD) από το 1963 συγκριτικά με τις δημοσιεύσεις για την κάνναβη γενικά φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



Η CBD έχει πολύ μικρή συγγένεια, (σε μικρομοριακό επίπεδο) για τον CB1 υποδοχέα και για τον CB2 υποδοχέα, και βρέθηκε ότι έχει αντισπαστική δράση σε ζωικά μοντέλα με επιληψία και σε ανθρώπους με επιληψία. Επιπλέον η CBD έχει αντισπασμωδικές, αγχολυτικές, αντι-εμετικές και αντι-ρευματοειδούς αρθρίτιδας ιδιότητες, (Mechoulam RE, και συν., 2002). Η CBD φάνηκε επίσης να είναι προστατευτική απέναντι στην τοξικότητα του N-μεθυλ-D-ασπαρτικού και του

πεπτιδίου του β-αμυλοειδούς, (Iuvone T, και συν., 2004), όπως επίσης και στην γενικευμένη αλλά και εντοπισμένη ισχαιμική βλάβη, (Braidia D, και συν., 2003). Πιο πρόσφατα, η CBD βρέθηκε ότι έχει ποικίλες πρόσθετες λειτουργίες, όπως το νευροπροστατευτικό αποτέλεσμα που προκαλείται μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με την μιτοχόνδρια-εξαρτώμενη ρύθμιση του Ca^{2+} , την αύξηση του σήματος της αδενοσίνης αναστέλλοντας την πρόσληψή της, (Carrier EJ, και συν., 2006), μπλοκάροντας ένα νέο υποδοχέα κανναβινοειδών GPR55 (Ryberg E, και συν., 2007).



Χημική δομή της κανναβιδιόλης (CBD), (Mechoulam R, και συν., 2005)

A12. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΝΝΑΒΙΔΙΟΛΗΣ (CBD)

A12.1. Αντιεπιληπτική δράση

Το 1973 μια ομάδα Βραζιλιάνων ερευνητών ανακοίνωσε ότι η CBD δρούσε μειώνοντας ή μπλοκάρωντας τις συσπάσεις που προκλήθηκαν σε πειραματόζωα με διάφορες διαδικασίες (Izquierdo I, και συν.,1973), που επιβεβαιώθηκε από μια άλλη ομάδα ένα χρόνο αργότερα (Turrkanis SA, και συν., 1974).

Η κλινική χρησιμότητα της CBD σε ότι αφορά την επιληψία είναι αβέβαιη, (Zuardi AW ,2008) αλλά αυτήν η ένωση φάνηκε ότι εξασθενεί τους σπασμούς που προκαλούνται με διάφορες διαδικασίες στα ζώα, (Mechoulam R, και συν., 2007) (Zuardi A.W.,2008) (Pertwee R.G.,2004) και ότι μειώνει τις ταλαντώσεις του Ca^{2+} κάτω από υψηλή διεγερσιμότητα σε καλλιεργημένους νευρώνες του υποκάμπου. (Ryan D, και συν.,2009). Η μοριακή βάση για την αντιεπιληπτική δράση της CBD μπορεί να αφορά μια μείωση στο $[Ca^{2+}]_i$, δια μέσω αλληλεπίδρασης με τον μιτοχονδριακό Na^{2+}/Ca^{2+} -ανταλλάκτη.

Η CBD (δια μέσω μείωσης του $[Ca^{2+}]_i$), έχει προταθεί ότι ασκεί αντιεπιληπτικές δράσεις σε πειραματικές μελέτες.

A12.2. Ηρεμιστική - αγχολυτική δράση

Στους ανθρώπους με αϋπνία οι ψηλές δόσεις της CBD (160 mg) αύξησαν τη διάρκεια του ύπνου σε σύγκριση με το placebo (Carlini EA, και συν.,1981). Ηρεμιστική δράση παρατηρήθηκε επίσης σε υγιείς εθελοντές με ψηλές δόσεις CBD (600 mg) (Zuardi AW, και συν.,1993).

Το 1974 για πρώτη φορά σε μια μελέτη αλληλεπίδρασης ανάμεσα στην CBD και στη THC από το στόμα σε υγιείς εθελοντές, φάνηκε καθαρά ότι η CBD μπορούσε να δράσει σαν αγχολυτικό φάρμακο γιατί μείωνε το άγχος και τις άλλες παρενέργειες της THC (Karniol IG, και συν.,1974).

Οι αγχολυτικές δράσεις της CBD σε υγιείς εθελοντές παρατηρήθηκαν επίσης σε μια πολύ πιο πρόσφατη έρευνα που μελετούσε τις επιδράσεις της, στην τοπική εγκεφαλική αιματική ροή με τομογραφία εκπομπής μονού φωτονίου. Επειδή η διαδικασία από μόνη της μπορεί να ερμηνευτεί σαν μια αγχογενή κατάσταση, επιτρέπει την εκτίμηση της αγχολυτικής δράσης του φαρμάκου. Η CBD προκάλεσε ένα καθαρά αγχολυτικό αποτέλεσμα (Crippa JA, και συν.,2004).

Η CBD έχει δειχθεί ότι ασκεί αγχολυτικές δράσεις, (πιθανώς δια μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα 5-HT_{1A}) και ότι διευκολύνει την εξάλειψη των συναφών αναμνήσεων του φόβου, (ίσως δια μέσω έμμεσης ενεργοποίησης των CB₁ υποδοχέων) στα τρωκτικά.

Έχουν περιγραφεί δράσεις που προκαλούν ύπνο για τη CBC και για τη CBD, αν και κεντρική χορήγηση της CBD μπορεί επίσης να έχει ιδιότητες αφύπνισης.

A12.3. Αντιψυχωσική δράση.

Η πρώτη επιβεβαίωση ότι η CBD θα μπορούσε να έχει αντιψυχωσικές δράσεις ήρθε από μια μελέτη αλληλεπίδρασης ανάμεσα στην CBD και στην Δ9-THC σε υγιείς εθελοντές που δημοσιεύθηκε το 1982 (Zuardi AW, και συν., 1982). Αυτή η μελέτη έδειξε ότι η CBD θα μπορούσε να αναστείλλει τις THC-επαγόμενες υποκειμενικές αλλαγές που μοιάζουν με συμπτώματα ψυχωσικών ασθενειών όπως: αποσυνδεδεμένες σκέψεις, απώλεια της προσωπικότητας, δυσκολία στην επικοινωνία. Σε πιο πρόσφατες έρευνες φάνηκε ότι η CBD εξασθενίζει τις παραισθήσεις που επάγονται από την ναβιλόνη, υποδεικνύοντας μια αντιψυχωσική δράση της CBD (Schneider U, και συν.,2002).

Κλινικές δοκιμές το 2006, έδειξαν ότι η συμπληρωματική θεραπεία με κανναβιδιόλη ήταν ασφαλής, καλά ανεκτή και αποτελεσματική για τη θεραπεία της ψύχωσης σε ασθενείς με ανθεκτική σχιζοφρένεια (Zuardi AW, και συν.,2006).

Το 2008, επιστήμονες μελέτησαν τα αποτελέσματα της κανναβιδιόλης σε συμπτώματα που μοιάζουν με σχιζοφρένεια, σε ανθρώπους που χρησιμοποιούν κάνναβη. Η κάννα-

βης περιέχει διάφορα κανναβινοειδή, δυο από τα οποία έχουν σχεδόν αντίθετες δράσεις: η D9-THC είναι ψυχομιμητική, ενώ η CBD έχει αντιψυχωτικές δράσεις. Στη συγκεκριμένη μελέτη, αναλύθηκαν δείγματα μαλλιών για να εξετασθούν τα επίπεδα της D9-THC και της CBD σε 140 άτομα, τα οποία χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες: ‘μόνο THC’, ‘THC+CBD’, και αυτούς που δεν είχαν κανναβινοειδή στα μαλλιά τους. Η ομάδα με ‘μόνο THC’ εμφάνισε υψηλότερα επίπεδα θετικών συμπτωμάτων που μοιάζουν με σχιζοφρένεια, συγκριτικά με τις ομάδες ‘THC+CBD’ και χωρίς κανναβινοειδή και υψηλότερα επίπεδα ψευδαισθήσεων συγκριτικά με την ομάδα χωρίς κανναβινοειδή, (Cellia J.A. Morgan και συν., 2008).

Προκαταρκτικές αναφορές απέδειξαν την αντιψυχωσική δράση της CBD σε ανθρώπινα μοντέλα με ψυχωτικά συμπτώματα που προκαλούνται σε εθελοντές και σε ψυχωτικούς ασθενείς, (Zuardi A.W., 2008). Το φαρμακολογικό προφίλ της αντιψυχωσικής δράσης της CBD, που μελετήθηκε σε ανθρώπινα μοντέλα χρησιμοποιώντας τεχνικές συμπεριφοράς και νευροχημείας, φάνηκε ότι είναι παρόμοιο με αυτό των άτυπων αντιψυχωτικών όπως η κλοζαπίνη, και διαφορετικό από αυτό των τυπικών αντιψυχωτικών, όπως η αλοπεριδόλη, εξ’ αιτίας του γεγονότος ότι συσχετίζεται με λιγότερες ανεπιθύμητες παρενέργειες όπως η καταληψία.

Η CBD είναι το μόνο φυτοκανναβινοειδές που έχει εκτιμηθεί για πιθανά αντιψυχωσικά αποτελέσματα. Πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι εμφανίζει αντιψυχωτικές δράσεις και σχετίζεται με λιγότερα δυσμενή αποτελέσματα συγκρινόμενη με τα «τυπικά αντιψυχωτικά».

A12.4. Δράση στις κινητικές διαταραχές.

Ήδη από το 1986 σε μια μελέτη (Consroe P, και συν., 1986) σε ανθρώπους με δυστονία, φάνηκε ότι η CBD είχε αντιδυστονική δράση.

Αργότερα έγιναν μελέτες σε ασθενείς με v.Huntington, με v.Parkinson, με πολλαπλή σκλήρυνση (MS) κ.ά.

Ένα μεγάλο μέρος των ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση (MS) έχει σπαστικότητα, που επιδρά δυσμενώς στην ποιότητα της ζωής τους. Πολύ πρόσφατα, επιβεβαιώθηκε

με κλινικές μελέτες, η αποτελεσματικότητα των κανναβινοειδών στη θεραπεία της σπαστικότητας των ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση, (Leussink V.I, και συν., 2012). Βασισμένο σε αυτά τα δεδομένα, ένα νέο φάρμακο το ναβιξιμόλς(Sativex) , ένα μίγμα 1:1 της Δ9-τετραϋδροκανναβινόλης και κανναβιδιόλης, εκχυλισμένο από κλώνους της Cannabis sativa, πήρε έγκριση για τη θεραπεία της σπαστικότητας που σχετίζεται με πολλαπλή σκλήρυνση (MS), σε διάφορες χώρες παγκοσμίως.

A12.5.Αντιοξειδωτική και νευροπροστατευτική δράση.

Στα τέλη του 1990 αποδείχθηκε ότι η CBD μείωσε την τοξικότητα του γλουταμινικού που μεσολαβείται από τους υποδοχείς του N-μεθυλ-D-ασπαρτικού (NMDAr) και τους υποδοχείς του 2-αμινο-3-(4-βουτυλ-3-υδροξυσοξαζόλ-5-υλ) προπιονικού οξέος (AMPA) . Η νευροπροστασία που παρατηρήθηκε από την CBD δεν επηρεάστηκε από τους ανταγωνιστές των υποδοχέων των κανναβινοειδών, υποδεικνύοντας ότι είναι ανεξάρτητη από τους υποδοχείς των κανναβινοειδών (Hampson AJ, και συν., 1998). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η τοξικότητα του γλουταμινικού μπορεί να παρεμποδισθεί από τα αντιοξειδωτικά. Σε συμφωνία με τις μελέτες αυτές η CBD μπορούσε να μειώσει την οξειδωτική βλάβη που επάγεται από το H₂O₂ το ίδιο καλά ή και καλύτερα από ότι άλλα αντιοξειδωτικά. Η CBD ήταν πιο προστατευτική απέναντι στην τοξικότητα του γλουταμινικού από ότι το ασκορβικό οξύ ή η α-τοκοφερόλη, δείχνοντας ότι αυτό το φάρμακο είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό (Hampson AJ, και συν.,1998).

Η αντιοξειδωτική δράση της CBD μπορεί να είναι υπεύθυνη για την νευροπροστασία που αναφέρθηκε σε ζώϊκά μοντέλα με ν.Parkinson (PD). Σε αυτό το μοντέλο της νόσου Parkinson, η CBD οδήγησε σε μια αύξηση των επιπέδων του m-RNA της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου Cu/Zn , ένα ένζυμο κλειδί στην ενδογενή άμυνα έναντι του οξειδωτικού στρες. Το συμπέρασμα ήταν ότι οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της CBD μπορούν να παρέχουν νευροπροστασία απέναντι στην επιθετική αποικοδό-

μηση των ντοπαμινεργικών νευρώνων που συμβαίνει στην νόσο Parkinson. (Garcia-Arencibia M, και συν., 2007).

Περίληπτικά, η CBD πιθανώς εξ' αιτίας των αντιοξειδωτικών της ιδιοτήτων και του ελέγχου που ασκεί στην ομοιόσταση του Ca^{2+} , ασκεί θετικές επιδράσεις σε ένα μεγάλο εύρος παθοφυσιολογικών διαδικασιών που εμπλέκονται στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Η CBD είναι ακόμη αποτελεσματική σε πειραματικά μοντέλα με AD, PD και HD, (Izzo A, και συν., 2009).

A12.6. Αντιφλεγμονώδη δράση.

Η CBD αποδείχθηκε αποτελεσματική σε χρόνιες νευροπαθικές οδυνηρές καταστάσεις σε ποντίκια, μειώνοντας την υπεραλγησία σε μηχανικά ερεθίσματα. Αυτό το αποτέλεσμα παρεμποδίσθηκε από τον ανταγωνιστή του vanilloid υποδοχέα καψαζεπίνη, αλλά όχι από τους ανταγωνιστές των υποδοχέων των κανναβινοειδών (Costa B, και συν., 2007). Σε αυτά τα μοντέλα της φλεγμονής παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα της προσταγλανδίνης E2 του πλάσματος (PGE2), της δραστηριότητας της ιστικής κυκλοοξυγενάσης (COX), και παραγωγή νιτρικού οξειδίου (NO) (Costa B, και συν., 2004). Οι κατασταλτικές επιδράσεις της CBD στις απαντήσεις της κυτταρικής ανοσίας και στην παραγωγή των προφλεγμονωδών μεσολαβητών δείχνουν τη χρησιμότητά της σε διάφορες φλεγμονώδεις ασθένειες, π.χ. ρευματοειδής αρθρίτιδα.

Περίληπτικά, η CBD ασκεί αντι-αρθριτικές δράσεις διαμέσω ενός συνδυασμού ανοσοκατασταλτικών και αντιφλεγμονωδών δράσεων. Η CBD μπορεί να ασκήσει προστατευτικές δράσεις και σε άλλες φλεγμονώδεις καταστάσεις (π.χ. ψωρίαση και φλεγμονή του εντέρου). Η αντιφλεγμονώδης δράση της CBD απαιτεί περαιτέρω έρευνα.

A12.7. Δράση στο διαβήτη

Η ισχυρή αντιφλεγμονώδης δράση της CBD με μείωση της παραγωγής κυτταροκινών (IFN- γ και TNF- α) και αναστολή του πολλαπλασιασμού των T κυττάρων που παρατηρήθηκε στην πειραματική αρθρίτιδα (Malfait AM, και συν., 2000), οδήγησε στη διερεύνηση πιθανών επιδράσεων της CBD και σε άλλες αυτοάνοσες ασθένειες (Mechoulam R, και συν., 2007), όπως ο διαβήτης μελιταίος τύπου I (ινσουλινοεξαρτώμενος). Έτσι, η ομάδα του Mechoulam μελέτησε τη δράση της CBD σε μη παχύσαρκα διαβητικά ποντίκια (NOD). Βρήκαν ότι η θεραπεία με CBD των NOD ποντικών πριν την ανάπτυξη της ασθένειας μείωσε την εμφάνισή της από 86% στα μη θεραπευμένα ποντίκια στο 30% στα CBD-θεραπευμένα ποντίκια. Η θεραπεία με CBD επίσης είχε σαν αποτέλεσμα μια σημαντική μείωση στα επίπεδα του πλάσματος των προφλεγμονωδών κυττοκινών, IFN- γ και TNF- α (Weiss L, και συν., 2006). Περιληπτικά, η CBD ασκεί ωφέλιμες δράσεις ενάντια στο διαβήτη και σε κάποιες από τις επιπλοκές του (π.χ. καταστροφή αμφιβληστροειδούς). Οι αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και νευροπροστατευτικές δράσεις της CBD μπορεί να συνεισφέρουν σε αυτές τις προστατευτικές ενέργειες.

A12.8. Αντιεμετική δράση.

Η θεραπεία της ναυτίας και του εμέτου που σχετίζονται με τη χημειοθεραπεία ήταν μία από τις πρώτες θεραπευτικές χρήσεις της κάνναβης και των κανναβινοειδών που αξιολογήθηκε με κλινικές δοκιμασίες. Αν και η αντιεμετική δράση σχετίστηκε με την Δ 9-τετραϋδροκανναβινόλη, αρκετοί εθελοντές ισχυρίστηκαν ότι η μαριχουάνα καταστέλλει την ναυτία πιο αποτελεσματικά από την Δ 9-THC που λαμβάνεται από το στόμα (Grinspoon L, και συν., 1997). Μια παρόμοια μελέτη που υποστηρίζει την αντιεμετική δράση της CBD έγινε σε ποντίκια το 2008 (Rock EM, και συν., 2008).

A12.9. Αντικαρκινική δράση

Το 2000 ανανεώθηκε το ενδιαφέρον σε ότι αφορά την **CBD** σαν πιθανό αντικαρκινικό φάρμακο με μια μελέτη της επίδρασής της **στα κύτταρα του γλοιώματος (πολύ επιθετικός καρκίνος του εγκεφάλου)**. Σε αυτήν την μελέτη η CBD προκαλούσε μια μέτρια μείωση στην κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων C6 του γλοιώματος ποντικού, μόνον μετά από 6 μέρες επώασης με το φάρμακο (Jacobsson SO, και συν., 2000). Μια παραπέρα μελέτη έδειξε ότι η CBD, in vitro, προκάλεσε μια δόσοεξαρτώμενη αναστολή στη βιωσιμότητα των κυττάρων του γλοιώματος που ήταν εμφανής μόλις 24 ώρες μετά την έκθεση σε CBD και ανέστειλε σημαντικά την αύξηση των υποδορίως εμφυτευόμενων ανθρωπίνων κυττάρων του γλοιώματος στα ποντίκια. Οι ερευνητές έδειξαν για πρώτη φορά ότι οι αντιπολλαπλασιαστικές επιδράσεις της CBD σχετίστηκαν **με επαγωγή της απόπτωσης**, όπως επιβεβαιώθηκε με κυτταροφθορισμομετρική ανάλυση και χρώση της μονής έλικας του DNA, που δεν ήταν αναστρέψιμη με ανταγωνιστές των υποδοχέων των κανναβινοειδών (CB1, CB2) και βανιλλοειδών (TRPV1), (Massi P, και συν., 2004).

Ακόμη, η CBD ανέστειλε την μετάσταση των U87 ανθρωπίνων κυττάρων του γλοιώματος in vitro και αυτή η δράση δεν ανταγωνιζόταν από τους εκλεκτικούς ανταγωνιστές των CB1, CB2 υποδοχέων (Vaccani A, και συν., 2005).

Η CBD επίσης προκάλεσε απόπτωση **στα ανθρώπινα κύτταρα της μυελοβλαστικής λευχαιμίας** (McKallip RJ, και συν., 2006).

Μια μελέτη της επίδρασης διαφορετικών κανναβινοειδών σε οκτώ καρκινικές κυτταρικές σειρές in vitro, υπέδειξε ότι από τα πέντε φυσικά συστατικά που εξετάστηκαν, η CBD ήταν ο πιο ισχυρός αναστολέας της αύξησης των καρκινικών κυττάρων (Ligresti A, και συν., 2006).

Ένας αναστολέας των βασικών μεταγραφικών παραγόντων, με δομή έλικα-στροφή-έλικα (**Id1**), αποδείχθηκε πρόσφατα ότι είναι το κλειδί-ρυθμιστής του **μεταστατικού καρκίνου του μαστού** και άλλων καρκίνων. Η CBD μπορούσε να περιορίσει την έκφραση της πρωτεΐνης Id-1 στα επιθετικά ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα και οι

αποτελεσματικές συγκεντρώσεις της CBD ώστε να αναστείλλει την έκφραση της Id-1 σχετίστηκαν με αυτές που χρησιμοποιούνται για να αναστείλλουν τον πολλαπλασιαστικό και διηθητικό φαινότυπο στα καρκινικά κύτταρα του μαστού (McAllister SD, και συν., 2007).

Σε άλλες μελέτες βρέθηκε ότι η CBD αναστέλλει την επιβίωση τόσο των οιστρογόνο-ευαίσθητων (MCF-7), όσο και των μη οιστρογόνο-ευαίσθητων (MDA-MB-231) καρκινικών κυτταρικών σειρών του μαστού και προκαλεί απόπτωση με έναν δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (Ligresti A, και συν., 2006), (McAllister SD, και συν., 2007).

Πολλά κανναβινοειδή ασκούν τις δράσεις τους συνδεδεμένα στους υποδοχείς CB1, CB2 ή στον υποδοχέα βανιλλοειδών (TRPV1). Ωστόσο πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η CBD επάγει προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ανεξάρτητα από αυτούς τους υποδοχείς (Guzman M, 2003), (Qin N, και συν., 2008).

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (**ER stress**), παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόκληση αυτοφαγίας σαν ανταπόκριση σε διάφορους στρεσογόνους κυτταρικούς παράγοντες. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η θεραπεία των MDA-MB-231 (καρκινικών κυττάρων του μαστού) με CBD οδήγησε σε εκροή Ca^{2+} , ένα σύνηθες φυσιολογικό αποτέλεσμα του ER stress (Ligresti A, και συν., 2006). Πρόσφατες μελέτες συνάγουν στο συμπέρασμα ότι το ER stress μπορεί να εισάγει αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο (Health-Engel HM, και συν., 2008).

Η πρωτεΐνη **AKT** είναι ένας δείκτης επιβίωσης και η μειωμένη φωσφορυλίωσή της προηγείται της επαγωγής τόσο της αυτοφαγίας όσο και της απόπτωσης, στα MDA-MB-231 κύτταρα, μετά από την επίδραση της CBD (Rosen N, She QB, 2006).

Η Annexin V, πρωτεϊνικός δείκτης απόπτωσης παρουσιάζει αύξηση 16-24 ώρες μετά την επίδραση της CBD.

Η απόπτωση μπορεί να προκληθεί είτε από το εσωτερικό μονοπάτι (μέσω των μιτοχονδρίων) είτε από το εξωτερικό μονοπάτι (σηματοδότηση από υποδοχείς θανάτου στην κυτταρική επιφάνεια), (Green DR, 2000), (Thorburn A, 2004). Βρέθηκε ότι η CBD προκαλεί την ενεργοποίηση της κασπάσης-8, τη γένεση και μετατόπιση του t-Bid στα μιτοχόνδρια, την απελευθέρωση του κυττοχρώματος c και SMAC μέσα στο κυτταρόπλασμα (Ashutosh Shrivastava, και συν., 2011).

Πρόσφατες δημοσιεύσεις δείχνουν ότι οι αντιδραστικές ενώσεις του οξυγόνου (**ROS**, όπως το O_2^- και το H_2O_2) παίζουν κεντρικό ρόλο στον CBD-επαγόμενο θάνατο των κυττάρων του γλοιώματος και της λευχαιμίας (Massi P, και συν., 2004), (McKallip RJ, και συν., 2006).

Άλλες πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η αυξημένη παραγωγή αντιδραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS) ,εξαιτίας ελαττωμένης μιτοχονδριακής λειτουργίας, συνεισφέρει στην CBD-επαγόμενη απόπτωση και αυτοφαγία στα MDA-MB-231 κύτταρα, η οποία περιορίζεται σημαντικά παρουσία της αντιοξειδωτικής ένωσης α-τοκοφερόλης (Chen Y, Gibson SB, 2008).

Πολύ πρόσφατα, από μια μελέτη φάνηκε ότι η CBD αναστέλλει τη διήθηση και μετάσταση **των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα**, μειώνοντας την δραστηριότητα και έκφραση **της μεταλλοπρωτεϊνάσης 2**, ένα πρωτεϊνολυτικό ένζυμο που επιτρέπει τη διάσπαση του ιστού και την αναδιαμόρφωση, κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης και μετάστασης, (Donald I. Abrams, και συν., 2009), (Ramer R, και συν., 2012).

Σε άλλη μελέτη, εξετάστηκε η συμμετοχή του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1 (**PAI-1**), στην αντιδιηθητική δράση της κανναβιδιόλης, ένα μη ψυχοδραστικό κανναβινοειδές. Η CBD ανέστειλε σημαντικά τη διήθηση **των A549 κυττάρων**,(μη μικροκυτταρικών καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα) η οποία συνοδεύτηκε από μια μειωμένη έκφραση και έκκριση του PAI-1. Τα αποτελέσματα της CBD στην έκκριση του PAI-1 και στη διήθηση, κατεστάλησαν από τους ανταγωνιστές των CB1, CB2 υποδοχέων όπως και του υποδοχέα TRPV1.

Ανασυνδυασμένο ανθρώπινο PAI-1 και PAI-1 siRNA, οδήγησαν σε μια δόσοεξαρτώμενη ενεργοποίηση και απενεργοποίηση αντίστοιχα της διήθησης, υποδεικνύοντας ένα κρίσιμο ρόλο του PAI-1 στη διηθητικότητα των A549 κυττάρων, (Ramer R, Rohde A, και συν., 2010).

Ο καρκίνος του εντέρου, προσβάλλει εκατομμύρια ανθρώπους στις δυτικές κοινωνίες. Η κανναβιδιόλη, ένα ασφαλές και μη ψυχοδραστικό συστατικό της Cannabis sativa, γνωστή για τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις της, μελετήθηκε για τα χημειοπροστατευτικά αποτελέσματα στο μοντέλο του καρκίνου του εντέρου που επάγεται από **την αζοξυμεθάνη (AOM)** στα ποντίκια. Η θεραπεία με AOM

συσχετίστηκε με έκτοπες αδενικές κύστεις (ACF, προνεοπλασματικές αλλοιώσεις), πολύποδες και δημιουργία όγκου, ενεργοποίηση της φωσφορυλιωμένης-Akt, iNOS και COX-2 και απενεργοποίηση της κασπάσης-3. Η κανναβιδιόλη μείωσε τις ACF, τους πολύποδες και τους όγκους, και αντέδρασε στις επαγόμενες αλλαγές από την αζοξυμεθάνη στη φωσφορυλιωμένη Akt και κασπάση-3. Στις κυτταρικές σειρές **του ορθοκολικού καρκινώματος**, η κανναβιδιόλη προστάτευε το DNA από οξειδωτική βλάβη, αυξημένα επίπεδα ενδοκανναβινοειδών και μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό με εξαρτώμενο τρόπο από τους CB1 και TRPV1 ανταγωνιστές, (Aviello G, και συν., 2012).

Περίληπτικά, τα φυτοκανναβινοειδή CBD, CBG, CBC, έχουν δείξει ενδιαφέρουσες προαποπτωτικές ιδιότητες στις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Το πιο μελετημένο φυτοκανναβινοειδές είναι η CBD. Η CBD προκαλεί αυξήσεις στο $[Ca^{2+}]_i$, έτσι διεγείρει την παραγωγή ROS, και προκαλεί απόπτωση. In vivo, η CBD αναστέλλει κυρίως την αύξηση του γλοιώματος και το πειραματικό καρκίνωμα του μαστού.

B. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί η πιθανή αντικαρκινική δράση των φυτικών, μη ψυχοδραστικών κανναβινοειδών, της κανναβιδιόλης (CBD), αλλά και της κανναβινόλης (CBN), σε δυο ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, την A549 (από μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα), και την MRC-5 (από φυσιολογικό πνευμονικό ιστό, η εν λόγω κυτταρική σειρά έχει ‘αθανατοποιηθεί’ στο εργαστήριο) χρησιμοποιώντας τις ευρέως διαδεδομένες χρωματομετρικές δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας και κυτταρικού πολλαπλασιασμού, MTT και SRB.

Γ. ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ

Γ.1. Βιολογικά υλικά

Χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα A549 (από μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα). Η κυτταρική σειρά A549 παραχωρήθηκε από το εργαστήριο Κυτταροκαλιεργειών, Μοριακού Modeling και Σχεδιασμού Φαρμάκων, του Συμεωνίδειου Ερευνητικού Κέντρου του «Θεαγενείου» Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης. Παραχωρήθηκαν επίσης από το ίδιο εργαστήριο και κύτταρα MRC-5, από ανθρώπινο φυσιολογικό πνεύμονα, αλλά ‘αθανατοποιημένα’.

Μια ανασκόπηση, σχετικά με τις δυο κυτταρικές σειρές:

Τα κύτταρα A549 είναι επιθηλιακά κύτταρα, ανθρώπινου κυψελιδικού αδενοκαρκινώματος, (Giard DJ, και συν.,1973). Η κυτταρική σειρά A549, απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1972, από τον D.J.Giardet και τους συνεργάτες του, μετά από καλλιέργεια καρκινικού πνευμονικού ιστού, από τον εκριζωθέν όγκο ενός 58 ετών Καυκάσιου άνδρα.

Στην φυσική τους μορφή, αυτά τα κύτταρα είναι πλακώδη και είναι υπεύθυνα για τη διάχυση κάποιων ενώσεων, όπως το νερό και οι ηλεκτρολύτες κατά μήκος των κυψελίδων των πνευμόνων.

Εάν τα A549 κύτταρα καλλιεργηθούν *in vitro*, μεγαλώνουν σε μια στοιβάδα, προσκολλημένα στη φλάσκα καλλιέργειας. Η ανθρώπινη κυψελιδική επιθηλιακή κυτταρική σειρά A549, μπορεί να εναιωρηθεί σε διάλυμα *in vitro*.

Άλλο χαρακτηριστικό αυτών των κυττάρων, είναι ότι είναι ικανά να συνθέσουν λεκιθίνη και περιέχουν υψηλά επίπεδα μη κορεσμένων λιπαρών οξέων, που είναι σημαντικά για τη διατήρηση της φωσφολιποειδικής στοιβάδας των κυττάρων.

Η A549 κυτταρική σειρά, χρησιμοποιείται ευρέως *in vitro*, για την μελέτη του μεταβολισμού των φαρμάκων κτλ.

Τα κύτταρα MRC-5, είναι κύτταρα από ανθρώπινο εμβρυϊκό πνεύμονα.

Απομονώθηκαν για πρώτη φορά από φυσιολογικό πνευμονικό ιστό ενός 14 εβδομάδων άρρενος εμβρύου (μετά από έκτρωση της μητέρας του για ψυχιατρικούς λόγους), το Σεπτέμβριο του 1966.

Τα κύτταρα διαιρούνται 60-70 φορές περίπου, πριν γεράσουν και πεθάνουν (δευτερεύοντα κύτταρα, secondary cells). Τα κύτταρα MRC-5, που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, είναι 'αθανатоποιημένα'.

Τα κύτταρα είναι προσκολλημένα (adherent) στις φλάσκες καλλιέργειας, αλλά μπορούν να εναιωρηθούν σε διάλυμα in vitro

Γ.2.Υλικά κυτταρικών καλλιεργειών.

Για τις κυτταρικές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα υλικά και αντιδραστήρια:

1. Υλικό καλλιέργειας DMEM 1X (Dulbecco's Modified Eagle Medium με L-γλουταμίνη, C Gibco IBRL, USA, 41966029).
2. Μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης, στρεπτομυκίνης, και βόειος εμβρυϊκός ορός FBS (Fetal Bovine Serum-E.U. approved Gibco BRL, 10106-169).
3. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS 10X, pH=7,2, Gibco BRL, 70013-016).
4. Διάλυμα Trypan Blue 0,4% (Sigma-Aldrich, Inc, Saint Louis Missouri, USA, T8154).

Όλα τα αναλώσιμα των κυτταρικών καλλιεργειών (τρυβλία καλλιέργειας, φλάσκες, τρυβλία πολλαπλών πηγαδιών, σωλήνες φυγοκέντρωσης, πιπέτες, αντικειμενοφόρες πλάκες, μικρά σωληνάκια κ.ά.), προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Corning (Inc, N.Y., U.S.A.) και VWR Int. (Inc, West Chester, U.S.A.).

Γ.2.1.Τεχνική παρασκευής πλήρους θρεπτικού μέσου κυττάρων, (GM).

- 1). Αρχικά προστίθεται 5ml αντιβιοτικό, μέσα στο μπουκάλι D-MEM των 500 ml.
- 2). Μετά από ήπια ανάδευση, αφαιρούνται 50ml από το μίγμα, σε ένα μικρό αποστειρωμένο σωληνάριο (falcon) των 15ml.
- 3). Προσθέτονται 50ml ορού FBS (στο DMEM + αντιβιοτικό).

Γ.2.2.Τεχνική ψύξης των κυττάρων .

Πραγματοποιείται αποκόλληση των κυττάρων με την επίδραση τρυψίνης/EDTA και φυγοκέντρωση για 3 λεπτά, στους 25°C, στα 1100 στροφές ανά λεπτό.

- 1). Αφαιρείται το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο.
- 2). Γίνεται ανασύσταση του ιζήματος των κυττάρων σε D-MEM + DMSO 10% .
Η τελική συγκέντρωση του DMSO είναι 10% και χρησιμοποιείται προκειμένου να αμβλυνθεί η διαδικασία δημιουργίας κρυστάλλων νερού στο εσωτερικό των κυττάρων.
- 3). Το εναιώρημα αυτό μεταφέρεται σε σωληνάριο ειδικό για την ψύξη των κυττάρων (cryovial), στο οποίο αναγράφεται ο κυτταρικός τύπος, ο κλώνος και η ημερομηνία ψύξης.
- 4). Το σωληνάριο με το εναιώρημα των κυττάρων και το DMSO τοποθετείται άμεσα για 12-36 ώρες σε υποδοχή ενός δοχείου ψύξης κυττάρων που περιέχει παγωμένη ισοπροπανόλη και βρίσκεται στους -80° C. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας των κυττάρων (περίπου 1°C ανά ώρα), με αποτέλεσμα την μεγαλύτερη βιωσιμότητά τους.
- 5). Μετά την πάροδο του χρόνου αυτού, το σωληνάριο τοποθετείται και φυλάσσεται σε συγκεκριμένη θέση στο δοχείο του υγρού αζώτου.

Γ.2.3.Τεχνική απόψυξης των κυττάρων.

Αφαίρεση των κυτταρικών σειρών A549 και MRC-5 από το υγρό άζωτο και απόψυξή τους .

- 1). Προσθέτονται από 10 ml πλήρες θρεπτικό μέσο (D-MEM + FBS + PS) σε ένα σωληνάριο (falcon) των 15 ml και σε ένα τρυβλίο (plate) των 100 mm για κάθε κυτταρική σειρά και τοποθετούνται για 20 λεπτά στον κλίβανο, στους 37° C, για να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου (επειδή βρίσκονταν στο ψυγείο, στους 4° C).
- 2). Το κρυοφιαλίδιο (cryovial, με τα κύτταρα +DMSO) , μεταφέρεται στο θάλαμο νηματικής ροής, και το περιοχόμενό του (με τη βοήθεια πιπέτας και λίγου θρεπτικού μέσου), χύνεται μέσα στο 15/άρι falcon .
- 3). Γίνεται φυγοκέντρωση σε χαμηλές στροφές (700 στροφές για 2 λεπτά) και στη συνέχεια απόχυση του υπερκειμένου (μαζί με τα νεκρά κύτταρα).
- 4). Γίνεται επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων με 1ml πλήρους θρεπτικού μέσου, μεταφορά στο τρυβλίο (plate) και ήπια ανακίνηση με σταυροειδή κίνηση του plate.
- 5). Επώση στον κλίβανο, στους 37°C, με υγρασία και 5% CO₂.

Γ.2.4.Τεχνική ανακαλλιέργειας των κυττάρων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα A549 και ‘αθανατοποιημένα’ κύτταρα πνεύμονα MRC-5. Για τα κύτταρα, ισχύει η ακόλουθη πειραματική πορεία ανακαλλιέργειας.

- 1). Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει τουλάχιστον το 80% της επιφάνειας του τρυβλίου στο οποίο ανακαλλιεργούνται. Ο προσδιορισμός του βαθμού κάλυψης γίνεται με παρατήρηση του τρυβλίου στο μικροσκόπιο. Κύτταρα υγιή θεωρούνται αυτά που είναι προσκολλημένα στον πυθμένα του τρυβλίου.
- 2). Μεταφορά του τρυβλίου με τα κύτταρα σε θάλαμο νηματικής ροής, όπου είναι δυνατή η εργασία υπό στείρες συνθήκες. Αναρρόφηση υπό κενό του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας και ξέπλυμα των κυττάρων μια έως δυο φορές με PBS(1X).

Με τη διαδικασία αυτή απομακρύνονται τυχόν εναπομείναντα ίχνη ορού τα οποία περιέχουν αναστολείς της τρυψίνης.

- 3). Προσθήκη 1ml έως 2ml τρυψίνης, ανά τρυβλίο (plate) των 100mm.
- 4). Επώαση στον κλίβανο στους 37°C , με υγρασία και 5% CO₂ , για 5 λεπτά (έως 7 λεπτά). Η επιβίωση των κυττάρων κινδυνεύει σε περίπτωση παραμονής τους πλέον των 10 λεπτών στην τρυψίνη.
- 5). Κατά τη διάρκεια της επώασης γίνεται προσθήκη από 10 ml πλήρες θρεπτικού μέσου σε δυο νέα τρυβλία στα οποία αναγράφεται ο κυτταρικός τύπος, ο κλώνος και η ημερομηνία της ανακαλλιέργειας.
- 6). Μετά το πέρας των 5 λεπτών, παρατήρηση του τρυβλίου στο μικροσκόπιο (10X). Εφ'όσον τα κύτταρα αποκολλήθηκαν, είναι στρογγυλά και κινούνται.
- 7). Μεταφορά του εναιωρήματος των κυττάρων σε αποστειρωμένο σωλήνα των 15 ml. Προσθήκη PBS (1X) και συλλογή των κυττάρων που έχουν εναπομείνει στο τρυβλίο. Φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στους 25°C στις 1100 στροφές ανά λεπτό.
- 8). Απομάκρυνση του υπερκείμενου, δηλαδή της τρυψίνης και ανασύσταση του ιζήματος με 1ml PBS. Η επαναιώρηση των κυττάρων γίνεται με τη βοήθεια πιπέτας.
- 9). Με πιπέτα, λαμβάνεται μικρή ποσότητα από το εναιώρημα, π.χ. 100 μl και μοιράζεται στα δυο νέα τρυβλία που έχουν ήδη ετοιμαστεί, τα οποία τοποθετούνται στη συνέχεια στον κλίβανο για επώαση.

Γ.2.5. Τεχνική μέτρησης κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.

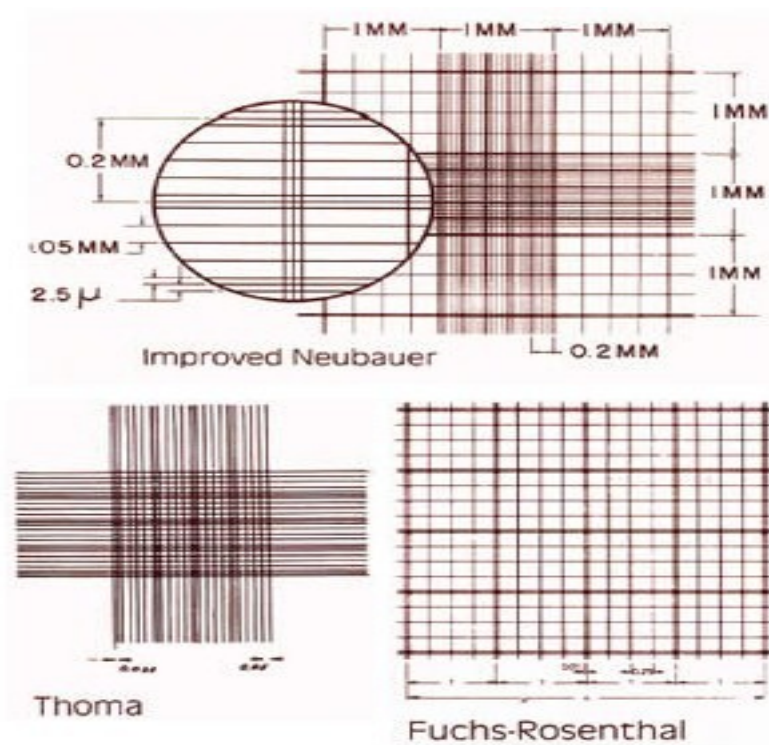
Για τον προσδιορισμό του ρυθμού της κυτταρικής ανάπτυξης των A549, και MRC-5 στις καλλιέργειες, γίνεται μέτρηση του αριθμού των κυττάρων ανά μονάδα όγκου, (ml), θρεπτικού υγρού.

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων γίνεται με την μέθοδο του αιμοκυτταρομέτρου (Neubauer) κάτω από το μικροσκόπιο (100X), (American Optical Corp., USA) ώστε να προσδιορίζεται η συγκέντρωση της καλλιέργειας σε κύτταρα/ml.

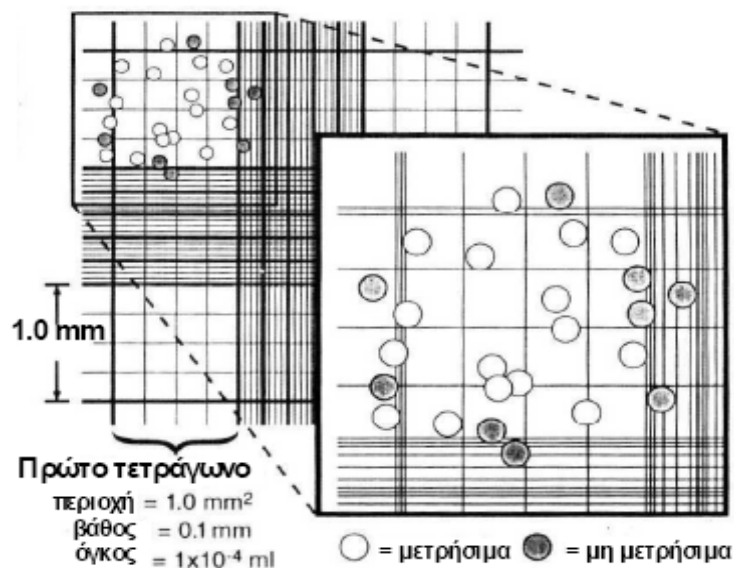
Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την μέτρηση των κυττάρων είναι αιμοκυτταρόμετρο, (πλάκα Neubauer), και καλυπτρίδες, (Thomas).

Τοποθετείται μια σταγόνα κυττάρων στην ειδική εσοχή κάτω από την καλυπτρίδα στο αιμοκυτταρόμετρο. Όπως φαίνεται **(στην εικόνα 14)** η περιοχή με τις γραμμώσεις στο αιμοκυτταρόμετρο διαιρείται σε 9 μεγάλα τετράγωνα με πλευρά 1mm το καθένα. Το κεντρικό μεγάλο τετράγωνο υποδιαιρείται σε άλλα 25 τετράγωνα μετρίου μεγέθους και το καθένα από αυτά υποδιαιρείται σε άλλα 16 μικρά τετράγωνα. Τα μικρά τετράγωνα έχουν πλευρά 1/20 mm και ο χώρος της πλάκας μέτρησης έχει βάθος 1/10 mm.

Μετρώντας τα κύτταρα προτιμώνται τα τέσσερα γωνιακά όπως φαίνεται στο σχήμα. Πολλαπλασιάζεται ο ολικός αριθμός κυττάρων επί 10000. Ο αριθμός αυτός δίνει τον αριθμό των κυττάρων σε κάθε κυβικό χιλιοστόμετρο της καλλιέργειας.



Εικόνα 14,α: Σχηματική αναπαράσταση του αιμοκυτταρομέτρου Neubauer.



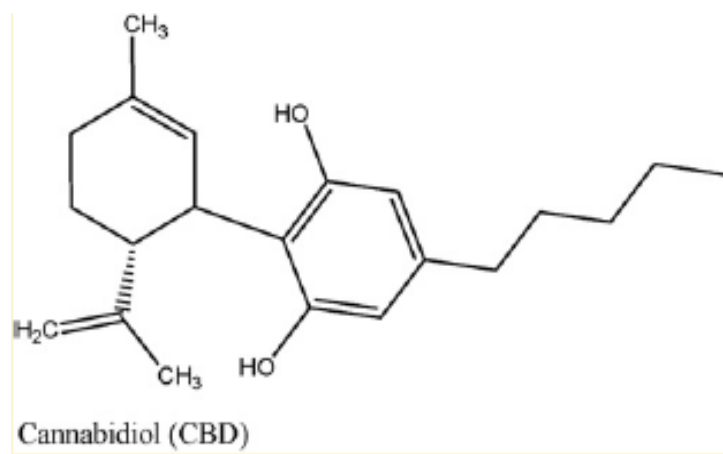
Εικόνα 14,β: Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Παρουσιάζεται σχηματικά και ο τρόπος υπολογισμού των κυττάρων.

Γ.3. Χημικά αντιδραστήρια

Γ.3.1. Φάρμακα.

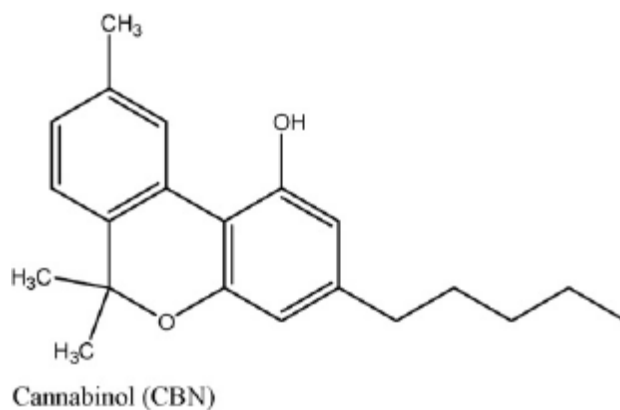
Τα φάρμακα, κανναβιδιόλη (CBD, -90899-, δάλυμα κανναβιδιόλης 10mg/ml σε αιθανόλη) και κανναβινόλη [CBN , -C6520- διάλυμα κανναβινόλης 1.0mg/ml σε μεθανόλη], αγοράστηκαν από την αντιπροσωπεία ‘Σελίδης’, εταιρεία Sigma Aldrich.

Η CBD, το κύριο μη ψυχοδραστικό κανναβινοειδές, της κάνναβης, απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1940, από τον Adams και τους συνεργάτες του, αλλά η δομή και η στερεοχημεία του διευκρινίσθηκαν το 1963 από τους Mechoulam και Schvo. Η CBD εμφανίζει μια πληθώρα φαρμακολογικών δράσεων, που διαμεσολαβούνται από πολλαπλούς μηχανισμούς. Έχει εκτιμηθεί κλινικά στο άγχος, στην ψύχωση , και στις κινητικές διαταραχές (για την ανακούφιση του νευροπαθικού πόνου στους ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση) και πολύ πρόσφατα και στον καρκίνο, (Izzo A.A., και συν.,2009).



Χημική δομή της κανναβιδιόλης (Izzo A.A, και συν., 2009)

Η CBN, που απομονώθηκε το 1896 από τον Wood και τους συνεργάτες του στο Cambridge, αντιπροσωπεύει το πρώτο φυσικό κανναβινοειδές που λήφθηκε σε καθαρή μορφή. Η σωστή του δομή ταυτοποιήθηκε αργότερα από τον Adams και τους συνεργάτες του, το 1940. Αρχικά, υπήρχε η λανθασμένη εκτίμηση ότι πρόκειται για κύριο ψυχοδραστικό συστατικό της κάνναβης. Στην πραγματικότητα, είναι ένα σχετικά έλασσον συστατικό της φρέσκιας κάνναβης, επειδή είναι προϊόν της οξείδωσης της D9-THC. Η περιεκτικότητα σε CBN αυξάνει καθώς η D9-THC αποδομείται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής της. Είναι ένας ασθενής CB1 και CB2 μερικός αγωνιστής, με περίπου το 10% της ενεργότητας της D9-THC. Έχει πιθανή θεραπευτική εφαρμογή σε ασθένειες, στις οποίες ενεργοποιούνται οι υποδοχείς των κανναβινοειδών, (Izzo A.A., και συν.,2009).



Χημική δομή της κανναβινόλης (Izzo A.A., και συν.,2009).

Γ.3.2. Δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας και κυτταρικού πολλαπλασιασμού in vitro, (MTT και SRB).

α). Δοκιμασία ελέγχου της κυτταροτοξικότητας MTT .

Το αντιδραστήριο MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (M-6494, σκόνη 1g, φωτοευαίσθητο), αγοράστηκε από την αντιπροσωπεία Σελίδης, εταιρεία Invitrogen.

Αφού **τα κύτταρα εκτεθούν στην παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων των ενώσεων επί 48h**, ακολουθεί η εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης των ενώσεων μέσω **της χρωματομετρικής μεθόδου MTT**, (Jane A., και συν.,1989).

Η αναγωγή των αλάτων του τετραζολίου είναι ευρέως διαδεδομένη σαν ένας αξιόπιστος τρόπος για την εξέταση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Το κίτρινο τετραζόλιο MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) ανάγεται στα μεταβολικά ενεργά κύτταρα από τη δράση μιτοχονδριακών ενζύμων δεϋδρογενάσης, για να παράγει αναγμένα ισοδύναμα όπως είναι το NADH και το NADPH. Η παραγόμενη ενδοκυττάρια πορφυρή φορμαζάνη μπορεί να διαλυτοποιηθεί και να ποσοτικοποιηθεί με τη χρήση σπεκτροφωτομέτρου.

β). Δοκιμασία ελέγχου της κυτταροτοξικότητας SRB .

Το αντιδραστήριο SRB, παραχωρήθηκε στα πλαίσια της συνεργασίας με το Α.Ν.Θ. «Θεαγένειο».

Αφού **τα κύτταρα εκτεθούν στην παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων των ενώσεων επί 48h** , ακολουθεί η εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης των ενώσεων μέσω **της χρωματομετρικής μεθόδου SRB**, (Houghton P., και συν.,2007).

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα της χρωστικής sulforhodamine B (SRB) να δεσμεύεται ηλεκτροστατικά και εξαρτώμενα από το pH σε κατάλοιπα βασικών πρωτεϊνικών αμινοξέων (χρώση των κυττάρων), από μονιμοποιημένα με τριχλωροξικό οξύ κύτταρα. Κάτω από ήπια όξινες συνθήκες προσδένεται στα κύτταρα και κάτω από ήπια βασικές συνθήκες μπορεί να εκχυλιστεί και να διαλυτοποιηθεί για την μέτρηση.

Γ.3.3. Σύγκριση των δοκιμασιών MTT - SRB.

Η μέθοδος MTT, εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1986 (Cole S.P.C., 1986) και ακολούθησε η μέθοδος XTT το 1988 (Scudiero D.A., και συν., 1988).

Και τα δυο αντιδραστήρια, ανάγονται από τα μιτοχόνδρια στα ζωντανά κύτταρα, σε ένα χρωματισμένο προϊόν φορμαζάνης, η ένταση του οποίου μπορεί να μετρηθεί με τη χρήση σπεκτροφωτομέτρου. Η χρήση της XTT προτιμάται, γιατί το προϊόν φορμαζάνης είναι υδατοδιαλυτό και δεν χρειάζεται το βήμα διαλυτοποίησης που απαιτείται, εφ' όσον χρησιμοποιηθεί η μέθοδος MTT.

Και με τα δυο παραπάνω αντιδραστήρια, ο σχηματισμός χρώματος, εξαρτάται από τη δραστηριότητα των μιτοχονδρίων, έτσι εάν η λειτουργία των μιτοχονδρίων ανασταλλεί από διαφοροποιήσεις στα κυτταρικά επίπεδα του NADH, της γλυκόζης και άλλων παραγόντων, λαμβάνονται ποικίλα αποτελέσματα και ένα παρόμοιο αποτέλεσμα θα μπορούσε να δοθεί στην περίπτωση που τα κύτταρα δεν ήταν ζωντανά ή δεν πολλαπλασιάζονταν.

Εξ' αιτίας αυτών των περιορισμών, προτιμάται από κάποιους η δεύτερη βασική τεχνική για την μέτρηση της κυτταροτοξικότητας, η SRB (sulforhodamine B) δοκιμασία.

Αυτή βασίζεται στην πρόσληψη της αρνητικά φορτισμένης ροζ χρωστικής αμινοξανθίνης, SRB, από τα βασικά κατάλοιπα αμινοξέων των πρωτεϊνών των κυττάρων. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των κυττάρων, τόσο μεγαλύτερο ποσό χρωστικής προσλαμβάνεται και μετά από την μονιμοποίηση των κυττάρων και αφού τα κύτταρα υποστούν λύση, η απελευθερωμένη χρωστική θα δώσει ένα πιο έντονο χρώμα και μεγαλύτερη απορρόφηση (Skehan P, και συν., 1990). Η SRB δοκιμασία είναι ευαίσθητη, απλή, αναπαραγώγιμη και πιο γρήγορη από τις δοκιμασίες που στηρίζονται στο σχηματισμό φορμαζάνης, δίνει καλύτερη γραμμικότητα και έχει ένα σταθερό τελικό σημείο (end-point), που δεν απαιτεί χρονοευαίσθητη μέτρηση, όπως η MTT και η XTT δοκιμασίες, (Fricker S.P., και συν., 1996), (Keepers Y.P., και συν., 1991).

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΠΕΙΡΑΜΑ (1).

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ 2 ΦΑΡΜΑΚΩΝ, CBD ΚΑΙ CBN, ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ A549, MRC-5 ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΗΝ ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ ΜΤΤ.

1^η ημέρα.

Τεχνική ανακαλλιέργειας των κυττάρων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα A549 και ‘αθανατοποιημένα’ κύτταρα πνεύμονα MRC-5. Για τα κύτταρα, ισχύει η πειραματική πορεία ανακαλλιέργειας, (αναλύθηκε στην ενότητα **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**).

Τεχνική αυτόματης μέτρησης των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο.

A). Μέτρηση των κυττάρων A549.

- 1). Σε ένα erendorf, προσθέτονται 10μl της χρωστικής trypan blue και 10μl (από το ανασυσταμένο ίζημα των κυττάρων) και γίνεται ανάδευση στο vortex.
- 2). Σε μια πλάκα Neubauer με πιπέτα, τοποθετούνται προσεχτικά 10μl από το παραπάνω μίγμα, στο δεξί μηνίσκο της πλάκας.

Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται σε ειδική υποδοχή στο αιμοκυτταρόμετρο.

Η αυτόματη μέτρηση των κυττάρων A549, δίνει τα εξής αποτελέσματα:

Total: $3,0 \times 10^6/\text{ml}$

Live : $2,9 \times 10^6/\text{ml}$

Viability : 96%

B). Μέτρηση των κυττάρων MRC-5.

Ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία , τα αποτελέσματα της αυτόματης μέτρησης των κυττάρων MRC-5 είναι τα εξής:

Total: $5,5 \times 10^6/\text{ml}$

Live : $5,3 \times 10^6/\text{ml}$

Viability: 97%.

Υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων που απαιτούνται για το πείραμα.

A) Κύτταρα A549.

Έχουμε 3×10^6 cells/ml ή 300×10^4 cells/ml.

Θέλουμε **10000 cells/well** ή **1×10^4 cells/ 0,1ml** (επειδή στο κάθε πηγαδάκι προσθέτονται 100μl κυττάρων). Δηλαδή θέλουμε **10×10^4 cells/ml**.

B). Κύτταρα MRC-5.

Έχουμε $5,5 \times 10^6$ cells/ml ή 550×10^4 cells/ml.

Θέλουμε **5000 cells/well** ή **5×10^4 cells/ml** (επειδή όπου well → 100μl).

Υπολογίζεται το stock κυττάρων που θα χρειαστούν για το πείραμα.

Στο συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιούνται 2 (δυο) κυτταρικές σειρές A549 και MRC-5 και θα ελεγχθούν 10 συνολικά συγκεντρώσεις (το control και εννέα συγκεντρώσεις) των δυο κανναβινοειδών, της CBD και CBN.

Δηλαδή θα χρειαστούν 3 (triplicate) x 10 (control + 9 dilutions),

δηλ. 30 wells x 0,1ml/well, δηλαδή 3ml x 2 drugs, **δηλαδή 6ml** κύτταρα **A549** και **6ml** κύτταρα **MRC-5**.

Θα ετοιμαστεί **stock 15ml** από τον κάθε κυτταρικό τύπο.

1) stock A549.

Ισχύει ο νόμος $C1 \times V1 = C2 \times V2$.

Όπου $C1 = 300 \times 10^4$ cells/ml.

$C2 = 10 \times 10^4$ cells/ml.

$V2 = 15$ ml.

300×10^4 c/ml X $V1 = 10 \times 10^4$ c/ml X 15ml → $V1 = 0,5$ ml κύτταρα (και θα χρειαστούν και 14,5 ml GM).

2) **stock MRC-5.**

$$C1 \times V1 = C2 \times V2.$$

Όπου $C1=550 \times 10^4$ c/ml.

$$C2=5 \times 10^4$$
 c/ml.

$$V2=15$$
 ml.

550×10^4 c/ml X $V1 = 5 \times 10^4$ c/ml X 15ml → $V2= 0,136$ ml κύτταρα (και θα χρειαστούν και 14,86 ml GM).

Χρησιμοποιούνται **2 (δυο) αποστειρωμένα τρυβλία των 100 mm (για το stock):**

Στο πρώτο τρυβλίο ,(A549), προσθέτονται 14,5ml GM και 0,5ml κύτταρα A549 .

Στο δεύτερο τρυβλίο , (MRC-5), προσθέτονται 14,9ml GM και 136μl κύτταρα MRC-5.

Για την κυτταρική σειρά A549 χρειάζονται δυο μικροπλάκες των 96 πηγαδιών.

Η πρώτη , A549, 10000 c/well, 28/1/2013, CBD.

Η δεύτερη , A549, 10000 c/well, 28/1/2013, CBN.

Προσθέτονται 100μl κύτταρα (από το stock των 15ml των κυττάρων A549) σε 30 πηγαδάκια (10 στήλες x 3 σειρές) σε κάθε μικροπλάκα.

(Χρειάζεται συνεχής ανάδευση, για να μην προσκολληθούν τα κύτταρα στον πυθμένα του τρυβλίου).

Ομοίως για την κυτταρική σειρά **MRC-5**, χρειάζονται δυο 96/well μικροπλάκες.

Η πρώτη , MRC-5, 5000 c/well, 28/1/2013, CBD.

Η δεύτερη , MRC-5, 5000 c/well, 28/1/2013, CBN.

Προσθέτονται 100μl κύτταρα (από το stock των 15 ml των κυττάρων MRC-5) σε 30 πηγαδάκια (10 στήλες x 3 σειρές) σε κάθε μικροπλάκα.

Οι τέσσερις (4) μικροπλάκες των 96 πηγαδιών τοποθετούνται στον επωαστήρα (incubator), στους 37°C, 5% CO₂ και υγρασία, για 24 ώρες.

2^η ημέρα (24/ωρη επώαση).

Προσθήκη των φαρμάκων CBD – CBN στις δυο κυτταρικές σειρές.

Τα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα, αγοράστηκαν από την εταιρεία Σελίδης, αντιπροσωπεία Sigma-Aldrich, και είναι τα εξής:

- (1) CBD -90899- . Διάλυμα κανναβιδιόλης 10 mg/ml σε 100% αιθανόλη και
 (2) CBN –C6520-. Διάλυμα κανναβινόλης 1,0 mg/ml σε 100% μεθανόλη.

Συγκεντρώσεις φαρμάκων.

(1) CBD : 10 mg/ml, M.B= 314,46

$$10/314,46 = 0,031800 \text{ mmol/ml}$$

ή 31,8 mM (1 ml) in EtOH

Δηλαδή **CBD : 31800 μM σε (100% EtOH).**

ή 318 μM σε (1% EtOH)

(2) CBN : 1 mg/ml, M.B= 310,43

$$1/310,43 = 0,0032213 \text{ mmol/ml}$$

ή 3,221 mM (1 ml) in MetOH

Δηλαδή **CBN: 3221 μM σε (100% MetOH)**

ή 32 μM σε (1% MetOH) (σε συγκεντρώσεις > 30μM θα χρησιμοποιηθεί control MetOH).

Υπολογισμός των συγκεντρώσεων των κανναβινοειδών, CBD – CBN που θα χρησιμοποιηθούν στο πείραμα.

(1) **CBD stock: 31,8 mM in EtOH (31800 μM).**

Initial (μM): 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 120, 240

Final (μM): 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 120.

Για την μεγαλύτερη συγκέντρωση, **240 μM**, απαιτούνται: 1 ml (για 240μM), 1ml (για 120μM , αραιώση 1:2), 0,8 ml (για 80 μM, αραιώση 1:3). Δηλαδή συνολικά 2,8 ml.

Ισχύει ο νόμος των αραιώσεων: $C1 \times V1 = C2 \times V2$

240 μM: 240 μM x 2,8ml = 31800 μM x a ml → a=0,0211 ml από το stock CBD

Δηλαδή **21,1 μl stock + 2779 μl GM** (θεραπευτικό μέσο).

80 μM: 80 μM x 2,4ml = 240 μM x b ml → b= 0,8 ml από τα 240 μM

Δηλαδή **0,8 ml (από τα 240 μM) + 1,6 ml GM.**

Για τις συγκεντρώσεις **10 – 60 μM και 120 μM**, γίνονται διαδοχικές αραιώσεις **1:2**, **[1ml GM + 1ml (x2 drug) → 2ml (x1 drug)]** .

Δεν χρειάζεται control EtOH , επειδή [CBD 318 μM σε (1% EtOH)], δηλαδή μέχρι τα 120μM, η συγκέντρωση της EtOH είναι <1%.]

Για τις αραιώσεις των drugs (φαρμάκων), χρησιμοποιούνται πλάκες 12 πηγαδιών.

Initial (αρχικές) συγκεντρώσεις CBD

	1	2	3	4
1	0	10	20	30
2	40	60	80	120
3	240			

Για τις διαδοχικές αραιώσεις, προστίθεται σε όλα τα παραπάνω αριθμημένα πηγαδάκια **1ml GM**, εκτός από το πηγαδάκι των **80μM** στο οποίο προσθέτονται **1,6 ml GM** και από το πηγαδάκι των **240μM** στο οποίο προσθέτονται **2,8 ml GM**.

Στη συνέχεια, προσθέτονται **21,1μl** από το stock CBD (των 31,8 mM in EtOH) στο πηγαδάκι των **240μM** και από το μίγμα, μεταφέρονται τα **800μl** στο πηγαδάκι με συγκέντρωση **80μM** (για να γίνει η αραιώση 1:3).

Στη συνέχεια, μεταφέρεται **1ml** μίγματος (μετά από ανάδευση), διαδοχικά ως εξής:

1ml 1ml 1ml
80 → 40 → 20 → 10
 1:2 1:2 1:2

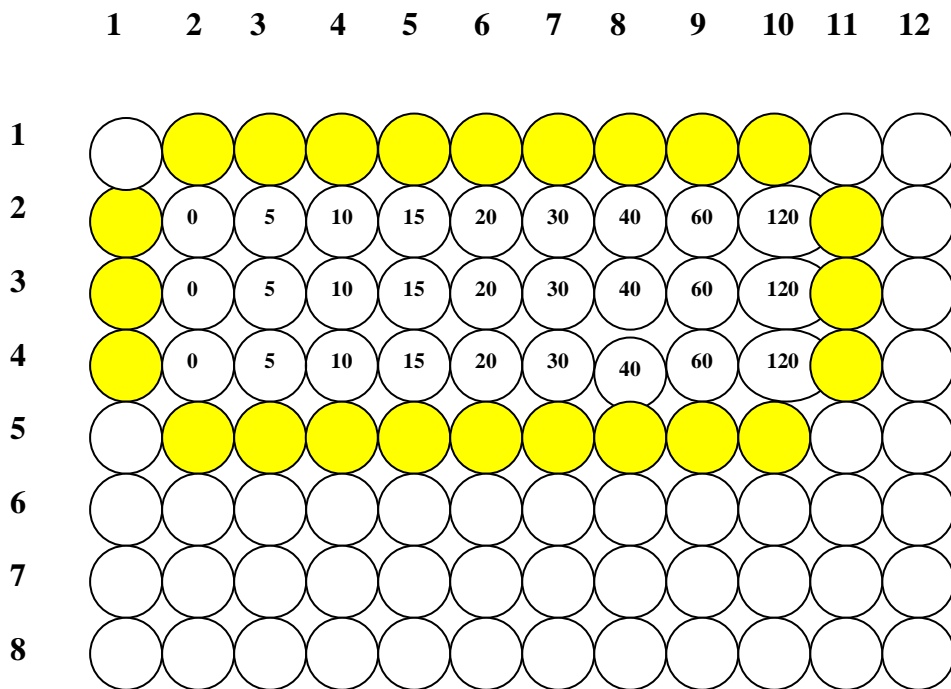
Ομοίως, μεταφέρεται **1ml** μίγματος, διαδοχικά ως εξής:

1ml 1ml 1ml
240 → 120 → 60 → 30
 1:2 1:2 1:2

Στη συνέχεια, βγαίνουν οι 96/μικροπλάκες από τον επωαστήρα (μετά την ολονύκτια επώαση) και αφού γίνει η μικροσκοπική επιβεβαίωση ότι υπάρχει ο ίδιος αριθμός κυττάρων προσκολλημένος σε όλα τα πηγαδάκια, ακολουθεί η επόμενη φάση, δηλαδή η προσθήκη των φαρμάκων (drugs), στις κυτταρικές σειρές A549 και MRC-5. Προσθέτονται το control (μάρτυρας) και οι 8(οκτώ) συγκεντρώσεις της CBD στις 2(δυο) 96/well μικροπλάκες, την μια με τα κύτταρα A549 και την άλλη με τα κύτταρα MRC-5, ως εξής.

96/well μικροπλάκα, (12 στήλες x 8 σειρές)
A549, 29/1.

Final (τελικές) συγκεντρώσεις CBD.



Χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα με 3(τρία) ρύγχοι, μεταφέρεται ποσότητα **100 μl drug**, αντίστοιχα από τα πηγαδάκια της 12/μικροπλάκας, στα πηγαδάκια της 96/well μικροπλάκας, (στα οποία είχαν προστεθεί την προηγούμενη μέρα 100μl κύτταρα) .

(Στη θέση του control-0, έχει προστεθεί μόνο 2ml GM).

Η ίδια ακριβώς διαδικασία επαναλαμβάνεται για την κυτταρική σειρά **MRC-5**, μόνο που στην 96/well μικροπλάκα όπου έχουν προσκολληθεί τα κύτταρα MRC-5, αναγράφεται (με μαρκαδόρο), **MRC-5 , CBD, 29/1**.

Περιμετρικά από τα πηγαδάκια με τα δείγματα (samples), (έχουν χρωματιστεί κίρινα στο παραπάνω σχήμα), προσθέτονται **200μl PBS**, για να μην αλλοιωθούν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων (τυχόν εξάτμιση). Τελικά οι δυο 96/well μικροπλάκες (A549-CBD και MRC-5-CBD), τοποθετούνται στον επωαστήρα για 48/ωρη επώαση.

(2) CBN stock: 3,221 mM σε 100% MetOH (3221 μM)

Initial (μM): 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320

Final (μM): 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160

Ισχύει ο νόμος των αραιώσεων: **$C1 \times V1 = C2 \times V2$**

Για την μεγαλύτερη συγκέντρωση **320 μM**, ισχύει:

$320 \mu\text{M} \times 2 \text{ ml} = 3221 \mu\text{M} \times a \text{ ml} \rightarrow a=0,1987 \text{ ml από το stock CBN,}$

Δηλαδή **199 μl stock + 1801 μl GM** (θρεπτικό μέσο).

Μικροπλάκα των 12 πηγαδιών, (4 στήλες x 3 σειρές).

Initial (αρχικές) συγκεντρώσεις CBN - control MetOH (%)

	1	2	3	4
1	0	10	20	40
2	80	160	320	
3		4,9 %	2,5 %	1,24 %

Αρχικά προστίθεται σε όλα τα πηγαδάκια της 12/well μικροπλάκας **1ml GM**, εκτός από το πηγαδάκι των **320 μM**, στο οποίο προσθέτονται **1,8 ml GM**.

Στη συνέχεια, προσθέτονται στο πηγαδάκι των **320 μM**, **199μl από το stock CBN**, και αφού γίνει καλή ανάδευση, μεταφέρεται **1ml μίγμα (διαδοχικές αραιώσεις 1:2)**, ως εξής:

1ml 1ml 1ml 1 ml 1 ml
320 → 160 → 80 → 40 → 20 → 10
1:2 1:2 1:2 1:2 1:2

Επειδή το stock CBN είναι 3221 μM σε 100% MetOH,

ή 32 μM σε (1% MetOH) ,

αυτό σημαίνει ότι για τις 3(τρεις) Final (τελικές συγκεντρώσεις της CBN, 40, 80, 160 μM, όπου η συγκέντρωση της MetOH είναι > 1%, απαιτείται control για MetOH).

Υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις της MetOH, που αντιστοιχούν στις 3 συγκεντρώσεις της CBN, ως εξής:

Stock: Τα 3221 μM CBN περιέχουν 100% MetOH
160 μM CBN περιέχουν 4,967% MetOH
80 μM CBN περιέχουν 2,484% MetOH
40 μM CBN περιέχουν 1,2418% MetOH

Στην μεγαλύτερη συγκέντρωση των **160 μM CBN → 4,967% MetOH**.

Ετοιμάζονται 2ml.

Ισχύει $C1 \times V1 = C2 \times V2$

δηλαδή, 100% MetOH x a ml = 4,967% MetOH x 2ml → **a=0,0993 ml ή 99,3 μl**

από το stock της MetOH 100% + 1900,7 μl GM.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε τρία πηγαδάκια της 12/well μικροπλάκας, έχουν αναγραφεί (φαίνεται στο παραπάνω σχήμα) οι συγκεντρώσεις της MetOH 4,967%, 2,484%, 1,2418%.

Στο πηγαδάκι των 4,967%, προσθέτονται 1900,7 μl GM + 99,3μl MetOH (από το stock), ενώ στα πηγαδάκια των 2,484% MetOH και 1,2418% MetOH, προστίθεται 1ml GM. Στη συνέχεια γίνεται καλή ανάδευση και μεταφέρεται διαδοχικά 1ml, από το πηγαδάκι της μεγαλύτερης συγκέντρωσης, στα άλλα δυο, για να γίνουν οι υποδιπλάσιες αραιώσεις, ως εξής:

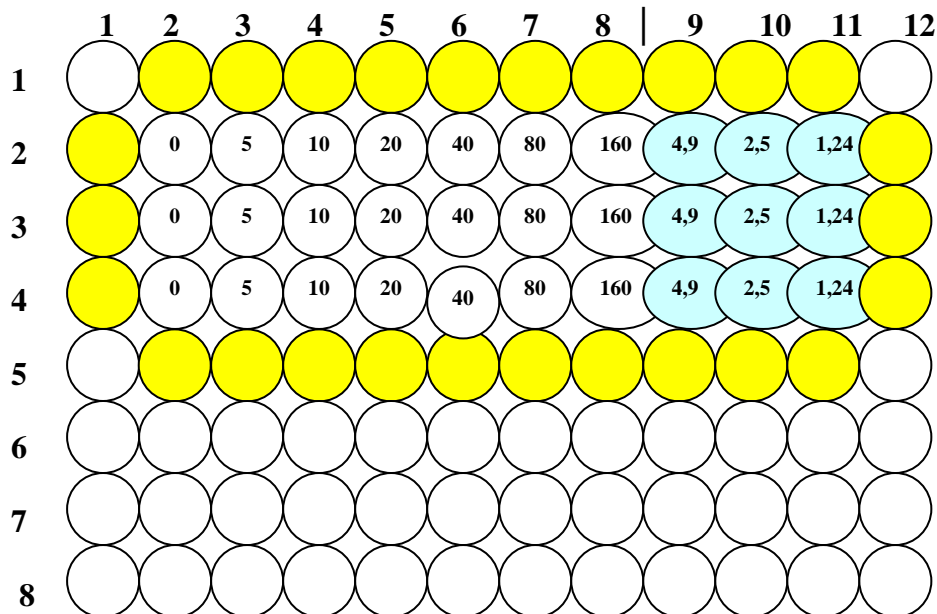
1ml	1ml
4,967% MetOH → 2,484% MetOH → 1,2418 % MetOH	
1:2	1:2

Στη συνέχεια βγαίνουν οι 96/μικροπλάκες από τον επωαστήρα και προσθέτονται το control (μάρτυρας) και οι 6 (έξι) συγκεντρώσεις της CBN στις δυο κυτταρικές σειρές, A549 και MRC-5. Επίσης προστίθεται control για MetOH (%).

96/well μικροπλάκα, (12 στήλες x 8 σειρές).

A549, 29/1.

Final (τελικές) συγκεντρώσεις, CBN. | MetOH (%)



Χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα με 3(τρία) ρύγχωι, μεταφέρεται ποσότητα **100 μl drug**, αντίστοιχα από τα πηγαδάκια της 12/μικροπλάκας, στα πηγαδάκια της 96/μικροπλάκας, (στα οποία είχαν προστεθεί την προηγούμενη μέρα 100μl κύτταρα), από τη 2^η μέχρι και την 8^η στήλη.

(Στη θέση του control-0, έχει προστεθεί μόνο 2ml GM).

Στις τρεις τελευταίες στήλες, 9^η, 10^η, 11^η, μεταφέρονται με πιπέτα,

100 μl της αντίστοιχης συγκέντρωσης MetOH, 4,96%, 2,48%, 1,24%, αντίστοιχα.

Η ίδια ακριβώς διαδικασία επαναλαμβάνεται για την κυτταρική σειρά **MRC-5**, μόνο που στην 96/well μικροπλάκα όπου έχουν προσκολληθεί τα κύτταρα MRC-5, αναγράφεται (με μαρκαδόρο), **MRC-5 , CBN, 29/1**.

Περιμετρικά από τα πηγαδάκια με τα δείγματα (samples), (έχουν χρωματιστεί κίρινα στο παραπάνω σχήμα), προσθέτονται **200μl PBS**, για να μην αλλοιωθούν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων (τυχόν εξάτμιση). Τελικά οι δυο 96/well μικροπλάκες (A549-CBN και MRC-5-CBN), τοποθετούνται στον επωαστήρα για 48/ωρη επώαση.

4^η ημέρα (μετά από 48 ώρες επώαση, από την προσθήκη της CBD και CBN).

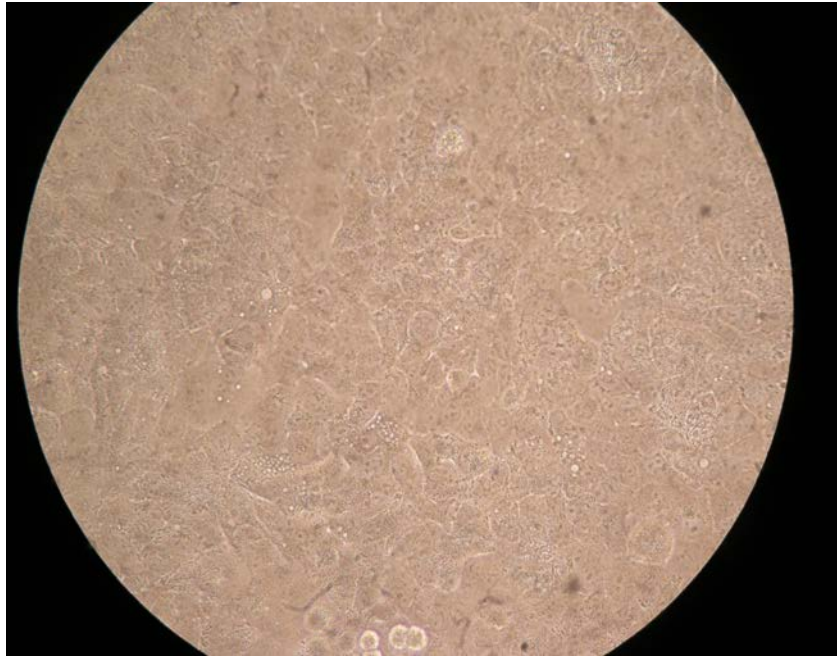
Μετά από 48 ώρες επώαση, ελέγχεται στο μικροσκόπιο η μορφολογία και των δυο κυτταρικών σειρών, μετά από την επίδραση των δυο κανναβινοειδών, της CBD και της CBN.

Φαίνεται, ότι τόσο τα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα A549, όσο και τα ‘αθανατοποιημένα στο εργαστήριο’ κύτταρα πνεύμονα MRC-5, είναι ευαίσθητα και στις δυο παραπάνω ενώσεις και μάλιστα σε χαμηλές σχετικά συγκεντρώσεις.

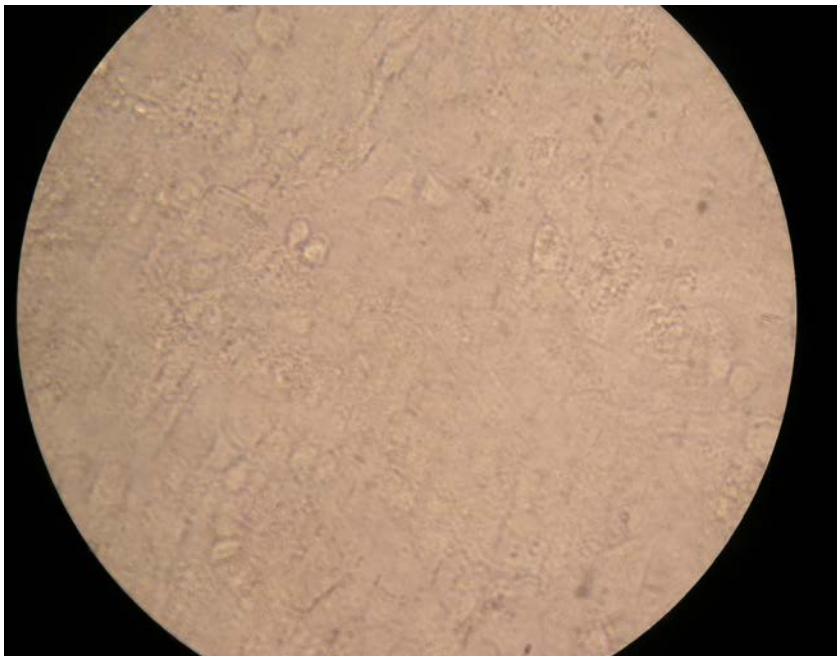
Είναι γνωστό, ότι τα κύτταρα που πεθαίνουν μετά από οξεία βλάβη, τυπικά διογκώνονται και κατακερματίζονται και στη συνέχεια διασπείρουν το περιεχόμενό τους, πάνω στα γειτονικά κύτταρα (μια διεργασία γνωστή ως κυτταρική νέκρωση). Αντίθετα, **ένα κύτταρο που υφίσταται απόπτωση πεθαίνει ήσυχα, χωρίς να παραβλάπτει τους γείτονές του. Το κύτταρο συρρικνώνεται και συμπυκνώνεται, ο κυτταροσκελετός καταρρέει, το πυρηνικό περίβλημα αποσυναρμολογείται και το DNA του πυρήνα θρυμματίζεται σε μικρά κλάσματα.**

Παρακάτω παραθέτονται χαρακτηριστικές ηλεκτρονιομικρογραφίες, (που τραβήχτηκαν με κάμερα στο εργαστήριο Βιοχημείας της Καθηγήτριας κας Χολής).

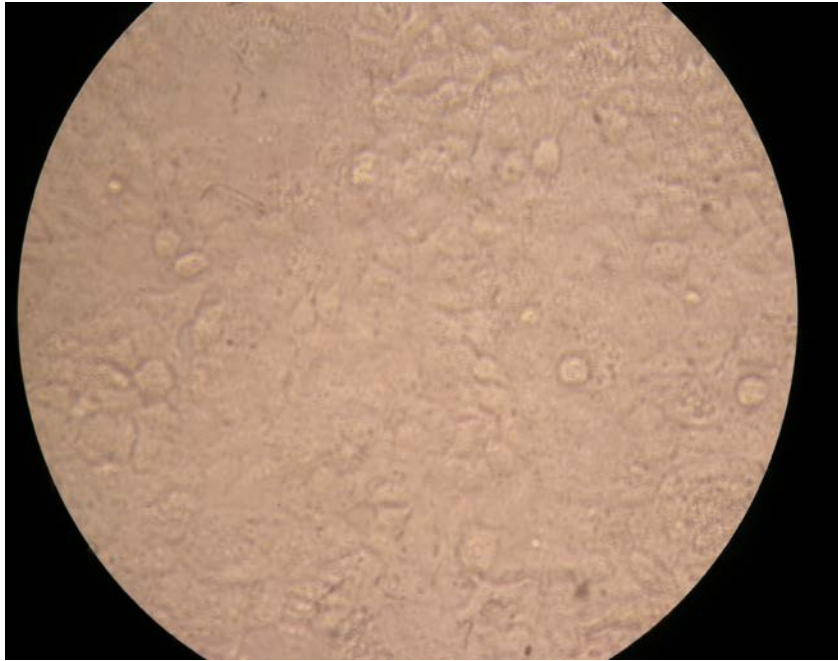
Κύτταρα A549 (10000 cells/well) – 48/ωρη επίδραση CBD.



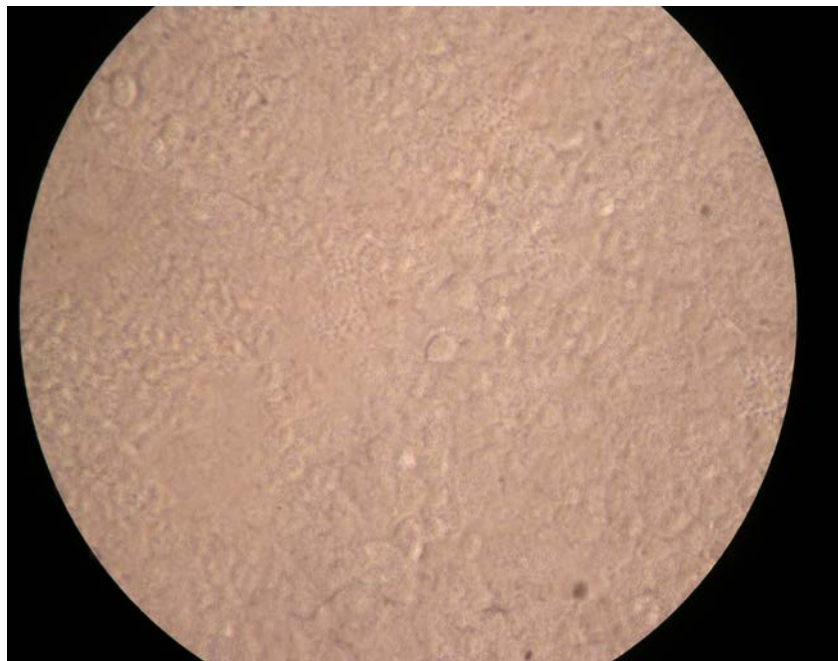
Εικόνα 1: Ηλεκτρονιομικρογραφία, που δείχνει ζωντανά κύτταρα A549, μετά από 48 ώρες επώαση σε πλήρες θρεπτικό μέσο, χωρίς την επίδραση CBD (control-μάρτυρας).



Εικόνα 2: Ηλεκτρονιομικρογραφία, που δείχνει ζωντανά κύτταρα A549, μετά από 48/ωρη επίδραση 5μM CBD (εικόνα παρόμοια με το control).



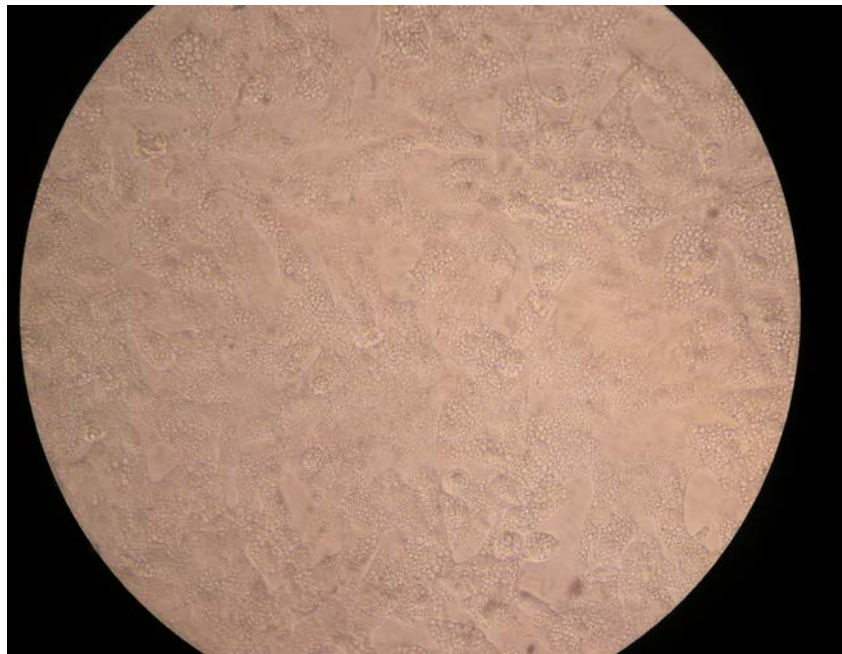
Εικόνα 3: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει ζωντανά κύτταρα A549, μετά από 48/ωρη επίδραση 10μM CBD (εικόνα παρόμοια με το control).



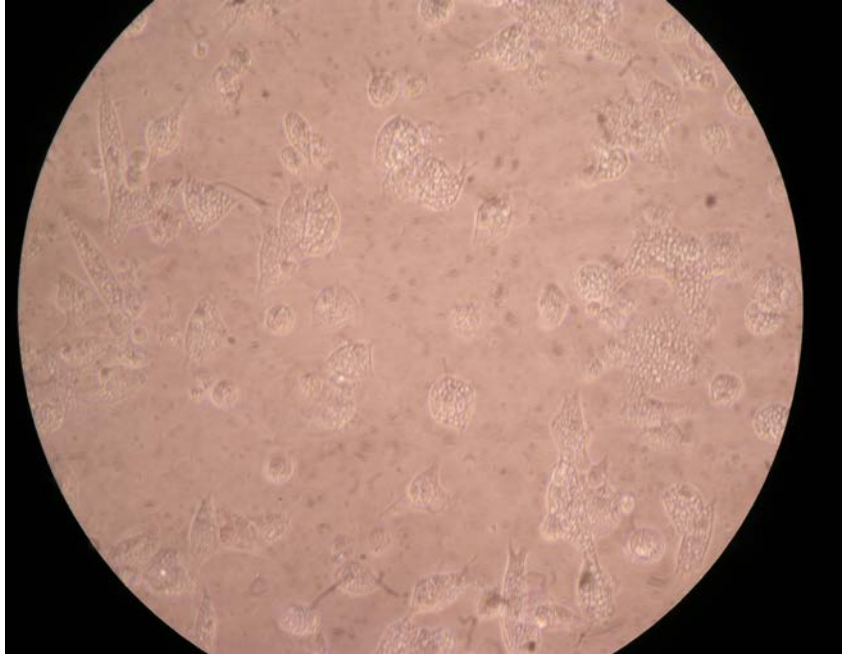
Εικόνα 4: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει ζωντανά κύτταρα A549, μετά από 48/ωρη επίδραση 15μM CBD (εικόνα παρόμοια με το control).



Εικόνα 5: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει κύτταρα A549 μετά από 48/ωρη επίδραση 20μM CBD (αρχίζουν να διακρίνονται κενοτόπια στο κυτταρόπλασμα μερικών κυττάρων, χαρακτηριστικό της απόπτωσης).



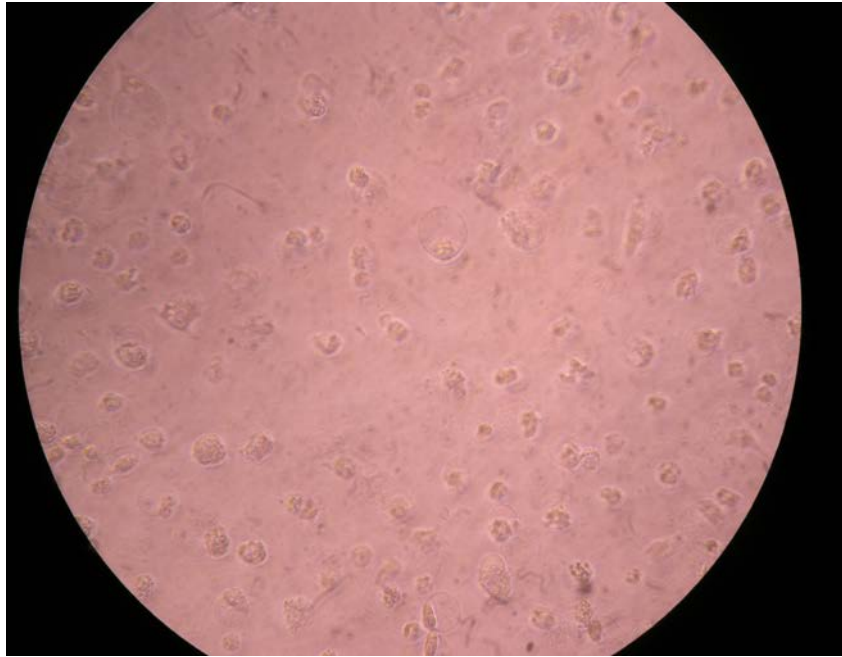
Εικόνα 6: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει κύτταρα A549, μετά από 48/ωρη επίδραση 30μM CBD (εικόνα όμοια με την προηγούμενη).



Εικόνα 7: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει κύτταρα A549, μετά από 48/ωρη επίδραση 40μM CBD (έχουν πεθάνει τα μισά περίπου κύτταρα).

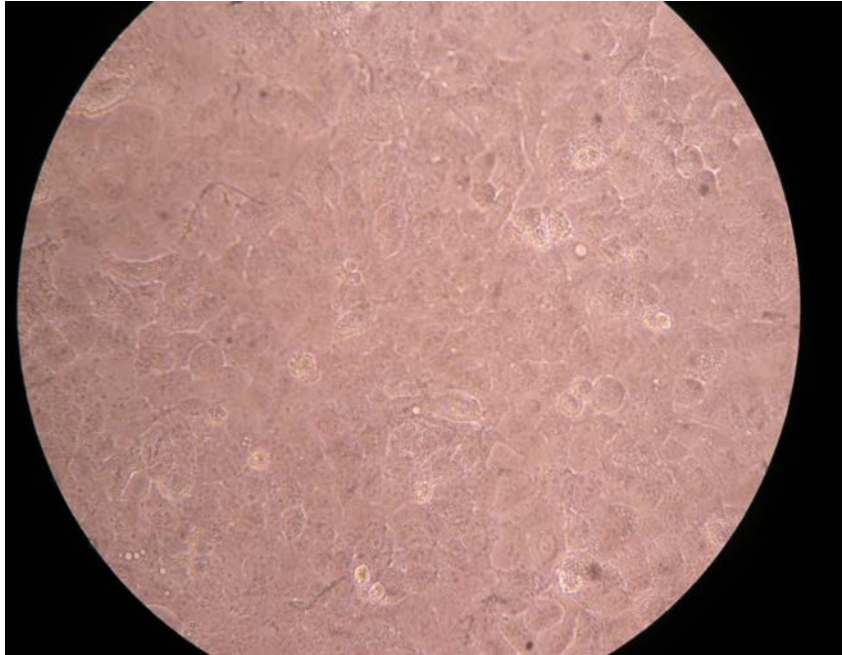


Εικόνα 8: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει κύτταρα A549, μετά από 48/ωρη επίδραση 60μM CBD (είναι χαρακτηριστική η συρρίκνωση και η συμπύκνωση που υφίστανται τα αποπτωτικά κύτταρα).

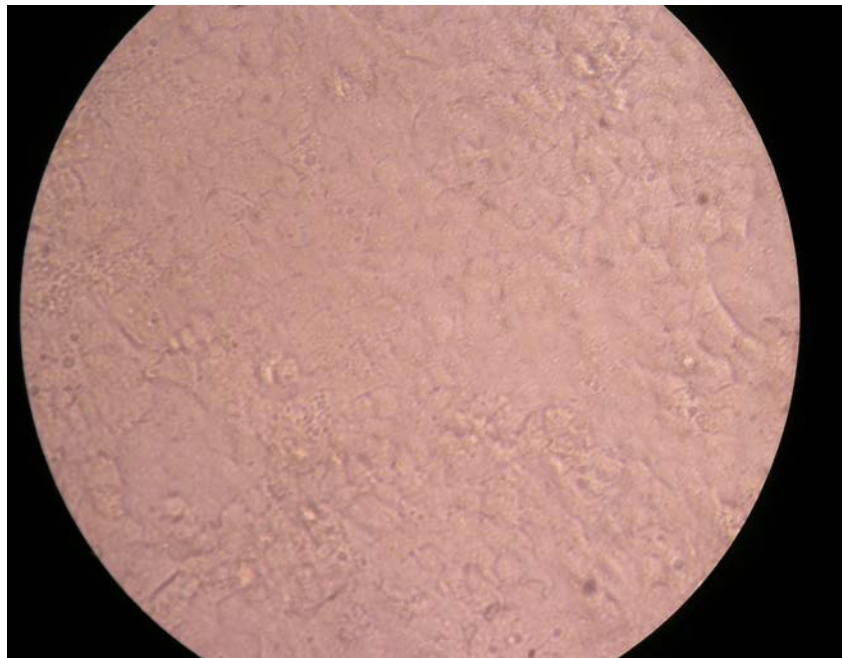


Εικόνα 9: Ηλεκτρονιομικρογραφία των νεκρών A549 κυττάρων, μετά από 48/ωρη επίδραση 120μM CBD.

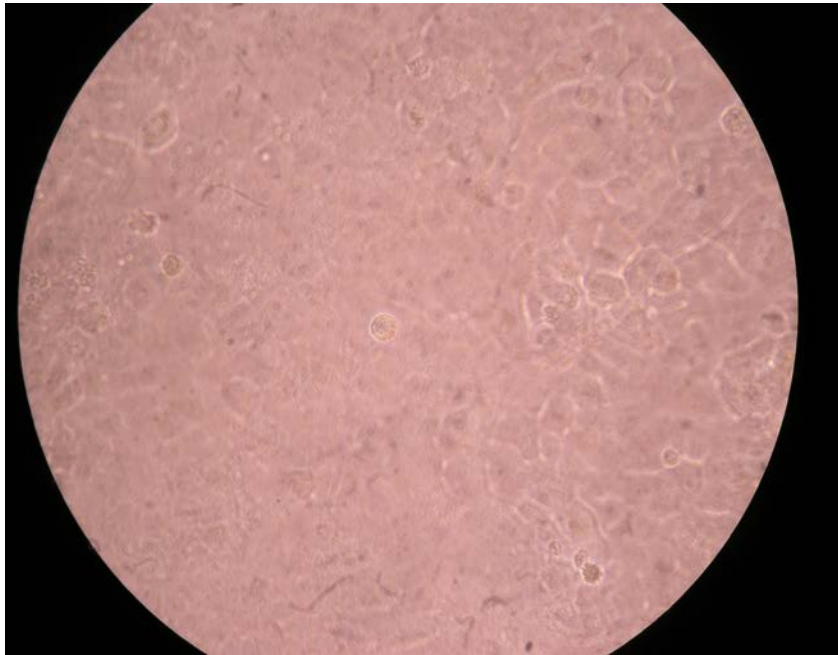
Κύτταρα A549 (10000 cell/well) – 48/ωρη επίδραση CBN.



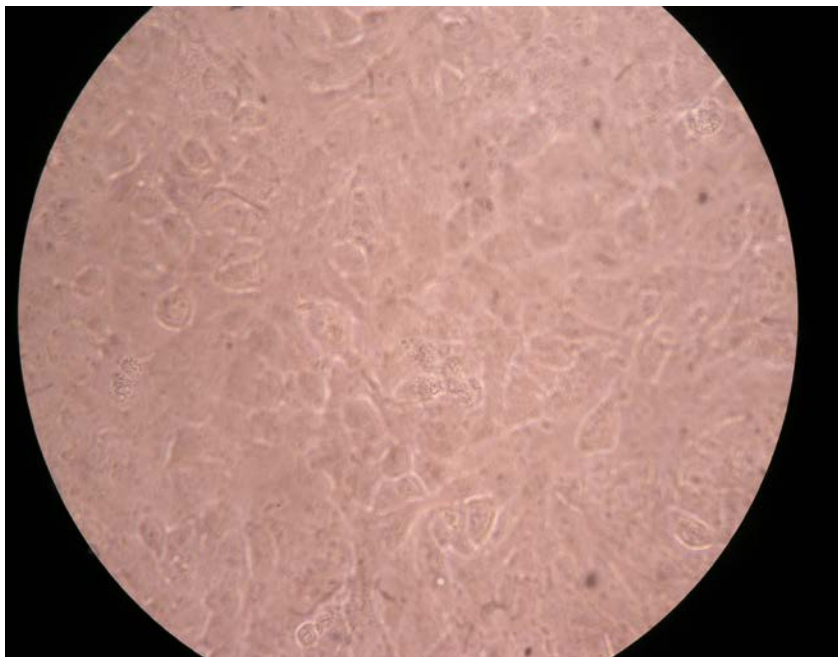
Εικόνα 10: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει ζωντανά A549 κύτταρα μετά από 48/ωρη καλλιέργεια σε πλήρες θρεπτικό μέσο, χωρίς την επίδραση CBN (control-μάρτυρας).



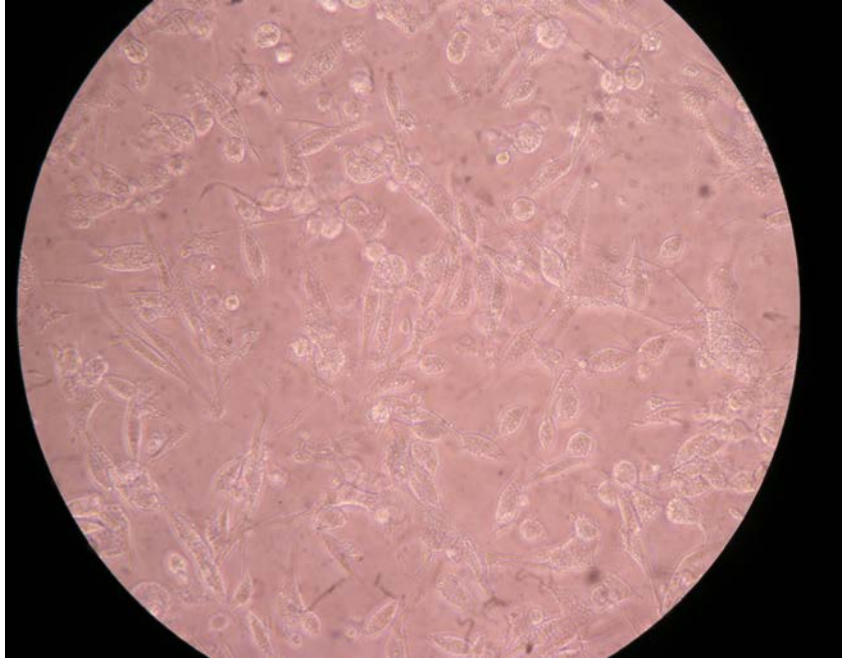
Εικόνα 11: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει ζωντανά A549 κύτταρα μετά από 48/ωρη επίδραση 5μM CBN (εικόνα παρόμοια με το control).



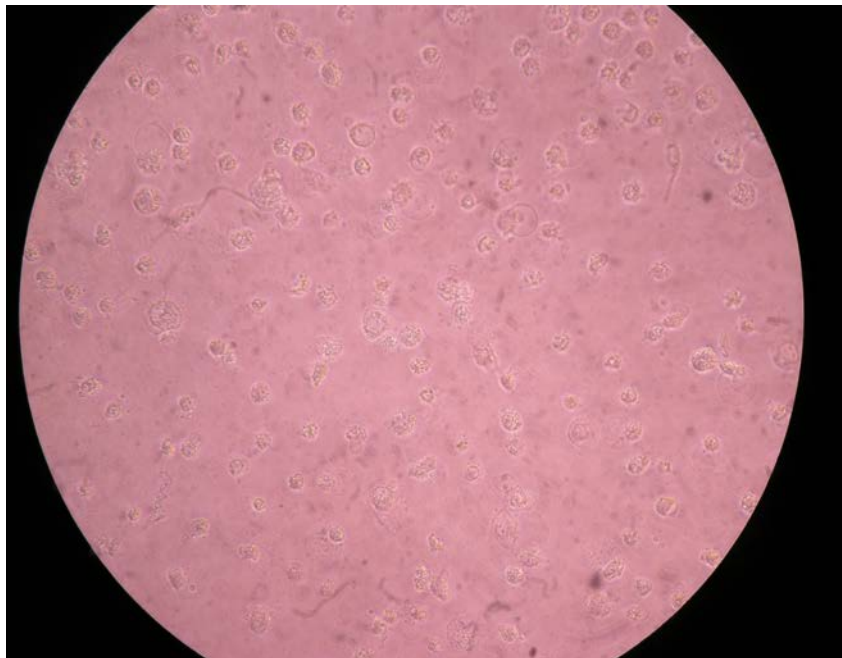
Εικόνα 12: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει ζωντανά κύτταρα A549 μετά από 48/ωρη επίδραση 10μM CBN (εικόνα παρόμοια με το control).



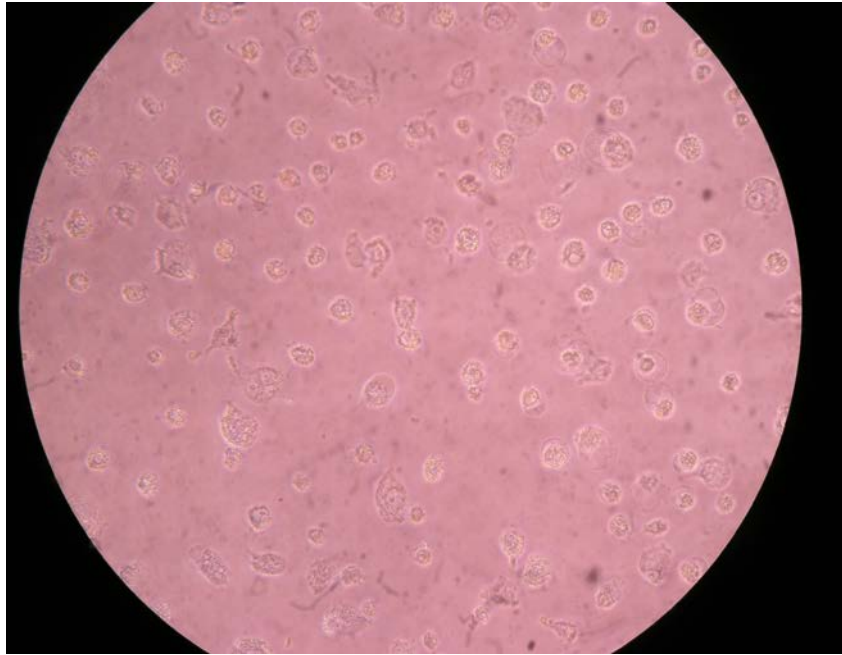
Εικόνα 13: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει ζωντανά κύτταρα A549, μετά από 48/ωρη επίδραση 20μM CBN (εικόνα παρόμοια με το control).



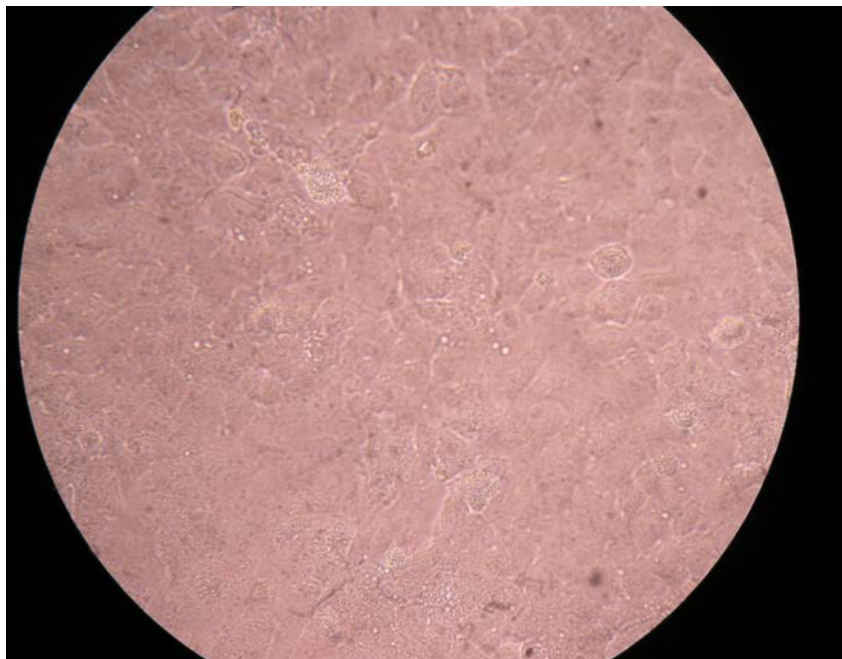
Εικόνα 14: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει κύτταρα A549, μετά από 48/ωρη επίδραση 40μM CBN (τα μεγάλα κενोटόπια στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, είναι χαρακτηριστικό της απόπτωσης).



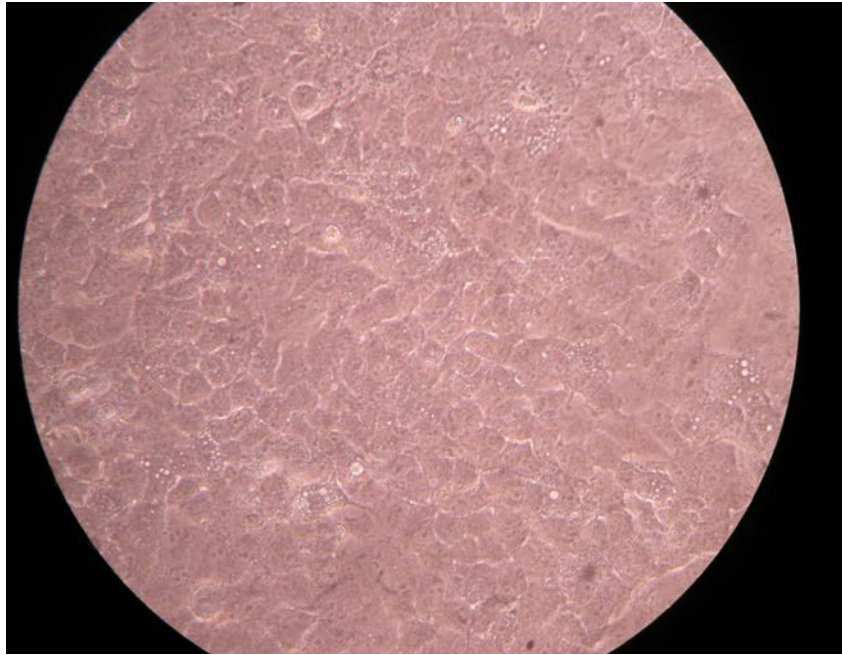
Εικόνα 15: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει νεκρά, (συρρικνωμένα-συμπυκνωμένα) κύτταρα A549, μετά από 48/ωρη επίδραση 80μM CBN.



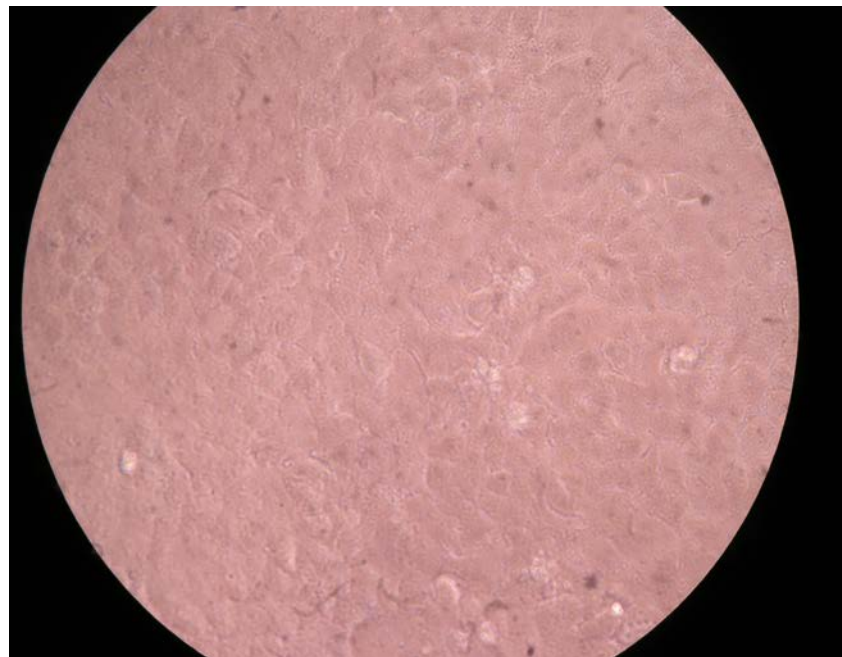
Εικόνα 16: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει νεκρά κύτταρα A549, μετά από 48/ωρη επίδραση 160μM CBN.



Εικόνα 17: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει κύτταρα A549, μετά από 48/ωρη επίδραση 4,97% MetOH (εικόνα παρόμοια με το control).

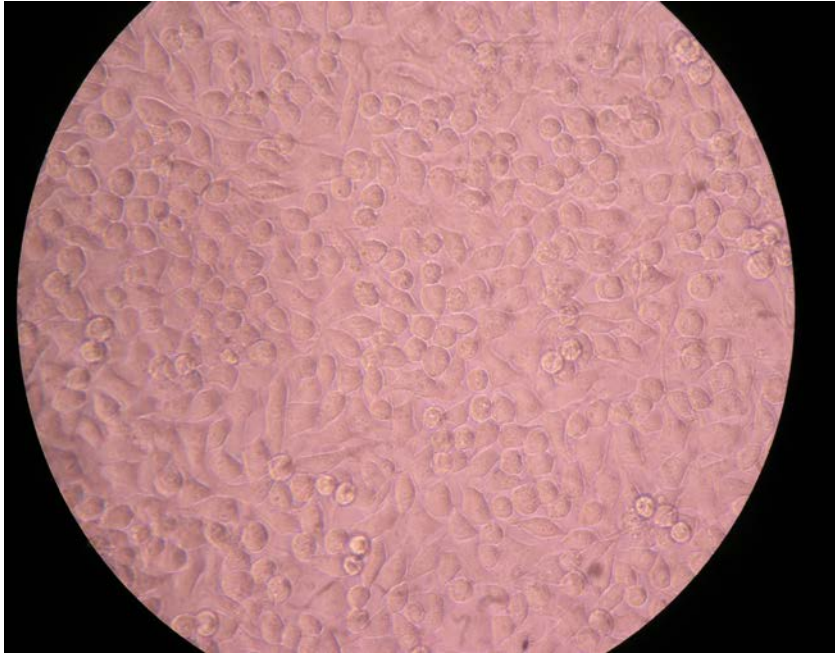


Εικόνα 18: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει κύτταρα A549, μετά από 48/ωρη επίδραση 2,48% MetOH (εικόνα παρόμοια με το control).

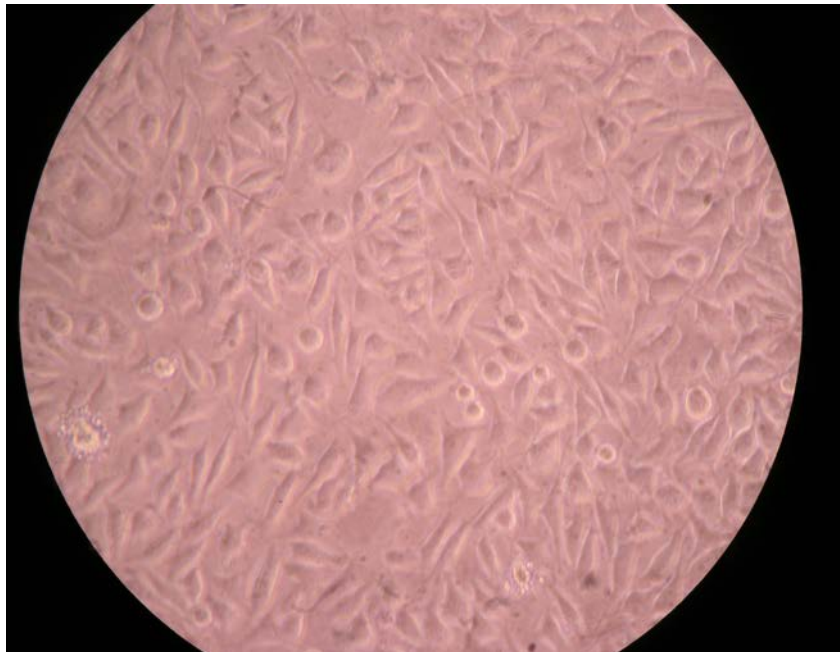


Εικόνα 19: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει κύτταρα A549, μετά από 48/ωρη επίδραση 1,24% MetOH (εικόνα παρόμοια με το control).

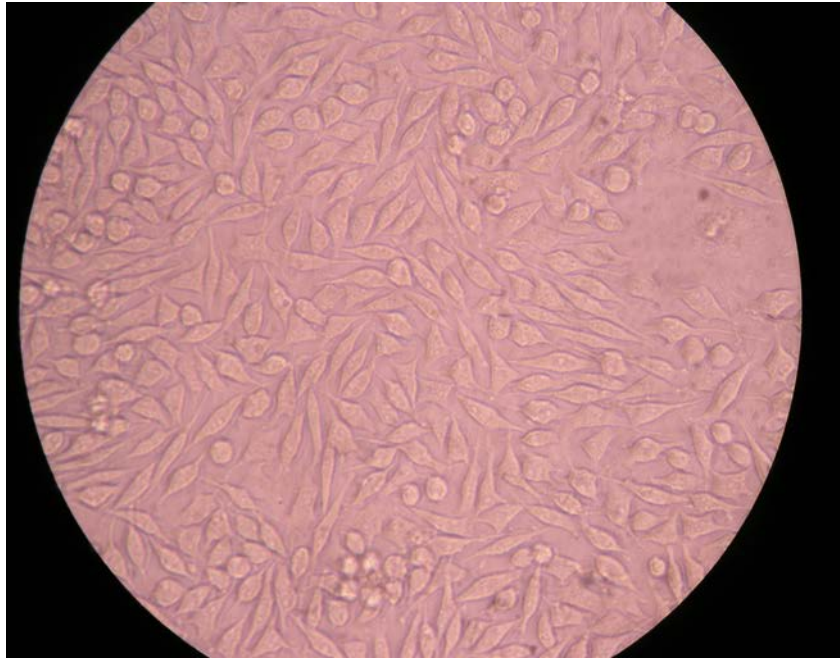
Κύτταρα MRC-5 (5000cells/well) - 48/ωρη επίδραση CBD.



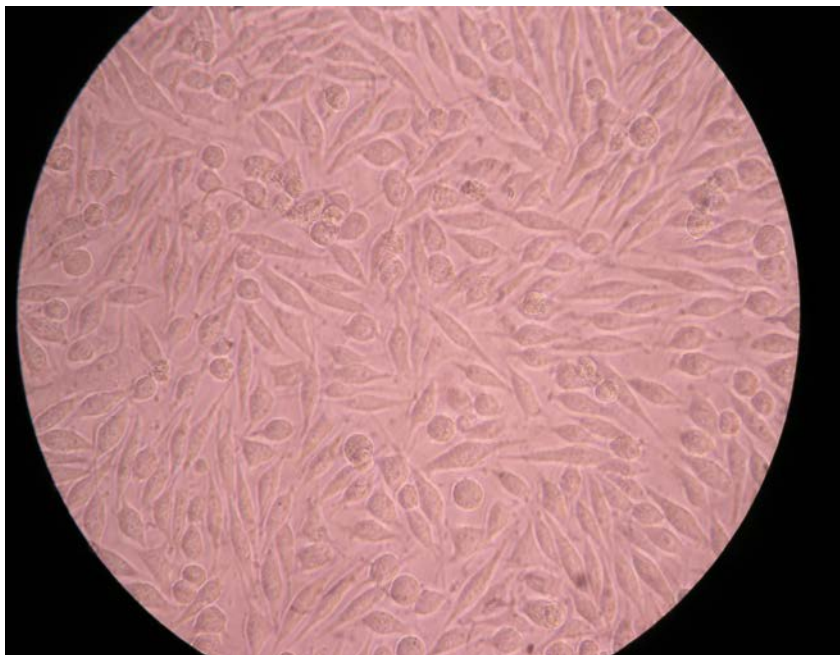
Εικόνα 20: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει ζωντανά κύτταρα MRC-5, μετά από 48/ωρη καλλιέργεια σε πλήρες θρεπτικό μέσο, χωρίς την επίδραση CBD (control-μάρτυρας).



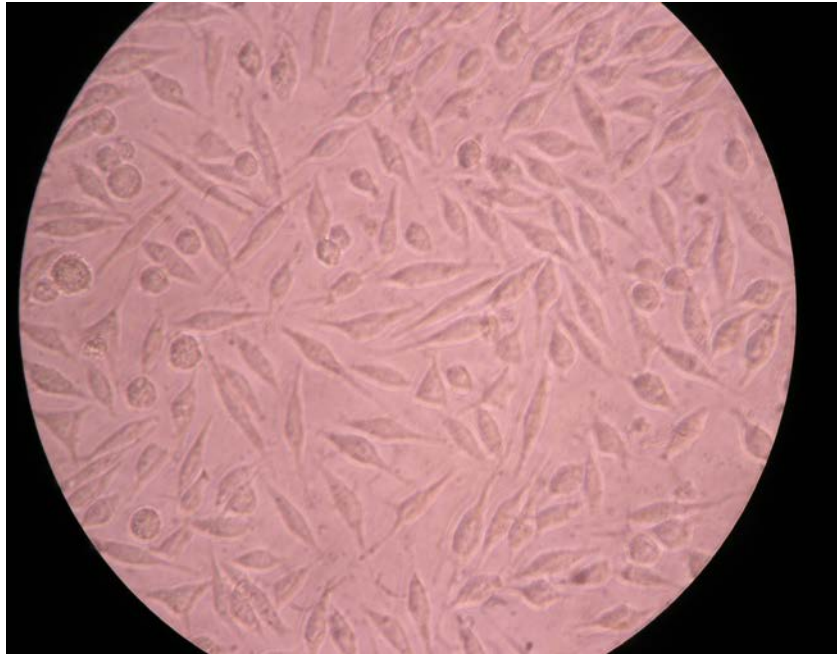
Εικόνα 21: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει ζωντανά κύτταρα MRC-5, μετά από 48/ωρη επίδραση 5μM CBD (εικόνα παρόμοια με το control).



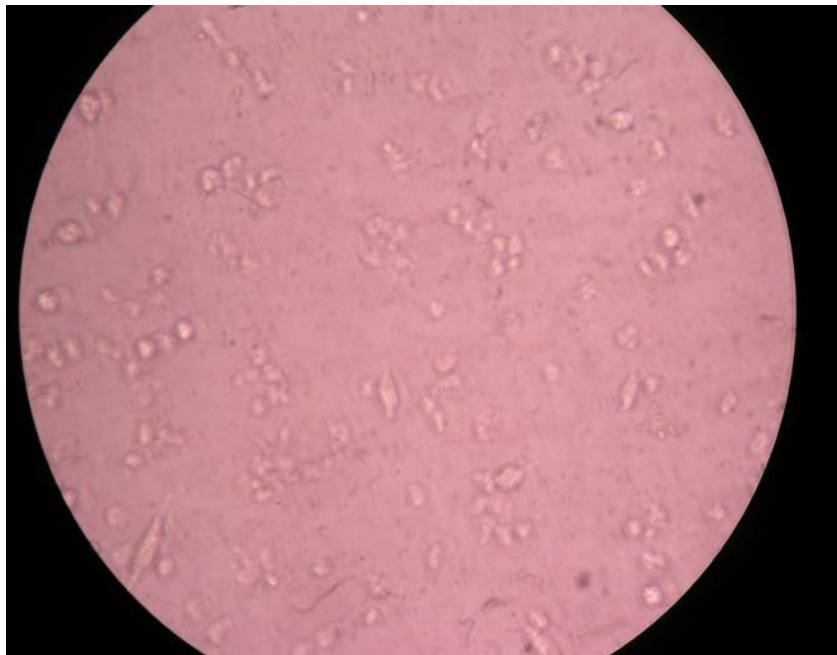
Εικόνα 22: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει ζωντανά κύτταρα MRC-5, μετά από 48/ωρη επίδραση 10 μM CBD (εικόνα παρόμοια με το control).



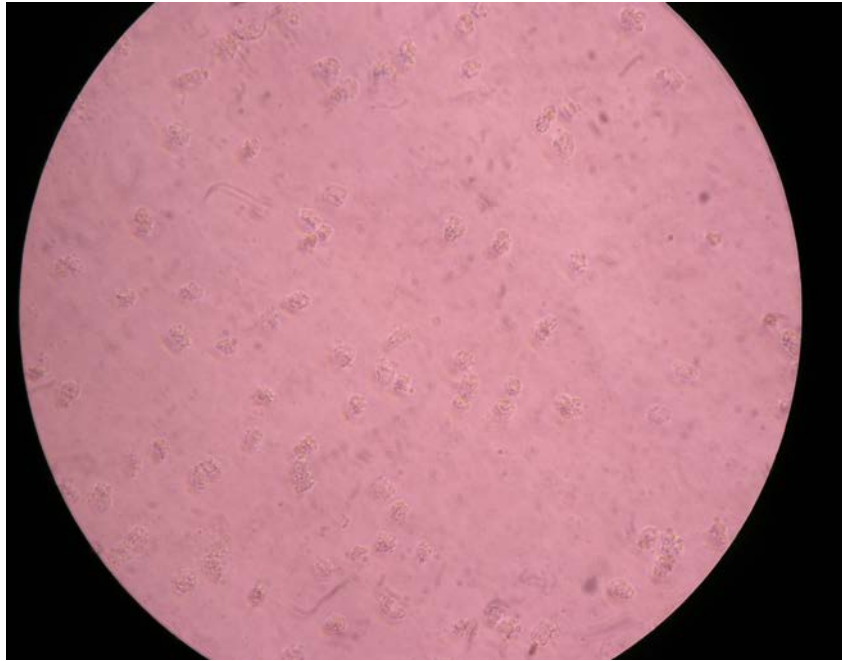
Εικόνα 23: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει ζωντανά κύτταρα MRC-5, μετά από 48/ωρη επίδραση 15 μM CBD (εικόνα παρόμοια με το control).



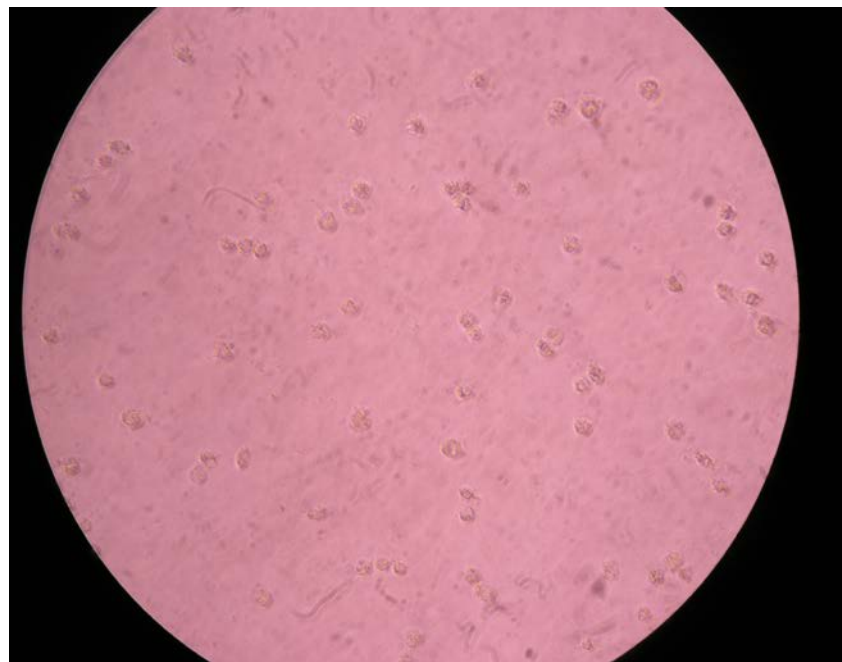
Εικόνα 24: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει ζωντανά κύτταρα MRC-5, μετά από 48/ωρη επίδραση 20μM CBD (εικόνα παρόμοια με το control).



Εικόνα 25: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει κύτταρα MRC-5, μετά από 48/ωρη επίδραση 30μM CBD (είναι χαρακτηριστική η συρρίκνωση των κυττάρων).

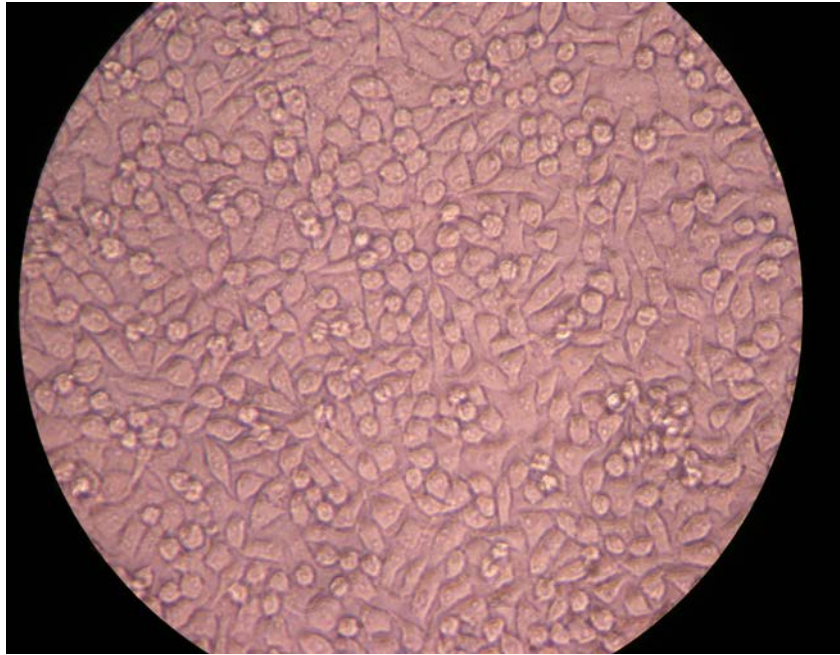


Εικόνα 26: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει νεκρά κύτταρα MRC-5, μετά από 48/ωρη επίδραση 40μM CBD.

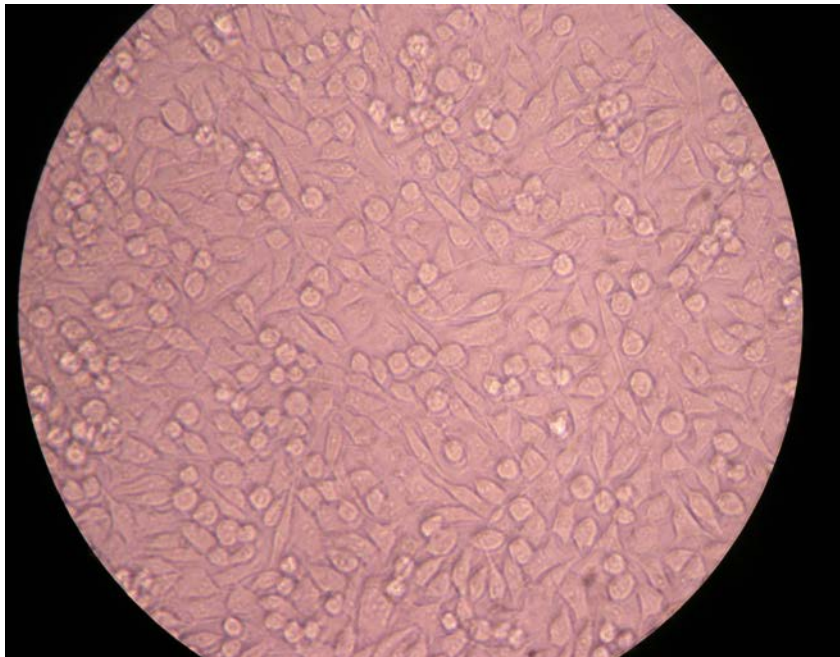


Εικόνα 27: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει νεκρά κύτταρα MRC-5, μετά από 48/ωρη επίδραση 60μM CBD.

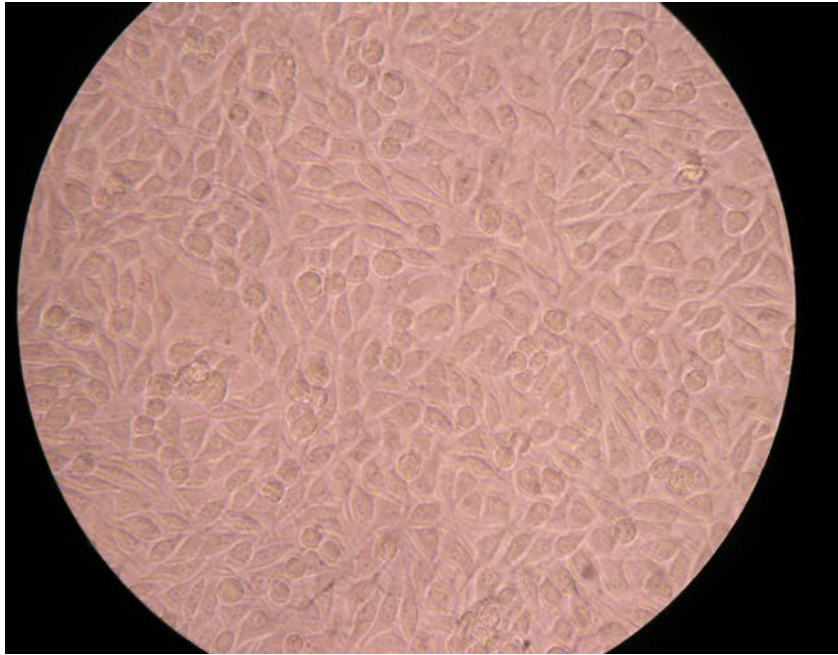
Κύτταρα MRC-5 (5000/well) - 48/ωρη επίδραση CBN.



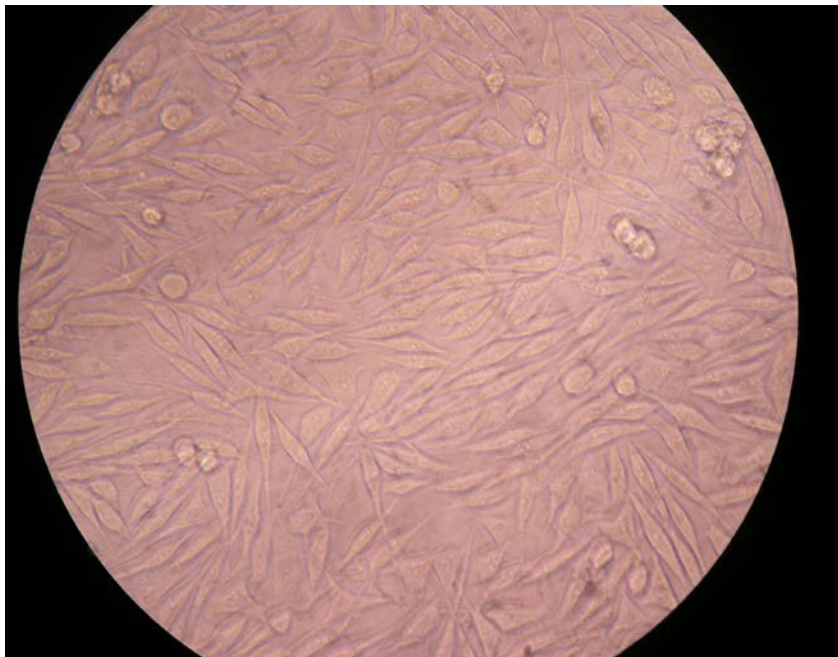
Εικόνα 28: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει ζωντανά κύτταρα MRC-5, μετά από 48/ωρη καλλιέργεια σε πλήρες θρεπτικό μέσο, χωρίς την επίδραση της CBN (control-μάρτυρας).



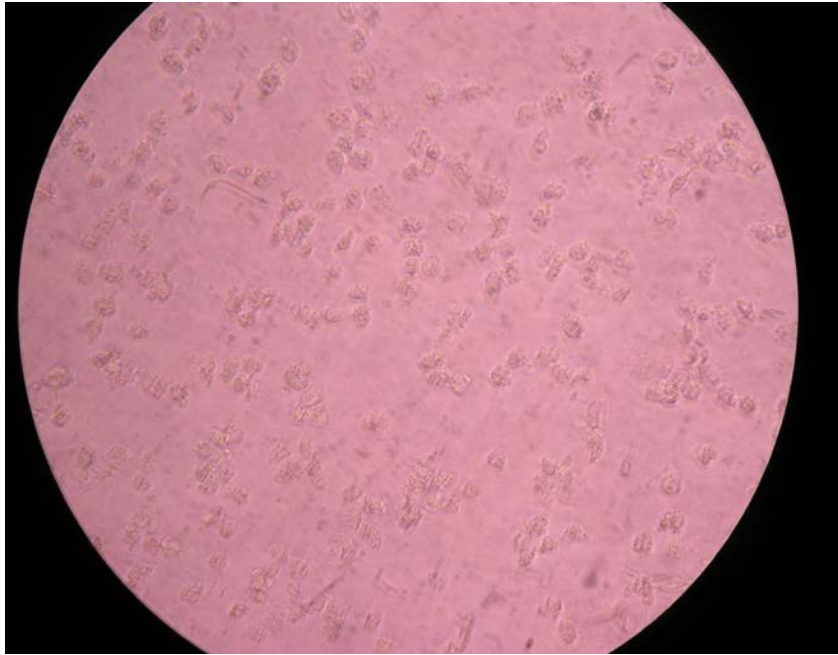
Εικόνα 29: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει ζωντανά κύτταρα MRC-5, μετά από 48/ωρη επώαση 5μM CBN (εικόνα παρόμοια με το control).



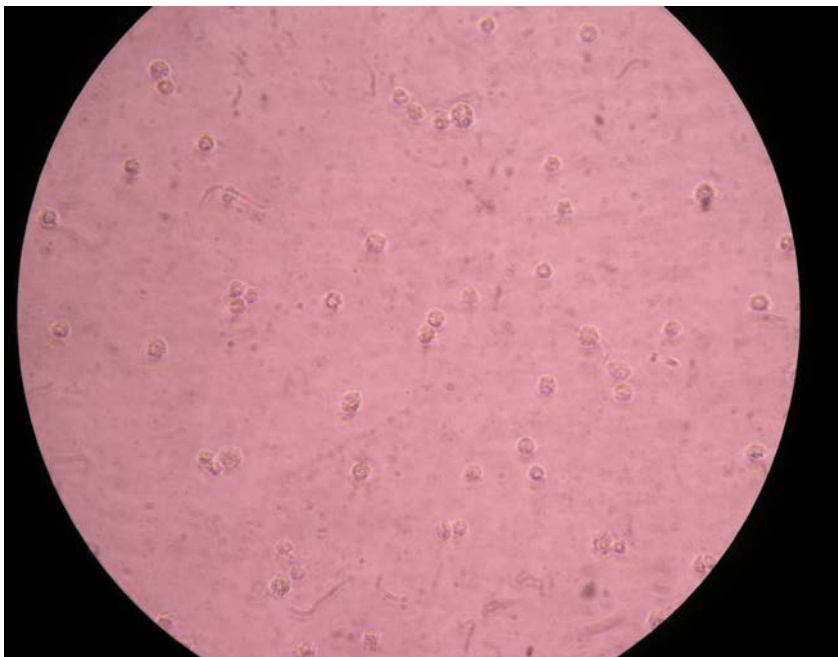
Εικόνα 30: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει ζωντανά κύτταρα MRC-5, μετά από 48/ωρη επίδραση 10μM CBN (εικόνα παρόμοια με το control).



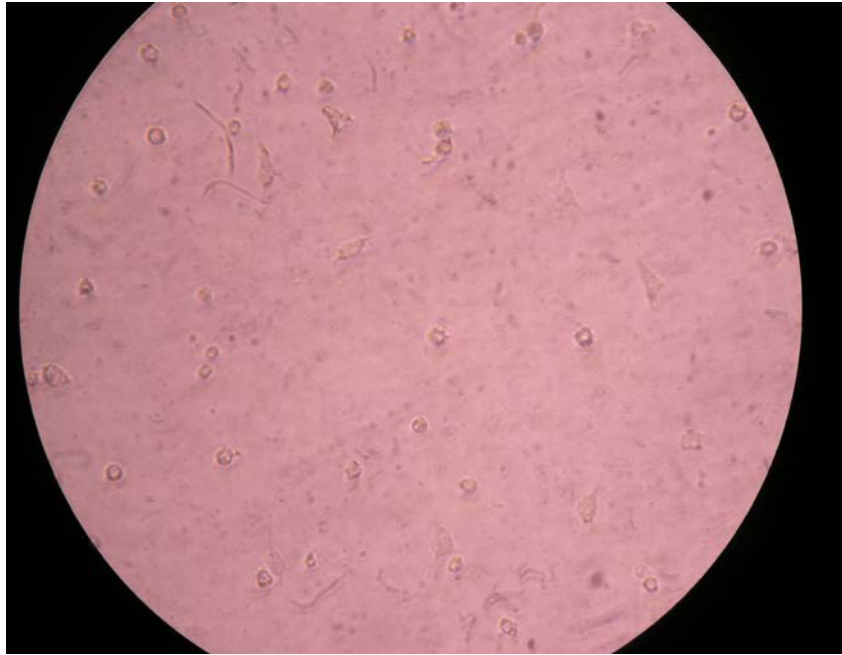
Εικόνα 31: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει ζωντανά κύτταρα MRC-5, μετά από 48/ωρη επίδραση 20μM CBN (εικόνα παρόμοια με το control).



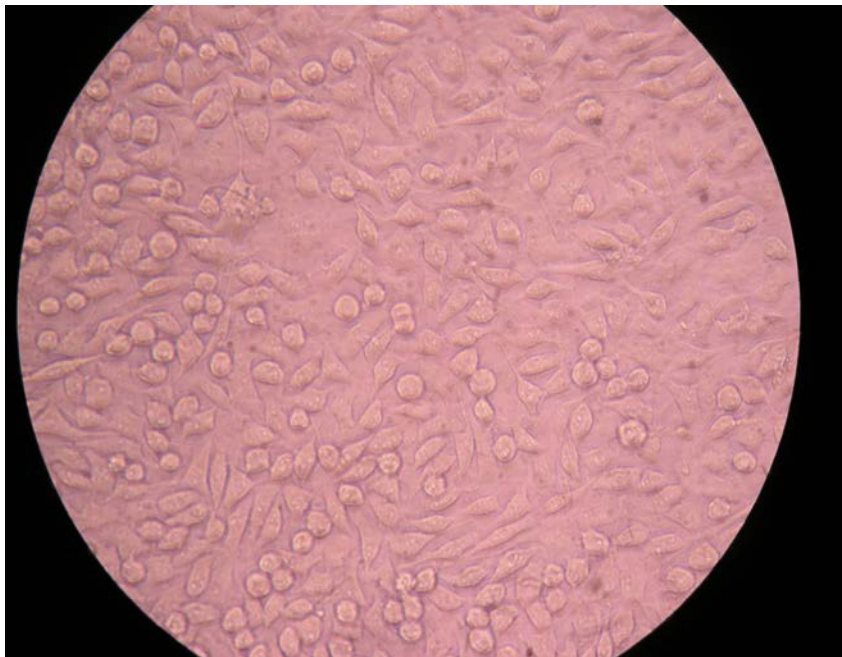
Εικόνα 32: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει κύτταρα MRC-5, μετά από 48/ωρη επίδραση 40μM CBN (είναι χαρακτηριστική η συρρίκνωση των κυττάρων).



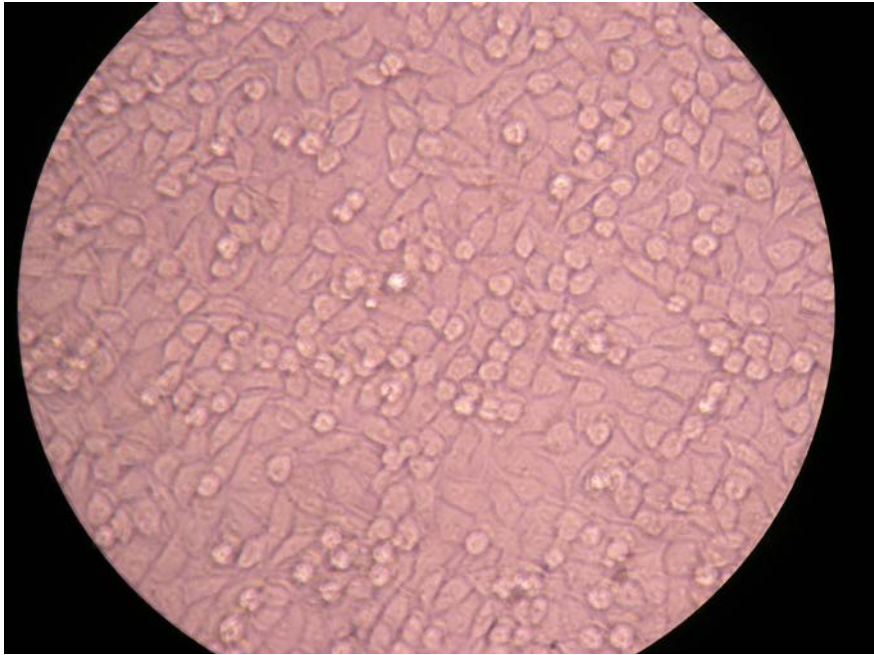
Εικόνα 33: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει νεκρά κύτταρα MRC-5, μετά από 48/ωρη επίδραση 80μM CBN.



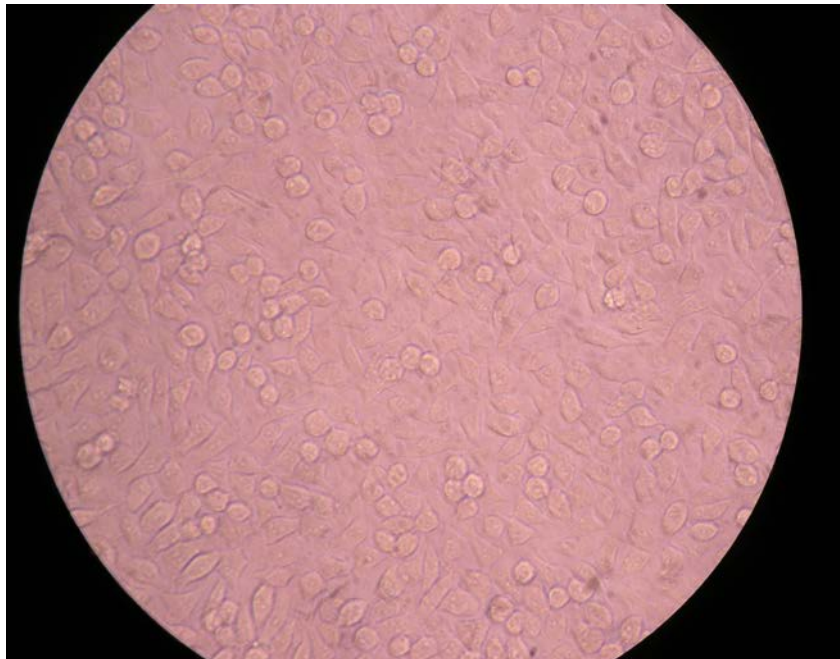
Εικόνα 34: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει νεκρά κύτταρα MRC-5, μετά από 48/ωρη επίδραση 160μM CBN.



Εικόνα 35: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει ζωντανά κύτταρα MRC-5, μετά από 48/ωρη επίδραση 4,97% MetOH (εικόνα παρόμοια με το control).



Εικόνα 36: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει ζωντανά κύτταρα MRC-5, μετά από 48/ωρη επίδραση 2,48% MetOH (εικόνα παρόμοια με το control).



Εικόνα 37: Ηλεκτρονιομικρογραφία που δείχνει ζωντανά κύτταρα MRC-5, μετά από 48/ωρη επίδραση 1,24% MetOH (εικόνα παρόμοια με το control).

Μέσα στα 15 ml θέλουμε να υπάρχει 0,01 M HCl, αλλά έχουμε HCl 12,1 M.

Ισχύει ο νόμος των αραιώσεων, $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$, όπου $C_1 = 12,1$ M HCl,

$C_2 = 0,01$ M HCl και $V_2 = 15$ ml. Τελικά $V_1 = 0,0124$ ml HCl ή $V_1 = 12,4$ μl HCl.

Το SDS θέλουμε να είναι 10%, ή 10gr/100ml. Δηλαδή στα 15ml τελικό όγκο, θα ζυγίσουμε και θα διαλύσουμε 1,5gr SDS, στη συνέχεια θα προσθέσουμε μέχρι τα 15ml όγκο δισαπεσταγμένο H_2O και τελικά θα προσθέσουμε και τα 12,4μl HCl.

- 7). Οι τέσσερις μικροπλάκες τοποθετούνται στη συνέχεια στον επωαστήρα, για ολονύκτια επώαση, (15 ώρες) και το επόμενο πρωί πραγματοποιείται μέτρηση των απορροφήσεων στα 570 nm, με μήκος κύματος αναφοράς τα 630nm, ώστε να μετρηθεί η οπτική πυκνότητα του περιεχομένου των πηγαδιών.

Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης προκύπτει ο μέσος όρος της οπτικής πυκνότητας των replicates wells που χρησιμοποιήθηκαν (τριπλά) για την κάθε συγκέντρωση της ένωσης που γίνεται η μελέτη, (αφού αφαιρεθεί πρώτα από όλες τις τιμές η οπτική πυκνότητα του αρνητικού control).

Αυτός ο μέσος όρος διαιρείται με τον μέσο όρο της απορρόφησης των control wells (χωρίς επίδραση της ένωσης, μόνο κύτταρα). Με τον τρόπο αυτό υπολογίζεται **το κλάσμα επιβίωσης (survival fraction , SF)** (δηλαδή η % κυτταρική επιβίωση) των κυττάρων για κάθε συγκέντρωση της ένωσης που χρησιμοποιήθηκε.

Τοποθετώντας **τα SF με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε ένα διάγραμμα**, προκύπτει η καμπύλη επιβίωσης των κυττάρων.

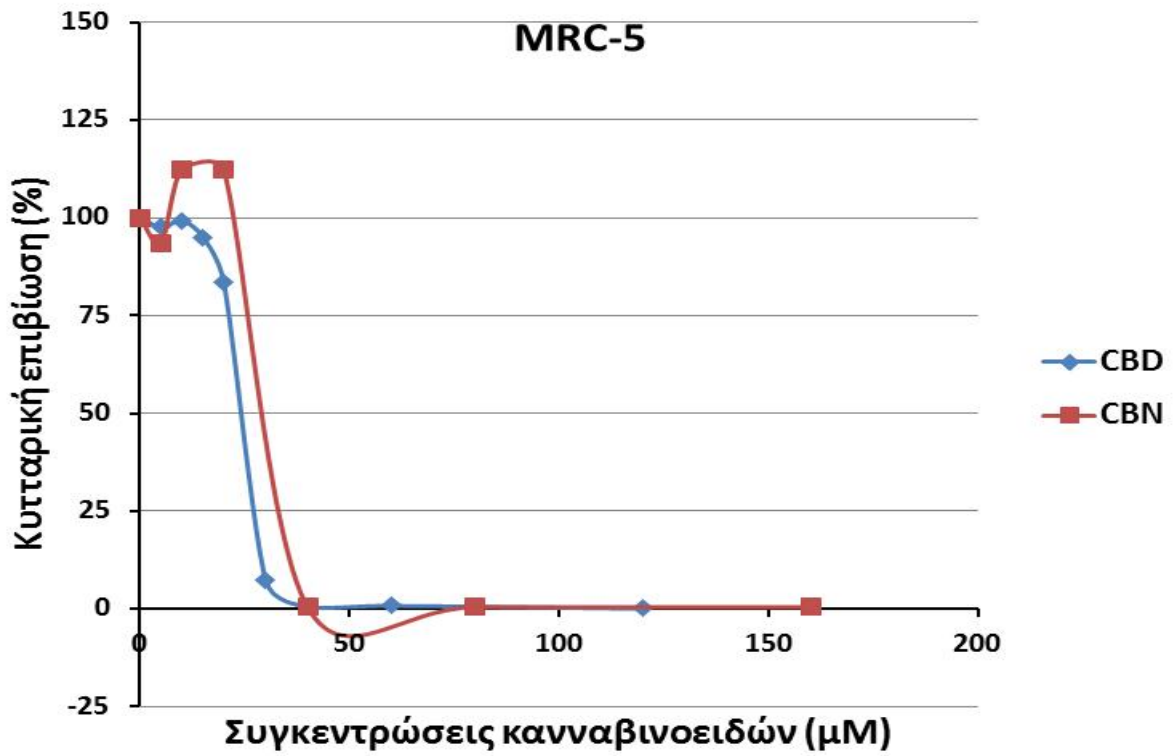
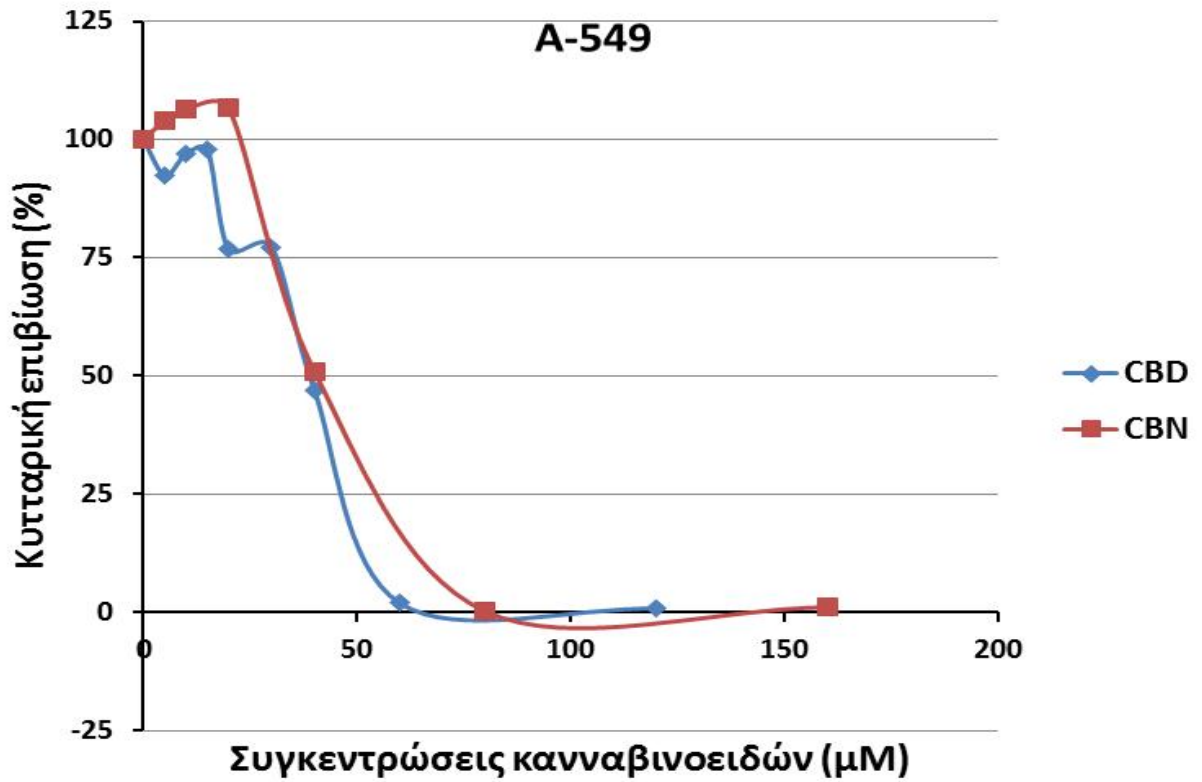
Αυτή η καμπύλη χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης η οποία προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων κατά 50% (IC_{50}).

Πίνακας 1 : Κυτταρική επιβίωση (%) των A-549, μετά από 48/ωρη επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων (μM) , των δυο κανναβινοειδών CBD και CBN.

A-549				
CBD (μM)	Κυτταρική επιβίωση%		CBN (μM)	Κυτταρική επιβίωση%
0	100		0	100
5	92,43		5	103,96
10	97,04		10	106,32
15	97,83		20	106,6
20	76,71		40	51
30	77,24		80	0,21
40	47,04		160	1,11
60	1,97			
120	0,79			

Πίνακας 2 : Κυτταρική επιβίωση (%) των MRC-5, μετά από 48/ωρη επίδραση των δυο κανναβινοειδών CBD και CBN.

MRC-5				
CBD (μM)	Κυτταρική επιβίωση%		CBN (μM)	Κυτταρική επιβίωση%
0	100		0	100
5	97,52		5	93,58
10	99,18		10	112,44
15	94,99		20	112,15
20	83,51		40	0,37
30	7,23		80	0,39
40	0,5		160	0,42
60	0,74			
120	0,02			



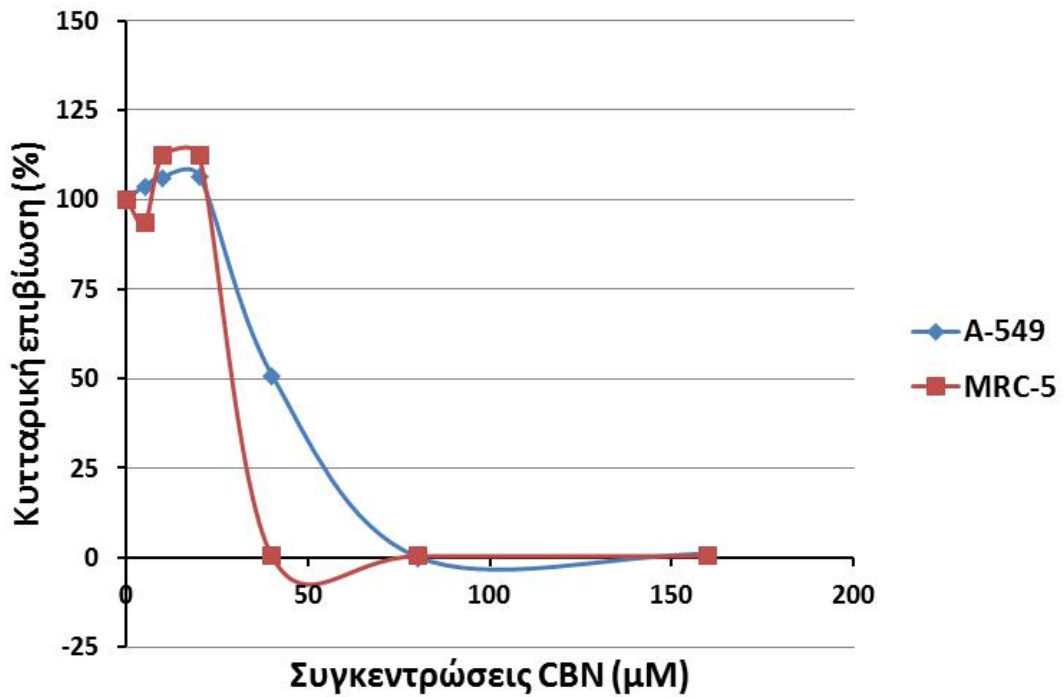
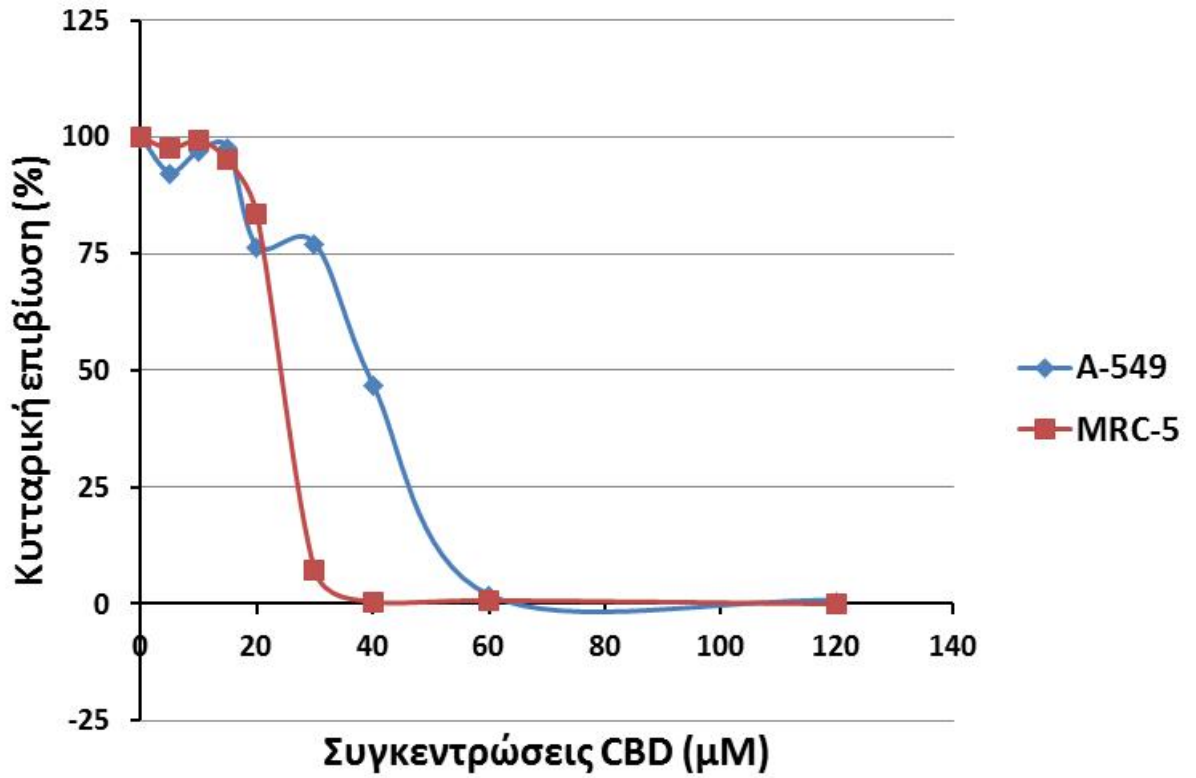
Πίνακας 3 : Κυτταρική επιβίωση (%) των δυο κυτταρικών σειρών A549 και MRC-5, μετά από 48/ωρη επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων (μM) της ένωσης CBD.

CBD (μM)	Κυτταρική επιβίωση (%)	
	A-549	MRC-5
0	100	100
5	92,43	97,52
10	97,04	99,18
15	97,83	94,99
20	76,71	83,51
30	77,24	7,23
40	47,04	0,5
60	1,97	0,74
120	0,79	0,02

Πίνακας 4: Κυτταρική επιβίωση (%) των δυο κυτταρικών σειρών A549 και MRC-5, μετά από 48/ωρη επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων (μM) της ένωσης CBN.

CBN (μM)	Κυτταρική επιβίωση (%)	
	A-549	MRC-5
0	100	100
5	103,96	93,58
10	106,32	112,44
20	106,6	112,15
40	51	0,37
80	0,21	0,39
160	1,11	0,42

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Πίνακας 5: Τιμές IC₅₀ για τα κανναβινοειδή CBD & CBN έναντι των κυτταρικών σειρών A-549 και MRC-5 (με τη μέθοδο MTT).

IC₅₀		
Κανναβινοειδή (μM)	A-549	MRC-5
CBD	38,90	24,18
CBN	40,60	29,00

ΠΕΙΡΑΜΑ (2).

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ 2 ΦΑΡΜΑΚΩΝ, CBD ΚΑΙ CBN, ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ A549, MRC-5 ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΗΝ ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ SRB.

1^η ημέρα.

Τεχνική ανακαλλιέργειας των κυττάρων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα **A549** και ‘αθανατοποιημένα’ κύτταρα πνεύμονα **MRC-5**. Για τα κύτταρα, ισχύει η γνωστή πορεία ανακαλλιέργειας.

Τεχνική μέτρησης των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο.**A). Μέτρηση των κυττάρων MRC-5.**

- 1). Σε ένα erendorf, προσθέτονται 200μl GM και 100μl (από το ανασυσταμένο ίζημα των κυττάρων), αραιώση 1:2 και γίνεται ανάδευση.
- 2). Σε μια πλάκα Neubauer, στην οποία έχει τοποθετηθεί καλυπτρίδα, προσθέτονται 10μl από το παραπάνω μίγμα, σε ειδική εσοχή κάτω από την καλυπτρίδα. Στη συνέχεια τα κύτταρα μετρούνται σε οπτικό μικροσκόπιο (X10) στα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα και από τις δυο πλευρές.
Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων στα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα της μιας πλευράς, είναι 760 κύτταρα, τα οποία διαιρούμενα με το τέσσερα, δίνουν 190 κύτταρα, τα οποία πολλαπλασιάζόμενα με το τρία (επειδή η αραιώση είναι 1:2), δίνουν 570×10^4 cells/ml.
Με τον ίδιο τρόπο υπολογισμού, ο αριθμός των κυττάρων από την άλλη πλευρά καλυπτρίδας είναι $604,5 \times 10^4$ cells/ml.
Δηλαδή ο μέσος όρος είναι **$587,25 \times 10^4$ cells/ml.**

B). Μέτρηση των κυττάρων A549.

Ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία, το αποτελέσματα της μέτρησης των κυττάρων A549 σε πλάκα Neubauer είναι: **$470,5 \times 10^4$ cells/ml.**

Υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων που απαιτούνται για το πείραμα.

A) Κύτταρα MRC-5.

Έχουμε $587,25 \times 10^4$ cells/ml.

Θέλουμε 5000 cells/well ή $0,5 \times 10^4$ cells/ 0,1ml (επειδή στο κάθε πηγαδάκι προσθέτονται 100μl κυττάρων). Δηλαδή θέλουμε 5×10^4 cells/ml.

B). Κύτταρα A549.

Έχουμε $470,5 \times 10^4$ cells/ml.

Θέλουμε 10000 cells/well ή 10×10^4 cells/ml (επειδή όπου well →100μl).

Υπολογισμός του stock κυττάρων που θα χρειαστούν για το πείραμα.

Στο συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιούνται 2 (δυο) κυτταρικές σειρές A549 και MRC-5 και θα ελεγχθούν 10 συνολικά συγκεντρώσεις (το control και 9 συγκεντρώσεις) 2 κανναβινοειδών, της CBD και CBN.

Δηλαδή θα χρειαστούν 3 (triplicate) x 10 (control + 9 dilutions),

δηλ. 30 wells x 0,1ml/well, δηλαδή 3ml x 2 drugs, **δηλαδή 6ml κύτταρα A549 και 6ml κύτταρα MRC-5.**

Θα ετοιμαστεί **stock 15ml** από τον κάθε κυτταρικό τύπο.

A) stock MRC-5.

Ισχύει ο νόμος $C1 \times V1 = C2 \times V2$.

Όπου $C1 = 587,25 \times 10^4$ cells/ml.

$C2 = 5 \times 10^4$ cells/ml.

$V2 = 15$ ml.

$587,25 \times 10^4$ c/ml X $V1 = 5 \times 10^4$ c/ml X 15 ml → $V1 = 0,1277$ ml κύτταρα (και θα χρειαστούν και 14,872 ml GM).

B) stock A549.

$$C1 \times V1 = C2 \times V2.$$

Όπου $C1=470,5 \times 10^4$ c/ml.

$C2=10 \times 10^4$ c/ml.

$V2=15$ ml.

$470,5 \times 10^4$ c/ml X $V1 = 10 \times 10^4$ c/ml X 15 ml → $V2= 0,3188$ ml κύτταρα (και θα χρειαστούν και 14,681 ml GM).

Χρησιμοποιούνται **2 (δύο)αποστειρωμένα τρυβλία των 100 mm (για το stock)** :

Στο πρώτο τρυβλίο ,MRC-5,προσθέτονται 14,872 ml GM και 0,1277 ml κύτταρα MRC-5 .

Στο δεύτερο τρυβλίο , A549,προσθέτονται 14,681ml GM και 0,3188 ml κύτταρα A549 .

Για το πείραμα, θα χρειαστούν δυο 96/well μικροπλάκες.

Στην πρώτη μικροπλάκα, προσθέτονται 100μl κύτταρα MRC-5 (από το stock) σε 30 πηγαδάκια (1 πηγαδάκι για το control και 9 πηγαδάκια για τις συγκεντρώσεις της CBD, επί τρεις φορές).

Επίσης προσθέτονται 100μl κύτταρα A549 (από το stock) σε άλλα 30 πηγαδάκια.

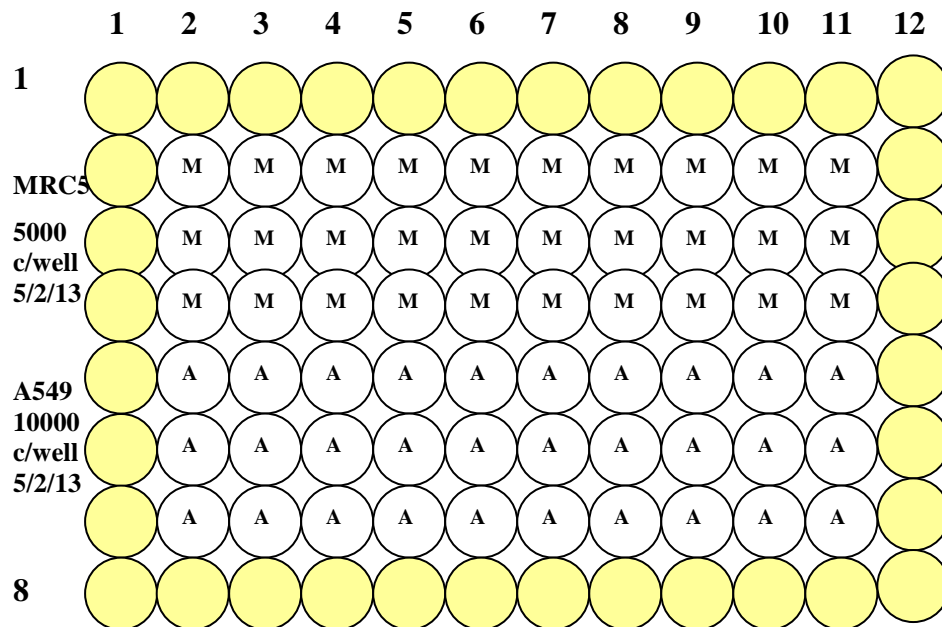
Περιμετρικά της πλάκας, προσθέτονται 200μl PBS(1X).

Στη δεύτερη μικροπλάκα, προσθέτονται 100μl κύτταρα MRC-5 σε 30 πηγαδάκια και επίσης προσθέτονται 100μl κύτταρα A549 σε άλλα τριάντα πηγαδάκια.

Περιμετρικά της πλάκας προσθέτονται 200μl PBS(1X).

Οι δυο (2) μικροπλάκες των 96 πηγαδιών τοποθετούνται στον επωαστήρα (incubator), στους 37°C, 5% CO₂ και υγρασία, για 24 ώρες.

96/well μικροπλάκα 5/2/2013



2^η ημέρα .**Προσθήκη των κανναβινοειδών, CBD, CBN.****CBD stock: 31,8 mM in EtOH****CBN stock: 3,2213 mM in MetOH.**

Θα ετοιμαστούν εννέα (9) αραιώσεις και για τις δυο ενώσεις, εκτός από το control. Για κάθε αραιώση, θα χρειαστούν 3πηγαδάκια x 100μl=300μl για την κυτταρική σειρά A549 και άλλα 300μl για την κυτταρική σειρά MRC-5, δηλαδή συνολικά 600μl.

Θα ετοιμαστούν **2ml για κάθε μια από τις αραιώσεις της ένωσης CBD και 1,2 ml για κάθε μια από τις αραιώσεις της ένωσης CBN.**

Και για τις δυο ενώσεις CBD και CBN, οι τελικές(final) και οι αρχικές(initial) συγκεντρώσεις, που θα ετοιμαστούν είναι οι εξής:

F (μM) : 0 ,20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 80**I (μM) : 0, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160****Για την ένωση CBD,**

Θα ετοιμαστεί αρχικά το stock της μεγαλύτερης συγκέντρωσης, δηλαδή τα 160μM, από το οποίο θα μεταφερθούν οι σωστοί όγκοι, για να γίνουν οι μικρότερες συγκεντρώσεις.

Ισχύει ο νόμος των αραιώσεων: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$, όπου $C_1=160\mu\text{M}$, $V_2=2\text{ml}$
 όπου $C_2=120\mu\text{M}$, δηλαδή $160\mu\text{M} \times V_1=120\mu\text{M} \times 2\text{ml} \rightarrow V_1=1500\mu\text{l}$ και **500μl GM**,
 όπου $C_2=100\mu\text{M}$, δηλαδή $160\mu\text{M} \times V_1=100\mu\text{M} \times 2\text{ml} \rightarrow V_1=1250\mu\text{l}$ και **750μl GM**,
 όπου $C_2=90\mu\text{M}$, δηλαδή $160\mu\text{M} \times V_1=90\mu\text{M} \times 2\text{ml} \rightarrow V_1=1125\mu\text{l}$ και **875μl GM**,
 όπου $C_2=80\mu\text{M}$, δηλαδή $160\mu\text{M} \times V_1=80\mu\text{M} \times 2\text{ml} \rightarrow V_1=1000\mu\text{l}$ και **1000μl GM**,
 όπου $C_2=70\mu\text{M}$, δηλαδή $160\mu\text{M} \times V_1=70\mu\text{M} \times 2\text{ml} \rightarrow V_1=875\mu\text{l}$ και **1125μl GM**,
 όπου $C_2=60\mu\text{M}$, δηλαδή $160\mu\text{M} \times V_1=60\mu\text{M} \times 2\text{ml} \rightarrow V_1=750\mu\text{l}$ και **1250 μl GM**,
 όπου $C_2=50\mu\text{M}$, δηλαδή $160\mu\text{M} \times V_1=50\mu\text{M} \times 2\text{ml} \rightarrow V_1=625\mu\text{l}$ και **1375 μl GM**,
 όπου $C_2=40\mu\text{M}$, δηλαδή $160\mu\text{M} \times V_1=40\mu\text{M} \times 2\text{ml} \rightarrow V_1=500\mu\text{l}$ και **1500 μl GM**.

Θα χρειαστεί και για τη συγκέντρωση **160μM**, όγκος **2000μl**.

Αν αθροιστούν όλοι οι παραπάνω όγκοι, προκύπτει το άθροισμα 9625μl ή

10ml περίπου. Τόσος είναι ο όγκος της συγκέντρωσης 160μM, που θα ετοιμαστεί.

CBD: Προετοιμασία της συγκέντρωσης 160μM / 10ml (σε falcon των 15ml).

$C1 \times V1 = C2 \times V2$, δηλαδή $31800\mu\text{M} \times a \text{ ml} = 160\mu\text{M} \times 10 \text{ ml} \rightarrow a=0,0503\text{ml}$ ή

50,3μl από το CBD stock και 9949,7μl GM.

Οι αραιώσεις θα γίνουν σε μικροπλάκα των 12 πηγαδιών, όπως φαίνεται στο πιο κάτω σχήμα.

12/μικροπλάκα

CBD I (μM)

	1	2	3	4
1	0	40	50	60
2	70	80	90	100
3	120	160		

Αρχικά προστίθεται GM σε όλα τα πηγαδάκια ως εξής:

Στο πηγαδάκι των 120μM, 500μl GM.

Στο πηγαδάκι των 100μM, 750μl GM.

Στο πηγαδάκι των 90μM, 875μl GM.

Στο πηγαδάκι των 80μM, 1000μl GM.

Στο πηγαδάκι των 70μM, 1125μl GM.

Στο πηγαδάκι των 60μM, 1250μl GM.

Στο πηγαδάκι των 50μM, 1375μl GM.

Στο πηγαδάκι των 40μM, 1500μl GM.

Στο control, (0μM) 2000μl GM.

Στη συνέχεια, προστίθεται στο πηγαδάκι των 160μM, το stock των 10ml (9949,7μl GM και 50,3μl CBD) και γίνεται καλή ανάδευση.

Έπειτα μεταφέρονται από το πηγαδάκι των 160μM, οι παρακάτω όγκοι στα άλλα πηγαδάκια ως εξής:

1500μl στο πηγαδάκι των 120μM, 1250μl στο πηγαδάκι των 100μM, 1125μl στο πηγαδάκι των 90μM, 1000μl στο πηγαδάκι των 80μM, 875μl στο πηγαδάκι των 70μM, 750μl στο πηγαδάκι των 60μM, 625μl στο πηγαδάκι των 50μM, 500μl στο πηγαδάκι των 40μM.

Η ίδια διαδικασία ακολουθείται για την παρασκευή 1,2ml για κάθε μια από τις αραιώσεις της CBN.

Ισχύει ο νόμος των αραιώσεων: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$, όπου $C_1=160\mu\text{M}$, $V_2=1,2\text{ml}$ όπου $C_2=120\mu\text{M}$, δηλαδή $160\mu\text{M} \times V_1=120\mu\text{M} \times 1,2\text{ml} \rightarrow V_2=900\mu\text{l}$ και **300μl GM**, όπου $C_2=100\mu\text{M}$, δηλαδή $160\mu\text{M} \times V_1=100\mu\text{M} \times 1,2\text{ml} \rightarrow V_1=750\mu\text{l}$ και **450μl GM**, όπου $C_2=90\mu\text{M}$, δηλαδή $160\mu\text{M} \times V_1=90\mu\text{M} \times 1,2\text{ml} \rightarrow V_2=675\mu\text{l}$ και **525μl GM**, όπου $C_2=80\mu\text{M}$, δηλαδή $160\mu\text{M} \times V_1=80\mu\text{M} \times 1,2\text{ml} \rightarrow V_2=600\mu\text{l}$ και **600μl GM**, όπου $C_2=70\mu\text{M}$, δηλαδή $160\mu\text{M} \times V_1=70\mu\text{M} \times 1,2\text{ml} \rightarrow V_2=525\mu\text{l}$ και **675μl GM**, όπου $C_2=60\mu\text{M}$, δηλαδή $160\mu\text{M} \times V_1=60\mu\text{M} \times 1,2\text{ml} \rightarrow V_2=450\mu\text{l}$ και **750 μl GM**, όπου $C_2=50\mu\text{M}$, δηλαδή $160\mu\text{M} \times V_1=50\mu\text{M} \times 1,2\text{ml} \rightarrow V_2=375\mu\text{l}$ και **825 μl GM**, όπου $C_2=40\mu\text{M}$, δηλαδή $160\mu\text{M} \times V_2=40\mu\text{M} \times 1,2\text{ml} \rightarrow V_2=300\mu\text{l}$ και **900 μl GM**. Θα χρειαστεί και για τη συγκέντρωση **160μM**, όγκος **1200μl**.

Αν αθροιστούν όλοι οι παραπάνω όγκοι, προκύπτει το άθροισμα 5775μl ή **6ml περίπου**. Τόσος είναι ο όγκος της συγκέντρωσης 160μM, που θα ετοιμαστεί.

CBN: Προετοιμασία της συγκέντρωσης 160μM / 6ml (σε falcon των 15ml).

$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$, δηλαδή $3221\mu\text{M} \times a \text{ ml} = 160\mu\text{M} \times 6 \text{ ml} \rightarrow a=0,298\text{ml}$ ή

298μl από το CBN stock και 5702μl GM.

Οι αραιώσεις θα γίνουν σε μικροπλάκα των 12 πηγαδιών, όπως φαίνεται στο πιο κάτω σχήμα.

12/well μικροπλάκα

CBN I (μM)

	1	2	3	4
1	0	40	50	60
2	70	80	90	100
3	120	160		

Αρχικά προστίθεται GM σε όλα τα πηγαδάκια ως εξής:

Στο πηγαδάκι των 120μM, 300μl GM.

Στο πηγαδάκι των 100μM, 450μl GM.

Στο πηγαδάκι των 90μM, 525μl GM.

Στο πηγαδάκι των 80μM, 600μl GM.

Στο πηγαδάκι των 70μM, 675μl GM.

Στο πηγαδάκι των 60μM, 750μl GM.

Στο πηγαδάκι των 50μM, 825μl GM.

Στο πηγαδάκι των 40μM, 900μl GM.

Στο control, (0μM) 2000μl GM.

Στη συνέχεια, προστίθεται στο πηγαδάκι των 160μM, το stock των 6ml (5702μl GM και 298μl CBN) και γίνεται καλή ανάδευση.

Έπειτα μεταφέρονται από το πηγαδάκι των 160μM, οι παρακάτω όγκοι στα άλλα πηγαδάκια ως εξής:

900μl στο πηγαδάκι των 120μM, 750μl στο πηγαδάκι των 100μM, 675μl στο πηγαδάκι των 90μM, 600μl στο πηγαδάκι των 80μM, 525μl στο πηγαδάκι των 70μM, 450μl στο πηγαδάκι των 60μM, 375μl στο πηγαδάκι των 50μM, 300μl στο πηγαδάκι των 40μM.

Στη συνέχεια, βγαίνουν οι δυο 96/μικροπλάκες από τον επωαστήρα (μετά από την 24/ωρη επώαση) και αφού επιβεβαιωθεί μικροσκοπικά ότι υπάρχει ο ίδιος αριθμός κυττάρων σε όλα τα πηγαδάκια, ακολουθεί η προσθήκη **100μl της αντίστοιχης αραιώσεως των δυο ενώσεων, στην μια πλάκα της CBD και στην άλλη πλάκα της CBN.**

96/well μικροπλάκα 5/2/2013: **CBD 6/2/2013 - I(μM)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1												
MRC5		0	40	50	60	70	80	90	100	120	160	
5000		0	40	50	60	70	80	90	100	120	160	
c/well		0	40	50	60	70	80	90	100	120	160	
5/2/13		0	40	50	60	70	80	90	100	120	160	
A549		0	40	50	60	70	80	90	100	120	160	
10000		0	40	50	60	70	80	90	100	120	160	
c/well		0	40	50	60	70	80	90	100	120	160	
5/2/13		0	40	50	60	70	80	90	100	120	160	
8												

Με τον ίδιο τρόπο, προσθέτονται 100μl της αντίστοιχης αραιώσης της ένωσης **CBN**, στην άλλη 96/well μικροπλάκα.

Οι δυο 96/well μικροπλάκες τοποθετούνται στον επωαστήρα, στους 37°C, 5%CO₂ και υγρασία, για 48 ώρες.

4^η ημέρα.**Χρωματομετρική δοκιμασία SRB.**

Αφού τα κύτταρα εκτεθούν στην παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων των ενώσεων CBD και CBN επί 48h , ακολουθεί η εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης των ενώσεων μέσω της χρωματομετρικής μεθόδου SRB.

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα της χρωστικής sulforhodamine B (SRB) να δεσμεύεται ηλεκτροστατικά και εξαρτώμενα από το pH σε κατάλοιπα βασικών πρωτεϊνικών αμινοξέων (χρώση των κυττάρων), από μονιμοποιημένα με τριχλωροοξικό οξύ κύτταρα. Κάτω από ήπια όξινες συνθήκες προσδένεται στα κύτταρα και κάτω από ήπια βασικές συνθήκες μπορεί να εκχυλιστεί και να διαλυτοποιηθεί για την μέτρηση.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- 1). Αρχικά απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό με αποστράγγιση των 96-well μικροπλακών.
- 2). Στη συνέχεια προσθέτονται 50μL 10% ψυχρού τριχλωροοξικού οξέος (TCA) σε κάθε πηγαδάκι, για να μονιμοποιηθούν τα κύτταρα, και οι μικροπλάκες τοποθετούνται στο ψυγείο (4°C) για 30 λεπτά.
- 3). Ακολουθούν 5 πλύσεις με νερό της βρύσης. Το νερό πρέπει να πέφτει πλάγια και στην άκρη των μικροπλακών κι όχι με δυνατή ροή, ώστε να μην ξεκολλήσουν τα μονιμοποιημένα κύτταρα.
- 4). Οι μικροπλάκες αποστραγγίζονται ελαφρώς με αναστροφή σε διηθητικό χαρτί και χωρίς το καπάκι αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες (εναλλακτικά για πιο γρήγορη διεκπεραίωση της δοκιμασίας, οι μικροπλάκες μπορούν να στεγνώσουν με τοποθέτησή τους σε κλίβανο στους 30-40°C , ή μπορεί να χρησιμοποιηθεί κοινό σεσουάρ.)
- 5). Στη συνέχεια προσθέτονται 70 μL 0,4% SRB σε διάλυμα 1% οξικού οξέος, σε κάθε πηγαδάκι και οι μικροπλάκες αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου.
- 6). 20 λεπτά μετά, ακολουθούν 5 πλύσεις με 1% οξικό οξύ, έτσι ώστε να απομακρυνθεί όλη η χρωστική που δεν είχε προσδεθεί στα κύτταρα.

- 7). Οι μικροπλάκες χωρίς το καπάκι αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 24ώρες (ή πραγματοποιείται στέγνωμα με εναλλακτικό τρόπο, όπως προηγουμένως).
- 8). Για την εκχύλιση της χρωστικής προσθέτονται 200 μ L 10mM unbuffered Tris-base/well, και οι μικροπλάκες τοποθετούνται σε μηχανικό ανακινήτηρα για 10 λεπτά.
- 9). Αμέσως μετά την ανακίνηση πραγματοποιείται μέτρηση των απορροφήσεων στα 492 nm, με μήκος κύματος αναφοράς τα 630nm, ώστε να μετρηθεί η οπτική πυκνότητα του περιεχομένου των πηγαδιών.

Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης προκύπτει ο μέσος όρος της οπτικής πυκνότητας των replicates wells που χρησιμοποιήθηκαν (τριπλά) για την κάθε συγκέντρωση της ένωσης που γίνεται η μελέτη.

Αυτός ο μέσος όρος διαιρείται με τον μέσο όρο της απορρόφησης των πηγαδιών με το control (μάρτυρα), (χωρίς επίδραση της ένωσης, μόνο κύτταρα). Με τον τρόπο αυτό υπολογίζεται το κλάσμα επιβίωσης (survival fraction , SF) (δηλαδή η % κυτταρική επιβίωση) των κυττάρων για κάθε συγκέντρωση της ένωσης που χρησιμοποιήθηκε.

Τοποθετώντας τα SF με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε ένα διάγραμμα, προκύπτει η καμπύλη επιβίωσης των κυττάρων.

Αυτή η καμπύλη χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης η οποία προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων κατά 50% (IC_{50}).

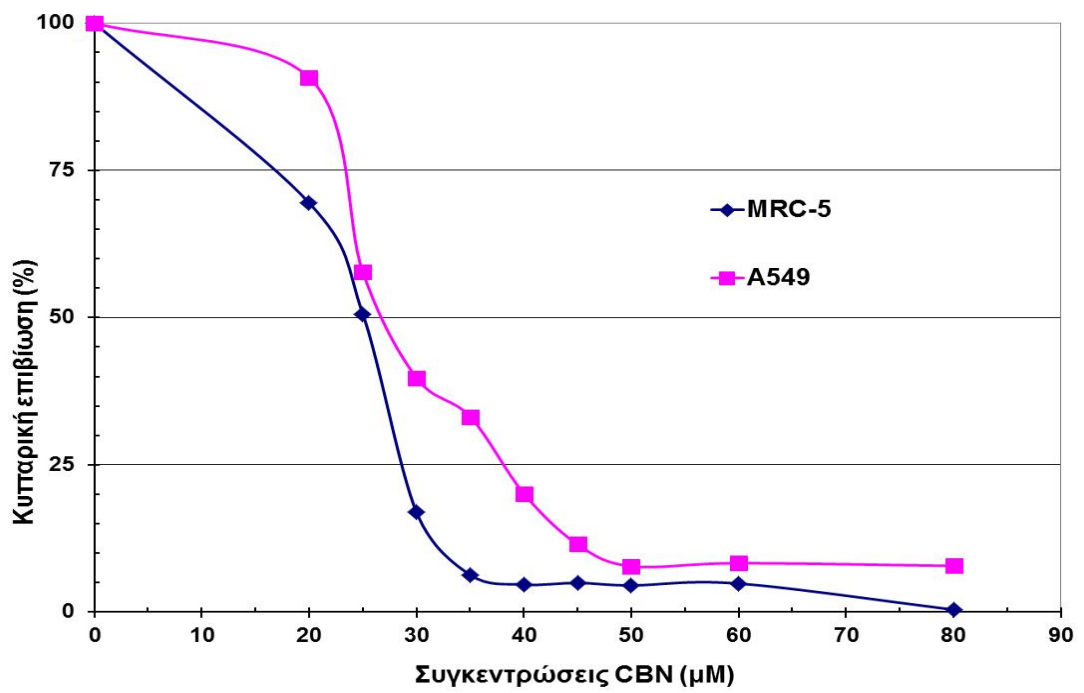
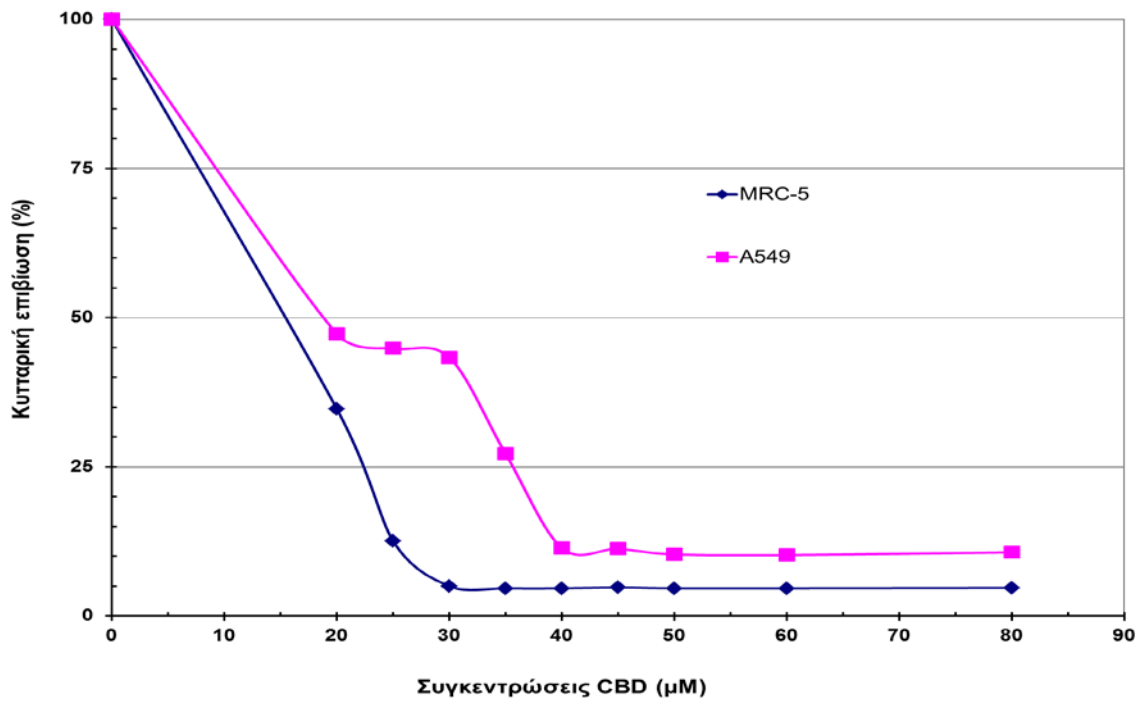
Πίνακας 6: Κυτταρική επιβίωση (%) των κυτταρικών σειρών MRC-5 και A549 μετά από 48/ωρη επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων της ένωσης CBD (μM).

CBD (μM)	Κυτταρική επιβίωση (%)	
	MRC-5	A549
0	100	100
20	34,698	47,257
25	12,55	44,879
30	5	43,306
35	4,63	27,196
40	4,63	11,392
45	4,765	11,239
50	4,63	10,318
60	4,63	10,203
80	4,698	10,664

Πίνακας 7: Κυτταρική επιβίωση (%) των κυτταρικών σειρών MRC-5 και A549 μετά από 48/ωρη επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων της ένωσης CBN (μM).

CBN (μM)	Κυτταρική επιβίωση (%)	
	MRC-5	A549
0	100	100
20	69,492	90,772
25	50,606	57,701
30	16,955	39,77
35	6,315	33,169
40	4,671	20,099
45	4,960	11,494
50	4,527	7,783
60	4,844	8,309
80	0,427	7,849

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



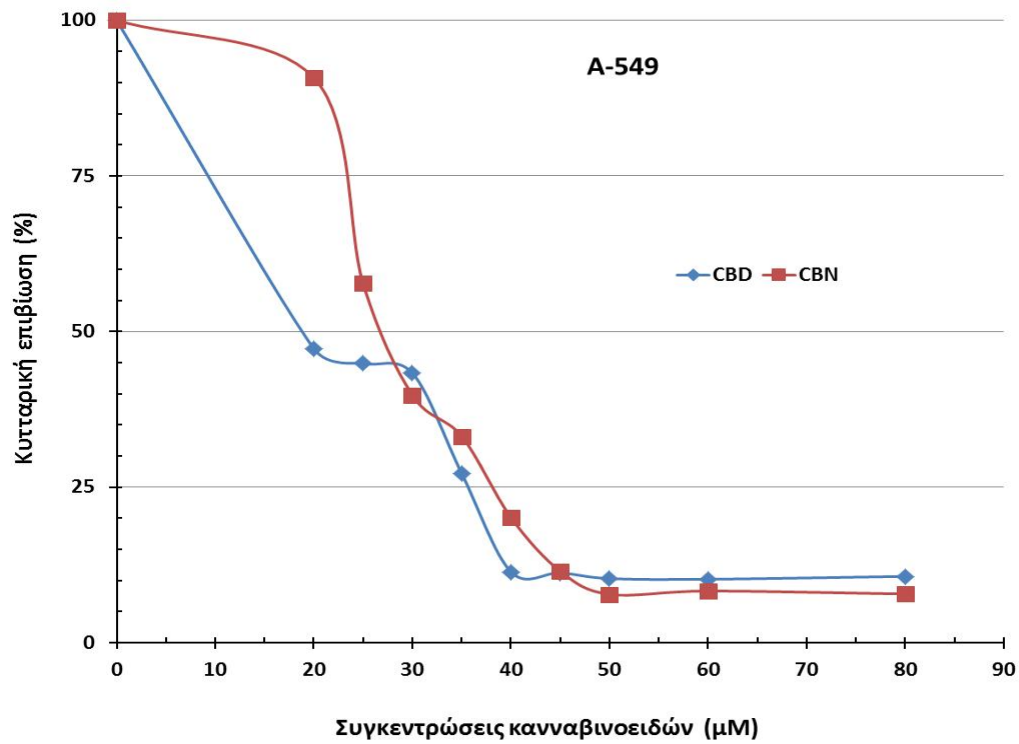
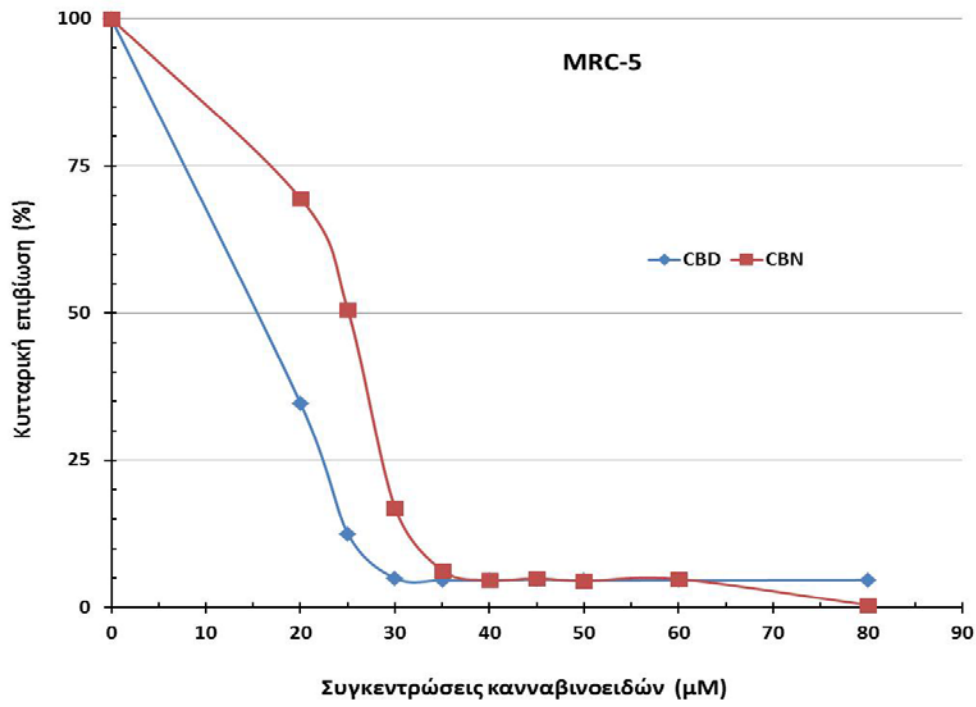
Πίνακας 8: Κυτταρική επιβίωση (%) των MRC-5, μετά από 48/ωρη επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων των δυο κανναβινοειδών CBD και CBN.

MRC-5				
CBD (μM)	Κυτταρική επιβίωση %		CBN (μM)	Κυτταρική επιβίωση %
0	100		0	100
20	34,698		20	69,492
25	12,55		25	50,606
30	5		30	16,955
35	4,63		35	6,315
40	4,63		40	4,671
45	4,765		45	4,96
50	4,63		50	4,527
60	4,63		60	4,844
80	4,698		80	0,427

Πίνακας 9: Κυτταρική επιβίωση (%) των A549, μετά από 48/ωρη επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων των δυο κανναβινοειδών CBD και CBN.

A549				
CBD (μM)	Κυτταρική επιβίωση %		CBN (μM)	Κυτταρική επιβίωση %
0	100		0	100
20	47,257		20	90,772
25	44,879		25	57,701
30	43,306		30	39,77
35	27,196		35	33,169
40	11,392		40	20,099
45	11,239		45	11,494
50	10,318		50	7,783
60	10,203		60	8,309
80	10,604		80	7,849

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Πίνακας 10: Τιμές IC₅₀ για τα κανναβινοειδή CBD & CBN έναντι των κυτταρικών σειρών A-549 και MRC-5 (με τη μέθοδο SRB)

IC ₅₀		
Κανναβινοειδή (μM)	A-549	MRC-5
CBD	19,20	15,70
CBN	26,75	25,00

ΣΤ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- 1) Το κανναβινοειδές CBD εμφανίστηκε περισσότερο δραστικό απ' ό τι το CBN και στις δύο κυτταρικές σειρές (1,6 και 1,4 φορές περισσότερο δραστικό έναντι της MRC-5 και A-549 κυτταρικής σειράς αντίστοιχα, με τη μέθοδο SRB. Οι αντίστοιχες τιμές που προέκυψαν από τη μέθοδο MTT είναι: 1,2 και 1,1, αντίστοιχα).
- 2) Τα κύτταρα MRC-5 βρέθηκαν πιο ευαίσθητα από τα A-549 έναντι του κανναβινοειδούς CBD (1,2 και 1,6 φορές περισσότερο ευαίσθητα για τις μεθόδους SRB & MTT, αντίστοιχα).
- 3) Τα κύτταρα MRC-5 βρέθηκαν πιο ευαίσθητα από τα A-549 έναντι του κανναβινοειδούς CBN (1,4 φορές περισσότερο ευαίσθητα για τη μέθοδο MTT), ενώ για τη μέθοδο SRB οι δύο κυτταρικές σειρές εμφάνισαν την ίδια ευαισθησία.
- 4) Για όλα τα αποτελέσματα οι τιμές IC_{50} , που προέκυψαν από τη μέθοδο SRB βρέθηκαν να είναι μικρότερες από τις αντίστοιχες τιμές της μεθόδου MTT.

ΣΤ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Άμεση αντικαρκινική δράση των κανναβινοειδών: Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι τα κανναβινοειδή –τόσο τα φυσικά όσο και τα συνθετικά- είναι ενδιαφέροντα βιολογικά μόρια.

Οι επιστήμονες άρχισαν στη δεκαετία του 1970 να ασχολούνται με τις αντικαρκινικές ιδιότητες των κανναβινοειδών, και έχουν δημοσιευθεί από τότε αρκετές εκατοντάδες άρθρα σχετικά με τα κανναβινοειδή και τον καρκίνο.

Υπάρχουν σημαντικά και αυξανόμενα επιστημονικά δεδομένα άμεσης αντικαρκινικής δραστηριότητας των κανναβινοειδών, κυρίως των CB1 και CB2 αγωνιστών (που αναστρέφονται από τους ανταγωνιστές) και της CBD, σε ένα μεγάλο εύρος καρκινικών τύπων.

Διαταραχές του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος έχουν εμπλακεί στην ρύθμιση της αύξησης του μεγέθους του καρκίνου με έναν μεγάλο αριθμό υποδοχέων στις καρκινικές κυτταρικές καλλιέργειες και βρέθηκε ότι οι αντικαρκινικές ενέργειες μεσολαβούνται από γνωστές αλληλεπιδράσεις υποδοχέων κανναβινοειδών.

Πράγματι, οι σύνθετες αλληλεπιδράσεις του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος και των υποδοχέων, οδηγούν σε μεγαλύτερη επιστημονική κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους αναπτύσσεται ο καρκίνος.

Η αντικαρκινική δραστηριότητα σε μελέτες *in vitro* ανθρώπινων ιστών, έδειξε υποχώρηση των όγκων, μειώσεις στην επαναγγείωση (προσφορά αίματος) και μείωση των μεταστάσεων (δευτερογενείς όγκοι), όπως επίσης και μια άμεση πρόκληση θανάτου (απόπτωση) στα καρκινικά κύτταρα.

Τα φάρμακα που βασίζονται στην κάνναβη φαίνεται ότι είναι πολλά υποσχόμενα σαν αποτελεσματικές αντικαρκινικές θεραπείες, κυρίως συνδεδεμένα με τις υπάρχουσες ή τις καινούργιες (γενετικά προσαρμοσμένες) χημειοθεραπείες.

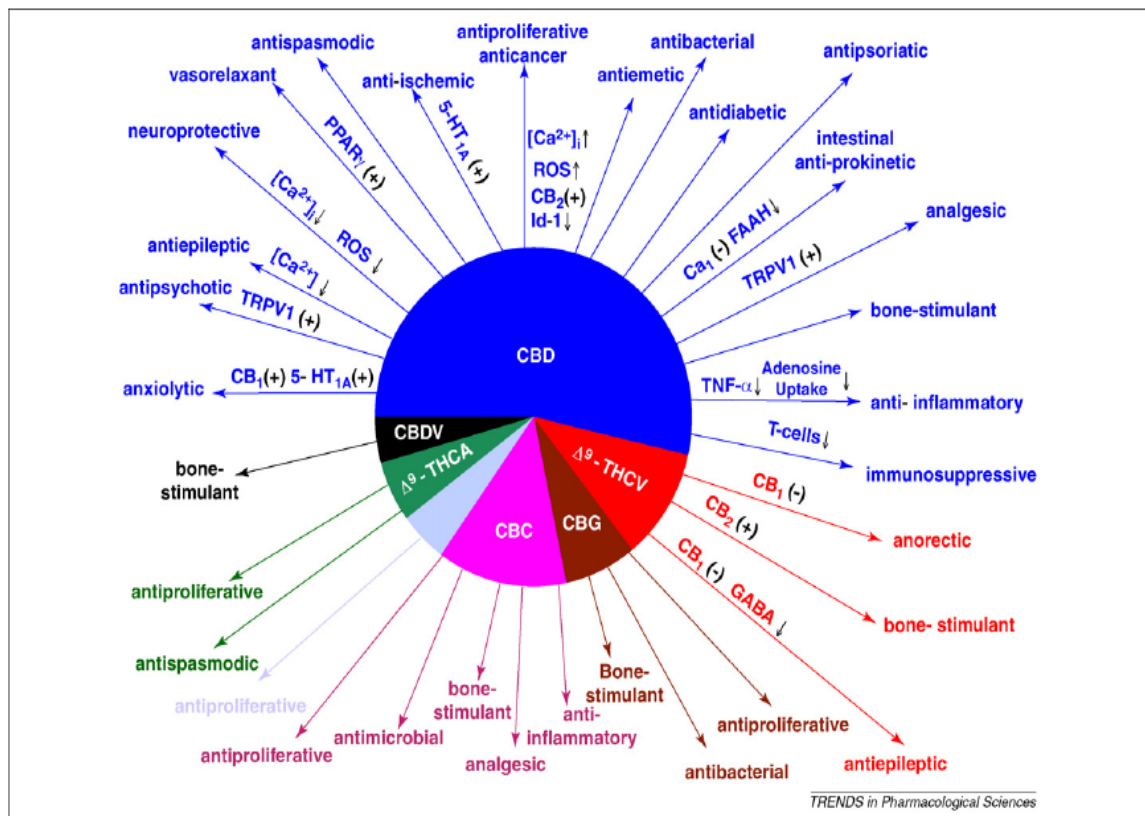
Μη ψυχοδραστικά φυτοκκανναβινοειδή: Πρόσφατες ανακαλύψεις, υποθέτουν ότι τα μη ψυχοδραστικά φυτοκκανναβινοειδή ασκούν φαρμακολογικές δράσεις μεγάλου εύρους (**εικόνα 15**), πολλές από τις οποίες έχουν σημαντικό θεραπευτικό ενδιαφέρον.

Το πιο μελετημένο ανάμεσα σε αυτά τα συστατικά είναι η **CBD**, οι φαρμακολογικές ενέργειες της οποίας, μπορεί να εξηγηθούν, τουλάχιστον εν μέρει, από έναν

συνδυασμό μηχανισμών δράσης. Η CBD έχει ένα εξαιρετικά ασφαλές προφίλ στους ανθρώπους και έχει αξιολογηθεί κλινικά για τη θεραπεία του άγχους, της ψύχωσης, και των κινητικών διαταραχών. Υπάρχουν καλά προκλινικά δεδομένα για να εγγραφούν κλινικές μελέτες γύρω από τη χρήση της για τη θεραπεία του διαβήτη, της ισχαιμίας, του καρκίνου. Ο σχεδιασμός περαιτέρω κλινικών δοκιμών θα πρέπει:

- 1) να λάβει υπόψη το κωδονοειδές σχήμα της δοσοεξαρτώμενης καμπύλης, που παρατηρήθηκε στην προκλινική φαρμακολογία και
- 2) να αποφασισθεί εάν η CBD είναι πιο αποτελεσματική ή έχει λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες από τα άλλα φάρμακα.

Ένα υπογλώσσιο σπρέι που περιέχει ίσες ποσότητες CBD-D9THC (Sativex), έχει δειχθεί ότι είναι αποτελεσματικό στη θεραπεία του νευροπαθικού πόνου στους ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση (MS).



Εικόνα 15: Φαρμακολογική δράση των μη ψυχοδραστικών κανναβινοειδών (με την ένδειξη του προτεινόμενου μηχανισμού δράσης), (Izzo A, και συν., 2009).

Αναπάντητα ερωτήματα.

Υπάρχουν αρκετά αναπάντητα ερωτήματα σχετικά με τη χρήση κανναβινοειδών για τη θεραπεία του καρκίνου.

Το μεγαλύτερο ζήτημα είναι ότι δεν υπάρχουν ακόμη αρκετά κλινικά δεδομένα, που να μπορούν να υποστηρίξουν την άποψη ότι τα κανναβινοειδή μπορούν να θεραπεύσουν τον καρκίνο σε ανθρώπους, αν και η έρευνα συνεχίζεται παγκοσμίως.

Και δεν είναι ξεκάθαρο ποιος τύπος κανναβινοειδούς –είτε φυσικό είτε συνθετικό– μπορεί να είναι πιο αποτελεσματικό, τι είδους δόσεις μπορεί να χρειασθούν, ή ποιοι τύποι καρκίνου μπορούν να ανταποκριθούν καλύτερα στα κανναβινοειδή.

Έως τώρα υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα από τα πειράματα στο εργαστήριο με καρκίνους του προστάτη, του μαστού, του πνεύμονα, των οστών, του παγκρέατος, γλοίωμα εγκεφάλου και λέμφωμα.

Το μήνυμα είναι ότι διαφορετικά κανναβινοειδή φαίνεται να έχουν διαφορετικά αποτελέσματα σε διάφορους τύπους καρκίνου, οπότε είμαστε μακριά από μια γενική θεραπεία. Η περισσότερη έρευνα επικεντρώθηκε στην THC, το κύριο φυσικό συστατικό της κάνναβης, αλλά οι ερευνητές βρήκαν ότι διαφορετικά κανναβινοειδή φαίνεται να έχουν καλύτερα ή χειρότερα αποτελέσματα σε διαφορετικούς τύπους καρκινικών κυττάρων.

Τα πειράματα στο εργαστήριο έδειξαν θετικά αποτελέσματα με τη χορήγηση της THC στους όγκους του εγκεφάλου και στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, ενώ η CBD φαίνεται να έχει καλό αποτέλεσμα στα καρκινικά κύτταρα του μαστού.

Έπειτα υπάρχει το πρόβλημα των ψυχοδραστικών αποτελεσμάτων της THC κυρίως σε μεγάλες δόσεις, αν και αυτό μπορεί να αντιμετωπισθεί χορηγώντας τη συγχρόνως με CBD. Γνωρίζοντας αυτό το πρόβλημα, τα συνθετικά κανναβινοειδή που δεν έχουν τέτοιες επιδράσεις, μπορεί να είναι πιο χρήσιμα για μεγάλες χρονικές περιόδους.

Υπάρχουν επίσης μεγάλα ερωτηματικά σχετικά με τον καλύτερο τρόπο χορήγησης, ώστε να μπορέσουν τα φάρμακα να φτάσουν πραγματικά μέσα στους όγκους.

Εξ' αιτίας της χημικής δομής τους, τα κανναβινοειδή δε διαλύονται εύκολα στο νερό και δεν ταξιδεύουν μακριά στους ιστούς των ανθρώπων. Αυτό καθιστά ιδιαίτερα δύσκολο το να φτάσουν βαθειά μέσα στον όγκο, ή έστω να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος, χρειάζονται επομένως αρκετά υψηλές δόσεις για να φανεί το αποτέλεσμα.

Επίσης δεν γνωρίζουμε εάν τα κανναβινοειδή θα ενισχύσουν ή θα δράσουν αντίθετα ως προς τα αποτελέσματα της κάθε χημειοθεραπείας, ούτε ποιοι συνδυασμοί φαρμάκων είναι καλύτεροι για δοκιμή.

Είναι καλό να θυμηθούμε ότι υπάρχουν εκατοντάδες πιθανά αντικαρκινικά φάρμακα που αναπτύσσονται και ελέγχονται σε διάφορα πανεπιστήμια και εργαστήρια παγκοσμίως και ότι τα κανναβινοειδή αποτελούν απλά ένα μικρό τμήμα της όλης έρευνας. Οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις δε θα τα καταφέρουν ποτέ να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη, για τη θεραπεία των ασθενών για πολλούς λόγους, όπως η τοξικότητά τους, η μη αποτελεσματικότητά τους, οι μη αποδεκτές παρενέργειές τους, ή η δυσκολία να φτάσει το φάρμακο στους όγκους.

Στο ερώτημα, εάν τα κανναβινοειδή πρόκειται να χρησιμοποιηθούν κάποτε στην κλινική πράξη, η απάντηση είναι ότι πρέπει να ξεπεράσουν αυτές τις δυσκολίες, και να αποδείξουν ότι έχουν ωφέλιμες δράσεις που ξεπερνούν τις υπάρχουσες θεραπείες για τον καρκίνο.

H. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abrams DL., and M. Guzman, (2009): Cannabinoids and Cancer; Evidence from cell culture systems and animal models indicates that THC and other cannabinoids may inhibit the growth of some tumors by the modulation of signalling pathways, *O'Shaughnessy's*:7-14.

Aguado T, Carracedo A, Julien B, Velasco G, Milman G, Mechoulam R, Alvarez L, Guzmán M, Galve-Roperh I. (2007) Cannabinoids induce glioma stem-like cell differentiation and inhibit gliomagenesis. *J Biol Chem.* 282(9):6854-62.

Alessandrini A, S. Namura, MA. Moskowitz and JV. Bonventre (1999): MEK1 protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia, *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 12866-12869

Alger, BE. (2004): Endocannabinoids: getting the message across. *PNAS* 101(23): 8512-8513.

Athanasiou A, Clarke AB, Turner AE, et al,(2007) Cannabinoid receptor agonists are mitochondrial inhibitors: a unified hypothesis of how cannabinoids modulate mitochondrial function and induce cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 364(1):131-7.

Aviello G, Romando B, Borrelli F, Capasso R, Gallo L, Piscitelli F, Di Marzo V, Izzo AA.(2012): Chemopreventive effect of the non-psychotropic phytocannabinoid cannabidiol on experimental colon cancer. *J Mol Med (Berl).* :90(8):925-34.

Baker, D. G. Pryce, WL. Davies and CR. Hilley (2006): In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 27: 1-4.

Bedoya F, Rubio JC, Morales-Gutierrez C, Abad-Barahona A, et al, (2009) Single nucleotide change in the cannabinoid receptor-1 (CNR1) gene in colorectal cancer outcome. *Oncology*. 76(6):435-41.

Bifulco M., C. Laezza, G. Portella, M. Vitale, P. Orlando, L. De Petrocellis, V. Di Marzo (2001): Control by the endogenous cannabinoid system of ras oncogene-dependent tumor growth. *FASEB J*. 15(14): 2745-2747.

Blázquez C, Carracedo A, Barrado L, et al. (2006): Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *FASEB J* :20:2633-5.

Blázquez C, González-Feria L, Alvarez L, Haro A, Casanova ML, Guzmán M. (2004) Cannabinoids inhibit the vascular endothelial growth factor pathway in gliomas. *Cancer Res.*;64(16):5617-23.

Blázquez C., C. Sanchez, A. Daza, I. Galve-Roperh and M. Guzman (1999): The stimulation of ketogenesis by cannabinoids in astrocytes defines carnitine palmitoyltransferase I as a new ceramide-activated enzyme. *J Neurochem*. 72:1759-1768.

Block RI. (1996): Does heavy marijuana use impair human cognition and brain function? *JAMA* 275(7): 560-1.

Bonnet S., Stephen L.Archer, Joan Allalunis-Turner, Alois Haromy, Christian Beaulieu, Richard Thompson, Christopher T.Lee, Gary D. Lopaschuk, Lakshmi Puttagunta, Sandra Bonnet, Gwyneth Harry, Kyoko Hashimoto, Christopher J. Porter, Miguel A. Andrade, Bernard Thebaud, and Evangelos D. Michelakis.(2006): A Mitochondria-K⁺ Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth, doi 10.1016/j.ccr.2006.10.020

Bouaboula M., C. Poinot Chazel, J. Marchard, X. Canat, B. Bourrie, M. Rinaldi-Carmona, B. Calandra, G. Le Fur and P. Casellas (1996): Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur J Biochem* 237:704-711.

Brunet A., Bonni A., Zigmund M. J. et al. (1999): Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96:857-868.

Caffarel MM, Andradas C, Mira E, Pérez-Gómez E, Cerutti C, Moreno-Bueno G, Flores JM, García-Real I, Palacios J, et al,(2010) Cannabinoids reduce ErbB2-driven breast cancer progression through Akt inhibition. *Mol Cancer* .9:196.

Caffarel MM, Moreno-Bueno G, Cerutti C, Palacios J, et al, (2008) JunD is involved in the antiproliferative effect of Delta9-tetrahydrocannabinol on human breast cancer cells. *Oncogene*.27(37):5033-44.

Caffarel MM, Sarrió D, Palacios J, Guzmán M, Sánchez C. (2006) Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation . *Cancer Res*.66(13):6615-21.

Calatozzolo C, Salmaggi A, Pollo B, Sciacca FL, et al, (2007). Expression of cannabinoid receptors and neurotrophins in human gliomas. *Neurol Sci*. 28(6):304-10.

Cardone M.H., N. Roy, HR. Stennicke, GS. Salvesen, TF. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch and JC. Reed (1998): Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282:1318-1321.

Carlini EA, Cunha JM. Hypnotic and antiepileptic effects of cannabidiol. *J Clin Pharmacol*. (1981);21(8-9 Suppl):417S-27S.

Carracedo A, Gironella M, Lorente M, et al. (2006): Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes.

Cancer Res :66:6748-55.

Casanova ML, Blazquez C, Martinez-Palacio J, Villanueva C, et al, (2003).

Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest.* 111(1):43-50.

Cellia J.A.Morgan and H.Valerie Curran. Effects of cannabidiol on schizophrenia-like symptoms in people who use cannabis.(2008) *The British Journal of Psychiatry* 192, 306-307.doi:10.1192/bjp.bp.107.046649.

Chen Y, Gibson SB. (2008): Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy? *Autophagy* :4:246-8.

Chung SC, Hammarsten P, Josefsson A, Stattin P, Granfors T, et al, (2009). A high cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity is associated with disease severity and outcome in prostate cancer. *Eur J Cancer.* 45(1):174-82.

Cianchi F, Papucci L, Schiavone N, Lulli M, Magnelli L, et al, (2008) Cannabinoid receptor activation induces apoptosis through tumor necrosis factor alpha-mediated ceramide de novo synthesis in colon cancer cells. *Clin Cancer Res.*14(23):7691-700.

Cluny, N.L. et al. (2008) The effects of cannabidiol and tetrahydrocannabinol on motion-induced emesis in *Suncus murinus*. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 103, 150-156.

Cole S.P.C., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 17 (1986) 259-263.

Consroe P, Sandyk R, Snider SR.(1986): Open label evaluation of cannabidiol in dystonic movement disorders. *Int J Neurosci.* :30(4):277-82.

- Contassot E**, Wilmotte R, Tenan M, Belkouch MC, et al, (2004). Arachidonylethanolamide induces apoptosis of human glioma cells through vanilloid receptor-1. *J Neuropathol Exp Neurol.* 63(9):956-63.
- Costa B**, Colleoni M, Conti S, Parolaro D, Franke C, Trovato AE, Giagnoni G. (2004): Oral anti-inflammatory activity of cannabidiol, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* :369(3):294-9.
- Costa B**, Trovato AE, Comelli F, Giagnoni G, Colleoni M. (2007): The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* :556(1-3):75-83.
- Crippa JA**, Zuardi AW, Garrido GE, Wichert-Ana L, Guarnieri R, Ferrari L, Azevedo-Marques PM, Hallak JE, McGuire PK, Filho Busatto G. (2004). Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. *Neuropsychopharmacology.* :29(2):417-26.
- Cudaback E**, Stella N. (2007) Targeting astrocytomas and invading immune cells with cannabinoids: a promising therapeutic avenue. *Mol Neurobiol.* 36(1):36-44.
- Das SK.**, BC. Paria, I. Chakraborty and SK. Dey (1995): Cannabinoid ligand-receptor signaling in the mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4332-4336.
- Deadwyler SA.**, RE. Hampson, J. Mu, A. Whyte and S. Childers (1995): Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP dependent process. *J Pharmacol Exp Ther* 273:734-743.
- De Lago E**, Gustafsson SB, Fernández-Ruiz J, Nilsson J, Jacobsson SO, Fowler CJ. (2006) Acyl-based anandamide uptake inhibitors cause rapid toxicity to C6 glioma cells at pharmacologically relevant concentrations. *J Neurochem.* 99(2):677-88.

De Petrocellis L., Bisogno T, Ligresti A, Bifulco M, Melck D, Di Marzo V. (2002) Effect on cancer cell proliferation of palmitoylethanolamide, a fatty acid amide interacting with both the cannabinoid and vanilloid signaling systems. *Fundam Clin Pharmacol.* 16(4):297-302.

De Petrocellis L., D. Melck, A. Palmisano, T. Bisogno, C. Laezza, M. Bifulco and V. Di Marzo (1998): The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:8375-8380.

Derkinderen P., M. Toutant, G. Kadare, C. Ledent, M. Parmentier and JA. Girault (2001): Dual role of Fyn in the regulation of FAK_{6,7} by cannabinoids in hippocampus. *J Biol Chem* 276:38289-38296.

Devane WA., L. Hanus, A. Breuer, RG. Pertwee, LA. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger and R. Mechoulam (1992): Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949.

Díaz-Laviada I. (2011) The endocannabinoid system in prostate cancer. *Nat Rev Urol.*8(10):553-61.

Di Marzo V., Melck D, Orlando P, Bisogno T, Zagoory O, Bifulco M, Vogel Z, De Petrocellis L. (2001) Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells. *Biochem J.* 358(Pt 1):249-55.

Donadelli M., Dando I, Zaniboni T, Costanzo C, et al, (2011). Gemcitabine/cannabinoid combination triggers autophagy in pancreatic cancer cells through a ROS-mediated mechanism. *Cell Death Dis.* 2:e152.

Duntsch C, Divi MK, Jones T, Zhou Q, et al, (2006). Safety and efficacy of a novel cannabinoid chemotherapeutic, KM-233, for the treatment of high-grade glioma. *J Neurooncol.* 77(2):143-52.

Ellert-Miklaszewska A, Grajkowska W, Gabrusiewicz K, Kaminska B, Konarska L. (2007) Distinctive pattern of cannabinoid receptor type II (CB2) expression in adult and pediatric brain tumors. *Brain Res.* 1137(1):161-9.

Ellert-Miklaszewska A, Kaminska B, Konarska L.(2005): Cannabinoids down-regulate PI3K/Akt and Erk signaling pathways and activate proapoptotic function of Bad protein. *Cell Signal* :17:25-37.

Felder CC., KE. Joyce, EM. Briley, J. Mansouri, K. Mackie, O. Blond, Y. Lai, AL. Ma, RL. Mitchell (1995): Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 48:443-450.

Flygare J, Gustafsson K, Kimby E, Christensson B, Sander B. (2005): Cannabinoid receptor ligands mediate growth inhibition and cell death in mantle cell lymphoma. *FEBS Lett* :579:6885-9.

Fogli S, Nieri P, Chicca A, et al.(2006): Cannabinoid derivatives induce cell death in pancreatic MIA PaCa-2 cells via a receptor-independent mechanism. *FEBS Lett* :580:1733-9.

Fowler CJ, Hammarsten P, Bergh A. (2010). Tumour Cannabinoid CB(1) receptor and phosphorylated epidermal growth factor receptor expression are additive prognostic markers for prostate cancer. *PLoS One.* 5(12):e15205.

Fricker S.P., Buckley R.G., *Anticancer Res.* 16 (1996) 3755-3760.

- Galanti G**, Fisher T, Kventsel I, Shoham J, Gallily R, Mechoulam R, et al, (2008). Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression by downregulation of E2F1 in human glioblastoma multiforme cells. *Acta Oncol.* 47(6):1062-70.
- Galve-Roperh I**, C. Sanchez, ML. Cortes, T. Gomez del Pulgar, M. Izquierdo and M. Guzman (2000): Antitumoral action of cannabinoids: Involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med* 6:313-319.
- Gaoni Y.**, R. Mechoulam (1964): Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society*, 86:1646-1647.
- Garcia-Arencibia M**, Gonzalez S, de Lago E, Ramos JA, Mechoulam R, Fernandez-Ruiz J.(2007): Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Res.* :1134(1):162-70.
- Gazzerro P**, Malfitano AM, Proto MC, Santoro A,et al,(2010) Synergistic inhibition of human colon cancer cell growth by the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant and oxaliplatin. *Oncol Rep.* 23(1):171-5.
- Gebremedhin D.**, AR. Lange, WB. Campbell, CJ. Hillard and DR. Harder (1999): Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am J Physiol* 276:2085-2093.
- Gerard CM.**, C. Mollereau, G. Vassart and M. Parmentier (1991): Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in the testis, *Biochemical Journal* 279:129-134.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, et al., (1973). In vitro cultivation of human tumors. Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 51(5):1417-23.

Gifford AN., CR. Ashby (1996): Electrically-evoked acetylcholinerelease from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist, WIN5512-2, and is potentiated by the cannabinoid antagonist, SR141716A. *J Pharmacol Exp Ther* 277:1431-1436.

Glass M., Felder C. C. 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* 1997; 17:5327-5333.

Glass M., Northup J.K. Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 1999; 56:1362-1369.

Gomes I., BA. Jordan, A. Gupta, C. Rios, N. Trapaidze and LA. Devi (2001): G protein coupled receptor dimerization: implications in modulating receptor function. *J Mol Med* 79:226-242.

Gomez del Pulgar T, Velasco G, Sanchez C, Haro A, Guzman M. (2002) De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. *Biochem J.* 363(Pt 1):183-8.

Goncharov I, Weiner L, Vogel Z, (2005) Delta9-tetrahydrocannabinol increases C6 glioma cell death produced by oxidative stress. *Neuroscience.* 134(2):567-74.

Goswami R. and G. Dawson (2000): Does ceramide play a role in neural cell apoptosis? *J. Neurosci. Res.*60:141-149.

Green DR. (2000):Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* :102:1-4.

Greenhough A, Patsos HA, Williams AC, Paraskeva C. (2007) The cannabinoid delta(9)-tetrahydrocannabinol inhibits RAS-MAPK and PI3K-AKT survival signaling and induces BAD-mediated apoptosis in colorectal cancer cells. *Int J Cancer*. 121(10):2172-80.

Grewal SS, RD. York and PJS. Storck (1999): Extracellular-signal regulated kinase signaling in neurons. *Curr Opin Neurobiol*. 9:544-553.

Grimaldi C, Pisanti S, Laezza C, et al. (2006): Anandamide inhibits adhesion and migration of breast cancer cells. *Exp Cell Res*. :312:363-73.

Grinspoon L, Bakalar JB. (1997):Marihuana, the forbidden medicine. *New Haven, CT: Yale University Press*.

Gudermann T., T. Schoneberg and G. Schultz (1997): Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein coupled receptors. *Annu Rev Neurosci* 20:399-427.

Gustafsson K, Christensson B, Sander B, Flygare J. (2006): Cannabinoid receptor-mediated apoptosis induced by R(+)-methanandamide and Win55,212-2 is associated with ceramide accumulation and p38 activation in mantle cell lymphoma. *Mol Pharmacol* :70:1612-20.

Gustafsson SB, Lindgren T, Jonsson M, Jacobsson SO. (2009) Cannabinoid receptor-independent cytotoxic effects of cannabinoids in human colorectal carcinoma cells:synergism with 5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol*. 63(4):691-701.

Gustafsson SB, Palmqvist R, Henriksson ML, Dahlin AM, Edin S, et al, (2011) High tumour cannabinoid CB1 receptor immunoreactivity negatively impacts disease-specific survival in stage II microsatellite stable colorectal cancer. *PLoS One*.6(8):e23003.

- Guzmán M**, (2003): Cannabinoids :potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 3 (10):745-55.
- Guzmán M**, Duarte MJ, Blazquez C, et al.(2006): A pilot clinical study of Δ9-tetrahydrocannabinol in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Br J Cancer* :95:197-203.
- Guzmán M.**, I. Galve-Roperh and C. Sánchez (2001): Ceramide, a new second messenger of cannabinoid action. *Trends Pharmacol Sci* 22:19-22.
- Guzmán M.**, C. Sánchez and I. Galve-Roperh (2002): Cannabinoids and cell fate. *Pharmacol Ther.* 95(2): 175-84.
- Hampson AJ**, Grimaldi M, Axelrod, Wink D. (1998):Cannabinoid and delta 9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA.* :95(14):8268-73.
- Harkany T.**, M. Guzmán, I. Galve-Roperh, P. Berghuis, LA. Devi and K. Mackie (2007): The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends in Pharmacological Sciences* 28(2):83-92.
- Hart S.**, OM. Fischer and A. Ullrich (2004): Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor α-converting enzyme (TACE/ADAM17)-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 64:1943-1950.
- Heath-Engel HM**, Chang NC, Shore GC.(2008): The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family. *Oncogene* :27:6419-33.
- Held-Feindt J**, Dörner L, Sahan G, Mehdorn HM, Mentlein R. (2006) Cannabinoid receptors in human astroglial tumors. *J Neurochem.*98(3):886-93.

- Herkenham M.**, AB. Lynn, MR. Johnon, LS. Melvin, BR. De Costa and KC. Rice (1991): Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* 11:563-583.
- Herrera B**, Carracedo A, Diez-Zaera M, Guzmán M, Velasco G. (2005) p38 MAPK is involved in CB2 receptor-induced apoptosis of human leukemia cells. *FEBS Lett.* 579(22):5084-8.
- Hollister LE.**, (1986): Health aspects of cannabis. *Pharm. Rev.*, 38:1-20.
- Houghton P**, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands P.J, Lee C.C, (2007). The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Pharmaceutical Sciences, Methods* 42(2007): 377-387.
- Howlett AC.** (1984): Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and natriadol compounds. *Life Sci.* 35:1803-1810.
- Howlett AC.**, J.M. Qualy and L.L. Khachatrain, (1986): Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabinoid drugs. *Molecular Pharmacology* 29:307-313.
- Howlett A.C.**, F.Barth, TI. Bonner, G. Cabral, P.Casellas, WA. Devane, CC. Felder, M. Herkenham, K. Mackie, BR. Martin, R. Mechoulam and RG. Pertwee (2002): International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.*, 54:161-202.
- Islam TC**, Asplund AC, Lindvall JM, Nygren L, Liden J, Kimby E, et al, (2003) High level of cannabinoid receptor 1, absence of regulator of G protein signaling 13 and differential expression of Cyclin D1 in mantle cell lymphoma. *Leukemia.*2003 Sep;17(9):1880-90.

- Izquierdo I**, Orsingher OA, Berardi AC.(1973): Effect of cannabidiol and other Cannabis sativa compounds on hippocampal seizures discharges. *Psychopharmacologia*. :28(1):95-102.
- Izzo AA**, (2007) The cannabinoid CB(2) receptor: a good friend in the gut. *Neurogastroenterol Motil*. 19(9):704-8.
- Izzo AA**, Camilleri M. (2009) Cannabinoids in intestinal inflammation and cancer. *Pharmacol Res*.60 (2):117-25.
- Izzo AA**, Aviello G, Petrosino S, Orlando P, Marsicano G, Lutz B, Borrelli F, et al, (2008) Increased endocannabinoid levels reduce the development of precancerous lesions in the mouse colon. *J Mol Med (Berl)*. 86(1):89-98.
- Jacobsson SO**, Rongard E, Stridh M, Tiger G, and Fowler CJ (2000): Serum-dependent effects of tamoxifen and cannabinoids upon C6 glioma cell viability. *Biochem Pharmacol* 60:1807-1813.
- Jacobsson SO**, Wallin T, Fowler CJ. (2001) Inhibition of rat C6 glioma cell proliferation by endogenous and synthetic cannabinoids. Relative involvement of cannabinoid and vanilloid receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Dec;299(3):951-9.
- Jane A. Plumb**, R. Milroy, and S.B.Kaye, (1989). Effects of the pH Dependence of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromide-Formazan Absorption on Chemosensitivity Determined by a Novel Tetrazolium-based Assay. *Cancer Research* 49:4435-4440.
- Jia W**, Hegde VL, Singh NP, Sisco D, Grant S, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. (2006) Delta9-tetrahydrocannabinol-induced apoptosis in Jurkat leukemia T cells is regulated by translocation of Bad to mitochondria. *Mol Cancer Res*.2006.
- Joosten M**, Valk PJ, Jorda MA, et al, (2002) Leukemic predisposition of pSca-1/Cb2 transgenic mice. *Exp Hematol*. 30(2):142-9.

Jorda MA, Verbakel SE, Valk PJ, et al, (2002) Hematopoietic cells expressing the peripheral cannabinoid receptor migrate in response to the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Blood*. 99(8):2786-93.

Joseph J, Niggemann B, Zaenker KS, Entschladen F. (2004) Anandamide is an endogenous inhibitor for the migration of tumor cells and T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother*. 53(8):723-8.

Karniol IG, Shirakawa I, Kasinski N, Pfeferman A, Carlini EA. Cannabidiol interferes with the effects of delta 9-tetrahydrocannabinol in man. (1974). *Eur J Pharmacol*. :28(1):172-7.

Katona I., B. Sperlagh, A. Sik, A. Kafalvi, ES. Vizi, K. Mackie and TF. Freund (1999): Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* 19:4544-4558.

Keepers Y.P., Pizao P.E., Peters G.J., et al.,*Eur. J. Cancer* 27 (1991) 897-900.

Kolesnick RN. And M. Krönke (1998): Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol*. 60:643-665.

Leussink VI., Leila Husseini, Clemens Warnke, Erasmia Broussalis, Hans-Peter Hartung and Bernd C.Kieseier.(2012): Symptomatic therapy in multiple sclerosis:the role of cannabinoids in treating spasticity. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, : 5(5)255-266.

Ligresti A, Bisogno T, Matias I, et al, (2003) Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth. *Gastroenterology*. 125(3):677-87.

Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K, Matias I, Pisanti S, De Petrocellis L, Laezza C, Portella G, Bifulco M, Di Marzo V.(2006): Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabinoid on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther*. :318(3):1375-87.

- Liu WM**, Scott KA, Shamash J, Joel S, Powles TB, (2008) Enhancing the in vitro cytotoxic activity of Delta9-tetrahydrocannabinol in leukemic cells through a combinatorial approach. *Leuk. Lymphoma* . 49(9):1800-9.
- Lorente M**, Carracedo A, Julien B, Velasco G, et al, (2009). Amphiregulin is a factor for resistance of glioma cells to cannabinoid-induced apoptosis. *Glia*. 57(13):1374-85.
- Luca T**, Di Benedetto G, Scuderi MR, Palumbo M, et al,(2009). The CB1/CB2 receptor agonist WIN-55,212-2 reduces viability of human Kaposi's sarcoma cells in vitro. *Eur J Pharmacol*. 616(1-3):16-21.
- Mackie K.** and N. Stella (2006): Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS. J.* 8:298-306.
- Mackie K.**, WA. Devane and B. Hille (1993): Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol* 44:498-503.
- Mackie K.**, R. Westenbroek and R. Mitchell (1995): Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AT20 cells transfected with rat-brain cannabinoid receptor, *Journal of Neuroscience* 15:6552-6561.
- Mailleux P.**, M. Verslype, X. Preud'homme and JJ. Vanderhaeghen (1994): Activation of multiple transcription factor genes by tetrahydrocannabinol in rat forebrain. *NeuroReport* 5:1265-1268.
- Malfait AM**, Gallily R, Sumariwalla PF, Malik AS, Andreakos E, Mechoulam R, Feldman M. (2000):The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* .:97(17):9561-6.

Maneuf YP. and J.M. Brotchie, (1997): Paradoxical action of the cannabinoid WIN55,212-2 in stimulated and basal cyclic AMP accumulation in rat globus pallidus slices, *British Journal of Pharmacology* 120:1397-1398.

Marcu JP, Christian RT, Lau D, et al, (2010). Cannabidiol enhances the inhibitory effects of delta9-tetrahydrocannabinol on human glioblastoma cell proliferation and survival. *Mol Cancer Ther.* 9(1):180-9.

Maresz K., et al.(2005): Modulation of the cannabinoid CB receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J. Neurochem.* 95:437-445.

Massi, P. et al. (2008) 5-Lipoxygenase and anandamide hydrolase (FAAH) mediate the antitumor activity of cannabidiol, a non-psychoactive cannabinoid. *J. Neurochem.* 104, 1091-1100.

Massi P, Vaccani A, Bianchessi S, et al.(2006): The non-psychoactive cannabidiol triggers caspase activation and oxidative stress in human glioma cells. *Cell Mol Life Sci* :63:2057-66.

Massi P, Vaccani A, Ceruti S, Colombo A, Abbrachio MP, Parolaro D. (2004): Antitumor effects of cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid, on human glioma cell lines. *J Pharmacol Exp Ther.* :308(3):838-45.

Matsuda LA., SJ. Lolait, MJ. Brownstein, AC. Young and TI. Bonner (1990): Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-564.

McAllister SD, Chan C, Taft RZ, Luu T, et al, (2005). Cannabinoids selectively inhibit proliferation and induce death of cultured human glioblastoma multiforme cells. *J Neurooncol.* 74(1):31-40.

McAllister SD, Christian RT, Horowitz MP, Garcia A, Desprez PY.(2007): Cannabidiol as a novel inhibitor of Id-1 gene expression in aggressive breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* :6(11):2921-7.

McAllister SD, Murase R, Christian RT, et al, (2011) Pathways mediating the effects of cannabidiol on the reduction of breast cancer cell proliferation, invasion, and metastasis. *Breast Cancer Res Treat.* 129(1):37-47.

McKallip RJ, Lombard C, Fisher M, Martin BR, Ryu S, Grant S, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. (2002) Targeting CB2 cannabinoid receptors as a novel therapy to treat malignant lymphoblastic disease. *Blood.* 100(2):627-34.

McKallip RJ, Jia W, Schlomer J, Warren JW, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. (2006): Cannabidiol-induced apoptosis in human leukemia cells: a novel role of cannabidiol in the regulation of p22phox and Nox4 expression. *Mol Pharmacol.* :70(3):897-908.

McKallip RJ, Nagarkatti M, Nagarkatti PS.(2005): Δ^9 -tetrahydrocannabinol enhances breast cancer growth and metastasis by suppression of the antitumor immune response. *J Immunol* :174:3281-9.

Mechoulam R. (2005): Cannabinoids as Therapeutics

Mechoulam R, Peters M, Murillo-Rodriguez E, Hanus LO. (2007):Cannabidiol-recent advances. *Chem Biodivers.* :4(8):1678-92.

Melck D., L. De Petrocellis, P. Orlando, T. Bisogno, C. Laezza, M. Bifulco and V. Di Marzo (2000): Suppression of nerve growth factor Trk receptors and prolactin receptors by endocannabinoids leads to inhibition of human breast and prostate cancer cell proliferation. *Endocrinology* 141:118-126.

Michalski CW, Oti FE, Erkan M, Sauliunaite D, Bergmann F, Pacher P, et al, (2008). Cannabinoids in pancreatic cancer: correlation with survival and pain. *Int J Cancer.* 122(4):742-50.

- Mimeault M**, Pommery N, Wattez N, Bailly C, Henichart JP. (2003): Anti-proliferative and apoptotic effects of anandamide in human prostatic cancer cell lines: implication of epidermal growth factor receptor down-regulation and ceramide production. *Prostate* :56:1-12.
- Minden A.** and M. Karin (1998): The JNK family of MAP kinases: Regulation and function. *Horm. Signal.* 1:209-233.
- Molina-Holgado E.,** JM. Vela, A. Arévalo-Martin, G. Almazán, F. Molina-Holgado, J. Borrell and C. Guaza (2002): Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *J. Neurosci.* 22:9742-9753.
- Muller-Vahl KR.,** H. Kolbe, U. Schneider and HM. Emrich (1999): Cannabis in movement disorders. *Forsch Komplementarmed* 6 Suppl 3:23-7.
- Munro S.,** Kerrie L. Thomas & Muna Abu-Shaar (1993): Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61-65.
- Nithipatikom K,** Endsley MP, Isbell MA, et al. (2004): 2-arachidonoylglycerol: a novel inhibitor of androgen-independent prostate cancer cell invasion. *Cancer Res* :64:8826-30.
- Olea-Herrero N,** Vara D, Malagarie-Cazenave S, Díaz-Laviada I. (2009) Inhibition of human tumour prostate PC-3 cell growth by cannabinoids R(+)-Methanandamide and JWH-015: involvement of CB2. *Br J Cancer.* 101(6):940-50.
- Olea-Herrero N,** Vara D, Malagarie-Cazenave S, Díaz-Laviada I. (2009) The cannabinoid R(+)-methanandamide induces IL-6 secretion by prostate cancer PC3 cells. *J Immunotoxicol.*
- Ozaita A.,** E. Puighermanal and R. Maldonado (2007): Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *Journal of Neurochemistry* 102(4):1105-14.

Palazuelos J., T. Aguado, A. Egia, R. Mechoulam, M. Guzmán and I. Galve-Roperh (2006): Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J.* 20:2405-2407.

Pan, H. et al. (2009) Cannabidiol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing oxidative/nitrosative stress, inflammation, and cell death. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 328,708-714.

Parolaro D, Massi P.(2008) Cannabinoids as potential new therapy for the treatment of gliomas. *Expert Rev Neurother.* 8(1):37-49.

Patsos HA, Hicks DJ, Dobson RR, Greenhough A, Woodman N, Lane JD, Williams AC, Paraskeva C.(2005) The endogenous cannabinoid, anandamide, induces cell death in colorectal carcinoma cells: a possible role for cyclooxygenase 2. *Gut.* 54(12):1741-50.

Pertwee, R.G. (2004) The pharmacology and therapeutic potential of cannabidiol. In *Cannabinoids* (Di Marzo, V., ed.), pp. 32-83, Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Pertwee RG. (2005): Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb. Exp. Pharmacol.* 168:1-51.

Petersen G, Moesgaard B, Schmid PC, Schmid HH, et al, (2005). Endocannabinoid metabolism in human glioblastomas and meningiomas compared to human non-tumour brain tissue. *J Neurochem.* 2005 April;93(2):299-309.

Piomelli D., A. Giuffrida, A. Calignano and F. Rodriguez de Fonseca (2000): The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 21:218-224.

Piszc JA, Lemancewicz D, Kloczko J, Dzieciol J, Rusak M, Dabrowska M. (2007) Cannabinoid receptors expression in bone marrow trephine biopsy of chronic lymphocytic leukaemia patients treated with purine analogues. *Exp Oncol.* 29(3):221-5.

Preet A, Ganju RK, Groopman JE.(2008): D(9)-Tetrahydrocannabinol inhibits epithelial growth factor-induced lung cancer cell migration in vitro as well as its growth and metastasis in vivo. *Oncogene.* 27(3):339-46.

Preet A, Qamri Z, Nasser MW, Prasad A, Shilo K, Zou X, Groopman JE, Ganju RK. (2011) Cannabinoid receptors, CB1 and CB2, as novel targets for inhibition of non-small cell lung cancer growth and metastasis. *Cancer Prev Res (Phila).*4(1):65-75.

Qamri Z, Preet A, Nasser MW, Bass CE, Leone G, Barsky SH, Ganju RK. (2009) Synthetic cannabinoid receptor agonists inhibit tumor growth and metastasis of breast cancer. *Mol Cancer Ther.*8(11):3117-29.

Qin N, Neepier MP, Liu Y, Hutchinson TL, Lubin ML, Flores CM. (2008): TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* :28:6231-8.

Ramer R, Bublitz K, Freimuth N, et al.(2012): Cannabidiol inhibits lung cancer cell invasion and metastasis via intercellular adhesion molecule-1. *FASEB J* 26(4): 1535-48.

Ramer R, Ronde A, Merkord J, Rohde H, Hinz B. (2010): Decrease of plasminogen activator inhibitor-1 may contribute to the anti-invasive action of cannabidiol on human lung cancer cells. *Pharm Res.* :27(10):2162-74.

Rayman N, Lam KH, van der Holt B, Koss C, van Leeuwen J, Budel LM, Mulder AH, Sonneveld P, Delwel R. (2011) The expression of the peripheral cannabinoid receptor CB2 has no effect on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphomas. *Eur J Haematol.* 86(6):466-76.

- Rayman N**, Lam KH, Van Leeuwen J, Mulder AH, Budel LM, et al, (2007). The expression of the peripheral cannabinoid receptor on cells of the immune system and non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma*. 48(7):1389-99.
- Rock EM**, Limebeer CL, Mechoulam R, Piomelli D, Parker LA. (2008):The effect of cannabidiol and URB597 on conditioned gaping (a model of nausea) elicited by a lithium-paired context in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. :196(3):389-95.
- Rosen N**, She QB.(2006): AKT and cancer-is it all mTOR? *Cancer Cell* 2:10:254-6.
- Rubovitch V**, Gafni M, Sarne Y. (2002) The cannabinoid agonist DALN positively modulates L-type voltage-dependent calcium-channels in N18TG2 neuroblastoma cells. *Brain Res Mol Brain Res*. 101(1-2):93-102.
- Ruiz L**, Miguel A, Diaz-Laviada I.(1999): Δ9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in human prostate PC-3 cells via a receptor-independent mechanism. *FEBS Lett* :458:400-4.
- Russo EB.**, JM. McPartland (2003): Cannabis is more than simple D9-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacol*. 165:431-432.
- Ryan, D.et al.** (2009) Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca²⁺ levels. *J. Neurosci*. 29, 2053-2063.
- Salazar M**, Carracedo A, Salanueva IJ, Hernández-Tiedra S, et al, (2009). Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J Clin Invest*. 119(5):1359-72.
- Sanchez C**, de Ceballos ML, del Pulgar TG, Rueda D, et al,(2001) Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res*.61(15):5784-9.

Sanchez C., D. Rueda, B. Segui, I. Galve-Roperth, T. Levade and M. Guzmán (2001): The CB1 Cannabinoid Receptor of Astrocytes Is Coupled to Sphingomyelin Hydrolysis through the Adaptor Protein Fln. *Mol. Pharmacol.* 59:955-959.

Sanchez M., L. Ruiz-Llorente, AM. Sanchez and I. Diaz-Laviada (2003): Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cell. Signal.* 15:851-859.

Sanchez MG, Sanchez AM, Ruiz-Llorente L, Diaz-Laviada I.(2003): Enhancement of androgen receptor expression induced by Δ^9 -methanandamide in prostate LNCaP cells. *FEBS Lett* :555:561-6.

Santoro A, Pisanti S, Grimaldi C, Izzo AA, et al, (2009) Rimonabant inhibits human colon cancer cell growth and reduces the formation of precancerous lesions in the mouse colon. *Int J Cancer.*2009 Sep 1;125(5):996-1003.

Sarfaraz S, Afaq F, Adhami VM, et al.(2007): Cannabinoid receptors agonist WIN-55,212-2 inhibits angiogenesis, metastasis and tumor growth of androgen-sensitive prostate cancer cells. CWR22Rv1 xenograft in athymic nude mice. *Proc Am Assoc Cancer Res* :48:521.

Sarfaraz S, Afaq F, Adhami VM, Malik A, Mukhtar H.(2006): Cannabinoid receptor agonist-induced apoptosis of human prostate cancer cells LNCaP proceeds through sustained activation of ERK1/2 leading to G₁ cell cycle arrest. *J Biol Chem* :281:39480-91.

Schneider U, Borsutzky M, Seifert J, Leweke FM, Huber TJ, Rollnik JD, Emrich HM. Reduced binocular depth inversion in schizophrenic patients.(2002) *Schizophr. Res.* :53(1-2):101-8.

Scuderi MR, Cantarella G, Scollo M, Lempereur L, Palumbo M, et al, (2011). The antimitogenic effect of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on human melanoma cells is mediated by the membrane lipid raft. *Cancer Lett.* 310(2):240-9.

Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D., et al., *Cancer Res.* 48 (1988) 4827-4833.

Shire D., C. Carillon, M. Kaghad, B. Calandra, M. Rinaldi-Carmona, G. Le Fur, D. Caput, and P. Ferrara (1995): An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing, *The Journal of Biological Chemistry* 270:3726-3731.

Shrivastava A., Paula M. Kuzontkoski, Jerome E. Groopman, et al.(2011): Cannabidiol Induces Programmed Cell Death in Breast Cancer Cells by Coordinating the Cross-talk between Apoptosis and Autophagy. *Mol Cancer Ther.* :10:1161-1172.

Skehan P., Storeng R., Scudiero D., et al., *Cancer Inst.* (1990) 1107-1112.

Sreevalsan S, Joseph S, Jutooru I, Chadalapaka G, Safe SH. (2011) Induction of apoptosis by cannabinoids in prostate and colon cancer cells is phosphatase dependent. *Anticancer Res.* 31(11):3799-807.

Stella N. (2004): Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia* 48:267-277.

Sulcova E., R. Mechoulam and E. Fride (1998): Biphasic effects of anandamide. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59(2): 347-52.

Takeda S, Yamamoto I, Watanabe K. (2009) Modulation of Delta9-tetrahydrocannabinol-induced MCF-7 breast cancer cell growth by cyclooxygenase and aromatase. *Toxicology*;259(1-2):25-32.

Terranova JP., JC. Michaud, G. Lefur and P. Soubrie (1995): Inhibition of long-term potentiation in rat hippocampal slices by anandamide and WIN55,212-2 reversal by SR141716, a selective antagonist of CB1 cannabinoid receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*352:576-579.

Thapa D, Babu D, Park MA, Kwak MK, et al, (2010) Induction of p53-independent apoptosis by a novel synthetic hexahydrocannabinol analog is mediated via Sp1-dependent NSAID-activated gene-1 in colon cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 80(1):62-71.

Thapa D, Lee JS, Heo SW, Lee YR, Kang KW, et al, (2011) Novel hexahydrocannabinol analogs as potential anti-cancer agents inhibit cell proliferation and tumor angiogenesis. *Eur J Pharmacol.* 650(1):64-71.

Thorburn A.(2004): Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* :16:139-44.

Tsou K., S. Brown, MC. Sanudo-Pena, K. Mackie and JM. Walker (1998): Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83:393-411.

Turkanis SA, Cely W, Olsen DM, Karler R. (1974):Anticonvulsant properties of cannabidiol. *Res Communic Chem Pathol Pharmacol.* :8(2):231-46.

Vaccani A, Massi P, Colombo A, Rubino T, Parolaro D.(2005): Cannabidiol inhibits human glioma cell migration through a cannabinoid receptor-independent mechanism. *Br J Pharmacol.* :144(8):1032-6.

Van Sickle MD., M. Duncan, PJ. Kingsley, A. Mouihate, P. Urbani, K. Mackie, N. Stella, A. Makriyannis, D. Piomelli, JS. Davison, LJ. Marnett, V. Di Marzo, QJ. Pittman, KD. Patel and KA. Sharkey (2005): Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310:329-332.

Velasco G, Carracedo A, Blázquez C, Lorente M, Aguado T, et al, (2007). Cannabinoids and gliomas. *Mol Neurobiol.* 36(1):60-7.

Velasco G, Galve-Roperh I, Sánchez C, Blázquez C, Guzmán M. (2004) Hypothesis: cannabinoid therapy for the treatment of gliomas? *Neuropharmacology*. 47(3):315-23.

Wager-Miller J., Westenbroek R., Mackie K. (2002): Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example, *Chem. Phys. Lipids* 121:83-89.

Walsh D., KA. Nelson and FA. Mahmoud (2003): Established and potential therapeutic applications of cannabinoids in oncology. *Support Care Cancer* 11:137-143.

Wartmann M., D. Campbell, A. Subramanian, SH. Burstein and RJ. Davis (1995): The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett* 359:133-136.

Wasik AM, Christensson B, Sander B. (2011). The role of cannabinoid receptors and the endocannabinoid system in mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin lymphomas. *Semin Cancer Biol*. 21(5):313-21.

Weiss L, Zeira M, Reich S, Har-Noy M, Mechoulam R, Slavin S, Gallily R.(2006): Cannabidiol lowers incidence of diabetes in non-obese diabetic mice. *Autoimmunity*. :39(2):143-51.

Wilson RI, & RA. Nicoll (2002): Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*, 296:678-682.

Wu X, Han L, Zhang X, Li L, Jiang C, et al, (2012). Alteration of endocannabinoid system in human gliomas. *J Neurochem*. 120(5):842-9.

Zhao ZG, Li YY, Yang J, Li HJ, Zhao H.(2010). Expression of cannabinoid receptor 2 in squamous cell carcinoma.

Zheng D, Bode AM, Zhao Q, Cho YY, et al, (2008). The cannabinoid receptors are required for ultraviolet-induced inflammation and skin cancer development. *Cancer Res.* 68(10):3992-8.

Zuardi AW, Guimaraes FS, Moreira AC. Effect of cannabidiol on plasma prolactin, growth hormone and cortisol in human volunteers.(1993) *Braz J Med Biol Res.* :26(2):213-7.

Zuardi AW, Hallak JE, Dursun SM, Morais SL, Sanches RF, Musty RE, Crippa JA. (2006) :Cannabidiol monotherapy for treatment-resistant schizophrenia. *J Psychopharmacol.* :20(5):683-6.

Zuardi AW, Shirakawa I, Finkelfarb E, Karniol IG. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects.(1982) *Psychopharmacology (Berl).* :76(3):245-50.

Zuardi, A.W. (2008) Cannabidiol:from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 30, 271-280.