



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«Βασικών Βιοϊατρικών Επιστημών»**

**Έλεγχος αναλγητικής δράσης απομονωμένων ουσιών  
από βιομηχανική κάνναβη. Εστιάζοντας στην  
κανναβιδιόλη και στο κανναβιδιολικό οξύ.**

**Ασπρογέρακας Μιχαήλ-Ζώης**

**Βιολόγος, M.Sc.**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Επιβλέπουσα: Αντωνίου Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια**

## Περίληψη

Η κανναβιδιόλη (CBD) είναι μια μη ψυχομιμητική ένωση του φυτού της κάνναβης, ενώ το κανναβιδιολικό οξύ (CBDA) είναι μία ασταθής ένωση, η οποία είναι το πρόδρομο οξύ από το οποίο συντίθεται η CBD, μέσω της αποκαρβοξυλίωσής του. Επιστημονικές μελέτες υποστηρίζουν ότι οι δύο αυτές ουσίες έχουν μεγάλο εύρος φαρμακολογικών ιδιοτήτων, περιλαμβανομένης της αναλγητικής τους δράσης κυρίως σε μοντέλα νευροπαθητικού πόνου. Οι περισσότερες από τις μελέτες αυτές έχουν επικεντρωθεί στη αναλγητική δράση της CBD επί του νευροπαθητικού πόνου, ενώ ελάχιστες έχουν ερευνήσει την αναλγητική δράση της CBD και του CBDA σε οξύ πόνο. Στην παρούσα μελέτη, ερευνήθηκε και αξιολογήθηκε η δράση της CBD (1, 3, 10, 30 mg/kg) και του CBDA (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg) επί της αυθόρμητης κινητικότητας και επί του πόνου, σε επίμυες, χρησιμοποιώντας την δοκιμασία ελέγχου κινητικότητας ανοικτού πεδίου και τη δοκιμασία θερμαινόμενης πλάκας. Επίσης ερευνήθηκε και αξιολογήθηκε η αναλγητική δράση της CBD σε πειραματικό μοντέλο νευροπαθητικού πόνου σε επίμυες με τη δοκιμασία von Frey. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι οξεία χορήγηση της υψηλότερης δόσης CBD (30 mg/kg) προκαλεί μείωση της αυθόρμητης κινητικότητας στη δοκιμασία του ανοικτού πεδίου, Η CBD παρουσιάζει αναλγητική δράση κατά τη δοκιμασία της θερμαινόμενης πλάκας, μία (1) ώρα μετά την οξεία χορήγησή της σε δόση 1 mg/kg, αλλά και μετά τη χρόνια χορήγησή της σε δόσεις 1 και 3 mg/kg. Από την άλλη, η οξέως χορηγούμενη CBD δεν επηρεάζει την αναλγητική δράση της κωδεΐνης ούτε ασκεί αναλγητική δράση επί του νευροπαθητικού πόνου σε επίμυες. Τέλος, το CBDA έχει αναλγητική δράση, κατά τη δοκιμασία θερμαινόμενης πλάκας, και στις 3 χρονικές στιγμές μέτρησης (0.5, 1, 2 ώρες) μετά από οξεία χορήγηση σε δόση 0.1 mg/kg, αλλά και 2 ώρες μετά από τη χορήγηση σε δόσεις 0.3 και 3 mg/kg. Τα παρόντα αποτελέσματα δείχνουν ότι η οξεία χορήγηση του CBDA σε χαμηλή δόση, καθώς και η χρόνια χορήγηση της CBD χρονίως έχουν αναλγητική δράση, γεγονός που αναμένεται να συμβάλει στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση του πόνου.

## Abstract

Cannabidiol (CBD) is a non-addictive ingredient of cannabis, which is synthesized through the decarboxylation of its precursor acid, cannabidiolic acid (CBDA). An amount of studies report that these two substances have a wide range of pharmacological properties, among them their analgesic effect, especially on neuropathic pain. However, few experimental studies have investigated the analgesic effect of low doses of CBD and CBDA. In the present study, the analgesic and motoric effects of both CBD (1, 3, 10, 30 mg/kg) and CBDA (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg) were investigated using the Open Field apparatus and the Hot Plate test. The analgesic properties of CBD were also studied in a rat model of neuropathic pain using the von Frey test. Present results showed that only the highest dose of CBD (30mg/kg) causes a decrease in spontaneous motor activity. Acute administration of CBD induced an analgesic effect at the dose of 1 mg/kg (i.p.), one hour following its administration. Additionally, chronic administration of CBD (1 and 3 mg/kg, i.p.) induced analgesic effect, using the Hot Plate test. On the other hand, acute CBD administration did not affect the analgesic action of codeine while it did not induce a statistically significant effect on neuropathic pain as deduced using the von Frey test. Finally, analgesic effect was also appeared following acute CBDA administration and this effect was prominent at the dose of 0.1 mg/kg (i.p.), using the Hot Plate test. The results of the present study show that the acute administration of CBD and CBDA induce analgesic effects at low doses. Moreover, analgesic effect was also observed following the chronic administration of CBD. These findings confirm and extend information on phytocannabinoids-induced analgesia and contribute to the development of new therapeutic approaches for the treatment of pain.

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο της Φαρμακολογίας της Ιατρικής σχολής Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη της κ. Αντωνίου. Ολοκληρώνοντας την εκπόνησή της, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους ανθρώπους οι οποίοι συνέβαλαν στη διεκπεραίωσή της. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας και Επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας κυρία Αικατερίνη Αντωνίου για τη συνεχή καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές καθώς και την αμέριστη υποστήριξή της όλο το διάστημα της εκπόνησης της εργασίας. Ήδη από την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας, ως προπτυχιακός φοιτητής στο εργαστήριο Φαρμακολογίας υπό την επίβλεψή της, με κέρδισε με την οργανωτικότητα, τη δυναμικότητα, τη γενναιοδωρία της και κυρίως με τις ουσιώδεις γνώσεις που μου μετέδωσε και την απεριόριστη φροντίδα προς το πρόσωπό μου. Εν συνεχεία θα ήθελα να ευχαριστήσω τους επίκουρους Καθηγητές κ. Λεονταρίτη και κ. Λαμπρακάκη γιατί δέχθηκαν να συμμετάσχουν στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο Καθηγητή κ. Λαμπρακάκη και για τη βοήθεια και την άριστη συνεργασία στην πραγματοποίηση και την ολοκλήρωση των συμπεριφορικών πειραμάτων σε μοντέλο νευροπηθητικού πόνου σε επίμυες, τα οποία πραγματοποιήθηκαν υπό την καθοδήγησή του και με τη βοήθεια της ερευνητικής του ομάδας στο εργαστήριο Φυσιολογίας του τμήματος ΒΕΤ. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας και του Εκτροφείου Πειραματοζώων για το άριστο και φιλικό κλίμα που υπήρχε όλον αυτόν το καιρό. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Μεταδιδακτορική ερευνήτρια κ. Δελή, και τον Διδακτορικό φοιτητή κ. Μπρακατσέλο για την πολύτιμη καθοδήγησή, αρωγή, ανοχή και υποστήριξή τους καθώς και για την άριστη συνεργασία και το φιλικό περιβάλλον που δημιούργησαν μεταξύ μας καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας αυτής. Τέλος, το πιο μεγάλο μου ευχαριστώ απευθύνεται στους γονείς μου και τον αδερφό μου, οι οποίοι έστω και από απόσταση στάθηκαν πάντα δίπλα μου όλο το διάστημα αυτό. Η συμπαράσταση, οι συμβουλές και η απλόχερη αγάπη τους με βοήθησαν στο έπακρο στην επίτευξη των στόχων και των ονείρων μου.

# Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή .....	σελ. 8
1.1 Κάνναβη (Cannabis sativa L.) .....	σελ. 8
1.2 Βιομηχανική και Φαρμακευτική κάνναβη .....	σελ. 9
1.3 Κανναβινοειδή.....	σελ. 9
1.4 Κανναβιδιόλη (CBD) .....	σελ. 10
1.4.1 Ιστορικά στοιχεία .....	σελ. 10
1.4.2 Χημικές και φυσικές ιδιότητες του μορίου της CBD .....	σελ. 10
1.4.3 Σύνθεση της CBD .....	σελ. 10
1.4.4 Φαρμακοκινητική.....	σελ. 11
1.4.5 Φαρμακοδυναμική .....	σελ. 11
1.4.6 Φαρμακολογικές ιδιότητες.....	σελ. 13
1.4.7 Τοξικότητα και ανεπιθύμητες ενέργειες .....	σελ. 13
1.4.8 Φαρμακευτικά σκευάσματα με CBD .....	σελ. 14
1.4.9 CBD και Πόνος.....	σελ. 15
1.5 Κανναβιδιολικό οξύ (CBDA).....	σελ. 17
1.5.1 Χημεία και σύνθεση του κανναβιδιολικού οξέως.....	σελ. 17
1.5.2 Φαρμακοδυναμική .....	σελ. 18
1.5.3 Φαρμακοκινητική.....	σελ. 19
1.5.4 Φαρμακολογικές ιδιότητες.....	σελ. 19
1.5.5 Τοξικότητα και ανεπιθύμητες ενέργειες .....	σελ. 19
1.5.6 CBDA και Πόνος .....	σελ. 19
Σκοπός της μελέτης.....	σελ. 20
2. Υλικά και Μέθοδοι .....	σελ. 21
2.1 Πειραματόζωα .....	σελ. 21
2.2 Φάρμακα.....	σελ. 21
2.3 Διαδικασία δημιουργίας Νευροπάθειας .....	σελ. 21
2.4 Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (Open Field Test, OFT) .....	σελ. 22
2.5 Δοκιμασία θερμικής ευαισθησίας (Μέθοδος Θερμαινόμενης Πλάκας - Hot Plate Test, HPT).....	σελ. 23
2.6 Δοκιμασία μηχανικής ευαισθησίας στο πέλμα των πίσω άκρων (von Frey) .....	σελ. 24

2.7 Στατιστική ανάλυση .....	σελ. 26
3. Αποτελέσματα.....	σελ. 27
3.1 Δοκιμασία Ανοικτού Πεδίου (Open Field) .....	σελ. 27
3.1.1 Η επίδραση της οξείας χορήγησης της CBD στη κινητικότητα Ανοικτού πεδίου.....	σελ. 27
3.1.2 Η επίδραση της οξείας χορήγησης του CBDA στη κινητικότητα Ανοικτού Πεδίου.....	σελ. 29
3.2 Δοκιμασία Θερμαινόμενης Πλάκας (Hot Plate) .....	σελ. 30
3.2.1 Η επίδραση της οξείας χορήγησης CBD στη δοκιμασία Θερμαινόμενης Πλάκας .....	σελ. 30
3.2.2 Η επίδραση της χρόνιας χορήγησης CBD στη δοκιμασία της Θερμαινόμενης Πλάκας .....	σελ. 31
3.2.3 Η επίδραση της οξείας συγχορήγησης κανναβιδιόλης (CBD) και κωδεΐνης (Cod) στη δοκιμασία Θερμαινόμενης Πλάκας.....	σελ. 32
3.2.4 Η επίδραση της οξείας χορήγησης CBDA στη δοκιμασία Θερμαινόμενης Πλάκας .....	σελ. 33
3.3 Δοκιμασία von Frey .....	σελ. 35
3.3.4 Η επίδραση της οξείας χορήγησης CBD επί του νευροπαθητικού πόνου στη δοκιμασία von Frey .....	σελ. 35
4. Συζήτηση.....	σελ. 36
4.1 Επίδραση της χορήγησης κανναβιδιόλης στην δοκιμασία ανοιχτού πεδίου .....	σελ. 36
4.2 Επίδραση της χορήγησης κανναβιδιολικού οξέος στην δοκιμασία ανοιχτού πεδίου.....	σελ. 37
4.3 Επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιόλης στην δοκιμασία Θερμαινόμενης Πλάκας.....	σελ. 37
4.4 Επίδραση της χρόνιας χορήγησης κανναβιδιόλης στη δοκιμασία Θερμαινόμενης Πλάκας.....	σελ. 38
4.5 Επίδραση της οξείας συγχορήγησης κανναβιδιόλης και κωδεΐνης στη δοκιμασία θερμαινόμενης πλάκας .....	σελ. 38
4.6 Επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιόλης επί του νευροπαθητικού πόνου στην δοκιμασία von Frey .....	σελ. 39
4.7 Επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιολικού οξέος στη δοκιμασία Θερμαινόμενης Πλάκας.....	σελ. 39
5. Συμπεράσματα .....	σελ. 41
6. Βιβλιογραφία .....	σελ. 42

## Κατάλογος Γραφημάτων

- Γράφημα 1.** Επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιόλης (CBD) στην διανυθείσα απόσταση κατά τη δοκιμασία ανοικτού πεδίου .....σελ. 28
- Γράφημα 2.** Επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιόλης (CBD) στην συχνότητα κατακόρυφης ανόρθωσης του ανοικτού πεδίου.....σελ. 28
- Γράφημα 3.** Επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιολικού οξέως (CBDA) στην διανυθείσα απόσταση κατά τη δοκιμασία ανοικτού πεδίου .....σελ. 29
- Γράφημα 4.** Επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιολικού οξέως (CBDA) στην συχνότητα κατακόρυφης ανόρθωσης κατά τη δοκιμασία ανοικτού πεδίου .....σελ. 30
- Γράφημα 5.** Επίδραση της οξείας χορήγησης της κανναβιδιόλης (CBD) στο χρονικό διάστημα απόκρισης του πειραματόζωου στη δοκιμασία θερμαινόμενης πλάκας..σελ. 31
- Γράφημα 6.** Επίδρασης της χρόνιας χορήγησης CBD στο χρονικό διάστημα απόκρισης του πειραματόζωου στη δοκιμασία θερμαινόμενης πλάκας.....σελ. 32
- Γράφημα 7.** Επίδρασης της οξείας συγχορήγησης κανναβιδιόλης (CBD) και κωδεΐνης (Cod) στο χρονικό διάστημα απόκρισης του πειραματόζωου στη δοκιμασία θερμαινόμενης πλάκας .....σελ. 33
- Γράφημα 8.** Επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιόλης (CBD) στην απόκριση του πειραματόζωου σε μηχανικό ερέθισμα κατά τη δοκιμασία von Frey, σε μοντέλο νευροπαθητικού πόνου .....σελ. 34
- Γράφημα 9.** Επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιολοκού οξέος (CBDA) στο χρονικό διάστημα απόκρισης του πειραματόζωου στη δοκιμασία θερμαινόμενης πλάκας .....σελ.35

## Κατάλογος Εικόνων

<b>Εικόνα 1.</b> Cannabis sativa L.....	σελ 8
<b>Εικόνα 2.</b> Δ9-THC και CBD .....	σελ. 9
<b>Εικόνα 3.</b> Φυσική σύνθεση της CBD μέσω αποκαρβοξυλίωσης του CBDA....	σελ. 10
<b>Εικόνα 4.</b> Φυσική σύνθεση του CBDA από το CBGA μέσω της συνθάσης του CBDA .....	σελ. 17
<b>Εικόνα 5.</b> Πορεία σύνθεσης του CBD .....	σελ. 18
<b>Εικόνα 6.</b> Πειραματική διάταξη του πρότυπου ανοικτού πεδίου (Open Field) .	σελ. 22
<b>Εικόνα 7.</b> Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διεργασίας του ανοιχτού πεδίου .....	σελ 22
<b>Εικόνα 8.</b> Πειραματική διάταξη της δοκιμασίας της θερμαινόμενης πλάκας (Hot Plate) .....	σελ. 23
<b>Εικόνα 9.</b> Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διεργασίας της θερμαινόμενης πλάκας.....	σελ. 24
<b>Εικόνα 10.</b> Πειραματική διάταξη της δοκιμασίας von Frey .....	σελ. 25
<b>Εικόνα 11.</b> Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διεργασίας von Frey.....	σελ. 26



# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Κάνναβη (*Cannabis sativa* L.)

Η ήμερη κάνναβη (*Cannabis sativa* L.) ανήκει στην οικογένεια των ποωδών φυτών Cannabaceae και ευδοκίμει σε ποικίλους οικοτόπους και υψόμετρα, τα οποία κυμαίνονται από το επίπεδο της θάλασσας μέχρι τους αλπικούς πρόποδες των Ιμαλαΐων, από όπου ενδεχομένως να προήλθε (ElSohly et al, 2017). Πιο συγκεκριμένα, πρωτοκαλλιεργήθηκε στην Κίνα το 4000 π.Χ., γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι χρησιμοποιούνταν για την παρασκευή υφασμάτων, σχοινιών και χαρτιού. Επιπρόσθετα χρησιμοποιούνταν ως ιερό φυτό σε θρησκευτικές τελετές στη νότια Ασία και αναφερόταν ως πηγή ευτυχίας και χαράς. Βρέθηκε ακόμη ότι η κάνναβη χρησιμοποιούνταν για ιατρικούς σκοπούς, όπως για τη θεραπεία της ελονοσίας, την εντερική δυσκοιλιότητα, τον εμμηνορροϊκό και χειρουργικό πόνο. Η φαρμακευτική της χρήση καταγράφεται από τα αρχαία χρόνια και συνεχίζει μέχρι σήμερα (Elsaid et al, 2019).

Η χρήση της για ιατρικούς σκοπούς και για λόγους αναψυχής διαδόθηκε από την Ινδία στη Μέση Ανατολή και την Αφρική. Επίσης διαδόθηκε μέσω των σκλάβων από την Αφρική στη Βραζιλία, ενώ εισήχθη στη Δυτική ιατρική το 19ο αιώνα μέσω του Δρ. William O'Shaughnessy, ο οποίος ταξίδεψε από την Αγγλία στη Ινδία. Ο Δρ. Shaughnessy ήταν ο πρώτος επιστήμονας ο οποίος διερεύνησε τις τοξικολογικές και θεραπευτικές ιδιότητες της κάνναβης σε μελέτες ζώων και ανθρώπων. Μεταγενέστερα χρησιμοποιήθηκε ευρέως ως ηρεμιστικό/υπνωτικό, αναλγητικό και διεγερτικό της όρεξης μέχρι τα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα, οπότε αντικαταστάθηκε από άλλα φάρμακα που έγιναν διαθέσιμα. Η χρήση της περιορίστηκε περαιτέρω όταν αφαιρέθηκε από την Αμερικάνικη φαρμακοποιία (1941), λόγω των ψυχοτρόπων ιδιοτήτων της. Οι νόμοι περιορισμού χρήσης και διανομής της αυστηροποιήθηκαν τη δεκαετία του 1960 όταν και έγινε έξαρση της ψυχαγωγικής χρήσης της από το νεαρό ενήλικο πληθυσμό στις Η.Π.Α. (Elsaid et al, 2019).



**Εικόνα 1:** *Cannabis sativa* L.(strainprint.ca)

## 1.2 Βιομηχανική και Φαρμακευτική κάνναβη

Πλέον είναι δυνατή η καλλιέργεια και η παραγωγή στελεχών κάνναβης με διαφορετική περιεκτικότητα σε φυτοκανναβινοειδή και ειδικότερα στο ψυχοτρόπο φυτοκανναβινοειδές Δ-9-τετραϋδροκανναβινόλη (THC). Από χημικής άποψης, τα φυτά της κάνναβης κατατάσσονται ανάλογα με την περιεκτικότητά τους στα φυτοκανναβινοειδή THC) και κανναβιδιόλη (CBD). Προκύπτουν έτσι τρεις κύριοι χημειότυποι: I) υψηλής περιεκτικότητας σε THC, II) ίσης περιεκτικότητας THC και CBD, III) υψηλής περιεκτικότητας σε CBD. Επίσης η κάνναβη διακρίνεται σε δυο κατηγορίες: την βιομηχανική κάνναβη και την φαρμακευτική κάνναβη, ανάλογα με την περιεκτικότητα σε THC. Αναλυτικότερα, στην Ευρωπαϊκή Ένωση και τον Καναδά η βιομηχανική κάνναβη θεωρείται εκείνο το φυτό με περιεκτικότητα σε THC <0.2 %, αν και το συγκεκριμένο ποσοστό μπορεί ανά χώρα να διαφοροποιείται και να επιτρέπεται μέχρι και 0.6%. Από την άλλη, η περιεκτικότητα της φαρμακευτικής κάνναβης σε THC είναι μεγαλύτερη από το ποσοστό που προαναφέρθηκε, ενώ τα προϊόντα από την επεξεργασία του φυτού είναι φαρμακευτικά και ακολουθούν κατ' αναλογία τη φαρμακευτική νομοθεσία και το αντίστοιχο πλαίσιο συνταγογράφησης (Hartsel et al, 2016, Αυγερινός κ.α. 2018).

## 1.3 Κανναβινοειδή

Η ήμερη κάνναβη περιέχει περισσότερες από 500 ενώσεις, εκ των οποίων τουλάχιστον οι 113 ανήκουν στην οικογένεια των κανναβινοειδών. Τα κανναβινοειδή είναι μια κατηγορία ποικίλων χημικών ενώσεων που ασκούν δράσεις στο ΚΝΣ και στην περιφέρεια (ElSohly et al, 2017, Elsaid et al, 2019). Αναλυτικότερα, ως κανναβινοειδή ορίζονται τα φυσικά προϊόντα (φυτοκανναβινοειδή) που απομονώνονται από το φυτό της κάνναβης και είναι μια κατηγορία ενώσεων οι οποίες αποτελούνται από ένα τυπικό τερπενοφαινολικό σκελετό 21 ατόμων άνθρακα. Αυτή η κατηγορία ενώσεων έχει παράγωγα και προϊόντα μετασχηματισμού τα οποία θεωρούνται επίσης κανναβινοειδή. Όπως προαναφέρθηκε τα κανναβινοειδή που έχουν απομονωθεί είναι περισσότερα από 100 και μπορούν να ταξινομηθούν σε 10 γενικούς τύπους όπως για παράδειγμα, Δ9-trans-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ9-THC), Δ8-trans-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ8-THC), κανναβιγερόλη (CBG), κανναβιχρωμίνη (CBC), κανναβιδιόλη (CBD), κανναβινοδιόλη (CBND), κανναβελσοΐνη (CBE), κανναβικυκλόλη (CBL), κανναβινόλη (CBN), και κανναβιτριόλη (CBT) (Kinghorn et al, 2017). Από αυτά, τα κύρια φυτοκανναβινοειδή είναι δύο, η Δ9-THC και η CBD (ElSohly et al, 2017, Elsaid et al, 2019), και έχουν εκτενώς μελετηθεί (εικόνα 2).



Εικόνα 2: Δ9-THC και CBD (Leafscience.com)

## 1.4 Κανναβιδιόλη (CBD)

### 1.4.1 Ιστορικά στοιχεία

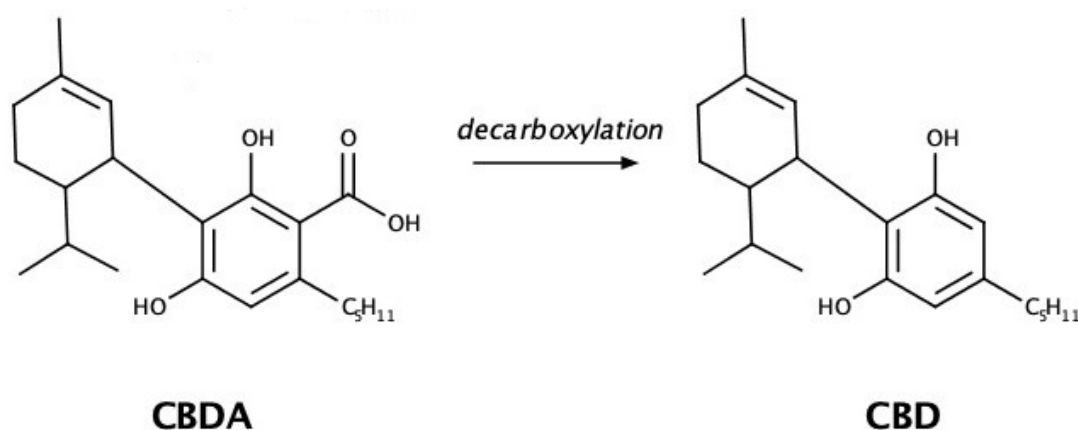
Η CBD, σε αντίθεση με την THC, είναι μια μη ψυχομιμητική ένωση, η οποία απομονώθηκε τυχαία από το φυτό της κάνναβης για πρώτη φορά το από τους Adams et al, (1940) στο πανεπιστήμιο του Ιλινόι. Ο Δρ. Walter S. Loewe ήταν ο πρώτος που μελέτησε τις επιπτώσεις της χορήγησης της CBD με δοκιμές σε εργαστηριακά ζώα (Pertwee, 2006). Ωστόσο, η χημική του δομή χαρακτηρίστηκε 20 χρόνια αργότερα από τους Mechoulam et al, (2002). Αν και η κανναβιδιόλη ανακαλύφθηκε περισσότερο από 20 χρόνια πριν την THC, η THC κυριάρχησε στην έρευνα σχετικά με την κάνναβη μέχρι πρόσφατα (Gaoni et al, 1964). Μόλις το 1980, η μελέτη του καθ. Mechoulam και των συνεργατών του ανέδειξε τη θετική επίδραση της χορήγησης της CBD σε ασθενείς με επιληψία (Cunha et al, 1980).

### 1.4.2 Χημικές και φυσικές ιδιότητες του μορίου της CBD

Η κανναβιδιόλη είναι ένα φαινολικό τερπένιο του φυτού της κάνναβης το οποίο είναι αδιάλυτο στο νερό αλλά διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες όπως το πεντάνιο ή το εξάνιο. Σε θερμοκρασία δωματίου, είναι ένα άχρωμο κρυσταλλικό στερεό, ενώ σε έντονα βασικά μέσα και παρουσία αέρα, οξειδώνεται σε κινόνη. Επίσης, υπό όξινες συνθήκες μετατρέπεται σε THC (Gaoni et al, 1966). Τέλος, η CBD αποτελείται από 21, 30 και 2 άτομα άνθρακα, υδρογόνου και οξυγόνου αντίστοιχα και η χημική της ονομασία κατά IUPAC είναι 2-[(6R)-3-μεθυλ-6-προπ-1-εν-2-υλκυκλοεξ-2-εν-1-υλ]-5-πεντυλοβενζόλιο-1,3-διόλη.

### 1.4.3 Σύνθεση της CBD

Η CBD συντίθεται φυσικά μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του πρόδρομου οξέος της, του κανναβιδιολικού οξέος (CBDA), το οποίο είναι εκείνο που εντοπίζεται στο φυτό της κάνναβης, αρχικά με τη μορφή του κανναβιγερολικού οξέος (cannabigerolic acid, CBGA) και παίρνει την τελική του μορφή ύστερα από τη δράση της συνθάσης του CBDA (Εικόνα 3). Η αποκαρβοξυλίωση του CBDA λαμβάνει χώρα μέσω της θέρμανσης, της έκθεσης στο φως ή της γήρανσης της κάνναβης. Επίσης είναι δυνατή η σύνθεσή της και μέσω συνθετικών οδών in vitro, ωστόσο η ποσότητα της CBD που αποδίδουν είναι μικρή (Review Report, WHO, 2018).



Εικόνα 3. Φυσική σύνθεση της CBD μέσω αποκαρβοξυλίωσης του CBDA (Analytical Cannabis.com)

#### 1.4.4 Φαρμακοκινητική

Η κανναβιδιόλη είναι μια εξαιρετικά λιποδιαλυτή ουσία, η οποία απορροφάται σχετικά καλά στο λεπτό έντερο. Μετά την απορρόφησή της στο λεπτό έντερο, υφίσταται έντονα το φαινόμενο της αρχικής διάβασης πριν από την είσοδο της στη συστηματική κυκλοφορία. Για το λόγο αυτό, η βιοδιαθεσιμότητά της, όταν χορηγείται μέσω της στοματικής οδού, είναι χαμηλή (από 6% έως και 13-19%) (Review Report, WHO, 2018, Elsaid et al, 2019). Η υπογλώσσια χορήγησή της αυξάνει ελαφρώς τη βιοδιαθεσιμότητά της. Ωστόσο, η μέγιστη συγκέντρωση της CBD επιτυγχάνεται ταχύτερα μετά από α) ενδοφλέβια χορήγηση (i.v.), β) όταν εισπνέεται, γ) όταν χορηγείται από το στόμα κατά την λήψη τροφής. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι η βιοδιαθεσιμότητα της CBD στη συστηματική κυκλοφορία τριπλασιάζεται όταν συγχρηγείται με λιπίδια.

Στη συστηματική κυκλοφορία, η CBD κατανέμεται γρήγορα στον εγκέφαλο, το λιπώδη ιστό και σε άλλα όργανα λόγω του εξαιρετικά λιπόφιλου προφίλ της. Επίσης, δεσμεύεται σε υψηλά επίπεδα σε πρωτεΐνες, ενώ περίπου το 10% συνδέεται με ερυθρά αιμοσφαίρια. (Elsaid et al, 2019).

Η CBD μεταβολίζεται εκτενώς στο ήπαρ. Έχουν εντοπιστεί 53 μεταβολίτες της CBD, εκ των οποίων οι περισσότεροι είναι προϊόντα οξείδωσης, β-οξείδωσης, υδροξυλίωσης, σύζευξης γλυκουρονιδίου και εποξείδωσης. Κατά τον μεταβολισμό της Φάσης I, η CBD οξειδώνεται από 7 ένζυμα του κυτοχρώματος (CYP), τα CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 και CYP3A5. Αποτέλεσμα είναι η υδροξυλίωση σε 7-OH-CBD, η οποία στη συνέχεια μεταβολίζεται περαιτέρω και απεκκρίνεται στα κόπρανα, αλλά και στα ούρα σε ελεύθερη κατάσταση και ως παράγωγο γλυκουρονίδης. Ωστόσο, όσον αφορά την απέκκρισή της, η CBD απεκκρίνεται κυρίως στη χολή (Pre-Review Report, WHO, 2017, Elsaid et al, 2019).

Δεδομένου ότι η CBD είναι ισχυρός αναστολέας των ενζύμων CYP2C και CYP3A, είναι αναγκαία η διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ φαρμάκων και CBD, ειδικά όταν τα φάρμακα μεταβολίζονται από τα συγκεκριμένα ένζυμα (Elsaid et al, 2019).

Ο χρόνος ημίσειας ζωής ( $t_{1/2}$ ) της CBD εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την οδό χορήγησης. Πιο συγκεκριμένα όταν χορηγείται από το στόμα ο  $t_{1/2}$  είναι μικρότερος (1.4-10.9 ώρες) από ότι όταν χορηγείται ενδοφλεβίως (24 ώρες) ή από όταν καπνίζεται (31 ώρες) (Elsaid et al, 2019).

#### 1.4.5 Φαρμακοδυναμική

Η CBD έχει περίπλοκο φαρμακοδυναμικό προφίλ, καθώς αλληλεπιδρά με ευρύ φάσμα μοριακών στόχων. Με βάση τα μέχρι τώρα δεδομένα πιστεύεται ότι η πληθώρα των στόχων αυτών (49%) είναι ενζυματικοί (π.χ. ένζυμα του κυτοχρώματος CYP450), ένα μικρότερο ποσοστό (20%) είναι μεμβρανικοί και κυτταρικοί μεταφορείς, και 15% είναι υποδοχείς και ιοντικά κανάλια. Παρά το γεγονός ότι δεν έχουν πλήρως διεκρινιστεί οι μηχανισμοί δράσης της, τα τρέχοντα δεδομένα, από μελέτες σε προκλινικό και κλινικό επίπεδο, προτείνουν ότι η CBD πιθανόν διαθέτει αναλγητική, αντιψυχωσική, αγχολυτική, αντισπασμωδική, αντιπλεγμονώδη, αντι-αποπτωτική, αντιοξειδωτική και νευροπροστατευτική δράση (Elsaid et al, 2019).

Η CBD ασκεί τις ενέργειές της επηρεάζοντας διάφορα συστήματα. Ένα από τα **συστήματα είναι το ενδοκανναβινοειδές** το οποίο περιλαμβάνει τα ενδοκανναβινοειδή και τους υποδοχείς του οι οποίοι εντοπίζονται στον εγκέφαλο, στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, στο λίπος, στους μυς και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Η CBD αν και φυτο-κανναβινοειδές φαίνεται να έχει ασθενή επίδραση στη ενεργοποίηση στο σύστημα μέσω των υποδοχέων του και ο μηχανισμός δράσης της είναι πιο περίπλοκος. Εμφανίζει πολύ μικρή συγγένεια με τους υποδοχείς των ενδοκανναβινοειδών τύπου 1 (CB1) και τύπου 2 (CB2). Συγκεκριμένα στον CB1 υποδοχέα ασκεί δράση αρνητικού αλλοστερικού τροποποιητή (Welty et al, 2014, Elsaid et al, 2019). Η επίδραση αυτή είναι σημαντική, επειδή η ανασταλτική δράση στον CB1 υποδοχέα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, ώστε να διατηρείται η φυσιολογική δραστηριότητα του εγκεφάλου, καθώς οι υποδοχείς αυτοί προστατεύουν τον εγκέφαλο από επιληπτικές κρίσεις (Wallace et al, 2004). Ακόμη, προκαλεί αύξηση έκλυσης ενδοκανναβινοειδών όπως η ανανδαμίδη η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί τους υποδοχείς και η δράση αυτή έχει συσχετιστεί με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Zurier et al, 2016).

Επιπλέον η CBD φαίνεται να μπορεί να αναστείλει την υδρολάση του αμιδίου του λιπαρού οξέος (FAAH), αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τον καταβολισμό της ανανδαμίδης (Ibeas Bih et al, 2015, Elsaid et al, 2019). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι η CBD, μέσω της αλληλεπίδρασής της με το ενδοκανναβινοειδές σύστημα, αναστέλλει πολλές από τις φαρμακολογικές ιδιότητες της THC. Ο πιθανός μοριακός μηχανισμός μέσω του οποίου η CBD επιτυγχάνει αυτό το αποτέλεσμα εμπλέκει το φωσφατιδικό μονοπάτι pERK1-2, καθώς οι Hudson et al., (2019) παρατήρησαν ότι η χορήγηση CBD ανέστειλε την επίδραση της THC ως προς το pERK1-2.

Επιπρόσθετα, η CBD εμφανίζει αγωνιστική δράση στους υποδοχείς **σεροτονίνης 5HT-1A** στη ραχιαία περιυδραγωγό φαιά (dPAG), στα βασικά γάγγλια και στο ραχιαίο πυρήνα της ραφής. Η σεροτονίνη εμπλέκεται σε αρκετές φυσιολογικές λειτουργίες και παθοφυσιολογικές καταστάσεις του ΚΝΣ (άγχος, κατάθλιψη, ψύχωση, διαταραχές ως προς τη λήψη τροφής, διαταραχές ύπνου κ.α) και η αλληλεπίδραση της CBD με τους 5HT-1A υποδοχείς, έχει συσχετιστεί με τις αγχολυτικές, αντιψυχωτικές και αντικαταθλιπτικές της ιδιότητες (Elsaid et al, 2019).

Μία άλλη οδός δράσης της CBD αποτελούν οι ιοντικοί διάυλοι/υποδοχείς παροδικού δυναμικού (TRP), οι οποίοι επηρεάζουν τα επίπεδα ασβεστίου εντός του κυττάρου. Επομένως, η δράση της CBD επί των TRP υποδοχέων είναι ικανή να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων ασβεστίου σε διάφορους τύπους κυττάρων (Welty et al., 2014). Η CBD επίσης προκαλεί την ενεργοποίηση και απευαισθητοποίηση των βανιλλοειδικών υποδοχέων (TRPV 1-2) και με τον τρόπο αυτό πιθανώς να εμφανίζει αντι-επιληπτική, αγχολυτική και αντι-υπεραλγησιακή δράση (Elsaid et al, 2019).

Η CBD ακόμη εμφανίζει αγωνιστική δράση επί των υποδοχέων A<sub>1</sub> της αδενοσίνης και η δράση της αυτή έχει συσχετισθεί με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και ευεργετική επίδραση κατά την κοιλιακή ταχυκαρδία. (Elsaid et al, 2019).

Η CBD επίσης αναστέλλει δυναμικά τη συναπτοσωμική πρόσληψη νοραδρεναλίνης, ντοπαμίνης, σεροτονίνης και γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA). Πρόσφατες in vitro μελέτες, έδειξαν ότι η CBD δρα στους «High» και «Low» υποδοχείς ντοπαμίνης D<sub>2</sub>, ανάλογα με τη συγκέντρωσή της (Elsaid et al, 2019).

Εμφανίζει ανταγωνιστικές δράσεις επί των υποδοχέων των οπιοειδών ( $\mu$  και  $\delta$ ). Όπως φαίνεται και από μια μελέτη κινητικής σε παρασκεύασμα φλοιού από επίμου, η οποία έχει δείξει τη δράση της CBD ως αρνητικός αλλοστερικός τροποποιητής των υποδοχέων των οπιοειδών τύπου  $\mu$  και  $\delta$ , οι οποίοι είναι συζευγμένοι με  $G_{j/o}$  πρωτεΐνες (Kathman et al, 2006). Λόγω της μελέτης αυτής είχε ως επακόλουθο η CBD να μελετηθεί ως θεραπευτικός παράγων για τον εθισμό στα οπιοειδή (Elsaid et al, 2019).

Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιεί και αυξάνει την πρωτεϊνική έκφραση του υποδοχέα PPAR- $\gamma$ , ο οποίος αποτελεί σημαντικό στόχο σε μελέτες πειραματικών μοντέλων της νόσου Alzheimer. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα αυτού επίσης επιφέρει αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές δράσεις (Elsaid et al, 2019).

Άξια αναφοράς αποτελεί η ανταγωνιστική δράση της CBD επί των υποδοχέων των G πρωτεϊνών 55 (GPR55). Η ενεργοποίηση του υποδοχέα GPR55 προκαλεί αύξηση της απελευθέρωσης του ασβεστίου από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες, ρυθμίζοντας περαιτέρω την απελευθέρωση διεγερτικών νευροδιαβιβαστών, όπως το γλουταμικό οξύ. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του GPR55 διεγείρει τον πυρηνικό παράγοντα καλσινευρίνης των ενεργοποιημένων T κυττάρων (NFAT), ο οποίος εμπλέκεται στην ενίσχυση της ανοσοαπόκρισης και των νευροεκφυλιστικών διαδικασιών. Ο αποκλεισμός του υποδοχέα GPR55 θα μπορούσε να σχετίζεται με τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις της CBD (Elsaid et al, 2019).

#### **1.4.6 Φαρμακολογικές ιδιότητες**

Δεδομένου ότι η CBD παρουσιάζει πολλαπλούς μηχανισμούς δράσης, εμφανίζει μεγάλο εύρος ως προς τις πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές της. Παρά το γεγονός ότι οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης της CBD δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί σε πειραματικά ζωικά μοντέλα ή σε ανθρώπους, έχει δείχθει ότι έχει αναλγητικές, αντιψυχωσικές, αγχολυτικές, αντισπασμωδικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιαποπτωτικές, αντιοξειδωτικές, και νευροπροστατευτικές ιδιότητες. Η CBD, ακόμη εμφανίζει αναλγητική δράση επί του νευροπαθητικού πόνου και του πόνου στους καρκινοπαθείς. Τέλος, η CBD έχει διερευνηθεί και διερευνάται ως προς την πιθανή θεραπευτική της δράση σε διαφορες διαταραχές του ΚΝΣ όπως στην επιληψία, στη νόσο του Alzheimer, του Parkinson, του Huntington, στη σχιζοφρένεια, στις διαταραχές της διάθεσης και στην αντιμετώπιση του εθισμού σε εξαρτησιογόνες ουσίες (Review Report, WHO, 2018, Elsaid et al, 2019).

#### **1.4.7 Τοξικότητα και ανεπιθύμητες ενέργειες**

In vitro και ζωικά πειράματα έχουν δείξει ότι η CBD έχει σχετικά μικρή τοξικότητα, αν και το ερώτημα χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Σχετικά με την ασφάλεια και την ανεκτικότητα της, οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί, έδειξαν μη σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες μετά από οξεία ή χρόνια χορήγηση από του στόματος δόσεων CBD έως 1500 mg/ημέρα ή ενδοφλέβιων δόσεων 30 mg (Bergamaschi et al, 2011). Επιπλέον, προκλινικές και κλινικές μελέτες έδειξαν ότι δεν εμφανίζει προφίλ εξάρτησης και γενικά αποτελεί μια ασφαλή και καλά ανεκτή ουσία (Bergamaschi et al, 2011, Elsaid et al, 2019).

Ειδικότερα σε μια πειραματική μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί μύες οι οποίοι έλαβαν ενδοπεριτοναϊκώς μία φορά τη μέρα CBD (0.1, 1 ή 3 mg/kg) ή THC (1, 3 ή 10 mg/kg) για 14 συνεχόμενες μέρες, δεν παρατηρήθηκε αντοχή ως προς τη CBD,

παρά μόνο για την THC. Μια πειραματική μελέτη έδειξε ότι η χορήγηση χαμηλής δόσης CBD (5 mg/kg) σε αρσενικούς επίμυες Sprague-Dawley δεν μεταβάλλει το κατώφλι του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού. Από την άλλη, μεγαλύτερες δόσεις (10 και 20 mg/kg) προκαλούν αύξηση ως προς την ουδό έκλυσης συμπεριφοράς ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού γεγονός που υποδηλώνει μείωση ως προς τη διαδικασία συστήματος ανταμοιβής του εγκεφάλου. Η μεταβολή αυτή είναι προς την αντίθετη κατεύθυνση από εκείνη που επέρχεται μετά από τη χορήγηση ουσιών κατάχρησης (κοκαΐνη, οπιοειδή κτλ) τα οποία μειώνουν το κατώφλι/την ουδό της συμπεριφοράς έκλυσης του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού. Ακόμη, η CBD δεν εμφανίζει κάποια δράση στο πείραμα εξαρτημένης προτίμησης θέσης, συγκεκριμένα σε πειραματική μελέτη όπου επίμυες του γένους Long-Evans έλαβαν δόση 10 mg/kg, δεν παρατηρήθηκε ούτε εγκατάσταση προτίμησης θέσης ούτε αποστροφή προτίμησης θέσης.

Τέλος, αν και ο αριθμός των κλινικών μελετών είναι περιορισμένος, μια καλά ελεγχόμενη μελέτη σε ανθρώπους υποδεικνύει ότι η CBD δεν εμφανίζει προφίλ κατάχρησης. Ειδικότερα η εφάπαξ χορήγηση από το στόματος CBD (600 mg) σε εθελοντές δεν διέφερε από το εικονικό φάρμακο, ως προς την πρόκληση κατάχρησης. Επίσης πραγματοποιήθηκε τυχαιοποιημένη διπλά-τυφλή μελέτη και εκτιμήθηκε η επίδραση της από το στόματος προχορήγησης CBD (0, 200, 400, 800 mg) επί της δράσης της καπνιζόμενης κάνναβης (με ποσοστό THC: 0.01 % και 5.30 – 5.80 % αντίστοιχα). Ειδικότερα υγιείς καπνιστές κάνναβης (n=31) ολοκλήρωσαν 8 εξωτερικές συνεδρίες με CBD η οποία χορηγούνταν 90 λεπτά πριν από την λήψη της κάνναβης. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης έδειξαν ότι υπό συνθήκες εικονικού φαρμάκου CBD, η καπνιζόμενη κάνναβη με ποσοστό THC 5.30 – 5.80 % αυτό-χορηγήθηκε από τους περισσότερους συμμετέχοντες και ακόμη προκάλεσε σημαντική χρονοεξτρώμενη αύξηση στο καρδιακό ρυθμό σε σύγκριση με τη καπνιζόμενη κάνναβη με ποσοστό THC 0.01 %. Ένα άλλο αποτελέσματα ήταν ότι η CBD από μόνη της δεν εμφανίζει σημαντική ψυχοδραστική, καρδιαγγειακή ή άλλη δράση. Επίσης η αυτό-χορήγηση της CBD, δεν επηρεάζεται από τη δόση της σε σχέση με το εικονικό φάρμακο. Οπότε προτάθηκε ότι η CBD χορηγούμενη από το στόμα δεν μειώνει τις φυσιολογικές, ενισχυτικές ή θετικές δράσης της κάνναβης με ποσοστό THC 5.30 – 5.80 %. Εν κατακλείδι η ίδια ερευνητική ομάδα έκανε μια 2<sup>η</sup> ανάλυση των δεδομένων αυτών με στόχο να εξεταστεί το προφίλ κατάχρησης της CBD που χορηγείται από το στόμα σε σχέση τόσο με το εικονικό φάρμακο όσο και με την κάνναβη με ποσοστό THC 5.30 – 5.8- %. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής έδειξαν ότι η CBD μοιάζει με το εικονικό φάρμακο σε όλες τις μετρήσεις που ελήφθησαν, σε σύγκριση με την κάνναβη (THC: 5.30 – 5.80%). (Review Report, WHO, 2018).

#### **1.4.8 Φαρμακευτικά σκευάσματα με CBD**

Πρόσφατα εγκρίθηκε από τον FDA η χρήση του φαρμακευτικού σκευάσματος Epidiolex<sup>®</sup>, το οποίο είναι μια εμπορική ονομασία της CBD, για τη θεραπεία των επιληπτικών κρίσεων οι οποίες σχετίζονται με τα σύνδρομα Lennox-Gastaut, Dravet και το σύμπλεγμα της οζώδους σκλήρυνσης (tuberous sclerosis complex), σε ασθενείς ηλικίας 2 ετών και μεγαλύτερους. Ένα ακόμη φαρμακευτικό σκευάσμα είναι το Sativex<sup>®</sup>, το οποίο αποτελεί συνδυασμό της CBD και της THC, και χρησιμοποιείται ως συμπληρωματική θεραπεία για τη συμπτωματική ανακούφιση του νευροπαθητικού

πόνου στο αυτοάνοσο νόσημα της σκλήρυνσης κατά πλάκας στον Καναδά και σε αρκετές ευρωπαϊκές χώρες, συμπεριλαμβανομένου του Ηνωμένου Βασιλείου, της Γερμανίας και της Ισπανίας (Elsaid et al, 2019).

#### 1.4.9 CBD και Πόνος

Οι ερευνητικές μελέτες όσο αφορά την επίδραση της CBD στον πόνο, έχουν εστιάσει κυρίως στην δράση της σε πειραματικά μοντέλα νευροπαθητικού πόνου. Αναλυτικότερα οι Costa et al, (2007), παρατήρησαν ότι η χρόνια χορήγηση (άπαξ ημερησίως για 7 συνεχόμενες ημέρες) 20mg/kg CBD από του στόματος προκαλεί μείωση της υπεραλγησίας σε μοντέλο νευροπάθειας σε επίμυες. Μια άλλη έρευνα έδειξε παρόμοια αποτελέσματα σε μοντέλο νευροπαθητικού πόνου σε επίμυες οι οποίοι έλαβαν από του στόματος ,για 7 συνεχόμενες ημέρες, μια φορά τη μέρα εκχύλισμα κάνναβης πλούσιο σε CBD (64%) (Comelli et al, 2008). Και οι δύο αυτές οι μελέτες υποστηρίζουν ότι η αντι-υπεραλγησιακή δράση της CBD διαμεσολαβείται από τους βανιλοειδικούς υποδοχείς (TRPV). Επιπλέον οι De Gregorio et al, (2019) παρατήρησαν ότι η επαναλαμβανόμενη χορήγηση μικρής δόσης CBD (5mg/kg, υποδόρια) προκαλεί αναλγησία σε μοντέλο νευροπαθητικού πόνου επιμύων μέσω των υποδοχέων TRPV1 και του σεροτονεργικού συστήματος. Η αντι-αλλοδυνική δράση της οξέως ή υποχρονίως χορηγούμενης CBD μέσω του σεροτονεργικού συστήματος καταγράφηκε και από μια άλλη έρευνα σε μοντέλο διαβητικού νευροπαθητικού πόνου που έδειξε ότι η CBD ασκεί οξεία και παρατεταμένη αντι-αλλοδυνική δράση στις δόσεις 0.3 και 3 mg/kg (Jesus et al, 2019).

Επιπρόσθετα, μια ερευνητική μελέτη έδειξε ότι η συστηματική και ενδοραχιαία χορήγηση της CBD σε τρωκτικά, καταστέλλει σημαντικά τον χρόνιο φλεγμονώδη και νευροπαθητικό πόνο, χωρίς να συνοδεύεται από την εμφάνιση ανοχής (Xiong et al, 2012). Παρόμοια αποτελέσματα παρατήρησαν λίγα χρόνια αργότερα και οι Hammell et al, (2016), οι οποίοι έδειξαν ότι η διαδερμική χορήγηση της CBD εκτός του ότι μειώνει τη φλεγμονή, προκαλεί μείωση των συμπεριφορών που σχετίζονται με τον πόνο σε μοντέλο αρθρίτιδας σε επίμυες. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η CBD μπορεί να λειτουργήσει ως αναλγητικό σε επίπεδο περιφέρειας, καθώς βρέθηκε ότι τοπική χορήγησή της αναστέλλει τον πόνο και την περιφερειακή ευαισθησία σε μοντέλο οστεοαρθρίτιδας σε επίμυες (Philpott et al, 2017). Ακόμη μια μελέτη που επιβεβαιώνει τη περιφερική αναλγητική δράση της CBD είναι αυτή των Wong et al, (2019), όπου υποστηρίζεται η αναλγητική δράση CBD (5mg/mL), CBN (1mg/mL) και του συνδυασμού τους (CBD/CBN 1:1 και 5:1 mg/mL) σε θηλυκούς επίμυες. Ειδικότερα παρατήρησαν ότι ενδομυϊκές ενέσεις αυτών των 2 μη ψυχομημιτικών κανναβινοειδών καθώς και του συνδυασμού τους, ανέστειλαν την ευαισθητοποίηση, που προκλήθηκε από ενδομυϊκή ένεση NGF (25 μg/mL) στο αριστερό μασητικό μυ υπό αναισθησία, σε συμπεριφορικά και ηλεκτροφυσιολογικά πειράματα. Τέλος, μελέτες έχουν δείξει ότι η οξεία χορήγηση CBD φαίνεται να μην ασκεί κεντρική αναλγητική δράση (Sofia et al, 1975, Finn et al, 2004, Long et al, 2010), ενώ οι Long et al (2010) παρατήρησαν ότι ούτε η χρόνια χορήγηση CBD προκαλεί κεντρικού τύπου αναλγησία. Πιο συγκεκριμένα οι Sofia et al, (1975) παρατήρησαν ότι η CBD (20, 40, 80, 160, 320 mg/kg) δεν εμφάνισε αναλγητική δράση σε κανένα από τις τρεις πειραματικές δοκιμασίες πόνου που χρησιμοποίησαν (acetic-induced writhing, hot plate and Randall-Selitto paw pressure tests). Ομοίως οι Finn et al, (2004) μέσω της τεχνικής καταγραφής πόνου CPS-WST παρατήρησαν ότι η CBD (5 mg/kg), την οποία χορήγησαν τριάντα



λεπτά πριν την ένεση της φορμαλίνης (50 mL, 2.5%) στο δεξί πέλμα του επίμου, δεν εμφάνισε αναλγητική δράση. Από την άλλη οι Long et al, (2010) χορήγησαν την CBD (1, 5, 10 ή 50 mg/kg, i.p.) τόσο οξέως όσο και χρονίως (1 δόση για 21 συνεχείς μέρες) σε μύες. Μέσω της πειραματικής δοκιμασίας του τινάγματος ουράς σε θερμικό ερέθισμα (hot-water tail-flick test), παρατήρησαν ότι η CBD δεν έχει αναλγητική δράση ούτε όταν χορηγήθηκε οξέως ούτε χρονίως. Λόγω του μικρού πλήθους των ερευνών σε αυτό το θέμα, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες ώστε να αποσαφηνιστεί αν η CBD μπορεί να δράσει ως κεντρικό αναλγητικό ή όχι.

**Πίνακας 1.** Κανναβιδιόλη (CBD) και Πόνος – Πειραματικές μελέτες

Συγγραφείς	Πειραματικό πρότυπο	Δόση CBD	Μέθοδος χορήγησης	Αναλγητική δράση
<b>Sofia et al, 1975</b>	Acetic-induced writhing, Hot Plate, Randall-Selitto analgesimeter	20, 40, 80, 160, 320 mg/kg	p.o.	-
<b>Finn et al, 2004</b>	CPS-WST pain scoring technique	5 mg/kg	i.p.	-
<b>Costa et al, 2007</b>	Randall-Selitto analgesimeter	20 mg/kg (7Days)	p.o.	+
<b>Comeli et al, 2008</b>	Hargreaves & Dynamic Plantar Aesthesiometer	10 mg/kg (7Days)	p.o.	+
<b>Long et al, 2010</b>	Hot-water tail-flick test	1, 5, 10 or 50 mg/kg (acute & 21Days)	i.p.	-
<b>Xiong et al, 2012</b>	Von Frey & Hargreaves	100µg	i.t.	+
<b>Hammell et al, 2016</b>	Light beam & limb posture score	Gels 0.6, 3.1, 6.2 or 62.3 mg/day (4Days)	Transdermal	+
<b>Philpott et al, 2017</b>	Von Frey & Hind limb incapacitance	100, 200, or 300 mg in 100 mL	i.a.	+
<b>Wong &amp; Cairns, 2019</b>	Von Frey	5mg/kg	i.m.	+
<b>De Gregorio et al, 2019</b>	Von Frey	5 mg/kg (7Days)	s.c.	+
<b>Jesus et al, 2019</b>	Von Frey	0.3, 3 mg/kg (acute & 14Days)	i.p.	+

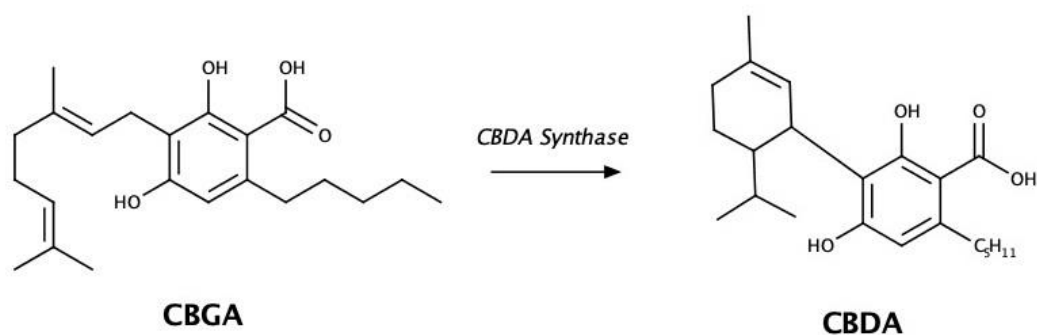
## 1.5 Κανναβιδιολικό οξύ (CBDA)

Το κανναβιδιολικό οξύ, μία ασταθής ένωση, είναι το πρόδρομο οξύ από το οποίο συντίθεται η CBD, μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του (Review Report, WHO, 2018). Το CBDA βρίσκεται σε αφθονία και σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο φυτό της κάνναβης από ότι η CBD. Ωστόσο δεν έχει μελετηθεί εκτενώς και ως επακόλουθο λίγα είναι γνωστά για την ουσία αυτή (Anderson et al, 2019). Σε αντίθεση με τη CBD, το CBDA άρχισε να μελετάται μεταγενέστερα και ελάχιστα είναι γνωστά τόσο για τον μηχανισμό δράσης και τις φαρμακολογικές ιδιότητές του όσο και για την πιθανή φαρμακευτική του χρήση. Λόγω του μικρού αριθμού πειραματικών μελετών που έχουν διεξαχθεί έως σήμερα, είναι εμφανής η ανάγκη για επιπλέον έρευνες για την καλύτερη κατανόηση του εύρους των ιδιοτήτων και των πιθανών θεραπευτικών εφαρμογών του, αλλά και τον μηχανισμό δράσης του.

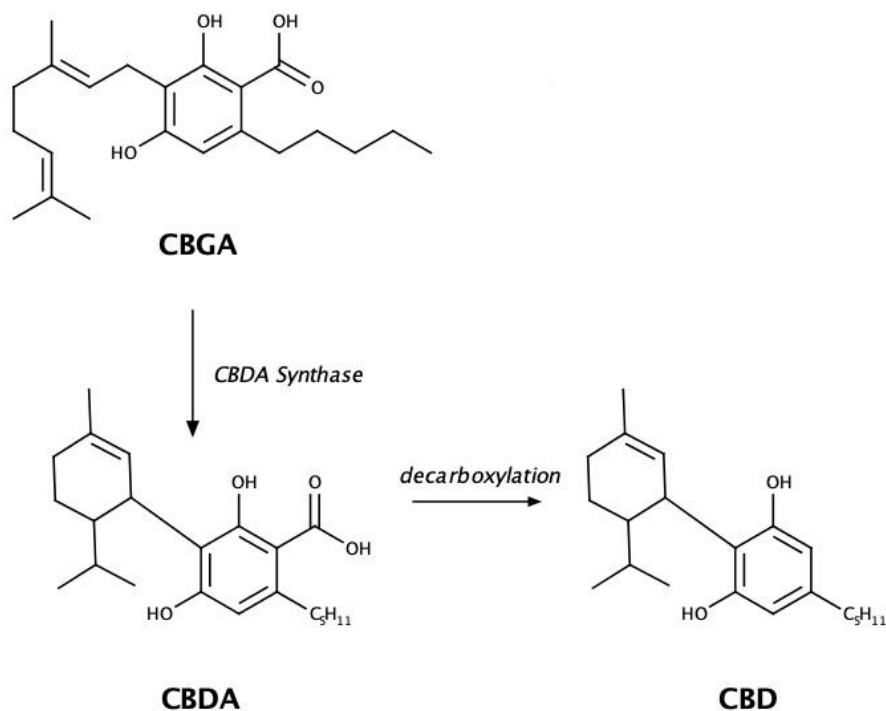
### 1.5.1 Χημεία και σύνθεση του κανναβιδιολικού οξέως

Από χημική άποψη, το CBDA είναι ένα διυδροξυβενζοϊκό οξύ, δηλαδή είναι ένα ολιετολικό οξύ στο οποίο το υδρογόνο στη θέση 3 αντικαθίσταται από μια ομάδα 3-*p*-μενθα-1,8-διεν-3-υλο (λιμονένιο) και ανήκει στις ρεσορσινόλες. Αποτελείται από 22, 30 και 4 άτομα άνθρακα, υδρογόνου και οξυγόνου αντίστοιχα και η χημική του ονομασία κατά IUPAC είναι 2,4-διυδροξυ-3 - [(1*R*, 6*R*) -3-μεθυλ-6-προπ-1-εν-2-υλοκυκλοεξ-2-εν-1-υλο] -6-πεντυλοβενζοϊκό οξύ (Taura et al, 2007).

Το CBDA συντίθεται ενζυματικά στο φυτό της κάνναβης από το πρόδρομο κανναβινοειδές, κανναβιγερολικό οξύ (CBGA), μέσω της συνθάσης του CBDA. Αναλυτικότερα η συνθάση του CBDA καταλύει την οξειδωτική κυκλοποίηση του μονοτερπενικού μέρους του CBGA ώστε να σχηματιστεί το CBDA (**Εικόνα 4**) Υπενθυμίζεται επίσης ότι η CBD παράγεται από το CBDA όπως φαίνεται στην **εικόνα 5**.(Review Report, WHO, 2018).



**Εικόνα 4.** Φυσική σύνθεση του CBDA από το CBGA μέσω της συνθάσης του CBDA (Analytical Cannabis.com)



Εικόνα 5. Πορεία σύνθεσης του CBD (Analytical Cannabis.com)

### 1.5.2 Φαρμακοδυναμική

Η μελέτη της φαρμακοδυναμικής του κανναβιδιολικού οξέως βρίσκεται υπό εξέλιξη. Ωστόσο οι υπάρχουσες ερευνητικές μελέτες υποδεικνύουν ότι, ομοίως με την κανναβιδιόλη, το CBDA αλληλεπιδρά με μία πληθώρα μοριακών στόχων. Αναλυτικότερα, φαίνεται να έχει αγωνιστική δράση επί των υποδοχέων 5-HT<sub>1A</sub>, (Bolognini et al, 2013, Brierley et al, 2016, Rock et al, 2017), γεγονός που του προσδίδει αγχολυτική ιδιότητα (Brierley et al, 2016, Rock et al, 2017). Επιπρόσθετα, εμφανίζει αγωνιστική δράση και επί των TRPV1 υποδοχέων, με αποτέλεσμα να εμφανίζει αντιφλεγμονώδη και αντι-υπεραλγητική δράση σε πειραματικό ζωικό μοντέλο οξείας φλεγμονής (Rock et al, 2018). Πέρα από την ενεργοποίηση των TRPV1 υποδοχέων, το CBDA ενεργοποιεί τους υποδοχείς παροδικού δυναμικού TRPA1, ενώ έχει ανταγωνιστική δράση επί των υποδοχέων TRPM8 (De Petrocellis et al, 2008, De Petrocellis et al 2011). Επίσης, το CBDA αποτελεί εκλεκτικό αναστολέα του μορίου της κυκλοοξυγενάσης-2, γεγονός που σχετίζεται με την εμφάνιση αντιφλεγμονώδους δράσης (Takeda et al, 2008, Takeda et al, 2014). Όπως και η CBD, έτσι και το CBDA φαίνεται να έχει πολύ μικρή συγγένεια για τους υποδοχείς των ενδοκανναβινοειδών CB1 και CB2 (Aizpurua-Olaizola et al, 2017). Τέλος, το CBDA φαίνεται να έχει τη δυνατότητα να αναστέλλει την εξαρτώμενη από το cAMP πρωτεϊνική κινάση A και να ενεργοποιεί τη RhoA, μια μικρή GTPάση, συνδυασμός ο οποίος αναστέλλει τη μετανάστευση των εξαιρετικά επιθετικών MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων του μαστού στον άνθρωπο (Takeda et al, 2012, Takeda et al, 2014).

### 1.5.3 Φαρμακοκινητική

Παρόλο που η φαρμακοκινητική της κανναβιδιόλης είναι καλά μελετημένη, λίγα είναι γνωστά για το κανναβιδιολικό οξύ. Μια πολύ πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι, όταν διαλύεται σε έκδοχο ελαίου και χορηγείται ενδοπεριτοναϊκώς, απορροφάται γρήγορα στο πλάσμα και εμφανίζει χρόνο ημιζωής ( $t_{1/2}$ ) 92 λεπτά. Ωστόσο στον εγκέφαλο απορροφάται πιο αργά και αποβάλλεται γρηγορότερα ( $t_{1/2}$  = 41 λεπτά). Γενικότερα, το CBDA διαλυμένο σε έκδοχο ελαίου εμφανίζει κακή διείσδυση στον εγκέφαλο. Η απορρόφηση του CBDA είναι πιο γρήγορη στο πλάσμα, όταν διαλύεται σε έκδοχο με Tween, ωστόσο μειώνεται τόσο η μέγιστη συγκέντρωσή του ( $C_{max}$ ,  $17.6 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$  έναντι  $29.6 \pm 2.2 \mu\text{g/mL}$ ), όσο και ο χρόνος ημιζωής (20 λεπτά έναντι 92 λεπτών) σε σχέση με έκδοχο ελαίου. Όσον αφορά τον εγκέφαλο, η πρόσληψη του CBDA διπλασιάζεται όταν είναι διαλυμένο σε έκδοχο με Tween, ενώ ο χρόνος ημιζωής αυξάνεται ( $t_{1/2}$  = 55 λεπτά) (Anderson et al, 2019). Καταλήγοντας, είναι εμφανές ότι η μελέτη των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων του CBDA χρήζουν περαιτέρω έρευνας.

### 1.5.4 Φαρμακολογικές ιδιότητες

Δεδομένου ότι το CBDA παρουσιάζει σύνθετο προφίλ ως προς το μηχανισμό δράσης, φαίνεται να εμφανίζει και μεγάλο εύρος ως προς τις πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές του. Ωστόσο είναι γεγονός ότι οι ακριβείς μηχανισμοί δράσεις του CBDA δεν είναι πλήρως γνωστοί, ούτε έχουν πλήρως διευκρινιστεί σε πειραματικό και κλινικό επίπεδο. Με βάση τα μέχρι τώρα δεδομένα, το CBDA φαίνεται να έχει αγχολυτική (Brierley et al, 2016, Rock et al, 2017), αναλγητική, αντιφλεγμονώδη (Rock et al, 2018) και αντικαταθλιπτική δράση (Shbiro et al, 2017). Ακόμη, εμφανίζει κατασταλτική δράση επί της ναυτίας και του εμέτου που προκαλείται από τη χημειοθεραπεία (Pertwee, 2014), και πιθανώς επί της μετανάστευσης καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων επιθετικών καρκίνων του μαστού (Takeda et al, 2012, Takeda et al, 2014).

### 1.5.5 Τοξικότητα και ανεπιθύμητες ενέργειες

Όσον αφορά την τοξικότητα και τις ανεπιθύμητες ενέργειες ελάχιστα είναι γνωστά και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Οι Brierley et al (2016) παρατήρησαν ότι το CBDA είναι μια πολύ καλά ανεκτή ουσία, η οποία στερείται του κατασταλτικού προφίλ των βενζοδιαζεπινών και δεν επηρεάζει τις φυσιολογικές συμπεριφορές ως προς τη λήψη τροφής σε ζωικό μοντέλο. Οι πληροφορίες από μελέτες σε ανθρώπους σχετικά με την τοξικότητα και τις ανεπιθύμητες ενέργειές του είναι ελάχιστες.

### 1.5.6 CBDA και Πόνος

Η μελέτη της επίδρασης του CBDA επί του πόνου βρίσκεται σε αρχικό στάδιο, ωστόσο λόγω της ιδιότητας της ουσίας αυτής να δρα ως αγωνιστής στους υποδοχείς TRPV1 (Rock et al, 2018), TRPA1 και ως ανταγωνιστής στους υποδοχείς TRPM8 (De Petrocellis et al, 2008, De Petrocellis et al, 2011), υποδοχείς που είναι γνωστό ότι σχετίζονται τον πόνο, δίνει ελπίδες για πιθανή αναλγητική δράση. Στην έρευνά τους οι Rock et al (2018) χορήγησαν ποικίλες δόσεις CBDA ενδοπεριτοναϊκώς (10, 1000  $\mu\text{g/kg}$ ) και από του στόματος (0.1, 1, 10, 100, 1000  $\mu\text{g/kg}$ ) σε αρσενικούς επίμυς, στους οποίους είχαν προκαλέσει οξεία φλεγμονή στο πέλμα του οπίσθιου ποδιού. Συμπέραναν ότι το CBDA εμφανίζει αντιφλεγμονώδη και αντι-υπεραλγησιακή δράση σε αυτό το μοντέλο ζώων οξείας φλεγμονής. Άξια αναφοράς είναι η μελέτη των Zhu et

al (2020), οι οποίοι χορήγησαν δόσεις του μεθυλεστέρα του κανναβιδιολικού οξέος (CBDA-ME), μία παρόμοια αλλά σταθερότερη ένωση από ότι το CBDA, σε μοντέλου νευροπαθητικού πόνου σε ζώα. Ειδικότερα, χρησιμοποίησαν και αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες, χορηγώντας τους εκτεταμένο δοσολογικό σχήμα CBDA-ME (0.001, 0.1 και 1 μg/kg και 2 επιπλέον δόσεις στα θηλυκά, 2 και 4 μg/kg), ενδοπεριτοναϊκά μία φορά τη μέρα για 14 συνεχόμενες μέρες. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι ο CBDA-ME παρουσίασε δοσοεξαρτώμενη μακροχρόνια αντι-υπεραλγητική δράση μόνο στους αρσενικούς επίμυες. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι η έναρξη της θεραπείας ενός τραύματος περιφερικού νεύρου με CBDA-ME σε πρώιμο στάδιο μετά τη χειρουργική επέμβαση πιθανόν να έχει αντι-υπεραλγητική επίδραση. Τέλος, είναι εμφανές ότι χρειάζεται περαιτέρω έρευνα, ώστε να προκύψουν ασφαλή συμπεράσματα όσον αφορά τη πιθανή αντι-υπεραλγησιακή δράση του CBDA επί του πόνου.

### **Σκοπός της μελέτης**

Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα ευρήματα και την όλο και περισσότερο αυξανόμενη ανάγκη για φαρμακευτική χρήση των φυτοκανναβινοειδών CBDA και CBD δεδομένου ότι δεν διαθέτουν εθιστικές ιδιότητες, ο στόχος της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η περαιτέρω διερεύνηση της πιθανής αναλγητικής δράσης της οξείας χορήγησης του CBDA, της οξείας χορήγησης CBD, της οξείας συγχορήγησης CBD και κωδεΐνης, και της χρόνιας χορήγησης CBD χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία της θερμαινόμενης πλάκας. Επιπλέον, αξιολογήθηκε η αναλγητική δράση της οξείας χορήγησης CBD επί του νευροπαθητικού πόνου χρησιμοποιώντας το πειραματικό μοντέλο του Von Frey τεστ. Σε αυτή την κατεύθυνση διερευνήθηκε η δράση του CBDA και της CBD στην κινητική δραστηριότητα κατά τη δοκιμασία του ανοικτού πεδίου (Open Field test, OFT). Η συγκεκριμένη πειραματική δοκιμασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό να καθοριστεί το σωστό δοσολογικό σχήμα των δυο ουσιών, ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε επίδραση της εκάστοτε ουσίας στην κινητική δραστηριότητα κατά τη διερεύνηση των αναλγητικών ιδιοτήτων τους χρησιμοποιώντας τις προαναφερόμενες πειραματικές διαδικασίες .

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Πειραματόζωα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί επίμυες του γένους Sprague-Dawley, που προήλθαν από τη μονάδα πειραματοζώων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Κατά την έναρξη των πειραμάτων οι επίμυες ήταν ηλικίας 90 ημερών, με σωματικό βάρος 250-300g. Διαβίωναν σε ομάδες των 2 ή 3 ζώων ανά κλωβό (42.5 x 26.6 x 15.5 cm), με ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή· η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ , υπό σταθερές συνθήκες κυκλικού φωτισμού, 12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι (07:00 h- 19:00h). Όλα τα πειράματα μελέτης της συμπεριφοράς εκτελέστηκαν κατά το φωτεινό στάδιο του ημερονύκτιου κύκλου. Χρησιμοποιήθηκαν μόνο αρσενικοί επίμυες ώστε να αποφευχθούν πιθανές παραλλαγές στη συμπεριφορά, που ενδέχεται να παρουσιαστούν στα διάφορα στάδια του οιστρικού κύκλου των θηλυκών επιμύων. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις ευρωπαϊκές οδηγίες για τη φροντίδα και τη χρήση των πειραματόζωων (2010/63/EU). Η μελέτη σχεδιάστηκε έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται η ταλαιπωρία και ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων πειραματόζωων.

### 2.2 Φάρμακα

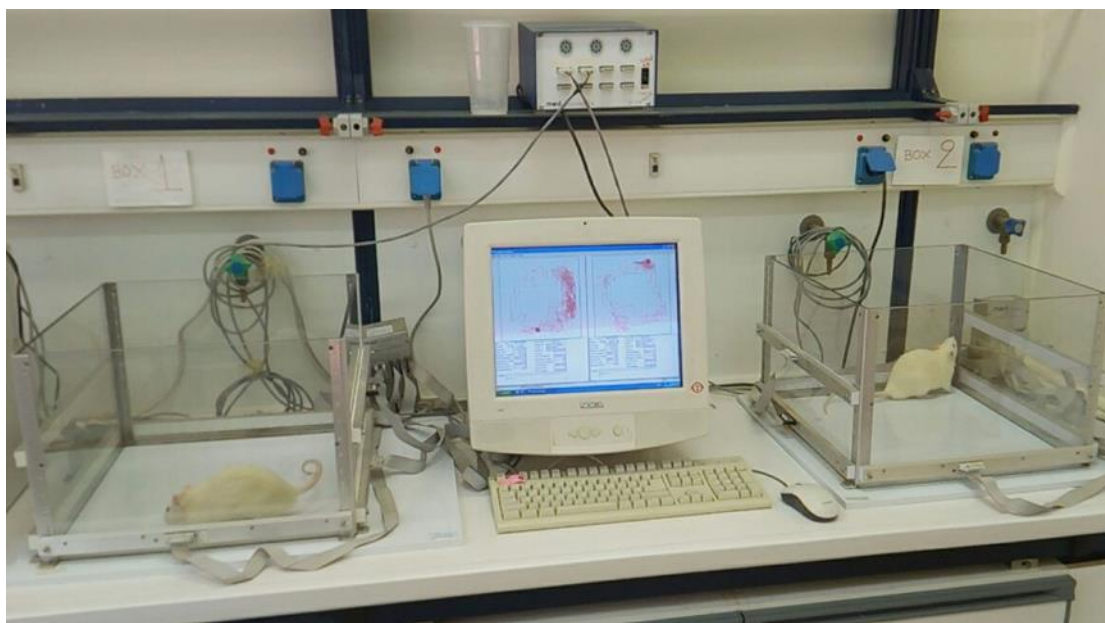
Το κανναβιδιολικό οξύ (CBDA) και η κανναβιδιόλη (CBD) προήλθαν από τη βιοτεχνολογική ανώνυμη εταιρία PHARMAGNOSE, η οποία είναι τεχνοβλαστός του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΤΦΠΑ/Pharmacognose) και διαλύθηκαν σε διάλυμα εκδόχου το οποίο αποτελούνταν από 5% διμέθυλσουλφοξείδιο (DMSO, SIGMA), 5 % Cremophor EL (SIGMA) και 90 % φυσιολογικό ορό (0.9 % NaCl, SAL). Όσον αφορά τη δοκιμασία του ανοικτού πεδίου, το CBDA χορηγήθηκε σε δόσεις 0.3, 1, 3, 10 mg/kg με βάση προκαταρκτικά πειράματα στο εργαστήριό μας και προηγούμενη βιβλιογραφία (Anderson et al, 2019). Η CBD χορηγήθηκε σε δόσεις 1, 3, 10, 30 mg/kg, με βάση προκαταρκτικά πειράματα στο εργαστήριό μας και προηγούμενη βιβλιογραφία (Peres et al, 2016, Hlozek et al, 2017). Οι δόσεις των δύο ενώσεων που στη δοκιμασία του ανοικτού πεδίου δεν εμφάνισαν κατασταλτική δράση, επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμασία της θερμαινόμενης πλάκας. Επιπλέον, έγινε χρόνια χορήγηση των δόσεων 1 και 3 mg/kg της CBD, μία φορά τη μέρα για επτά συνεχόμενες ημέρες. Η χορήγηση των φαρμάκων στις παραπάνω δόσεις έγινε μέσω ενδοπεριτοναϊκών ενέσεων σε όγκο 1 mL/kg.

### 2.3 Διαδικασία δημιουργίας Νευροπάθειας

Το χειρουργείο καθώς και όλη διαδικασία της δημιουργίας νευροπάθειας στους επίμυες εκτελέστηκε από την ερευνητική ομάδα του Επίκουρου καθηγητή Λαμπρακάκη Χαράλαμπου στο εργαστήριο Φυσιολογίας του τμήματος ΒΕΤ του πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Περιληπτικά, για τη δημιουργία πειραματικού προτύπου για την προσέγγιση νευροπαθητικού πόνου στους επίμυες, πραγματοποιήθηκε χειρουργική επέμβαση στο αριστερό πίσω άκρο κάθε επίμυ, ο οποίος ήταν υπό αναισθησία. Συγκεκριμένα αποκαλύφθηκε το ισχιακό νεύρο στο επίπεδο του μεσαίου μηρού

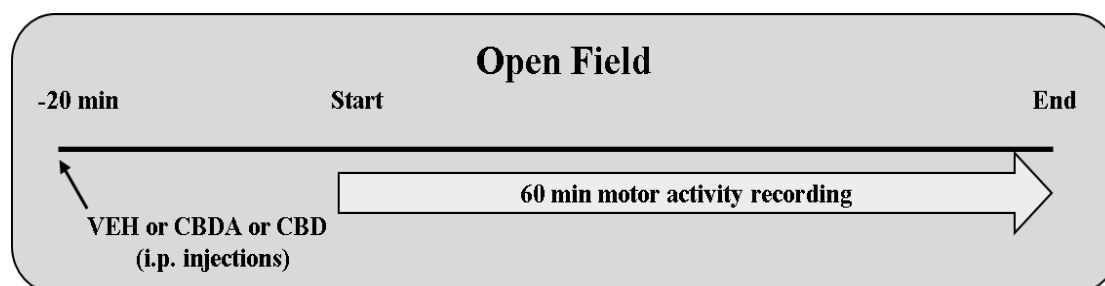
κατόπιν τομής και ύστερα τοποθετήθηκε ένας σωλήνας σφιχτά γύρω από το νεύρο αυτό, πριν το σημείο διακλάδωσής του (Charplan et al, 1994, Pitcher et al, 1999).

## 2.4 Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (Open Field Test, OFT)



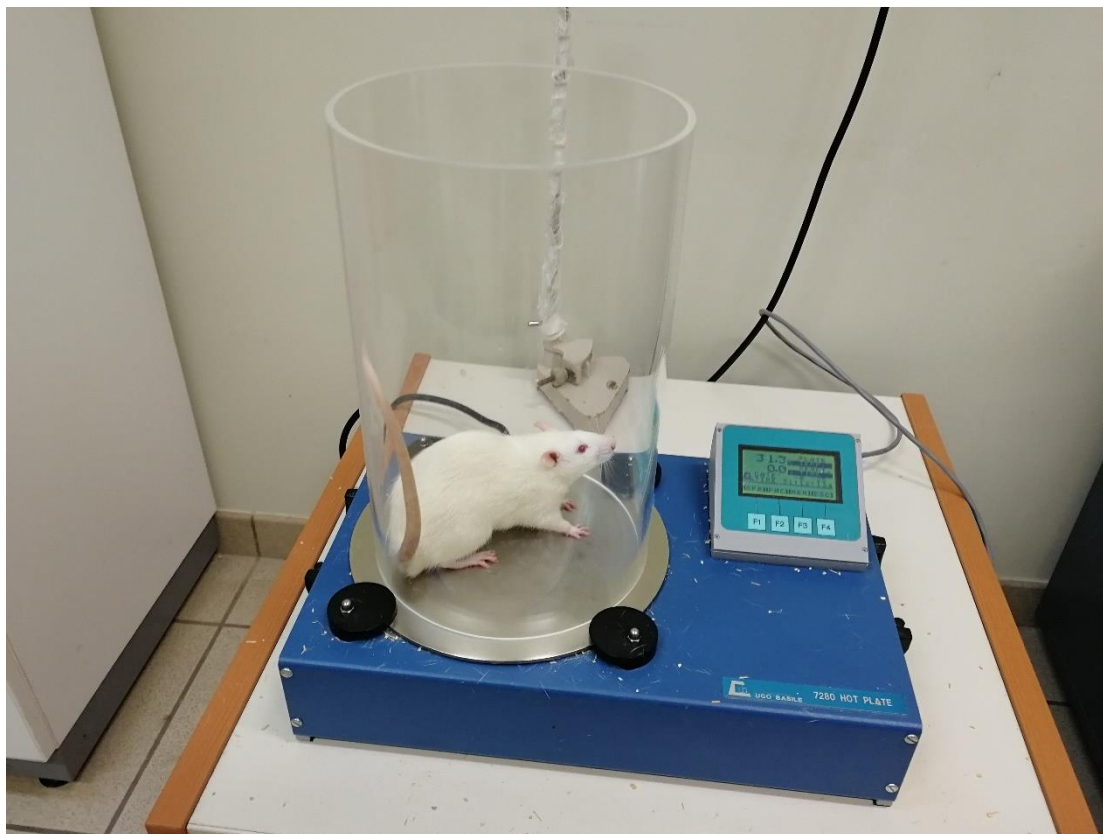
**Εικόνα 6.** Πειραματική διάταξη του πρότυπου ανοιχτού πεδίου (Open Field)

Η συμπεριφορική δοκιμασία εκτελέστηκε μεταξύ 08:00 και 16:00 h. Όλοι οι επίμυες εξοικειώθηκαν με το δωμάτιο πειραματισμού για 40 λεπτά πριν από την έναρξη του πειράματος. Η συμπεριφορά της κινητικότητας καταγράφηκε με πλήρως αυτοματοποιημένη, ηλεκτρονική παρακολούθηση της δραστηριότητας (ENV515, ActivityMonitor, version 5; Med Associates Inc., USA) σε έναν διαφανή κυβικό κλωβό, ακμής 40cm (**εικόνα 7**). Πιο συγκεκριμένα, καταγράφηκε η κάθετη (Vertical Counts, VC) και η οριζόντια (Ambulatory Distance, AD) κινητικότητα των επιμύων. Οι μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αυθόρμητης κινητικότητας των πειραματοζώων, η οποία αποτελεί και τον κύριο δείκτη πιθανής κατεσταλμένης δραστηριότητας, επειδή η έκθεση των πειραματοζώων σε ένα νέο περιβάλλον προκαλεί έντονη διάθεση εξερεύνησης (Pouliou et al, 2019, Delis et al, 2017, Polissidis et al, 2013). Στους επίμυες χορηγήθηκε άπαξ ενδοπεριτοναϊκώς: έκδοχο (VEH) ή CBDA (0.1, 1, 3, 10 mg/kg) ή CBD (1, 3, 10, 30 mg/kg) και τα πειραματόζωα επιστράφηκαν στους κλωβούς διαβίωσης. Οι επίμυες τοποθετήθηκαν στο κλωβό δραστηριότητας 20 λεπτά μετά την χορήγηση φαρμάκου ή εκδόχου και καταγράφηκε η κινητική τους δραστηριότητα για 1 ώρα. Οι ομάδες κάθε δοσολογικού σχήματος περιελάμβαναν 7 - 8 επίμυες.



**Εικόνα 7.** Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διεργασίας του ανοιχτού πεδίου

## 2.5 Δοκιμασία θερμικής ευαισθησίας (Μέθοδος Θερμαινόμενης Πλάκας - Hot Plate Test, HPT)

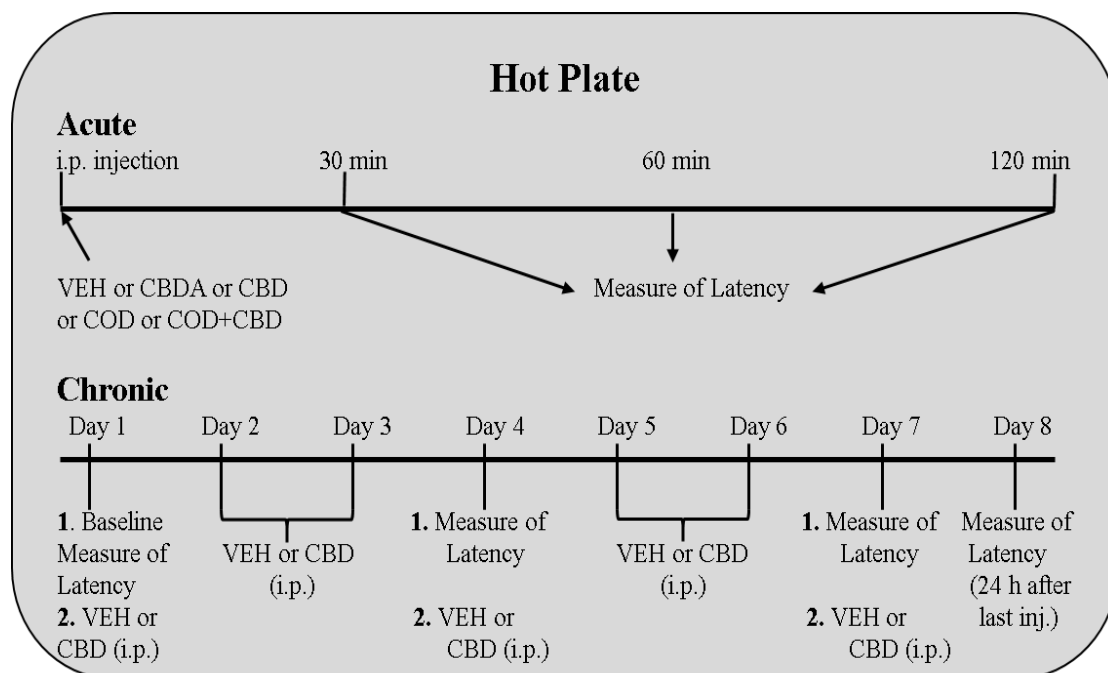


**Εικόνα 8.** Πειραματική διάταξη της δοκιμασίας της θερμαινόμενης πλάκας (Hot Plate)

Η μέθοδος της θερμαινόμενης πλάκας χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της ευαισθησίας των επιμύων σε θερμικό ερέθισμα. Γενικότερα η συμπεριφορική μέθοδος αυτή χρησιμεύει στον καθορισμό του κατωφλιού ευαισθησίας σε θερμικό ερέθισμα (Deulis et al., 2017). Οι επίμυες αφέθηκαν για μια 1 ώρα στο δωμάτιο πειραματισμού πριν από την έναρξη του συμπεριφορικού πειράματος, ώστε να εξοικειωθούν με τον χώρο. Η απόκριση στο θερμικό ερέθισμα παρακολούθηθηκε με τη χρήση της δοκιμασίας θερμαινόμενης πλάκας (UgoBasile 7280, Ugo Basile Biological Research Apparatus Comerio, Varese, Italy). Η συσκευή αποτελείται από ένα κυλινδρικό πλαίσιο από πλεξιγκλάς που τοποθετείται πάνω από μια ηλεκτρικά θερμαινόμενη κυκλική πλάκα ανοξείδωτου χάλυβα, η οποία διατηρεί σταθερή θερμοκρασία (εικόνα 9). Ειδικότερα, οι επίμυες τοποθετήθηκαν μέσα στο κυλινδρικό πλαίσιο πάνω στην θερμαινόμενη πλάκα, η θερμοκρασία της οποίας ρυθμίστηκε θερμοστατικά στους  $52 \pm 0.11$  °C. Η απόκριση στο θερμικό ερέθισμα εκτιμήθηκε καταγράφοντας το χρονικό διάστημα (Latency, s) από τη στιγμή που και τα 4 πόδια του πειραματόζωου ακουμπάνε στη θερμαινόμενη πλάκα μέχρι τη στιγμή που αυτό γλείφει την πατούσα του ή αναπηδά. Το χρονικό όριο παραμονής στη θερμαινόμενη πλάκα ήταν τα 40 s, πέραν του οποίου ο επίμυς απομακρυνόταν από τη συσκευή. Οι επίμυες έλαβαν άπαξ, ενδοπεριτοναϊκώς: VEH ή CBD (1, 3, 10 mg/kg) ή CBDA (0.3, 1, 3 mg/kg) και τοποθετήθηκαν στη θερμαινόμενη πλάκα τρεις φορές: 30 min, 1 h και 2 h μετά από την χορήγηση των φαρμάκων. Επιπρόσθετα, επίμυες έλαβαν μία φορά τη μέρα για επτά συνεχείς μέρες ενδοπεριτοναϊκώς: VEH ή CBD (1, 3 mg/kg) και τοποθετήθηκαν στη θερμαινόμενη πλάκα 3 φορές: την τέταρτη και την έβδομη μέρα πριν την ημερήσια



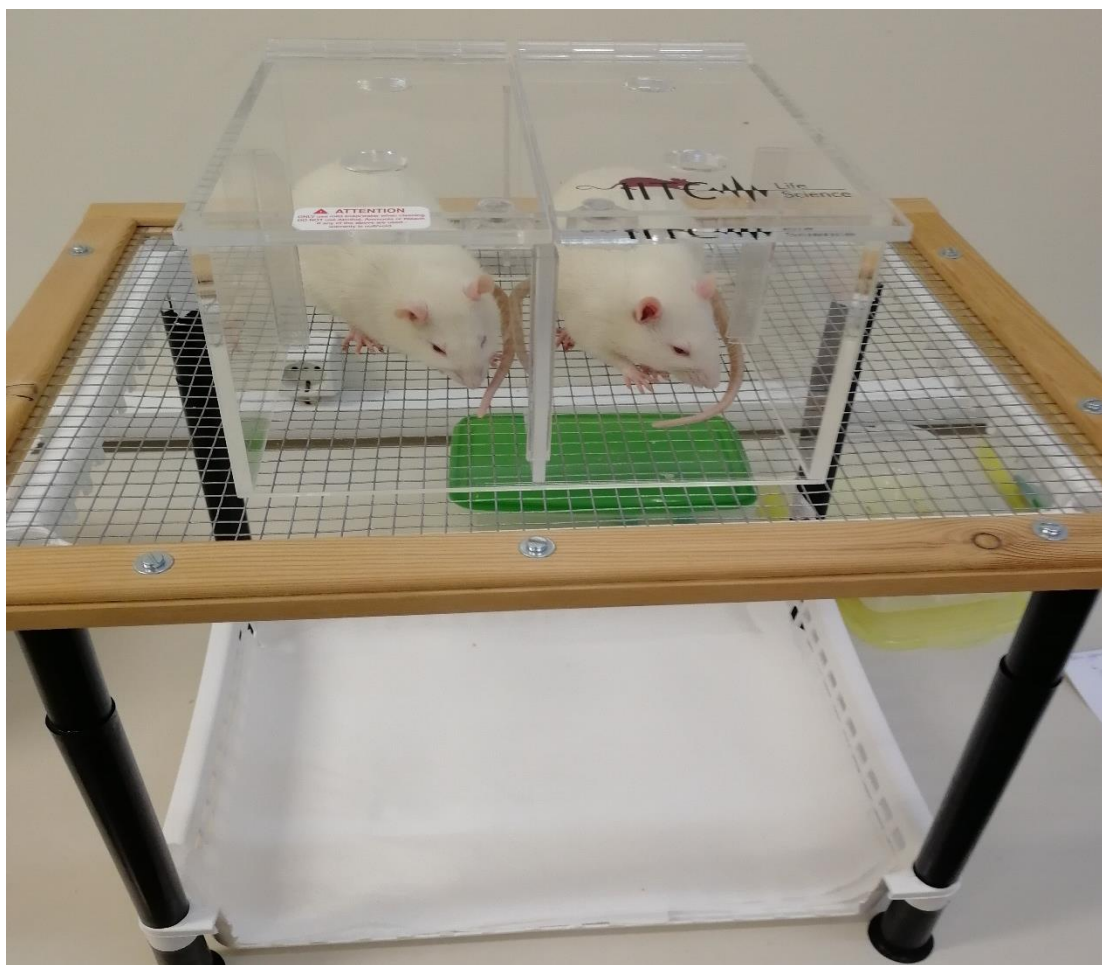
χορήγηση της CBD καθώς και 24 ώρες μετά την τελευταία χορήγηση. Ακόμη, οι επίμυες αυτοί είχαν τοποθετηθεί στη θερμαινόμενη πλάκα και πριν την έναρξη των χρόνιων χορηγήσεων (τιμές αναφοράς). Για κάθε δοσολογικό σχήμα χρησιμοποιήθηκαν ομάδες των 9 - 12 επιμύων.



Εικόνα 19. Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διεργασίας της θερμαινόμενης πλάκας

## 2.6 Δοκιμασία μηχανικής ευαισθησίας στο πέλμα των πίσω άκρων (von Frey)

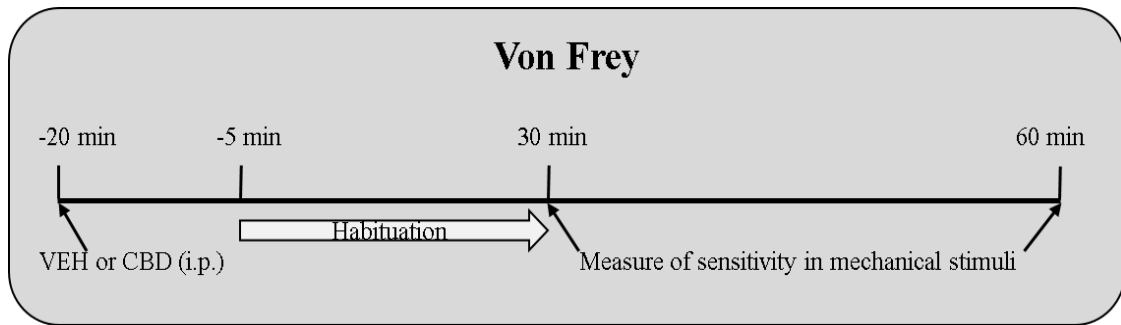
Η δοκιμασία von Frey χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της μηχανικής ευαισθησίας. Η συγκεκριμένη συμπεριφορική μέθοδος χρησιμεύει πειραματικά για την εκτίμηση της μηχανικής αλλοδυνίας σε μύες και επίμυες (Chaplan et al, 1994, Pitcher et al, 1999, Bannon & Malmberg, 2007). Η συσκευή του von Frey αποτελείται από ένα ορθογώνιο πλαίσιο από πλεξιγκλάς χωρισμένο σε δύο διαμερίσματα που τοποθετείται πάνω σε ένα υπερυψωμένο μεταλλικό πλέγμα (εικόνα 11). Πριν από την έναρξη της πειραματικής δοκιμασίας, οι επίμυες τοποθετούνταν για 15 λεπτά στη πειραματική διάταξη von Frey για να εξοικειωθούν. Η εξοικείωση ήταν απαραίτητη, ώστε κατά την έναρξη της δοκιμασίας να αποκλειστεί η έντονη κινητικότητα των επιμύων, λόγω ανάγκης εξερεύνησης του χώρου. Κατά τη δοκιμασία αυτή έγινε εφαρμογή σειράς λεπτών ακίδων von Frey κάθετα στο πέλμα του πίσω ποδιού του επίμυος, μέχρι να λυγίσει η κάθε ακίδα, με επακόλουθο την εφαρμογή σταθερής και προκαθορισμένης δύναμης μεταξύ 1.4 και 32 gr (5.9 - 98 mN). Πιο συγκεκριμένα το μηχανικό ερέθισμα μέσω της ακίδας εφαρμοζόταν για τουλάχιστον 4 δευτερόλεπτα και τερματιζόταν είτε όταν το ζώο ανασήκωνε απότομα το πόδι του είτε όταν περνούσε το χρονικό διάστημα αυτό. Οι συμπεριφορές οι οποίες υποδείκνυαν πόνο και λαμβάνονταν ως θετικές απαντήσεις ήταν το «τίναγμα» του πίσω άκρου που κάποιες φορές συνοδευόταν και από γλείψιμο του (Chaplan et al, 1994, Pitcher et al, 1999, Bannon & Malmberg, 2007).



**Εικόνα 10.** Πειραματική διάταξη της δοκιμασίας von Frey

Εάν ο επίμυς δεν εκδήλωνε κάποια συμπεριφορά πόνου, τότε, ύστερα από δύο λεπτά, γινόταν χρήση ακίδας μεγαλύτερης δύναμης. Από την άλλη, όταν εκδήλωνε κάποια συμπεριφορά πόνου, γινόταν χρήση ακίδας μικρότερης δύναμης. Αυτή η αλληλουχία συνεχιζόταν μέχρι τη λήψη τεσσάρων απαντήσεων (θετικών ή αρνητικών) μετά τη πρώτη αλλαγή απάντησης είτε αυτή ήταν θετική είτε αρνητική. Ακόμη κύρια προϋπόθεση για την εφαρμογή της εκάστοτε ακίδας ήταν να ακουμπάνε και τα τέσσερα πόδια του επίμου στη επιφάνεια του μεταλλικού πλέγματος (Chaplan et al, 1994, Pitcher et al, 1999, Bannon & Malmberg, 2007). Τα αποτελέσματα ερμηνεύτηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο «up-down», η οποία ορίζει την τιμή της μηχανικής δύναμης που απαιτείται ώστε να προκαλέσει απόκριση απόσυρσης του ποδιού στο 50% των δοκιμασιών («50% Threshold») σε g (Dixon, 1980). Η τιμή υπολογίζεται με βάση τον τύπο:  $\text{Threshold-50\%} = 10(xf + kd)$ , όπου  $xf$ : ο λογάριθμος της δύναμης της τελευταίας ακίδας von Frey που χρησιμοποιήθηκε,  $k$ : σταθερά που προκύπτει από τον πίνακα Dixon και  $d$ : η μέση διαφορά των λογαρίθμων της δύναμης των ακίδων. Τέλος η δοκιμασία ξεκινούσε από ακίδα στο μέσο της σειράς δυνάμεων (5.7 gr).

Οι επίμυες έλαβαν άπαξ, ενδοπεριτοναϊκώς: VEH ή CBD (1, mg/kg) και εκτιμήθηκε η ευαισθησία τους στο μηχανικό ερέθισμα μισή και μία ώρα μετά από την χορήγηση των φαρμάκων. Για κάθε δοσολογικό σχήμα χρησιμοποιήθηκαν ομάδες των 8 επιμύων. Η παραπάνω πειραματική δοκιμασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας του τμήματος ΒΕΤ υπό την επίβλεψη του Επικουρού Καθηγητή Φυσιολογίας, κ. Χ. Λαμπρακάκη.



**Εικόνα 11.** Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διεργασίας von Frey

## 2.7 Στατιστική ανάλυση

Η κάθετη (VC) και οριζόντια (AD) κινητική δραστηριότητα των πειραματοζώων κατά το πρώτο ημίωρο της δοκιμασίας OFT, καθώς και η συνολική δραστηριότητα σε όλη τη διάρκεια της καταγραφής (1h), μετά από χορήγηση CBDA ή CBD, αναλύθηκε με τη μέθοδο ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA), με παράγοντα μεταβλητότητας μεταξύ των δειγμάτων τη χορήγηση του φαρμάκου. Για τα αποτελέσματα της δοκιμασίας θερμαινόμενης πλάκας, μετά από χορήγηση CBDA ή CBD πραγματοποιήθηκαν στα δεδομένα μη παραμετρικές δοκιμές (Kruskall – Wallis). Όπου κρίθηκε σκόπιμο, δοκιμές Mann-Whitney χρησιμοποιήθηκαν για συγκεκριμένες συγκρίσεις ομάδων. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο  $p < 0.05$ . Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SPSSv.21.

## 3. Αποτελέσματα

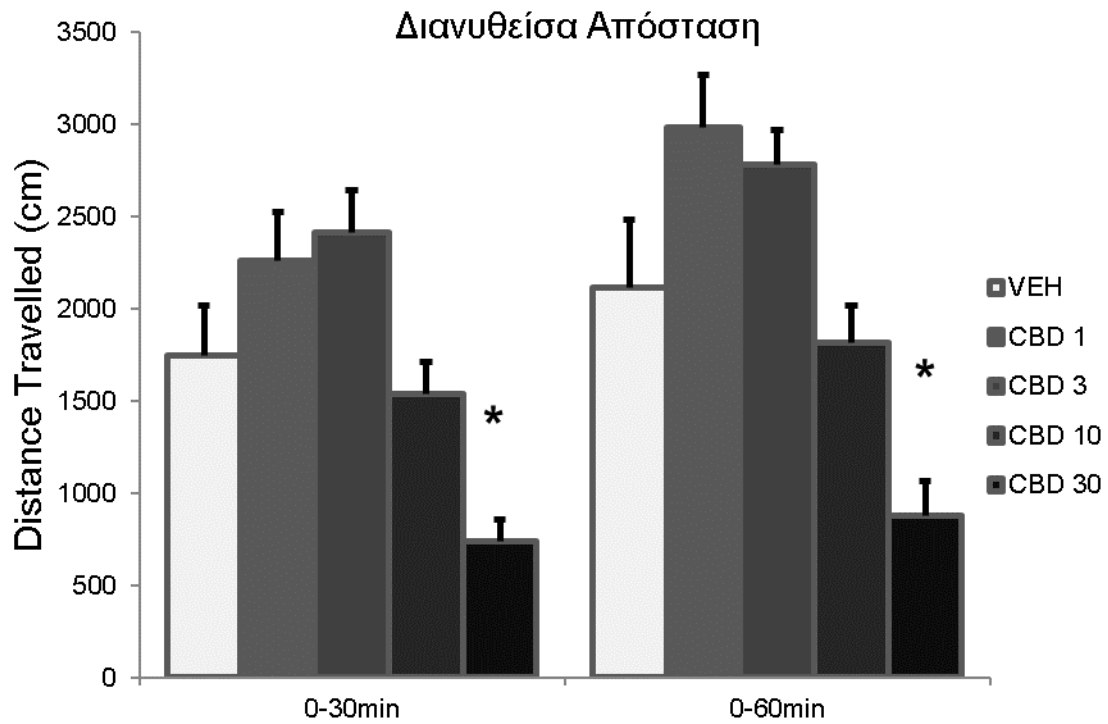
### 3.1 Δοκιμασία Ανοικτού Πεδίου (Open Field)

#### 3.1.1 Η επίδραση της οξείας χορήγησης της CBD στη κινητικότητα Ανοικτού πεδίου

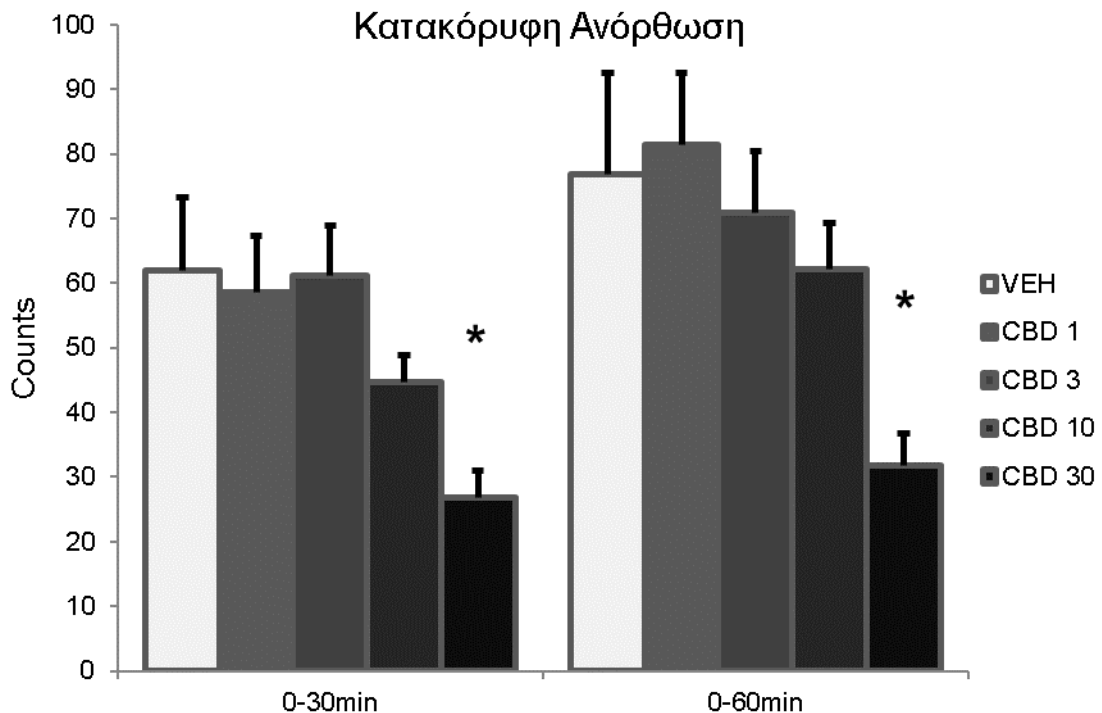
Η ανάλυση μεταβλητότητας έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της χορήγησης φαρμάκου στην διανυθείσα απόσταση κατά τη δοκιμασία του ανοικτού πεδίου για το χρονικό διάστημα των πρώτων 30 λεπτών, καθώς και για ολόκληρο το χρονικό διάστημα των 60 λεπτών της καταγραφής της κινητικότητας [ $F_{0-30}(4, 33) = 10.202$ ,  $p < 0.001$ ,  $F_{0-60}(4, 33) = 10.677$ ,  $p < 0.001$ ]. Ειδικότερα οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων (Bonferroni post-hoc tests) έδειξαν ότι η CBD, σε δόση 30 mg/kg, προκαλεί μείωση στη διανυθείσα απόσταση των επιμύων, σε σχέση με το έκδοχο, μισή και μία ώρα μετά τη χορήγησή της [ $F_{0-30}(4, 33) = 10.202$ ,  $p = 0.023$ ,  $F_{0-60}(4, 33) = 10.677$ ,  $p = 0.021$ ] (Γράφημα 1).

Ομοίως, για τη κατακόρυφη ανόρθωση κατά τη δοκιμασία ανοικτού πεδίου, η ανάλυση μεταβλητότητας έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της χορήγησης CBD στη συχνότητα κατακόρυφης ανόρθωσης και στα δυο χρονικά διαστήματα καταγραφής [ $F_{0-30}(4, 32) = 4.452$ ,  $p = 0.006$ ,  $F_{0-60}(4, 32) = 4.122$ ,  $p = 0.008$ ]. Πιο συγκεκριμένα, οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων έδειξαν ότι η δόση 30 mg/kg, μισή και μία ώρα μετά τη χορήγησή της, προκαλεί μείωση στη κατακόρυφη ανόρθωση των επιμύων σε σχέση με το έκδοχο [ $F_{0-30}(4, 32) = 4.452$ ,  $p = 0.019$ ,  $F_{0-60}(4, 32) = 4.122$ ,  $p = 0.030$ ] (Γράφημα 2).

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, για τη διερεύνηση της αναλγητικής δράσης της CBD χρησιμοποιήθηκαν οι δόσεις 1, 3, και 10 mg/kg, καθώς καμία από αυτές δεν είχε κατασταλτική δάση, σε αντίθεση με τη δόση 30mg/kg, η οποία απορρίφθηκε.



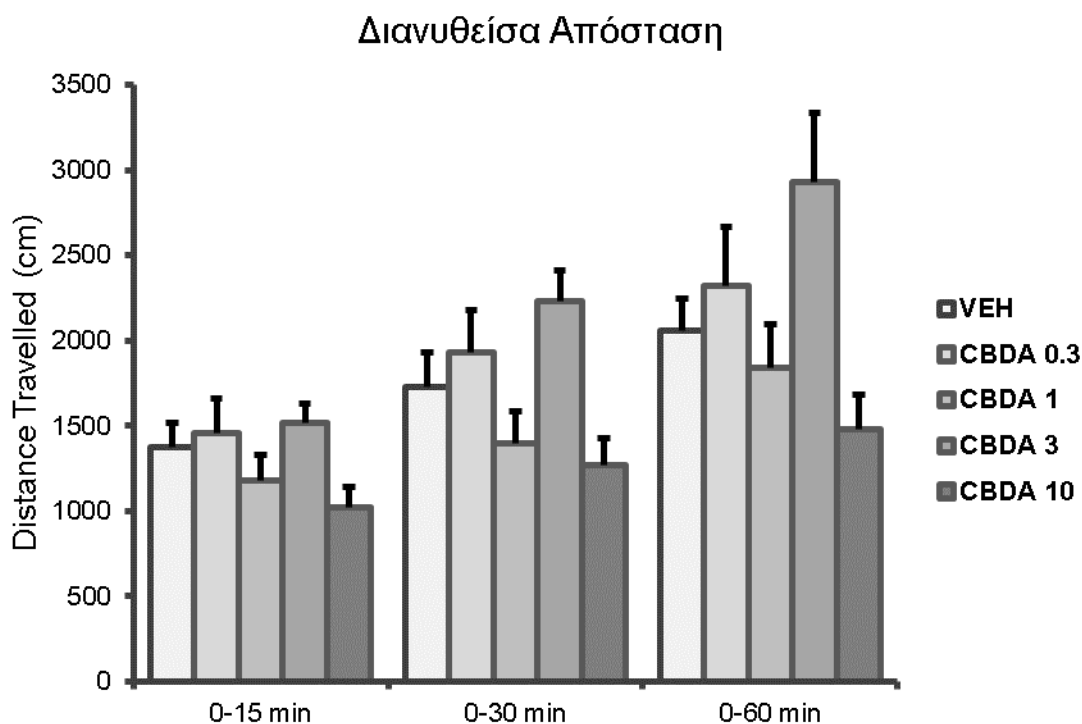
**Γράφημα 1.** Επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιόλης (CBD) στην διανυθείσα απόσταση κατά τη δοκιμασία ανοικτού πεδίου. Τα ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή+SEM της διανυθείσας απόστασης (cm): VEH: έκδοχο· οι δόσεις 1, 3, 10, 30 αντιστοιχούν σε mg/kg. \*  $P < 0.05$  σύγκριση με έκδοχο.



**Γράφημα 2.** Επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιόλης (CBD) στην συχνότητα κατακόρυφης ανόρθωσης του ανοικτού πεδίου. Τα ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή+SEM της συχνότητας κατακόρυφης ανόρθωσης (VC, counts): VEH: έκδοχο· οι δόσεις 1, 3, 10, 30 αντιστοιχούν σε mg/kg. \*  $P < 0.05$  σύγκριση με έκδοχο.

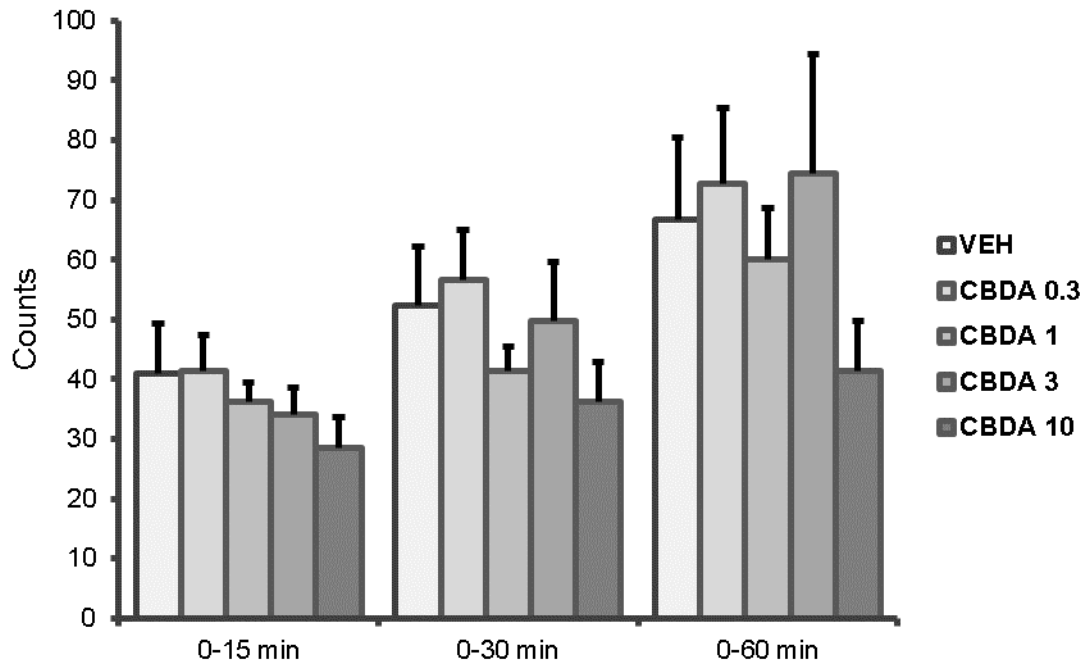
### 3.1.2 Η επίδραση της οξείας χορήγησης του CBDA στη κινητικότητα Ανοικτού Πεδίου

Η ανάλυση μεταβλητότητας έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της χορήγησης φαρμάκου στη διανυθείσα απόσταση κατά τη δοκιμασία του ανοικτού πεδίου για το χρονικό διάστημα των πρώτων 30 λεπτών, καθώς και για ολόκληρο το χρονικό διάστημα των 60 λεπτών της καταγραφής της κινητικότητας [ $F_{0-30}(4, 32) = 3.511, p = 0.017, F_{0-60}(4, 32) = 3.531, p = 0.017$ ]. Στη συνέχεια, οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων (Bonferroni post hoc tests) δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική επίδραση της χορήγησης CBDA συγκριτικά με το έκδοχο ως προς τη διανυθείσα απόσταση (Γράφημα 3). Όσον αφορά τη κατακόρυφη ανόρθωση, η ανάλυση μεταβλητότητας δεν έδειξε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση. (Γράφημα 4). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, για τη διερεύνηση της αναλγητικής δράσης του CBDA χρησιμοποιήθηκαν όλες οι δόσεις (0.3, 1, 3, 10 mg/kg) στη δοκιμασία θερμαινόμενης πλάκας, καθώς καμία από αυτές δεν είχε κατασταλτική δάση.



**Γράφημα 3.** Επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιολικού οξέως (CBDA) στην διανυθείσα απόσταση κατά τη δοκιμασία ανοικτού πεδίου. Τα ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή+SEM της διανυθείσας απόστασης (cm). VEH: έκδοχο· οι δόσεις 0.3, 1, 3, 10 αντιστοιχούν σε mg/kg.

## Κατακόρυφη Ανόρθωση

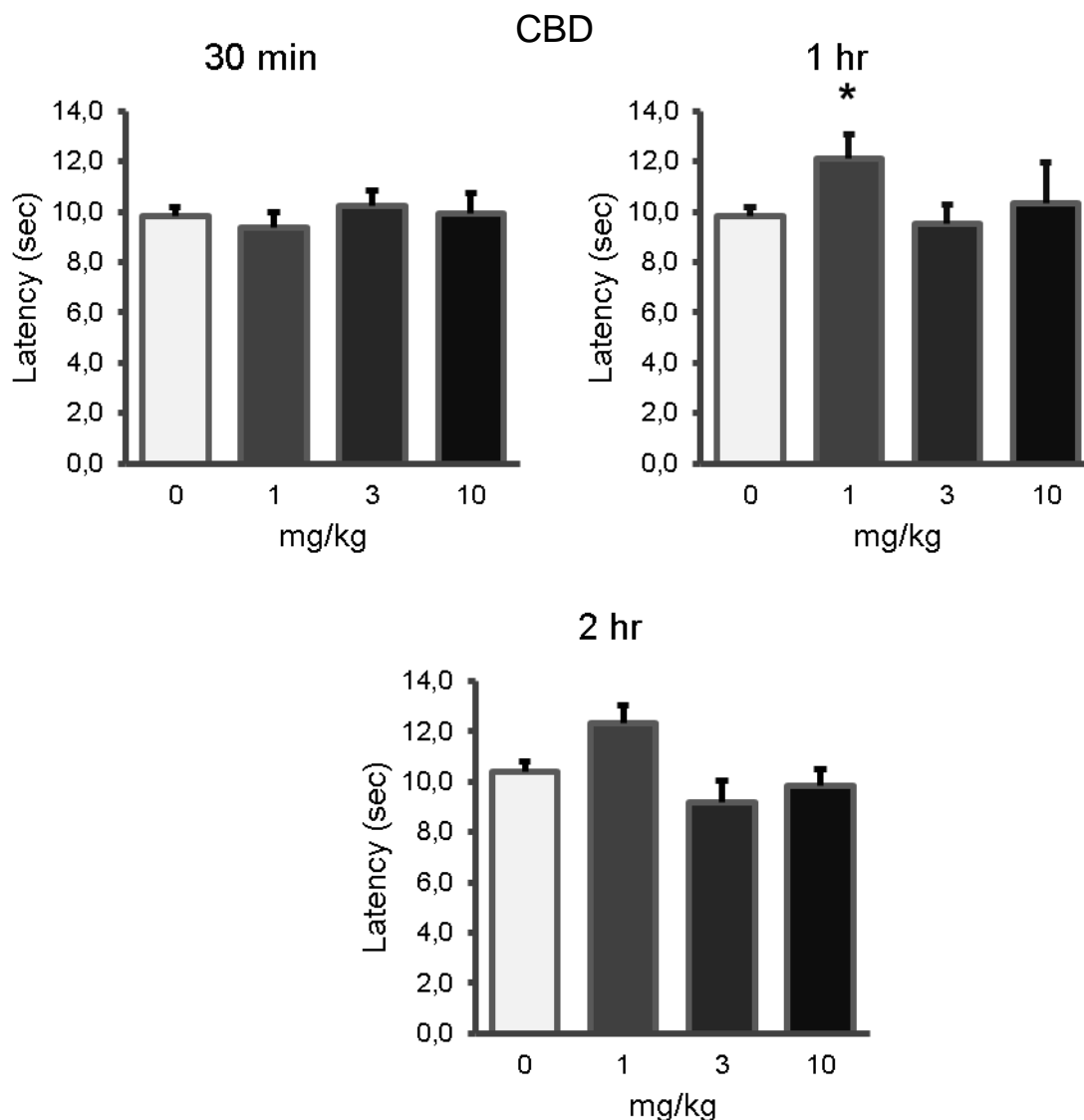


Γράφημα 4. Επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιολικού οξέως (CBDA) στην συχνότητα κατακόρυφης ανόρθωσης κατά τη δοκιμασία ανοικτού πεδίου. Τα ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή+SEM της συχνότητας κατακόρυφης ανόρθωσης (counts). VEH: εκδόχο· οι δόσεις 0.3, 1, 3, 10 αντιστοιχούν σε mg/kg.

### 3.2 Δοκιμασία Θερμαινόμενης Πλάκας (Hot Plate)

#### 3.2.1 Η επίδραση της οξείας χορήγησης CBD στη δοκιμασία Θερμαινόμενης Πλάκας

Ανάλυση μεταβλητότητας κατά Kruskal-Wallis με παράγοντα τη χορήγηση φαρμάκου δεν έδειξε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ως προς την αναλγητική δράση της CBD. Ας σημειωθεί ότι, οι συγκρίσεις με τη δοκιμασία Mann-Whitney ανέδειξαν τη στατιστικά σημαντική αναλγητική δράση της CBD μία ώρα μετά από τη χορήγηση της χαμηλότερης δόσης [ $z = -2.081$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0.039$ ], σε σύγκριση με τη χορήγηση εκδόχου, ενώ επίσης παρατηρήθηκε και μία τάση για αναλγητική δράση δύο ώρες μετά τη χορήγηση (Γράφημα 5).

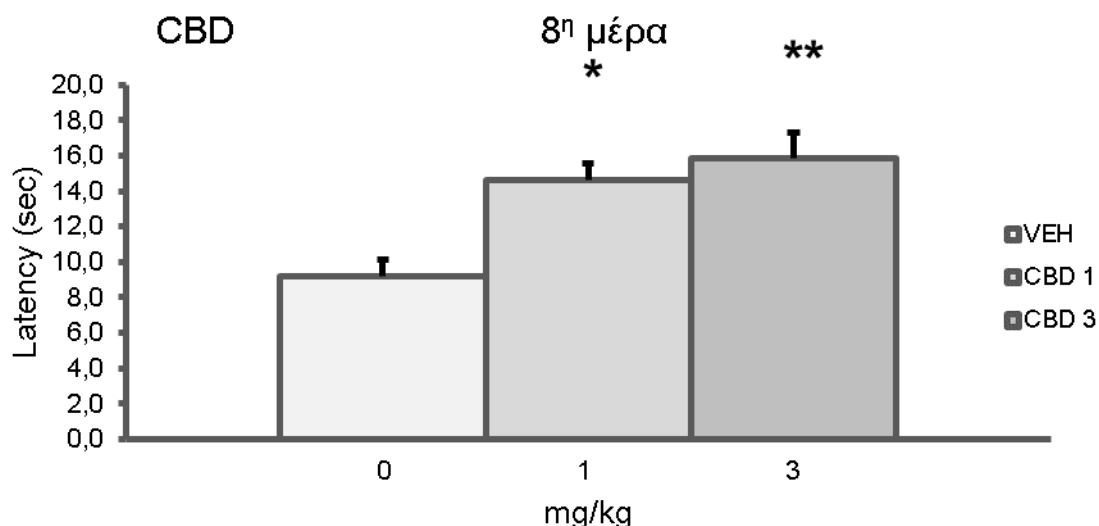


**Γράφημα 5.** Επίδραση της οξείας χορήγησης της κανναβιδιόλης (CBD) στο χρονικό διάστημα απόκρισης του πειραματόζωου στη δοκιμασία Θερμαινόμενης Πλάκας. Τα ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή+SEM του χρονικού διαστήματος απόκρισης (Latency) (γλείψιμο της πατούσας ή αναπήδηση). Έκδοχο (0 mg/kg)· CBD (1, 3, 10 mg/kg, i.p.). \*  $P < 0.05$  σύγκριση με έκδοχο.

### 3.2.2 Η επίδραση της χρόνιας χορήγησης CBD στη δοκιμασία της Θερμαινόμενης Πλάκας

Η ανάλυση Kruskal-Wallis, με παράγοντα τη χρόνια χορήγηση φαρμάκου έδειξε στατιστικά σημαντική αναλγητική δράση της CBD, την 8<sup>η</sup> μέρα (24 ώρες μετά την τελευταία ένεση), [ $\chi^2 = 9.968$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.007$ ]. Περαιτέρω συγκρίσεις με τη μέθοδο Mann-Whitney έδειξαν στατιστικά σημαντική αναλγητική δράση και των 2 δόσεων CBD (1, 3 mg/kg), συγκριτικά με το έκδοχο, κατά την 8<sup>η</sup> ημέρα [ $z = -2.402$ ,  $z = -2.680$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.016$ ,  $p = 0.007$ , 1, 3 mg/kg αντίστοιχα] (Γράφημα 6).

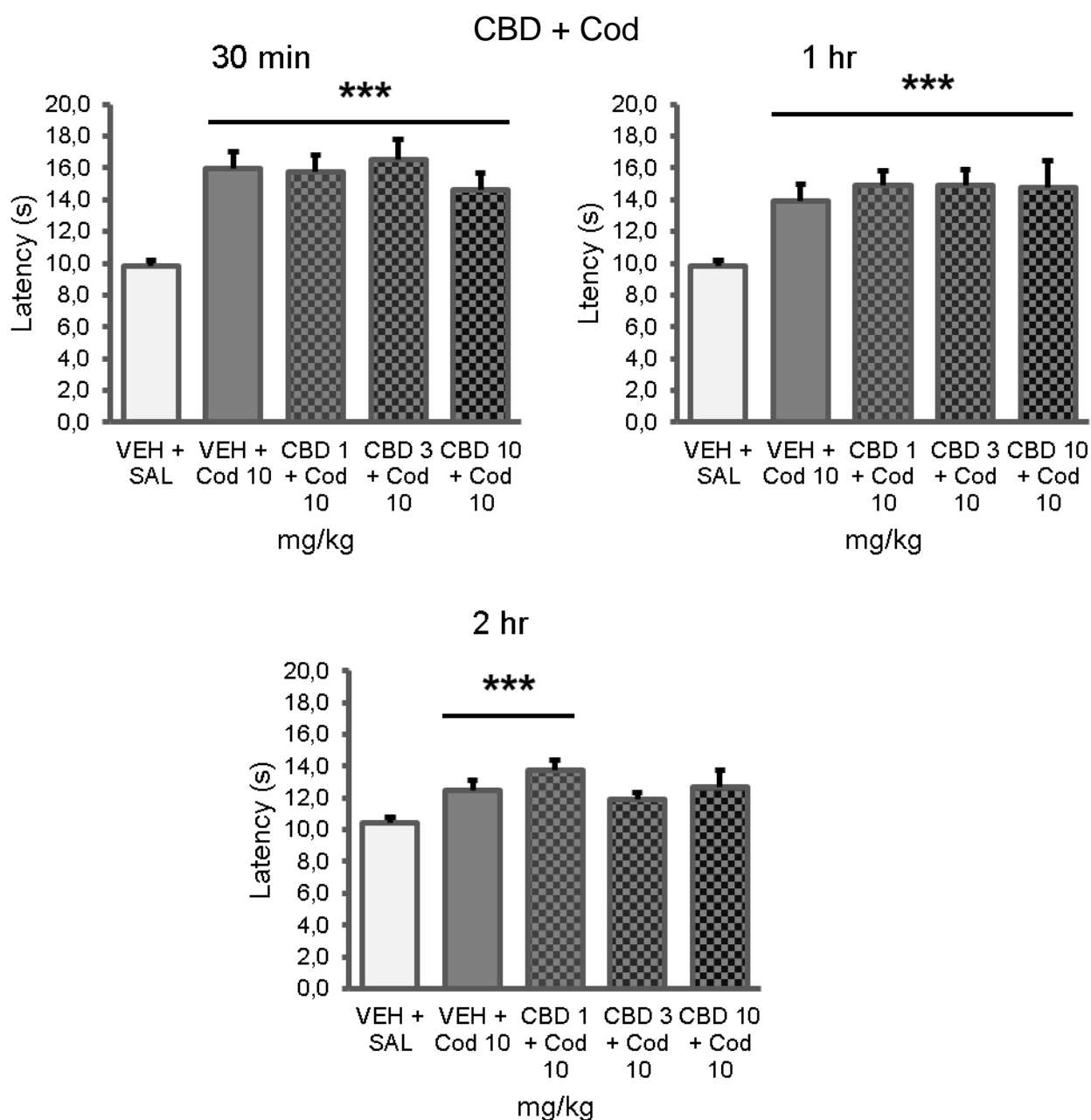




**Γράφημα 6.** Επίδρασης της χρόνιας χορήγησης CBD στο χρονικό διάστημα απόκρισης του πειραματόζωου στη δοκιμασία Θερμαινόμενης Πλάκας. Τα ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή+SEM του χρονικού διαστήματος απόκρισης (Latency) (γλείψιμο της πατούσας ή αναπήδηση). Έκδοχο (0 mg/kg)· CBD (1, 3 mg/kg, i.p.). \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 σύγκριση με έκδοχο.

### 3.2.3 Η επίδραση της οξείας συγχορήγησης κανναβιδιόλης (CBD) και κωδεΐνης (Cod) στη δοκιμασία Θερμαινόμενης Πλάκας

Η ανάλυση Kruskal-Wallis, με παράγοντα τη χορήγηση φαρμάκου έδειξε ότι η CBD δεν ενισχύει την αναλγητική δράση της κωδεΐνης κατά τη δοκιμασία της θερμαινόμενης πλάκας. Επιπλέον, η ανάλυση έδειξε ότι τόσο η συγχορήγηση CBD και Cod, όσο και η χορήγηση Cod είχαν στατιστικώς σημαντική αναλγητική επίδραση, συγκριτικά με το έκδοχο και στα τρία χρονικά σημεία των μετρήσεων (30 min, 1h, 2h) [ $\chi^2 = 17.627, 18.452, 12.161, df = 3, p = 0.01, p < 0.01, p = 0.07, \chi^2 = 34.019, 28.483, 12.594, df = 1, p < 0.01, p < 0.01, p < 0.01, αντίστοιχα$ ]. Συγκρίσεις με δοκιμασία Mann-Whitney έδειξαν στατιστικά σημαντική αναλγητική δράση σε όλες τις ομάδες χορηγήσεων μισή [ $z_{(Cod)} = -4.231, df = 1, p < 0.001, z_{(CBD1/COD)} = -4.105, z_{(CBD3/COD)} = -4.309, z_{(CBD10/COD)} = -3/251, df = 3, p < 0.001, p < 0.001, p = 0.001$ ] και μία ώρα [ $z_{(COD)} = -3.102, df = 1, p = 0.001, z_{(CBD1/COD)} = -4.058, z_{(CBD3/COD)} = -4.037, z_{(CBD10/COD)} = -3.125, df = 3, p < 0.001, p < 0.001, p < 0.001$ ] μετά τη χορήγηση, συγκριτικά με το έκδοχο. Επιπρόσθετα δύο ώρες μετά τη χορήγηση Cod, αλλά και μετά τη συγχορήγηση CBD (1 mg/kg) και Cod εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική αναλγητική δράση σε σύγκριση με το έκδοχο. [ $z_{(COD)} = -2.046, df = 1, p = 0.041, z_{(CBD1/COD)} = -3.619, df = 3, p < 0.001, p < 0.001$ ] (Γράφημα 7).

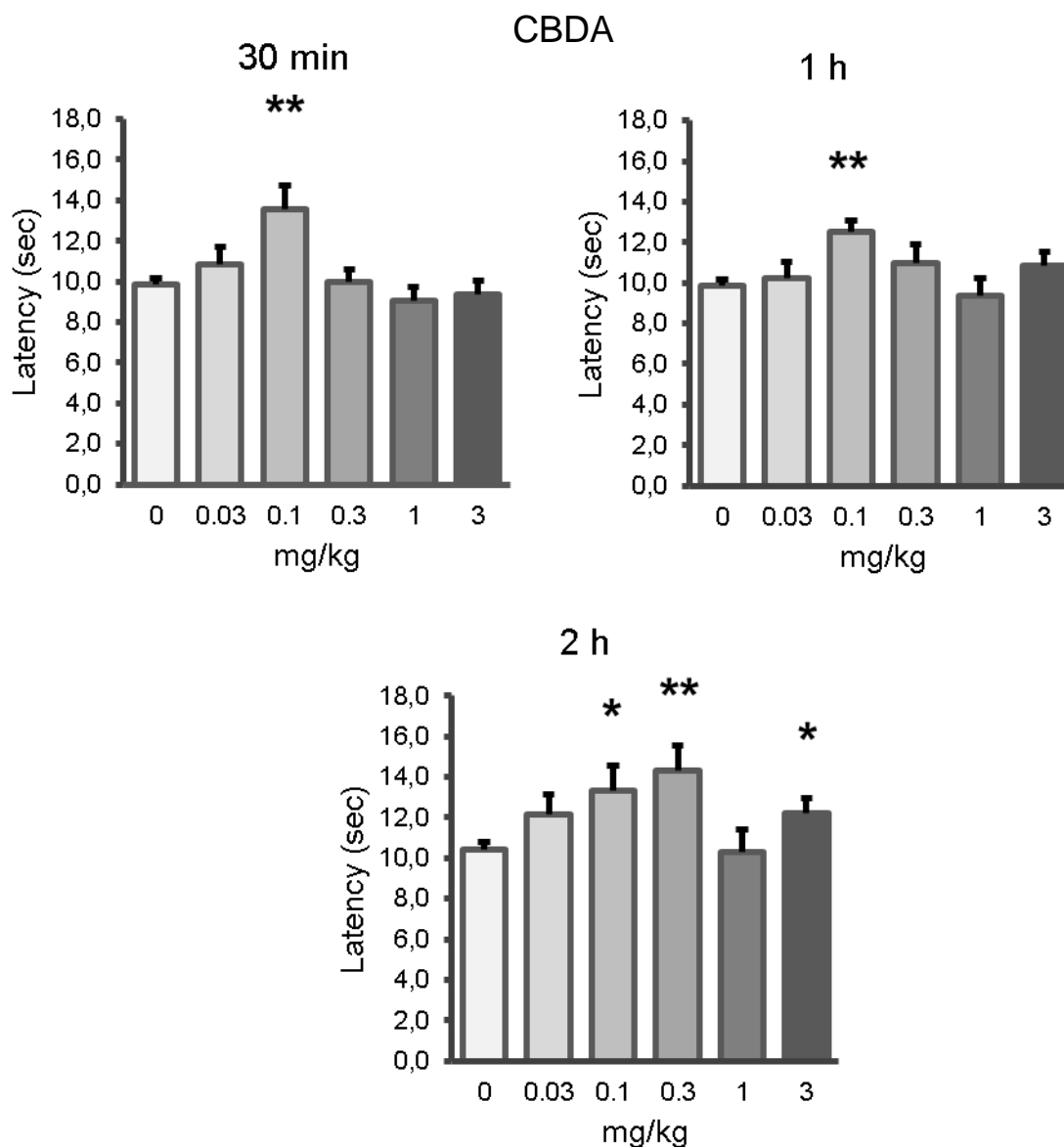


**Γράφημα 7.** Επίδρασης της οξείας συγχορήγησης κανναβιδιόλης (CBD) και κωδεΐνης (Cod) στο χρονικό διάστημα απόκρισης του πειραματόζωου στη δοκιμασία Θερμαινόμενης Πλάκας. Τα ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή+SEM του χρονικού διαστήματος απόκρισης (γλείψιμο της πατούσας ή αναπήδηση). VEH+SAL έκδοχο· CBD (1, 3, 10 mg/kg, i.p.) και Cod (10 mg/kg, i.p.). \*\*\*  $P \leq 0.001$  σύγκριση με έκδοχο.

### 3.2.4 Η επίδραση της οξείας χορήγησης CBDA στη δοκιμασία Θερμαινόμενης Πλάκας

Η ανάλυση Kruskal-Wallis με παράγοντα τη χορήγηση του φαρμάκου έδειξε στατιστικά σημαντική αναλγητική δράση, 30 λεπτά και 2 ώρες μετά τη χορήγηση του φαρμάκου [ $\chi^2 = 11.820, 14.856, df = 5, p = 0.037, p = 0.011$ , αντίστοιχα]. Εν συνεχεία, συγκρίσεις με δοκιμασία Mann-Whitney έδειξαν ότι σε κάθε χρονική στιγμή που μελετήθηκε, το CBDA είχε στατιστικά σημαντική αναλγητική δράση συγκριτικά με το έκδοχο, στη δόση 0.1 mg/kg [ $z_{30} = -2.875, z_{60} = -2.803, z_{120} = -2.513, df = 5, p_{30} =$

0.004,  $p_{60} = 0.005$ ,  $p_{120} = 0.012$ ]. Επίσης το CBDA είχε στατιστικά σημαντική αναλγητική δράση 2 ώρες μετά τη χορήγησή του, στις δόσεις 0.3 και 3 mg/kg [  $z = -2.697$ ,  $-1.981$ ,  $df = 5$ ,  $p = 0.007$ ,  $p < 0.05$  αντίστοιχα]. Επιπλέον, στη δόση των 0.03 mg/kg παρουσίασε μια τάση για αναλγητική δράση 2 ώρες μετά τη χορήγησή του (Γράφημα 8).

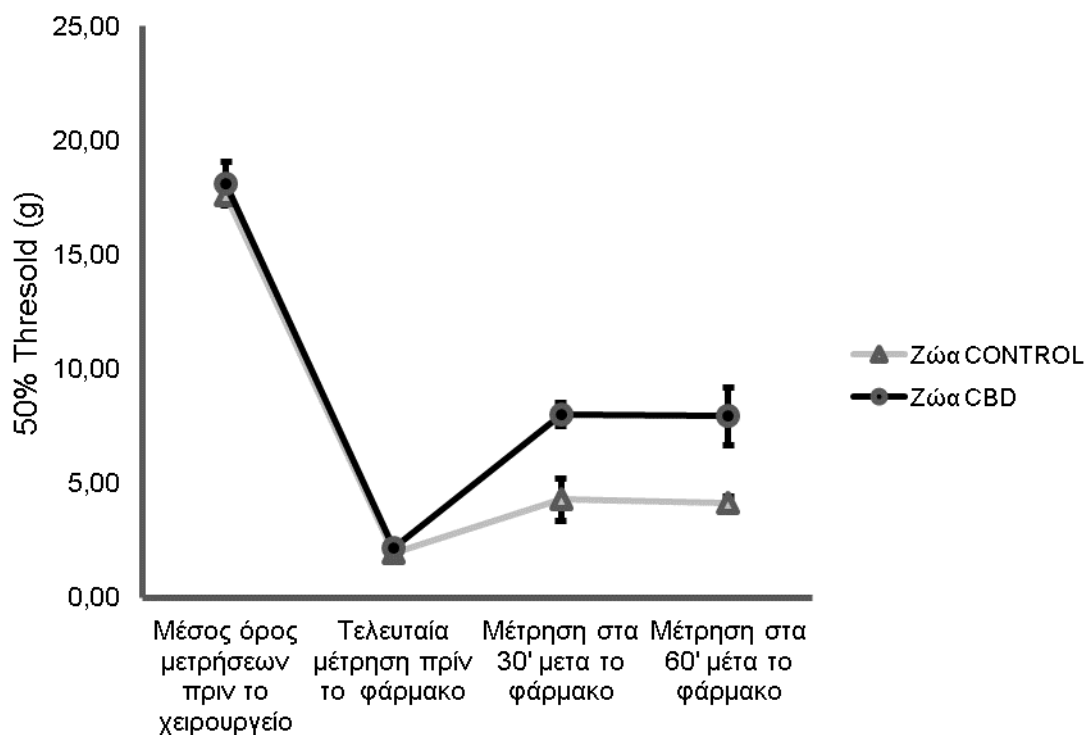


**Γράφημα 8.** Επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιολοκού οξέος (CBDA) στο χρονικό διάστημα απόκρισης του πειραματόζωου στη δοκιμασία Θερμαινόμενης Πλάκας. Τα ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή+SEM του χρονικού διαστήματος απόκρισης (γλείψιμο της πατούσας ή αναπήδηση). Έκδοχο (0 mg/kg)· CBDA (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 mg/kg, i.p.). \*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  σύγκριση με έκδοχο.

### 3.3 Δοκιμασία von Frey

#### 3.3.4 Η επίδραση της οξείας χορήγησης CBD επί του νευροπαθητικού πόνου στη δοκιμασία von Frey

Η ανάλυση Kruskal-Wallis, με παράγοντα τη χορήγηση φαρμάκου, έδειξε ότι η οξεία χορήγηση της CBD, σε δόση 1mg/kg, δεν ασκεί στατιστικώς σημαντική αναλγητική δράση επί του νευροπαθητικού πόνου σε επίμυες, στη δοκιμασία von Frey. Συγκρίσεις με τη δοκιμασία Mann-Whitney δεν έδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική αναλγητική δράση της CBD παρά τη διαφαινόμενη τάση τόσο μισή, όσο και μία ώρα μετά τη χορήγησή της (Γράφημα 9).



**Γράφημα 9.** Επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιόλης (CBD) στην απόκριση του πειραματόζωου σε μηχανικό ερέθισμα κατά τη δοκιμασία von Frey, σε μοντέλο νευροπαθητικού πόνου. Κάθε σημείο των γραμμών αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή+SEM της μεταβολής του «50% Threshold» (g) στο νευροπαθητικό πόδι για τα πειραματόζωα.. VEH έκδοχο· η δόση 1 αντιστοιχεί σε mg/kg.

## 4. Συζήτηση

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας αφορούσε τη διερεύνηση της πιθανής αναλγητικής δράσης τόσο της κανναβιδιόλης (CBD), μετά από οξεία ή χρόνια χορήγησή της, όσο και του προδρόμου οξέος της, του κανναβιδιολικού οξέος (CBDA), μετά από οξεία χορήγησή του. Επιπλέον αξιολογήθηκε η πιθανή αναλγητική δράση της CBD μετά από συγχορήγηση με κωδεΐνη (Cod). Οι μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκαν με τη δοκιμασία της θερμαινόμενης πλάκας. Επίσης, μελετήθηκε η πιθανή αναλγητική δράση της CBD επί του νευροπαθητικού πόνου. Με σκοπό τον καθορισμό του σωστού δοσολογικού σχήματος των δύο αυτών ουσιών, διερευνήθηκε η δράση τους στην κινητική δραστηριότητα κατά τη δοκιμασία του ανοικτού πεδίου. Η χορήγηση της υψηλότερης δόσης της CBD (30mg/kg) προκάλεσε μείωση τόσο της διανυθείσας απόστασης όσο και της συχνότητας κατακόρυφης ανόρθωσης, σε σύγκριση με τη χορήγηση του εκδόχου καθ' όλη τη διάρκεια της καταγραφής. Οι υπόλοιπες δόσεις της CBD (1, 3, 10 mg/kg), καθώς και όλες οι δόσεις του CBDA (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg) δεν εμφάνισαν καμία δράση στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου σε σύγκριση με τη χορήγηση του εκδόχου. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, η υψηλή δόση της CBD (30 mg/kg) δε χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της δοκιμασίας της θερμαινόμενης πλάκας.

Όσον αφορά τη δοκιμασία της θερμαινόμενης πλάκας η οξεία χορήγηση της CBD (1 mg/kg) προκάλεσε την εμφάνιση αναλγητικού αποτελέσματος, με το πέρας μιας ώρας από τη χορήγησή της. Επίσης παρατηρήθηκε αναλγητική δράση μετά από την χρόνια χορήγηση της κανναβιδιόλης και στις δύο δόσεις, 24 ώρες μετά τη τελευταία χορήγησή τους. Αντιθέτως η οξεία συγχορήγηση CBD και Cod έδειξε ότι η CBD δεν επηρεάζει την αναλγητική δράση της κωδεΐνης. Παρομοίως στο μοντέλο του νευροπαθητικού πόνου επίμυος δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αναλγητική δράση ύστερα από οξεία χορήγηση CBD, παρά μόνο μία τάση εμφάνισης αναλγητικού αποτελέσματος. Τέλος, όσον αφορά το CBDA, καταγράφηκε αναλγητική δράση και στις τρεις χρονικές στιγμές μέτρησης ύστερα από την οξεία χορήγησή του σε δόση 0.1 mg/kg. Επιπλέον οι δόσεις 0.3 και 3 mg/kg εμφάνισαν όμοιο αποτέλεσμα με αυτό της δόσης 0.1 mg/kg, αλλά μόνο 2 ώρες μετά τη χορήγησή τους.

### 4.1 Επίδραση της χορήγησης κανναβιδιόλης στην δοκιμασία ανοικτού πεδίου

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μελέτη της πιθανής αναλγητικής δράσης της κανναβιδιόλης στη δοκιμασία θερμαινόμενης πλάκας, ήταν αναγκαίο να καθοριστεί το σωστό δοσολογικό σχήμα χορήγησής της. Στόχος ήταν η αποφυγή ανασταλτικής δράσης επί της κινητικότητας του επίμυ, ώστε το αποτέλεσμα επί της αναλγησίας να είναι «καθαρό». Σε αυτό το πλαίσιο πραγματοποιήθηκε μελέτη της δράσης της χορήγησης διαφόρων δόσεων της κανναβιδιόλης στη δοκιμασία του ανοικτού πεδίου. Οι δόσεις (1, 3, 10, 30 mg/kg) στις οποίες χορηγήθηκε η CBD επιλέχθηκαν με βάση προκαταρκτικά πειράματα στο εργαστήριό μας και κατόπιν μελέτης της σχετικής βιβλιογραφίας (Peres et al, 2016, Hložek et al, 2017). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υψηλότερη δόση (30 mg/kg) προκάλεσε μείωση της αυθόρμητης κινητικότητας των επιμύων, όπως απεικονίζεται από τη μείωση της διανυθείσας απόστασης και της κάθετης ανόρθωσής τους. Η κινητικότητα των επιμύων δεν επηρεάστηκε από τις υπόλοιπες δόσεις CBD

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με μελέτες σε μύες, οι οποίες αναφέρουν ότι η CBD δεν ασκεί κάποια δράση σε χαμηλές δόσεις (Brakatselos et al, 2020, Hartmann et al, 2019, Long et al, 2010), ενώ σε υψηλές δόσεις προκαλεί υποκινητικότητα (Brakatselos et al, 2020, Socala et al, 2019). Σε αντίθεση, μια μελέτη των Moreira και Guimaraes (2005) δεν έδειξε υποκινητικότητα κατά τη χορήγηση υψηλής δόση CBD σε μύες. Παίρνοντας υπόψιν τις προαναφερθείσες μελέτες και τα έως τώρα ευρήματά μας, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι η χορήγηση χαμηλών δόσεων CBD δεν επηρεάζει την αυθόρμητη κινητική συμπεριφορά, ενώ η χορήγηση υψηλών δόσεων τη μειώνει. Τέλος, με βάση τα αποτελέσματα αυτά, αποφασίστηκε να διερευνηθεί η αναλγητική δράση της CBD σε δόσεις 1, 3 και 10 mg/kg, όχι όμως σε δόση 30 mg/kg διότι προκαλεί κατασταλτική επίδραση στην κινητικότητα του πειραματόζωου.

## **4.2 Επίδραση της χορήγησης κανναβιδιολικού οξέος στην δοκιμασία ανοικτού πεδίου**

Η μελέτη της δράσης του CBDA σε διάφορες δόσεις στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου είχε ως σκοπό να επιλεχθεί το σωστό δοσολογικό σχήμα για τη μελέτη της πιθανής αναλγητικής δράσης του CBDA στη δοκιμασία θερμαινόμενης πλάκας. Πιο συγκεκριμένα, στόχος ήταν να ελεγχθεί αν κάποια δόση προκαλούσε υποκινητικότητα στους επίμυς, γεγονός που θα επηρέαζε τα αποτελέσματα στη δοκιμασία θερμαινόμενης πλάκας. Οι δόσεις του CBDA οι οποίες χορηγήθηκαν επιλέχθηκαν με βάση προκαταρκτικά πειράματα στο εργαστήριό μας και κατόπιν μελέτης της υπάρχουσας βιβλιογραφίας (Brierley et al, 2016), και ήταν οι 0.03, 0.1, 0.3, 1 και 3 mg/kg. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας καμία από τις δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν δεν προκάλεσε διεγερτική ή ανασταλτική δράση επί της κινητικότητας των επιμύων.

Η απουσία παρόμοιας μελέτης (κινητικότητας στο ανοικτό πεδίο μη εξοικειωμένων επιμύων) στην σχετική βιβλιογραφία, δεν επιτρέπει τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μας με προϋπάρχουσες μελέτες. Ωστόσο οι Brierley et al. (2016) έδειξαν ότι η χορήγηση του CBDA δεν έχει καμία δράση επί της κινητικότητας σε εξοικειωμένους επίμυες κατά τη δοκιμασία του ανοικτού πεδίου. Άρα βασιζόμενοι στα ευρήματα αυτά, προτείνουμε ότι η χορήγηση του CBDA δεν επηρεάζει την αυθόρμητη κινητική συμπεριφορά. Επιπλέον, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι όλες οι δόσεις του CBDA μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία της θερμαινόμενης πλάκας, για τη διερεύνηση της πιθανής αναλγητικής δράσης.

## **4.3 Επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιόλης στην δοκιμασία Θερμαινόμενης Πλάκας**

Στη παρούσα μελέτη δείχτηκε ότι η CBD εμφανίζει αναλγητική δράση, μόνο στη μικρότερη δόση (1 mg/kg) και μία ώρα μετά τη χορήγηση, καθώς οι επίμυες εμφάνισαν αυξημένο χρόνο παραμονής στη θερμαινόμενη πλάκα σε σύγκριση με την ομάδα του εκδόχου. Επίσης, δύο ώρες μετά τη χορήγηση της χαμηλότερης δόσης, η CBD εμφανίζει μία τάση για αναλγητική δράση, καθώς παρόλο που ο χρόνος παραμονής των επιμύων στην θερμαινόμενη πλάκα είναι αυξημένος, η αύξηση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με τη χορήγηση εκδόχου. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα των Goncalves et al. (2014) και Maione et al. (2011), οι

οποίοι όμως χρησιμοποίησαν την πειραματική δοκιμασία τινάγματος της ουράς. Υπάρχουν όμως έρευνες σε μύες (Sofia et al, 1975, Long et al, 2010, Neelakantan et al, 2015) και επίμυες (Sofia et al, 1975, Britch et al, 2017) οι οποίες αντιτίθεται στα αποτελέσματα μας.

Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα μπορούν να αποδοθούν, κατά κύριο λόγο, στους διαφορετικούς πειραματικούς χειρισμούς και στα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν στις εκάστοτε μελέτες, με έμφαση στο διαφορετικό δοσολογικό σχήμα που επιλέχθηκε στη κάθε πειραματική προσέγγιση. Επίσης σημαντικό ρόλο στις διαφορές αυτές διαδραματίζουν τα διαφορετικά αναπτυξιακά παράθυρα όπου εκτελέστηκαν οι φαρμακολογικοί χειρισμοί, καθώς και το γεγονός ότι στις περισσότερες μελέτες χρησιμοποιήθηκαν μύες.

#### **4.4 Επίδραση της χρόνιας χορήγησης κανναβιδιόλης στη δοκιμασία Θερμαινόμενης Πλάκας**

Λαμβάνοντας υπόψιν τα ευρήματα των πειραμάτων οξείας χορήγησης CBD, το γεγονός ότι η CBD αποτελεί μια μη εθιστική, ασφαλή και καλά ανεκτή ουσία, και το ισχυρό ενδιαφέρον που αναπτύσσεται τελευταία για την επαναλαμβανόμενη χρήση κανναβιδιόλης, διερευνήσαμε την πιθανή αναλγητική της δράση ύστερα από χρόνια χορήγησή της σε επίμυες. Μελετήσαμε τις δύο χαμηλότερες δόσεις (1, 3 mg/kg), βασιζόμενοι στο γεγονός ότι μόνο η χαμηλότερη δόση εμφάνισε αναλγητική δράση στην οξεία χορήγηση. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι μετά από χρόνια χορήγηση CBD ο χρόνος παραμονής των επιμύων πάνω στη θερμαινόμενη πλάκα είναι αυξημένος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, το αναλγητικό αποτέλεσμα της χρόνιας χορήγησης CBD εμφανίζεται και στις δύο δόσεις, με την υψηλότερη δόση (3mg/kg) αυτή τη φορά να έχει εντονότερη αναλγητική δράση. Το εύρημα αυτό υποδεικνύει ότι η χρόνια χορήγηση της CBD χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση αναλγητικών ιδιοτήτων.

Τα αποτελέσματά μας βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά της μελέτης σε επίμυες του ίδιου στελέχους των Greene et al. (2018), ωστόσο η δόση που παρατήρησαν αναλγησία ήταν υψηλότερη, και συγκεκριμένα 10 mg/kg. Από την άλλη, μία παλαιότερη μελέτη των Long et al. (2010) σε μύες δεν είχε δείξει κάποια αναλγητική δράση της CBD. Αυτή η αντίθεση των αποτελεσμάτων μπορεί να οφείλεται κυρίως, στο διαφορετικό πειραματικό χειρισμό και στο μοντέλο το οποίο χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη, με έμφαση στο διαφορετικό δοσολογικό σχήμα που επιλέχθηκε. Τέλος σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η επιλογή μυών αντί επιμύων.

#### **4.5 Επίδραση της οξείας συγχορήγησης κανναβιδιόλης και κωδεΐνης στη δοκιμασία θερμαινόμενης πλάκας**

Στην οξεία συγχορήγηση CBD και Cod, τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η CBD δεν ασκεί καμία δράση επί της αναλγητικής δράσης της κωδεΐνης. Τα παρόντα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά της πειραματικής μελέτης σε μύες των Neelakantan et al. (2015), ο οποίοι όμως συγχορήγησαν στους μύες κανναβιδιόλη και μορφίνη. Λόγω της μη ύπαρξης επαρκούς βιβλιογραφίας σχετιζόμενης με τη συγχορήγηση αυτή, είναι εμφανές ότι το ερώτημα χρήζει περαιτέρω μελέτης. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι η Cod αποτελεί προ-φάρμακο το οποίο μεταβολίζεται από το κυτόχρωμα P450 2D6 σε μορφίνη και με τον τρόπο αυτό προκαλείται η αναλγητική της δράση

(Crews et al, 2014, Chidambaran et al, 2017), ενώ από την άλλη, μελέτες δείχνουν ότι η CBD αναστέλλει το συγκεκριμένο ένζυμο (Yamaori et al, 2011, Qian et al, 2019)., Με βάση τις μελέτες αυτές θα αναμέναμε η χορήγηση της CBD να αναστείλει την αναλγητική δράση της Cod, ωστόσο δεν παρατηρήθηκε κάτι τέτοιο. Πιθανώς οι δόσεις της CBD που χρησιμοποιήθηκαν να μην είναι αρκετές για να προκαλέσουν μια τέτοια δράση, ωστόσο σύμφωνα με μελέτες η Cod είναι ικανή να ασκήσει κάποια αναλγητική δράση ακόμη και αν το κυτόχρωμα P450 2D6 έχει ανασταλεί πιθανώς μέσω ενός μεταβολίτη της, της 6-γλυκουρονίδης (Lötsch et al, 2006, Chidambaran et al, 2017).

#### **4.6 Επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιόλης επί του νευροπαθητικού πόνου στην δοκιμασία von Frey**

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης όσον αφορά το μοντέλο νευροπαθητικού πόνου σε επίμυες, έδειξαν μια τάση για αναλγητική δράση της οξείας χορήγησης CBD. Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία έχει αξία η περαιτέρω μελέτη της δράσης της οξείας χορήγησης CBD επί του νευροπαθητικού πόνου κυρίως σε υψηλότερες δόσεις, στις οποίες έχει εμφανίσει αναλγητική δράση, τόσο σε όμοιο (Comeli et al, 2008), όσο και σε διαφορετικό πειραματικό μοντέλο (Jesus et al, 2019). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι, αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι η χρόνια χορήγηση CBD εμφανίζει αναλγητική δράση επί του νευροπαθητικού πόνου σε τρωκτικά (Costa et al, 2007, Comeli et al, 2008, Xiong et al, 2012, Jesus et al, 2019, De Gregorio et al, 2019, Abraham et al, 2019). Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί η μελέτη των Breen et al. (2012), οι οποίοι παρατήρησαν ότι, το άτυπο κανναβινοειδές O-1602 αύξησε την ευαισθητοποίηση του νευροπαθητικού ποδιού. Ωστόσο, το O-1602, σε αντίθεση με τη CBD (ανταγωνιστική δράση), δρα ως αγωνιστής στους υποδοχείς των G πρωτεϊνών GRP55, οπότε με βάση αυτό πρότειναν ότι πιθανώς η CBD να μπορεί να μειώσει την ευαισθητοποίηση αυτή. Με βάση όλα αυτά τα δεδομένα, καθώς και τα δύο ευρήματα της παρούσας μελέτης, ότι η οξεία χορήγηση της CBD εμφάνισε τάση για αναλγητική δράση επί του νευροπαθητικού πόνου και ότι η ίδια δόση σε χρόνια χορήγηση είχε αναλγητική δράση, αποφασίστηκε η περαιτέρω μελέτη της χρόνιας χορήγησης της δόσης αυτής, στο μοντέλο του νευροπαθητικού πόνου σε επίμυες.

#### **4.7 Επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιολικού οξέος στη δοκιμασία Θερμαινόμενης Πλάκας**

Τα πειράματα έδειξαν ότι το CBDA έχει αναλγητική δράση σε τρεις από τις δόσεις στις οποίες χορηγήθηκε. Αναλυτικότερα, και στα τρία χρονικά σημεία μέτρησης της αναλγητικής δράσης, μετά τη χορήγηση της δόσης 0.1 mg/kg, οι επίμυες είχαν αυξημένο χρόνο παραμονής στη θερμαινόμενη πλάκα σε σχέση με τη χορήγηση εκδόχου. Όμοιο αποτέλεσμα έδωσαν και οι δόσεις 0.3 και 3 mg/kg, αλλά μόνο στις δύο ώρες μετά την χορήγησή τους. Επιπλέον η μικρότερη δόση (0.03 mg/kg) εμφάνισε μία τάση για αναλγητική δράση, καθώς ο χρόνος παραμονής των επιμύων στην θερμαινόμενη πλάκα είναι αυξημένος αλλά η αύξηση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με τη χορήγηση εκδόχου.

Τα αποτελέσματα μας αυτά δεν είναι εφικτό να συγκριθούν με άλλα, καθώς δεν υπάρχει αντίστοιχη πειραματική μελέτη στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, γεγονός που καθιστά το αποτέλεσμα αυτό μοναδικό και άξιο περαιτέρω διερεύνησης. Άξια αναφοράς είναι η πειραματική μελέτη των Rock et al. (2018), στην οποία



υποστηρίζεται ότι το CBDA έχει αντιφλεγμονώδη και αντι-υπεραλγησιακή δράση σε μοντέλο φλεγμονώδους πόνου σε επίμυες.

## 5. Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μπορούν να εξαχθούν τα εξής συμπεράσματα:

- α) η CBD χορηγούμενη οξέως εμφανίζει ήπια αναλγητική δράση,
- β) η οξεία χορήγηση της CBD δεν επηρεάζει την αναλγητική δράση της Cod
- γ) σε κατάσταση νευροπαθητικού πόνου η οξεία χορήγηση CBD εμφανίζει μια τάση για αναλγησία,
- δ) η CBD χορηγούμενη χρονίως έχει αναλγητική δράση,
- ε) η οξεία χορήγηση του CBDA σε χαμηλή δόση εμφανίζει αναλγητική δράση.

## 5. Βιβλιογραφία

Abraham AD, Leung EJY, Wong BA, Rivera ZMG, Kruse LC, Clark JJ, Land BB (2020) “Orally consumed cannabinoids provide long-lasting relief of allodynia in a mouse model of chronic neuropathic pain” *Neuropsychopharmacol*, 45, 1105–1114. DOI:10.1038/s41386-019-0585-3

Adams R, Hunt M, Clark JH (1940) “Structure of Cannabidiol, a Product Isolated from the Marihuana Extract of Minnesota Wild Hemp. I”, *J. Am. Chem. Soc.* 1940, 62, 1, 196-200. DOI: 10.1021/ja01858a058

Aizpurua-Olaizola O, Elezgarai I, Rico-Barrio I, Zarandona I, Etxebarria N, Usobiaga A (2017) “Targeting the endocannabinoid system: future therapeutic strategies” *Drug Discovery Today*, 22 (1) , pp. 105-110. DOI: 10.1016/j.drudis.2016.08.005

Anderson LL, Low IK, Banister SD, McGregor IS, Arnold JC (2019) “Pharmacokinetics of phytocannabinoid acids and anticonvulsant effect of cannabidiolic acid in a mouse model of dravet syndrome” *J Nat Prod*, 82, 3047–3055. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b00600

Bannon AW, Malmberg AB (2007) “Models of Nociception: Hot-Plate, Tail-Flick, and Formalin Tests in Rodents” *Current protocols in neuroscience*, Chapter 8. Doi.org/10.1002/0471142301.ns0809s41

Bolognini D, Rock EM, Cluny NL, Cascio MG, Limebeer CL, Duncan M, Stott CG, Javid FA, Parker LA, Pertwee RG (2013) “Cannabidiolic acid prevents vomiting in *Suncus murinus* and nausea-induced behaviour in rats by enhancing 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation” *British Journal of Pharmacology*, 168, 1456–1470. DOI: 10.1111/bph.12043

Brakatselos, C, Delis F, Asprogerakas MZ, Lekkas P, Tseti I, Tzimas PS, Petrakis EA, Halabalaki M, Skaltsounis LA, Antoniou K (2020) “Cannabidiol Modulates the Motor Profile and NMDA Receptor-related Alterations Induced by Ketamine” *Neuroscience*, 0306-4522. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2020.09.029

Breen C, Brownjohn PW, Ashton JC (2012) “The atypical cannabinoid O-1602 increases hind paw sensitisation in the chronic constriction injury model of neuropathic pain” *Neurosci Lett*, 508(2):119-22. DOI: 10.1016/j.neulet.2011.12.039

Brierley DI, Samuels J, Duncan M, Whalley BJ, Williams CM (2016) “Neuromotor tolerability and behavioural characterisation of cannabidiolic acid, a phytocannabinoid with therapeutic potential for anticipatory nausea” *Psychopharmacology*, 233(2):243-54. DOI: 10.1007/s00213-015-4100-1

Britch SC, Wiley JL, Yu Z, Clowers BH, Craft RM (2017) “Cannabidiol- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol interactions on acute pain and locomotor activity” *Drug Alcohol Depend*, 1;175:187-197. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2017.01.046

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) “Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*” Jul;53(1):55-63. Doi: 10.1016/0165-0270(94)90144-9. PMID: 7990513.

Comelli F, Giagnoni G, Bettoni I, Colleoni M, Costa B (2008) “Antihyperalgesic effect of a Cannabis sativa extract in a rat model of neuropathic pain: mechanisms involved” *Phytother Res*, 22(8):1017-1024. DOI: 10.1002/ptr.2401

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. DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.11.006

Cunha JM, Carlini EA, Pereira AE, Ramos OL, Pimentel C, Gagliardi R, Sanvito WL, Lander N, Mechoulam R (1980) “Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients”, *Pharmacology*, 21:175–185. DOI: 10.1159/000137430

De Gregorio D, McLaughlin RJ, Posa L, Ochoa-Sanchez R, Enns J, Lopez-Canul M, Aboud M, Maione S, Comai S, Gobbi G (2019) “Cannabidiol modulates serotonergic transmission and reverses both allodynia and anxiety-like behavior in a model of neuropathic pain” *Pain*, 160(1):136-150. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001386

De Petrocellis L, Vellani V, Schiano-Moriello A, Marini P, Magherini PC, Orlando P, Di Marzo V (2008) “Plant-derived cannabinoids modulate the activity of transient receptor potential channels of ankyrin type-1 and melastatin type-8” *J Pharmacol Exp Ther*, 325: 1007–1015. DOI: 10.1124/jpet.107.134809

De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allarà M, Bisogno T, Petrosino S, Stott CG, Di Marzo V (2011) “Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes” *Br J Pharmacol*, 163: 1479–1494. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.01166.x

Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I (2017) “Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents” *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 284. Doi.org/10.3389/fnmol.2017.00284

Finn DP, Beckett SR, Roe CH, Madjd A, Fone KC, Kendall DA, Marsden CA, Chapman V (2004) “Effects of coadministration of cannabinoids and morphine on nociceptive behaviour, brain monoamines and HPA axis activity in a rat model of persistent pain” *Eur J Neurosci*, 19(3):678-686. DOI: 10.1111/j.0953-816x.2004.03177.x

Gaoni Y, Mechoulam R (1964) ” Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish”, *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 8, 1646-1647. DOI: 10.1021/ja01062a046

Gaoni Y, Mechoulam R (1966) “Hashish—VII : The isomerization of cannabidiol to tetrahydrocannabinols”, *Tetrahedron*, Volume 22, Issue 4, Pages 1481-1488. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)99446-3

Gonçalves TC, Londe AK, Albano RI, de Araújo Júnior AT, de Aguiar Azeredo M, Biagioni AF, Vasconcellos TH, Dos Reis Ferreira CM, Teixeira DG, de Souza Crippa JA, Vieira D, Coimbra NC (2014) “Cannabidiol and endogenous opioid peptide-mediated mechanisms modulate antinociception induced by transcutaneous

electrostimulation of the peripheral nervous system” *J Neurol Sci*, 15;347(1-2):82-9. DOI: 10.1016/j.jns.2014.09.024

Green G (2005) “The Cannabis Breeder's Bible”, Green Candy Press, pp. 15-16

Hammell DC, Zhang LP, Ma F, Abshire SM, McIlwrath SL, Stinchcomb AL, Westlund KN (2016) “Transdermal cannabidiol reduces inflammation and pain-related behaviours in a rat model of arthritis” *Eur J Pain*, 20(6):936-948. DOI: 10.1002/ejp.818

Greene NZ, Wiley JL, Yu Z, Clowers BH, Craft RM (2018) “Cannabidiol modulation of antinociceptive tolerance to  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol” *Psychopharmacology*, 235(11):3289-3302. doi: 10.1007/s00213-018-5036-z

Hartmann A, Lisboa SF, Sonogo AB, Coutinho D, Gomes FV, Guimaraes FS (2019) “Cannabidiol attenuates aggressive behavior induced by social isolation in mice: Involvement of 5-HT1A and CB1 receptors” *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 94:109637.

Hartsel JA, Eades J, Hickory B, Makriyannis A (2016) “Cannabis sativa and Hemp. In: *Nutraceuticals. Efficacy, safety and toxicity*”, Science Direct ed, pp 735-756. DOI: 10.1016/B978-0-12-802147-7.00053-X

Hlozek T, Uttl L, Kaderabek L, Balikova M, Lhotkova E, Horsley RR, Novakova P, Šíchová K, Štefková K, Tylš F, Kuchař M, Palenicek T (2017) “Pharmacokinetic and behavioural profile of THC, CBD, and THC+CBD combination after pulmonary, oral, and subcutaneous administration in rats and confirmation of conversion in vivo of CBD to THC” *European Neuropsychopharmacology*, 27 (12) , pp. 1223-1237. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2017.10.037

Hudson R, Renard J, Norris C, Rushlow WJ, Laviolette SR (2019) “Cannabidiol Counteracts the Psychotropic Side-Effects of  $\Delta$ -9-Tetrahydrocannabinol in the Ventral Hippocampus through Bidirectional Control of ERK1-2 Phosphorylation” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 39(44), 8762–8777. Doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0708-19.2019

Jesus CHA, Redivo DDB, Gasparin AT, Sotomaior BB, de Carvalho MC, Genaro K, Zuardi AW, Hallak JEC, Crippa JA, Zanoveli JM, da Cunha JM (2019) “Cannabidiol attenuates mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats via serotonergic system activation through 5-HT1A receptors” *Brain Res*, 1715:156-164. DOI: 10.1016/j.brainres.2019.03.014

Kinghorn AD, Falk H, Gibbons S, Kobayashi J (2017), *Phytocannabinoids, Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 103. DOI: 10.1007/978-3-319-45541-9\_1

Long LE, Chesworth R, Huang XF, McGregor IS, Arnold JC, Karl T (2010) “A behavioural comparison of acute and chronic Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in C57BL/6JArc mice” *Int J Neuropsychopharmacol*, 13(7):861-876. DOI: 10.1017/S1461145709990605

Maione S, Piscitelli F, Gatta L, Vita D, De Petrocellis L, Palazzo E, de Novellis V, Di Marzo V (2011) “Non-psychoactive cannabinoids modulate the descending pathway of antinociception in anaesthetized rats through several mechanisms of action” *Br J Pharmacol*, 162(3):584-96. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.01063.x

Mechoulam R, Parker LA, Gallily R (2002) “Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects” *J Clin Pharmacol.*, 42(S1):11S–19S.

Moreira FA, Guimaraes FS (2005) Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. *Eur J Pharmacol* 512:199–205

Neelakantan H, Tallarida RJb, Reichenbach ZWb, Tuma RFb, Ward SJb, Walker E A (2015) “Distinct interactions of cannabidiol and morphine in three nociceptive behavioral models in mice” *Behavioural Pharmacology*, Vol 26, Issue 3, p: 304-314. DOI: 10.1097/FBP.000000000000119

Peres FF, Levin R, Suiama MA, Diana MC, Gouvêa DA, Almeida V, Santos CM, Lungato L, Zuardi AW, Hallak JEC, Crippa JA, Vânia D’A, Silva RH, Abílio VC (2016) “Cannabidiol Prevents Motor and Cognitive Impairments Induced by Reserpine in Rats” *Frontiers in Pharmacology*, 7, 343, 1663-9812. DOI: 10.3389/fphar.2016.00343

Pertwee RG (2006) “Cannabinoid pharmacology: the first 66 years”, *Br J Pharmacol*, 147(Suppl 1): S163–S171. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706406

Pertwee, G., ed. (2014) “Handbook of Cannabis”, Oxford University Press

Philpott HT, O’Brien M, McDougall JJ (2017) “Attenuation of early phase inflammation by cannabidiol prevents pain and nerve damage in rat osteoarthritis” *Pain*, 158(12):2442-2451. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001052

Pitcher GM, Ritchie J, Henry JL (1999) “Nerve constriction in the rat: model of neuropathic, surgical and central pain” *Pain*. 1999 Oct;83(1):37-46. Doi: 10.1016/s0304-3959(99)00085-8. PMID: 10506670.

Rock EM, Limebeer, CL, Petrie GN Williams LA, Mechoulam R, Parker LA (2017) “Effect of prior foot shock stress and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, cannabidiolic acid, and cannabidiol on anxiety-like responding in the light-dark emergence test in rats” *Psychopharmacology*, 234:2207–2217. DOI: 10.1007/s00213-017-4626-5

Rock EM, Limebeer CL, Parker LA (2018) “Effect of cannabidiolic acid and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol on carrageenan-induced hyperalgesia and edema in a rodent model of inflammatory pain” *Psychopharmacology*, 235:3259–3271. DOI: 10.1007/s00213-018-5034-1

Ruhaak LR, Felth J, Karlsson PC, Rafter JJ, Verpoorte R, Bohlin L (2011) “Evaluation of the cyclooxygenase inhibiting effects of six major cannabinoids isolated from *Cannabis sativa*” *Biol Pharm Bull*, 34: 774–778. DOI: 10.1248/bpb.34.774

Russo E, Guy GW (2006) “A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol” *Med Hypotheses*, 66(2):234-46. DOI: 10.1016/j.mehy.2005.08.026

Shbiro L, Hen-Shoval D, Hazut N, Zalsman G, Mechoulam R, Weller A, Shoval G (2017) “Anti-depressant-like effects of cannabidiol and cannabidiolic acid in genetic rat models of depression” *European Neuropsychopharmacology*, 27, S783–S784. DOI: 10.1016/s0924-977x(17)31426-8

Socala K, Wyska E, Szafarz M, Nieoczym D, Wlaz P (2019) “Acute effect of cannabidiol on the activity of various novel antiepileptic drugs in the maximal electroshock- and 6Hz-induced seizures in mice: Pharmacodynamic and pharmacokinetic studies” *Neuropharmacology*, 158:107733

Sofia RD, Vassar HB, Knobloch LC (1975) “Comparative analgesic activity of various naturally occurring cannabinoids in mice and rats” *Psychopharmacologia*, 40(4):285-295. DOI: 10.1007/BF00421466

Takeda S, Misawa K, Yamamoto I, Watanabe K (2008) “Cannabidiolic acid as a selective cyclooxygenase-2 inhibitory component in cannabis” *Drug Metab Dispos*, 36(9):1917-1921. DOI: 10.1124/dmd.108.020909

Takeda S, Okajima S, Miyoshi H, Yoshida K, Okamoto Y, Okada T, Amamoto T, Watanabe K, Omiecinski CJ, Aramaki H (2012) “Cannabidiolic acid, a major cannabinoid in fiber-type cannabis, is an inhibitor of MDA-MB-231 breast cancer cell migration” *Toxicology letters*, 214(3), 314–319. DOI: 10.1016/j.toxlet.2012.08.029

Takeda S, Okazaki H, Ikeda E, Abe S, Yoshioka Y, Watanabe K, Aramaki H (2014) “Down-regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) by cannabidiolic acid in human breast cancer cells” *J Toxicol Sci*, 39(5):711-716. doi:10.2131/jts.39.711

Taura F, Sirikantaramas S, Shoyama Y, Yoshikai K, Shoyama Y, Morimoto S (2007) “Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*”, *FEBS letters* 581, 2929-2934

Wallace R (2004) ” Cannabinoids: defending the epileptic brain”, *Epilepsy Curr.*, 4(3):93-5. DOI: 10.1111/j.1535-7597.2004.43003.x

Welty TE, Luebke A, Gidal BE (2014) “Cannabidiol: promise and pitfalls”, *Epilepsy Curr.*, 14(5):250-2. DOI: 10.5698/1535-7597-14.5.250

Wong H, Cairns BE (2019) “Cannabidiol, cannabitol and their combinations act as peripheral analgesics in a rat model of myofascial pain” *Arch Oral Biol*, 104:33-39. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2019.05.028

World Health Organization (2018) “Cannabidiol (CBD)”, Review report

Xiong W, Cui T, Cheng K, Yang F, Chen SR, Willenbring D, Guan Y, Pan HL, Ren K, Xu Y, Zhang L (2012) “Cannabinoids suppress inflammatory and neuropathic pain by targeting  $\alpha 3$  glycine receptors” *J Exp Med*, 209(6):1121-1134. DOI: 10.1084/jem.20120242

Zurier RB, Burstein SH (2016) “Cannabinoids, inflammation, and fibrosis”, *FASEB J.*, 30(11):3682-3689. DOI: 10.1096/fj.201600646R

Αυγερινός Δ, Παπαρρηγόπουλος Θ, Δάλλα Χ (2018) «Οι εξαρτήσεις», Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης