



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΝΗΛΙΚΙΩΣΗ

Ναυσικά Πούλια

Βιολόγος, M.Sc.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΝΗΛΙΚΙΩΣΗ

Ναυσικά Πούλια

Βιολόγος, M.Sc.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)

Ημερομηνία αίτησης της κ. Πούλια Ναυσικάς: 16-10-2014

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 7719/28-11-2014

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Αντωνίου Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Μαρσέλος Μάριος-Αθανάσιος, Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Πιτσικας Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 15-1-2015

«Χρήρηση κανναβινοειδών κατά την ανάπτυξη των πειραματοζώων και έλεγχος συμπεριφορικών και νευροβιολογικών δεικτών κατά την ενηλικίωση»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 855/15-5-2018

Κωνσταντή Μαρία	Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Αντωνίου Αικατερίνη	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπάς Περικλής	Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πιτσικας Νικόλαος	Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Δάλλα Χριστίνα	Δάλλα Χριστίνα, Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
Λεονταρίτης Γεώργιος	Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πετρίκης Πέτρος	Επίκουρος Καθηγητής Ψυχιατρικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 22-5-2018

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



Στους γονείς μου και την αδερφή μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το χρονικό διάστημα 2014-2018, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Φαρμακολογίας Κυρίας Αικατερίνης Αντωνίου.

Η Διδακτορική αυτή Διατριβή ολοκληρώθηκε χάρη στην αμέριστη βοήθεια και ενεργή συμμετοχή όλων των μελών του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, των φίλων μου και της οικογένειάς μου. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας και Επιβλέπουσα της Διδακτορικής μου Διατριβής Κυρία Αικατερίνη Αντωνίου για την ευκαιρία που μου έδωσε να φοιτήσω δίπλα της στον τομέα της Νευροφαρμακολογίας, κάτι που για μένα αποτελούσε όνειρο ζωής. Ήδη, από την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας, ως Προπτυχιακή Φοιτήτρια στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, με κέρδισε με τις ουσιώδεις γνώσεις που μου μετέδωσε, την οργανωτικότητα, τη δυναμικότητα και τη γενναιοδωρία της, καθώς και την απεριόριστη φροντίδα προς το πρόσωπό μου. Παρότι, ένα μεγάλο μέρος της Διδακτορικής αυτής Διατριβής συνέπεσε με την παράλληλη ανάληψη δύσκολων καθηκόντων, ευθυνών και υποχρεώσεων από την πλευρά της, προσωπικά, δεν έπαψα στιγμή να αισθάνομαι την παρουσία της δίπλα μου με κάθε τρόπο. Μου μετέδιδε ένα αίσθημα ασφάλειας και σιγουριάς, βλέποντας στα μάτια της την εμπιστοσύνη και την αγάπη της για μένα. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω βαθύτατα γι' αυτά τα χρόνια που μαθήτευσα κοντά της, αισθανόμενη ότι η πόρτα του Εργαστηρίου μας θα παραμείνει και στο μέλλον ανοιχτή για μένα.

- Την Καθηγήτρια Φαρμακολογίας και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας Κυρία Μαρία Κωνσταντή γιατί δέχτηκε να συμμετάσχει στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω ιδιαίτερα γιατί, πέραν των άλλων, όλα αυτά τα χρόνια με έκανε να αισθανθώ ως ένα μέλος της δικής της ομάδας, πάντα καλλιεργώντας ένα κλίμα αλληλοβοήθειας, συνεργασίας και υποστήριξης μεταξύ των μελών του Εργαστηρίου.

- Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας Κύριο Νικόλαο Πιτσίκα γιατί δέχτηκε να συμμετάσχει στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή. Καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της Διατριβής αυτής στάθηκε δίπλα μου δείχνοντας ειλικρινές ενδιαφέρον για την πορεία των πειραμάτων, κάνοντας καίριες παρατηρήσεις και συμβάλλοντας εποικοδομητικά τόσο στην υλοποίηση όσο και στη συγγραφή της Διδακτορικής μου Διατριβής.

- Τον Ομότιμο Καθηγητή Φαρμακολογίας Κύριο Μάριο Μαρσέλο γιατί με καλωσόρισε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας όταν ξεκίνησα τη Διδακτορική μου Διατριβή και δέχτηκε να συμμετάσχει στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή. Αν και στη φάση της ολοκλήρωσης της Διατριβής μου κρίθηκε αναγκαία η αντικατάστασή του στην Τριμελή Επιτροπή, οι γνώσεις που με προθυμία μοιράστηκε μαζί μου όλο αυτό το διάστημα, η πείρα και η καθοδήγησή του υπήρξαν πολύτιμες για την πορεία μου και αποτελεί για μένα ιδιαίτερη τιμή η συνεργασία μαζί του.
- Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας Κύριο Περικλή Παππά γιατί δέχτηκε να συμμετάσχει στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή. Η συνεργασία μας κατά την παραμονή μου στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας ήταν πάντα άψογη, και τα σχόλια και οι παρατηρήσεις του με βοήθησαν να αντιμετωπίσω με σιγουριά τις ερευνητικές προκλήσεις.
- Τον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας Κύριο Γεώργιο Λεονταρίτη γιατί δέχτηκε να συμμετάσχει στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή. Από την πρώτη στιγμή αντιλήφθηκα ότι η πόρτα του γραφείου του θα είναι πάντα ανοιχτή για να ακούσει οποιαδήποτε απορία σε θεωρητικό και πρακτικό επίπεδο, πάντα πρόθυμος να με βοηθήσει κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων μου.
- Τον Επίκουρο Καθηγητή Ψυχιατρικής Κύριο Πέτρο Πετρίκη γιατί δέχτηκε να συμμετάσχει στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή και η συνεργασία μας ήταν άκρως εποικοδομητική.
- Την Επίκουρη Καθηγήτρια Ψυχοφαρμακολογίας Κυρία Χριστίνα Δάλλα γιατί δέχτηκε να συμμετάσχει στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα γιατί με φιλοξένησε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών ώστε να διεξάγω εκεί τα περισσότερα πειράματα Νευροχημείας. Ήταν πάντα πρόθυμη να με βοηθήσει και να με συμβουλευθεί σε ό,τι και αν χρειάστηκα, ιδιαίτερα κατά τη συγγραφή της πρώτης δημοσίευσης των αποτελεσμάτων της παρούσας έρευνας.
- Όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας και του Εκτροφείου Πειραματοζώων για το άριστο κλίμα που υπήρχε καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο Εργαστήριο.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Κυρία Φωτεινή Δελή γιατί από την πρώτη στιγμή της συνεργασίας μας με κέρδισε με την οργανωτικότητα, τη μεθοδικότητα και τις καίριες γνώσεις που μου προσέφερε. Οι συμβουλές της, το ειλικρινές ενδιαφέρον, η αμέριστη υποστήριξη καθώς και η εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε κάθε φάση υλοποίησης αυτής της Διδακτορικής Διατριβής με βοήθησαν να αγαπήσω περισσότερο τη Νευροβιολογία και με ενθάρρυναν να συνεχίζω να βελτιώνομαι ακόμα και όταν όλα φαίνονταν δύσκολα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς οφείλω επίσης στην Υποψήφια Διδάκτορα Κυρία Χριστίνα Ανδριοπούλου. Πέρα από την άριστη εργαστηριακή σχέση που είχαμε, η βοήθεια της στα πρώτα μου βήματα στο Εργαστήριο, η υποστήριξη και η γενναιοδωρία της έκαναν τις ώρες δουλειάς πραγματικά απολαυστικές. Αλλά και εκτός Εργαστηρίου, η στήριξη και το ενδιαφέρον της με οδηγούν στο να πω ότι κέρδισα και μια φίλη.

Ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω επίσης στους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές του Εργαστηρίου μας, Ναυσικά, Αριστεΐδη, Βούλα, Αλεξάνδρα, Χάρη, Χριστίνα και Μιχάλη.

- Τη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Κυρία Αλεξία Πολισσίδα γιατί με φιλοξένησε στο Ινστιτούτο Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών κατά τη διεξαγωγή πολλών συμπεριφορικών πειραμάτων. Στάθηκε στο πλάι μου με προθυμία, γενναιοδωρία και ειλικρινές ενδιαφέρον και με έκανε να αισθανθώ απεριόριστη ασφάλεια δίπλα της.

- Το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας για τη χορήγηση Υποτροφίας κατά το τρίτο έτος εκπόνησης της Διδακτορικής μου Διατριβής.

- Τους φίλους μου Μάριον, Αναστασία, Νένα και Βαγγέλη για την αμέριστη υποστήριξη, ενθάρρυνση και αγάπη που μου έδειξαν.

- Τέλος, το πιο μεγάλο μου ευχαριστώ απευθύνεται στους γονείς μου και την αδερφή μου, που στάθηκαν πάντα δίπλα μου σε όλη την πορεία αυτών των ετών. Η ανοχή τους, η συμπαράσταση, η συνεχής βοήθεια και η απλόχερη αγάπη τους μου εξασφάλισαν τις ιδανικότερες συνθήκες και μου επέτρεψαν να αφοσιωθώ ολοκληρωτικά στην επίτευξη των στόχων και των ονείρων μου.

Ιωάννινα, 22 Μαΐου 2018

Ναυσικά Πιούλια

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Κάνναβη - Γενικά στοιχεία	1
1.2 Ιστορική αναδρομή κάνναβης	2
1.3 Ενδογενές σύστημα κανναβινοειδών	3
1.3.1 Υποδοχείς κανναβινοειδών	5
1.3.2 Ενδογενή κανναβινοειδή	9
1.3.2.1 Προσδέτες των υποδοχέων των κανναβινοειδών	10
Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλη	11
1.3.2.2 Ανταγωνιστές	14
1.3.3 Ένζυμα υπεύθυνα για τη σύνθεση, απελευθέρωση και απενεργοποίηση των ενδογενών κανναβινοειδών	14
1.4 Κυτταρική μεταγωγή σήματος	15
1.5 Νευροβιολογία της ανάπτυξης	17
1.6 Μορφολογικές, ανατομικές και λειτουργικές αλλαγές	18
1.7 Επίδραση χρήσης κάνναβης κατά την ανάπτυξη στην ενηλικίωση	19
1.7.1 Κλινικές παρατηρήσεις χρήσης κάνναβης κατά την εφηβεία	19
1.7.2 Προκλινικές μελέτες χορήγησης κανναβινοειδών κατά την ανάπτυξη	22
Α) Συμπεριφορικές προσεγγίσεις	23
Β) Νευροχημικές – Νευροβιολογικές προσεγγίσεις	25
Γ) Νευροβιολογικές προσεγγίσεις σχετικά με μοριακούς δείκτες νευροπλαστικότητας	32
Δ) Αλληλεπίδραση εξωγενώς χορηγούμενης κάνναβης με το ενδοκανναβινοειδές σύστημα	36
ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	37
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	39
2.1 ΥΛΙΚΑ	39
2.1.1 Πειραματόζωα	39
2.1.2 Φάρμακα	40
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	41
2.2.1 Συμπεριφορικές μέθοδοι	41
2.2.1.1 Δοκιμασία Ανοικτού Πεδίου (Open Field Test)	41
2.2.1.2 Δοκιμασία Αναγνώρισης Θέσης Αντικειμένου (Object Location Task, OLT)	44
2.2.1.3 Δοκιμασία Υδάτινου Λαβύρινθου κατά Morris (Morris Water Maze, MWM)	45
2.2.1.4 Δοκιμασία Μετατόπισης της Προσοχής (Attentional Set Shift Test, ASST) .	48
2.2.1.5 Δοκιμασία Προ-παλμικής Αναστολής του Αντανακλαστικού του Αιφνιδιασμού (Pre-Pulse Inhibition test, PPI)	49
2.2.1.6 Μέτρηση κινητικής δραστηριότητας μετά από οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης	51
2.2.2 Θυσία πειραματοζώων	51
Α) Ομογενοποίηση ιστών με σκοπό τον προσδιορισμό νευροχημικών δεικτών	51
Β) Ομογενοποίηση ιστών με σκοπό τον προσδιορισμό της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών	52

2.2.3 Νευροχημικές Μέθοδοι	54
2.2.4 Νευροβιολογικές Μέθοδοι	58
2.2.5 Στατιστικές Αναλύσεις	63
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	64
3.1 Καταγραφή σωματικού βάρους	64
3.2 Αποτελέσματα συμπεριφορικών δοκιμασιών	64
3.2.1 Δοκιμασία Ανοικτού Πεδίου	64
3.2.1.1 Μέτρηση αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας	64
3.2.1.2 Προσδιορισμός ικανότητας εξοικείωσης μετά από συνεχόμενη έκθεση σε νέο περιβάλλον	66
3.2.2 Δοκιμασία Αναγνώρισης Θέσης Αντικειμένου	68
3.2.3. Δοκιμασία Υδάτινου Λαβύρινθου κατά Morris	69
3.2.4 Δοκιμασία Μετατόπισης της Προσοχής	70
3.2.5 Δοκιμασία Προ-Παλμικής Αναστολής του Αντανακλαστικού Αιφνιδιασμού	71
3.2.6 Αποτελέσματα καταγραφής της κινητικής δραστηριότητας μετά από οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης κατά την ενηλικίωση	71
3.3 Αποτελέσματα νευροχημικών αναλύσεων	74
3.3.1. Ντοπαμινεργική δραστηριότητα	74
3.3.1.1 Μέτρηση επιπέδων ντοπαμίνης και μεταβολιτών της και εκτίμηση ρυθμού ανακύκλωσης	74
3.3.1.2 Επίδραση στα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης του μεταφορέα της ντοπαμίνης (DAT)	75
3.3.2 Σεροτονεργική δραστηριότητα	77
3.3.2.1 Μέτρηση επιπέδων σεροτονίνης και μεταβολίτη της και εκτίμηση ρυθμού ανακύκλωσης	77
3.3.3.2. Επίδραση στα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης του μεταφορέα της σεροτονίνης (SERT)	78
3.3.3. Επίδραση στα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης του μονοπατιού BDNF	79
3.3.4 Επίδραση στα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης των υποδοχέων CB1 και CB2 ...	82
ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	86
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	87
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	103
6. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	105
7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	107
8. ABSTRACT	110
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	113

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Κάνναβη – Γενικά στοιχεία

Η κάνναβη συνιστά την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη για ηδονιστικούς λόγους εξαρτησιογόνο ουσία μετά το αλκοόλ, την καφεΐνη και τον καπνό. Αποτελεί ένα ετήσιο φυτό, ενδημικό της κεντρικής Ασίας και της Ινδικής υποηπείρου, το οποίο ευδοκίμει σε όλες τις χώρες με εύκρατο κλίμα (Μαρσέλος & Καραγιαννίδου, 2005).

Για μεγάλο διάστημα επικρατούσε η άποψη, πως η κάνναβη αποτελεί ένα γένος ανθοφόρων φυτών στο οποίο ταξινομούνται τρία είδη, η *Cannabis sativa* (κάνναβη η ήμερη), η *Cannabis indica* (ινδική κάνναβη) και η *Cannabis ruderalis* (Elsohly et al., 2007). Ωστόσο, σύμφωνα με πιο σύγχρονες απόψεις της Συστηματικής Βοτανικής, το φυτό εκπροσωπεί ένα και μοναδικό ταξινομικό είδος, την *Cannabis sativa*, που όμως χαρακτηρίζεται από έντονη βιολογική πολυμορφία και αστάθεια των εξωτερικών του γνωρισμάτων (Μαρσέλος και Καραγιαννίδου, 2005). Η κάνναβη έχει χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή σχοινιών, υφασμάτων, τροφίμων και χαρτιού, αλλά και ως καύσιμη ύλη, προσθετικό σε χρώματα και πλαστικά, ενώ έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικό και ευφορικό μέσο από την αρχαιότητα έως σήμερα.

Η φυτοχημεία της κάνναβης έχει μελετηθεί ευρέως. Οι ίνες του φυτού περιέχουν περισσότερες από 480 αναγνωρισμένες χημικές ουσίες, από τις οποίες ξεχωρίζει μια μεγάλη οικογένεια αρωματικών τερπενοφαινολών, γνωστών ως **κανναβινοειδή**. Έχουν αναγνωριστεί μέχρι στιγμής 66 κανναβινοειδή προερχόμενα από το φυτό της κάνναβης (Turner et al., 2017; Thakur et al., 2005). Ο όρος «κανναβινοειδές» είχε αρχικά χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει την κατηγορία αρωματικών υδρογονανθρακικών ενώσεων με 21 άτομα άνθρακα που περιέχουν οξυγόνο και εντοπίζονται στο φυτό *Cannabis sativa* (Mechoulam and Gaoni, 1967). Ωστόσο, ο όρος αυτός χρησιμοποιείται σήμερα για να περιγράψει γενικά όλες τις φυσικές ή συνθετικές ουσίες που μπορούν να μιμηθούν τις δράσεις κανναβινοειδών που προέρχονται από το φυτό της κάνναβης ή που προσομοιάζουν δομικά εκείνες των φυτικών κανναβινοειδών (Fisar et al., 2009). Τα φυσικά κανναβινοειδή, που βρίσκονται στο φυτό *Cannabis sativa*, διακρίνονται σε έξι υποκατηγορίες: 1) τις τετραϋδροκανναβινόλες (THCs), 2) τις κανναβιδιόλες (CBDs), 3) τις κανναβινόλες (CBNs) και, σε μικρότερο βαθμό, 4) τα κανναβιχρωμένια (CBCs), 5) τις κανναβιγερόλες (CBGs) και 6) τις κανναβινοδιόλες (CBNDs) (Elsohly and Slade, 2005). Από τα μέχρι στιγμής γνωστά κανναβινοειδή, μόνο η Δ^9 - και η Δ^8 -τετραϋδροκανναβινόλη ασκούν παρόμοιες φαρμακολογικές δράσεις με τα αδρά μέρη του φυτού της κάνναβης (π.χ. άνθη, φύλλα, στελέχη και παραγόμενη ρητίνη), χωρίς όμως να υπάρχει απόλυτη ταύτιση.

Αυτό είναι φυσικό, αν αναλογιστούμε πόσα ακόμα συστατικά περιέχει το φυτό και πόσες δυνατότητες υπάρχουν για πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των συστατικών. Παρόλα αυτά, για πρακτικούς λόγους οι περισσότερες πειραματικές μελέτες που αφορούν την κάνναβη γίνονται με Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλη και όχι με ακατέργαστα μέρη του φυτού (Μαρσέλος και Καραγιαννίδου, 2005).

Πολλές βιβλιογραφικές μελέτες έχουν εστιαστεί σε ερωτήματα σχετικά με την ύπαρξη αντοχής και εξάρτησης μετά από τη μακροχρόνια χρήση κάνναβης (Ramaekers et al., 2016; Delforterie et al., 2016; de Fonseca and Schneider, 2008). Έχει υποστηριχθεί ότι εμφανίζονται συμπτώματα στέρησης κατά τη διακοπή της χρήσης αλλά σπανίως συνιστούν ένα ευδιάκριτο σύνδρομο στέρησης, πιθανώς λόγω του μεγάλου χρόνου ημιζωής των κανναβινοειδών, ο οποίος συνεισφέρει στη μη έντονη εμφάνιση έντονων συμπτωμάτων στέρησης (Svizenska et al., 2008). Αξίζει να σημειωθεί ότι η μακροχρόνια χρήση αυτών των ουσιών, ιδιαίτερα κατά την περίοδο της εφηβείας, μπορεί να συνδεθεί με διαταραχές γνωστικού τύπου και με εμφάνιση ψυχωτικού τύπου συμπτωματολογίας αργότερα κατά την ενηλικίωση (Murray et al., 2007).

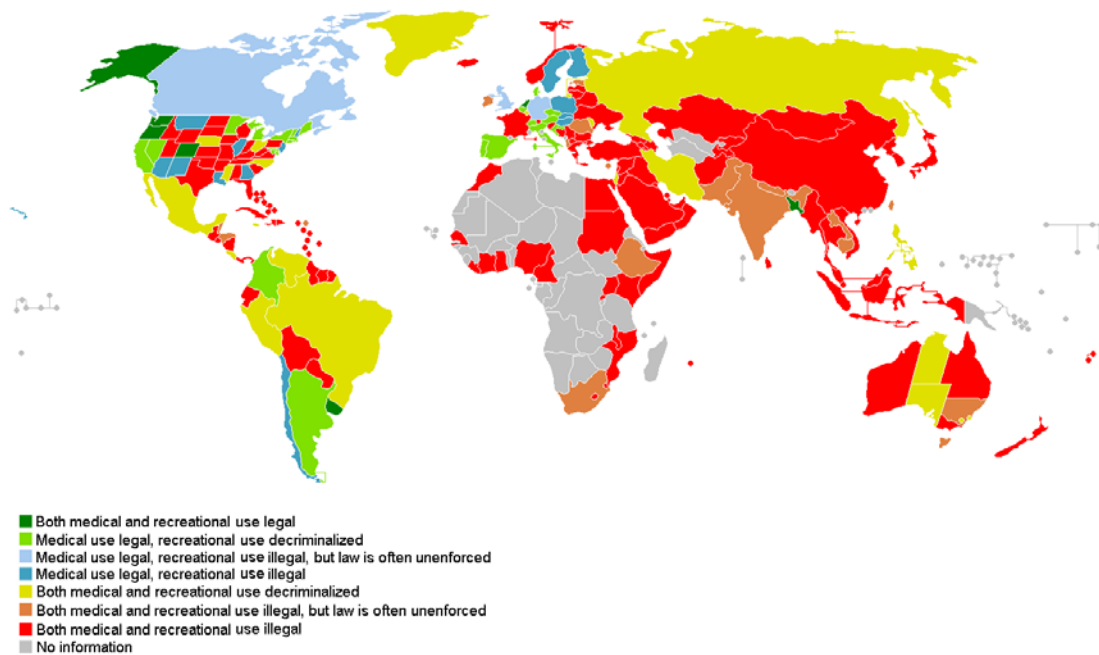
1.2 Ιστορική αναδρομή κάνναβης

Η κάνναβη αποτελεί το αρχαιότερο και δημοφιλέστερο διεθνώς ναρκωτικό (Chen et al., 1997), ενώ συνιστά την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ψυχαγωγική εξαρτησιογόνο ουσία μετά το αλκοόλ, την καφεΐνη και τον καπνό. Αν και η καλλιέργειά της ξεκίνησε για τη δημιουργία υφασμάτων και σχοινιών από της ίνες της (Μαρσέλος, 1997), η χρήση της ως ψυχοτρόπου ουσίας καταδεικνύεται από αρχαιολογικά ευρήματα στις προϊστορικές ήδη κοινωνίες της Ευρασίας και της Αφρικής, ενώ αναφέρεται και σε αρχαία συριακά και κινέζικα κείμενα του 8500 π.Χ. Ο όρος «**κάνναβις**» εντοπίζεται πρώτη φορά σε κείμενο του Ηροδότου το 450 π.Χ., αναφερόμενο στην Ευρασιατική φυλή των Σκυθών (Butrica et al., 2002), και αρκετούς αιώνες αργότερα, ο Διοσκορίδης ο Πεδάνιος (40-90 μ.Χ.), στο βιβλίο του «Περί ύλης ιατρικής» αναγνωρίζει τον θεραπευτικό χαρακτήρα του φυτού, στον οποίο αποδίδει συγκεκριμένες ενδείξεις, όπως η τόνωση της σεξουαλικότητας.

Οι πρώτες πληροφορίες που λαμβάνονται για την κάνναβη στο δυτικό ημισφαίριο χρονολογούνται από το 1545 με την αποβίβαση των Ισπανών στη Χιλή (Bouquet et al., 1951) και μέχρι τον 19^ο αιώνα η διάδοση της ήταν τέτοια που κατέληξε να επιτελεί σημαντικό ρόλο για την οικονομική ανάπτυξη της ηπείρου. Την ίδια χρονική περίοδο, στην Ευρώπη σημειώθηκε μια αναζωπύρωση του ενδιαφέροντος για το φυτό, με τη χρήση του όρου «χασίς»,

λέξη αραβικής προέλευσης που σημαίνει ξερόχορτο. Η επαναφορά αυτή οφείλεται τόσο στις Σταυροφορίες όσο και στην εκστρατεία του Ναπολέοντα στην Αίγυπτο το 1800 (Kimmens et al., 1977). Το 1928 η κάνναβη απαγορεύεται στο Ηνωμένο Βασίλειο και το 1937 και στις Ηνωμένες Πολιτείες (Musto et al., 1991). Από τότε έχουν γίνει πολλά κινήματα για την αποποινικοποίησή της ανά τον κόσμο (Robson et al., 2001), ενώ σε κάποιες χώρες έχει πραγματοποιηθεί ήδη η νομιμοποίησή της (**Εικόνα 1.1**).

Τέλος, όσον αφορά στον ελλαδικό χώρο, αναφορές για το φυτό γίνονται σε επίσημα ιατρικά συγγράμματα του 19^{ου} αιώνα (Αφεντούλης, 1875) με την καταπραϋντική και υπνωτική ένδειξη φαρμάκου, ενώ η παραϊατρική χρήση του σημειώνει έξαρση στις αρχές του περασμένου αιώνα (Γεωργιάδης, 1932). Σήμερα, η καλλιέργεια, η διακίνηση και η κατοχή της κάνναβης είναι παράνομες, ενώ τα τελευταία χρόνια γίνεται έντονη συζήτηση για τη νομιμοποίησή της για θεραπευτικούς σκοπούς.

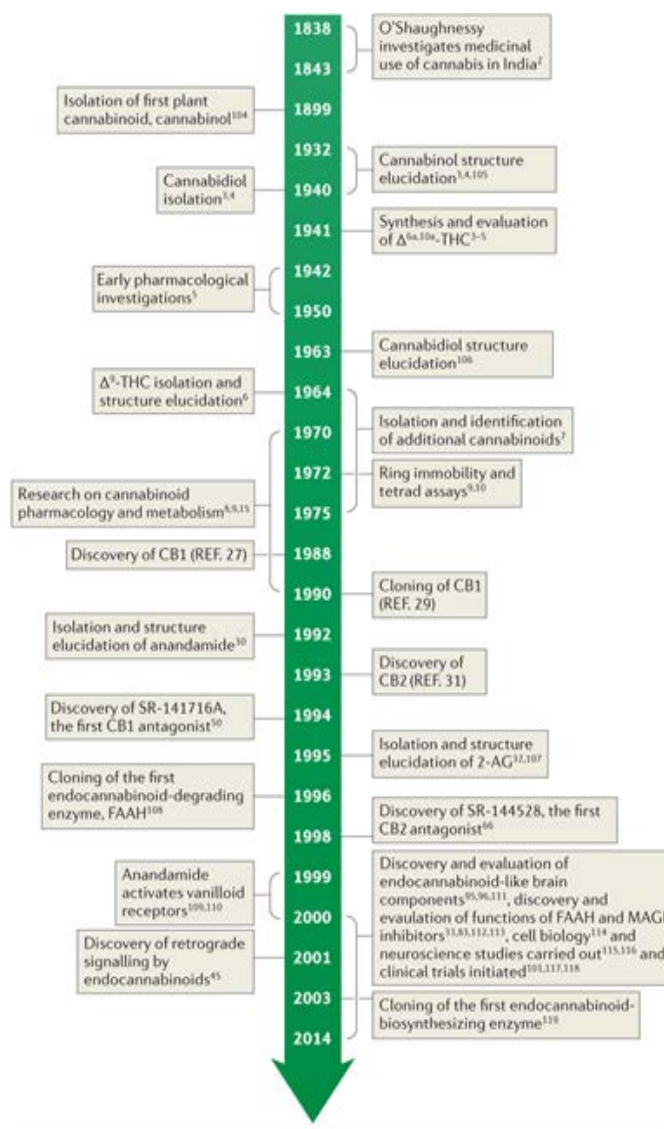


Εικόνα 1.1. Χάρτης απεικόνισης του διεθνούς Νομοθετικού Πλαισίου για τη χρήση κάνναβης.
Υποσημείωση: Η Ελλάδα από το 2016 ανήκει στις χώρες που είναι νόμιμη η χρήση κάνναβης για θεραπευτικούς σκοπούς, άρα στον χάρτη πλέον θα απεικονίζεται με μπλε χρώμα.

1.3 Ενδογενές σύστημα κανναβινοειδών

Τα τελευταία 30 χρόνια έχουν εμπλουτιστεί οι γνώσεις μας όσον αφορά το ενδοκανναβινοειδές σύστημα λόγω πολλών σημαντικών ερευνών (**Εικόνα 1.2**). Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα αποτελεί ένα νευρορρυθμιστικό σύστημα λιπιδίων αποτελούμενο από: **α)** συγκεκριμένους υποδοχείς κανναβινοειδών, **β)** τα ενδογενή προσδέματα (τα ενδογενή κανναβινοειδή ή

ενδοκανναβινοειδή) και γ) τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση και την απενεργοποίησή τους (Salzet and Stefano, 2002). Το ενδογενές κανναβινοειδές σύστημα συμμετέχει σε κομβικές λειτουργίες όπως στην ανταμοιβή, τη ρύθμιση της κίνησης και σε διαδικασίες γνωστικού τύπου, όπως η μνήμη και η μάθηση, καθώς και στη ρύθμιση της ενεργειακής ισορροπίας, τον μεταβολισμό λιπιδίων και γλυκόζης, την αντίληψη του πόνου, τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού μηχανισμού, την αναπαραγωγή κ.α. (Pagotto et al., 2006). Η εκτεταμένη παρουσία του στα διάφορα όργανα και ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού καταδεικνύει το σημαντικό ρόλο του στη ρύθμιση και ομοιοστασία διαφόρων φυσιολογικών λειτουργιών (De Petrocellis, 2004).



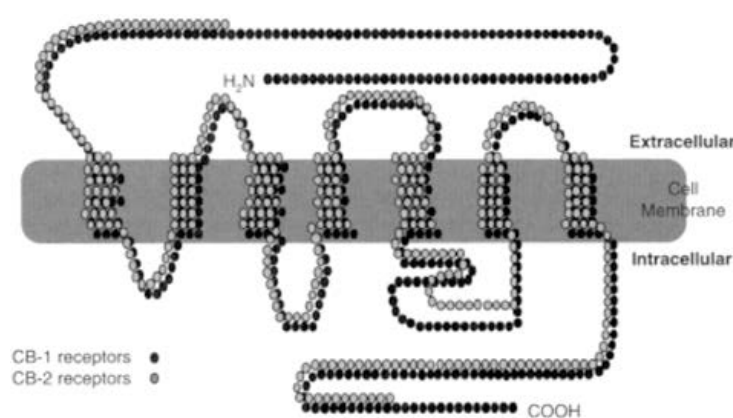
Εικόνα 1.2. Οι σημαντικότερες έρευνες για τα κανναβινοειδή και το ενδογενές σύστημα των κανναβινοειδών (Mechoulam et al., 2015).

1.3.1 Υποδοχείς κανναβινοειδών (Cannabinoid receptors, CBRs)

Λόγω του ιδιαίτερα λιπόφιλου χαρακτήρα των κανναβινοειδών αρχικά υπήρχε η θεωρία πως η δράση τους οφείλεται στη διάχυση μέσω των κυτταρικών μεμβρανών (Hillard et al., 1985). Ωστόσο, περαιτέρω έρευνες, υποδεικνύοντας συγκεκριμένη σχέση δομής-δράσης για τις ενώσεις αυτές (structure-activity relationship), κατέληξαν στη ύπαρξη και μεσολάβηση κάποιου πρωτεϊνικού υποδοχέα (Dewey et al., 1986). Μέχρι σήμερα, έχει γίνει περιγραφή σε ιστούς θηλαστικών τουλάχιστον δύο τέτοιων τύπων υποδοχέων: των **CB1** (Cannabinoid receptor type 1) και **CB2** (Cannabinoid receptor type 2), βάσει της δομής, των ιδιοτήτων δέσμησης προσδεμάτων και των χαρακτηριστικών συστημάτων μεταγωγής σημάτων (Pertwee, 2005), ενώ πιθανολογείται και η ύπαρξη ενός τρίτου «**CB3**» υποδοχέα (Demuth and Molleman, 2006). Παράλληλα, αναλύσεις σε knockout μύες για τους CB υποδοχείς (Elphick and Egertová, 2001) καταδεικνύουν τον υποψήφιο ρόλο των **βανιλλοϊδικών υποδοχέων** (VR1 ή TRPV1) στο ενδοκανναβινοειδές σύστημα, καθώς, γίνεται εντοπισμός κανναβινοειδικής απόκρισης και, πιο συγκεκριμένα, δέσμησης του ανανδαμιδίου (AEA) και της 2-αραχιδονυλογλυκερόλης (2-AG) στους πρωτεϊνικούς αυτούς συνδέτες (Puente et al., 2011).

CB1 υποδοχείς

Οι CB1 υποδοχείς αποτελούνται από μία αλυσίδα 473 αμινοξέων που ανήκουν στην υπεροικογένεια των πρωτεϊνών με επτά διαμεμβρανικές περιοχές (**Εικόνα 1.3**), οι οποίες δεσμεύονται με G πρωτεΐνες (GPCRs) του τύπου $G_{i/o}$ (Elphick and Egertova, 2001).

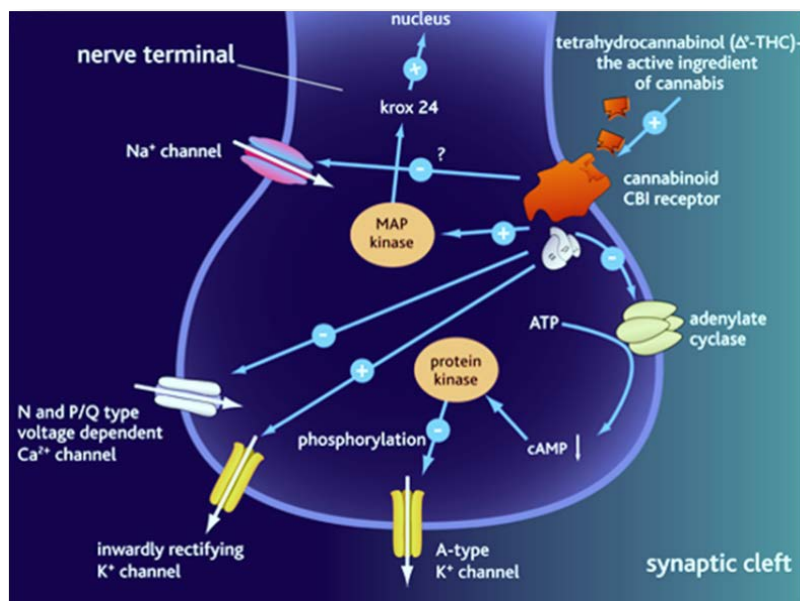


Εικόνα 1.3. Δομή και ομολογία των CB1 και CB2 υποδοχέων.

Στον άνθρωπο η αμινοξική ομολογία προσεγγίζει ποσοστό 44%, ενώ μόνο για τις διαμεμβρανικές περιοχές το ποσοστό αγγίζει το 68% (Cabral and Griffin-Thomas, 2009).

Η σύνδεση του CB1 υποδοχέα με τις G πρωτεΐνες σε **προσυναπτικές** νευρωνικές απολήξεις προκαλεί την αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης και έτσι αποτρέπεται η μετατροπή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) σε κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP), ενώ συγχρόνως διεγείρει την πρωτεϊνική κινάση MAPK (Mitogen-activated protein kinase) (Grotenhermen, 2004) και προκαλεί απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος (**Εικόνα 1.4**). Επίσης, ο CB1 υποδοχέας μέσω της δέσμευσής του με τις G πρωτεΐνες τύπου $G_{i/o}$ συνδέεται με συγκεκριμένους ιοντικούς διαύλους και προκαλεί διέγερση στους διαύλους καλίου τύπου A και D, αλλά αναστολή στους τασεοεξαρτώμενους διαύλους ασβεστίου τύπου N και P/Q (Howlett and Mukhopadhyay, 2000; Pertwee et al., 1997). Η μείωση της σύνθεσης της cAMP λόγω ενεργοποίησης των CB1 υποδοχέων προκαλεί αναστολή της cAMP - εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης (PKA), γεγονός που οδηγεί σε αναστολή της φωσφορυλίωσης του ιοντικού διαύλου καλίου και αυξημένη ροή καλίου προς τα έξω. Αντίστοιχα, η αναστολή των CB1 υποδοχέων, προκαλεί φωσφορυλίωση των διαύλων καλίου και με αυτόν τον τρόπο μειώνεται το ρεύμα καλίου προς τα έξω.

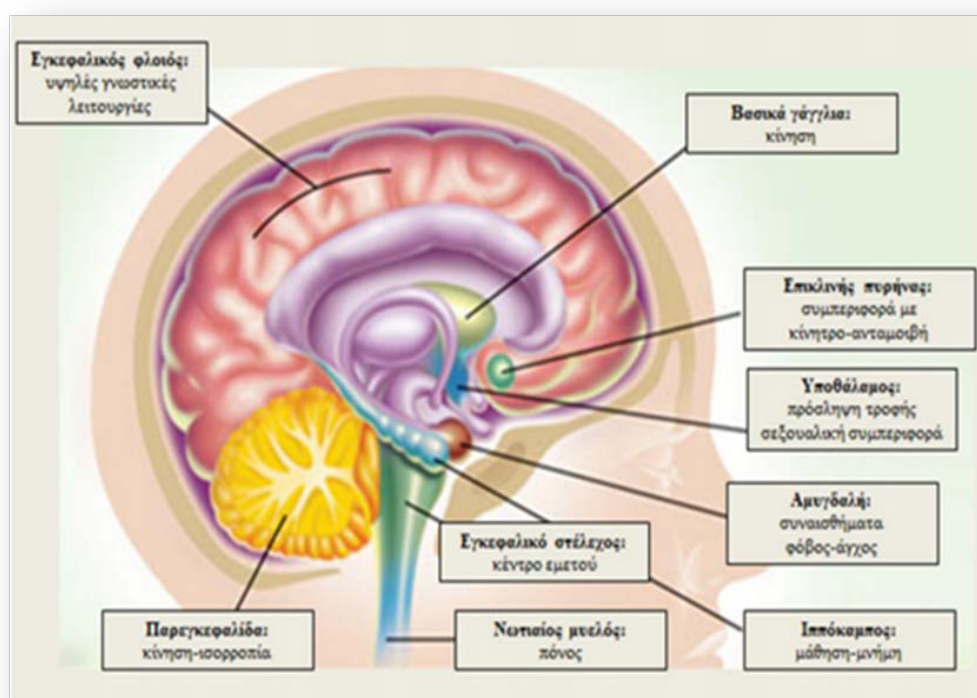
Η αναστολή των προσυναπτικών διαύλων ασβεστίου από τα κανναβινοειδή πιθανώς **μειώνει την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών** από προσυναπτικές απολήξεις που εκφράζουν CB1 υποδοχείς. Τα ενδογενή κανναβινοειδή φαίνεται πως τροποποιούν την προσυναπτική απελευθέρωση ή/και επαναπρόσληψη της νορεπινεφρίνης (NE), του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA), του γλουταμικού οξέος (GLU), της ακετυλοχολίνης (Ach) και της ντοπαμίνης (DA) (Freiman and Szabo, 2005; Ishac et al., 1996; Stefano, et al., 1997).



Εικόνα 1.4. Μονοπάτι ενεργοποίησης μετά από δέσμευση της Δ^9 -THC στον CB1 υποδοχέα σε προσυναπτική νευρωνική απόληξη.

Υπάρχουν επίσης αναφορές που υποδεικνύουν ότι οι CB1 υποδοχείς των κανναβινοειδών βρίσκονται **μετασυναπτικά** σε συγκεκριμένους κυτταρικούς πληθυσμούς, όπως σε πυραμιδικούς νευρώνες του ιπποκάμπου (Marsicano et al., 2003) και σε περιαγγειακά αστροκύτταρα (Rodriguez et al., 2001) στον εγκέφαλο επιμύων.

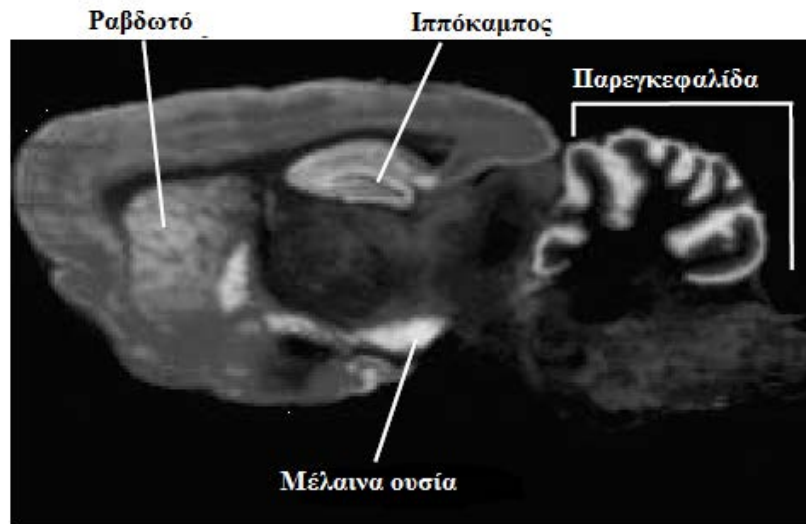
Όσον αφορά την **κατανομή** τους, η αρχική υπόθεση υποστήριζε πως οι CB1 υποδοχείς εντοπίζονται κυρίως στον εγκέφαλο, ενώ οι CB2 στην περιφέρεια και στο ανοσοποιητικό σύστημα (Ameri, 1999) αλλά και στο ΚΝΣ (Van Sickle et al., 2005). Εντούτοις, CB1 υποδοχείς έχουν εντοπιστεί πλέον και σε διάφορους περιφερικούς ιστούς (Howlett, 2002). Ωστόσο η πυκνότητα των CB1 υποδοχέων στον εγκέφαλο είναι υψηλότερη από οποιοδήποτε άλλον τύπο υποδοχέα και είναι παρόντες σε πολλές περιοχές που εμπλέκονται σε βασικές λειτουργίες, γεγονός που, επίσης, σχετίζεται με πολλές φυσιολογικές δράσεις των κανναβινοειδών (**Εικόνα 1.5**).



Εικόνα 1.5. Συσχετισμός συγκεκριμένων εγκεφαλικών περιοχών με βασικές λειτουργίες.

Ειδικότερα, η παρουσία υψηλής πυκνότητας CB1 υποδοχέων στον ιππόκαμπο συσχετίζεται με τις συχνά εμφανιζόμενες αποδιοργανωτικές/διασπαστικές επιδράσεις των κανναβινοειδών στη **μνήμη και τη μάθηση** (Herkenham et al., 1990; Scallet, 1991), ενώ η ύπαρξή τους στα βασικά γάγγλια υποδεικνύει την εμπλοκή των κανναβινοειδών στη ρύθμιση και τον **έλεγχο της κίνησης**.

Επίσης, η ενεργοποίησή τους στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος και γενικότερα σε δομές του μεταχιαμακού συστήματος σχετίζεται με τις ευφοριογόνες δράσεις των κανναβινοειδών και υποδεικνύει την εμπλοκή του κανναβινοειδούς συστήματος στο **κύκλωμα της ανταμοιβής**, την ενδυνάμωση «συμπεριφοράς κινήτρου» και την αναζήτηση και χρήση εξαρτησιογόνων ουσιών (Maldonado et al., 2006) (**Εικόνα 1.6**).



Εικόνα 1.6. Η κατανομή των CB1 υποδοχέων, απεικόνιση μελετών δέσμευσης με τον CB1 αγωνιστή CP-55,940 [προσαρμοσμένο από Purves et al., 2004].

CB2 υποδοχείς

Οι CB2 υποδοχείς κλωνοποιήθηκαν το 1993 (Munro et al., 1993) και όπως και οι CB1 υποδοχείς, είναι πρωτεΐνες με επτά διαμεμβρανικές περιοχές, οι οποίες δεσμεύονται με G πρωτεΐνες τύπου $G_{i/o}$ και αναστέλλουν την αδενυλική κυκλάση (**Εικόνα 1.3**). Σε αντίθεση με τον κυρίαρχο προσυναπτικό εντοπισμό των CB1 υποδοχέων στον εγκέφαλο, η ανοσοδραστικότητα των CB2 υποδοχέων προτείνει κυρίως έναν **μετασυναπτικό εντοπισμό** (Gong et al., 2006). Επίσης, αντίθετα από τους CB1, οι CB2 είναι ευρέως κατανεμημένοι στους περιφερικούς ιστούς, και κυρίως σε αυτούς του ανοσοποιητικού-λεμφικού συστήματος (λευκά αιμοσφαίρια, σπλήνας, αμυγδαλές), συμμετέχοντας σε μηχανισμούς κυτταρικής μετανάστευσης, πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και απόπτωσης (Howlett et al., 2002).

Μέχρι πριν από κάποια χρόνια, θεωρείτο σχεδόν βέβαιο ότι οι CB2 υποδοχείς δεν εκφράζονται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) και άρα δε βρίσκονται σε νευρώνες του εγκεφάλου, ωστόσο μεταγενέστερες μελέτες απέδειξαν την ύπαρξή τους και εντός του εγκεφάλου - σε

αισθητικούς νευρώνες (Sokal et al., 2003), σε κοκκιώδης νευρώνες και νευρώνες Purkinje (Skaper et al., 1996), αλλά και στον ιππόκαμπο, στον εγκεφαλικό φλοιό, στην παρεγκεφαλίδα και στο ραβδωτό σώμα (Gong et al., 2006), σε χαμηλότερα όμως επίπεδα, συγκριτικά με τους CB1 (Onaivi et al., 2006).

1.3.2 Ενδογενή κανναβινοειδή

Τα ενδογενή κανναβινοειδή ή ενδοκανναβινοειδή, οι φυσικοί δηλαδή προσδέτες των κανναβινοειδικών υποδοχέων, περιλαμβάνουν μια οικογένεια εικοσανοειδών (Devane et al., 1992), τα οποία ανιχνεύονται στο ΚΝΣ και στους περιφερικούς ιστούς. Πρόκειται για μόρια λιπιδικής φύσεως, με ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ (αραχιδονικό οξύ) και μία πολική κεφαλή (αιθανολαμίνη ή γλυκερόλη).

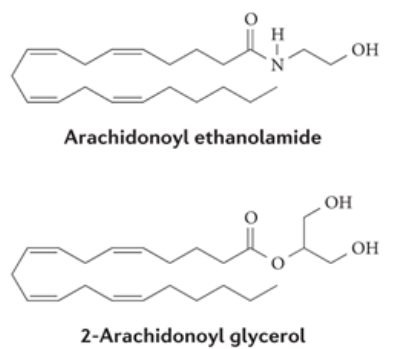
Το πρώτο και καλύτερα μελετημένο ενδοκανναβινοειδές, η N-αραχιδονοϋλαιθανολαμίνη (ΑΕΑ) (Εικόνα 1.7), απομονώθηκε από τον Raphael Mechoulam και ονομάστηκε **ανανδαμίδη** από την σανσκριτική λέξη *ananda*, που σημαίνει «ευδαιμονία» («internal bliss») (Devane et al., 1992). Έχει όλες τις συμπεριφορικές και φαρμακολογικές δράσεις της Δ⁹-THC σε διάφορα πειραματικά πρότυπα ζώων, αν και όταν χορηγείται σε πειραματόζωα, δεν είναι πολύ ισχυρή, λόγω της ταχείας απενεργοποίησής της (McFarland and Barker, 2004). Αποτελεί παράγωγο του αραχιδονικού οξέως και μερικό αγωνιστή των CB1 και CB2 υποδοχέων (Felder et al., 1995). Τα πιο υψηλά επίπεδα ανανδαμίδης βρέθηκαν στις περιοχές του εγκεφάλου με υψηλές πυκνότητες υποδοχέων των κανναβινοειδών, όπως ο ιππόκαμπος, το ραβδωτό σώμα, η παρεγκεφαλίδα και ο φλοιός. Η ανανδαμίδη συντίθεται στους μετασυναπτικούς νευρώνες και δρα ως παλίνδρομος αγγελιοφόρος ρυθμίζοντας την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών από προσυναπτικές απολήξεις οι οποίες εκφράζουν CB1 υποδοχείς (Egertova and Elphick, 2000).

Εκτός από τους υποδοχείς των κανναβινοειδών, η ανανδαμίδη ενεργοποιεί και τους βανιλοϊδικούς υποδοχείς, όπου συμπεριφέρεται ως πλήρης αγωνιστής, αλλά με σχετικά χαμηλή συγγένεια πρόσδεσης (Zygmunt et al., 1999).

Η **2-αραχιδονοϋλγλυκερόλη (2-AG)** (Εικόνα 1.7), επίσης παράγωγο του αραχιδονικού οξέως, ήταν το δεύτερο ενδοκανναβινοειδές που απομονώθηκε από το έντερο σκύλων (Mechoulam et al., 1995) και τον εγκέφαλο επιμύων (Sugiura et al., 1995). Αν και χαρακτηρίζεται από μικρότερη συγγένεια για τους CB1 υποδοχείς συγκριτικά με την ανανδαμίδη, υπάρχει στον

εγκέφαλο σε υψηλότερα επίπεδα. Επομένως, η 2-AG θεωρείται το πρωταρχικό ενδογενές κανναβινοειδές στον εγκέφαλο και είναι ένας πλήρης αγωνιστής των CB1 υποδοχέων.

Επιπλέον, στην κατηγορία των ενδοκανναβινοειδών ανήκουν και οι ουσίες 2-αραχιδονοϋλγλυκερικός αιθέρας ή αλλιώς **νολαδίνη** (Hanus et al., 2001), η **βιροδαμίνη** (Porter et al., 2002), η N-αραχιδονοϋλο-ντοπαμίνη (**NADA**), η N-εικοσιδυοτετραενυλαιθανολαμίνη (**DTEA**) και η N-διομο-γ- λινολενυλαιθανολαμίνη (**HLEA**) (Hanus et al., 1993).



Εικόνα 1.7. Οι δομές της N-αραχιδονοϋλαιθανολαμίνη (AEA) ή ανανδαμίδης και της 2-αραχιδονοϋλγλυκερόλης (2-AG).

1.3.2.1 Προσδέτες των υποδοχέων των κανναβινοειδών

Μετά την ανακάλυψη του πρώτου κανναβινοειδικού υποδοχέα ο ερευνητικός κόσμος υπέθεσε την ύπαρξη ενδογενών προσδετών για αυτόν (Katona and Freund, 2012). Οι συνδέτες αυτοί που παράγονται μέσα στο σώμα ονομάζονται ενδοκανναβινοειδή ή ενδογενή κανναβινοειδή (Axelrod and Felder, 1998). Ένα χαρακτηριστικό αυτών είναι πως διατηρούνται γενικά σε χαμηλά επίπεδα και είναι δραστικά σε μικρή μόνο απόσταση από τη θέση απελευθέρωσής τους (Freund et al., 2003). Αντίθετα, σε ορισμένες περιοχές του ΚΝΣ παρατηρείται πολύ υψηλή συγκέντρωση υποδοχέων (Herkenham et al., 1991b), πιθανόν για να εξασφαλιστεί με αυτόν τον τρόπο η αποτελεσματικότητα των ενδοκανναβινοειδών ενώσεων.

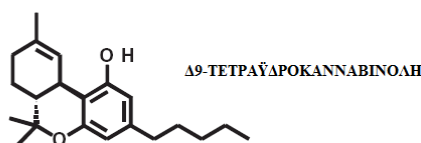
Υπάρχει σαφής ένδειξη ότι το ενδοκανναβινοειδές σύστημα, με τους ειδικούς υποδοχείς του και τα προσδέματά τους, παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση διάφορων φυσιολογικών λειτουργιών. Αυτή τη στιγμή, ένας αυξανόμενος αριθμός νέων αναλόγων που δρουν ως εκλεκτικά προσδέματα των κανναβινοειδών υποδοχέων, είτε με αγωνιστική ή με ανταγωνιστική δράση, είναι υπό μελέτη. Αυτές οι ενώσεις, μαζί και με άλλες προσεγγίσεις που αφορούν τη ρύθμιση της δραστηριότητας του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος, μπορούν να

συμβάλουν στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών ουσιών με λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες από τα κλασικά κανναβινοειδή (Di Marzo et al., 2007).

Ανάλογα με τη δράση τους, οι συνδέτες των υποδοχέων των κανναβινοειδών διαχωρίζονται σε αγωνιστές και ανταγωνιστές (Pertwee, 2006). Αντίστοιχα, οι **φυσικοί προσδέτες των κανναβινοειδών** υποδιαιρούνται σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με τη χημική τους δομή: 1) τα κλασικά κανναβινοειδή, 2) τα μη κλασικά κανναβινοειδή, 3) τις αμινοακτυλοϊνδόλες και 4) τα εικοσανοειδή (Childers and Breivogel, 1998).

Κλασικά κανναβινοειδή

Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τα τρικυκλικά παράγωγα του διβενζοπυρανίου και περιλαμβάνει τα δύο φυσικά συστατικά της κάνναβης, Δ^9 -THC (**Εικόνα 1.8**) και Δ^8 -THC και τα συνθετικά ανάλογά τους, όπως το HU-210. Η πρώτη γενιά κλασικών κανναβινοειδών δεν παρουσίασε εκλεκτικότητα για τους CB1 ή τους CB2 υποδοχείς αλλά αργότερα αναπτύχθηκαν νέα ανάλογα με εκλεκτικότητα όπως οι CB2-εκλεκτικοί αγωνιστές π.χ JWH-133 και HU-308 (Huffman et al., 1996).



Εικόνα 1.8. Η χημική δομή της Δ^9 -THC, αντιπροσωπευτικής της ομάδας των κλασικών κανναβινοειδών.

Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλη

Η τετραϋδροκανναβινόλη (tetrahydrocannabinol, THC), και πιο συγκεκριμένα το βασικό ισομερές της **trans- Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλη** (Δ^9 -THC, $C_{21}H_{30}O_2$), είναι το κύριο ψυχοδραστικό συστατικό του φυτού της κάνναβης. Αναγνωρίστηκε το 1964 και συνετέθη το 1967 από το Raphael Mechoulam (**Εικόνα 1.8**) (Mechoulam and Gaoni, 1967).

Από χημική άποψη, κατατάσσεται στις αρωματικές τερπενοειδείς ενώσεις και έχει τη μορφή ενός παχύρευστου ρητινώδους υγρού. Είναι λιπόφιλη, γεγονός που την καθιστά διαλυτή στην αιθανόλη και άλλους οργανικούς διαλύτες, ενώ παραμένει πρακτικά αδιάλυτη στο νερό (Rashidi et al., 2009).

Ο πρόδρομος της τετραϋδροκανναβινόλης είναι το τετραϋδροκανναβινολικό οξύ (THCA) (Baker et al., 1981; Sirikantaramas et al., 2004). Πιο συγκεκριμένα, εναρκτήριο βήμα για την πορεία βιοσύνθεσης αποτελεί η συμπύκνωση του πυροφωσφορικού γερανυλίου και του ολιβετολικού οξέος, που προέρχεται από ένα πολυκετίδιο με δώδεκα άνθρακες (C12). Στη συνέχεια, το σχηματιζόμενο κανναβιγερολικό οξύ μετά από υδροξυλίωση και αλλυλική αναδιάταξη κυκλοποιείται προς κανναβιδιολικό οξύ, το οποίο υφίσταται μια δεύτερη κυκλοποίηση προς το τετραϋδροκανναβινολικό οξύ. Το τελευταίο αποκαρβοξυλιώνεται για να ολοκληρωθεί η διαδικασία σύνθεσης (Samuelson et al., 1992). Η παραγόμενη τετραϋδροκανναβινόλη δρα ως μερικός αγωνιστής στους CB1 υποδοχείς (**Πίνακας 1.1**), ενώ δεσμεύεται και στους CB2 (Mc Partland et al., 2009). Τα τελευταία χρόνια έχουν σχεδιαστεί και συντεθεί πιο ισχυρά ανάλογα των κανναβινοειδών, τα οποία είναι περισσότερο υδατοδιαλυτά και έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για τους υποδοχείς κανναβινοειδών, συγκριτικά με την Δ⁹-THC.

Πίνακας 1.1 K_i για τη σύνδεση της Δ⁹-THC στους υποδοχείς CB του ανθρώπου και του επίμυ.

K _i Δ ⁹ -THC	CB1	CB2
Ανθρώπος	25.1 ± 5.54	35.2 ± 5.86
Επίμυς	42.6 ± 5.01	13 ± 7.7

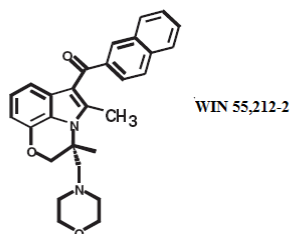
Ο φυσιολογικός ρόλος της είναι πιθανόν η άμυνα του φυτού από φυτοφάγους και παθογόνους οργανισμούς, ενώ φαίνεται να έχει και προστατευτική δράση έναντι της επικίνδυνης ηλιακής ακτινοβολίας, λόγω της μεγάλης οπτικής απορρόφησής της στην περιοχή UV-B του υπεριώδους (210-315 nm) φάσματος (Lydon et al., 1987).

Μη κλασικά κανναβινοειδή

Στη δεύτερη ομάδα εντάσσονται τα δικυκλικά και τρικυκλικά ανάλογα της Δ⁹-THC χωρίς το δακτύλιο πυρανίου (Melvin et al., 1993). Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει τον κύριο αγωνιστή των κανναβινοειδών CP-55,940, ο οποίος παρουσιάζει παρόμοια ικανότητα πρόσδεσης για τους CB1 αλλά και τους CB2 υποδοχείς και χαρακτηρίζεται από υψηλή *in vivo* δραστηριότητα (Devane et al., 1988). Είναι 10 έως 50 φορές ισχυρότερος από την Δ⁹-THC σύμφωνα με μελέτες σε μύες (Compton et al., 1992).

Αμινοαλκυλοϊνδόλες

Η τρίτη ομάδα κανναβομιμητικών ενώσεων περιλαμβάνει μόρια με διαφορετική χημική δομή από τα υπόλοιπα κανναβινοειδή. Κύριος εκπρόσωπος της ομάδας αυτής είναι το WIN 55,212-2, (Εικόνα 1.9), το οποίο επιδεικνύει υψηλή συγγένεια και για τους δύο υποδοχείς των κανναβινοειδών, αν και παρουσιάζει μέτρια εκλεκτικότητα υπέρ των CB2 υποδοχέων (Showalter et al., 1996).



Εικόνα 1.9. Η χημική δομή του WIN 55,212-2, αντιπροσωπευτική της ομάδας των αμινοαλκυλοϊνδολών.

Εικοσανοειδή

Οι κύριοι εκπρόσωποι της τέταρτης ομάδας των κανναβινοειδών αποτελούν παράγωγα του αραχιδονικού οξέος. Ως εικοσανοειδή αναφέρονται τα ενδογενή κανναβινοειδή ανανδαμίδη, βιροδαμίνη, 2-AG και νολαδίνη και πολλά συνθετικά ανάλογα της ανανδαμίδης, όπως η μεθυλοανανδαμίδη (AM356), η αραχιδονυλο-χλωροαιθυλαμίδη (ACEA), η αραχιδονυλοκυκλοπροπυλαμίδη (ACPA), το O-689 και το O-1812 (Howlett et al., 2002; Porter et al., 2002).

Οι αγωνιστές των υποδοχέων των κανναβινοειδών, όπως το WIN 55,212-2 και το CP-55,940 διαθέτουν ένα χαρακτηριστικό συνδυασμό από τέσσερις συμπεριφορικές αποκρίσεις, που περιλαμβάνει καταληψία, αναλγησία, υποκινητικότητα και υποθερμία (Pertwee and Ross, 1991), δημιουργώντας ένα συγκεκριμένο προφίλ, όπως ήδη αναφέρθηκε και για τα ενδοκανναβινοειδή. Γενικά, αυτή η τετράδα συμπεριφορών ταυτίζεται με κανναβομιμητική δραστηριότητα και αντιστρέφεται με τη χορήγηση ενός εκλεκτικού ανταγωνιστή των CB1 υποδοχέων, της ριμοναμπάντης (SR141716A), υποδεικνύοντας την εμπλοκή των CB1 υποδοχέων στην έκφραση αυτών των συμπεριφορών (Rinaldi-Carmona et al., 1994).

1.3.2.2 Ανταγωνιστές

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν ουσίες που με την πρόσδεσή τους παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση των υποδοχέων των κανναβινοειδών (Barth and Rinaldi-Carmona, 1999) και είναι γνωστές ως ανταγωνιστές των υποδοχέων των κανναβινοειδών, περιλαμβάνοντας τους **ανταγωνιστές**, τους **αντίστροφους αγωνιστές** - που όχι μόνο αναστέλλουν τη δράση των κανναβινοειδών αλλά προκαλούν τις αντίθετες εκδηλώσεις από αυτές των αγωνιστών - καθώς και τα προσφάτως χρησιμοποιούμενα **αντισώματα** των υποδοχέων CB1 (Barchukov et al., 2015).

Ο πρώτος ανταγωνιστής που ταυτοποιήθηκε για τους υποδοχείς των κανναβινοειδών (Rinaldi-Carmona et al., 1994) είναι η ριμοναμπάτη (SR141716A), η οποία συνδέεται ισχυρά στους CB1 υποδοχείς με υψηλή εκλεκτικότητα και ανταγωνίζεται τη δραστηριότητα των κανναβινοειδικών αγωνιστών, εμφανίζοντας παράλληλα και συμπεριφορά αντίστροφου αγωνιστή (Lange et al., 2005). Παρόμοια χαρακτηριστικά παρουσιάζουν και οι AM251 και SR147778 (Vemuri, et al., 2008; Howlett et al., 2002), ενώ ένα φυσικό κανναβινοειδές το οποίο δρα ανταγωνιστικά στους CB υποδοχείς είναι η κανναβιδιόλη. Οι ανταγωνιστές των CB1 υποδοχέων μπορεί να αποτελέσουν νέα φάρμακα για την αντιμετώπιση της εξάρτησης και του εθισμού (Le Foll and Goldberg, 2005). Ειδικότερα, έχειδειχθεί ότι ο ανταγωνιστής των CB1 υποδοχέων AM251 ανέστειλε την ενδοφλέβια αυτοχορήγηση της μεθαμφεταμίνης σε επίμυες (Vinklerova et al., 2002). Επίσης, προχορήγηση του συνδυασμού μεθαμφεταμίνης και AM251 κατέστειλε στους επίμυες την ανάπτυξη της ευαισθητοποίησης σε ψυχοδιεγερτικά (Landa et al., 2006).

1.3.3 Ένζυμα υπεύθυνα για τη σύνθεση, απελευθέρωση και απενεργοποίηση των ενδογενών κανναβινοειδών

Σε αντίθεση με τους κλασσικούς νευροδιαβιβαστές που βρίσκονται αποθηκευμένοι σε ενδοκυττάρια διαμερίσματα, είναι γνωστό πως τα ενδογενή κανναβινοειδή συντίθενται και απελευθερώνονται **«κατά παραγγελία»** [“on demand”] (Piomelli, 2003). Στη συνέχεια, απενεργοποιούνται ταχύτατα, ενώ έχουν την ικανότητα διάχυσης μέσω της κυτταρικής μεμβράνης λόγω του λιπόφιλου χαρακτήρα τους.

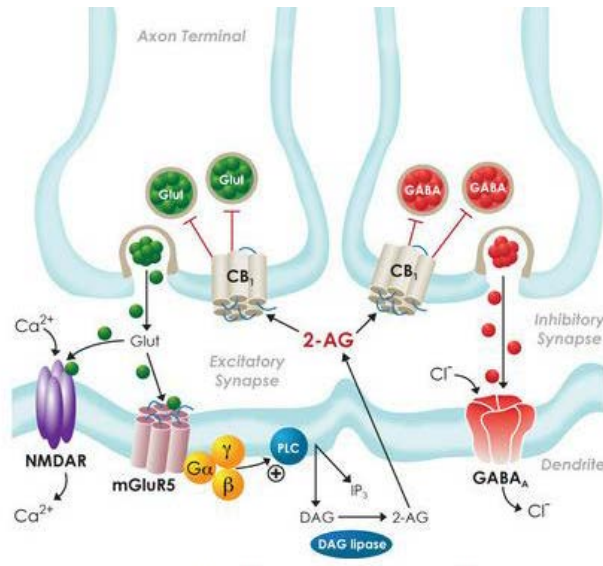
Όσον αφορά τη βιοσύνθεσή τους, οι λεπτομέρειες της διεργασίας δεν είναι πλήρως κατανοητές, ωστόσο η AEA και η 2-AG συνθέτονται κατ' επίκληση από πρόδρομες φωσφολιπιδικές ουσίες της κυτταρικής μεμβράνης με τη βοήθεια κατάλληλων ενζύμων (Okamoto et al., 2007).

Η εκπόλωση της μετασυναπτικής κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων ενδοκυττάρου ασβεστίου (Ca^{2+}) και αυτή με τη σειρά της, στην ενεργοποίηση των βιοσυνθετικών ενζύμων των ενδοκανναβινοειδών (Piomelli, 2003). Αμέσως μετά τη σύνθεσή τους, τα ενδογενή κανναβινοειδή **απελευθερώνονται** στη συναπτική σχισμή, όπου αλληλεπιδρούν με τους CB υποδοχείς (Hillard and Jarrhian, 2003). Ο χρόνος ημίσειας ζωής των ενδοκανναβινοειδών διαρκεί από μερικά δευτερόλεπτα έως λίγα λεπτά (Solinas et al., 2008). Μετά τη δράση τους ακολουθεί η **επαναπρόσληψή** τους από μεμβρανικούς μεταφορείς και η γρήγορη υδρόλυση τους σε ανενεργά παράγωγα. Η **αποδόμηση** τόσο της AEA όσο και της 2-AG πραγματοποιείται από υδρολυτικά ένζυμα. Στην περίπτωση της AEA, η υδρολάση του αμιδίου των λιπαρών οξέων (Fatty Acid Amide Hydrolase, **FAAH**) με υδρόλυση παράγει αραχιδονικό οξύ και αιθανολαμίνη και, αντίστοιχα, η λιπάση της μονοακυλογλυκερόλης (Monoacylglycerol Lipase, **MAGL**) αποσυνθέτει τη 2-AG σε αραχιδονικό οξύ και γλυκερόλη (Bisogno et al., 2002; Cravatt and Lichtman, 2003).

1.4 Κυτταρική μεταγωγή σήματος

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι το ενδογενές σύστημα κανναβινοειδών συμμετέχει στην ηλεκτροφυσιολογική διεργασία της **παλίνδρομης μετάδοσης σημάτων**, μιας μορφής μοριακής επικοινωνίας που παίζει σημαντικό ρόλο στην αναστολή της απελευθέρωσης άλλων νευροδιαβιβαστών από τις προσυναπτικές απολήξεις των νευρώνων (Howlett et al., 2002).

Κατά την παλίνδρομη μεταγωγή σήματος, η διέγερση του μετασυναπτικού κυττάρου που συνθέτει τα ενδοκανναβινοειδή προκαλεί το άνοιγμα τασεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} λόγω εκπόλωσης (Wilson and Nicoll, 2002) και, σε συνδυασμό με τη διέγερση των μετασυναπτικών μεταβοτροπικών υποδοχέων του γλουταμικού οξέος (mGluR), ενεργοποιούνται ένζυμα που συνθέτουν τα κανναβινοειδή από λιπιδικής φύσης πρόδρομα μόρια (Piomelli, 2003). Αυτά τα παραγόμενα ενδογενή κανναβινοειδή απομακρύνονται από το μετασυναπτικό κύτταρο, διαχέονται από την μετασυναπτική μεμβράνη και δεσμεύονται στους CB υποδοχείς στις προσυναπτικές απολήξεις των νευρώνων. Η ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών ως δευτέρων αγγελιοφόρων μορίων αναστέλλει την προσυναπτική εισροή Ca^{2+} με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση της απελευθέρωσης ανασταλτικών (GABA) ή διεγερτικών (γλουταμικό) νευροδιαβιβαστών από το προσυναπτικό κύτταρο στη συναπτική σχισμή (**Εικόνα 1.10**) (Alger, 2002).



Εικόνα 1.10. Παλίνδρομη μεταγωγή σημάτων από το ενδογενές σύστημα κανναβινοειδών (Wilson and Nicoll, 2002).

Το φαινόμενο με το οποίο τα κανναβινοειδή προκαλούν τέτοιες λειτουργικές αλλαγές στο ΚΝΣ ονομάζεται **καταστολή της αναστολής που επάγεται από εκπόλωση** (Depolarization induced Suppression of Inhibition, DSI) και παρατηρήθηκε το 1992 στα κύτταρα Purkinje της παρεγκεφαλίδας (Vincent et al., 1992), ενώ στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε και στον ιππόκαμπο, καταστέλλοντας την προκαλούμενη από GABA αναστολή πυραμιδικών κυττάρων (Pitler and Alger, 1992; Alger, 2002). Επιπλέον, μελέτες έδειξαν πως η DSI μπορεί να ανασταλεί μετά από χορήγηση των CB1 ανταγωνιστών ριμοναμπάντη και AM251 (Wilson and Nicoll, 2001), υποδεικνύοντας την απελευθέρωση κανναβινοειδών και τη δράση προσυναπτικών CB1 υποδοχέων στη διαδικασία (Kano et al., 2002). Παράλληλα, στοιχεία φανερώνουν πως η μείωση της αναστολής σχετίζεται με συγκεκριμένο υποπληθυσμό GABAεργικών νευρώνων του ιππόκαμπου (Wilson and Nicoll, 2001). Ακόμα, στην περίπτωση μυών που δεν εκφράζεται ο CB1 υποδοχέας, η διεργασία αυτή δεν πραγματοποιείται (Wilson and Nicoll, 2001).

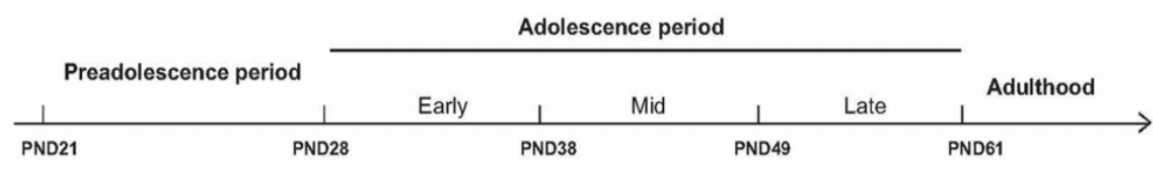
Αντίστοιχα, σε διεγερτικές προσυναπτικές ίνες η απελευθέρωση των ενδοκανναβινοειδών μπορεί να μειώσει την έκκριση διεγερτικών νευροδιαβιβαστών, όπως του γλουταμινικού (Glu), στην πορεία της **καταστολής της διέγερσης που επάγεται από εκπόλωση** (Depolarization induced Suppression of Excitation, DSE). Οι ιδιότητές της ομοιάζουν με εκείνες της DSI (Kano et al., 2002) και αιτία πρόκλησής της φαίνεται να είναι η μειωμένη εισροή Ca^{2+} σε προσυναπτικές απολήξεις.

1.5 Νευροβιολογία της ανάπτυξης

Η ανάπτυξη του εγκεφάλου είναι μια δυναμική διεργασία που εξελίσσεται καθ' όλη την παιδική ηλικία και την εφηβεία, με αλλαγές στην οργάνωση και τη λειτουργία του εγκεφάλου που συνεχίζονται μέχρι και την ενήλικη ζωή. Η χρονική περίοδος της εφηβείας, αποτελεί μια κρίσιμη περίοδο στην ανάπτυξη του ανθρώπου που χαρακτηρίζεται από σημαντικές αλλαγές σε μορφολογικό, κυτταρικό, αλλά και σε ψυχολογικό και κοινωνικό επίπεδο (Spear, 2000). Οι αλλαγές στη συμπεριφορά κατά την εφηβεία προϋποθέτουν την «επαναδιαμόρφωση» διαφόρων περιοχών του εγκεφάλου και συνοδεύονται από αρκετές νευροβιολογικές μεταβολές του ΚΝΣ (Cannon et al., 2005).

Ωστόσο, δεν είναι εύκολο να προσδιοριστούν με ακρίβεια τα χρονικά περιθώρια του αναπτυξιακού αυτού σταδίου με όρους που μπορούν να γενικευθούν προς όλα τα είδη. Η εφηβεία (adolescence) **στον άνθρωπο** μπορεί ασαφώς να προσδιοριστεί από μια σύνθεση σωματικών, ψυχολογικών, κοινωνικών και γνωστικών παραμέτρων και αντιπροσωπεύει τη μεταβατική περίοδο κατά την οποία αποκτώνται ενήλικα συμπεριφορικά πρότυπα και ικανότητες. Η έναρξη και η λήξη της περιόδου είναι δύσκολο να χαρακτηριστούν (Casey et al., 2008; Spear, 2000), και ενώ κάποιες κλινικές έρευνες χαρακτηρίζουν ως εφηβεία την περίοδο περίπου από 9 έως 18 ετών (Buchanan et al., 1992), άλλοι συμπεριλαμβάνουν ολόκληρη τη δεύτερη δεκαετία της ζωής στην περίοδο «εφηβεία» (Petersen et al., 1996).

Στους επίμυες, η αντίστοιχη περίοδος καλύπτει όλη τη διάρκεια μετά την παιδική ηλικία μέχρι την ενηλικίωση. Παλαιότερες μελέτες καταδεικνύουν το χρονικό «παράθυρο» των 28-42 μεταγεννητικών ημερών ως μια πρότυπη εφηβική περίοδο, καθώς επίμυες σχεδόν όλων των γενών παρουσιάζουν τα τυπικά χαρακτηριστικά της περιόδου αυτής, χωρίς ωστόσο να αποκλείει ηλικιακά μεγαλύτερα ή μικρότερα ζώα από το να θεωρηθούν ως έφηβα (Spear, 2000). Συγκεκριμένα, οι αρσενικοί επίμυες «ωριμάζουν» συνήθως πιο αργά από ότι οι θηλυκοί, με την εφηβεία ενός αρσενικού επίμου να μπορεί να αρχίσει τόσο νωρίς όσο η 28η μεταγεννητική ημέρα και να διαρκέσει τόσο αργά όσο περίπου η 55η μεταγεννητική ημέρα (**Εικόνα 1.11**) (Ojeda et al., 1986).



Εικόνα 1.11. Σχηματική επισκόπηση των διαφόρων σταδίων της εφηβικής περιόδου στους επίμυες (Renard et al., 2014).

1.6 Μορφολογικές, ανατομικές και λειτουργικές αλλαγές

Μόλις την τελευταία δεκαετία, κλινικές και προκλινικές έρευνες σχετικά με τη νευρωνική ανάπτυξη εστιάζουν στην περίοδο της εφηβείας και έχουν αποκαλύψει έναν εκπληκτικό βαθμό νευρωνικής πλαστικότητας στην αναπτυξιακή αυτή φάση, με σημαντικές ομοιότητες σε περιοχές του εγκεφάλου ανάμεσα σε διαφορετικά είδη οργανισμών (Spear, 2007).

Η κυριότερη ίσως των νευρωνικών μεταβολών που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της εφηβείας είναι η εκτενής **μείωση συναπτικών συνδέσεων**. Η διαδικασία αυτής της κατάργησης συνάψεων, η οποία αναφέρεται ως “synaptic pruning”, παρατηρείται κυρίως στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού (prefrontal cortex, PFC) και σε άλλες νεοφλοιώδεις περιοχές (Rakic et al., 1994). Μια ακόμη χαρακτηριστική αλλαγή από την έναρξη της εφηβείας μέχρι την ενήλικη περίοδο είναι η προοδευτική **μυελίνωση** των αξόνων που οδηγεί σε σημαντική **αύξηση της λευκής ουσίας του φλοιού** και βελτιστοποιεί την αγωγή και τη μετάδοση της νευρωνικής πληροφορίας, ειδικά στις μεγάλες αποστάσεις που διασχίζουν τα νεύρα (Sowell et al., 2003). Παρόλο που είναι λιγότερο εμφανής από την αύξηση της λευκής ουσίας, **μειώσεις στον όγκο της φαιάς ουσίας** έχουν παρατηρηθεί σε περιοχές όπως ο μετωπιαίος φλοιός (Giedd et al., 1999), αν και σε άλλες περιοχές π.χ. αμυγδαλή και ιππόκαμπος (Giedd et al., 1997) έχει καταγραφεί αύξηση του όγκου.

Ανάμεσα στις περιοχές που παρουσιάζουν σημαντικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της εφηβείας είναι, όπως προαναφέρθηκε, ο **προμετωπιαίος φλοιός (PFC)**, με την περιοχή αυτή να υφίσταται σημαντική μείωση συνάψεων (pruning) (Bourgeois et al., 1994). Αναπτυξιακές μελέτες με χρήση fMRI έχουν δείξει επίσης μεταβολές στην ενεργοποίηση του προμετωπιαίου φλοιού κατά την πραγματοποίηση γνωστικών δοκιμασιών που εξετάζουν ποικίλους δείκτες εκτελεστικών λειτουργιών (πχ. διατήρηση προσοχής, μνήμη εργασίας κλπ.) (Casey et al., 2008; Schweinsburg et al., 2008, 2010; Padula et al., 2007; Paus, 2005; Luna et al., 2001).

Παρότι η κύρια έμφαση δίνεται στις μεταβολές στον προμετωπιαίο φλοιό και σε άλλες νεοφλοιώδεις περιοχές, υπάρχουν και υποφλοιώδεις περιοχές που υφίστανται μετασχηματισμούς κατά την εφηβεία - ιδιαίτερα οι περιοχές που εμπλέκονται σε κυκλώματα με τον προμετωπιαίο φλοιό. Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί πως περιοχές και κυκλώματα που σχετίζονται με το **σύστημα ανταμοιβής** του εγκεφάλου υφίστανται αρκετές αλλαγές κατά την περίοδο αυτή (Cunningham, et al., 2008). Το πώς ακριβώς αυτές οι αλλαγές μπορεί να επηρεάζουν την αντίστοιχη συμπεριφορά κατά την εφηβεία και αργότερα κατά την ενηλικίωση παραμένει ασαφές και υπάρχουν πολλοί ακόμη παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη, οι οποίοι, επίσης, μεταβάλλονται κατά την περίοδο της εφηβείας.

Ένας βασικός εξ' αυτών είναι το σύστημα των ενδοκανναβινοειδών. Όλο και περισσότερα στοιχεία υποστηρίζουν πως το σύστημα αυτό συνεχίζει να υφίσταται λειτουργική ανάπτυξη και ωρίμανση κατά το στάδιο αυτό, και πως ίσως, επίσης, παίζει ρόλο στη ρύθμιση της νευρογένεσης κατά την ενήλικη ζωή (Galve-Roperh et al., 2007; Malon et al., 2010). Οι CB1 υποδοχείς φτάνουν αναπτυξιακά την υψηλότερη συγκέντρωσή τους στο ραβδωτό σώμα και στις μεταιχμιακές περιοχές κατά την εφηβεία (μεταγεννητικές ημέρες 30–40 σε επίμυες) πριν να μειωθούν σημαντικά κατά την ενήλικη φάση (Rodriguez de Fonseca et al., 1993).

Η αποτελεσματικότητα, επίσης, της σύνδεσης των CB1 υποδοχέων με τις G-πρωτεΐνες κατά την εφηβεία δε φαίνεται να μεταβάλλεται ιδιαίτερα, συνεπώς οι υποδοχείς φαίνεται πως είναι περισσότερο αποδοτικοί κατά την περίοδο αυτή (Rubino et al., 2014). Αναπτυξιακές μεταβολές παρατηρούνται, επίσης, και στα επίπεδα των κύριων ενδοκανναβινοειδών, με αναπτυξιακή αύξηση της ανανδαμίδης στον PFC, αλλά μείωση της 2-AG στην ίδια περιοχή (Ellgren et al., 2008).

1.7 Επίδραση της χρήσης κάνναβης κατά την ανάπτυξη στην ενηλικίωση

1.7.1 Κλινικές παρατηρήσεις χρήσης κάνναβης κατά την εφηβεία

Η κάνναβη είναι το πιο ευρέως διαδεδομένο παράνομο ναρκωτικό στους εφήβους, τόσο στην Ευρώπη όσο και στην Αμερική (Lisdahl et al., 2014; Hibell et al., 2004). Καθώς τα εξωγενή κανναβινοειδή επηρεάζουν τη λειτουργία του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος, έχει προταθεί πως η έκθεση στην κάνναβη κατά την περίοδο της εφηβείας, πιθανώς διαταράσσει το σύστημα σε ένα κρίσιμο αναπτυξιακό στάδιο και οδηγεί σε μεταβολές που αυξάνουν τον κίνδυνο

εμφάνισης ψυχοπαθολογίας (Bossong and Niesink, 2010; Caballero and Tseng, 2012; Malone et al., 2010).

Για τον προσδιορισμό της μακροχρόνιας επίδρασης της χρήσης της στην ανάπτυξη έχει πραγματοποιηθεί πλήθος **κλινικών προσεγγίσεων** που περιλαμβάνουν τόσο μελέτες **συμπεριφοράς** όσο και **νευροαπεικονιστικές** παρατηρήσεις.

Ειδικότερα, έφηβοι και ενήλικες που κατανάλωναν μαριχουάνα κατά την εφηβεία φαίνεται να παρουσιάζουν ελλείμματα σ' ένα μεγάλο εύρος εκτελεστικών και γνωστικών λειτουργιών (Crean et al., 2011; Fried et al., 2005; Solowij et al., 2002). Επίσης, καταγράφονται διαταραχές στη λεκτική μνήμη και την ταχύτητα αντίληψης (Higuera-Matas et al., 2015), συνοδευόμενες από μειωμένες ακαδημαϊκές επιδόσεις (Mokrysz et al., 2014), μειωμένο δείκτη νοημοσύνης IQ (Meier et al., 2012), έλλειψη κινήτρου και εμφάνιση απάθειας (Lynskey and Hall, 2000), συγκριτικά με τους μη χρήστες. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά δε μπορούν να είναι πλήρως αντικειμενικά, αφενός, γιατί εμπλέκονται και κοινωνικοοικονομικοί παράγοντες (Rogeberg, 2013) κι αφετέρου, διότι ο δείκτης IQ παρουσιάζει περιορισμένη εγκυρότητα ως μέτρο γνωστικών δεξιοτήτων (Duckworth et al., 2011). Η αποδιοργάνωση του ενδοκανναβιοειδούς συστήματος ίσως να εμπλέκεται και στην εμφάνιση των διαταραχών στη μνήμη και στη μάθηση που παρατηρούνται μετά από έκθεση στην κάνναβη κατά την εφηβεία, καθώς υπάρχουν πολλά στοιχεία για την εμπλοκή του συστήματος των κανναβιοειδών στις διαδικασίες αυτές (Sullivan, 2000).

Παράλληλα, πολλές επιδημιολογικές μελέτες συσχετίζουν τη χρήση κάνναβης κατά την εφηβεία με την εμφάνιση αγχώδους διαταραχής ή διαταραχής της διάθεσης (Degenhardt et al., 2003). Ξεχωριστή προσοχή δίνεται στην περίπτωση της κατάθλιψης, που παρατηρείται αύξηση του κινδύνου εμφάνισης της διαταραχής ανάλογα με τη συχνότητα χρήσης μαριχουάνας και αντιστρόφως ανάλογα με την ηλικία (Brook et al., 2002; Ferguson et al., 2002; Stefanis et al., 2004). Ωστόσο, οι παρατηρήσεις αυτές υπόκεινται σε προβληματισμό καθώς, για διαταραχές τέτοιου τύπου πρέπει να ληφθούν υπόψη και κοινωνικές μεταβλητές, όπως το μορφωτικό επίπεδο, η οικογενειακή κατάσταση, ή η ταυτόχρονη χρήση άλλων ναρκωτικών (Degenhardt et al., 2003a; Green and Ritter, 2000; Rowe et al., 1995).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης, επιστημονικές αναλύσεις που συσχετίζουν τη χρήση κάνναβης κατά την εφηβική περίοδο με την εμφάνιση ψυχωτικού τύπου συμπτωματολογίας. Μια από τις πρώτες έρευνες που προσπάθησαν να συνδέσουν την έκθεση

στην κάνναβη με τη σχιζοφρένεια ήταν μια μακρόχρονη μελέτη 15 ετών σε ένα δείγμα 45.570 Σουηδών στρατιωτών. Στα αποτελέσματά της φάνηκε μια δοσολογική σχέση μεταξύ της χρήσης κάνναβης στην ηλικία των 18 ετών και της ψυχιατρικής νοσηλείας για σχιζοφρένεια στα επακόλουθα 15 χρόνια. Πιο συγκεκριμένα, η πιθανότητα εμφάνισης σχιζοφρένειας αυξανόταν όσο αυξανόταν ο αριθμός κατανάλωσης κάνναβης. Μάλιστα το ρίσκο για εμφάνιση σχιζοφρένειας αυξήθηκε κατά 6 φορές για τα επόμενα 15 χρόνια ζωής ατόμων με εφηβική έντονη χρήση (περισσότερες από 50 χρήσεις έως τη στιγμή έναρξης της μελέτης) σε σχέση με μη χρήστες (Andréasson et al., 1987). Ένας αριθμός άλλων παρόμοιων χρόνιων επιδημιολογικών μελετών, συμπεριλαμβανομένων των Dunedin cohort (Manrique-Garcia et al., 2012), Netherlands Mental Health Survey and Incidence Study (NEMESIS) (Arseault et al., 2002) και German Early Developmental Stages of Psychopathology (EDSP), έχουν δημοσιεύσει παρόμοια ευρήματα. Ωστόσο μέχρι και σήμερα, η συσχέτιση μεταξύ της χρήσης κάνναβης κατά την εφηβεία και της ψυχωτικής συμπτωματολογίας δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Σε αυτό το σημείο, είναι σημαντικό να τονιστεί πως η μαριχουάνα έχει πιθανά αρνητικές επιδράσεις σε άτομα με γενετική προδιάθεση σε ψυχικές ασθένειες, χωρίς να είναι, όμως, δεδομένο πως αποτελεί και τη βασική αιτία εκδήλωσης διαταραχών του κεντρικού νευρικού συστήματος (Stefanis et al., 2014, 2013; Veen et al., 2004; Semple et al., 2005).

Παρόλο που έως σήμερα δεν έχει πλήρως εξακριβωθεί ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου η μακροχρόνια χρήση της κάνναβης στην εφηβική ηλικία επιδρά αρνητικά σε γνωστικού τύπου λειτουργίες, είναι σαφώς επιβεβαιωμένες οι δομικές και μορφολογικές αλλαγές που παρατηρούνται στον εγκέφαλο του χρήστη. Με τη διεξαγωγή πιο εξειδικευμένων απεικονιστικών τεχνικών, όπως της λειτουργικής MRI (functional MRI, fMRI) εντοπίζονται ανομοιότητες στον όγκο των περιοχών του ιπόκαμπου, της αμυγδαλής, της παρεγκεφαλίδας, του ραβδωτού σώματος, της νησίδας του εγκεφάλου, του κροταφικού λοβού και του προμετωπιαίου φλοιού, συγκριτικά με μη χρήστες (Ashtari et al., 2011; Battistella et al., 2014; Churchwell et al., 2012; Gilman et al., 2014; Gruber et al., 2012; Medina et al., 2010; McQueeney et al., 2011). Μέσω της απεικονιστικής μεθόδου MRI σε χρήστες κάνναβης οι Filbey et al. (2014) έδειξαν πως έφηβοι που έκαναν χρήση κάνναβης εμφανίζουν μειωμένη ποσότητα φαιάς ουσίας στον μεσοκοιλιακό προμετωπιαίο φλοιό και αυξημένη νευρωνική δραστηριότητα σε περιοχές όπως τα βασικά γάγγλια και η μετακεντρική έλικα του δεξιού ημισφαιρίου, καθώς και στο προσφηνοειδές λοβίο (precuneus) και στον άνω βρεγματικό λοβό και των δύο ημισφαιρίων, υποδεικνύοντας την ύπαρξη πιθανών αντισταθμιστικών μηχανισμών στη λειτουργία των νευρωνικών κυκλωμάτων (Higuera-Matas et al., 2015). Επιπλέον, με χρήση

απεικονιστικών μελετών σε πραγματικό χρόνο (real time neuroimaging), φαίνεται ότι οι χρόνιοι χρήστες κατά την ανάπτυξη υιοθετούν διαφορετικές στρατηγικές και εμπλέκουν εναλλακτικά νευρωνικά κυκλώματα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου όταν χρειάζεται να αποδώσουν σε συγκεκριμένες γνωστικές διεργασίες (Padula et al., 2007).

1.7.2 Προκλινικές μελέτες χορήγησης κανναβινοειδών κατά την ανάπτυξη

Αν και οι κλινικές παρατηρήσεις σε έφηβους προσφέρουν σχετικά αξιόπιστα συμπεράσματα για τις μακροχρόνιες επιπτώσεις της χρήσης κάνναβης σε ανατομικό, μορφολογικό και λειτουργικό επίπεδο, η διεξαγωγή τέτοιων ερευνών είναι περιορισμένη, λόγω των ηθικών φραγμών και των μεθοδολογικών δυσκολιών που παρουσιάζουν (Rubino and Parolaro, 2014). Επομένως, τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα που προέρχονται από **προκλινικές μελέτες**, αν και δε μπορούν να «προσομοιάσουν» απόλυτα την πολυπλοκότητα των διαταραχών του ΚΝΣ στους ανθρώπους, παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για το νευροβιολογικό υπόστρωμά τους, ενώ παρουσιάζουν και αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με ανασκοπικές κλινικές παρατηρήσεις. Πρώτον, τα πειραματικώς σχεδιασμένα πρωτόκολλα έκθεσης σε κανναβινοειδή μπορούν να ελέγχουν με ακρίβεια την ηλικία και την ποσότητα της έκθεσης σε συγκεκριμένα σχετικά φυτοκανναβινοειδή, όπως η Δ⁹-THC. Δεύτερον, μπορούν να επιλεγθούν συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα μετά την έκθεση για να μελετηθούν συγκεκριμένοι συμπεριφορικοί και νευροβιολογικοί δείκτες που αντανακλούν συμπτωματολογία ΚΝΣ. Τρίτον, μόλις διαπιστωθούν τα συγκεκριμένα αποτελέσματα της έκθεσης σε κανναβινοειδή πάνω σε αυτά τα νευροβιολογικά και συμπεριφορικά φαινόμενα, μπορεί μηχανιστικά να ερευνηθεί το πώς πειραματικοί χειρισμοί σε αυτές τις νευροπροσαρμογές μπορούν να αποτρέψουν και/ή να αντιστρέψουν αυτά τα δυσμενή αποτελέσματα (Renard et al., 2016). Οι προκλινικές αυτές μελέτες εστιάζουν στη διαχείριση εργαστηριακών πειραματόζωων, όπως ανώτερων θηλαστικών (Wiley et al., 1993b; McMahon, 2006), επιμύων (Cadoni et al., 2013; Quinn et al., 2008) και μυών (O'Tuathaigh et al., 2010). Στα τρωκτικά, για τη μελέτη των μακροπρόθεσμων επιπτώσεων της εφηβικής έκθεσης στην κάνναβη, συνηθέστερα εξετάζονται δείκτες που σχετίζονται με κάποια **συμπεριφορική δοκιμασία και δείκτες νευροχημικού και νευροβιολογικού ενδιαφέροντος**.

A) Συμπεριφορικές προσεγγίσεις

Η μελέτη της κινητικής δραστηριότητας των επιμύων προσφέρει πληροφορία σχετική με τη γενικότερη δραστηριότητα, την εγρήγορση, την «εσωτερική διεγερσιμότητα» και την εξερευνητικότητα (Polissidis et al., 2010; Pierce and Kalivas, 1997; Antoniou et al., 1998, 2008). Τα αποτελέσματα πειραματικών ερευνών που μελέτησαν την αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα επιμύων μετά από χρόνια χορήγηση κανναβινοειδών κατά την εφηβεία, φαίνεται να παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια και να ποικίλουν ανάλογα με το δοσολογικό προφίλ που χρησιμοποιείται κάθε φορά, τη διάρκεια και το στάδιο χορήγησης, καθώς και το γενικότερο μεθοδολογικό σχεδιασμό. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά σε συμπεριφορικές δοκιμασίες ελέγχου της κινητικής δραστηριότητας των πειραματόζωων, τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η χρόνια χορήγηση Δ⁹-THC ή και των αγωνιστών των υποδοχέων των κανναβινοειδών WIN 55,212-2 και CP-55,940 κατά την εφηβεία είτε δεν επιφέρει συμπεριφορική αλλαγή στην κινητική δραστηριότητα τόσο αρσενικών όσο και θηλυκών ενήλικων επιμύων (Zamberletti et al., 2015; Rubino et al., 2008; Shen et al., 2011; Bambico et al., 2010; Schneider et al., 2005; O'Shea et al., 2004; Biscaia et al., 2003), είτε οδηγεί σε αυξημένη οριζόντια και κάθετη κινητικότητα (Lorente-Berzal et al., 2013; Wegner et al., 2009; Abush and Akirav, 2012), είτε οδηγεί σε μειωμένες παραμέτρους οριζόντιας και κάθετης κινητικής δραστηριότητας μη εξοικειωμένων επιμύων κατά την ενηλικίωση (Harte and Dow-Edwards, 2012; Renard et al., 2016).

Επομένως, όσον αφορά τη δοκιμασία ανοικτού πεδίου και τον έλεγχο της αυθόρμητης κινητικότητας - που αποδίδουν στοιχεία που προσομοιάζουν «ψυχοκινητική» ανάπτυξη - τα μέχρι τώρα ερευνητικά αποτελέσματα παρουσιάζουν ετερογένεια και ποικίλουν ανάλογα με το μεθοδολογικό σχεδιασμό και το δοσολογικό προφίλ, το οποίο κυρίως εστιάζει στη χρήση υψηλών δόσεων. Είναι προφανές ότι απαιτείται επιπλέον διερεύνηση και ενδελεχής μελέτη για να αποτυπωθεί η επίδραση της χορήγησης κανναβινοειδών κατά την ανάπτυξη στην κινητική συμπεριφορά κατά την ενηλικίωση.

Οι συμπεριφορικές δοκιμασίες που μελετούν γνωστικές λειτουργίες όπως η μάθηση, η μνήμη και η προσοχή, βρίσκονται σε μεγαλύτερη συμφωνία, με τις περισσότερες έρευνες να υπογραμμίζουν πως η χρόνια χορήγηση κανναβινοειδών κατά την εφηβεία επηρεάζει αρνητικά γνωστικού τύπου συμπεριφορές, όπως η αναγνωριστική χωρική μνήμη και στα δυο φύλα στην ενήλικη ζωή των επιμύων (Abush and Akirav, 2012; Rubino and Parolaro, 2014; Zamberletti et al., 2014; Renard et al., 2014). Προς την ίδια κατεύθυνση κινούνται και προσεγγίσεις που

μελετούν εκφάνσεις χωρική μνήμη και μάθηση, όπως τη δοκιμασία υδάτινου λαβυρίνθου κατά Morris, τη δοκιμασία ακτινωτού λαβυρίνθου και τη δοκιμασία λαβυρίνθου Y, όπου φαίνεται ότι η χορήγηση Δ⁹-THC ή WIN 55,212-2 σε έφηβους επίμυες επηρεάζει αρνητικά τη χωρική μνήμη κατά την ενηλικίωση και στα δυο φύλα (Rubino et al., 2009; Rubino et al., 2014; Abboussi et al., 2014). Επισημαίνεται ότι οι γνωστικές δυσλειτουργίες εντάσσονται και στην ψυχωτική συμπτωματολογία, είτε σε συνδυασμό με τα αρνητικά συμπτώματα είτε ως «αυτόνομη» ομάδα συμπτωμάτων. Στον αντίποδα των προαναφερθέντων, υπάρχει περιορισμένος αριθμός πειραματικών μελετών στις οποίες φαίνεται ότι η χρόνια χορήγηση κανναβινοειδών κατά την ανάπτυξη δεν έχει κάποια επίπτωση σε γνωστικού τύπου συμπεριφορές, αξιολογούμενες με συμπεριφορικές δοκιμασίες, όπως αυτή του υδάτινου λαβυρίνθου κατά Morris και του ακτινωτού λαβυρίνθου (Cha et al., 2006; Cadoni et al., 2013; Higuera-Matas et al., 2009). Αξίζει να επισημανθεί ότι οι περισσότερες από τις μελέτες που προαναφέρθηκαν έχουν χρησιμοποιήσει υψηλές δόσεις κανναβινοειδών.

Τα μέχρι σήμερα δημοσιευμένα αποτελέσματα **ελέγχου συμπεριφορικών προσεγγίσεων που σχετίζονται με ανώτερου επιπέδου γνωστικές λειτουργίες** μετά τη χορήγηση κανναβινοειδών είναι περιορισμένα (Cohen and Weinstein, 2018; Egerton et al., 2005). Δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα αναφορές στις οποίες να έχει γίνει χορήγηση Δ⁹-THC κατά την εφηβεία και να ελέγχονται ανώτερες γνωστικές λειτουργίες κατά την ενηλικίωση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των Gomes et al. (2015), κατά την οποία η χορήγηση WIN 55,212-2 κατά την εφηβεία δεν επηρέασε τη γενικότερη γνωστική ευελιξία (cognitive flexibility) των ενήλικων επιμύων, αλλά μείωσε την ικανότητα μετατόπισης της προσοχής τους (reversal learning).

Επίσης, μια **δοκιμασία ηθμού της αισθητικοκινητικής πληροφορίας** είναι αυτή της **προπαλμικής αναστολής του αντανακλαστικού του αιφνιδιασμού (Pre-Pulse Inhibition test, PPI)**. Η δοκιμασία αυτή ρυθμίζεται από το φλοιϊκό, το μεταιχμιακό κύκλωμα και την προβολή του ραβδωτού σώματος στην ωχρά σφαίρα (cortico-limbic-striatopallidal circuit) και χρησιμοποιεί ακουστικά ερεθίσματα για να ελεγχθεί η αισθητικοκινητική απάντηση σε συγκεκριμένη ροή πληροφορίας, μια διαδικασία που διαταράσσεται στη σχιζοφρένεια (Geyer et al., 2001). Ειδικότερα, υπάρχουν αναφορές που δείχνουν ότι η χορήγηση Δ⁹-THC κατά την εφηβεία δεν επηρέασε το ποσοστό προπαλμικής αναστολής κατά την ενηλικίωση (Llorente-Berzal et al., 2013). Στην αντίθετη κατεύθυνση βρίσκονται άλλες έρευνες που υποστηρίζουν ότι η χρόνια χορήγηση Δ⁹-THC ή WIN 55,212-2 σε αρσενικούς επίμυες προκάλεσε μείωση του

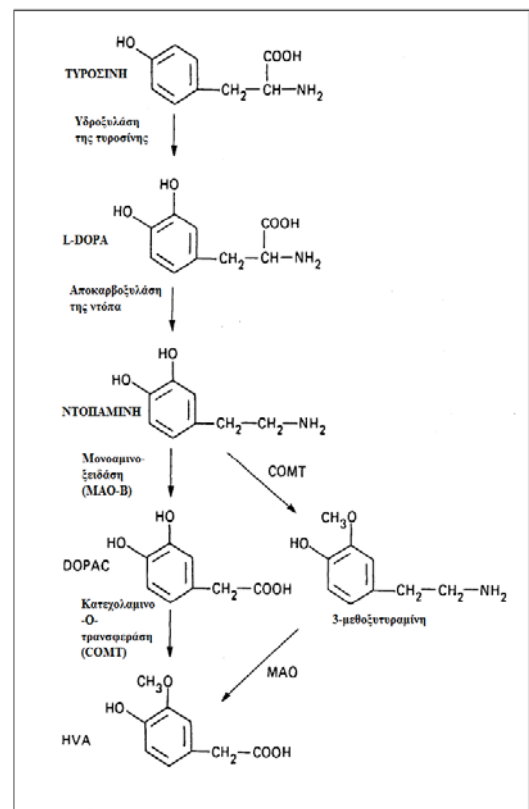
ποσοστού προπαλμικής αναστολής στην ενηλικίωση (Renard et al., 2016; Schneider et al., 2005; Wegener and Koch, 2009).

B) Νευροχημικές – Νευροβιολογικές προσεγγίσεις

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν, επίσης, και πειραματικές μελέτες στις οποίες εξετάζονται δείκτες νευροχημικού και νευροβιολογικού ενδιαφέροντος.

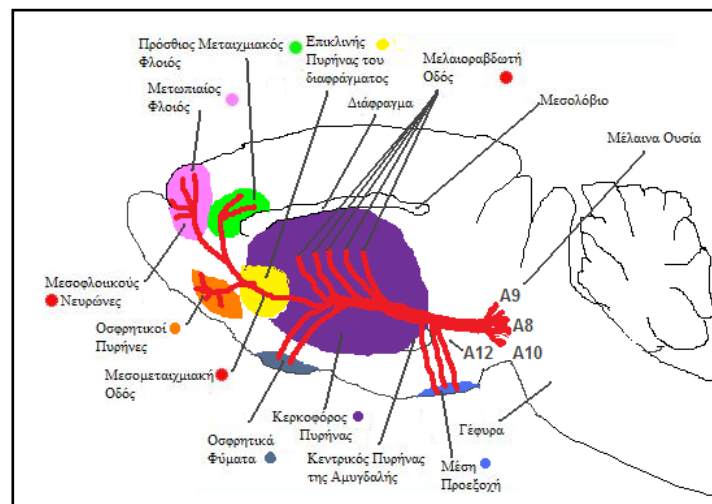
B1) Το ντοπαμινεργικό σύστημα εμπλέκεται σε φυσιολογικές λειτουργίες και διαδικασίες, όπως η κινητικότητα, η ανταμοιβή, οι γνωστικές λειτουργίες και η εξάρτηση (Panagis et al., 2002), ενώ η απορύθμιση του έχει συσχετισθεί με διαταραχές του ΚΝΣ όπως η σχιζοφρένεια.

Αρχικό στάδιο σύνθεσης της ντοπαμίνης (3:4 διυδροξυφαινυλεθλαμίνης, DA), κύριου νευροδιαβιβαστή του ΚΝΣ, είναι η υδροξυλίωση της τυροσίνης σε 3,4-διυδροξυφαινυλαλανίνη (L-DOPA). Η ντοπαμίνη μετά τη σύνθεση της αποθηκεύεται σε συναπτικά κυστίδια με τη βοήθεια ενός μονοαμινικού μεταφορέα. Μετά τη δημιουργία κατάλληλου δυναμικού ενέργειας παρατηρείται διάνοιξη ιοντικών διαύλων Ca^{2+} , εισροή Ca^{2+} και απελευθέρωση της ντοπαμίνης στη συναπτική σχισμή (Cheramy et al., 1981; Santiago and Westerink, 1991). Μετά την απελευθέρωση της ντοπαμίνης στη συναπτική σχισμή, έπεται ο καταβολισμός της από εξειδικευμένα ένζυμα, όπως η κατεχολαμινο-O-μεθυλοτρανσφεράση (COMT) και η μονοαμινοξειδάση (MAO), και η επαναπρόσληψή της από τις προσυναπτικές απολήξεις με τη βοήθεια του μεταφορέα της ντοπαμίνης (dopamine transporter, DAT), που εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη (Εικόνα 1.12).



Εικόνα 1.12. Η συνθετική οδός της ντοπαμίνης.

Οι ντοπαμινεργικές οδοί προβάλλουν από τα κυτταρικά σώματα της μέλαινας ουσίας και της κοιλιακής καλυπτρικής περιοχής σε πολλές εγκεφαλικές δομές σχηματίζοντας τέσσερις κύριες οδούς: τη μελαινοραβδωτή, τη μεσομεταιχμιακή, τη μεσοφλοιώδη και τη φυματοχοανική (Εικόνα 1.13). Οι υποδοχείς της ντοπαμίνης αποτελούνται από την ομάδα D1 και την ομάδα D2. Η ομάδα των D1 (διεγερτικοί υποδοχείς) περιλαμβάνει και τον υποτύπο D5, ενώ η ομάδα των D2 (ανασταλτικοί υποδοχείς) περιλαμβάνει και τους υποτύπους D3 και D4, σχηματίζοντας έτσι ένα σύνολο 5 υποτύπων υποδοχέων. Εντοπίζονται σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται τόσο με τις φυσιολογικές διεργασίες που αναφέρθηκαν, αλλά και με το νευροβιολογικό υπόστρωμα διαταραχών του ΚΝΣ, όπως η σχιζοφρένεια και η κατάχρηση ουσιών.



Εικόνα 1.13. Ντοπαμινεργικές οδοί στον εγκέφαλο επίμοις.

Όσον αφορά την **αλληλεπίδραση της κάνναβης με το ντοπαμινεργικό σύστημα** πολλές μελέτες αναφέρουν αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα και τον προμετωπιαίο φλοιό σε διάφορα στελέχη επιμύων μετά από χορήγηση Δ^9 -THC και WIN 55-212,2 (Polissidis et al., 2014; Chen et al., 1990a; Chen et al., 1990b; Chen et al., 1991; Malone and Taylor, 1999; Pistis et al., 2002; Tanda et al., 1999). Η αύξηση της εξωκυττάριας ντοπαμίνης στις προαναφερθείσες περιοχές φαίνεται πως εξαρτάται από τον CB1 υποδοχέα των κανναβινοειδών, καθώς η προκαλούμενη από τα κανναβινοειδή αύξηση αναστέλλεται με την προχορήγηση του CB1 ανταγωνιστή των κανναβινοειδών, SR141716A (Pistis et al., 2002; Tanda et al., 1997). Επίσης, ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες του μεσεγκεφάλου υποστηρίζουν έντονα ότι η Δ^9 -THC, μέσω της αγωνιστικής δράσης στους CB1

υποδοχείς, αυξάνει το ρυθμό πυροδότησης των εν λόγω νευρώνων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Oleson and Cheer, 2012).

Τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί μέσω *in vitro* νευροχημικών προσεγγίσεων υποστηρίζουν επίσης την αλληλεπίδραση μεταξύ ντοπαμινεργικού συστήματος και συστήματος κανναβινοειδών. Έχει παρατηρηθεί αύξηση της σύνθεσης (Navarro et al., 1993a; b) και απελευθέρωσης της ντοπαμίνης (Jentsch et al., 1998; Poddar and Dewey, 1980), αναστολή της επαναπρόσληψής της (Banerjee et al., 1975; Hershkowitz and Szechtman 1979; Johnson et al., 1976; Poddar and Dewey, 1980) και μεταβολή του ρυθμού ανακύκλωσης της ντοπαμίνης (Polissidis et al., 2014) μετά από χορήγηση Δ^9 -THC.

Είναι εμφανές ότι τα εξωγενή κανναβινοειδή τροποποιούν τη ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση με τοποειδικό χαρακτήρα και πολλές από τις μελέτες αυτές μπορούν να συνδυαστούν με αντίστοιχες μελέτες ελέγχου της κινητικότητας ή γνωστικών λειτουργιών, λόγω της εμπλοκής των περιοχών αυτών (ραχιαίο ραβδωτό σώμα, επικλινής πυρήνας του διαφράγματος, υπόκαμπος) στις προαναφερθείσες λειτουργίες.

Αξίζει να σημειωθεί ότι πολλές συμπεριφορικές προσεγγίσεις και κυρίως μελέτες κινητικότητας έχουν αναφέρει ότι οι επιδράσεις της κάνναβης, της Δ^9 -THC, του WIN 55,212-2 και της ανανδαμίδης ακολουθούν ένα διφασικό, δοσοεξαρτώμενο προφίλ, που χαρακτηρίζεται από αυξημένη κινητικότητα στις χαμηλές δόσεις και από κατασταλμένη κινητική δραστηριότητα και καταληψία στις υψηλές δόσεις (Polissidis et al, 2012; Rodvelt et al., 2007; Davis et al., 1978; Drews et al., 2005). Σε αυτό το πλαίσιο απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση του δοσοεξαρτώμενου προφίλ των κανναβινοειδών ως προς τη ντοπαμινεργική λειτουργία και την ακόλουθη συσχέτιση με συμπεριφορικές αποκρίσεις.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν μελέτες που εστιάζουν στο πώς η επαναλαμβανόμενη έκθεση σε Δ^9 -THC κατά την ανάπτυξη επηρεάζει το ντοπαμινεργικό σύστημα. Ειδικότερα, σχετικά με τη χορήγηση κανναβινοειδών κατά την εφηβεία και τις επιδράσεις στο ντοπαμινεργικό σύστημα, μελέτες αναφέρουν μεταβολές στη ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση (Bortolato et al., 2014; Renard et al., 2016; Cadoni et al., 2013; Zamberletti et al., 2012), οι οποίες κυρίως αναδεικνύουν αυξημένη ντοπαμινεργική δραστηριότητα (Bortolato et al., 2014; Renard et al., 2016), σημειώνοντας ότι το δοσολογικό προφίλ που επιλέγεται εστιάζει κυρίως σε υψηλές δόσεις.

Στο σημείο αυτό αξίζει να γίνει μια αναφορά στις ψυχοδιεγερτικές ουσίες όπως η **αμφεταμίνη**, που κυρίως ενισχύουν τη ντοπαμινεργική δραστηριότητα (Arbuthnott et al., 1990; Raiteri et al., 1979; Carboni et al., 1989; Damsma et al., 1989; Di Chiara and Imperato, 1988; Kalivas and Duffy, 1990; Kuczenski et al., 1991; Wise, 1987; Gardner, 2002; 2005; Tanda and Goldberg, 2003). Η επαγόμενη από αμφεταμίνη αύξηση της ντοπαμινεργικής δραστηριότητας παράλληλα με την αυξημένη κινητική δραστηριότητα που προκαλεί η χορήγησή της (Pierce et al., 1997; Antoniou et al., 1998) και σε συνδυασμό με κλινικές παρατηρήσεις έχουν οδηγήσει στη χρήση της αμφεταμίνης για τη μοντελοποίηση της ψύχωσης και της σχιζοφρένειας, και ειδικότερα των θετικών συμπτωμάτων αυτής (Frankle et al., 2018; Bramness et al., 2016; Steeds et al., 2015).

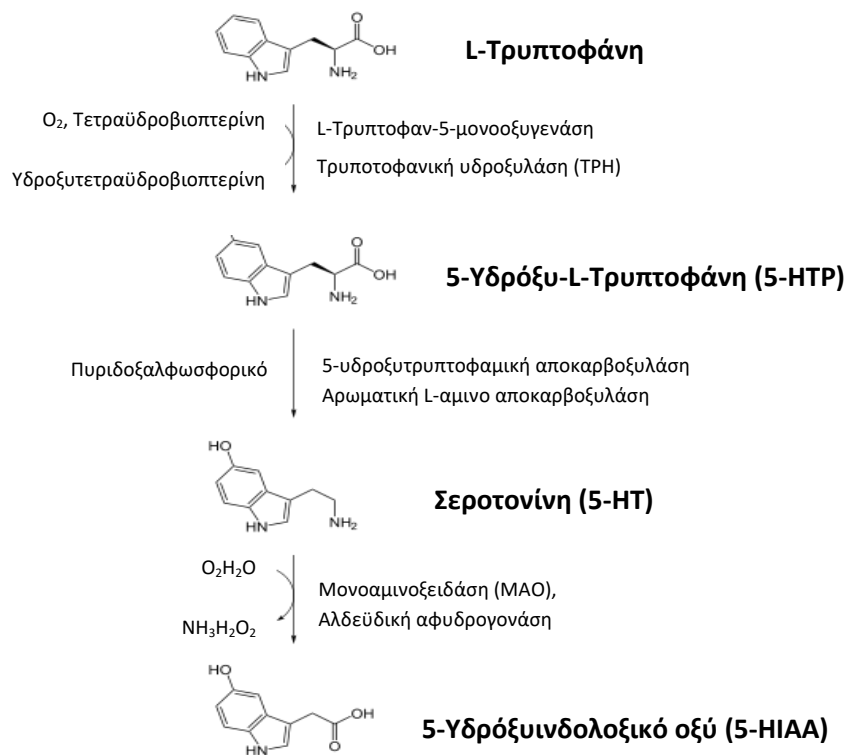
Όσον αφορά την αλληλεπίδραση αμφεταμίνης και κανναβινοειδών οι μελέτες υποστηρίζουν τη μεταβολή ως προς την κινητική δραστηριότητα που προκαλείται από την αμφεταμίνη, η οποία εξαρτάται από τη δόση των κανναβινοειδών που έχουν χρησιμοποιηθεί, το στέλεχος των πειραματοζώων και το σχετικό μεθοδολογικό χαρακτηρισμό (Polissidis et al., 2014; Goritti et al., 1999). Η ομάδα των Ellgren et al. (2004) έδειξε ότι η χορήγηση χαμηλών δόσεων Δ⁹-THC ή WIN 55,212-2 κατά την εφηβεία δεν επέφερε στατιστικώς σημαντική αλλαγή στην επαγόμενη από αμφεταμίνη κινητικότητα. Αντίθετα, χρόνια χορήγηση WIN 55,212-2 κατά την ύστερη εφηβεία οδήγησε σε αυξημένη υπερκινητικότητα μετά από χορήγηση αμφεταμίνης στην ενηλικίωση (Gomes et al., 2015), ενώ η προγεννητική έκθεση σε Δ⁹-THC σε αρσενικά και στα θηλυκά πειραματόζωα προκάλεσε μειωμένη κινητική απόκριση στην αμφεταμίνη (Silva et al., 2012).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η επίδραση της χορήγησης κανναβινοειδών κατά την εφηβεία στην συμπεριφορική απόκριση που προκαλεί η αμφεταμίνη κατά την ενηλικίωση είναι ένα επιστημονικό ερώτημα ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, σύμφωνα και με όσα προαναφέρθηκαν, και απαιτεί περαιτέρω ενδελεχή έλεγχο και μελέτη.

B2) Το σεροτονεργικό σύστημα εμπλέκεται σε φυσιολογικές λειτουργίες και διαδικασίες, όπως η διάθεση, και σε συμπεριφορές που σχετίζονται με το άγχος, το στρες, τη λήψη τροφής, την κατάθλιψη, τις γνωστικές διεργασίες και φαινόμενα πλαστικότητας.

Η βιοσύνθεση της σεροτονίνης (5-υδροξυ-3-τροπταμίνη, 5-HT) αρχίζει με την πρόσληψη του αμινοξέος L-τροπτοφάνη, που αποτελεί και την πρόδρομο ουσία. Η τροπτοφάνη κατά την είσοδο της στον σεροτονεργικό νευρώνα υδροξυλιώνεται σε 5-υδροξυτροπτοφάνη από το

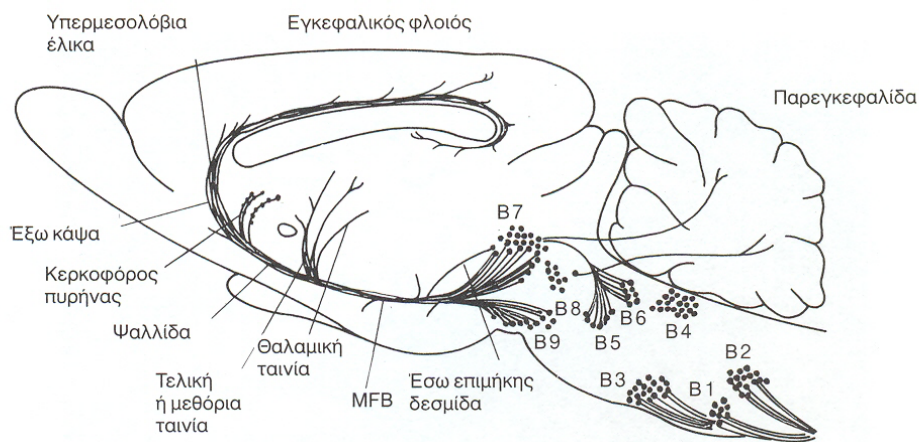
ένζυμο υδροξυλάση της τρυπτοφάνης, που θεωρείται και το ρυθμιστικό-περιοριστικό ένζυμο για την σύνθεση της 5-HT. Ακολούθως, η 5-υδροξυτρυπτοφάνη μεταβολίζεται σε 5-υδροξυτρυπταμίνη (5-HT) μέσω της αποκαρβοξυλάσης των L αρωματικών αμινοξέων (Cooper et al., 1996) (**Εικόνα 1.14**). Μετά τη σύνθεση της η 5-HT, αποθηκεύεται σε συναπτικά κυστίδια στις νευρωνικές απολήξεις και απελευθερώνεται μέσω εξωκύτωσης, που ελέγχεται από ιόντα Ca^{2+} . Η δράση της στο μετασυναπτικό κύτταρο τερματίζεται με την επαναπρόσληψή της από τους εκλεκτικούς μεταφορείς 5-HT (SERT). Στο νευρικό ιστό, η 5-HT μεταβολίζεται από τη μονοαμινοξειδάση A (MAO-A) σε 5-υδροξυινδολοξικό οξύ (5-HIAA), ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια (**Εικόνα 1.14**). Κατά την απελευθέρωσή της η 5-HT δεσμεύεται στους σεροτονεργικούς υποδοχείς, οι οποίοι βρίσκονται στους μετασυναπτικούς νευρώνες στόχους (Cooper et al., 1996; Hoyer et al., 2002).



Εικόνα 1.14. Η συνθετική οδός της σεροτονίνης.

Στο εγκεφαλικό στέλεχος υπάρχουν εννέα ομάδες σεροτονεργικών κυττάρων (B1-B9), που ονομάστηκαν πυρήνες της ραφής και εντοπίζονται στη μέση γραμμή του στελέχους από τον προμήκη μέχρι τον μεσεγκέφαλο (Dahlstrom and Fuxe, 1964) (**Εικόνα 1.15**). Κάθε πυρήνας της ραφής προβάλλει σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου. Αυτοί που βρίσκονται στο κοιλιακό τμήμα του προμήκη και στο ουραίο τμήμα της γέφυρας (B1-B3) νευρώνουν το

νωτιαίο μυελό και ρυθμίζουν αισθητηριακά μηνύματα, που σχετίζονται με την αίσθηση και την αντίληψη του πόνου. Η προβολή των ραχιαίων πυρήνων της ραφής B7 καταλήγει κυρίως στο ραβδωτό σώμα, τον πρόσθιο φλοιό και στην κοιλιακή δομή του ιπποκάμπου. Οι νευρώνες που ξεκινούν από τους μέσους και κοιλιακούς πυρήνες (B8/B9) προβάλλουν κυρίως στη ραχιαία δομή του ιπποκάμπου, στους πυρήνες του διαφράγματος, την αμυγδαλή, τη μέλαινα ουσία, το θάλαμο, τον υποθάλαμο και τον φλοιό. Οι πυρήνες, που βρίσκονται ενδιάμεσα (B4-B6) σχηματίζουν τόσο ανιούσες όσο και κατιούσες προβολές και παρέχουν σεροτονεργική νεύρωση στη παραγκεφαλίδα (**Εικόνα 1.15**).



Εικόνα 1.15. Σχηματική απεικόνιση των κύριων σεροτονεργικών οδών στο ΚΝΣ επιμύων.

Οι 5-HT₁ υποδοχείς διακρίνονται σε πέντε υποτύπους: 1A, 1B, 1D, 1E, 1F. Οι υποδοχείς της ομάδας αυτής συνδέονται με G_i πρωτεΐνες και αναστέλλουν την παραγωγή του δεύτερου μηνυματοφόρου μορίου c-AMP (Hoyer et al., 2002.).

Όσον αφορά την **αλληλεπίδραση της κάνναβης με το σεροτονεργικό σύστημα** έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν ότι τα ενδοκανναβινοειδή, μέσω της ενεργοποίησης του CB1 υποδοχέα, παίζουν ένα σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στις λειτουργίες του σεροτονεργικού συστήματος, υποδηλώνοντας υψηλό βαθμό λειτουργικής αλληλοεπικάλυψης μεταξύ του συστήματος των κανναβινοειδών και της σεροτονίνης (Tzavara et al., 2003; Aso et al., 2009; Mato et al., 2007). *In vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων αναστέλλει τη σεροτονεργική απελευθέρωση στις θέσεις προβολής των σεροτονεργικών νευρώνων του πυρήνα της ραφής, όπως στον προμετωπιαίο φλοιό και τον ιππόκαμπο (Egashira et al., 2002; Nakazi et al., 2000). Σε μια ενδιαφέρουσα μελέτη, η

αναστολή της νευρωνικής δραστηριότητας που παρατηρείται μετά από τη δράση CB1 ανταγωνιστών και η συνακόλουθη μείωση της σεροτονεργικής απελευθέρωσης στις περιοχές προβολής του πυρήνα της ραφής μπορεί να συσχετιστεί με καταθλιπτικόμορφους φαινοτύπους (Mendiguren et al., 2018). Αντίθετα, η αναστολή των CB1 υποδοχέων αυτών φαίνεται πως αυξάνει τα βασικά εξωκυττάρια επίπεδα της σεροτονίνης στον προμετωπιαίο φλοιό (Aso et al., 2009; Darmani et al., 2003; Tzavara et al., 2003). Επομένως, τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα ενδοκανναβινοειδή μειώνουν τη σεροτονεργική απελευθέρωση στο ΚΝΣ μέσω της δράσης των CB1 υποδοχέων (Haj-Dahmane and Shen, 2011).

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί μέσω *in vitro* νευροχημικών μεθόδων. Συστημική χορήγηση κανναβινοειδών μειώνει τα επίπεδα σύνθεσης της 5-HT σε περιοχές προβολής του πυρήνα της ραφής, περιλαμβανομένου του υπομέλαινα τόπου, του ιπποκάμπου, του φλοιού, του ραβδωτού σώματος και της παρεγκεφαλίδας (Moranta et al., 2004) και αυξάνει την αυθόρμητη πυροδότηση των 5-HT νευρώνων του πυρήνα της ραφής, μέσω ενός CB1-εξαρτώμενου μηχανισμού (Bambico et al., 2007, 2010; Gobbi et al., 2005). Αντίθετα, συστημική χορήγηση της Δ^9 -THC δεν έδειξε να επηρεάζει την πυροδοτική ικανότητα αυτών των σεροτονεργικών κυττάρων, γεγονός που ίσως αιτιολογείται από τις ιδιότητες μερικού αγωνιστή που διαθέτει η Δ^9 -THC (Bambico et al., 2016). Αντίθετα, οι ανταγωνιστές των CB1 υποδοχέων ριμοναμπάντη και AM-251 αναστέλλουν την πυροδότηση των σεροτονεργικών κυττάρων του πυρήνα της ραφής (Mendiguren et al., 2009).

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι έως τώρα δεν υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές που να δείχνουν πώς επηρεάζεται το **σεροτονεργικό σύστημα από την επαναλαμβανόμενη έκθεση σε Δ^9 -THC κατά την ανάπτυξη**. Έχει παρατηρηθεί αύξηση του αριθμού των ινών που είναι θετικές στην πρωτεΐνη μεταφορέα της σεροτονίνης (serotonin transporter, SERT) στις περιοχές του ιπποκάμπου και του βρεγματικού φλοιού αρσενικών επιμύων ύστερα από χορήγηση Δ^9 -THC κατά την εφηβεία (Lopez-Rodriguez et al., 2014). Έχει επίσης, παρατηρηθεί μείωση της δραστηριότητας των σεροτονεργικών νευρώνων στην περιοχή της ραχιαίας ραφής ενήλικων επιμύων μετά από εφηβική χορήγηση του αγωνιστή WIN 55,212-2 (Bambico et al., 2010). Αντίθετα, οι Shen et al (2011) δεν παρατήρησαν αλλαγές στα επίπεδα δέσμωσης του μεταφορέα SERT, ενώ αμετάβλητα παρέμειναν και τα ολικά επίπεδα της σεροτονίνης, καθώς και του μεταβολίτη της στις περιοχές του PFC, του ιπποκάμπου και του ραβδωτού σώματος κατά την ενηλικίωση.

Δεδομένης της εμπλοκής της ντοπαμινεργικής και σεροτονεργικής λειτουργίας σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες και διαταραχές του ΚΝΣ, καθώς επίσης και της αλληλεπίδρασης των κανναβινοειδών με τα προαναφερθέντα νευροδιαβιβαστικά συστήματα, είναι προφανές ότι αποκτά ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον η μελέτη της επίδρασης των κανναβινοειδών κατά την ανάπτυξη στη ρύθμιση των συστημάτων αυτών, ιδιαίτερα όταν το δοσολογικό σχήμα εστιάζεται σε χαμηλές δόσεις, γεγονός που συνάδει με τη χρήση κάνναβης κατά την εφηβεία.

Γ) Νευροβιολογικές προσεγγίσεις σχετικά με μοριακούς δείκτες νευροπλαστικότητας

Η μελέτη **νευροβιολογικών δεικτών**, που σχετίζεται με τις συμπεριφορικές δοκιμασίες που ήδη αναφέρθηκαν σαν παράγοντες κινητικής εγρήγορσης, γνωστικών λειτουργιών, αλλά και σαν μεταβλητές που αντανακλούν συμπτωματολογία διαταραχών ΚΝΣ παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Ειδικότερα, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, πολλοί **νευροτροφικοί παράγοντες** μορφοποιούν το νευρικό σύστημα προάγοντας την επιβίωση, τη διαφοροποίηση και τη συναπτογένεση. Πολλοί από αυτούς τους παράγοντες εξακολουθούν να συντίθενται και να δρουν και στον ώριμο εγκέφαλο, συμμετέχοντας σε διαδικασίες που σχετίζονται με την πλαστικότητα του εγκεφάλου και την ενίσχυση των λειτουργικά ενεργών συνάψεων.

Η ομάδα των νευροτροφικών παραγόντων που έχει μελετηθεί περισσότερο είναι η υπεροικογένεια των νευροτροφινών, όπως ο νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται από τον εγκέφαλο (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), ο αυξητικός παράγοντας των νεύρων (nerve growth factor, NGF), η νευροτροφίνη-3 (neurotrophin-3, NT-3) και οι νευροτροφίνες-4/5 (neurotrophin-4/5, NT-4/5) (Bothwell, 1995). Οι τέσσερις αυτές νευροτροφίνες προσδέονται σε δύο είδη μεμβρανικών υποδοχέων: α) της οικογένειας κίνησης-τυροσίνης TrkA, TrkB και TrkC (tropomyosin-related kinase) και β) του υποδοχέα p75NTR (pan-neurotrophin). Όλες οι νευροτροφίνες έχουν την ικανότητα δέσμευσης με χαμηλή όμως συγγένεια με τον υποδοχέα p75NTR, ενώ στον υποδοχέα TrkA συνδέεται με υψηλή συγγένεια μόνο ο NGF, στον υποδοχέα TrkB μόνο οι BDNF και NT-4, ενώ στον υποδοχέα TrkC μόνο η NT-3 (Barbacid, 1995; Thoenen, 1995).

BDNF

Ο BDNF ως νευροτροφικός παράγοντας είναι υπεύθυνος για την κυτταρική επιβίωση, διαφοροποίηση και αύξηση, τη νευρωνική πλαστικότητα, τις μεταβολές του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση τόσο στο ΚΝΣ όσο και στο ΠΝΣ (Bath and Lee, 2006; Chen et al., 2004; Cowansage et al., 2010; Koyama et al., 2004). Έχει, επίσης, κυρίαρχο ρόλο στη διαδικασία της νευρογένεσης στον ενήλικο εγκέφαλο, όπως και στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο (Fuchs and Gould, 2000; Gage, 2002). Τα επίπεδα έκφρασης του BDNF στον εγκέφαλο είναι ιδιαίτερα υψηλά στην περιοχή του ιπποκάμπου, όπου προάγει τη νευρογένεση, ειδικότερα στη περιοχή της οδοντωτής έλικας, ενώ θεωρείται βασικός παράγοντας για τη διεργασία της μακροχρόνιας ενδυνάμωσης της μνήμης (LTP). Ο BDNF, επίσης, εκφράζεται στο μεταιχμιακό σύστημα το οποίο εμπλέκεται και στο σύστημα της ανταμοιβής (Logrip et al., 2009; Vargas-Perez et al., 2009).

Το γονίδιο του BDNF εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11p13 και έχει πολύπλοκη δομή καθώς περιλαμβάνει 9 λειτουργικούς υποκινητές (promoters) και 11 εξόνια, τα οποία με διάφορους ανασυνδυασμούς κατά τη διαδικασία της μεταγραφής κωδικοποιούν περισσότερα από 30 διαφορετικά προϊόντα μεταγραφής (mRNA) (Allen et al., 2013). Το γονίδιο του BDNF κωδικοποιεί τον σχηματισμό ενός πρόδρομου πεπτιδίου (**pro-BDNF**) το οποίο μετά από μια πρωτεολυτική διαδικασία σχηματίζει την ώριμη πλέον μορφή BDNF (**mature BDNF**), μεγέθους 14 kDa (Lessmann et al., 2003). Το πρόδρομο πεπτίδιο και ο ώριμος BDNF συνδέονται εκλεκτικά με διαφορετικούς υποδοχείς νευροτροφινών. Πιο συγκεκριμένα, το πρόδρομο πεπτίδιο συνδέεται με τον υποδοχέα p75NTR και ελέγχει βιοχημικές διαδικασίες που ρυθμίζουν την απόπτωση των νευρικών κυττάρων και τη μείωση του αριθμού των δενδριτών (dendritic pruning). Ο ώριμος BDNF συνδέεται με τον υποδοχέα νευροτροφινών TrkB και ασκεί ρυθμιστική δράση στον κυτταρικό κύκλο, τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση των νευρικών κυττάρων, καθώς και τη διαμόρφωση των πολύπλοκων νευρικών συνάψεων (Kang and Schuman, 1995; Tongiorgi, 2008).

Κάνναβη και BDNF

Μια από τις κλινικές παρατηρήσεις σχετικά με την έκθεση σε εξωγενή κανναβινοειδή κατά την εφηβεία είναι, όπως προαναφέρθηκε, η εμφάνιση ψυχωτικού τύπου συμπτωματολογίας αργότερα κατά την ενήλικη ζωή. Έχει προταθεί πως πολλές από τις δομικές και λειτουργικές αλλαγές που παρατηρούνται σε τέτοιες συμπτωματολογίες καθώς και σε διαταραχές όπως η σχιζοφρένεια θα μπορούσαν να σχετίζονται με πιθανές ανισορροπίες στα επίπεδα

νευροτροφινών ή στις κυτταρικές τους λειτουργίες, καθώς η δράση αρκετών νευροτροφινών έχει συνδεθεί με την πλαστικότητα και τη μακρόχρονη ρύθμιση των συναπτικών συνδέσεων (Poo, 2001). Λόγω ακριβώς του κεντρικού ρόλου του BDNF στην ανάπτυξη και στην πλαστικότητα του εγκεφάλου, πρώιμες περιβαλλοντικές επιδράσεις στα επίπεδά του μπορεί να έχουν μακροπρόθεσμα αποτελέσματα στη λειτουργία του εγκεφάλου (Lessmann et al., 2003; Poo, 2001). Διαταραχές στη σηματοδότηση του BDNF στον εγκέφαλο, κυρίως λόγω **μείωσης της έκφρασης ή της απελευθέρωσής του**, έχει συσχετιστεί τα τελευταία χρόνια με ένα εύρος ψυχιατρικών και νευρολογικών διαταραχών (Balaratnasingam and Janca, 2012).

Η σχέση μεταξύ της έκθεσης σε κανναβινοειδή και των επιπέδων νευροπαραγόντων στον εγκέφαλο δεν έχει διερευνηθεί ακόμη, ωστόσο η μελέτη της επίδρασης της χρήσης κάνναβης, ιδιαίτερα κατά την εφηβεία, στα επίπεδα του BDNF, θα μπορούσε να συνεισφέρει στο νευροβιολογικό υπόστρωμα που χαρακτηρίζει τη συσχέτιση της χρήσης κάνναβης κατά την εφηβική περίοδο με την εμφάνιση σχιζοφρένειας ή άλλων διαταραχών κατά την ενήλικη ζωή.

Σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, ο τρόπος με τον οποίον το σύστημα των κανναβινοειδών, μετά την ενεργοποίησή του επηρεάζει περιοχές του εγκεφάλου και κυτταρικές διεργασίες, μέσω αλλαγών στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, αποτελεί ένα πεδίο αρκετά ανεξερεύνητο ακόμη. Ειδικότερα, όσον αφορά το γονίδιο του BDNF πολύ λίγες προκλινικές μελέτες έχουν ασχοληθεί με το πώς επηρεάζεται από την χορήγηση κανναβινοειδών - με μόνο μία εξ' αυτών να εμπλέκει την χορήγηση κανναβινοειδών κατά το αναπτυξιακό στάδιο της εφηβείας. Κάποιες από τις μελέτες που διερεύνησαν την επίδραση της χρόνιας έκθεσης σε Δ⁹-THC κατά την ενήλικη ζωή έδειξαν **αύξηση της έκφρασης του BDNF**, τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και πρωτεϊνικών επιπέδων, σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές, κυρίως σε όσες εμπλέκονται στις διαδικασίες της ανταμοιβής και της εξάρτησης (π.χ επικλινής πυρήνας του διαφράγματος) (Butovsky et al., 2005; Rubino et al., 2006). Ωστόσο, παρά την παρατηρούμενη αύξηση μετά από χρόνια χορήγηση κατά την ενήλικη ζωή, η μοναδική μέχρι στιγμής μελέτη σε επίμυες, της επίδρασης της χορήγησης κανναβινοειδών αγωνιστών κατά την εφηβεία στα επίπεδα του BDNF, έδειξε μια **τάση μείωσης στην έκφραση του BDNF** στην περιοχή του ιπποκάμπου (Lopez-Gallardo et al., 2012).

Κάνναβη και άλλοι νευροβιολογικοί δείκτες

Η βιβλιογραφία παρουσιάζει, επίσης, μεγάλη ετερογένεια αναφορικά με τη μελέτη πρωτεϊνικών δείκτες που σχετίζονται με σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζονται από τη χορήγηση

κανναβινοειδών. Πιο συγκεκριμένα, χορήγηση Δ^9 -THC κατά την εφηβεία σε αρσενικούς επίμυες, προκάλεσε συστηματικές αλλαγές στην έκφραση πρωτεϊνών στον **ιππόκαμπο**, συμπεριλαμβανομένων κυτταροσκελετικών και άλλων δομικών πρωτεϊνών, όπως η α - και β -τουμπουλίνη, η βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (MBP) και η τρανσγελίνη-3 (NP25) (Quinn et al., 2008), καθώς επίσης και βλάβες στη δομική και λειτουργική πλαστικότητα τόσο των νευρώνων όσο και των κυττάρων γλοίας της περιοχής αυτής (Lopez-Gallardo et al., 2012; Rubino et al., 2009). Οι συγκεκριμένοι επίμυες παρουσίασαν επιπλέον μείωση των δενδριτών σε μήκος και πολυπλοκότητα, καθώς και μείωση στον αριθμό των δενδριτικών ακανθών στην περιοχή της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου (Rubino et al., 2009). Σε αντίστοιχη μελέτη χορήγησης Δ^9 -THC κατά την εφηβεία σε αρσενικούς επίμυες παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης προσυναπτικών και μετασυναπτικών δεικτών (συναπτοφυσίνη και PSD-95, αντίστοιχα), καθώς και αυξημένα επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων των AMPA και NMDA υποδοχέων, GluA1, GluA2 και GluN2B, αντίστοιχα (Zamberletti et al., 2016).

Έρευνες χορήγησης Δ^9 -THC κατά την εφηβεία σε θηλυκούς επίμυες, έδειξαν την πρόκληση συστηματικών αλλαγών κατά την ενηλικίωση στην έκφραση πρωτεϊνών στον **προμετωπιαίο φλοιό**, συμπεριλαμβανομένων της αύξησης των προ-φλεγμονωδών παραγόντων i-NOS, TNF- α , COX-2, της μείωσης του αντιφλεγμονώδους δείκτη IL-10 και της μείωσης της πρωτεΐνης GAD67, ενζύμου υπεύθυνου για τη σύνθεση του GABA (Zamberletti et al., 2015, 2014). Παρόμοια μελέτη σε θηλυκούς επίμυες έδειξε αυξημένα επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων GluA1 και GluN2B των AMPA και NMDA υποδοχέων, αντίστοιχα στον ενήλικο προμετωπιαίο φλοιό (Rubino et al., 2015). Αντίθετα, σε δυο άλλες μελέτες ύστερα από χρόνια χορήγηση Δ^9 -THC σε θηλυκούς έφηβους επίμυες μειώθηκαν τόσο τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Arc, που εμπλέκεται σε διεργασίες νευροπλαστικότητας, μάθησης και παγίωσης της μνήμης στον προμετωπιαίο φλοιό όσο και μορίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι του mTORC1, όπως οι πρωτεΐνες GSK-3, Akt Thr 308, mTOR, p70S6K και β -κατενίνη, που σχετίζονται με πλήθος νευροψυχιατρικών διαταραχών, όπως η σχιζοφρένεια και συνδέονται με απορύθμιση της ντοπαμινεργικής λειτουργίας κατά την ενηλικίωση (Llorente-Berzal et al., 2013; Renard et al., 2016).

Συμπερασματικά, από τις μέχρι τώρα κλινικές παρατηρήσεις και τις προκλινικές μελέτες δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους η έκθεση στην κάνναβη κατά την εφηβεία επηρεάζει την ανάπτυξη του εγκεφάλου, ούτε ο τρόπος εμπλοκής νευροπαραγόντων, όπως ο BDNF, σ' αυτήν. Ωστόσο, η ύπαρξη κλινικών δεδομένων που συνδέουν τόσο την εφηβική έκθεση σε κανναβινοειδή, όσο και τα επίπεδα του BDNF ή άλλων

παραγόντων στον εγκέφαλο, με την εμφάνιση συμπτωματολογίας ψυχωτικού τύπου κατά την ενήλικη ζωή, δημιουργεί ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον πεδίο έρευνας για τη συσχέτιση αυτών των παραμέτρων, με πολλές μάλιστα πιθανές ιατρικές εφαρμογές.

Δ) Αλληλεπίδραση εξωγενώς χορηγούμενης κάνναβης με το ενδοκανναβινοειδές σύστημα

Για την επίδραση της Δ^9 -THC στο ενδοκανναβινοειδές σύστημα τα συμπεράσματα είναι αμφιλεγόμενα. Κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν πως δεν εντοπίζονται σημαντικές μακροχρόνιες αλλαγές στη δεσμευτική ικανότητα, την ενεργοποίηση των υποδοχέων των κανναβινοειδών (CB1) (Ellgren et al., 2008; Lopez-Rodriguez et al., 2014; Morel et al., 2009), και την πρωτεϊνική τους έκφραση (Steel et al., 2014; Zamberletti et al., 2014). Άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν πως τα επίπεδα του υποδοχέα CB1 μειώνονται στον υπόκαμπο και το ραβδωτό σώμα (Lopez Rodriguez et al., 2013; Winseauer, et al., 2012), ενώ η πυκνότητα και η λειτουργικότητά τους ελαττώνονται στον προμετωπιαίο φλοιό, τον υπόκαμπο, την αμυγδαλή, το κερκοφόρο κέλυφος, τον επικλινή πυρήνα και την κοιλιακή καλυπτρική περιοχή (Rubino et al., 2008; Zamberletti et al., 2012). Τέλος, σε μια μόνη μελέτη αναφέρεται αύξηση των επιπέδων έκφρασης του υποδοχέα CB2 σε μικρογλοιακά κύτταρα του PFC ενήλικων επιμύων, μετά από χορήγηση Δ^9 -THC κατά την εφηβεία (Zamberletti et al., 2015).

Καταλήγοντας, τα ευρήματα των κλινικών παρατηρήσεων σε συνδυασμό με τα προκλινικά δεδομένα φαίνεται να υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η χορήγηση Δ^9 -THC κατά την εφηβεία επιφέρει αλλαγές κατά την ενηλικίωση. Οι διαταραχές φαίνεται κυρίως να εντοπίζονται σε συμπεριφορικό επίπεδο, επηρεάζοντας ψυχοκινητικές διεργασίες και δείκτες γνωστικής λειτουργίας. Μεταβολές υπάρχουν, επίσης, σε συγκεκριμένους νευροχημικούς και νευροβιολογικούς δείκτες που αφορούν το σύστημα των μονοαμινών, αλλά και σε δείκτες νευροπλαστικότητας. Η αλλαγή ή η απορρύθμισή αυτών των δεικτών μπορεί να συσχετισθεί με την αποτύπωση ενός ολοκληρωμένου βιο-συμπεριφορικού φαινοτύπου που πιθανώς θα μπορούσε να προσομοιάσει τη συμπτωματολογία διαταραχών όπως η σχιζοφρένεια. Προς το παρόν όμως, απουσιάζουν οι παράλληλες εκτιμήσεις μεταξύ συμπεριφορικών και νευροβιολογικών δεικτών ενδιαφέροντος σε ομάδες πειραματόζωων που έχουν υποβληθεί κατά την ανάπτυξη σε τέτοια δοσολογικά σχήματα χορήγησης Δ^9 -THC που να προσομοιάζουν τη χρήση κάνναβης από εφήβους.

ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας αφορά τη μελέτη του συμπεριφορικού, νευροχημικού και νευροβιολογικού υποστρώματος ενήλικων επιμύων μετά από χορήγηση χαμηλών κλιμακούμενων δόσεων κάνναβης κατά την εφηβεία. Η συγκεκριμένη πειραματική προσέγγιση προσπαθεί να συσχετίσει τη χορήγηση κανναβινοειδών κατά την ανάπτυξη με συμπεριφορικές και νευροβιολογικές αλλαγές που παρατηρούνται κατά την ενηλικίωση. Απώτερος σκοπός της μελέτης αυτής είναι ο προκύπτων βιο-συμπεριφορικός φαινότυπος να συμβάλει, σε μεταφραστικό επίπεδο, στο κύριο ερώτημά μας: *Θα μπορούσε η κλιμάκωση της χρήσης κάνναβης σε χαμηλές δόσεις να αποτελέσει παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη ψυχοπαθολογίας αργότερα κατά την ενηλικίωση;*

Το ερευνητικό πλαίσιο της παρούσας μελέτης υποστηρίζεται από την πλούσια βιβλιογραφία που εστιάζει στο ρόλο του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος, στην έκφραση φυσιολογικών λειτουργιών και την εμφάνιση παθοφυσιολογικών καταστάσεων, στη μελέτη των φαρμακολογικών ιδιοτήτων των κανναβινοειδών και στις πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές τους. Ειδικότερα η παρούσα μελέτη ακολουθεί προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας που έχουν δείξει ότι η χορήγηση των αγωνιστών των κανναβινοειδών, Δ^9 -THC και WIN 55,212-2, προκαλεί ένα διφασικό μοντέλο κινητικής δραστηριότητας, νευροχημικές αλλαγές στο ντοπαμινεργικό και γλουταματεργικό σύστημα και γνωστικές δυσλειτουργίες, ενώ επηρεάζει την επίδραση ψυχοδιεγερτικών όπως η αμφεταμίνη. Ειδικότερα για την κινητική συμπεριφορά αναδείχθηκε ότι οι μικρές δόσεις, Δ^9 -THC και WIN 55,212-2 προκαλούν υπερκινητικότητα, ενώ, οι μεγαλύτερες δόσεις προκαλούν υποκινητικότητα. Επιπλέον, προηγούμενη μελέτη μας έχουν αποτυπώσει την αλληλεπίδραση αμφεταμίνης και WIN 55,212-2, δείχνοντας ότι η προχορήγηση κανναβινοειδών μειώνει την υπερκινητικότητα και την αύξηση στη ντοπαμινεργική λειτουργία που προκαλεί η αμφεταμίνη.

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε ένα συγκεκριμένο μοντέλο χορήγησης χαμηλών, σταδιακά αυξανόμενων κλιμακούμενων δόσεων Δ^9 -THC σε έφηβους αρσενικούς επίμυες, που προσομοιάζει τη χρήση κάνναβης κατά την εφηβεία και διερευνήθηκε η επίδρασή του σε συμπεριφορικούς, νευροχημικούς και μοριακούς δείκτες κατά την ενηλικίωση. Επίσης, λαμβάνοντας υπόψη τα ευρήματα που αφορούν τις φαρμακολογικές ιδιότητες των κανναβινοειδών, της αμφεταμίνης, της αλληλεπίδρασής τους, καθώς και της συσχέτισής τους με την εμφάνιση συμπτωματολογίας ψυχωτικού τύπου, μελετήθηκε η επίδραση των χαμηλών

κλιμακούμενων δόσεων Δ^9 -THC κατά την εφηβεία στη συμπεριφορική απόκριση της αμφεταμίνης κατά την ενηλικίωση.

Συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν:

1) Οι επιδράσεις της έκθεσης σε χαμηλές κλιμακούμενες δόσεις Δ^9 -THC κατά την εφηβεία σε μεταβλητές/εκφάνσεις συμπεριφοράς ενήλικων επιμύων που σχετίζονται με την ανάπτυξη κινητικής δραστηριότητας και συγκεκριμένες γνωστικές λειτουργίες.

2) Οι επιδράσεις της έκθεσης σε χαμηλές κλιμακούμενες δόσεις Δ^9 -THC κατά τη εφηβεία στο ντοπαμινεργικό σύστημα, εξετάζοντας δείκτες νευροχημείας και τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του μεταφορέα της ντοπαμίνης (DAT).

3) Οι επιδράσεις της έκθεσης σε χαμηλές κλιμακούμενες δόσεις Δ^9 -THC κατά τη εφηβεία στο σεροτονεργικό σύστημα, εξετάζοντας δείκτες νευροχημείας και τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του μεταφορέα της σεροτονίνης (SERT).

4) Οι επιδράσεις της έκθεσης σε χαμηλές κλιμακούμενες δόσεις Δ^9 -THC κατά τη εφηβεία σε μοριακούς δείκτες νευροπλαστικότητας, εκτός του σεροτονεργικού συστήματος, όπως έκφραση επιπέδων BDNF και των υποδοχέων του TrkB και p75.

5) Οι επιδράσεις της έκθεσης σε χαμηλές κλιμακούμενες δόσεις Δ^9 -THC κατά τη εφηβεία σε δείκτες του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος, όπως CB1 και CB2 υποδοχείς.

Η μελέτη των μεταβλητών νευροχημικού/νευροβιολογικού προσανατολισμού εστιάστηκαν στις περιοχές του ιπποκάμπου, του προμετωπιαίου φλοιού, του ραχιαίου ραβδωτού σώματος και του επικλινούς πυρήνα του διαφράγματος, που σχετίζονται με τις προαναφερθείσες συμπεριφορικές εκφάνσεις.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Πειραματόζωα

Για την πραγματοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί επίμυες του στελέχους Sprague-Dawley (**Εικόνα 2.1**) από το Εκτροφείο Πειραματοζώων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Οι επίμυες διαβιούν ανά τρεις σε πλαστικούς κλωβούς διαστάσεων 42.5 x 26.6 x 15.5 cm, υπό σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας ($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) και κυκλικού φωτισμού (07:00–19:00 φως και 19:00–07:00 σκοτάδι). Η πρόσβαση σε νερό και τροφή ήταν ελεύθερη και γινόταν τακτική καταγραφή του βάρους τους. Για αναπαραγωγή επιλεγόταν συνδυασμός ενός αρσενικού γεννήτορα με δύο θηλυκά ανά κλωβό σε ηλικία περίπου δυόμιση μηνών, ενώ 10 ημέρες αργότερα γινόταν απομάκρυνση των αρσενικών από τον κλωβό διαβίωσης. Μετά από 21 ημέρες που διαρκεί η κύηση των επιμύων γινόταν έλεγχος και καταγραφή των γεννήσεων και για κάθε νέο πειραματόζωο σημειωνόταν η ημερομηνία γέννησης ως μεταγεννητική ημέρα 0 (postnatal day, PND).

Η αναπαραγωγή, φροντίδα, στέγαση, χρήση και ευθανασία των πειραματοζώων έγινε σύμφωνα με τον κώδικα δεοντολογίας του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των ΗΠΑ (NIH Publications No 80-23,1996) και τις ευρωπαϊκές οδηγίες για τη φροντίδα και τη χρήση των πειραματόζωων (National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Eighth Edition, 2011). Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε όσο το δυνατόν μικρότερος αριθμός πειραματόζωων κι έγινε προσπάθεια για ελαχιστοποίηση του πόνου. Η εξοικείωσή τους με τον πειραματιστή ήταν εκτεταμένη, ενώ γινόταν μεταφορά τους στον εργαστηριακό χώρο τουλάχιστον τρεις ημέρες πριν την έναρξη της εκάστοτε πειραματικής διαδικασίας για προσαρμογή στις συνθήκες του νέου περιβάλλοντος.



Εικόνα 2.1. Επίμυς του στελέχους Sprague-Dawley.

2.1.2 Φάρμακα

Χορήγηση Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλης (Δ⁹-THC) κατά την εφηβεία

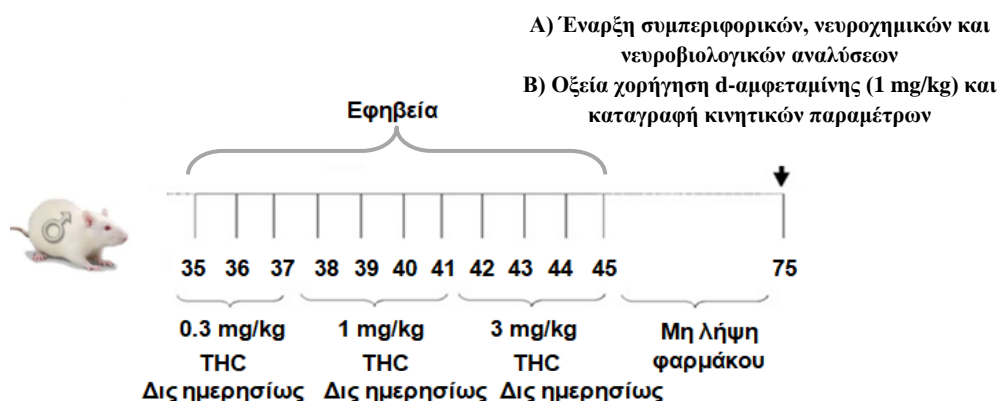
Η ουσία που χορηγήθηκε κατά την εφηβεία ήταν η Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ⁹-THC), η οποία αποτελεί το κύριο ψυχοδραστικό συστατικό του φυτού της κάνναβης. Η παραλαβή της έγινε σε υγρό διάλυμα αιθανόλης της εταιρίας Sigma-Aldrich, συσκευασμένης σε φιαλίδιο (28 mg THC/ml διαλύματος). Αρχικά, εκτελέστηκε εξάχνωση για την απομόνωση της αιθανόλης και, στη συνέχεια, παρασκευάστηκε διάλυμα Δ⁹-THC το οποίο αποτελείτο από 5% DMSO, 5% Cremophor EL, 90% Saline (NaCl) και τη δραστική ουσία σε συγκέντρωση 3 mg/ml. Το αρχικό διάλυμα επιμερίστηκε σε κλάσματα και από αυτό δημιουργήθηκαν διαδοχικά τα αραιότερα διαλύματα με συγκεντρώσεις 1 mg/ml και 0.3 mg/ml, αντίστοιχα. Για την ομάδα ελέγχου παρασκευάστηκε το έκδοχο (vehicle) με την ίδια κατά τα άλλα σύσταση ουσιών, χωρίς την Δ⁹-THC. Τα διαλύματα αποθηκευόταν στους -80°C πριν τη χρήση τους.

Η χορήγηση φαρμάκου και εκδόχου γινόταν με ενέσεις ενδοπεριτοναϊκά (i.p.) σε αναλογία 1ml/1kg σωματικού βάρους ζώου δύο φορές την ημέρα στο Εκτροφείο του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στους κλωβούς όπου διαβίωναν, ενώ το βάρους τους καταγραφόταν καθημερινά. Πιο συγκεκριμένα, από την 35^η έως και την 37^η ημέρα ζωής η δόση του φαρμάκου που λάμβαναν οι επίμυες ήταν **0.3 mg/kg**, από την 38^η μέχρι και την 41^η ημέρα η δόση ήταν **1 mg/kg** και από την 42^η έως και την 45^η ημέρα η αντίστοιχη δόση ήταν **3 mg/kg** βάρους ζώου. Αντίστοιχα, η ομάδα ελέγχου λάμβανε το έκδοχο (vehicle) για το ίδιο χρονικό διάστημα (PND 35-45) (**Εικόνα 2.2**). Η επιλογή των συγκεκριμένων ημερών για την προαναφερθείσα χορήγηση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με προηγούμενη βιβλιογραφία (Rubino and Parolaro, 2014; Rubino et al., 2008) ενώ η επιλογή του συγκεκριμένου κλιμακούμενου δοσολογικού σχήματος (χαμηλών δόσεων) βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας (Polisidis et al., 2012; Galanopoulos et al., 2011), οι οποίες και επιτρέπουν, σε μεταφραστικό επίπεδο, την προσομοίωση με τη χρήση κάνναβης από εφήβους.

Χορήγηση d-αμφεταμίνης κατά την ενηλικίωση

Σε υποομάδα επιμύων που έλαβαν το ίδιο μοντέλο χαμηλών κλιμακούμενων δόσεων Δ⁹-THC κατά την εφηβεία, προχωρήσαμε στη οξεία χορήγηση **d-αμφεταμίνης** κατά την ενηλικίωση (PND>75). Η d-αμφεταμίνη (Sigma-Aldrich) διαλυτοποιήθηκε σε φυσιολογικό ορό (saline) σε αναλογία 1 mg/ml. Ενήλικες επίμυες έλαβαν οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης 1 mg/kg με

ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις (i.p.) μετά την 75^η ημέρα ζωής τους. Αντίστοιχα, η ομάδα ελέγχου έλαβε το έκδοχο (saline) (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2. Το χρονοδιάγραμμα χορήγησης Δ^9 -THC και εκδόχου κατά την εφηβεία και οι περαιτέρω χειρισμοί κατά την ενηλικίωση.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Συμπεριφορικές μέθοδοι

2.2.1.1 Δοκιμασία Ανοικτού Πεδίου (Open Field Test, OFT)

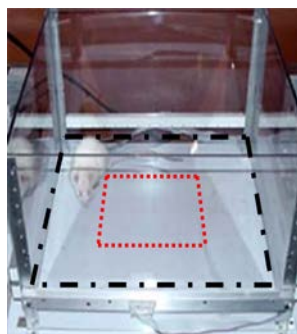
Είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες πως ο προσδιορισμός της κινητικότητας ενός ζώου, τόσο σε έναν ανεξερεύνητο, όσο και σε έναν οικείο χώρο, μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για την κινητική του λειτουργία, για εκφάνσεις της γνωστικής του λειτουργίας και για την κατάσταση της «εσωτερικής διεγερσιμότητας» - κινητοποίησής του (Polissidis et al., 2014). Πειραματικοί χειρισμοί, όπως η χορήγηση μιας ψυχοτρόπου ουσίας, μπορούν να επηρεάσουν τις παραμέτρους αυτές και να μεταβάλλουν το προφίλ κινητικότητας των πειραματοζώων. Για παράδειγμα, έρευνες έχουν αποδείξει πως ευφοριογόνες ουσίες προκαλούν διέγερση σε υψηλές δόσεις (Wiley et al., 2011), ενώ αντίθετα χορήγηση κανναβινοειδών σε υψηλές δόσεις οδηγεί σε καταστολή και σε χαμηλές δόσεις σε διέγερση (Antoniou et al., 2008 Polissidis et al., 2013; Polissidis et al., 2014).

Για την εξέταση της επίδρασης του φαρμάκου (Δ^9 -THC) στην κινητικότητα των επιμύων χρησιμοποιήθηκε η **Δοκιμασία Ανοικτού Πεδίου**. Κατά τη δοκιμασία αυτή ο επίμυς αφήνεται να εξερευνήσει έναν καινούργιο χώρο για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

Η καταγραφή της αυθόρμητης κινητικότητας των επιμύων πραγματοποιήθηκε σε κλωβούς καταγραφής κινητικότητας με φωτοκύτταρα (ENV515, Activity Monitor, version 5, Med

Associates). Η πειραματική συσκευή ανοικτού πεδίου αποτελείται από έναν διαφανή κλωβό διαστάσεων 40 x 40 x 40 cm, ανοικτό στο επάνω μέρος και με μια ηλεκτρική μονάδα καταγραφής (**Εικόνα 2.3**). Οι επιφάνειες του κλωβού είναι εξοπλισμένες με οριζόντιες και κάθετες σειρές ανιχνευτών. Η κίνηση του πειραματοζώου προκαλεί διακοπές στις δεσμίδες φωτός, οι οποίες καταγράφονται αυτόματα στο σύστημα.

Πριν την εισαγωγή κάθε επίμου, το δάπεδο καθαρίζεται επιμελώς με νερό και διάλυμα αιθανόλης, για την απάλειψη των οσμών από προηγούμενα πειραματόζωα. Την ημέρα του πειράματος, όλα τα πειραματόζωα εξοικειώνονται στο δωμάτιο πειραματισμού (κινητικότητας) για 40 λεπτά τουλάχιστον. Στη συνέχεια, τοποθετούνται στον κλωβό, όπου καταγράφεται η κινητικότητά τους για μια ώρα. Συγκεκριμένα, μετρώνται η διανυθείσα απόσταση λόγω οριζόντιας κινητικότητας (ambulatory distance) και η συχνότητα εμφάνισης οριζόντιας κινητικότητας (ambulatory counts), που χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες της αμιγούς οριζόντιας κινητικότητας. Επιπλέον καταγράφονται η διάρκεια και η συχνότητα εμφάνισης της κατακόρυφης κινητικότητας/ανόρθωσης (vertical time και vertical counts, αντίστοιχα), που χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτης της κάθετης/κατακόρυφης κινητικότητας και εξερευνητικότητας, και, επίσης, καταγράφεται ο χρόνος παραμονής στο κέντρο του κλωβού (center time) ως δείκτης έλλειψη ή μη άγχους. Τέλος, δίνεται η δυνατότητα καταγραφής της διάρκειας απραξίας του πειραματοζώου (resting time), ένας δείκτης που φανερώνει το χρονικό διάστημα που ο επίμυς δεν εξερευνά το χώρο, αλλά παραμένει ακίνητος σε μια θέση.



Εικόνα 2.3. Η πειραματική συσκευή της δοκιμασίας Ανοικτού Πεδίου.

(*Διακεκομμένες κόκκινες γραμμές: το κέντρο του κλωβού, Διακεκομμένες μαύρες γραμμές: η περιφέρεια του κλωβού, οι διαστάσεις των οποίων ορίζονται από τον χειριστή*)

A) Μέτρηση αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας (Reaction to novelty)

Κατά τον προσδιορισμό της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας, τα πειραματόζωα αφήνονται εντός του κλωβού ανοικτού πεδίου, χωρίς προηγούμενη εξοικείωσή τους με αυτόν, ώστε να εξερευνήσουν το καινούργιο περιβάλλον. Κάθε επίμυς, τοποθετείται εντός του κλωβού και παραμένει εκεί για μια ώρα, κατά τη διάρκεια της οποίας γίνεται η αυτόματη καταγραφή μιας σειράς κινητικών παραμέτρων, όπως της **οριζόντιας κινητικότητας** - εκφρασμένη ως διανυθείσα απόσταση και ως συχνότητα οριζόντιας κινητικότητας (ambulatory distance και ambulatory counts, αντίστοιχα) - και της **κάθετης κινητικότητας** - εκφρασμένη ως συχνότητα κάθετης κινητικότητας (vertical counts). Ακόμη, καταγράφεται ο **χρόνος παραμονής στο κέντρο του κλωβού** (center time), καθώς και η **διάρκεια απραξίας** του ζώου (resting time). Με την ολοκλήρωση της μίας ώρας παραμονής στον κλωβό ο επίμυς επιστρέφεται στον κλωβό διαβίωσής του.

B) Προσδιορισμός ικανότητας εξοικείωσης (Cognitive-related motor habituation)

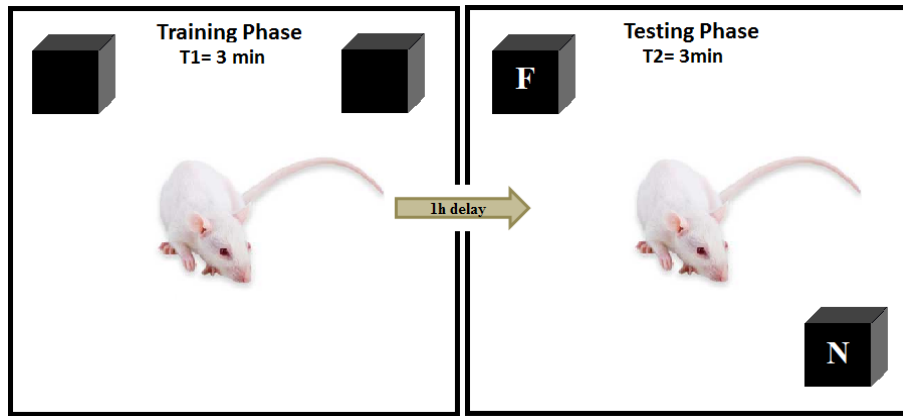
Για την αξιολόγηση της μη συνειρμικής μνήμης και μάθησης και της διατήρησής τους, στοιχείων που αντανακλούν την οργάνωση της συμπεριφοράς ενός πειραματόζωου, χρησιμοποιείται η διαδικασία εξοικείωσης σε έναν ανεξερεύνητο χώρο (Thiel et al., 1998; Mogensen et al., 2003; Antoniou et al., 2008; Polissidis et al., 2010; Galanopoulos et al., 2014). Για τον λόγο αυτό, μετά την ολοκλήρωση της πρώτης ημέρας καταγραφής της αυθόρμητης κινητικότητας στο ανοικτό πεδίο, ο επίμυς επανατοποθετείται στον ίδιο χώρο με στόχο να διερευνηθεί αν και κατά πόσο θυμάται και μπορεί να εξοικειωθεί ευκολότερα με το συγκεκριμένο περιβάλλον. Το κάθε πειραματόζωο αφήνεται να εξερευνήσει τον κλωβό ανοικτού πεδίου καθημερινά, για μία ώρα, τρεις συνεχόμενες ημέρες και καταγράφονται οι παράμετροι κινητικότητάς του. Με το πέρας της μίας ώρας επιστρέφει στον κλωβό διαβίωσής του. Η δοκιμασία αυτή αποτελεί έλεγχο της επαναλαμβανόμενης μάθησης των πειραματόζωων και, φυσιολογικά, αναμένεται ελάττωση των κινητικών δεικτών κάθε φορά που γίνεται εκ νέου εισαγωγή στον ίδιο πειραματικό κλωβό για επαναλαμβανόμενες ημέρες (Mogensen et al., 2003). Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκαν οι αλλαγές στην οριζόντια διανυθείσα απόσταση (ambulatory distance) και στη συχνότητα κάθετης κινητικότητας (vertical counts) με το πέρας των ημερών.

2.2.1.2 Δοκιμασία Αναγνώρισης Θέσης Αντικειμένου (Object Location Task, OLT)

Για την εξέταση της επίδρασης του φαρμάκου (Δ^9 -THC) στην αναγνωριστική βραχυπρόθεσμη χωρική μνήμη των πειραματόζωων πραγματοποιήθηκε η **Δοκιμασία Αναγνώρισης Θέσης Αντικειμένου**, η οποία αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου που πρώτοι περιέγραψαν οι Ennaceur και Delacour το 1988. Πρόκειται για ένα παράδειγμα που δε στηρίζεται στην ανταμοιβή, αλλά στην αυθόρμητη εξερευνητική ικανότητα των τρωκτικών (Ennaceur and Delacour, 1988).

Το πειραματικό πρωτόκολλο περιλαμβάνει τρεις φάσεις (Galanopoulos et al., 2014; Pitsikas et al., 2014, 2008) και πραγματοποιείται σε έναν αδιαφανή λευκό ξύλινο κλωβό διαστάσεων 50 x 50 x 50 cm και ανοικτό από πάνω. Αρχικά, οι επίμυες μεταφέρονται με τα κλουβιά τους στον πειραματικό χώρο όπου έχει ρυθμιστεί σταθερή θερμοκρασία. Η πρώτη φάση είναι αυτή της εξοικείωσης, κατά την οποία οι επίμυες τοποθετούνται ατομικά στον πειραματικό κλωβό ώστε να τον εξερευνήσουν για πέντε λεπτά (5 min) και στη συνέχεια επιστρέφουν στα κλουβιά διαβίωσής τους. Η διαδικασία εξοικείωσης επαναλαμβάνεται μετά από μία ώρα, καθώς και την επόμενη ημέρα.

Την τρίτη ημέρα ακολουθούν οι δύο επόμενες φάσεις της δοκιμασίας. Κατά την πρώτη φάση, τοποθετούνται στον κλωβό δύο πανομοιότυπα αντικείμενα (πλαστικά, κυλινδρικού σχήματος), έτσι ώστε να καλύπτουν τη μία πλευρά του κουτιού, σε απόσταση περίπου 10 cm από το τοίχωμα. Στη συνέχεια, κάθε επίμυς αφήνεται στο κέντρο του κλωβού ώστε να εξερευνήσει τα δύο αντικείμενα για 3 λεπτά (**T1=3 min**) κι ακολούθως επιστρέφει στο κλουβί του. Ο χρόνος που δαπανάται στο κάθε αντικείμενο από το πειραματόζωο καταγράφεται από τον ερευνητή. Ως χρόνος εξερεύνησης ενός αντικειμένου ορίζεται η χρονική διάρκεια κατά την οποία το τρωκτικό ακουμπάει το αντικείμενο ή η μύτη του απέχει λιγότερο από 2 cm από αυτό και με κατεύθυνση προς αυτό, ενώ αν κάθετα στάσιμο δε θεωρείται ότι εκδηλώνει εξερευνητική συμπεριφορά. Μετά από μία ώρα οι επίμυες επανατοποθετούνται στο κέντρο του κλωβού με διαφορετική όμως πειραματική διάταξη για 3 λεπτά (**T2=3 min**). Στη φάση αυτή, το ένα από τα δύο πανομοιότυπα αντικείμενα παραμένει στην ίδια θέση με αυτήν της προηγούμενης φάσης, η οποία είναι ήδη γνωστή για τους επίμυες, και χαρακτηρίζεται ως **οικεία (Familiar, F)**, ενώ το άλλο αντικείμενο τοποθετείται σε διαφορετική θέση, διαγώνια από την αρχική, η οποία χαρακτηρίζεται ως **νέα (Novel, N)** (**Εικόνα 2.4**). Ο χρόνος παραμονής στο κάθε αντικείμενο της φάσης T2 σημειώνεται ξανά από τον παρατηρητή.



Εικόνα 2.4. Η πειραματική διάταξη της δοκιμασίας Αναγνώρισης Θέσης Αντικειμένου. (Familiar (F): οικεία θέση, Novel (N): νέα θέση)

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται η χρήση ενός **Δείκτη Ικανότητας Διάκρισης (Discrimination Index)**, χαρακτηριστικού για το κάθε πειραματόζωο, που ορίζεται ως το πηλίκο της διαφοράς του χρόνου εξερεύνησης του αντικειμένου στην καινούργια θέση μείον τον χρόνο εξερεύνησης του αντικειμένου στην οικεία θέση προς το άθροισμα των δύο αυτών χρόνων, δηλαδή προς τον συνολικό χρόνο εξερεύνησης των δύο αντικειμένων (Cavoy and Delacour, 1993).

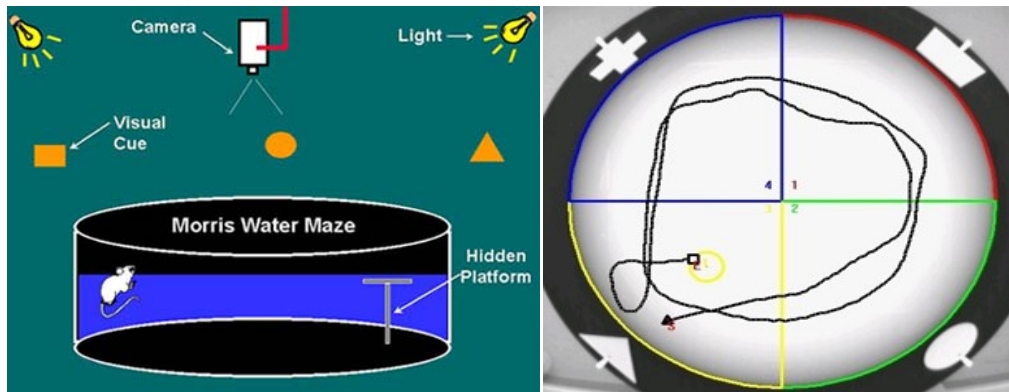
$$DI = \frac{(N-F)}{(N+F)} \quad (\text{Σχέση 2.1})$$

Για την αποφυγή προτίμησης των επιμύων στη θέση ή το υλικό κάποιου αντικειμένου χρησιμοποιείται εναλλάξ διαφορετικό ζεύγος αντικειμένων και γίνεται τοποθέτησή τους σε διαφορετικό σημείο του κλωβού (δεξιά - αριστερά στις γωνίες). Επίσης, γίνεται καλός καθαρισμός τόσο των αντικειμένων όσο και του δαπέδου του κλωβού με διάλυμα 60% αιθανόλης, πριν την εισαγωγή του κάθε πειραματόζωου στον πειραματικό χώρο για την απόλεια πιθανών οσμών.

2.2.1.3 Δοκιμασία Υδάτινου Λαβύρινθου κατά Morris (Morris Water Maze, MWM)

Για την εξέταση της επίδρασης του φαρμάκου (Δ^9 -THC) στη χωρική μάθηση και μνήμη χρησιμοποιήθηκε η **Δοκιμασία Υδάτινου Λαβύρινθου κατά Morris**, σύμφωνα με προηγούμενα καθιερωμένα πρωτόκολλα (Pitsikas et al., 1993; Galanopoulos et al., 2014; Vorhees et al., 2006), με σκοπό να αξιολογηθεί η χωρική μνήμη και μάθηση. Κατά τη δοκιμασία αυτή, μια κυκλική πισίνα γεμάτη με νερό περίπου 22°C, που καθίσταται αδιαφανές μέσω χρήσης μη-τοξικού χρώματος, τοποθετείται σε ένα δωμάτιο με σταθερό φωτισμό και σταθερά σημεία-αντικείμενα στους τοίχους και γύρω από την πισίνα, που δρουν ως εξωτερικά οπτικά ερεθίσματα (απαραίτητα για τον προσανατολισμό χωρικού τύπου).

Στο εσωτερικό της πισίνας τοποθετείται μια πλατφόρμα διαφυγής, είτε ορατή είτε κρυμμένη-βυθισμένη, σε ορισμένο κάθε φορά σημείο, με βάση τα τέσσερα νοητά σχηματιζόμενα σημεία του ορίζοντα. Στην οροφή πάνω από τη πισίνα τοποθετείται κάμερα καταγραφής που συνδέεται με υπολογιστικό σύστημα (Εικόνα 2.5).



Εικόνα 2.5. Η πειραματική διάταξη της δοκιμασίας του Υδάτινου Λαβύρινθου κατά Morris και τα τέσσερα νοητά σχηματιζόμενα τεταρτημόρια καταγραφής της πλοήγησης.

- Την πρώτη ημέρα εκπαίδευσης, η πλατφόρμα τοποθετείται σε συγκεκριμένο σημείο της πισίνας και παραμένει σε αυτό καθ' όλη τη διάρκεια των δοκιμών που θα ακολουθήσουν, έτσι ώστε να μην είναι ορατή από τον επίμυ αλλά να είναι προσβάσιμη από το πειραματόζωο. Ειδικότερα, κάθε επίμυ εισάγεται στην πισίνα και εκπαιδεύεται να κολυμπήσει ως την **κρυμμένη πλατφόρμα**, για τέσσερις συνεχόμενες δοκιμές (μέγιστης διάρκειας 90 sec η καθεμία). Η κατεύθυνση εισόδου του επίμυ στο νερό γίνεται κάθε φορά από διαφορετικό σημείο για καθεμία από τις τέσσερις δοκιμές. Η εκπαίδευση διαρκεί έως ότου το πειραματόζωο επιτύχει το κριτήριο εύρεσης της πλατφόρμας και αναρρίχησης σ' αυτήν. Μόλις ο επίμυ εντοπίσει την πλατφόρμα αφήνεται πάνω σε αυτή περίπου 15 sec, ώστε να την εξερευνήσει, και, στη συνέχεια, απομακρύνεται από αυτή. Αν δεν καταφέρει εντός των 90 sec κάθε δοκιμής να εντοπίσει την πλατφόρμα, καθοδηγείται από τον χειριστή προς το σημείο εύρεσής της. Μέσω υπολογιστικού προγράμματος (EthoVision XT) καταγράφεται η ταχύτητα πλοήγησης και η διάρκεια πλοήγησης μέχρι να εντοπιστεί από τον επίμυ η πλατφόρμα. Η δοκιμασία αυτή εξετάζει την ικανότητα πλοήγησης του τρωκτικού, μέσω σχηματισμού ενός χωρικού-γνωστικού χάρτη που βασίζεται στα σταθερά εξωτερικά οπτικά σημεία-αντικείμενα του δωματίου (**acquisition trials**).
- Τη δεύτερη και την τρίτη ημέρα, επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία εκπαίδευσης με την πρώτη μέρα. Η πλατφόρμα βυθίζεται στο νερό στο ίδιο σημείο με την πρώτη μέρα.

Η διαφορά τώρα είναι ότι ο επίμυς εισάγεται σε κάθε μια από τις τέσσερις δοκιμές από διαφορετικό σημείο του ορίζοντα σε σχέση με τις προηγούμενες μέρες. Ο επίμυς εκπαιδεύεται και πάλι να εντοπίσει την **κρυμμένη πλατφόρμα**, μέχρι να επιτύχει το κριτήριο εύρεσης της πλατφόρμας (**acquisition trials**).

- Την τέταρτη ημέρα **η πλατφόρμα αφαιρείται** τελείως από την πισίνα και ο επίμυς εξετάζεται σε μια δοκιμή διάρκειας 60 sec (**probe trial**) όπου μελετάται η ικανότητά του να αναγνωρίζει τη χωρική τοποθεσία που είχε συνδεθεί με την ύπαρξη της κρυμμένης πλατφόρμας. Και πάλι καταγράφονται τα μονοπάτια κίνησης, η ταχύτητα κολύμβησης, το μήκος της ολικής διανυστικής απόστασης, ο λανθάνων χρόνος (latency) εύρεσης του τεταρτημορίου που είχε συνδεθεί με την ύπαρξη της πλατφόρμας και οι διελεύσεις από όλα τα σημεία της πισίνας, με σκοπό να αξιολογηθούν η χωρική μνήμη και μάθηση.
- Την πέμπτη και έκτη ημέρα, η πλατφόρμα επανατοποθετείται **κρυμμένη σε μια νέα θέση, αντιδιαμετρική** της θέσης που βρισκόταν στα acquisition trials των ημερών ένα, δύο και τρία, και ο επίμυς εκπαιδεύεται εκ νέου σε τέσσερις δοκιμασίες (διάρκειας 90 sec) κάθε ημέρα (**acquisition of reversal trials**), με στόχο να επιτύχει το κριτήριο εύρεσης της πλατφόρμας. Με τη δοκιμασία αυτή ελέγχεται η γνωστική ικανότητα προσαρμογής του επίμου στον νέο κανόνα (cognitive flexibility).
- Την έβδομη ημέρα **η πλατφόρμα αφαιρείται** τελείως από την πισίνα και ο επίμυς εξετάζεται σε μια δοκιμή (**probe reversal trial**) διάρκειας 60 sec που μελετά την ικανότητά του να αναγνωρίζει τη χωρική τοποθεσία που είχε συνδεθεί με την ύπαρξη της κρυμμένης πλατφόρμας και καταγράφονται οι ίδιες παράμετροι όπως περιγράφηκαν στο probe trial.
- Την όγδοη ημέρα ελέγχεται ο φυσιολογικός οπτικοκινητικός συντονισμός των επιμύων. Ειδικότερα, **αφαιρούνται από τον περιβάλλοντα χώρο τα οπτικά ερεθίσματα** και η πλατφόρμα καθίσταται **ορατή**. Ο επίμυς εισάγεται στην πισίνα για τέσσερις συνεχόμενες δοκιμές (διάρκειας 90 sec). Η κατεύθυνση εισόδου του επίμου στο νερό γίνεται κάθε φορά από διαφορετικό σημείο για καθεμία από τις τέσσερις δοκιμές. Καταγράφεται και πάλι η χρονική διάρκεια εύρεσης της ορατής πλατφόρμας.

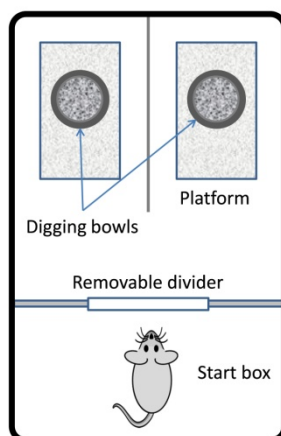
2.2.1.4 Δοκιμασία Μετατόπισης της Προσοχής (Attentional Set Shift Test, ASST)

Για την εξέταση της επίδρασης του φαρμάκου (Δ^9 -THC) σε ανώτερες εκτελεστικές λειτουργίες διεξήχθη η **Δοκιμασία Μετατόπισης της Προσοχής** (Birell and Brown, 2000). Πριν την έναρξη της δοκιμασίας οι επίμυες βρίσκονται σε περιορισμό τροφής για διάστημα μιας εβδομάδας (λαμβάνουν το 80% των ημερήσιων τροφικών τους αναγκών). Στη συνέχεια, εκπαιδεύονται να σκάβουν σε δύο μικρά δοχεία, με σκοπό να ανακτήσουν μια τροφή-δόλωμα που βρίσκεται κρυμμένη σε αυτά και τους δίνει μεγάλη ευχαρίστηση (Honey Nut Cheerios).

- Όταν μάθουν να σκάβουν στα δοχεία και να τρώνε την τροφή που εντοπίζουν, εκπαιδεύονται στην εκτέλεση ενός κανόνα απλής διάκρισης (**Simple Discrimination, SD**). Δηλαδή, εκπαιδεύονται να διακρίνουν τα δύο δοχεία που διαφέρουν ως προς μια διάσταση: π.χ. είναι γεμισμένα με το ίδιο μέσον (πριονίδι) αλλά το κάθε ένα έχει διαφορετική οσμή (π.χ. κανέλλα/γαρύφαλλο) και η τροφή-δόλωμα βρίσκεται σταθερά στο δοχείο με τη μία από τις δύο οσμές. Κριτήριο επιτυχίας είναι ο σωστός εντοπισμός του δοχείου που περιέχει την τροφή-δόλωμα για 6 συνεχόμενες φορές.
- Κατά την ημέρα της δοκιμασίας οι επίμυες εξετάζονται σε μια σειρά από διακρίσεις: Simple Discrimination (SD), Compound Discrimination (CD), CD Reversal (CD R), Intradimensional Shift (ID), ID Reversal (ID R), Extradimensional Shift (ED) και ED Reversal (ED R), σε καθεμία από τις οποίες πρέπει να επιτύχουν 6 συνεχόμενες σωστές επιλογές.
- Η δοκιμασία **SD** πραγματοποιείται όμοια με τη φάση της εκπαίδευσης και ακολουθείται από τη δοκιμασία **CD**, όπου εισάγεται μια δεύτερη διάσταση (το μέσο με το οποίο είναι γεμισμένα τα δοχεία, π.χ. σφαιρίδια αλουμινοχαρτου/άμμος), αλλά η συσχέτιση του σωστού (ύπαρξη τροφής) με την εξεταζόμενη διάσταση (οσμή, καφές) παραμένει σταθερή.
- Η δοκιμασία **CD** ακολουθείται από το **CD Reversal (CD R)**, όπου διατηρείται μεν η συσχέτιση τροφής και εξεταζόμενης διάστασης (οσμή) αλλά ο κανόνας αντιστρέφεται και ο επίμυς πρέπει να μάθει ότι η τροφή σχετίζεται πλέον με την άλλη οσμή (καφές: όχι τροφή – κακάο: ναι τροφή).
- Στη δοκιμασία **ID**, εισάγονται νέα παραδείγματα συσχετίσεων για τις δύο διαστάσεις, δηλαδή νέες οσμές και νέα μέσα, αλλά η ύπαρξη τροφής σχετίζεται και πάλι με τη ίδια διάσταση (οσμή). Στην επακόλουθη **ID R** αντιστρέφεται ο κανόνας συσχέτισης τροφής-οσμής, όπως και στη **CDR**.
- Τέλος, στη δοκιμασία **ED**, εισάγονται πάλι νέα παραδείγματα συσχετίσεων για τις δύο παραμέτρους, δηλαδή νέες οσμές και νέα μέσα, αλλά πλέον η ύπαρξη τροφής σχετίζεται με

την άλλη διάσταση (μέσον). Στην επακόλουθη **ED R**, αντιστρέφεται ο κανόνας συσχέτισης τροφής-μέσου.

Κατά τη διάρκεια κάθε δοκιμασίας καταγράφονται όλες οι επιλογές - σωστές και λανθασμένες - του πειραματοζώου, ο αριθμός των επιλογών του μέχρι να επιτύχει 6 συνεχόμενες σωστές, ο αριθμός των λαθών, καθώς και ο χρόνος που απαιτείται για την επιτυχή έκβαση της δοκιμασίας (**Εικόνα 2.6**).



Εικόνα 2.6. Η πειραματική διάταξη της δοκιμασίας Μετατόπισης της Προσοχής.

2.2.1.5 Δοκιμασία Προ-Παλμικής Αναστολής του Αντανακλαστικού Αιφνιδιασμού (Pre-Pulse Inhibition test, PPI)

Για την εξέταση της επίδρασης του φαρμάκου (Δ^9 -THC) στον έλεγχο της αισθητικοκινητικής απάντησης σε συγκεκριμένη ροή πληροφορίας, διεξήχθη η **Δοκιμασία Προ-Παλμικής Αναστολής του Αντανακλαστικού Αιφνιδιασμού**. Η δοκιμασία αυτή χρησιμοποιεί ακουστικά ερεθίσματα προκειμένου να εξεταστεί ο αισθητικοκινητικός ηθμός σε συγκεκριμένη ροή πληροφορίας, μια διαδικασία που διαταράσσεται στη σχιζοφρένεια. Η δοκιμασία διεξήχθη σύμφωνα με προηγούμενα ερευνητικά πρωτόκολλα, με ορισμένες τροποποιήσεις (Geyer et al., 2002). Ειδικότερα:

- Την πρώτη ημέρα της δοκιμασίας οι επίμυες εισάγονται σε έναν ειδικό αυτόματο κλωβό, με ανιχνευτές μέτρησης της ολικής αντίδρασης του σώματος του πειραματοζώου, και αφήνονται να εξοικειωθούν με το χώρο για διάστημα 5 λεπτών. Στη συνέχεια, δέχονται με τυχαία σειρά ακουστικά ερεθίσματα αιφνιδιασμού 70, 80, 90, 100, 110 και 120 dB για 40 ms το καθένα, με 20 sec ως ενδιάμεσο χρονικό διάστημα μεταξύ των ακουστικών ερεθισμάτων (intertrial interval). Το κάθε ερέθισμα επαναλαμβάνεται με τυχαία σειρά για πέντε φορές.

Ως ακουστικό ερέθισμα αιφνιδιασμού χρησιμοποιείται ένας λευκός θόρυβος. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας καταγράφεται μέσω υπολογιστικού προγράμματος (Startle V1.2) η απόκριση στο ερέθισμα αιφνιδιασμού και η αντανακλαστική συμπεριφορά αποστροφής σε αυτό (**αντανακλαστικό αιφνιδιασμού, startle reflex**). Ειδικότερα υπολογίζεται ο μέσος όρος των τιμών του εύρους (amplitude) κάθε αντανακλαστικής απόκρισης για καθένα από τα έξι ακουστικά ερεθίσματα αιφνιδιασμού (70, 80, 90, 100, 110 και 120 dB) (**Εικόνα 2.7**).

- Τη δεύτερη ημέρα ο επίμυς εισάγεται εκ νέου στον ίδιο κλωβό. Προηγείται ένα διάστημα εξοικείωσης με το χώρο για 5 λεπτά και, στη συνέχεια, δέχεται έναν ηχητικό παλμό (**προ-παλμό, pre-pulse**) που προηγείται του κύριου δυνατού ερεθίσματος αιφνιδιασμού των 115 dB. Πιο συγκεκριμένα, δέχεται για 20 ms, τυχαία, καθέναν από τους παρακάτω συνδυασμούς (από 10 φορές κάθε συνδυασμό με ενδιάμεσα διαστήματα 20 sec): προ-παλμός: 75 dB – παλμός: 115 dB; προ-παλμός: 80 dB – παλμός: 115 dB; προ-παλμός: 85 dB – παλμός: 115 dB; προ-παλμός: 90 dB – παλμός: 115 dB; προ-παλμός: όχι – παλμός: 115 dB. Καταγράφεται και πάλι το αντανακλαστικό της απόκρισης και υπολογίζεται το **ποσοστό προ-παλμικής αναστολής του αντανακλαστικού του αιφνιδιασμού (pre-pulse inhibition)**. Ειδικότερα, το ποσοστό αυτό υπολογίζεται για κάθε ζεύγος προ-παλμού + παλμού 115 dB από τη σχέση:

$$\% \text{ αναστολής} = [(\text{εύρος αντανακλαστικού απόκρισης στα 115 dB} - \text{εύρος αντανακλαστικού απόκρισης στον εκάστοτε προ-παλμό}) / \text{εύρος αντανακλαστικού απόκρισης στον εκάστοτε προ-παλμό}] * 100$$

Σε φυσιολογικά πειραματόζωα εάν ένας ηχητικός προ-παλμός προηγηθεί του δυνατού ερεθίσματος αιφνιδιασμού, μειώνει το αντανακλαστικό του αιφνιδιασμού.



Εικόνα 2.7. Η πειραματική διάταξη ηχομονωμένου θαλάμου εκτέλεσης της δοκιμασίας Προ-Παλμικής Αναστολής του Αντανακλαστικού του Αιφνιδιασμού.

2.2.1.6 Μέτρηση κινητικής δραστηριότητας μετά από οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης

Κατά τον προσδιορισμό της κινητικής δραστηριότητας στην ενηλικίωση, τα πειραματόζωα που έλαβαν χαμηλές κλιμακούμενες δόσεις Δ^9 -THC κατά την εφηβεία, αφήνονται για διάστημα 20 λεπτών στον κλωβό ανοικτού πεδίου, ώστε να εξερευνήσουν το καινούργιο περιβάλλον και **10 λεπτά πριν την έναρξη της καταγραφής της κινητικότητάς τους λαμβάνουν μια οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης** (1mg/kg, i.p.) [βλ. Εικόνα 2.2]. Η **εξοικείωση** με το νέο περιβάλλον παίζει καθοριστικό ρόλο στην αξιολόγηση διεγερτικών δράσεων στις παραμέτρους της κινητικότητας, καθώς η συμπεριφορά μη-εξοικειωμένων επιμύων κατά την έκθεσή τους σε ένα νέο περιβάλλον μπορεί να συγκαλύψει την αύξηση της κινητικής δραστηριότητας. Κάθε επίμυς, τοποθετείται εντός του κλωβού και παραμένει εκεί για μια ώρα, κατά τη διάρκεια της οποίας γίνεται η αυτόματη καταγραφή μιας σειράς κινητικών παραμέτρων, όπως της **οριζόντιας κινητικότητας** - εκφρασμένη ως διανυθείσα απόσταση, και ως συχνότητα οριζόντιας κινητικότητας (ambulatory distance και ambulatory counts, αντίστοιχα) - και της **κάθετης κινητικότητας** - εκφρασμένη ως συχνότητα κάθετης κινητικότητας (vertical counts). Με την ολοκλήρωση της μίας ώρας παραμονής στον κλωβό ο επίμυς επιστρέφεται στον κλωβό διαβίωσής του.

2.2.2 Θυσία των Πειραματοζώων

Στις ομάδες επιμύων που έλαβαν το φαρμακολογικό μοντέλο χαμηλών δόσεων Δ^9 -THC κατά την εφηβεία, πραγματοποιείται κατά την ενηλικίωση (PND>90) η θυσία τους ώστε να ακολουθήσει η απομάκρυνση του εγκεφάλου τους και η απομόνωση συγκεκριμένων εγκεφαλικών περιοχών ενδιαφέροντος. Η διαδικασία του αποκεφαλισμού υλοποιείται με τη βοήθεια λαμητόμου.

A) Ομογενοποίηση ιστών με σκοπό τον προσδιορισμό νευροχημικών δεικτών

Από τις προς μελέτη ομάδες επιμύων συλλέχθηκαν συγκεκριμένες περιοχές ενδιαφέροντος, με σκοπό να διεξαχθεί η νευροχημική ανάλυση των δεικτών της ντοπαμινεργικής και σεροτονεργικής δραστηριότητας. Αναλυτικότερα, μετά την απομάκρυνση του εγκεφάλου, έπεται η απομόνωση των λειτουργικών περιοχών ενδιαφέροντος, που στη συγκεκριμένη μελέτη αφορά αυτές του ιπποκάμπου (hippocampus, HIPPO), του προμετωπιαίου φλοιού (prefrontal cortex, PFC), του ραχιαίου ραβδωτού σώματος (dorsal striatum, DS) και του επικλινή πυρήνα του διαφράγματος (nucleus accumbens, NAC) και εναποτίθενται σε προζυγισμένα και

προσημειωμένα με τον αριθμό του πειραματόζωου σωληνάρια erpendorf που είναι εμβαπτισμένα σε πάγο. Ακολουθεί ζύγιση των συμπληρωμένων erpendorf, ώστε αφαιρώντας την τιμή του προζυγισμένου σωληναρίου να υπολογιστεί το βάρος του εγκεφαλικού ιστού, σύμφωνα με την απλή σχέση:

$$\text{Βάρος ιστού (mg)} = \text{Βάρος (erpendorf + ιστού) (mg)} - \text{Βάρος erpendorf (mg)}$$

Ύστερα, πραγματοποιείται ομογενοποίηση των προς επεξεργασία δειγμάτων με τη βοήθεια συστήματος υπερήχων (Virsonic) για περίπου 40 δευτερόλεπτα (20 δευτερόλεπτα x 2 φορές με ενδιάμεσο διάλειμμα 10 δευτερολέπτων) σε 500 μl διαλύματος HClO₄ 0.2 M για τον ιππόκαμπο και 250 μl διαλύματος HClO₄ 0.2 M για όλες τις άλλες περιοχές αντίστοιχα (Karege et al, 1987). Για την παρασκευή του διαλύματος ομογενοποίησης ακολουθείται η εξής διαδικασία: Σε 1 L ζυγίζονται οι ποσότητες: 1.5 g δισουλφίδιο του νατρίου (Na₂S₂O₅), 0.5 g EDTA και 17.2 ml πυκνό HClO₄ (70%). Τα αντιδραστήρια διαλύονται σε δις αποσταγμένο νερό (ddH₂O) με μαγνητική ανάδευση, ενώ για την αποφυγή σχηματισμού αδιάλυτου συμπλόκου το οποίο διασπάται μόνο με υπερήχους, η προσθήκη του EDTA γίνεται μετά την πλήρη διάλυση του Na₂S₂O₅. Το διάλυμα τοποθετείται σε σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάσσεται στους 4 °C μέχρι τη χρήση του.

Σε όλη τη διαδικασία της ομογενοποίησης είναι σημαντικό τα erpendorf να παραμένουν στον πάγο καθώς, λόγω των υπερήχων αυξάνεται η θερμοκρασία και υπάρχει κίνδυνος διάσπασης των βιογενών αμινών. Μετά το τέλος της ομογενοποίησης του κάθε ιστού το σύστημα των υπερήχων ξεπλένεται με διάλυμα HClO₄ και το μη διαυγές ομογενοποίημα, με τη μορφή εναιωρήματος, φυγοκεντρείται σε φυγόκεντρο Eppendorf® 5415C (Eppendorf Co., Γερμανία) στις 14000 στροφές (r.p.m.) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C. Τα υπερκείμενα μεταφέρονται απ' ευθείας σε νέα προσημειωμένα σωληνάρια erpendorf και γίνεται αποθήκευσή τους στους -80 °C, έως ότου αναλυθούν με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (Kokras et al., 2018; Antoniou et al., 2017; Polissidis et al., 2012, 2014).

B) Ομογενοποίηση ιστών με σκοπό τον προσδιορισμό της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Από τις προς μελέτη ομάδες επιμύων, που έλαβαν τους ίδιους φαρμακολογικούς χειρισμούς, συλλέχθηκαν οι προαναφερθείσες περιοχές ενδιαφέροντος (ιππόκαμπος, προμετωπιαίος φλοιός,

ραχιαίο ραβδωτό σώμα και επικλινής πυρήνας του διαφράγματος) με στόχο να αναλυθούν τα ολικά επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνικών δεικτών.

Οι ιστοί που απομονώθηκαν από τους επίμυες ομογενοποιούνται με τη βοήθεια συστήματος υπερήχων (Virsonic) σε 1.5:1 (w/v) ποσότητα διαλύματος ομογενοποίησης Hepes (**Πίνακας 2.1**). Καθ' όλη τη διάρκεια λύσης και ομογενοποίησης των ιστών τα δείγματα κρατούνται στον πάγο. Κατόπιν, τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 30 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (Eppendorf® 5415C) στις 14.000 στροφές (rpm) σε θερμοκρασία 4°C (Rentesi et al, 2013; Polissidis et al., 2010).

Τα ληφθέντα υπερκείμενα μεταφέρονται σε νέα σωληνάρια eppendorf και αποθηκεύονται στους -80°C, έως ότου αναλυθούν με τη μέθοδο της Ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Πίνακας 2.1. Σύσταση του διαλύματος ομογενοποίησης
50 mM Hepes (pH=7.4)
0,5% NP40
10% glycerol
137 mM NaCl
d.dH ₂ O
Protease Inhibitors cocktail
10 mM NaF
100 mM DTT

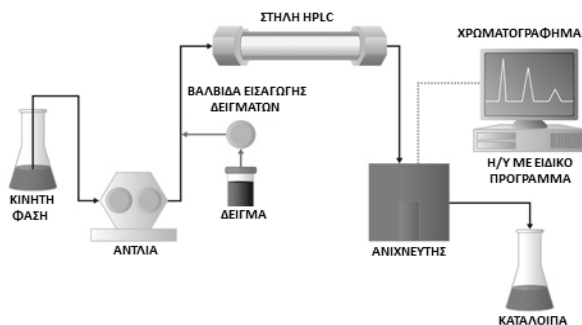
Η μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης του ομογενοποιημένου πραγματοποιείται με τη μέθοδο BCA (Bicinchoninic Acid), χρησιμοποιώντας το πακέτο BCA Protein Assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit), με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου Nanodrop.

Αρχικά, κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης, με τον προσδιορισμό της BCA σε διάφορες συγκεντρώσεις. Παρασκευάζονται stock διαλύματα του 1 ml με συγκεντρώσεις 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1 mg/ml, 1.5 mg/ml και 2 mg/ml BCA σε dH₂O. Σε 5 µl των παραπάνω αραιώσεων προστίθενται από 100µl από το working reagent. Τα δείγματα αναδεύονται, επωάζονται για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο 37°C και μετράται η απορρόφησή τους στα 562 nm. Παράλληλα, ακολουθείται η ίδια διαδικασία και για τα άγνωστα δείγματα ιστού, αφού πρώτα αραιωθούν κατάλληλα.

Από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς, η οποία σχεδιάζεται με βάση την απορρόφηση των διαλυμάτων της BCA, υπολογίζεται η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος σε mg/ml.

2.2.3 Μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με Ηλεκτροχημικό Ανιχνευτή (HPLC-ED) για τον προσδιορισμό της ντοπαμίνης, της σεροτονίνης και μεταβολιτών τους

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων ντοπαμίνης, σεροτονίνης και μεταβολιτών τους στις εγκεφαλικές περιοχές που έχουν απομονωθεί, δηλαδή για τη συγκεκριμένη μελέτη στον υπόκαμπο, στον προμετωπιαίο φλοιό, στο ραχιαίο ραβδωτό σώμα και στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος, γίνεται χρήση της μεθόδου της **Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) με Ηλεκτροχημικό Ανιχνευτή (Electrochemical Detector, ED)** (Kokras et al., 2018; Gemmel et al., 2016). Η μέθοδος αυτή αποτελεί μια γρήγορη τεχνική για την ανάλυση μιγμάτων ουσιών, τόσο ποιοτικά, όσο και ποσοτικά. Η βασική διάταξη ενός τέτοιου συστήματος HPLC αποτελείται από την αντλία, τη βαλβίδα εισαγωγής δείγματος, τη χρωματογραφική στήλη, τον ανιχνευτή και το καταγραφικό, το οποίο συνήθως είναι ένας ηλεκτρονικός υπολογιστής (H/Y). Με τη βοήθεια της αντλίας, το προς εξέταση δείγμα διαπερνά τη χρωματογραφική στήλη, από την οποία παρακρατείται για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, χαρακτηριστικό για κάθε ουσία που αναλύεται κάτω από τις ίδιες συνθήκες (**Εικόνα 2.8**).



Εικόνα 2.8. Βασική διάταξη συστήματος HPLC.

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στις δυνάμεις συγκράτησης και έκλουσης μεταξύ των προς ανάλυση ουσιών, του υλικού πλήρωσης της στήλης και του φέροντος διαλύτη (κινητή φάση) με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό βάσει της πολικότητας. Λόγω της ροής της κινητής φάσης οι ουσίες συμπαρασύρονται έξω από τη χρωματογραφική στήλη και στη συνέχεια ανιχνεύονται με τη βοήθεια κατάλληλου ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής αυτός είναι ηλεκτροχημικός όταν οι αναλύόμενες ουσίες εμφανίζουν οξειδοαναγωγικές ιδιότητες και η ανίχνευσή τους στηρίζεται

στην παραγωγή ηλεκτρικού ρεύματος κατά την αντίδραση που πραγματοποιείται μέσα στην κυψελίδα λόγω της ανταλλαγής ηλεκτρονίων μεταξύ της χημικής ουσίας και του ηλεκτροδίου του ανιχνευτή. Αντίδραση οξείδωσης λαμβάνει χώρα όταν το μόριο της ουσίας δίνει ηλεκτρόνια, ενώ αναγωγή συμβαίνει όταν το ηλεκτρόδιο δρα ως δότης ηλεκτρονίων.

Στην περίπτωση των βιογενών αμινών, που μας αφορά, ένα μόριο κατεχολαμίνης που περιέχει ομάδες υδροξυλίου (-OH) εισέρχεται στην κυψελίδα του ανιχνευτή και πραγματοποιείται οξείδωση δίνοντας δύο ηλεκτρόνια στο ηλεκτρόδιο, με αποτέλεσμα την παραγωγή δυο υδρογονοκατιόντων (H⁺) και μιας κινόνης. Το παραγόμενο ηλεκτρικό ρεύμα καλείται «επαγωγικό ρεύμα» και η ανιχνεύσιμη ουσία καταγράφεται στο χρωματογράφημα ως κορυφή, το εμβαδόν της οποίας είναι ανάλογο της συγκέντρωσής της στο δείγμα.

Η αντλία του συστήματος HPLC που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα για την ανάλυση των πειραματικών δειγμάτων είναι η LC 1150 (GBC) και ο ηλεκτροχημικός ανιχνευτής ο BAS LC4C. Η στήλη διαχωρισμού είναι η Hypersil GOLD aQ διαστάσεων 150 x 2.1 mm, 5 μm, ενώ η κινητή φάση προκύπτει με την ανάμειξη διαλύματος A και ακετονιτριλίου (ACN) σε αναλογία 90:10, το οποίο παρασκευάζεται καθημερινά και διηθείται μέσα από φίλτρα κυτταρίνης (Millipore, MAΛBA, Ελλάς) λίγο πριν την ανάλυση. Η σύσταση του διαλύματος A προκύπτει ως εξής: Σε 1 L προστίθενται οι ποσότητες: 8.9 g όξινο φωσφορικό νάτριο (Na₂HPO₄ · 2H₂O), 300 mg οκτυλοσουλφίδιο του νατρίου (C₈H₁₅SO₄Na) και 20 mg EDTA. Οι ουσίες αυτές διαλύονται σε δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O) με μαγνητική ανάδευση και ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στην τιμή 2.9 με ορθοφωσφορικό οξύ. Στη συνέχεια, το διάλυμα ογκομετρείται στο 1L και φυλάσσεται στους 4°C.

Η χρωματογραφική εκτίμηση των νευροδιαβιβαστών είναι μια ισοκρατική ανάλυση και μπορεί να προσδιορίσει σημαντικό αριθμό αυτών, καθώς και των μεταβολιτών τους, στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) του επίμυ. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή οι προς μελέτη νευροδιαβιβαστές είναι η ντοπαμίνη (DA) και οι μεταβολίτες της, διϋδροξυφαινυλοξικό οξύ (DOPAC) και ομοβανιλλικό οξύ (HVA), όπως επίσης και η σεροτονίνη (5-HT) με τον μεταβολίτη της, 5-υδροξυϊνδολοξικό οξύ (5-HIAA).

Η στήλη και η κινητή φάση πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ είναι απαραίτητο για την πρώτη να πλένεται με υδατικό διάλυμα ACN 7% με χαμηλή ροή (0.1-0.2 ml/min) για 24 ώρες μετά την τοποθέτησή της στο σύστημα και μετά το τέλος κάθε ανάλυσης. Οι αρχικές ρυθμίσεις αφορούν τη ροή της κινητής φάσης που καθορίζεται στα 0.2 ml/min, τον χρόνο έκλουσης από τη στήλη στα 20 min και το δυναμικό του ηλεκτροχημικού ανιχνευτή στα

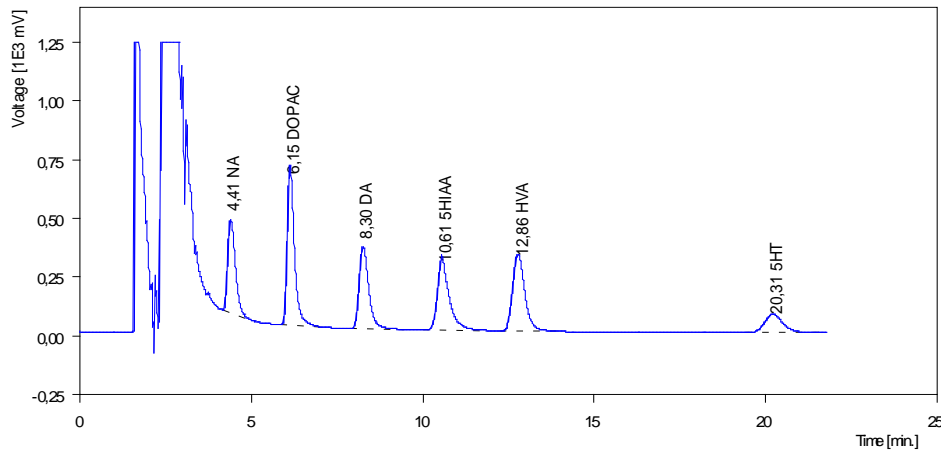
800 Volt. Ο όγκος του δείγματος που παραλαμβάνεται από το σύστημα, που είναι 27 μl, εγχύεται χειροκίνητα με σύριγγα.

Το πειραματικό πρωτόκολλο περιλαμβάνει την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων των βιογενών αμινών, την καταγραφή των επιπέδων τους σε κάθε δείγμα και την ποσοτικοποίηση των δεδομένων που έχουν ληφθεί: Η παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων, δηλαδή των νευροδιαβιβαστών και των μεταβολιτών τους (DOPAC, DA, HVA, 5-ΗΙΑΑ, 5-ΗΤ), πραγματοποιείται καθημερινά πριν την ανάλυση. Αρχικά, ζυγίζεται 1 mg από κάθε πρότυπη ουσία, το οποίο προστίθεται σε 5 ml HClO₄ 0.2 N και γίνεται ανάδευση μέχρι την πλήρη διάλυση όλων των συστατικών. Το πρότυπο αυτό διάλυμα (stock solution) χωρίζεται σε κλάσματα (aliquots) των 30 μl που αποθηκεύονται στους -80°C. Στη συνέχεια, σε δοκιμαστικό σωλήνα γίνεται προσθήκη 4,940 μl HClO₄ 0.2 N και 10 μl από κάθε «stock solution» νευροδιαβιβαστών μέχρι ο τελικός όγκος να είναι 5 ml (Διάλυμα C) και ακολουθούν δυο διαδοχικές αραιώσεις. Έπειτα, σε ένα erpendorf αναμειγνύονται 800 μl HClO₄ 0.2 N και 200 μl από το πρότυπο διάλυμα C με ισχυρή ανάδευση. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος (standard 1) είναι 80 ng/ml για κάθε νευροδιαβιβαστή. Τέλος, πραγματοποιείται αραιώση 1:1 του προηγούμενου διαλύματος, δηλαδή 500 μl standard 1 προστίθενται σε 500 μl HClO₄ 0.2 N, για τη δημιουργία νέου (standard 2) με συγκέντρωση 40 ng/ml για κάθε νευροδιαβιβαστή.

Για την ανάλυση των δειγμάτων, το πρώτο βήμα που λαμβάνει χώρα αφορά στην κινητή φάση, η οποία, αφού τοποθετηθεί στις γυάλινες φιάλες των διαλυτών, απαερώνεται χειροκίνητα για περίπου 5 λεπτά και απομακρύνεται μέρος της στα απόβλητα (purge) ώστε να αποφευχθεί η διέλευση φυσαλίδων μέσα από τη στήλη. Ακολούθως, διέρχεται μέσα από τη στήλη με ροή 0.2 ml/min για 15 λεπτά και στη συνέχεια ενεργοποιείται ο ανιχνευτής. Μόλις αυτός σταθεροποιηθεί σε μια τιμή περίπου στα 0,0015 A, παρακολουθείται το σήμα του (baseline) για 20 λεπτά μέχρις ότου να διαγράψει μια επίπεδη γραμμή στο χρωματογράφημα χωρίς ιδιαίτερο θόρυβο. Έπειτα η απόψυξη των προς ανάλυση δειγμάτων, ενώ παράλληλα γίνεται η προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις νευροδιαβιβαστών, σύμφωνα με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω, ώστε να μπορέσει να γίνει η δημιουργία της πρότυπης καμπύλης.

Από την κάθε πρότυπη ουσία ο δειγματολήπτης εγχύει 27 μl μέσα στη στήλη και με το πέρας της έκλουσης καταγράφεται ο χρόνος συγκράτησης (Retention time, Rt) και το εμβαδόν της κάθε κορυφής. Με βάση τις συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων και την τιμή του εμβαδού της κάθε κορυφής κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς για κάθε νευροδιαβιβαστή με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού του προγράμματος του Η/Υ (**Εικόνα**

2.9). Μετά ακολουθεί η μέτρηση των δειγμάτων και η τιμή του εμβαδού κάθε νευροδιαβιβαστή εισάγεται στην εξίσωση της ευθείας που προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς, ώστε να προκύψουν οι συγκεντρώσεις των κατεχολαμινών στο άγνωστο δείγμα.



Εικόνα 2.9. Ενδεικτικό χρωματογράφημα ανάλυσης μονοαμινών σε πρότυπο διάλυμα με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με Ηλεκτρονικό Ανιχνευτή.

Για τη μελέτη της λειτουργίας της ντοπαμινεργικής και σεροτονεργικής λειτουργίας, εκτός από την εκτίμηση των ολικών επιπέδων των νευροδιαβιβαστών και των μεταβολιτών τους, υπολογίζονται και οι ρυθμοί ανακύκλωσης (turnover rates) της ντοπαμίνης (DA) και της σεροτονίνης (5-HT). Πιο συγκεκριμένα, ως ρυθμός ανακύκλωσης για τη ντοπαμίνη ορίζεται ο λόγος της συγκέντρωσης του μεταβολίτη (DOPAC) της ντοπαμίνης (DA) προς τη συγκέντρωση της DA, δηλαδή DOPAC/DA και, αντίστοιχα, ως ρυθμός ανακύκλωσης για τη σεροτονίνη ορίζεται ο λόγος της συγκέντρωσης του μεταβολίτη (5-HIAA) της σεροτονίνης (5-HT) προς τη συγκέντρωση της 5-HT, δηλαδή 5-HIAA/5-HT (Commissiong, 1985). Το πηλίκο αυτό είναι ενδεικτικό του ρυθμού απελευθέρωσης, επαναπρόσληψης και μεταβολισμού των νευροδιαβιβαστών:

$$\text{Turnover Ratio}_{(DA)} = \text{DOPAC}/\text{DA}$$

Σχέση 2.2

$$\text{Turnover Ratio}_{(5-HT)} = 5\text{-HIAA}/5\text{-HT}$$

Σχέση 2.3

2.2.4 Νευροβιολογικές Μέθοδοι

Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)

Η τεχνική του **Western Blot** επιτρέπει την εκλεκτική ανίχνευση μιας πρωτεΐνης- αντιγόνου, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων που έχουν παρασκευαστεί για αυτό το σκοπό. Η μέθοδος περιλαμβάνει: α) την ηλεκτροφορητική ανάλυση ενός πρωτεϊνούχου διαλύματος σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, β) την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και γ) τη δέσμευση των ειδικών αντισωμάτων στην πρωτεΐνη-αντιγόνο. Μετά την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης της μεμβράνης (blocking) πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης με ειδικό έναντι του υπό μελέτη αντιγόνου αντίσωμα. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επώαζεται με άλλο αντίσωμα που αναγνωρίζει την Fc σταθερή περιοχή (fragment crystallizable region) του πρώτου αντισώματος. Το δεύτερο αντίσωμα είναι σημασμένο είτε ενζυμικά είτε ραδιενεργά, οπότε είναι δυνατή η ανίχνευση του συμπλόκου αντιγόνου - αντισώματος μετά την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη μπορεί να απεικονισθεί και να ποσοτικοποιηθεί με την εμφάνιση σε φωτογραφικό φιλμ ή σε άλλο σύστημα απεικόνισης.

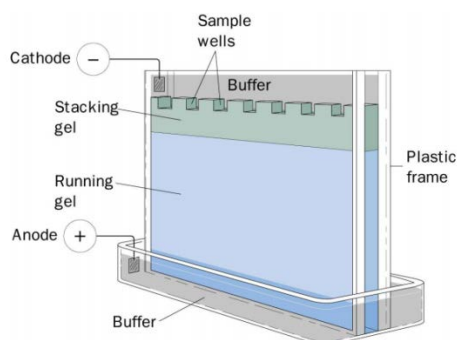
Αναλυτικότερα, η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μέγεθος τους, καθώς επίσης και το φορτίο τους. Με ηλεκτροφόρηση σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσίαθειϊκού δωδεκυλικού νατρίου (SDS) επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος (Laemmli, 1970). Μετά από έκθεση σε αρνητικά φορτισμένο απορρυπαντικό SDS οι πρωτεΐνες αποκτούν αρνητικό φορτίο (σε κάθε αμινοξύ μιας πρωτεΐνης δεσμεύεται περίπου ένα μόριο SDS) και μετακινούνται προς το θετικό πόλο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθός τους. Κατά τη μέθοδο της κάθετης ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες τοποθετούνται αρχικά σε πήκτωμα χαμηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο (πήκτωμα επιστοίβαξης), ενώ ο διαχωρισμός πραγματοποιείται, αφού οι πρωτεΐνες περάσουν σε πήκτωμα υψηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο (πήκτωμα διαχωρισμού) (**Εικόνα 2.10**).

i. Παρασκευή πήκτωματος πολυακρυλαμιδίου

Το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel) περιέχει ddH₂O, 1M Tris-HCl, pH=6.8, 10% w/v SDS και 5% w/v ακρυλαμίδιο. Το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel), περιέχει ddH₂O, 1,5M Tris-HCl, pH=8,8, 10% w/v SDS και 12% w/v πολυακρυλαμίδιο. Ο πολυμερισμός των πήκτωμάτων πραγματοποιείται με προσθήκη 10% w/v ammonium persulfate (APS) και tetramethylethylenediamine (TEMED), ως καταλύτη πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου.

ii. Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα (50 µg πρωτεΐνης) αφήνονται να ξεπαγώσουν εντός πάγου και αναμειγνύονται με διάλυμα "φόρτωσης" πρωτεϊνών (SDS sample buffer) [ddH₂O; 375 M Tris-HCl, pH 6.8; 48% Glycerol; 6% w/v SDS; 9% 2-β mercaptoethanol; 0,03% bromophenol blue]. Στη συνέχεια, επωάζονται για 5 min στους 95°C. Ο βρασμός παρουσία SDS έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση δεσμών (υδρογόνου, ιοντικών, υδρόφοβων και Van der Waals αλληλεπιδράσεων), ενώ η β-μερκαπτοαιθανόλη προκαλεί αναγωγή των ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών. Έτσι, οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται.



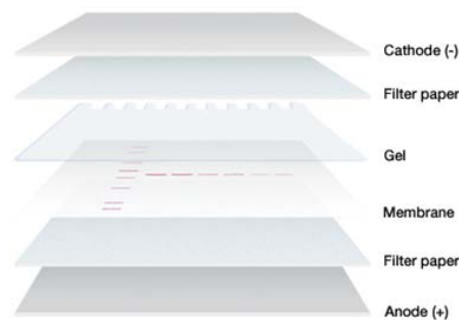
Εικόνα 2.10. Το gel διαχωρισμού και επιστοιβάξης και η διάταξη της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

iii. Ηλεκτροφόρηση

Όγκος 20 µl από κάθε δείγμα, καθώς επίσης και 2 µl πρωτεϊνικού δείκτη με γνωστό μοριακό βάρος (marker) τοποθετούνται στα φρεάτια του πηκτώματος επιστοιβάξης και στη συνέχεια η συσκευή ηλεκτροφόρησης (Biorad, Mini-PROTEAN[®]3 Cell) πληρώνεται με την ανάλογη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (Running Buffer) [Tris-base, 3,636g; Glycine, 17,292g; SDS, 1,2g σε τελικό όγκο 1,2 L με την προσθήκη ddH₂O]. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται υπό σταθερή τάση 100 V και συνεχίζεται μέχρι το μέτωπο της χρωστικής να εξέλθει από το πήκτωμα. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα επιστοιβάξης απομακρύνεται και το πήκτωμα διαχωρισμού χρησιμοποιείται για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, κομμένη στο μέγεθος του πηκτώματος, εμβαπτίζονται σε διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer) [Tris base, 0,3625g; Glycine, 0,1825g; Methanol, 12,5 mL σε τελικό όγκο 50 mL με την προσθήκη ddH₂O] και τοποθετούνται μαζί με τέσσερα διηθητικά χαρτιά τύπου Whatman, κομμένα στο μέγεθος του πηκτώματος και διαποτισμένα πλήρως με διάλυμα

μεταφοράς, σε ειδική συσκευή (Novex® Semi-Dry Blotter) ώστε να σχηματιστεί το «sandwich» της ηλεκτρομεταφοράς ως εξής: Στο κάτω ηλεκτρόδιο (θετικό) τοποθετούνται δύο διηθητικά χαρτιά Whatman, από πάνω η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και πάνω από αυτή το πήκτωμα. Τέλος, πάνω από το πήκτωμα τοποθετούνται δύο ακόμα χαρτιά Whatman (**Εικόνα 2.11**). Τα ηλεκτρόδια της συσκευής κλείνουν και η ηλεκτρομεταφορά γίνεται υπό σταθερή τάση 18V για 20 λεπτά. Κατά την ηλεκτρομεταφορά οι πρωτεΐνες του πηκτώματος μεταφέρονται ηλεκτροφορητικά πάνω σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Μετά τη μεταφορά γίνεται χρώση της μεμβράνης με κατάλληλη χρωστική (Ponceau Rouge), ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Εναλλακτικά, απόδειξη της μεταφοράς αποτελεί η παρουσία στην μεμβράνη του πρωτεϊνικού δείκτη (marker) που χρησιμοποιήθηκε και ο οποίος περιέχει χρωστική που μεταφέρεται στην μεμβράνη.



Εικόνα 2.11. Διάταξη της ηλεκτροφορητικής ημι-στεγνής μεταφοράς πρωτεϊνών.

Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτρομεταφορά, ακολουθεί ολονύκτια / overnight επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα Tris-buffered saline (TBS) με 5% w/v αποβουτυρωμένου γάλακτος σε σκόνη (Blocking Buffer) υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C. Με τη διαδικασία αυτή γίνεται δέσμευση των ελεύθερων θέσεων της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος, έτσι ώστε να παρεμποδιστεί η επακόλουθη μη ειδική πρόσδεση των χρησιμοποιούμενων αντισωμάτων στις θέσεις αυτές.

Ακολουθεί μια πλύση της μεμβράνης με TBS για 5 min και επώασή της υπό ανάδευση με το πρώτο αντίσωμα, το οποίο είναι κατάλληλα αραιωμένο σε διάλυμα 3% w/v γάλακτος/TBS/0,05% Tween-20, στους 4°C κατά τη διάρκεια της νύκτας. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν αναγνωρίζουν και συνδέονται ειδικά στην εκάστοτε πρωτεΐνη ενδιαφέροντος (**Πίνακας 2.2**). Μετά την επώαση πραγματοποιούνται δυο διαδοχικές πλύσεις με TBS/0,05% Tween-20, διάρκειας 5 min έκαστη. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης για 60 min, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ανάδευση με το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα IgG-HRP αραιωμένο σε διάλυμα 3% w/v γάλακτος/TBS/0,05% Tween-20.

Το δεύτερο αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο horseradish peroxidase (HRP) και αναγνωρίζει ανοσοσφαιρίνες του ζώου από το οποίο έχει παραχθεί το πρώτο αντίσωμα. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται δυο διαδοχικές πλύσεις με TBS/0,05% Tween-20, διάρκειας 5 min έκαστη.

Για την ανίχνευση του ειδικού σήματος εφαρμόστηκε το σύστημα χημειοφωταύγιας ECL (Biorad, Clarity™ Western ECL Blotting Substrates). Οι μεμβράνες επωάζονται σε σκοτεινό θάλαμο για 5 min στο σύστημα λουμινόλης – ενισχυτή ως εξής: αναμειγνύονται 2 ml από το κάθε συστατικό (λουμινόλη και ενισχυτής, reagents A, B) ακριβώς πριν την εφαρμογή. Η αντίδραση της λουμινόλης με το συνδεδεμένο με υπεροξειδάση (HRP) αντίσωμα οδηγεί στην οξείδωσή της. Στη συνέχεια, η λουμινόλη επανέρχεται στη βασική της κατάσταση με εκπομπή φωτονίου και παράγει έτσι φωτεινό σήμα, το οποίο αποτυπώνεται σε κατάλληλο σύστημα απεικόνισης.

Για τον έλεγχο της ισοφόρτωσης των δειγμάτων η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επαναεπωάζεται με αντίσωμα έναντι των ιδιοσυστατικών πρωτεϊνών της β-ακτίνης ή της GAPDH, το οποίο είναι κατάλληλα αραιωμένο σε διάλυμα 3% w/v γάλακτος/TBS/0,05% Tween-20, υπό ανάδευση στους 4°C. Στη συνέχεια, ακολουθείται το προαναφερθέν πρωτόκολλο πλύσεων και επώασης της μεμβράνης με το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα μέχρι την τελική ανίχνευση του σήματος μέσω του συστήματος χημειοφωταύγιας ECL.

Η οπτική πυκνότητα κάθε ζώνης πρωτεΐνης μετράται με ημιποσοτικό τρόπο με χρήση κατάλληλου λογισμικού (ImageJ for Windows). Συγκεκριμένα, ορίζεται ένα ορθογώνιο πλαίσιο σταθερού εμβαδού που περιέκλειε την κάθε ζώνη των πρωτεϊνών και μετρήθηκε η ένταση του σήματος (οπτική πυκνότητα O.D.) στο εσωτερικό του. Για την κανονικοποίηση των δειγμάτων και για να αποδοθεί η ακριβής οπτική απορρόφησή τους, η οπτική πυκνότητα κάθε ζώνης διαιρείται με την οπτική πυκνότητα της ζώνης της β-ακτίνης ή της GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) από το ίδιο δείγμα και ακολουθεί αναγωγή στα 100 (της ομάδας εκδόχου). Η β-ακτίνη και η GAPDH, χρησιμοποιούνται καθώς είναι ιδιοσυστατικές πρωτεΐνες που εκφράζονται σε αφθονία σε όλα τα κύτταρα και δεν επηρεάζονται από τις πειραματικές συνθήκες (housekeeping proteins).

Στον **Πίνακα 2.2** που ακολουθεί παραθέτονται αναλυτικά τα αντισώματα και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην Ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Πίνακας 2.2. Περιγραφή των αντισωμάτων και των συνθηκών που χρησιμοποιήθηκαν στην Ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Πρωτογενές Αντίσωμα	Προέλευση/Εταιρεία	Επόαση/Αραίωση	Διάλυμα αραίωσης
BDNF	Πολυκλωνικό (rabbit) Santa Cruz	Overnight 1:300	3% άπαχο γάλα/TBS/0.05% Tween-20
TrkB	Μονοκλωνικό (rabbit) Cell Signaling	Overnight 1:1000	5% άπαχο γάλα/TBS/0.1% Tween-20
p75	Πολυκλωνικό (rabbit) Santa Cruz	Overnight 1:250	3% άπαχο γάλα/TBS/0.05% Tween-20
Dopamine Transporter (DAT)	Πολυκλωνικό (rabbit) Merck-Millipore	Overnight 1:1000	5% άπαχο γάλα/TBS/0.05% Tween-20
Serotonin Transporter (SERT)	Πολυκλωνικό (rabbit) Merck-Millipore	Overnight 1:1000	3% άπαχο γάλα/TBS/0.1% Tween-20
CB1 Receptor	Πολυκλωνικό (rabbit) Sigma	Overnight 1:250	5% άπαχο γάλα/TBS/0.05% Tween-20
CB2 Receptor	Πολυκλωνικό (rabbit) Cayman Chemicals	Overnight 1:200	3% άπαχο γάλα/TBS/0.05% Tween-20
β-actin	Μονοκλωνικό (rabbit) Sigma	Overnight 1:2500	3% άπαχο γάλα/TBS/0.05% Tween-20
GAPDH	Μονοκλωνικό (mouse) Merck-Millipore	Overnight 1:6000	3% άπαχο γάλα/TBS/0.05% Tween-20
Δευτερογενές Αντίσωμα	Εταιρεία	Επόαση/Αραίωση	Διάλυμα αραίωσης
Goat anti-rabbit IgG, HRP-linked	Cell Signaling	1 ώρα 1:1500	3% άπαχο γάλα/TBS/0.05% Tween-20
Goat anti-mouse IgG, HRP-linked	Santa Cruz	1 ώρα 1:2000	3% άπαχο γάλα/TBS/0.05% Tween-20

2.2.5 Στατιστικές Αναλύσεις

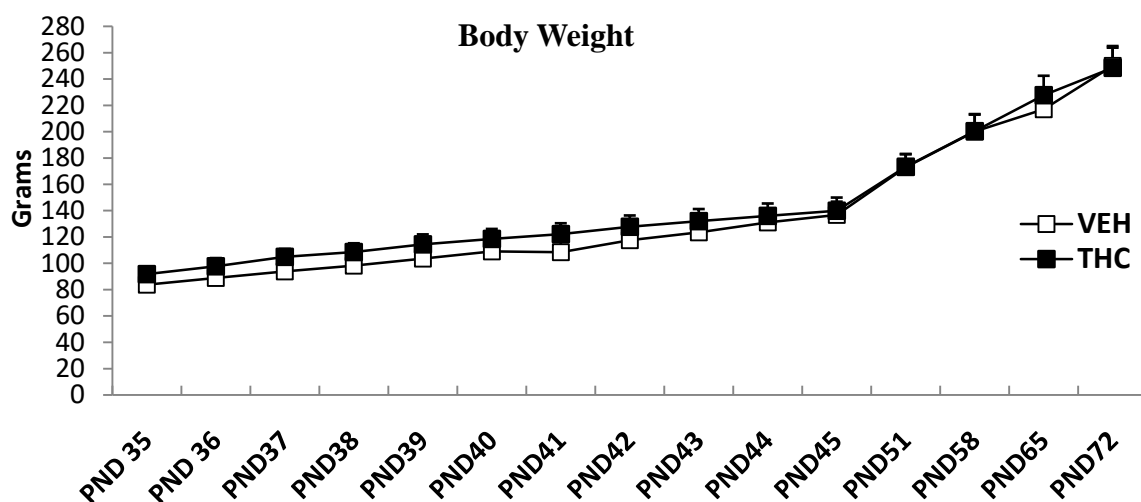
Για την επεξεργασία των δεδομένων από τις πειραματικές μελέτες έγινε χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS (Version 22.0) για Windows. Για τα αποτελέσματα των συμπεριφορικών πειραμάτων (έλεγχος αυθόρμητης κινητικότητας, έλεγχος βραχύχρονης αναγνωριστικής μνήμης και χωρικής μνήμης-μάθησης, δοκιμασία μετατόπισης της προσοχής, δοκιμασία προπαλμικής αναστολής), της νευροχημικής εκτίμησης με τη μέθοδο της HPLC και της ανοσοαποτύπωσης κατά Western χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση Student's t-test, για να διαπιστωθεί η επίδραση της χορήγησης Δ^9 -THC έναντι του εκδόχου. Για την καταγραφή του σωματικού βάρους και τα συμπεριφορικά αποτελέσματα προσδιορισμού της ικανότητας εξουκείωσης χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση μεταβλητότητας κατά μια διεύθυνση επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (one-way repeated measures analysis of variance, one-way RM ANOVA). Για τα συμπεριφορικά αποτελέσματα προσδιορισμού της κινητικής δραστηριότητας μετά από οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση μεταβλητότητας κατά μια διεύθυνση (one-way ANOVA). Ακολούθησαν οι κατάλληλες συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών υποομάδων επιμύων (post-hoc τύπου LSD).

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας για όλες τις αναλύσεις ορίστηκε ως $p < 0.05$, ενώ όλα τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος (mean) \pm SEM (Standard Error of the Mean).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Καταγραφή σωματικού βάρους

Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά μια διεύθυνση επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (one-way RM ANOVA) έδειξε μια στατιστικώς σημαντική αύξηση του βάρους με την πάροδο του χρόνου [$F_{(14,210)}=278.03$, $p<0.001$]. Συνολικά, το σωματικό βάρος και στις δύο ομάδες επιμύων αυξανόταν με την πάροδο του χρόνου και η μέτρηση κάθε εβδομάδας διέφερε στατιστικά από τις προηγούμενες εβδομάδες ($p<0.001$). Μεταξύ των δυο ομάδων δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην καταγραφή του σωματικού βάρους σε καμία χρονική στιγμή καταγραφής.



Γράφημα 3.1. Καταγραφή σωματικού βάρους των δύο ομάδων επιμύων στη διάρκεια των 11 ημερών χορήγησης της Δ^9 -THC ή του εκδόχου (VEH) και σε εβδομαδιαία βάση μέχρι την ενηλικίωση.

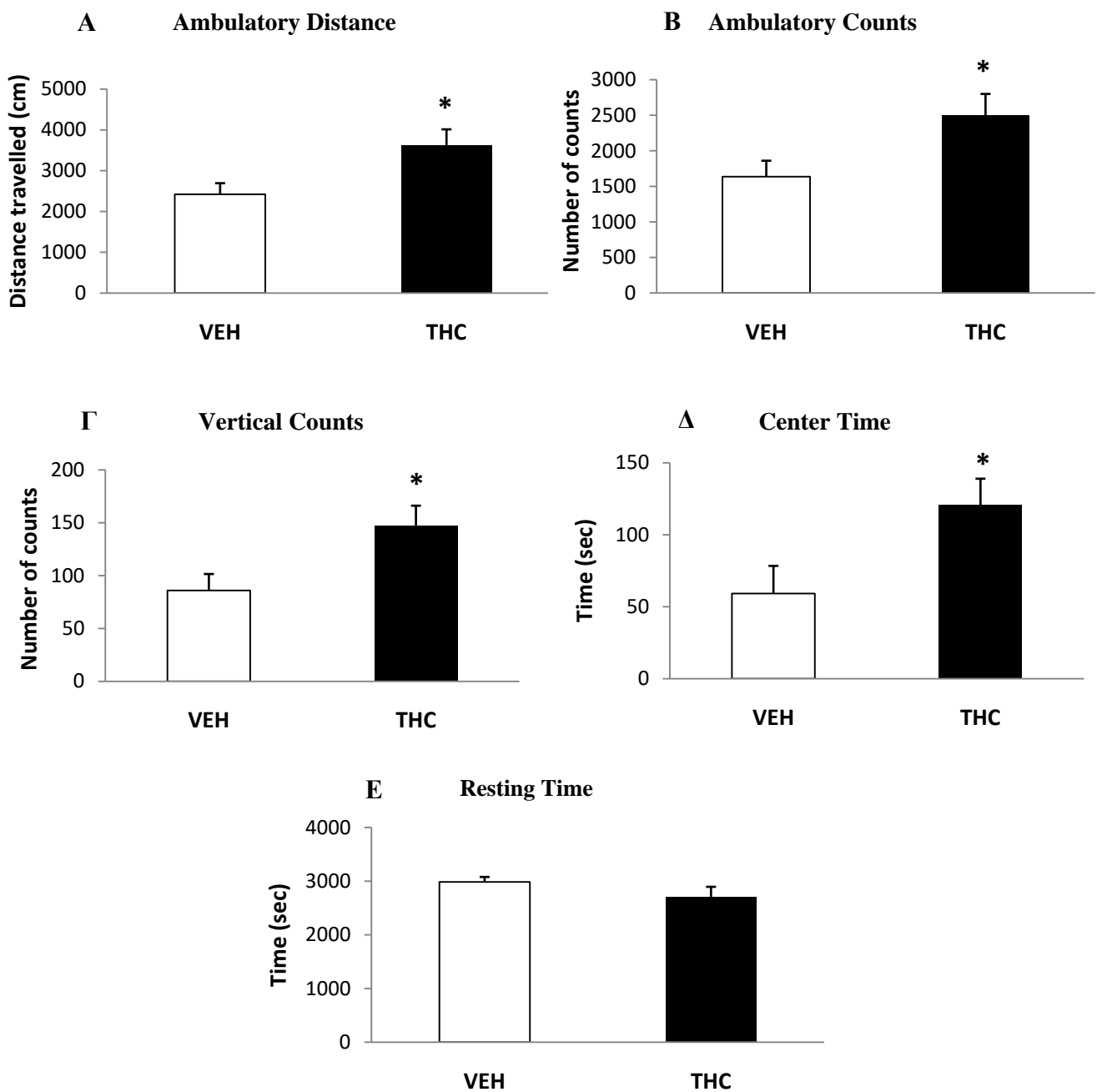
3.2 Αποτελέσματα συμπεριφορικών δοκιμασιών

3.2.1 Δοκιμασία Ανοικτού Πεδίου

3.2.1.1 Μέτρηση αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας

Η ανάλυση Student's t-test έδειξε στατιστικώς σημαντική αύξηση της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας σε μη εξοικειωμένους επίμυες που έλαβαν χαμηλές κλιμακούμενες δόσεις Δ^9 -THC κατά την εφηβεία συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, χρησιμοποιώντας τη Δοκιμασία Ανοικτού Πεδίου (**Γράφημα 3.2**). Ειδικότερα, οι μετρήσεις μας αφορούν στην αύξηση της οριζόντιας κινητικότητας (**Γράφημα 3.2 A, B**), όπως αυτή προκύπτει από τη μεγαλύτερη

διανυθείσα απόσταση ($p=0.019$) και τη μεγαλύτερη συχνότητα οριζόντιας κινητικότητας ($p=0.035$), και στην αύξηση της κάθετης κινητικότητας (**Γράφημα 3.2 Γ**), όπως αυτή προκύπτει από τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης της κατακόρυφης κινητικότητας/ανόρθωσης ($p=0.022$) των Δ^9 -THC-επιμύων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, παρατηρείται αυξημένος χρόνος παραμονής στο κέντρο του κλωβού για τους Δ^9 -THC-επίμυες έναντι της ομάδας ελέγχου ($p=0.033$) (**Γράφημα 3.2 Δ**), χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά στο χρόνο απραξίας μεταξύ των δύο εξεταζόμενων ομάδων (**Γράφημα 3.2 Ε**).

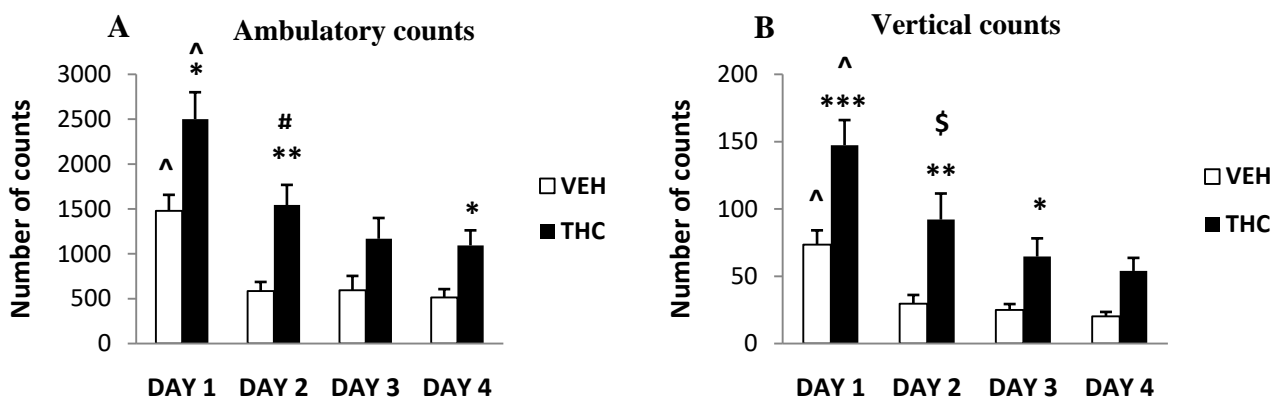


Γράφημα 3.2. Μέτρηση της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας ενήλικων επιμύων στη Δοκιμασία Ανοικτού Πεδίου, μετά από καταγραφή συμπεριφοράς για μία ώρα. **Α.** Διανυθείσα

απόσταση (cm) λόγω οριζόντιας κινητικότητας. **B.** Συχνότητα εμφάνισης της οριζόντιας κινητικότητας. **Γ.** Συχνότητας εμφάνισης της κατακόρυφης κινητικότητας/ανόρθωσης. **Δ.** Χρόνος παραμονής στο κέντρο του κλωβού. **Ε.** Χρόνος απραξίας, μεταξύ των ομάδων που έλαβαν Δ^9 -THC ή έκδοχο κατά την εφηβεία (* $p < 0.05$, VEH $n = 9$, THC $n = 9$).

3.2.1.2 Προσδιορισμός ικανότητας εξοικείωσης μετά από συνεχόμενη έκθεση σε νέο περιβάλλον

Μετά την ολοκλήρωση της πρώτης ημέρας καταγραφής της αυθόρμητης κινητικότητας των πειραματοζώων, ακολούθησε η διαδικασία της εξοικείωσής τους στο ίδιο περιβάλλον του ανοικτού πεδίου, για τις επόμενες τρεις ημέρες. Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δυο διευθύνσεις (two-way RM ANOVA), με παράγοντες τις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις κατά τη διάρκεια επανατοποθέτησης των πειραματοζώων στο ανοικτό πεδίο και τη χορήγηση ή μη Δ^9 -THC, έδειξε πως και για τις δύο ομάδες επίμυων - ομάδα ελέγχου ($n=8$) και ομάδα Δ^9 -THC ($n=9$) - υπάρχει στατιστικώς σημαντική μείωση της οριζόντιας κινητικότητας τους μετά την επανεισαγωγή τους στον κλωβό δοκιμασίας [$F_{(3,45)}=47.38$, $p < 0.001$; $F_{(1,15)}=10.08$, $p=0.06$, αντίστοιχα] (**Γράφημα 3.3 A**) και στατιστικώς σημαντική αλληλεπίδραση των ημερών επανεισαγωγής με τη χορήγηση ή μη Δ^9 -THC για την κάθετη κινητικότητα (**Γράφημα 3.3 B**), ενδεικτικά της εξοικείωσης τους στο νέο περιβάλλον με την πάροδο του χρόνου.



Γράφημα 3.3. Προφίλ εξοικείωσης και μάθησης των πειραματοζώων μετά από επαναλαμβανόμενες τοποθετήσεις στη διάταξη του ανοικτού πεδίου για 4 συνεχόμενες ημέρες. **A)** Συχνότητας οριζόντιας κινητικότητας και **B)** Συχνότητα κάθετης κινητικότητας (* : THC vs. VEH; ^ : DAY 1 vs. DAYS 2, 3, 4; # : DAY2 vs. DAY 4; \$: DAY 2 vs. DAY 3, 4).

Επιμέρους στατιστικές αναλύσεις, μέσω της ανάλυσης Student's t-test εντός της κάθε ημέρας (DAY 1, DAY 2, DAY 3, DAY 4) έδειξαν αύξηση στην οριζόντια και κάθετη κινητικότητα της ομάδας που έλαβε Δ^9 -THC σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου σε όλες τις ημέρες. Ειδικότερα, παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση της οριζόντιας κινητικότητας για την ομάδα που έλαβε Δ^9 -THC την πρώτη ημέρα ($p=0.017$), τη δεύτερη ημέρα ($p=0.004$) και την τέταρτη ημέρα ($p=0.022$) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (**Γράφημα 3.3 A**).

Επίσης, παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση της κάθετης κινητικότητας σε όλες τις ημέρες καταγραφής για την ομάδα που έλαβε Δ^9 -THC έναντι της ομάδας ελέγχου (DAY1: $p<0.001$, DAY2: $p=0.002$, DAY3: $p=0.031$) (**Γράφημα 3.3 B**).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση μεταβλητότητας κατά μία διεύθυνση (one-way repeated ANOVA) με παράγοντα τις ημέρες επαναεισαγωγής στον κλωβό δοκιμασίας, ξεχωριστά για τις δύο ομάδες - ομάδα ελέγχου και ομάδα Δ^9 -THC:

- Η ομάδα ελέγχου (vehicle) παρουσίασε μια απότομη μείωση στη συχνότητα της οριζόντιας κινητικότητας κατά την εξοικείωση [$F_{(3,21)}=18.81$, $p<0.001$]. Ο αριθμός των οριζόντιων κινήσεων στις ημέρες 2, 3 και 4 ήταν στατιστικώς μικρότερος έναντι της ημέρας 1 ($p=0.001$, $p=0.001$, $p<0.001$, αντίστοιχα), ενώ δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά στον αριθμό των οριζόντιων κινήσεων μεταξύ των τριών τελευταίων ημερών.

Η ομάδα ελέγχου παρουσίασε, επίσης, μια απότομη μείωση στη συχνότητα της κάθετης κινητικότητας κατά την εξοικείωση, όπως αποτυπώνεται από τη μείωση της κάθετης κινητικότητας στις ημέρες 2, 3 και 4 έναντι της ημέρας 1 ($p<0.001$), ενώ δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά στον αριθμό των οριζόντιων κινήσεων μεταξύ των τριών τελευταίων ημερών (**Γράφημα 3.3 A**).

- Η ομάδα των Δ^9 -THC παρουσίασε μια σταδιακή μείωση στη συχνότητα της οριζόντιας κινητικότητας με την πάροδο των ημερών [$F_{(3,24)}=30.65$, $p<0.001$]. Ο αριθμός των οριζόντιων κινήσεων στις ημέρες 2, 3 και 4 ήταν στατιστικώς μικρότερος έναντι της ημέρας 1 ($p<0.001$), ενώ την ημέρα 4 ήταν στατιστικώς μειωμένος έναντι της ημέρας 2 ($p=0.017$).

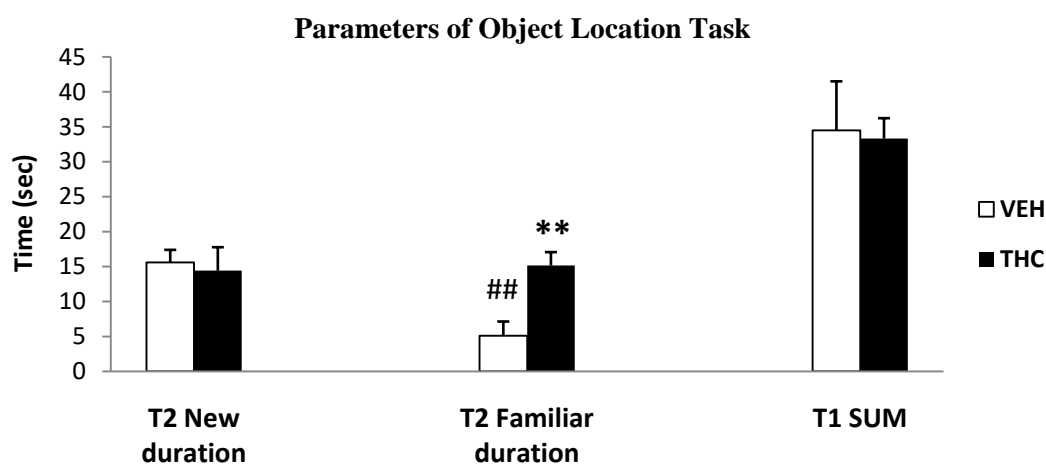
Η ομάδα των Δ^9 -THC παρουσίασε μια σταδιακή μείωση στη συχνότητα της κάθετης κινητικότητας με την πάροδο των ημερών, όπως αποτυπώνεται από τη μείωση της κάθετης κινητικότητας στις ημέρες 2, 3 και 4 έναντι της ημέρας 1 ($p<0.001$), καθώς και στις ημέρες 3 και 4 έναντι της ημέρας 2 ($p=0.002$, $p<0.001$, αντίστοιχα) (**Γράφημα 3.3 B**).

Επομένως, αξίζει να σημειώσουμε πως, ενώ και στις δύο ομάδες παρατηρούμε σταδιακή μείωση της κινητικής δραστηριότητας με την πάροδο των ημερών, εντούτοις η ομάδα των Δ^9 -

THC φαίνεται να ακολουθεί ένα διαφορετικό προφίλ εξοικείωσης και μάθησης, καθώς χρειάζεται μεγαλύτερο χρόνο ώστε να επιτύχει ένα «πλατώ» εξοικείωσης, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

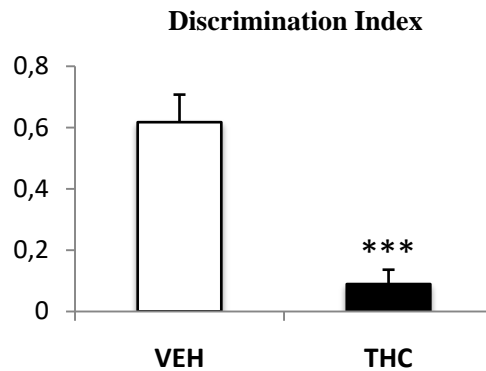
3.2.2 Δοκιμασία Αναγνώρισης Θέσης Αντικειμένου

Η στατιστική ανάλυση των καταγραφών κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Θέσης Αντικειμένου έδειξε πως η χορήγηση Δ^9 -THC κατά την εφηβεία είχε ως αποτέλεσμα η ομάδα THC (n=12) να δαπανά περισσότερο χρόνο στο αντικείμενο που εντοπίζεται στην οικεία θέση, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (n=10) (p=0.002). Αντίθετα, η ομάδα ελέγχου δαπανά περισσότερο χρόνο για την εξερεύνηση του αντικειμένου στην νέα θέση συγκριτικά με εκείνον στην οικεία θέση (p=0.0012). Ως προς το χρόνο που δαπανούν οι δύο ομάδες πειραματοζώων για την εξερεύνηση του αντικειμένου στην νέα θέση, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά (**Γράφημα 3.4**). Αξίζει να σημειωθεί πως ο συνολικός χρόνος εξερεύνησης των αντικειμένων και στις δύο θέσεις κατά την πρώτη φάση του πειράματος (T1 SUM) δε διαφέρει στατιστικά μεταξύ των δύο ομάδων.



Γράφημα 3.4. Σύγκριση του χρόνου (sec) εξερεύνησης των δυο αντικειμένων μεταξύ vehicle και THC στη δοκιμασία Αναγνώρισης Θέσης Αντικειμένου. *T2 New duration*: ο χρόνος που δαπανάται στο αντικείμενο της νέας θέσης (φάση T2). *T2 Familiar duration*: ο χρόνος που δαπανάται στο αντικείμενο της οικείας θέσης (φάση T2). *T1 SUM*: ο χρόνος εξερεύνησης και των δύο αντικειμένων κατά την πρώτη επαφή των ζώων με αυτά (φάση T1) (* THC vs. VEH, # T2 New duration vs. T2 Familiar duration για την κατηγορία VEH, ** p< 0.01, ## p< 0.01, VEH n= 10, THC n= 12).

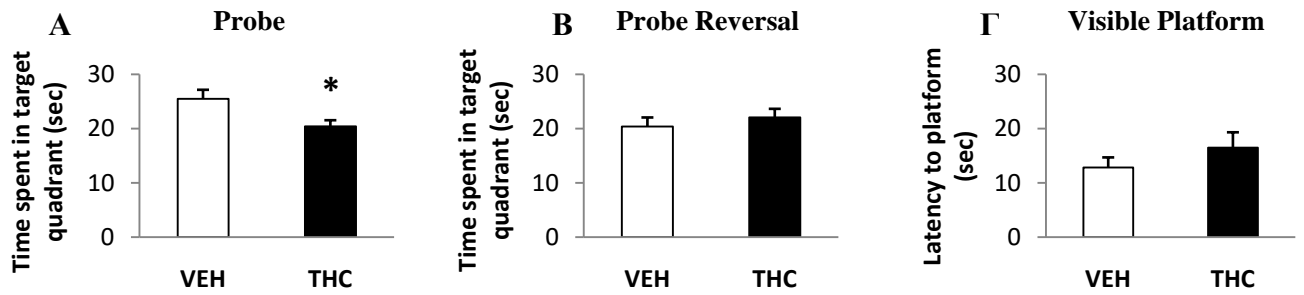
Η ανάλυση Student's t-test δείχνει **μειωμένη ικανότητα διάκρισης** για την ομάδα πειραματόζωων που τους έχει χορηγηθεί Δ^9 -THC συγκριτικά με την ομάδα vehicle ($p=0.001$), όπως φαίνεται από τον μικρότερο δείκτη ικανότητας διάκρισης που προκύπτει από τη σχέση 2.1 (**Γράφημα 3.5**).



Γράφημα 3.5. Σύγκριση του δείκτη ικανότητας διάκρισης μεταξύ της ομάδας που έλαβε Δ^9 -THC και της ομάδας ελέγχου (mean±SEM), κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Θέσης Αντικειμένου (***) $p < 0.001$, VEH $n = 10$, THC $n = 12$).

3.2.3. Δοκιμασία Υδάτινου Λαβύρινθου κατά Morris

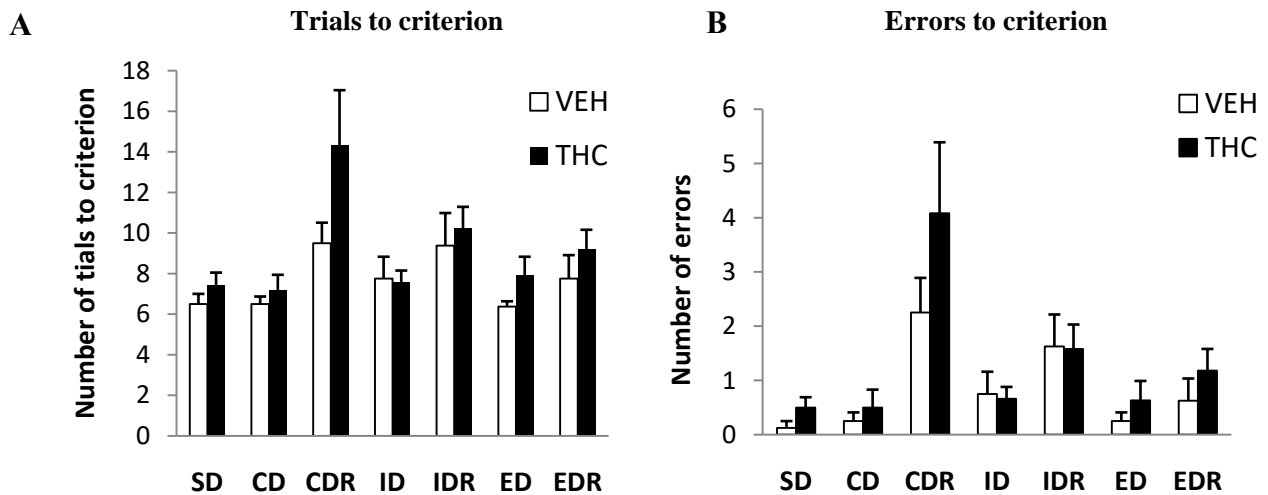
Η στατιστική ανάλυση των καταγραφών της Δοκιμασίας Υδάτινου Λαβύρινθου κατά Morris έδειξε πως η χορήγηση Δ^9 -THC κατά την εφηβεία είχε ως αποτέλεσμα η ομάδα THC να δαπανά λιγότερο χρόνο στο τεταρτημόριο που είχε συνδεθεί με την ύπαρξη της πλατφόρμας, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου στην ενηλικίωση ($p=0.03$) (**Γράφημα 3.6 A**). Αντίθετα, κατά την αντιστροφή του κανόνα, όπου εξετάζεται η γνωστική ικανότητα προσαρμογής του επίμουσ στον νέο κανόνα, δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά στο χρόνο παραμονής στο νέο τεταρτημόριο ενδιαφέροντος μεταξύ των δυο ομάδων (**Γράφημα 3.6 B**). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως δε διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων η χρονική διάρκεια εύρεσης της πλατφόρμας όταν αυτή καθίσταται ορατή από τους επίμους, γεγονός που υποδηλώνει φυσιολογικό οπτικοκινητικό συντονισμό και στις δυο ομάδες (**Γράφημα 3.6 Γ**).



Γράφημα 3.6. Χρόνοι παραμονής στα τεταρτημόρια ενδιαφέροντος ενήλικων επιμύων στη Δοκιμασία Υδάτινου Λαβύρινθου κατά Morris. **A.** Χρόνος παραμονής στο τεταρτημόριο που είχε συνδυαστεί με την ύπαρξη της κρυμμένης πλατφόρμας. **B.** Χρόνος παραμονής στο νέο τεταρτημόριο που είχε συνδυαστεί με την ύπαρξη της κρυμμένης πλατφόρμας. **Γ.** Χρονικής διάρκειας εύρεσης της ορατής πλατφόρμας, μεταξύ των ομάδων που έλαβαν Δ^9 -THC ή έκδοχο κατά την εφηβεία (* $p < 0.05$, VEH $n = 7$, THC $n = 7$).

3.2.4 Δοκιμασία Μετατόπισης της Προσοχής

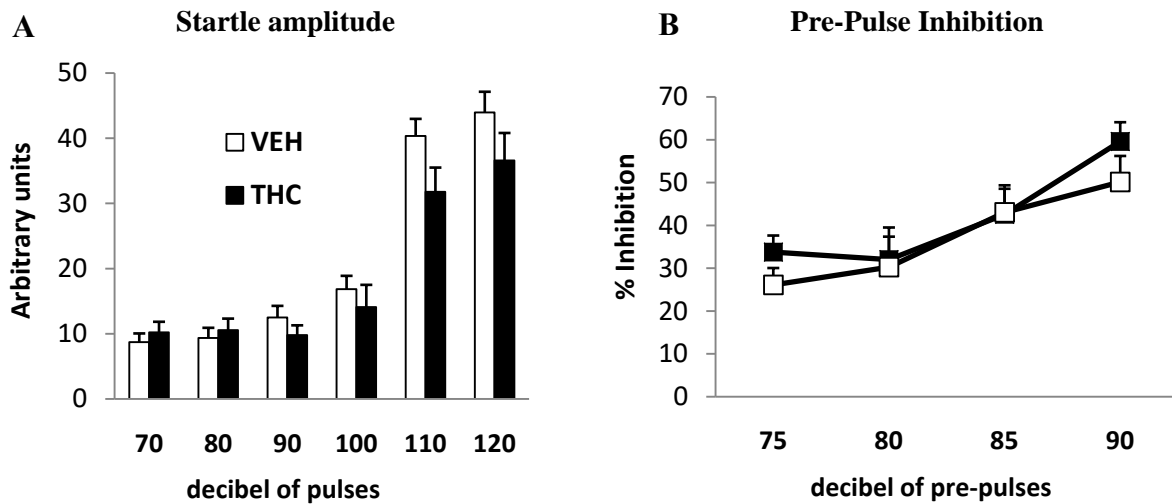
Η στατιστική ανάλυση των καταγραφών της Δοκιμασίας Μετατόπισης Προσοχής έδειξε πως η ομάδα που έλαβε Δ^9 -THC κατά την εφηβεία δεν εμφάνισε στατιστικώς σημαντική διαφορά στις παραμέτρους της δοκιμασίας αυτής, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, στην ενηλικίωση. Ειδικότερα, δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων, τόσο ως προς τον ολικό αριθμό των επιλογών μέχρι να επιτευχθούν 6 συνεχόμενες σωστές (Γράφημα 3.7 A), όσο και ως προς τον ολικό αριθμό λαθών εντός κάθε επιμέρους δοκιμασίας διάκρισης (Γράφημα 3.7 B). Αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρείται μια τάση η ομάδα που έλαβε Δ^9 -THC να εμφανίζει μικρότερη απόδοση κατά την εκτέλεση όλων των επιμέρους δοκιμασιών, και ιδιαίτερα της δοκιμασίας CDR - που είναι και η πρώτη δοκιμασία που αντιστρέφεται ο κανόνας - χωρίς όμως αυτή να είναι στατιστικώς σημαντική.



Γράφημα 3.7. Παράμετροι καταγραφής κατά την εκτέλεση της Δοκιμασίας Μετατόπισης της Προσοχής. **A.** Αριθμός δοκιμών μέχρι να επιτευχθεί το κριτήριο που αφορά στις 6 συνεχόμενες σωστές επιλογές εντός κάθε επιμέρους δοκιμασίας διάκρισης **B.** Αριθμός λαθών μέχρι την επιτυχή ολοκλήρωση του κανόνα εντός κάθε επιμέρους δοκιμασίας διάκρισης (VEH n= 8, THC n= 12).

3.2.5 Δοκιμασία Προ-Παλμικής Αναστολής του Αντανακλαστικού Αιφνιδιασμού

Η στατιστική ανάλυση των καταγραφών της Δοκιμασίας Μετατόπισης Προσοχής έδειξε πως η ομάδα που έλαβε Δ^9 -THC κατά την εφηβεία δεν εμφάνισε στατιστικώς σημαντική διαφορά στις παραμέτρους της δοκιμασίας αυτής, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, στην ενηλικίωση. Ειδικότερα, δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων, ως προς το εύρος της απόκρισης αιφνιδιασμού σε τυχαία σειρά ακουστικών ερεθισμάτων (70-120 dB) κατά την πρώτη ημέρα καταγραφής (**Γράφημα 3.8 A**). Την επόμενη ημέρα δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων επιμύων ως προς το ποσοστό προ-παλμικής αναστολής της απόκρισής τους σε διάφορους συνδυασμούς προ-παλμών (75, 80, 85, 90 dB) με σταθερής έντασης παλμό 115 dB (**Γράφημα 3.8 B**).



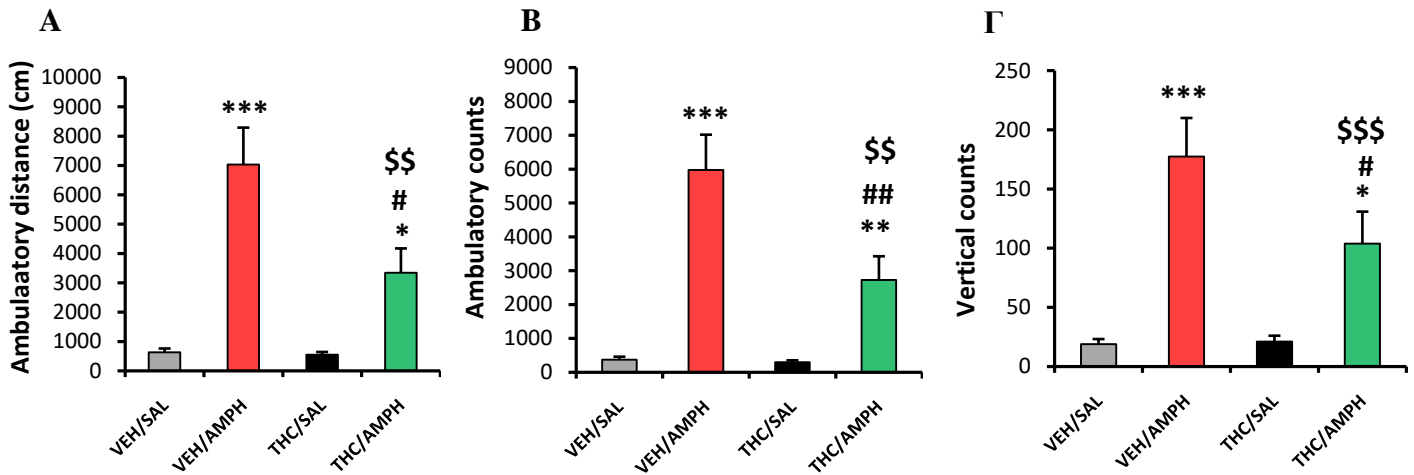
Γράφημα 3.8. Δοκιμασία Προ-Παλμικής Αναστολής του Αντανακλαστικού Αιφνιδιασμού. **A.** Αντανακλαστικό αιφνιδιασμού στα επαναλαμβανόμενα ακουστικά ερεθίσματα λευκού θορύβου την πρώτη ημέρα καταγραφής. **B.** Ποσοστού προ-παλμικής αναστολής του αντανακλαστικού του αιφνιδιασμού μετά από τέσσερις συνδυασμούς διαφορετικών προ-παλμών + σταθερού παλμού 115 dB, την δεύτερη ημέρα της δοκιμασίας μεταξύ των δύο ομάδων επιμύων (VEH n= 10, THC n= 10).

3.2.6 Αποτελέσματα καταγραφής της κινητικής δραστηριότητας μετά από οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης κατά την ενηλικίωση

Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά μια διεύθυνση έδειξε ότι η χορήγηση 1 mg/kg αμφεταμίνης ή/και Δ^9 -THC προκάλεσαν αλλαγές στην οριζόντια κινητικότητα των επιμύων, όταν εκφράστηκαν ως οριζόντια διανυθείσα απόσταση [$F_{(2,23)}=14.46$, $p<0.001$] και ως αριθμός κινητικών επεισοδίων [$F_{(2,23)}=19.49$, $p<0.001$]. Πιο συγκεκριμένα, οι ακόλουθες συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων έδειξαν ότι η χορήγηση d-αμφεταμίνης προκάλεσε αύξηση στην οριζόντια κινητικότητα ενήλικων επιμύων, όταν αυτοί κατά την εφηβεία έλαβαν είτε έκδοχο-vehicle ($p<0.001$) είτε χαμηλές κλιμακούμενες δόσεις Δ^9 -THC ($p=0.006$). Ωστόσο, η ομάδα επιμύων που έλαβε χρόνια χορήγηση Δ^9 -THC στην εφηβεία και οξεία d-αμφεταμίνη στην ενηλικίωση (THC/AMPH) παρουσίασε μειωμένη κινητική δραστηριότητα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου που έλαβε οξέως d-αμφεταμίνη (VEH/AMPH) ($p=0.011$, για την οριζόντια διανυθείσα απόσταση και $p=0.001$, για τον αριθμό των οριζόντιων κινητικών επεισοδίων) (Γράφημα 3.9 **A, B**).

Αντίστοιχες επιδράσεις είχε η χορήγηση d-αμφεταμίνης και στις παραμέτρους κάθετης κινητικής δραστηριότητας, όπως αυτές εκφράζονται από τον αριθμό των κάθετων ανυψώσεων

[$F_{(2,23)}=10.7$, $p<0.001$]. Ειδικότερα, η ανάλυση μεταβλητότητας κατά μια διεύθυνση έδειξε ότι η χορήγηση 1 mg/kg d-αμφεταμίνης προκάλεσε αύξηση στην κινητικότητα των επιμύων, που έλαβαν είτε έκδοχο-vehicle ($p<0.001$) είτε Δ^9 -THC κατά την εφηβεία ($p=0.035$). Η ομάδα που δέχθηκε τη χρόνια χορήγηση Δ^9 -THC κατά την ανάπτυξη και οξεία d-αμφεταμίνη στην ενηλικίωση (THC/AMPH) παρουσίασε μειωμένη κάθετη κινητικότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου που έλαβε οξέως d-αμφεταμίνη (VEH/AMPH) ($p=0.02$) (Γράφημα 3.9 Γ).



Γράφημα 3.9. Επίδραση της χορήγησης Δ^9 -THC κατά την εφηβεία στην οριζόντια και κάθετη κινητικότητα που προκαλεί η d-αμφεταμίνη σε ενήλικους επίμυες, **A.** Διανυθείσα απόσταση λόγω οριζόντιας κινητικότητας. **B.** Συχνότητα εμφάνισης της οριζόντιας κινητικότητας. **Γ.** Συχνότητα εμφάνισης κατακόρυφων ανορθώσεων που σημειώθηκαν στη διάρκεια των 60 λεπτών της δοκιμασίας ανοικτού πεδίου. *: vs. VEH/SAL ($p<0.05$), #: vs. VEH/AMPH ($p<0.05$), \$: vs. THC/SAL ($p<0.05$). (VEH/SAL $n=7$, VEH/AMPH $n=7$, THC/SAL $n=7$, THC/AMPH $n=6$).

3.3 Αποτελέσματα νευροχημικών - νευροβιολογικών αναλύσεων

3.3.1. Ντοπαμινεργική δραστηριότητα

3.3.1.1 Μέτρηση επιπέδων ντοπαμίνης και μεταβολιτών της και εκτίμηση ρυθμού ανακύκλισης

Ιππόκαμπος

Η ανάλυση Student's t-test ανέδειξε ότι αυξήθηκε ο ρυθμός ανακύκλισης DOPAC/DA ($p=0.001$), μετά από τη χορήγηση χαμηλών κλιμακούμενων δόσεων Δ^9 -THC σε σύγκριση με τη χορήγηση εκδόχου, ενδεικτικό αυξημένης ντοπαμινεργικής δραστηριότητας στην περιοχή του ιπποκάμπου. Παράλληλα, παρατηρήθηκε μία οριακή τάση για μείωση ($p=0.059$) των επιπέδων της ντοπαμίνης στους Δ^9 -THC-επίμυες ($n=8$) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($n=12$) (Πίνακας 3.1).

Προμετωπιαίος Φλοιός

Μειώθηκε ο ρυθμός ανακύκλισης DOPAC/DA ($p=0.039$) και αντίστοιχα αυξήθηκαν τα ολικά επίπεδα DA (Student's t-tests, $p=0.034$), μετά από τη χορήγηση χαμηλών κλιμακούμενων δόσεων Δ^9 -THC σε σύγκριση με τη χορήγηση εκδόχου, ενδεικτικό μειωμένης ντοπαμινεργικής δραστηριότητας στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού (έκδοχο $n=11$, Δ^9 -THC $n=10$) (Πίνακας 3.1).

Ραχιαίο Ραβδωτό Σώμα

Τα ολικά επίπεδα DA και HVA μειώθηκαν (Student's t-tests, $p=0.013$; $p=0.015$, αντίστοιχα), μετά από τη χορήγηση χαμηλών κλιμακούμενων δόσεων Δ^9 -THC σε σύγκριση με τη χορήγηση εκδόχου (έκδοχο $n=11$, Δ^9 -THC $n=11$) (Πίνακας 3.1).

Επικλινής Πυρήνας του Διαφράγματος

Η ανάλυση Student's t-test ανέδειξε ότι αυξήθηκαν τα ολικά επίπεδα DOPAC ($p=0.033$), μετά από τη χορήγηση χαμηλών κλιμακούμενων δόσεων Δ^9 -THC σε σύγκριση με τη χορήγηση του εκδόχου (έκδοχο $n=8$, Δ^9 -THC $n=9$) (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1. Ντοπαμινεργική δραστηριότητα σε επίμυες μετά από χορήγηση εκδόχου ή Δ^9 -THC κατά την εφηβεία: Ιστική συγκέντρωση DA(ng/mg), DOPAC (ng/mg) και HVA (ng/mg) και ο λόγος DOPAC/DA που εκφράζει τον ρυθμό ανακύκλισης.

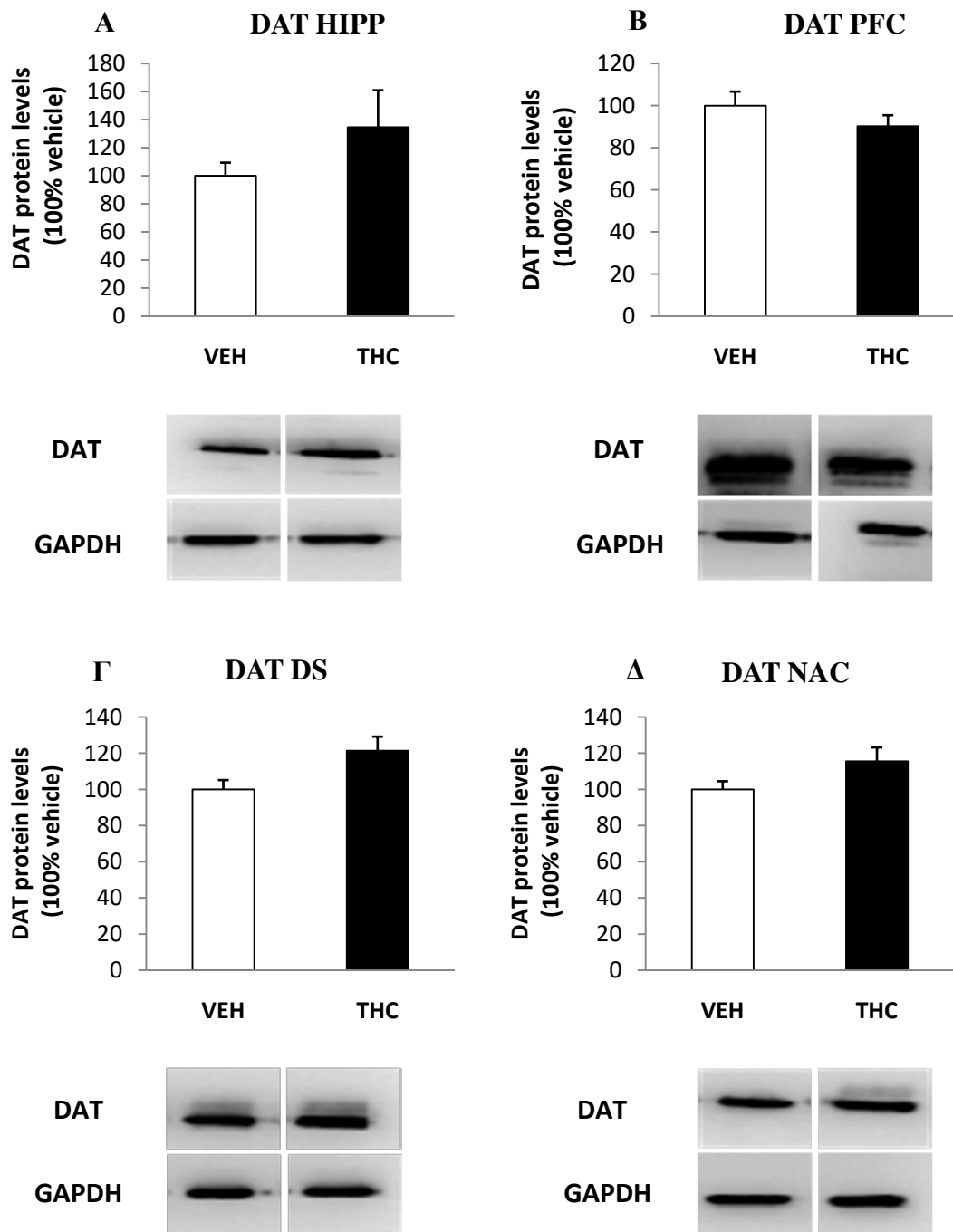
	Έκδοχο	Δ ⁹ -THC
Ιππόκαμπος		
DA	0.013±0.001	0.014±0.002
DOPAC	0.015±0.001	0.018±0.001
HVA	0.002±0.001	0.001±0.001
<i>Ρυθμός Ανακύκλωσης</i>		
DOPAC/DA	0.830±0.251	1.330±0.311 ***
Προμετωπιαίος Φλοιός		
DA	0.051±0.003	0.072±0.009 *
DOPAC	0.038±0.003	0.043±0.006
HVA	0.010±0.001	0.012±0.002
<i>Ρυθμός Ανακύκλωσης</i>		
DOPAC/DA	0.740±0.056	0.585±0.045 *
Ραχιαίο Ραβδωτό Σώμα		
DA	24.800±1.924	19.023±0.932 *
DOPAC	2.610±0.240	1.906±0.130
HVA	0.94±0.060	0.74±0.03 *
<i>Ρυθμός Ανακύκλωσης</i>		
DOPAC/DA	0.106±0.011	0.098±0.008
Επικλινής Πυρήνας του Διαφράγματος		
DA	7.887±1.140	7.853±1.347
DOPAC	1.294±0.123	2.220±0.354 *
HVA	0.44±0.070	0.45±0.071
<i>Ρυθμός Ανακύκλωσης</i>		
DOPAC/DA	0.203±0.036	0.296±0.064

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 έκδοχο vs. Δ⁹-THC

3.3.1.2 Επίδραση στα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης του μεταφορέα της ντοπαμίνης (DAT)

Η στατιστική ανάλυση των μετρήσεων οπτικής πυκνότητας της έκφρασης του μεταφορέα της ντοπαμίνης (DAT), μέσω της δοκιμασίας Student's t-test, έδειξε πως η επίδραση του

δοσολογικού μοντέλου χορήγησης Δ^9 -THC που πραγματοποιήθηκε κατά την εφηβεία σε αρσενικούς επίμυες, δεν προκάλεσε στατιστικώς σημαντική αλλαγή των επίπεδων του μεταφορέα της ντοπαμίνης (DAT) στην περιοχή του ιπποκάμπου, του προμετωπιαίου φλοιού, του ραχιαίου ραβδωτού σώματος και του επικλινούς πυρήνα του διαφράγματος, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Γράφημα 3.10 Α, Β, Γ, Δ).



Γράφημα 3.10. Επίδραση της χορήγησης Δ^9 -THC κατά την εφηβεία στην έκφραση του μεταφορέα της ντοπαμίνης (DAT) **Α.** στον ιππόκαμπο. **Β.** στον προμετωπιαίο φλοιό. **Γ.** στο

ραχιαίο ραβδωτό σώμα. Δ . στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος ενήλικων αρσενικών επιμύων (mean \pm SEM του λόγου - εκφρασμένος επί % της ομάδας ελέγχου- της σχετικής οπτικής πυκνότητας (O.D.) του DAT προς την GAPDH).

3.3.2. Σεροτονεργική δραστηριότητα

3.3.2.1 Μέτρηση επιπέδων σεροτονίνης και μεταβολίτη της και εκτίμηση ρυθμού ανακύκλισης

Ιππόκαμπος

Η ανάλυση Student's t-test ανέδειξε ότι μειώθηκε ο ρυθμός ανακύκλισης σεροτονίνης (5-HIAA/5-HT), ενώ, αυξήθηκαν τα ολικά επίπεδα 5-HT ($p=0.001$), μετά από τη χορήγηση χαμηλών κλιμακούμενων δόσεων Δ^9 -THC σε σύγκριση με τη χορήγηση του εκδόχου. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν μειωμένη σεροτονεργική δραστηριότητα στην περιοχή του ιπποκάμπου (έκδοχο $n=12$, Δ^9 -THC $n=12$) (**Πίνακας 3.2**).

Προμετωπιαίος Φλοιός

Ο ρυθμός ανακύκλισης (5-HIAA/5-HT) παράλληλα με τα ολικά επίπεδα 5-HIAA αυξήθηκαν στον προμετωπιαίο φλοιό ($p=0.049$, $p=0.022$, αντίστοιχα), μετά από τη χορήγηση χαμηλών κλιμακούμενων δόσεων Δ^9 -THC σε σύγκριση με τη χορήγηση του εκδόχου, γεγονός που υποδεικνύει αυξημένη σεροτονεργική δραστηριότητα (έκδοχο $n=12$, Δ^9 -THC $n=10$) (**Πίνακας 3.2**).

Ραχιαίο Ραβδωτό Σώμα

Η ανάλυση Student's t-test ανέδειξε μείωση του ρυθμού ανακύκλισης 5-HIAA/5-HT ($p=0.005$) και αύξηση των επιπέδων 5-HT ($p=0.035$) μετά από τη χορήγηση Δ^9 -THC σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (έκδοχο $n=9$, Δ^9 -THC $n=11$) (**Πίνακας 3.2**).

Επικλινής Πυρήνας του Διαφράγματος

Παρατηρήθηκε αύξηση του ρυθμού ανακύκλισης 5-HIAA/5-HT ($p=0.002$) μετά από τη χορήγηση χαμηλών δόσεων Δ^9 -THC σε σύγκριση με την ομάδα εκδόχου (έκδοχο $n=11$, Δ^9 -THC $n=8$) (**Πίνακας 3.2**).

Πίνακας 3.2. Σεροτονεργική δραστηριότητα μετά από χορήγηση εκδόχου ή Δ⁹-THC κατά την εφηβεία: Ιστική συγκέντρωση 5-HT (ng/mg) και 5-HIAA (ng/mg) και ο λόγος 5-HIAA/5-HT που εκφράζει τον ρυθμό ανακύκλωσης.

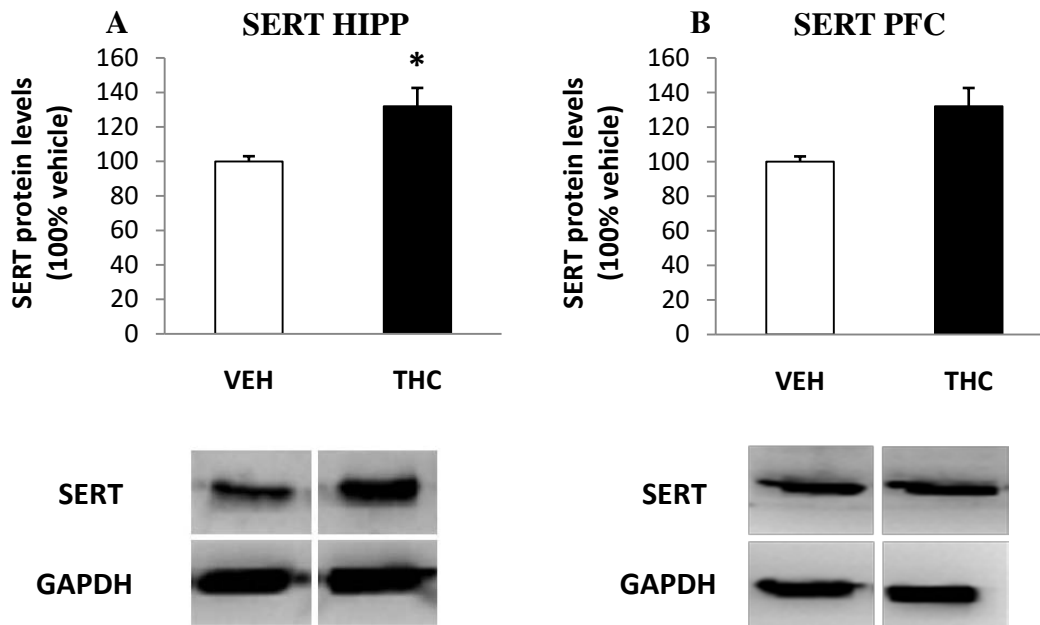
	Έκδοχο	Δ ⁹ -THC
Ιππόκαμπος		
5-HT	0.419±0.036	0.598±0.036 ***
5-HIAA	0.394±0.029	0.383±0.029
<i>Ρυθμός Ανακύκλωσης</i>		
5-HIAA/5-HT	1.010±0.067	0.655±0.067 ***
Προμετωπιαίος Φλοιός		
5-HT	0.929±0.048	0.853±0.047
5-HIAA	0.266±0.014	0.333±0.011 *
<i>Ρυθμός Ανακύκλωσης</i>		
5-HIAA/5-HT	0.290±0.015	0.409±0.046 *
Ραχιαίο Ραβδωτό Σώμα		
5-HT	0.591±0.075	0.848±0.068 **
5-HIAA	0.341±0.043	0.299±0.043
<i>Ρυθμός Ανακύκλωσης</i>		
5-HIAA/5-HT	0.548±0.050	0.373±0.029 **
Επικλινής Πυρήνας του Διαφράγματος		
5-HT	0.704±0.086	0.538±0.101
5-HIAA	0.316±0.034	0.346±0.034
<i>Ρυθμός Ανακύκλωσης</i>		
5-HIAA/5-HT	0.463±0.058	0.676±0.068 **

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 έκδοχο vs. Δ⁹-THC

3.3.3.2. Επίδραση στα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης του μεταφορέα της σεροτονίνης (SERT)

Η στατιστική ανάλυση των μετρήσεων οπτικής πυκνότητας της έκφρασης των πρωτεϊνών, μέσω της δοκιμασίας Student's t-test, έδειξε πως η επίδραση του δοσολογικού μοντέλου χορήγησης Δ⁹-THC που πραγματοποιήθηκε κατά την εφηβεία σε αρσενικούς επίμυες,

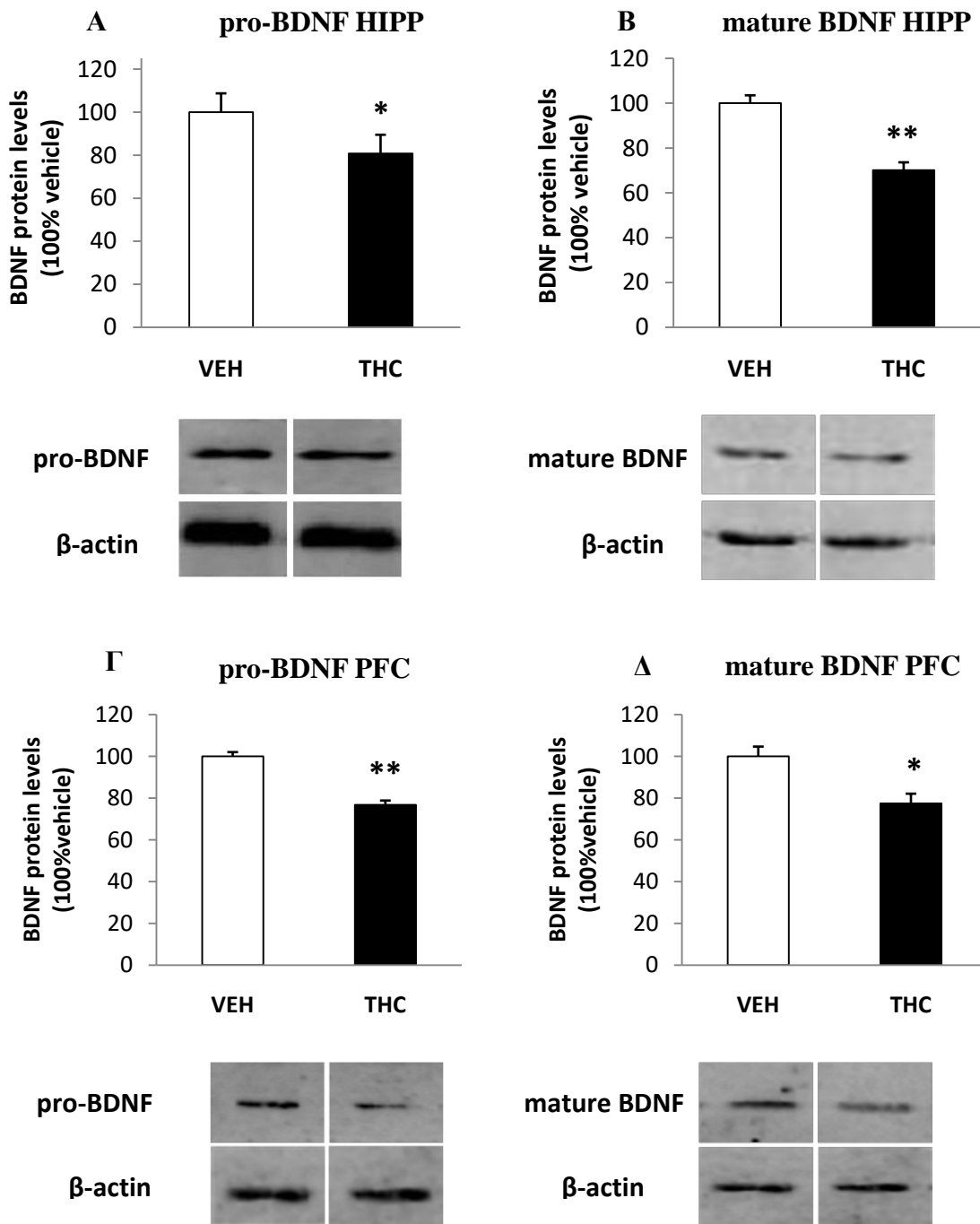
προκάλεσε στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων του μεταφορέα της σεροτονίνης (SERT) στην περιοχή του ιπποκάμπου, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p=0.01$) (Γράφημα 3.11 A). Δεν παρατηρήθηκε μεταβολή ως προς τα επίπεδα του μεταφορέα στον προμετωπιαίο φλοιό (Γράφημα 3.11 B).



Γράφημα 3.11. Επίδραση της χορήγησης Δ^9 -THC κατά την εφηβεία στην έκφραση του μεταφορέα της σεροτονίνης (SERT) **A.** στον ιππόκαμπο και **B.** στον προμετωπιαίο φλοιό ενήλικων αρσενικών επιμύων (mean \pm SEM του λόγου - εκφρασμένος επί % της ομάδας ελέγχου- της σχετικής οπτικής πυκνότητας (O.D.) του SERT προς την GAPDH, * $p < 0.05$).

3.3.3. Επίδραση στα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης του μονοπατιού BDNF

Η στατιστική ανάλυση των μετρήσεων οπτικής πυκνότητας της έκφρασης των πρωτεϊνών, μέσω της δοκιμασίας Student's t-test, έδειξε πως η επίδραση του δοσολογικού μοντέλου χορήγησης Δ^9 -THC που πραγματοποιήθηκε κατά την εφηβεία σε αρσενικούς επίμυες, προκάλεσε στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης BDNF, τόσο της πρώιμης όσο και της ώριμης μορφής του, στην περιοχή του ιπποκάμπου και του προμετωπιαίου φλοιού συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p=0.045$, $p=0.004$, $p=0.005$, $p=0.04$, αντίστοιχα) (Γράφημα 3.12 A, B, Γ, Δ).



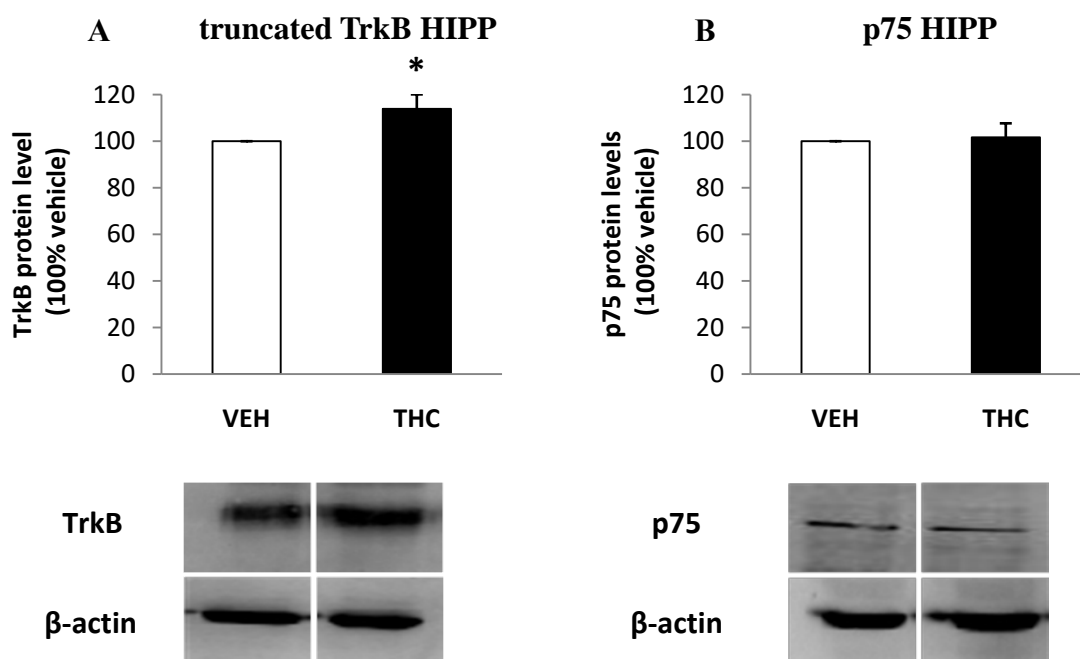
Γράφημα 3.12. Επίδραση της χορήγησης Δ^9 -THC κατά την εφηβεία στην έκφραση **A.** του πρώιμου BDNF και **B.** του ώριμου BDNF στον ιππόκαμπο, **Γ.** του πρώιμου BDNF και **Δ.** του ώριμου BDNF στον προμετωπιαίο φλοιό ενήλικων αρσενικών επιμύων (mean \pm SEM του λόγου - εκφρασμένος επί % της ομάδας ελέγχου - της σχετικής οπτικής πυκνότητας (O.D.) του BDNF προς την β -ακτίνη, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

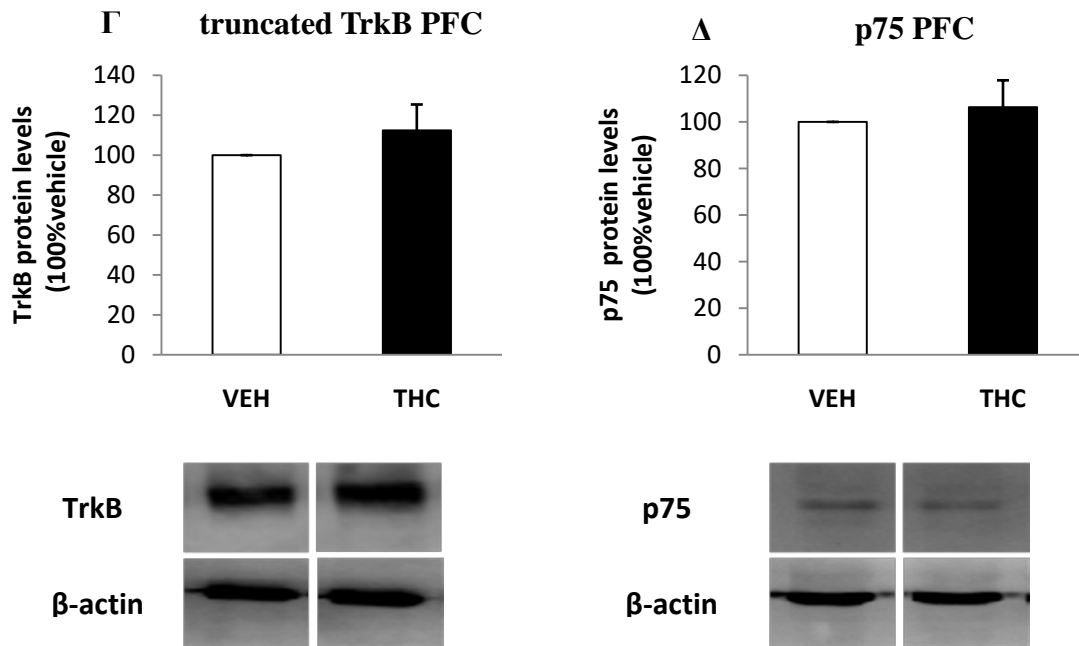
TrkB

Η στατιστική ανάλυση των μετρήσεων οπτικής πυκνότητας της έκφρασης των πρωτεϊνών, μέσω της δοκιμασίας Student's t-test, έδειξε πως η επίδραση του δοσολογικού μοντέλου χορήγησης Δ^9 -THC που πραγματοποιήθηκε κατά την εφηβεία σε αρσενικούς επίμυες, προκάλεσε στατιστικώς σημαντική αύξηση των επίπεδων έκφρασης του υποδοχέα TrkB (truncated isoform) μόνο στην περιοχή του ιπποκάμπου, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p=0.034$) (Γράφημα 3.13 A).

p75

Η στατιστική ανάλυση των μετρήσεων οπτικής πυκνότητας της έκφρασης των πρωτεϊνών, μέσω της δοκιμασίας Student's t-test, έδειξε πως η επίδραση του δοσολογικού μοντέλου χορήγησης Δ^9 -THC που πραγματοποιήθηκε κατά την εφηβεία σε αρσενικούς επίμυες, δεν επηρέασε τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα p75 στις περιοχές του ιπποκάμπου και του προμετωπιαίου φλοιού συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Γράφημα 3.13 B, Δ).



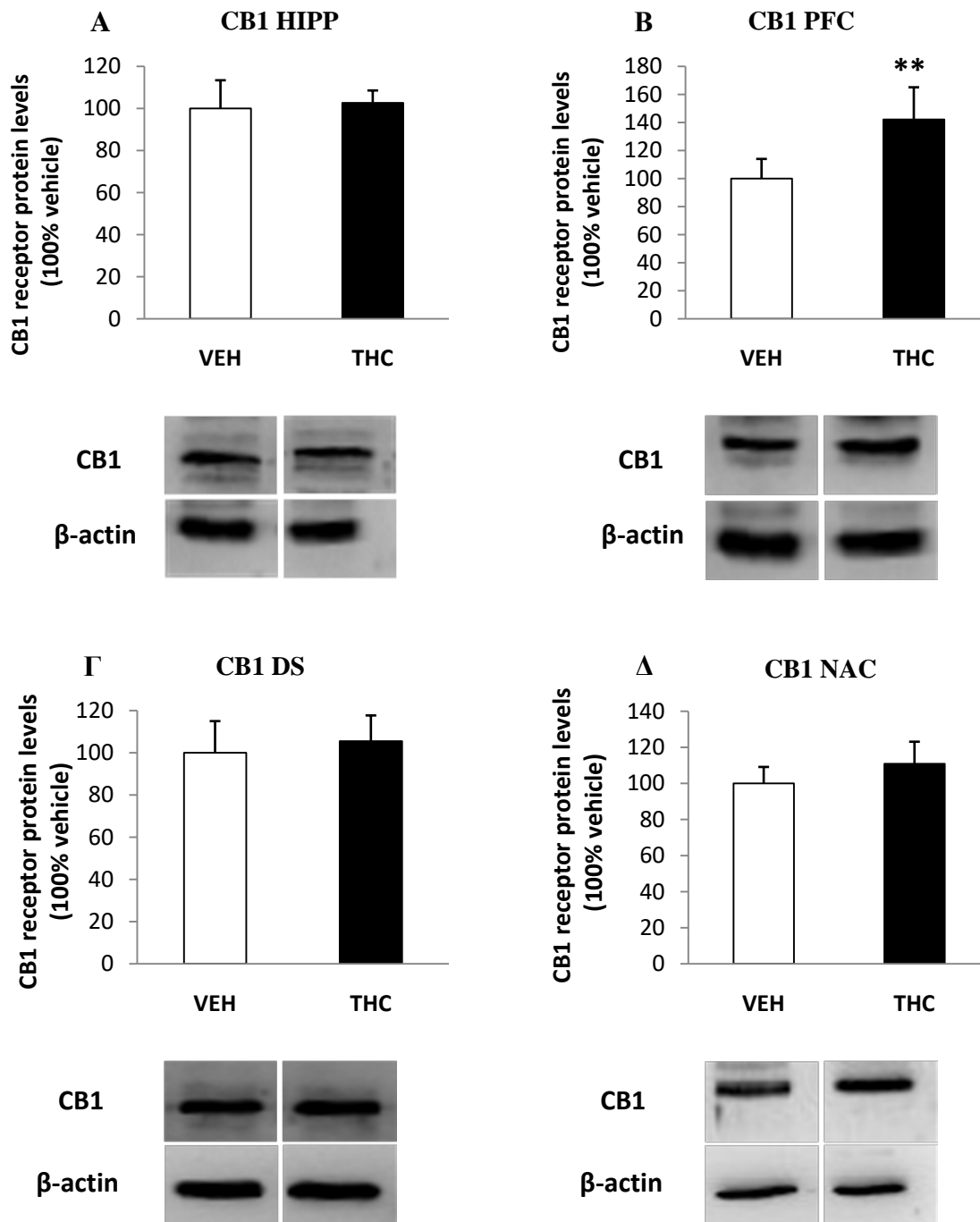


Γράφημα 3.13. Επίδραση της χορήγησης Δ^9 -THC κατά την εφηβεία στην έκφραση των υποδοχέων **A.** TrkB και **B.** p75 στον ιππόκαμπο, **Γ.** TrkB και **Δ.** p75 στον προμετωπιαίο φλοιό ενήλικων αρσενικών επιμύων (mean \pm SEM του λόγου - εκφρασμένος επί % της ομάδας ελέγχου - της σχετικής οπτικής πυκνότητας (O.D.) του TrkB και του p75 προς την β -ακτίνη, * $p < 0.05$).

3.3.4 Επίδραση στα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης των υποδοχέων CB1 και CB2

CB1 υποδοχείς

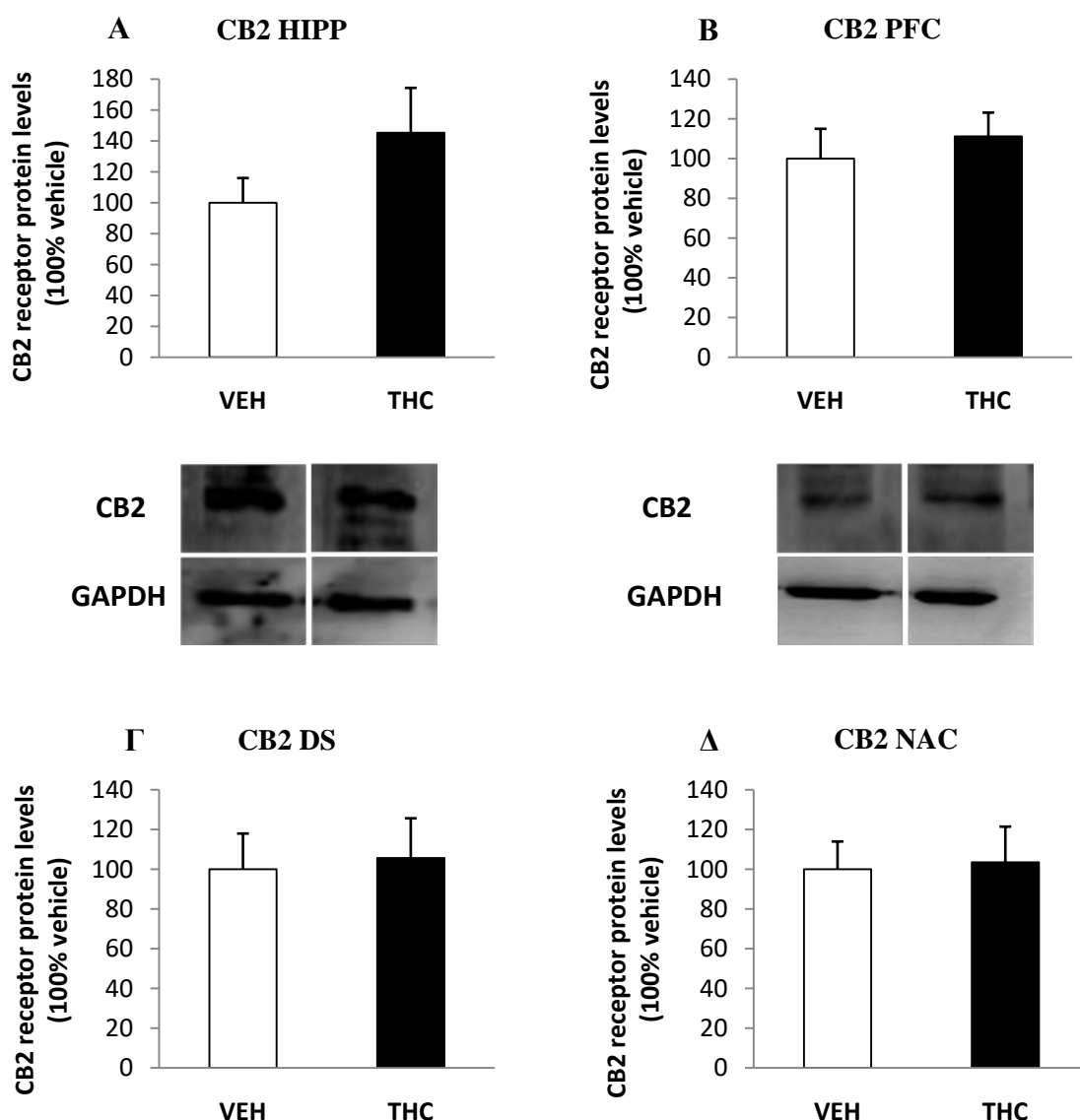
Η στατιστική ανάλυση των μετρήσεων οπτικής πυκνότητας της έκφρασης των πρωτεϊνών, μέσω της δοκιμασίας Student's t-test, έδειξε πως η επίδραση του δοσολογικού μοντέλου χορήγησης Δ^9 -THC που πραγματοποιήθηκε κατά την εφηβεία σε αρσενικούς επίμυες προκάλεσε στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης του υποδοχέα CB1 μόνο στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p=0.004$) (Γράφημα 3.14 A).



Γράφημα 3.14. Επίδραση της χορήγησης Δ^9 -THC κατά την εφηβεία στην έκφραση του υποδοχέα CB1 **A.** στον ιππόκαμπο, **B.** στον προμετωπιαίο φλοιό, **Γ.** στο ραχιαίο ραβδωτό σώμα και **Δ.** στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος των ενήλικων αρσενικών επιμύων (mean±SEM του λόγου - εκφρασμένος επί % της ομάδας ελέγχου- της σχετικής οπτικής πυκνότητας (O.D.) του CB1 προς την β-ακτίνη, ** $p < 0.01$).

CB2 υποδοχείς

Η στατιστική ανάλυση των μετρήσεων οπτικής πυκνότητας της έκφρασης των πρωτεϊνών, μέσω της δοκιμασίας Student's t-test, έδειξε πως η επίδραση του δοσολογικού μοντέλου χορήγησης Δ^9 -THC που πραγματοποιήθηκε κατά την εφηβεία σε αρσενικούς επίμυες, δεν προκάλεσε στατιστικώς σημαντική αλλαγή των επιπέδων του υποδοχέα CB2 στις περιοχές του εγκεφάλου που εξετάσθηκαν (ιππόκαμπος, προμετωπιαίος φλοιός, ραχιαίο ραβδωτό σώμα και επικλινής πυρήνας του διαφράγματος), συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Γράφημα 3.15 Α, Β, Γ, Δ).





Γράφημα 3.15. Επίδραση της χορήγησης Δ^9 -THC κατά την εφηβεία στην έκφραση του υποδοχέα CB2 **A.** στον ιππόκαμπο, **B.** στον προμετωπιαίο φλοιό, **Γ.** στο ραχιαίο ραβδωτό σώμα και **Δ.** στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος των ενήλικων αρσενικών επιμύων (mean \pm SEM του λόγου - εκφρασμένος επί % της ομάδας ελέγχου- της σχετικής οπτικής πυκνότητας (O.D.) του CB2 προς την GAPDH).

ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Πίνακας 3.3: Συνοπτικός πίνακας Αποτελεσμάτων

Συνοπτικός πίνακας των πειραματικών αποτελεσμάτων που εμφανίζουν την επίδραση των χαμηλών κλιμακούμενων δόσεων Δ⁹-THC κατά την εφηβεία σε αρσενικούς επίμυες, συγκριτικά με επίμυες ελέγχου.

1. Συμπεριφορικές δοκιμασίες	2. Νευροχημικές αναλύσεις		3. Νευροβιολογικές αναλύσεις			
	DA turnover rate	5-HT turnover rate	HIPP	PFC	DS	NAC
↑ Απόκριση σε νέο περιβάλλον (Reaction to Novelty)	↑ HIPP	↓ HIPP	↓ BDNF	↓ BDNF		
Δ Εξουκείωση (Motor habituation)	↓ PFC	↑ PFC	↑ TrkB	- TrkB		
↓ Αναγνωριστική μνήμη (OLT)	- DS	↓ DS	- p75	- p75		
↓ Χωρική μάθηση και μνήμη (MWM)	- NAC	↑ NAC	- DAT	- DAT	- DAT	- DAT
- Γνωστική ευελιξία (ASST)			↑ SERT	- SERT		
- Ηθμός αισθητικοκινητικής πληροφορίας (PPI)			- CB1	↑ CB1	- CB1	- CB1
			- CB2	- CB2	- CB2	- CB2
↓ Υπερκινητικότητα από d-αμφεταμίνη						

↑: στατιστικώς σημαντική αύξηση συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, ↓: στατιστικώς σημαντική μείωση συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, - : μη στατιστικώς σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, Δ: Διαφορετικό προφίλ.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας αφορούσε τη μελέτη συγκεκριμένων συμπεριφορικών, νευροχημικών και νευροβιολογικών μεταβλητών μετά από τη χορήγηση χαμηλών, κλιμακούμενων δόσεων Δ⁹-THC, του κύριου ψυχοδραστικού συστατικού της κάνναβης κατά την εφηβεία. Η χορήγηση χαμηλών σταδιακά κλιμακούμενων δόσεων Δ⁹-THC μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση κατά την εφηβεία προκάλεσε σημαντικές μεταβολές σε συμπεριφορικές δοκιμασίες ελέγχου της κινητικότητας, στην εξοικείωση στο ανοικτό πεδίο, στην έκφραση της χωρικής μνήμης και μάθησης και, επίσης, νευροχημικές και νευροβιολογικές μεταβολές στη ντοπαμινεργική και σεροτονεργική λειτουργία, σε διαφορετικές εγκεφαλικές περιοχές αργότερα στην ενηλικίωση αρσενικών επιμύων. Παράλληλα, η χορήγηση χαμηλών κλιμακούμενων δόσεων Δ⁹-THC σε έφηβους επίμυες επηρέασε σημαντικά τις επιδράσεις της οξείας χορήγησης d-αμφεταμίνης στην κινητικότητα κατά την ενηλικίωση. Τέλος, το μοντέλο χορήγησης κλιμακούμενων δόσεων Δ⁹-THC κατά την εφηβεία οδήγησε σε μεταβολές σε νευροβιολογικούς δείκτες που εμπλέκονται σε διαδικασίες νευροπλαστικότητας και λειτουργίας του συστήματος των ενδοκανναβινοειδών. Ας σημειωθεί ότι το σύστημα των ενδοκανναβινοειδών φαίνεται να ενέχει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στη έκφραση των νευρωνικών λειτουργιών και της νευροπλαστικότητας.

Χορήγηση κανναβινοειδών και συμπεριφορικές προσεγγίσεις

Επίδραση στην αυθόρμητη κινητικότητα

Τα πειραματόζωα που έλαβαν χρόνια χορήγηση Δ⁹-THC κατά την εφηβεία όταν εκτέθηκαν σε ένα νέο περιβάλλον ανοικτού πεδίου κατά την ενηλικίωση, παρουσίασαν αύξηση της αυθόρμητης κινητικής τους δραστηριότητας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η αυξημένη κινητικότητα χαρακτηρίζεται από αυξημένη οριζόντια και κατακόρυφη δραστηριότητα, υποδηλώνοντας διεγερσιμότητα και αυξημένη εξερευνητικότητα των πειραματοζώων. Η καταγραφή της κινητικής δραστηριότητας των επίμυων για διάστημα μίας ώρας ήταν αρκετή για να εντοπιστούν διαφορές τόσο ως προς την έκφραση της κινητικότητας και της ερευνητικότητας, αλλά και ως προς την ικανότητα εξοικείωσης με το νέο περιβάλλον. Τα παραπάνω ευρήματα δείχνουν για πρώτη φορά αύξηση της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας ενήλικων πειραματοζώων μετά από χορήγηση Δ⁹-THC κατά την εφηβεία. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας βρίσκονται και μελέτες που υποστηρίζουν ότι η χρόνια αυξανόμενη χορήγηση Δ⁹-THC (2.5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg) και

η χρόνια χρήση του αγωνιστή WIN 55,212-2 κατά την εφηβεία σε αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες οδήγησε σε αυξημένη οριζόντια και κάθετη κινητικότητα (Lorente-Berzal et al., 2013; Wegner et al., 2009). Επίσης, μια ακόμα μελέτη βρίσκεται σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα, υποστηρίζοντας ότι η χρόνια χρήση του αγωνιστή WIN 55,212-2 (1.2 mg/kg) κατά την εφηβεία σε αρσενικούς επίμυες οδήγησε σε αυξημένη οριζόντια και κάθετη κινητικότητα (Abush and Akirav, 2012). Υπάρχουν όμως και προηγούμενες μελέτες χορήγησης Δ^9 -THC κατά την εφηβεία οι οποίες έχουν δείξει είτε μη μεταβολή στην αυθόρμητη κινητικότητα των πειραματοζώων (Rubino et al., 2008; Zamberletti et al., 2014; Shen et al., 2011), είτε μείωση της κινητικής τους δραστηριότητας, όταν αυτή μετρήθηκε κατά την ενηλικίωση (Renard et al., 2016). Αξίζει να αναφερθεί ότι τα κανναβινοειδή επηρεάζουν την κινητική δραστηριότητα με ένα διφασικό τρόπο, αυξάνοντας την κινητικότητα σε χαμηλές δόσεις και προκαλώντας καταστολή σε υψηλότερες δόσεις (Chaperon and Thiebot, 1999; Polissidis et al., 2010; Polissidis et al., 2012).

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 στην εκάστοτε πειραματική προσέγγιση – υψηλές έναντι χαμηλών δόσεων. Ακόμη, σημαντικό ρόλο στις διαφορές αυτές έχει και η επιλογή του στελέχους των επίμυων που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και τα διαφορετικά αναπτυξιακά παράθυρα που πραγματοποιήθηκαν οι φαρμακολογικοί χειρισμοί.

Τα αποτελέσματα μας για πρώτη φορά αναδεικνύουν την επίδραση της χορήγησης χαμηλών δόσεων Δ^9 -THC κατά την εφηβεία στην αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα στην ενηλικίωση. Τα συγκεκριμένα ευρήματα, σε συνέπεια και με τις προηγούμενες μελέτες, αναδεικνύουν τη συσχέτιση χορήγησης Δ^9 -THC κατά την ανάπτυξη με την εμφάνιση συμπεριφορικών μεταβολών στην ενηλικίωση, ενώ συνεισφέρουν, σε μεταφραστικό επίπεδο, σε μελέτες που αφορούν την ανάπτυξη και μελέτη ψυχοκινητικής λειτουργίας.

Επίδραση σε δείκτες μη συνειρμικής μνήμης και μάθησης

Για την αξιολόγηση της μη συνειρμικής μνήμης και μάθησης, και τη διατήρησή τους, λειτουργιών που αντανakλούν και την οργάνωση της συμπεριφοράς ενός πειραματόζωου, χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία εξουκείωσης σε έναν μη – οικείο πειραματικό χώρο (Thiel et

al., 1998; Mogensen et al., 2003; Antoniou et al., 2008; Polissidis et al., 2010; Galanopoulos et al., 2014). Η δοκιμασία αυτή συνεισφέρει στον έλεγχο της διαδικασίας της επαναλαμβανόμενης μάθησης των πειραματόζωων δεδομένου ότι η επαναλαμβανόμενη έκθεση των επίμυων στη δοκιμασία του ανοικτού πεδίου οδηγεί σε χρόνο-εξαρτώμενες αλλαγές στη κινητική συμπεριφορά (Choleris et al., 2001). Πράγματι, τα πειραματόζωα στα οποία είχε χορηγηθεί Δ^9 -THC κατά την εφηβεία, και η ομάδα των μαρτύρων παρουσίασαν μια σταδιακή μείωση της κινητικότητας/εξερευνητικότητας μετά από την επαναλαμβανόμενη έκθεση των πειραματοζώων για τρεις συνεχόμενες ημέρες στον κλωβό κινητικότητας. Εντούτοις, η ομάδα Δ^9 -THC δεν ακολούθησε το χαρακτηριστικό προφίλ εξοικείωσης της ομάδας ελέγχου, καθώς χρειάστηκε περισσότερο χρόνο ώστε να επιτύχει ένα «πλατώ» εξοικείωσης. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία και με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που ήδη αναφέρθηκαν μετά από την ανάλυση της διαδικασίας εξοικείωσης των πειραματοζώων μετά από την πρώτη έκθεση τους στον κλωβό κινητικότητας για το χρονικό διάστημα της μίας ώρας. Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν ότι η διαδικασία της μη συνειρμικής μνήμης και μάθησης κατά την ενηλικίωση, φαίνεται να διαταράσσεται μετά από τη χορήγηση Δ^9 -THC κατά την εφηβεία, χωρίς όμως να επηρεάζεται η τελική έκφραση της συγκεκριμένης διεργασίας.

Επίδραση σε γνωστικές λειτουργίες σχετιζόμενες με την έκφραση της χωρικής μνήμης και μάθησης

Για την εξέταση της επίδρασης της χορήγησης Δ^9 -THC στη βραχυπρόθεσμη αναγνωριστική χωρική μνήμη, τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν στη **δοκιμασία αναγνώρισης θέσης αντικειμένου**, μια δοκιμασία που στηρίζεται στην αυθόρμητη εξερευνητική ικανότητα των τρωκτικών (Ennaceur and Delacour, 1988). Τα αποτελέσματά μας στη δοκιμασία αυτή έδειξαν μια αρνητική επίδραση της χορήγησης Δ^9 -THC στην έκφραση της βραχύχρονης αναγνωριστικής χωρικής μνήμης κατά την ενηλικίωση, με σημαντική μείωση της ικανότητας διάκρισης για την ομάδα Δ^9 -THC συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Τα μέχρι σήμερα δημοσιευμένα αποτελέσματα συμπεριφορικών δοκιμασιών γνωστικού τύπου που σχετίζονται με τις διεργασίες της μάθησης και της μνήμης βρίσκονται σε συμφωνία, με τις περισσότερες έρευνες να υπογραμμίζουν ότι η χρόνια χορήγηση κανναβινοειδών κατά την εφηβεία επηρεάζει αρνητικά γνωστικού τύπου συμπεριφορές, όπως η χωρική μνήμη εργασίας (Abush and Akirav, 2012; Rubino and Parolaro, 2014; Zamberletti et al., 2014).

Προς την ίδια κατεύθυνση κινούνται και μελέτες που χρησιμοποιούν διαφορετικά συμπεριφορικά μοντέλα, όπως τη **δοκιμασία υδάτινου λαβυρίνθου κατά Morris**, η οποία θεωρείται ιδιαίτερα ευαίσθητη στην αξιολόγηση των ικανοτήτων «χωρικής» μάθησης και μνήμης, τη δοκιμασία ακτινωτού λαβυρίνθου και τη δοκιμασία λαβυρίνθου Y, όπου φαίνεται ότι η χορήγηση αυξανόμενων δόσεων Δ^9 -THC (2.5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg) ή του αγωνιστή WIN 55,212-2 (σε σταθερή δόση 1 mg/kg) σε έφηβους επίμυες επηρεάζει αρνητικά τη χωρική μνήμη εργασίας κατά την ενηλικίωση και στα δυο φύλα (Rubino et al., 2009; Rubino et al., 2014; Abboussi et al., 2014). Αξίζει να σημειωθεί εδώ, πως υπάρχουν μελέτες οι οποίες δεν έχουν δείξει κάποια σημαντική επίδραση του κύριου ψυχοδραστικού της κάνναβης ή αγωνιστών των υποδοχέων των κανναβινοειδών σε μια σειρά παραμέτρων της χωρικής μνήμης (Cha et al. 2006; Cadoni et al. 2013; Higuera-Matas et al. 2009). Ωστόσο, οι μελέτες αυτές χαρακτηρίζονται από διαφορετικά δοσολογικά προφίλ Δ^9 -THC, διαφορετική διάρκεια χορήγησης καθώς και διαφορετική ηλικιακή περίοδο χορήγησης, συγκριτικά με την παρούσα μελέτη, γεγονός που πιθανώς εξηγεί και τις διαφορές των αποτελεσμάτων. Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας και λαμβάνοντας υπόψη τις διαθέσιμες βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τη δράση των κανναβινοειδών, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι η αρνητική επίδραση των ουσιών αυτών σε εκφάνσεις της χωρικής μνήμης εξαρτάται άμεσα από τη χορηγούμενη δόση, καθώς φαίνεται ότι σχετικά χαμηλές δόσεις κανναβινοειδών επιβαρύνουν σημαντικά τη χωρική μνήμη σε τρωκτικά, ενώ μεγαλύτερες δόσεις κανναβινοειδών προσβάλλουν τη μνήμη εργασίας και αναφοράς στα στάδια της απόκτησης, της σταθεροποίησης και της ανάκλησης της πληροφορίας, μέσω ενεργοποίησης των CB1 υποδοχέων.

Επίδραση σε ανώτερες εκτελεστικές λειτουργίες και στη γνωστική ευελιξία

Τα αποτελέσματα της παρούσα μελέτης καταδεικνύουν ότι δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ της ομάδας που έλαβε Δ^9 -THC και της ομάδας ελέγχου κατά την εκτέλεση των συμπεριφορικών δοκιμασιών που ελέγχουν ανώτερες εκτελεστικές λειτουργίες. Αξίζει να αναφερθεί ότι παρατηρήθηκε μείωση ως προς την απόδοση κατά την εκτέλεση εκείνων των δοκιμασιών όπου αντιστρέφεται ο κανόνας, στην ομάδα που έλαβε Δ^9 -THC συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, αλλά η μείωση αυτή δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Σε συμφωνία με τις συγκεκριμένες παρατηρήσεις οι Gomes et al. (2015) ανέφεραν ότι η χορήγηση του αγωνιστή των κανναβινοειδών WIN 55,212-2 (1.2 mg/kg) κατά την 40^η έως την 65^η μεταγεννητική ημέρα σε

αρσενικούς επίμυες δεν επηρέασε τη γενικότερη γνωστική ευελιξία (cognitive flexibility) των ενήλικων επιμύων κατά τη διάρκεια εκτέλεσης των ανώτερων γνωστικών δοκιμασιών, παρά μόνο μείωσε την ικανότητα μετατόπισης της προσοχής όταν αντιστρέφεται ο κανόνας που πρέπει να ακολουθήσουν (reversal learning).

Επίδραση στη δοκιμασία προ-παλμικής αναστολής του αντανακλαστικού του αιφνιδιασμού και στην υπερκινητικότητα λόγω χορήγησης αμφεταμίνης

1) Η δοκιμασία προ-παλμικής αναστολής του αντανακλαστικού του αιφνιδιασμού, παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα αναφορικά με τον έλεγχο της αισθητικοκινητικής πληροφορίας, μια λειτουργία που διαταράσσεται σε ασθενείς με σχιζοφρένεια (Steeds et al, 2015). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν έδειξαν διαφορές μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας Δ^9 -THC κατά την εφηβεία ως προς τη συγκεκριμένη συμπεριφορική δοκιμασία. Σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη οι Llorente-Berzal et al. (2013) υποστηρίζουν ότι η χορήγηση Δ^9 -THC (2.5, 5, 10 mg/kg) κατά την εφηβεία (PND 28-45) δεν επηρέασε το ποσοστό προ-παλμικής αναστολής κατά την ενηλικίωση. Στην αντίθετη κατεύθυνση βρίσκονται τα δεδομένα των Renard et al. (2016) που έδειξαν ότι η χρόνια χορήγηση Δ^9 -THC (2.5, 5, 10 mg/kg) σε αρσενικούς επίμυες στο διάστημα PND 35-45 είχε αρνητική επίδραση κατά τη διεργασία της προ-παλμικής αναστολής, με παρατηρούμενη μείωση του ποσοστού προ-παλμικής αναστολής στην ενηλικίωση. Σε συμφωνία με τα παραπάνω ευρήματα βρίσκονται και δυο άλλες μελέτες που υποστηρίζουν ότι η χρόνια χορήγηση WIN 55,212-2 (1.2 mg/kg) σε έφηβους αρσενικούς επίμυες (PND 15-40 και PND 40-65, αντίστοιχα) μείωσε το ποσοστό προ-παλμικής αναστολής κατά την ενηλικίωση (Schneider et al., 2005; Wegener and Koch, 2009). Τα αποτελέσματα που προκύπτουν σχετικά με την επίδραση της Δ^9 -THC κατά την ανάπτυξη στον ηθμό της αισθητικοκινητικής πληροφορίας στην ενηλικίωση δε βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία και οι διαφοροποιήσεις μπορούν να αποδοθούν κυρίως στον διαφορετικό μεθοδολογικό σχεδιασμό που αφορά στη διάρκεια και το διάστημα της χορήγησης. Το συγκεκριμένο ερευνητικό ερώτημα χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση δεδομένης και της χρήσης της συγκεκριμένης διαδικασίας στην μοντελοποίηση της ψύχωσης και της σχιζοφρένειας.

2) Η **χορήγηση αμφεταμίνης** στα τρωκτικά, η οποία είναι έμμεσος ντοπαμινεργικός αγωνιστής, έχει θεωρηθεί ως ένα «κλασσικό» φαρμακολογικό μοντέλο επαγωγής ψυχωτικού τύπου συμπτωματολογίας, που προσομοιάζει κυρίως τα θετικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας. Ας επισημανθεί ότι κλινικές παρατηρήσεις έχουν επίσης, δείξει τη συσχέτιση της χρήσης αμφεταμίνης με την ψύχωση. Η χορήγηση χαμηλών δόσεων Δ⁹-THC κατά την ανάπτυξη επηρέασε το κινητικό προφίλ που προκαλεί η d-αμφεταμίνη στους ενήλικες επίμυες.

Ειδικότερα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η d-αμφεταμίνη *per se* προκάλεσε μεγάλης κλίμακας αύξηση στην οριζόντια και κάθετη κινητικότητα των πειραματοζώων. Ωστόσο, η χορήγηση του ψυχοδιεγερτικού δε λειτούργησε με τον ίδιο τρόπο στους επίμυες που εκτέθηκαν στη χρόνια χορήγηση Δ⁹-THC κατά την εφηβεία, καθώς επέδειξαν μειωμένη ευαισθησία στη δράση της d-αμφεταμίνης. Τα ευρήματα αυτά δε φαίνεται να βρίσκονται σε συμφωνία με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, καθώς οι λίγες υπάρχουσες μελέτες χρόνιας χορήγησης κανναβινοειδών στην εφηβεία επιμύων έχουν δείξει είτε αντίθετα αποτελέσματα (Gomes et al., 2015), είτε καμία στατιστικά σημαντική αλλαγή στην κινητικότητα ενήλικων επιμύων μετά από χορήγηση d-αμφεταμίνης (Ellgren et al., 2004). Όπως προαναφέρθηκε, η ασυμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων πιθανότατα εξηγείται από τις διαφορές στο δοσολογικό σχήμα, τους πειραματικούς χειρισμούς και από το γεγονός ότι οι χαμηλές δόσεις της Δ⁹-THC δεν έχουν απαραίτητα πανομοιότυπη δράση με χαμηλές δόσεις άλλων κανναβινοειδών, όπως οι συνθετικοί CB1 αγωνιστές που χρησιμοποιήθηκαν στις παραπάνω μελέτες.

Τα αποτελέσματα μας υποδεικνύουν πιθανή εμπλοκή της χορήγησης Δ⁹-THC κατά την ανάπτυξη στη ντοπαμινεργική λειτουργία κατά την ενηλικίωση. Το αναπτυξιακό παράθυρο που επιλέχθηκε για τη χορήγηση της Δ⁹-THC, συμπίπτει με το χρονικό σημείο που οι ντοπαμινεργικές νευρωνικές διαδρομές (μεσοφλοιώδη και μεσομεταιχμιακή οδός) βρίσκονται σε διαδικασία ανάπτυξης και υφίστανται την τελική τους διαμόρφωση (Burke and Miczek, 2014). Κατά το διάστημα αυτό χαρακτηρίζονται από μεγάλη ευαισθησία και υποστηρίζεται ότι η ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση ρυθμίζει τα επίπεδα των υποδοχέων ντοπαμίνης D1 και D2 στις εμπλεκόμενες υποφλοιώδεις περιοχές, ενώ αυτά με την σειρά τους ρυθμίζουν τον ρυθμό ανάπτυξης των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Naneix et al., 2012; 2013). Παράλληλα, όπως προαναφέρθηκε, το ενδοκανναβινοειδές σύστημα αυξάνει τη ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση, ενώ επιπροσθέτως έχει προταθεί ότι προκαλεί σε αυτό αλλαγές σε επίπεδο νευρωνικής πλαστικότητας, μέσω της συμμετοχής στη ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων D1 και D2 (Martin et al., 2008; Dalton and Zavitsanou, 2010). Επιπρόσθετα, είναι γνωστό ότι οι CB1 υποδοχείς μέσω της υψηλής πυκνότητάς τους σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες της

κοιλιακής καλυπτικής περιοχής (VTA), ασκούν ισχυρό έλεγχο στην ντοπαμινεργική δραστηριότητα της περιοχής αλλά και κατ' επέκταση σε περιοχές στις οποίες αυτή προβάλλει στο μεταχιακό σύστημα και τον προμετωπιαίο φλοιό (Renard et al., 2014 και 2016, Bloomfield et al., 2017).

Θα μπορούσε να υποστηριχθεί λοιπόν, ότι για τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης θα μπορούσε να θεωρηθεί ως πιθανή εξήγηση το γεγονός ότι ο επαναλαμβανόμενος εξωτερικός ερεθισμός του συστήματος των ενδοκανναβινοειδών κατά την εφηβεία, προκαλεί άμεσες αλλά και μακροπρόθεσμες αλλαγές στη ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση, γεγονός που πιθανώς συνδέεται με την ικανότητα της d-αμφεταμίνης, ενός έμμεσου ντοπαμινεργικού αγωνιστή, να επάγει τις χαρακτηριστικές της επιδράσεις στην κινητική συμπεριφορά. Η παρούσα ερμηνεία μπορεί να συνεισφέρει στη γενικότερη συζήτηση περί συσχετισμού της χρήσης κάνναβης στην εφηβεία με την εμφάνιση ψυχωτικού τύπου συμπτωματολογίας στην ενηλικίωση, μέσω της δυσλειτουργίας του ντοπαμινεργικού συστήματος. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι χρειάζονται επιπλέον μελέτες για να διερευνηθεί το επίπεδο της ντοπαμινεργικής δραστηριότητας σε υποφλοιώδεις περιοχές του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένου και του επικλινή πυρήνα του διαφράγματος, οι οποίες κυρίως έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση αυξημένης κινητικής δραστηριότητας λόγω χορήγησης αμφεταμίνης.

Συμπερασματικά, οι συμπεριφορικές πειραματικές διαδικασίες της παρούσας μελέτης έχουν δείξει ότι η χορήγηση χαμηλών κλιμακούμενων δόσεων Δ^9 -THC κατά την ανάπτυξη προκάλεσε αλλαγές σε δείκτες που ελέγχθηκαν κατά την ενηλικίωση και σχετίζονται με την κινητική δραστηριότητα και εκφάνσεις γνωστικής λειτουργίας. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα αναφορικά με την επίδραση του κινητικού προφίλ της αμφεταμίνης που υποδεικνύουν μια «αναχαίτιση» της δράσης της και που χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση.

Χορήγηση κανναβινοειδών και νευροχημικές - νευροβιολογικές προσεγγίσεις

Οι νευροχημικές και νευροβιολογικές μας προσεγγίσεις είχαν ως στόχο την εξέταση κρίσιμων δεικτών της ντοπαμινεργικής και σεροτονεργικής λειτουργίας, καθώς και της νευροπλαστικότητας για να επισημανθεί, όπου είναι εφικτή, και η συσχέτιση τους με αντίστοιχα συμπεριφορικά ευρήματα που προαναφέρθηκαν.

Επίδραση στο ντοπαμινεργικό σύστημα, εξετάζοντας δείκτες νευροχημείας και τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του μεταφορέα της ντοπαμίνης (DAT)

Τα αποτελέσματα των πειραματικών προσεγγίσεων έδειξαν αύξηση της ντοπαμινεργικής δραστηριότητας στον ιππόκαμπο, σε αντίθεση με τον προμετωπιαίο φλοιό, όπου παρατηρήθηκε μείωσή στους Δ⁹-THC-επίμυες συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Ας σημειωθεί ότι παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα της DA και μεταβολιτών της στο ραχιαίο ραβδωτό σώμα, αλλά δεν υπήρξε αντίστοιχα στατιστικώς σημαντική μεταβολή του ρυθμού ανακύκλισης, ενώ παράλληλο εύρημα σημειώθηκε και στον επικλινή πυρήνα, όπου υπήρξε αύξηση του μεταβολίτη της DA, χωρίς ακόλουθη αύξηση του ρυθμού ανακύκλισης. Αρκετές μελέτες στη βιβλιογραφία αναφέρουν μεταβολές στη ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση (Bortolato et al., 2014; Renard et al., 2016; Cadoni et al., 2013; Zamberletti et al., 2012), οι οποίες κυρίως αναδεικνύουν αυξημένη ντοπαμινεργική δραστηριότητα σε υποφλοιώδεις περιοχές, όπως ο επικλινής πυρήνας του διαφράγματος και το ραχιαίο ραβδωτό σώμα, μετά από χορήγηση αγωνιστών των υποδοχέων των κανναβινοειδών στην εφηβεία (Bortolato et al., 2014; Renard et al., 2016), σημειώνοντας ότι το δοσολογικό προφίλ που επιλέγεται εστιάζει κυρίως σε υψηλές δόσεις.

Οι συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη (ιππόκαμπος, προμετωπιαίος φλοιός, ραχιαίο ραβδωτό σώμα και επικλινής πυρήνας του διαφράγματος), επιλέχθηκαν λόγω της εμπλοκής τους στις διαδικασίες εγρήγορσης, «εσωτερικής διεγερσιμότητας», μη συνειρμικής μνήμης, χωρικής μνήμης και μάθησης, αλλά και λόγω της διφασικής εμπλοκής της ντοπαμινεργικής λειτουργίας σε φλοιώδεις περιοχές συγκριτικά με τις υποφλοιώδεις δομές στο νευροβιολογικό υπόστρωμα που υπόκειται της συμπτωματολογίας των ψυχωτικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένης της σχιζοφρένειας (Borde et al., 1991; Howes and Kapur, 2009; Elsworth et al., 2015).

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης ως προς τη ντοπαμινεργική λειτουργία, δείχνουν ένα αντίρροπο προφίλ ντοπαμινεργικής δραστηριότητας μεταξύ ιππόκαμπου και προμετωπιαίου

φλοιού μετά από τη χορήγηση της Δ^9 -THC κατά την εφηβεία, το οποίο συνάδει με τα συμπεριφορικά μας ευρήματα που αφορούν στην έκπτωση των γνωστικών λειτουργιών που εξετάστηκαν. Τα συγκεκριμένα ευρήματα αποτελούν ένα υποσύνολο προκλινικών παρατηρήσεων, οι οποίες συνεισφέρουν μεταφραστικά στα κλινικά ευρήματα που αφορούν γνωστικές διαταραχές και αρνητικού τύπου συμπτωματολογία σε ενήλικες με ιστορικό χρήσης Δ^9 -THC κατά την εφηβεία (Schweinsburg et al., 2008, 2010; Dougherty et al., 2013; Padula et al., 2007; Higuera-Matas et al., 2015; Arsenault et al., 2002; Murray et al., 2008).

Αναφορικά με τον DAT, η παρούσα μελέτη δεν έδειξε αλλαγές στα επίπεδα έκφρασής του σε καμία από τις περιοχές που μελετήθηκαν. Το γεγονός αυτό μπορεί να συσχετιστεί με τη μη ύπαρξη σημαντικών μεταβολών στη ντοπαμινεργική δραστηριότητα, εκτός της περιοχής του ιπποκάμπου και του προμετωπιαίου φλοιού, οι οποίες όμως εκφράζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης DAT συγκριτικά με τις πλούσιες περιοχές σε ντοπαμινεργική δραστηριότητα, όπως το ραχιαίο ραβδωτό σώμα και ο επικλινής πυρήνας του διαφράγματος (Sesack et al., 1998). Μια ενδιαφέρουσα μελέτη χρησιμοποιώντας μετρήσεις *in situ* υβριδοποίησης σε ενήλικους αρσενικούς και θηλυκούς απογόνους αναφέρει ότι η προγεννητική χορήγηση Δ^9 -THC (5 mg/kg) σε εγκύους θηλυκούς επίμυες δεν επέφερε αλλαγές στον DAT, σε επίπεδο mRNA, στη μέλαινα ουσία και την VTA (Garcia-Gil et al., 1998). Ας σημειωθεί επίσης ότι ιδιαίτερα περιορισμένα είναι τα κλινικά ευρήματα που συσχετίζουν άμεσα τις επιπτώσεις της χρήσης Δ^9 -THC με τα επίπεδα έκφρασης του μεταφορέα DAT (Bossong et al., 2009; Stokes et al., 2009). Μόνο μια μελέτη που διεξήχθη σε χρήστες κάνναβης - που ταυτόχρονα όμως ήταν και χρήστες καπνού - έδειξε μείωση κατά 20% της διαθεσιμότητας του DAT στο ραβδωτό σώμα, μετά από ανάλυση τομογραφίας PET και μετά από έγχυση του $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$, ενός ειδικού ραδιοσυνδέτη του μεταφορέα της ντοπαμίνης (Leroy et al., 2012).

Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας υποδεικνύουν την επίδραση της χορήγησης χαμηλών δόσεων Δ^9 -THC στη ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση κατά την ενηλικίωση. Λαμβάνοντας υπόψη την εμπλοκή του ντοπαμινεργικού συστήματος στην κινητικότητα, σε εκφάνσεις της μνήμης και μάθησης, αλλά και την απορύθμισή του, με τοποειδικό τρόπο, σε διαταραχές όπως η εξάρτηση και η σχιζοφρένεια (Polissidis et al., 2014; Rodvelt et al., 2007; Drews et al., 2005), θα μπορούσε να συσχετισθεί η επίδραση της Δ^9 -THC στην αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα και σε συγκεκριμένες εκφάνσεις της μη-συνεργικής μνήμης και της χωρικής μνήμης και μάθησης με τις ντοπαμινεργικές μεταβολές στο ραβδωτό σώμα/επικλινή πυρήνα του διαφράγματος, τον ιππόκαμπο και τον προμετωπιαίο φλοιό.

Επίδραση στο σεροτονεργικό σύστημα, εξετάζοντας δείκτες νευροχημείας και τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του μεταφορέα της σεροτονίνης (SERT)

Τα νευροχημικά αποτελέσματά μας δείχνουν μειωμένη σεροτονεργική δραστηριότητα στον ιππόκαμπο και το ραχιαίο ραβδωτό σώμα, ενώ αυξημένη δραστηριότητα παρατηρείται στον προμετωπιαίο φλοιό και τον επικλινή πυρήνα τους διαφράγματος για τους Δ^9 -THC-επίμυες συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι το σεροτονεργικό σύστημα δεν έχει μελετηθεί τόσο εκτενώς με επακόλουθες περιορισμένες αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία. Χαρακτηριστικά αναφέρουμε ότι υπάρχουν μόνο τρεις αναφορές που εξετάζουν σεροτονεργικούς δείκτες σε νευροβιολογικό επίπεδο. Σε μία μελέτη εξ αυτών, μετά από χορήγηση υψηλής δόσης Δ^9 -THC (5 mg/kg) κατά την εφηβεία δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές ως προς τα επίπεδα της σεροτονίνης καθώς και του μεταβολίτη της στις περιοχές του ιπποκάμπου, του προμετωπιαίου φλοιού και του ραβδωτού σώματος κατά την ενηλικίωση (Shen et al., 2011).

Η μειωμένη σεροτονεργική δραστηριότητα στον ιππόκαμπο μαζί με τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του μεταφορέα της σεροτονίνης (SERT) δείχνουν ένα συγκεκριμένο προφίλ σεροτονεργικής νευροδιαβίβασης που εμπλέκεται σε γνωστικού τύπου διεργασίες και στη νευροπλαστικότητα (Liy-Salmeron and Meneses, 2008; Puig and Gullidge, 2011). Σε συμφωνία με τα δεδομένα μας, ύστερα από χορήγηση Δ^9 -THC κατά την εφηβεία σε δοσολογία 2.5, 5 και 10 mg/kg εμφανίζεται αύξηση του αριθμού των ινών που είναι θετικές στην πρωτεΐνη μεταφορέα της σεροτονίνης (SERT) στις περιοχές του ιπποκάμπου αρσενικών ενήλικων επιμύων (Lopez-Rodriguez et al., 2014), ενώ οι Shen et al. (2011) υποστήριξαν ότι δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές μετά από χορήγηση υψηλής δόσης Δ^9 -THC (5 mg/kg) κατά την εφηβεία, στις περιοχές του ιπποκάμπου, του προμετωπιαίου φλοιού και του ραβδωτού σώματος κατά την ενηλικίωση.

Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας υποδεικνύουν τη σημαντική επίδραση της χορήγησης χαμηλών δόσεων Δ^9 -THC στη σεροτονεργική νευροδιαβίβαση κατά την ενηλικίωση. Λαμβάνοντας υπόψη την εμπλοκή και τον ουσιαστικό ρόλο του σεροτονεργικού συστήματος σε εκφάνσεις της μνήμης και μάθησης και την νευροπλαστικότητα (Homberg, et al., 2014; Porona, et al., 2017), αλλά και την απορύθμισή του, με τοποειδικό τρόπο, σε διαταραχές που εμπεριέχουν γνωστικές δυσλειτουργίες, όπως το άγχος η κατάθλιψη και η σχιζοφρένεια, σύμφωνα άλλωστε και με προηγούμενες μελέτες μας (Rentesi et al., 2013; Dalla et al., 2005), θα μπορούσε να συσχετιστεί η αρνητική επίδραση της Δ^9 -THC σε εκφάνσεις της μη-

συνεσμικής μνήμης, της χωρικής μνήμης και μάθησης με τις σεροτονεργικές μεταβολές στο ραβδωτό σώμα, τον ιππόκαμπο και τον προμετωπιαίο φλοιό.

Ιδιαίτερη σημασία έχουν και τα ευρήματά μας που δείχνουν αντίθετο προφίλ ντοπαμινεργικής/σεροτονεργικής δραστηριότητας ανά περιοχή στα ενήλικα πειραματόζωα μετά από τη χορήγηση Δ^9 -THC κατά την εφηβεία. Ο συγκεκριμένος ενδοφαινότυπος χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση και μπορεί να συνεισφέρει σε μεταφραστικό επίπεδο στην κατανόηση του παθοφυσιολογικού υποστρώματος που σχετίζεται με συγκεκριμένες συμπεριφορικές αποκρίσεις και, ειδικά, με διαταραχές μνήμης και μάθησης που παρατηρούνται μετά από χρήση κανναβινοειδών.

Επίδραση σε μοριακούς δείκτες νευροπλαστικότητας, εκτός του σεροτονεργικού συστήματος, όπως στην έκφραση του BDNF και των υποδοχέων του TrkB και p75

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η χορήγηση Δ^9 -THC κατά την περίοδο της εφηβείας προκάλεσε μείωση των επιπέδων του προερχόμενου από τον εγκέφαλο νευροτροφικού παράγοντα, (BDNF) στις περιοχές του ιπποκάμπου και του προμετωπιαίου φλοιού, έναντι της ομάδας ελέγχου, και συνακόλουθη αύξηση των επιπέδων του υποδοχέα TrkB στην περιοχή του ιπποκάμπου. Ας σημειωθεί ότι ο BDNF, ένας νευροτροφικός παράγοντας με ιδιαίτερα υψηλή κατανομή στον εγκέφαλο, ιδίως στις περιοχές του ιπποκάμπου, του υποθαλάμου και του προμετωπιαίου φλοιού, κατέχει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες της νευρωνικής πλαστικότητας, της μνήμης, καθώς και της συναπτικής νευροδιαβίβασης (Duman, et al., 2016; Lu, et al., 2014; Polyakova, et al., 2015). Είναι προφανές ότι στην παρούσα μελέτη οι συγκεκριμένες περιοχές, πέραν της ευρείας παρουσίας του BDNF και των υποδοχέων του σε αυτές, επιλέχθηκαν να μελετηθούν και λόγω της εμπλοκής τους σε διαδικασίες γνωστικού τύπου, όπως η μνήμη και η μάθηση (Bramham and Messaoudi, 2005; Nagappan and Lu 2005).

Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν δημοσιευμένες εργασίες σχετικά με την επίδραση της χρόνιας χορήγησης Δ^9 -THC κατά την εφηβεία στην έκφραση του BDNF, σε ενήλικους αρσενικούς επίμυες. Εργασίες κατά τις οποίες χορηγήθηκαν ωστόσο άλλοι γνωστοί αγωνιστές των υποδοχέων κανναβινοειδών, όπως οι αγωνιστές CP-55,940 ή WIN 55,212- 2, κατά την περίοδο της εφηβείας ή την προγεννητική περίοδο αντίστοιχα, έχουν δείξει μείωση των επιπέδων του BDNF σε συγκεκριμένες ανατομικές περιοχές του ιπποκάμπου θηλυκών επίμυων (López-Gallardo et al., 2012), καθώς και μείωση των επιπέδων της ώριμης μορφής του BDNF - αλλά και μορίων που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του νευροπαράγοντα, όπως οι

κινάσες ERK1/2 και α -CaMKII - στον ιππόκαμπο και τον προμετωπιαίο φλοιό επίμυων (Maj et al., 2007).

Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί το γεγονός ότι ο BDNF μαζί με τη σεροτονίνη αποτελούν τους κύριους διαμεσολαβητές φαινομένων νευροπλαστικότητας (Homberg et al., 2014; Porona et al., 2017). Εντούτοις, η λειτουργική τους αλληλεπίδραση παραμένει εν πολλοίς υπό διερεύνηση. Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι τοποειδικές αλλαγές στη σεροτονεργική δραστηριότητα ενήλικων επιμύων μετά από τη χορήγηση χαμηλών δόσεων Δ^9 -THC κατά την εφηβεία συνοδεύτηκαν από μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του BDNF στις περιοχές του ιπποκάμπου και του προμετωπιαίου φλοιού. Θα μπορούσε, επομένως, να υποθεθεί ότι οι προαναφερθείσες αλλαγές στα δυο αυτά κομβικά νευρορυθμιστικά μόρια μπορεί να σχετίζονται με τον «αποδιοργανωμένο γνωστικά» φαινότυπο που παρατηρείται στους ενήλικους αρσενικούς επίμυες που έλαβαν χαμηλές δόσεις Δ^9 -THC κατά την εφηβεία.

Επιπλέον, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι η μείωση των επιπέδων του BDNF στις περιοχές του ιπποκάμπου και του φλοιού, που παρατηρήθηκε στα αποτελέσματά μας, θα μπορούσε να συσχετιστεί με διαταραχές διεργασιών νευρωνικής πλαστικότητας και αυξημένη ευαισθησία σε νευροψυχιατρικές παθήσεις, οι οποίες έχουν συσχετιστεί με μειωμένη παρουσία νευροτροφικών παραγόντων σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η σηματοδότηση BDNF/TrkB (Weickert et al., 2003; Green et al., 2011; Favalli et al., 2012), καθώς και η σηματοδότηση των υποδοχέων των κανναβινοειδών (Muller-Vahl and Emrich, 2008; Fernandez-Espejo et al., 2009; Bossong and Niesink, 2010), έχουν συσχετιστεί με τη βασική ψυχοπαθολογία ασθενειών όπως η σχιζοφρένεια. Η κατάχρηση κάνναβης κατά την εφηβεία είναι ανάμεσα στους σημαντικότερους ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη ψυχωτικής συμπτωματολογίας κατά την ενήλικη ζωή (Moore et al., 2007). Μάλιστα μελέτες που συνδέουν τον κοινό πολυμορφισμό Val66Met στο γονίδιο του BDNF, την έκθεση σε κάνναβη και το φύλο, με την ηλικία έναρξης εκδήλωσης σχιζοφρένειας (Decoster et al., 2011), δίνουν έμφαση στην ανάγκη να μελετηθεί περαιτέρω η σχέση μεταξύ αυτών των παραγόντων σε κατάλληλα προκλινικά ζωικά μοντέλα. Δεδομένα από ζωικά μοντέλα (Butovsky et al., 2005) και από κλινικές μελέτες (D' Souza et al., 2009) υποστηρίζουν πως η χορήγηση κάνναβης επηρεάζει άμεσα τα επίπεδα του BDNF. Ένας μικρός αριθμός εργασιών έχουν εστιάσει στη σχέση του BDNF με το ενδογενές σύστημα των κανναβινοειδών. Έχει δειχτεί ότι ο BDNF ρυθμίζει τη λειτουργία των CB1 υποδοχέων στο ραβδωτό σώμα του

εγκεφάλου (De Chiara et al., 2010), ενώ η έλλειψη CB1 υποδοχέων σε μύες (Aso et al., 2008) ή η χρόνια χορήγηση ανταγωνιστών των CB1 υποδοχέων σε επίμυες (Beyer et al., 2010) προκαλεί μείωση των επιπέδων του BDNF στην περιοχή του ιπποκάμπου και εκδήλωση συμπεριφορικών φαινοτύπων που αντανακλούν νευροψυχιατρικές διαταραχές. Έχοντας υπόψη τα δεδομένα αυτά, μπορούμε να συμπεράνουμε πως «παρεμβάσεις» στην ομαλή λειτουργία του ενδογενούς συστήματος των κανναβινοειδών κατά την περίοδο της ανάπτυξης μπορούν να οδηγήσουν σε μεταβολές της έκφρασης του BDNF ή της κάτωθεν σηματοδότησής του, οι οποίες, με τη σειρά τους, μπορούν να διαταράξουν τη νευρωνική λειτουργία, είτε μέσω τροποποιημένης απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών, είτε φυσικά μέσω διαταραχών της νευρωνικής πλαστικότητας.

Επίδραση σε δείκτες του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος, όπως CB1 και CB2 υποδοχείς

Χρήσιμες πληροφορίες αναφορικά με τη μακροχρόνια δράση των εξωγενώς χορηγούμενων κανναβινοειδών στο ενδοκανναβινοειδές σύστημα αυτό καθ' αυτό μπορεί να προσφέρει η μελέτη της μακροχρόνιας επίδρασης της εξωγενώς χορηγούμενης Δ^9 -THC κατά την εφηβεία στους υποδοχείς του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης εστίασαν στη μελέτη των δύο κύριων τύπων υποδοχέων των κανναβινοειδών και έδειξαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα των κανναβινοειδών τύπου 1 στον προμετωπιαίο φλοιό, χωρίς να επηρεάζονται τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα αυτού σε άλλες περιοχές. Επίσης, το φαρμακολογικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε δεν επηρέασε ούτε τα επίπεδα έκφρασης του CB2 υποδοχέα σε καμία από τις περιοχές που εξετάστηκαν. Ειδικότερα, σχετικά με τη χορήγηση κάνναβης κατά το αναπτυξιακό παράθυρο της εφηβείας, η ομάδα των Lopez Rodriguez et al. (2013) έδειξε ότι η χορήγηση Δ^9 -THC (2.5, 5, 10 mg/kg) κατά την εφηβεία σε θηλυκούς επίμυες οδήγησε σε μείωση, αν και όχι στατιστικά σημαντική, των επιπέδων του CB1 υποδοχέα στις περιοχές CA1, CA3 και οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου κατά την ενηλικίωση. Αντίστοιχη μείωση παρατηρήθηκε και στα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης του CB1 υποδοχέα στο ραβδωτό σώμα ενήλικων επιμύων, μετά από χρόνια χορήγηση υψηλής δόσης Δ^9 -THC (5.6 mg/kg) κατά την εφηβεία (Winseauer et al., 2012). Αντίθετα, δυο άλλες μελέτες δεν έδειξαν αλλαγές σε επίπεδο CB1 mRNA και πρωτεΐνης κατά την ενηλικίωση στον PFC και τον ιππόκαμπο, αντίστοιχα, είτε μετά από χρόνια χορήγηση υψηλής δόσης Δ^9 -THC (6 mg/kg), είτε μετά από χρόνια χορήγηση Δ^9 -THC (2.5, 5, 10 mg/kg) κατά την εφηβεία (Steel et al., 2014; Zamberletti et al., 2014).

Ας σημειωθεί ότι η χρόνια χορήγηση κάνναβης σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα έκφρασης του CB1 υποδοχέα, κάτι που πιθανώς να συνδέεται και με φαινόμενα ανάπτυξης φαρμακολογικής αντοχής και εξάρτησης (Maldonado et al., 2002; Clapper et al., 2009).

Τέλος, αναφορικά με τον CB2 υποδοχέα, σε μια μόνη μελέτη αναφέρεται αύξηση των επιπέδων έκφρασής του σε μικρογλοιακά κύτταρα του PFC ενήλικων επιμύων, μετά από χορήγηση Δ^9 -THC (2.5, 5, 10 mg/kg) κατά την εφηβεία (Zamberletti et al., 2015), γεγονός που υπογραμμίζει την ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης της επίδρασης των κανναβινοειδών στα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα αυτού.

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε κλινικό επίπεδο, μεταθανάτια μελέτη εγκεφάλων από χρόνιους χρήστες κάνναβης έδειξε μειωμένα επίπεδα πρόσδεσης και μειωμένα επίπεδα mRNA του CB1 υποδοχέα στις περιοχές του κερκοφόρου πυρήνα και του κελύφους, καθώς και στον φλοιό (Villares, 2007). Αναφορικά με τις απεικονιστικές μελέτες μέσω PET, παρατηρήθηκε μείωση του υποδοχέα CB1 στις περιοχές του φλοιού και του επικλινή πυρήνα (Hirvonen et al., 2012a; Ceccarini et al., 2013). Αντίθετα με τα προαναφερθέντα, σε σχιζοφρενείς ασθενείς (Volk and Lewis, 2016) μεταθανάτια ευρήματα, μέσω *in situ* υβριδοποίησης, ανοσοϊστοχημείας και qPCR, έδειξαν μειωμένα επίπεδα mRNA του CB1 υποδοχέα, ενώ, αντίθετα, μελέτες αυτοραδιογραφίας έδειξαν αυξημένα επίπεδα πρόσδεσης του CB1 στον DLPFC και τον πρόσθιο προσαγωγίο φλοιό. Μια πιθανή εξήγηση για αυτή την αναντιστοιχία στα αποτελέσματα ανάλογα με την τεχνική μέτρησης είναι ότι σε σχιζοφρενείς ασθενείς πιθανόν τα επίπεδα των διαμεμβρανικών CB1 υποδοχέων να είναι αυξημένα, και επομένως οι υποδοχείς είναι ευκολότερα προσβάσιμοι για πρόσδεση, σε αντίθεση με τα ολικά επίπεδα ενδοκυττάρων CB1 υποδοχέων, που είναι χαμηλότερα.

Στην παρούσα μελέτη εστιάσαμε τον φαρμακολογικό χειρισμό της εξωγενώς χορηγούμενης κάνναβης στην κρίσιμη αναπτυξιακή φάση της εφηβείας, όπου, υπό φυσιολογικές συνθήκες, στο στάδιο αυτό παρατηρείται μια αυξημένη δραστηριότητα των CB1 υποδοχέων, ιδιαίτερα στις εσωτερικές πτυχές του DLPFC (ραχιαίο-πλευρικού προμετωπιαίου φλοιού). Το φαρμακολογικό μοντέλο των χαμηλών δόσεων Δ^9 -THC δε φάνηκε να οδηγεί σε μακροχρόνιες και σημαντικές αλλαγές στο σύστημα των κανναβινοειδών, τουλάχιστον σε επίπεδο υποδοχέων σε περιοχές όπως ο ιπόκαμπος και το ραβδωτό σώμα. Το γεγονός αυτό πιθανώς να οφείλεται σε αντισταθμιστικούς μηχανισμούς που συντελούνται κατά την ανάπτυξη και δεν μας επέτρεψαν να δούμε μακροχρόνιες αλλαγές σε επίπεδο υποδοχέων των κανναβινοειδών στην ενηλικίωση, παρά μόνο οδήγησαν στην αποτύπωση σημαντικών αλλαγών σε επίπεδο συμπεριφορικών και

νευροχημικών δεικτών. Θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι η στατιστικώς σημαντική αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης του CB1 υποδοχέα στον PFC πιθανώς συσχετίζεται με τις παρατηρούμενες ντοπαμινεργικές/νευροχημικές αλλαγές που αντίστοιχα εντοπίστηκαν, δεδομένου και του ρυθμιστικού ρόλου του συστήματος των ενδοκανναβινοειδών στα άλλα νευροδιαβιβαστικά συστήματα. Τα συγκεκριμένα ευρήματα συμβάλλουν στην ανάπτυξη νέων επιστημονικών ερωτημάτων για το ρόλο του συστήματος των ενδοκανναβινοειδών σε διαδικασίες νευρωνικής ρύθμισης και πλαστικότητας ειδικότερα μετά από χορήγηση/χρήση κανναβινοειδών κατά την εφηβεία.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματά της παρούσας μελέτης δείχνουν καθαρά ότι το συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρήσης χαμηλών δόσεων Δ⁹-THC κατά την εφηβεία διεγείρει την κινητικότητα/εξερευνητικότητα, διαταράσσει την ομαλή εξέλιξη της διεργασίας της εξοικείωσης, υποδεικνύοντας δυσμενή επίδραση στη μη συνειρμική μνήμη, ενώ παρουσιάζει δυσμενή επίδραση στην έκφραση της χωρικής μνήμης και μάθησης. Υπογραμμίζεται, επίσης, ότι το συγκεκριμένο δοσολογικό προφίλ που ακολουθήθηκε δεν είχε δυσμενείς επιπτώσεις σε ανώτερες εκτελεστικές λειτουργίες και στην αισθητικοκινητική ροή πληροφοριών. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν μεταβολές στη ντοπαμινεργική και σεροτονεργική νευροδιαβίβαση σε περιοχές που σχετίζονται με την έκφραση των κινητικών και γνωστικών λειτουργιών. Οι παρατηρούμενες μεταβολές στα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης στο μονοπάτι του νευροπαράγοντα BDNF έρχονται να ενισχύσουν τα συμπεριφορικά αποτελέσματα αναφορικά με τη σαφή, δυσμενή επίδραση που εντοπίζεται στην έκφραση της χωρικής μνήμης και μάθησης.

Τα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης συνεισφέρουν ουσιαστικά στο ερευνητικό πεδίο που αφορά στις δράσεις των κανναβινοειδών στο ΚΝΣ, ενώ, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς εστιάζουν στις επιδράσεις μικρών δόσεων του κύριου ψυχοδραστικού συστατικού της κάνναβης σε διαδικασίες κινητικότητας, μνήμης και μάθησης, ανώτερες εκτελεστικές λειτουργίες και στη νευροπλαστικότητα. Ας σημειωθεί ότι οι χαμηλές, κλιμακούμενες δόσεις κανναβινοειδών «προσομοιάζουν» καλύτερα τη χρήση που γίνεται από τους εφήβους, λόγω της αναζήτησης κυρίως της ευφορικής δράσης και αποφυγής της κατασταλτικής δράσης που παρατηρείται κατά την λήψη υψηλών δόσεων. Επιπλέον, τα δεδομένα της παρούσας μελέτης αποκτούν ιδιαίτερη σημασία λόγω της προσπάθειας συσχέτισή τους με αντίστοιχους νευροχημικούς/νευροβιολογικούς παράγοντες προκειμένου να

καταγραφεί ένας βιο-συμπεριφορικός φαινότυπος ο οποίος θα συμβάλλει, σε μεταφραστικό επίπεδο, στο κύριο κλινικό ερώτημά που αφορά στη μελέτη της χρήσης κάνναβης σε χαμηλές δόσεις ως παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη ψυχοπαθολογίας αργότερα κατά την ενηλικίωση.

Βέβαια, θα πρέπει να τονιστεί ότι περαιτέρω μελέτες απαιτούνται, και ειδικότερα εκείνες που θα μελετήσουν την επίδραση της χρόνιας χορήγησης μικρών δόσεων της Δ^9 -THC κατά την εφηβεία, αλλά και άλλων αγωνιστών των CB1 και CB2 υποδοχέων στη λειτουργία του ίδιου του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος, άλλων νευροβιολογικών συστημάτων και της αλληλεπίδρασής τους, ως κρίσιμο παράγοντα φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών διαδικασιών του ΚΝΣ.

Πίνακας 4.1. Συνοπτική σχηματική παρουσίαση συσχετίσεων συγκεκριμένων συμπεριφορικών αποκρίσεων με συγκεκριμένους νευροχημικούς δείκτες που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη.

	Νευροδιαβιβαστής/ Νευροπαράγοντας	Συμπεριφορική απόκριση	Εμπλεκόμενη εγκεφαλική περιοχή
Ενδοκανναβινοειδές σύστημα → ↑ Δ^9-THC →	DA ↔	Απόκριση στο νέο ↔	NAC
	DA ↔	Μη συνειρμική μνήμη ↔	DS
	DA / 5-HT ↔ BDNF	Χωρική μνήμη και μάθηση ↔	HIPP
	5-HT / DA ↔	Γνωστική ευελιξία ↔	PFC
	5-HT / DA ↔	Ηθμός αισθητικοκινητικής πληροφορίας ↔	PFC, NAC

DA: ντοπαμίνη, 5-HT: σεροτονίνη, NAC: επικλινή πυρήνας του διαφράγματος, PFC: προμετωπιαίος φλοιός, DS: ραχιαίο ραβδωτό σώμα, HIPP: ιππόκαμπος, ↔: αλληλεπίδραση.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συνεισφέρουν στη συσσώρευση των γνώσεών μας αναφορικά με την επίδραση των χαμηλών δόσεων κανναβινοειδών κατά την εφηβεία σε συμπεριφορικές παραμέτρους και την επίδρασή του στη ντοπαμινεργική και σεροτονεργική λειτουργία του εγκεφάλου, αλλά και για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της Δ⁹-THC και του ψυχοδιεγερτικού αμφεταμίνη κατά την ενηλικίωση. Η συγκεκριμένη πειραματική εργασία κατέληξε στα παρακάτω ευρήματα σχετικά με την επίδραση των χαμηλών κλιμακούμενων δόσεων Δ⁹-THC κατά την εφηβεία σε συμπεριφορικούς, νευροχημικούς και νευροβιολογικούς δείκτες κατά την ενηλικίωση:

- **Αύξηση της κινητικής συμπεριφοράς κατά την ένταξη σε νέο περιβάλλον**, όπως αυτή εκτιμήθηκε από την αύξηση της οριζόντιας και κάθετης κινητικότητας στη συμπεριφορική δοκιμασία ανοικτού πεδίου.
- **Αλλαγές στο προφίλ εξοικείωσης των Δ⁹-THC επίμυων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου**, μετά από επαναλαμβανόμενες δοκιμασίες στο ανοικτό πεδίο.
- **Μείωση ικανότητας διάκρισης στη δοκιμασία αναγνώρισης θέσης αντικειμένου και αρνητική επίδραση στη έκφραση χωρικής μνήμης και μάθησης**, όπως αυτή καταγράφηκε κατά τη δοκιμασία Υδάτινου Λαβύρινθου κατά Morris.
- **Μη παρατηρούμενες αλλαγές στις δοκιμασίες μετατόπισης της προσοχής και προπαλμικής αναστολής του αντανακλαστικού του αιφνιδιασμού.**
- **Μείωση της υπερκινητικότητας που προκαλεί η οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης στην οριζόντια και κάθετη κινητικότητα των ενήλικων επιμύων μετά από χρόνια χορήγηση Δ⁹-THC κατά την εφηβεία.**
- **Αντίθετης κατεύθυνσης αλλαγές στη ντοπαμινεργική και σεροτονεργική νευροδιαβίβαση σε περιοχές που εμπλέκονται σε συμπεριφορικές διεργασίες**, όπως η κινητικότητα, οι εκφάνσεις της μνήμης και μάθησης και οι ανώτερες γνωστικές λειτουργίες.
- **Αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του μεταφορέα της σεροτονίνης (SERT) στην περιοχή του ιπποκάμπου.**
- **Μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του νεροπλαστικού παράγοντα BDNF στις περιοχές του ιπποκάμπου και του προμετωπιαίου φλοιού και αυξημένα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα TrkB στην περιοχή του ιπποκάμπου.**
- **Αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα των κανναβινοειδών τύπου 1 στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού**, γεγονός που υποδηλώνει την εμπλοκή του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος ως κρίσιμος νευρορυθμιστικός παράγοντας.

Συνοψίζοντας, μπορεί να υποστηριχθεί ότι τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν την εμπλοκή των εξωγενώς χορηγούμενων κανναβινοειδών, ακόμα και σε χαμηλές δόσεις, στην κινητική λειτουργία, σε διαδικασίες μνήμης και μάθησης και στις μεταβολές του ντοπαμινεργικού και σεροτονεργικού συστήματος σε εγκεφαλικές περιοχές που σχετίζονται με την κινητική δραστηριότητα, το κύκλωμα της ανταμοιβής, τη νευροπλαστικότητα και τις γνωστικές λειτουργίες.

Ειδικότερα, υποστηρίζουμε και επιβεβαιώνουμε την αρχική υπόθεση και το σκοπό της εργασίας μας για την εμφάνιση συμπεριφορικών, νευροχημικών και νευροβιολογικών διαταραχών έπειτα από τη χορήγηση του χαμηλών κλιμακούμενων δόσεων του κύριου ψυχοδραστικού προϊόντος της κάνναβης, Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλης, σε πειραματόζωα που βρίσκονται στην ανάπτυξη. Επιπλέον, επιβεβαιώνεται η αρχική μας υπόθεση σχετικά με την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ της χρόνιας χορήγησης Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλης σε έφηβους επίμυες με το κινητικό πρότυπο που επάγει η αμφεταμίνη κατά την ενηλικίωση.

Η παρούσα έρευνα αποτύπωσε έναν ενδοφαινότυπο που χαρακτηρίζεται από την παράλληλη αξιολόγηση συμπεριφορικών, νευροχημικών και νευροβιολογικών δεικτών με στόχο να συμβάλει, σε μεταφραστικό επίπεδο, στη διερεύνηση των μακροχρόνιων επιδράσεων των χαμηλών δόσεων κανναβινοειδών και στη συσχέτιση συγκεκριμένων προκλινικών προσεγγίσεων με κλινικές παρατηρήσεις που αφορούν τη σύνδεση της χρήσης κάνναβης κατά την εφηβεία με την εμφάνιση ψυχιατρικών διαταραχών αργότερα, κατά την ενήλικη περίοδο. Συγκεντρωτικά, η χορήγηση χαμηλών κλιμακούμενων δόσεων Δ^9 -THC κατά την εφηβεία στο παρόν μοντέλο δεν έδειξε ότι οδηγεί στην εμφάνιση ενός αμιγούς φαινοτύπου ψυχωτικής συμπτωματολογίας, αλλά ήταν ικανή να επάγει έναν «αποδιοργανωμένο γνωστικά» φαινότυπο σε σχέση με συγκεκριμένους δείκτες, ορισμένοι από τους οποίους μπορούν να συσχετιστούν με την εμφάνιση διαταραχών ψυχωτικού τύπου αργότερα στην ενηλικίωση.

6. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Ach	Acetylcholine, ακετυλοχολίνη
ΑΕΑ	Anandamide, ανανδαμίδη ή αραχιδονυλαιθανολαμίδη
Akt	Πρωτεϊνική κινάση B
ATP	Adenosine Triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor, νευροτροφικός παράγοντας προερχόμενος από τον εγκέφαλο
bp	Base pair, ζεύγος βάσεων
CB1	Cannabinoid receptor type 1, υποδοχέας των κανναβινοειδών τύπου 1
CB2	Cannabinoid receptor type 2, υποδοχέας των κανναβινοειδών τύπου 2
c-AMP	Cyclic Adenosine Monophosphate, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
COMT	Catechol-O-Methyl Transferase, κατεχολαμινο-O-μεθυλοτρανσφεράση
CPP	Conditioned Place Preference, εξαρτημένη προτίμηση θέσης
CREB	c-AMP Response Element Binding
Δ⁹-THC	Δ ⁹ -tetrahydrocannabinol, Δ ⁹ -τετραϋδροκανναβινόλη
D1	Υποδοχέας της ντοπαμίνης τύπου 1
D2	Υποδοχέας της ντοπαμίνης τύπου 2
DA	Dopamine, ντοπαμίνη
DAT	Dopamine Transporter, μεταφορέας της ντοπαμίνης
AMPH	Amphetamine, d-αμφεταμίνη
d.d.H₂O	Deionised, distilled water, δισ-απεσταγμένο και απιονισμένο νερό
DMSO	Dimethyl-sulfoxide, διμεθυλο-σουλφοξείδιο
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DOPAC	3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ
DS	Dorsal Striatum, ραχιαίο ραβδωτό σώμα
DSE	Depolarization induced Suppression of Excitation, καταστολή της διέγερσης που επάγεται από εκπόλωση
DSI	Depolarization induced Suppression of Inhibition, καταστολή της αναστολής που επάγεται από εκπόλωση
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
ERK	Extracellular-signaling Regulated Kinase, κινάση ρυθμιζόμενη από εξωκυττάρια σηματοδότηση
FAAH	Fatty Acid Amide Hydrolase, υδρολάση του αμιδίου των λιπαρών οξέων
fMRI	Functional Magnetic Resonance Imaging, απεικόνιση λειτουργικού πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού
GABA	Gamma-aminobutyric acid, γ-αμινοβουτυρικό οξύ
GLU	Glutamic acid, γλουταμικό οξύ
GPCR	G-protein coupled receptor, υποδοχέας συζευγμένος με G-πρωτεΐνη
HIPP	Hippocampus, ιππόκαμπος
HVA	Homovanillic acid, ομοβανιλλικό οξύ
kDa	kilo Dalton
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
KO	Knock-out
LTP	Long-term Potentiation, διεργασία παγίωσης της μνήμης
MAGL	Monoacylglycerol lipase, λιπάση της μονοακυλογλυκερόλης
MAO	Monoamine oxidase, μονοαμινοξειδάση
MAPK	Mitogen-activated protein kinase, ενεργοποιούμενη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση
M.B.	Μοριακό Βάρος
m-RNA	Messenger RNA, μηνυματοφόρο RNA
NAC	Nucleus accumbens, επικλινής πυρήνας του διαφράγματος

NE	Norepinephrine, νορεπινεφρίνη
NGF	Nerve Growth Factor, αυξητικός παράγοντας νευρών
NT	Neurotrophin, νευροτροφίνη
PFC	Prefrontal Cortex, προμετωπιαίος φλοιός
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase, 3-φωσφοινοσιτιδική κινάση
PKA	Protein kinase A, πρωτεϊνική κινάση A
PLC-γ	Phospholipase-γ, φωσφολιπάση-γ
SDS	Sodium-dodecyl-sulphate, δωδεκυλικό σουλφοξείδιο του νατρίου
SDS-PAGE	Sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με SDS
SERT	Serotonin Transporter, μεταφορέας της σεροτονίνης
TEMED	N,N,N,N'-τετραμεθυλική διαμίνη
Tris	τρις-υδροξυμεθυλ-αμινο-μεθάνιο
TBS	Tris-buffered saline
TH	Tyrosine Hydroxylase, τυροσινική υδοξυλάση
TNF	Tumor Necrosis Factor, παράγοντας νέκρωσης όγκων
TrK	Tropomyosin-related kinase, κινάση σχετιζόμενη με τροπομυοσίνη
VMAT	Vesicular Monoamine Transporter, κυστιδιακός μεταφορέας μονοαμινών
VTA	Ventral Tegmental Area, πλάγια κοιλιακή καλυπτική περιοχή
2-AG	2-arachidonoylglycerol, 2-αραχιδονοϋλγλυκερόλη
3-MT	3-methoxytyramine, 3-μεθοξυτυραμίνης
5-HIAA	5-hydroxyindoleacetic acid, 5-υδροξυ-3-ινδολοξικό οξύ
5-HT	5-hydroxytryptamine, 5-υδροξυ-3-τροπταμίνη ή σεροτονίνη
± SEM	± Standard Error of the Mean, ± μέσο τυπικό σφάλμα

7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Η μελέτη της χορήγησης χαμηλών, σταδιακά κλιμακούμενων δόσεων Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλης (Δ^9 -THC) - του κύριου ψυχοδραστικού συστατικού της κάνναβης - κατά την εφηβεία στο συμπεριφορικό, νευροχημικό και νευροβιολογικό προφίλ ενήλικων αρσενικών επιμύων. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η επίδραση της εφηβικής χορήγησης Δ^9 -THC σε συμπεριφορικούς δείκτες που σχετίζονται με την κινητική δραστηριότητα, τη χωρική μάθηση και μνήμη, αλλά και με ανώτερες εκτελεστικές λειτουργίες. Παράλληλα, αξιολογήθηκε η επίδραση των χαμηλών κλιμακούμενων δόσεων Δ^9 -THC στον ηθμό της αισθητικοκινητικής πληροφορίας κατά την ενηλικίωση και στην ικανότητα του ντοπαμινεργικού αγωνιστή, d-αμφεταμίνη, να επάγει υπερκινητικότητα κατά την ενηλικίωση. Επίσης, προχωρήσαμε στη νευροχημική - νευροβιολογική αξιολόγηση της ντοπαμινεργικής και σεροτονεργικής δραστηριότητας σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές ενήλικων επιμύων μετά από έκθεση σε χαμηλές κλιμακούμενες δόσεις Δ^9 -THC κατά την εφηβεία. Ταυτόχρονα, μελετήθηκε το νευροβιολογικό προφίλ των ενήλικων επιμύων, αναφορικά με πρωτεϊνικούς δείκτες, που εμπλέκονται σε διεργασίες νευροπλαστικότητας και λειτουργίας του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος.

Μέθοδοι: Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν χαμηλές κλιμακούμενες δόσεις Δ^9 -THC κατά την εφηβεία (μεταξύ μεταγεννητικής ημέρας 35-45) σε αρσενικούς επιμύες (0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg), σε μια προσπάθεια προσομοίωσης της χρήσης κάνναβης στους έφηβους και της επίδρασή της κατά την ενηλικίωση.

Οι συμπεριφορικές μελέτες έγιναν με στόχο να αποτυπωθεί ένας ενδοφαινότυπος που θα παρέχει πληροφορίες σχετικά με την αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα των επιμύων και την ικανότητα εξοικείωσής τους στο ανοικτό πεδίο, με την ικανότητα διάκρισης νέας θέσης αντικειμένου, έκφρασης της χωρικής μάθησης και μνήμης μέσω της δοκιμασίας υδάτινου λαβύρινθου κατά Morris και με τις ανώτερες εκτελεστικές ικανότητες μέσω της διεξαγωγής της δοκιμασίας μετατόπισης της προσοχής. Παράλληλα, ελέγχθηκε κατά πόσο επηρεάζεται από τη χορήγηση χαμηλών κλιμακούμενων δόσεων Δ^9 -THC κατά την εφηβεία η ροή της αισθητικοκινητικής πληροφορία χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία προ-παλμικής αναστολής του αντανεκλαστικού αιφνιδιασμού, και κατά πόσο επηρεάζεται η αυξημένη κινητική δραστηριότητα που παρατηρείται μετά από οξεία χορήγηση του έμμεσου ντοπαμινεργικού αγωνιστή d-αμφεταμίνη (1 mg/kg) κατά την ενηλικίωση.

Οι νευροχημικές - νευροβιολογικές μελέτες έγιναν με στόχο τη διερεύνηση των επιδράσεων της Δ^9 -THC όσον αφορά τη ντοπαμινεργική και τη σεροτονεργική δραστηριότητα σε

συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές (ιππόκαμπος, προμετωπιαίος φλοιός, ραχιαίο ραβδωτό σώμα, επικλινή πυρήνας του διαφράγματος) με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με Ηλεκτροχημικό Ανιχνευτή (HPLC-ED), ενώ στις περιοχές αυτές αξιολογήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των μεταφορέων της ντοπαμίνης και της σεροτονίνης.

Περαιτέρω νευροβιολογικές μελέτες έγιναν με στόχο να μελετηθούν τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων μοριακών δεικτών και να συσχετιστούν με τις παρατηρούμενες συμπεροφορικές και νευροχημικές αλλαγές. Ειδικότερα, μελετήθηκε το μονοπάτι του νευροπαράγοντα BDNF, καθώς και η λειτουργία του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος, μέσω ελέγχου των υποδοχέων των κανναβινοειδών τύπου 1 και 2.

Αποτελέσματα: Η χορήγηση χαμηλών κλιμακούμενων δόσεων Δ^9 -THC κατά την εφηβεία προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στις συμπεριφορικές παραμέτρους που αξιολογήθηκαν. Ειδικότερα, το φαρμακολογικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε οδήγησε σε αύξηση της αυθόρμητης οριζόντιας και κάθετης κινητικότητας και επηρέασε το προφίλ εξοικείωσης των ενήλικων επιμύων στο ανοικτό πεδίο. Επιπλέον, η χορήγηση χαμηλών κλιμακούμενων δόσεων Δ^9 -THC οδήγησε σε βλάβη στη βραχύχρονη αναγνωριστική χωρική μνήμη και μάθηση κατά την ενηλικίωση. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν αρνητικές επιδράσεις στους ενήλικες επίμυες κατά την εκτέλεση δοκιμασιών που ελέγχουν ανώτερες εκτελεστικές λειτουργίες και τη ροή της αισθητικοκινητικής πληροφορίας. Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση των κινητικών παραμέτρων στους ενήλικες επίμυες που έλαβαν Δ^9 -THC κατά την εφηβεία μετά από οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης στην ενηλικίωση.

Αναφορικά με το νευροχημικό έλεγχο της ντοπαμινεργικής και σεροτονεργικής δραστηριότητας σε συγκεκριμένες περιοχές των ενήλικων εγκεφάλων, παρατηρήθηκε ένα αντίθετο πρότυπο μεταβολών μεταξύ των δυο νευροδιαβιβαστικών συστημάτων για τους ενήλικες επίμυες που έλαβαν Δ^9 -THC, με μειωμένη ντοπαμινεργική και αυξημένη σεροτονεργική δραστηριότητα στον προμετωπιαίο φλοιό και αυξημένη ντοπαμινεργική και μειωμένη σεροτονεργική δραστηριότητα στον ιππόκαμπο έναντι της ομάδας ελέγχου. Επιπλέον, στο ραχιαίο ραβδωτό σώμα παρατηρήθηκε μειωμένη σεροτονεργική δραστηριότητα, ενώ, αντίθετα, αυξημένη σεροτονεργική δραστηριότητα εντοπίστηκε στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος. Οι αλλαγές αυτές συνοδεύτηκαν από αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του μεταφορέα της σεροτονίνης στον ιππόκαμπο, αφήνοντας αμετάβλητα τα επίπεδα έκφρασης του μεταφορέα της ντοπαμίνης. Τέλος, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης του νευροπλαστικού δείκτη BDNF τόσο στον ιππόκαμπο όσο και στον προμετωπιαίο φλοιό για

τους Δ^9 -THC επίμυες κατά την ενηλικίωση, ενώ αυξημένα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα CB1 καταγράφηκαν στον προμετωπιαίο φλοιό.

Συμπεράσματα: Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, μπορεί να υποστηριχθεί ότι η χορήγηση χαμηλών, σταδιακά αυξανόμενων δόσεων Δ^9 -THC κατά την εφηβεία συνδέεται με τις ακόλουθες μεταβολές κατά την ενηλικίωση:

- 1) αύξηση της κινητικής συμπεριφοράς κατά την ένταξη σε νέο περιβάλλον και μεταβολή στο προφίλ εξοικείωσης που αναδεικνύει αρνητική επίδραση στη μη συνειρμική μνήμη και μάθηση,
- 2) μείωση ικανότητας διάκρισης στη δοκιμασία αναγνώρισης θέσης αντικειμένου και αρνητική επίδραση στη έκφραση χωρικής μνήμης και μάθησης,
- 3) μείωση της υπερκινητικότητας που προκαλεί η οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης,
- 4) αντίθετης κατεύθυνσης αλλαγές στη ντοπαμινεργική και σεροτονεργική νευροδιαβίβαση σε περιοχές που εμπλέκονται σε συμπεριφορικές διεργασίες, όπως η κινητικότητα, οι εκφάνσεις της μνήμης και μάθησης και οι ανώτερες γνωστικές λειτουργίες,
- 5) μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του BDNF στον προμετωπιαίο φλοιό και τον ιππόκαμπο που υποστηρίζουν την εμπλοκή δεικτών νευροπλαστικότητας,
- 6) αύξηση των επιπέδων του υποδοχέα των κανναβινοειδών τύπου 1 στον προμετωπιαίο φλοιό, γεγονός που υποδηλώνει την εμπλοκή του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος ως κρίσιμος νευρορυθμιστικός παράγοντας.

Σημαντικοί Όροι: Δ^9 -THC, χαμηλές, κλιμακούμενες δόσεις, εφηβεία, ενηλικίωση, κινητικότητα, γνωστικές λειτουργίες, d-αμφεταμίνη, νευροχημεία, νευροβιολογικοί δείκτες, ιππόκαμπος, προμετωπιαίος φλοιός, ψυχωτικού τύπου συμπτωματολογία.

8. ABSTRACT

Objective: The study of escalating low-dose Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) administration – the main psychoactive component of the plant cannabis - during adolescence focusing on behavioral, neurochemical and neurobiological indices of adult male rats. In particular, we investigated the adolescent low-dose Δ^9 -THC effects on behavioral indices related to motor activity, spatial memory and learning and higher-order cognitive functions. In parallel, we evaluated the impact of escalating low-dose Δ^9 -THC exposure on the filtering of sensorimotor gating in adulthood and on the ability of the dopaminergic agonist, d-amphetamine, to induce hyperactivity during adulthood. In addition, we proceeded with the neurochemical evaluation of dopaminergic and serotonergic activity in specific brain regions of adult rats after adolescent low-dose Δ^9 -THC exposure. We also determined the neurobiological profile of adult rats, concerning protein markers related to cannabinoid activity and neuroplasticity.

Methods: In the present study escalating low-dose adolescent Δ^9 -THC were used (between post-natal days 35-45) in male rats (0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg) in order to better simulate the human adolescent cannabis abuse and its effects on adulthood.

Behavioral studies aimed to pattern an endophenotype providing information on spontaneous motor activity of adult rats, their habituation profile in the open field, their object location discrimination ability and the spatial memory and learning through the evaluation of the Morris Water Maze test, and their higher-order cognitive functions through the attentional set-shift test. In parallel, we assessed the filtering of the sensorimotor information through the pre-pulse inhibition test and the impact of acute d-amphetamine (1 mg/kg) hyperlocomotion on the motor response of adult rats.

The neurochemical – neurobiological studies aimed to evaluate Δ^9 -THC effects concerning dopaminergic and serotonergic activity in specific brain regions (hippocampus, prefrontal cortex, dorsal striatum, nucleus accumbens) using High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detector (HPLC-ED), while in the aforementioned regions DAT and SERT protein expression levels were measured.

Further neurobiological evaluation aimed to study protein expression levels of specific markers and to correlate them with the observed behavioral and neurochemical changes. More specifically, we studied the BDNF pathway and endocannabinoid function through the evaluation of cannabinoid receptors CB1 and CB2.

Results: The escalating low-dose Δ^9 -THC treatment during adolescence induced major changes in behavioral parameters. In particular, our pharmacological model led to increased spontaneous horizontal and vertical activity and affected the pattern of behavioral habituation of adult rats in the open-field test. Moreover, escalating low-dose Δ^9 -THC treatment led to impairment in adult short-term spatial recognition memory and learning. On the contrary, our protocol did not affect either the execution of higher-order cognitive tasks or the filtering of sensorimotor gating during adulthood. Moreover, we observed a reduction in motor parameters of adult Δ^9 -THC-treated rats that received an acute dose of d-amphetamine.

Regarding the neurochemical evaluation of dopaminergic and serotonergic activity in specific brain regions of adult rats, an opposing pattern of changes between the two neurotransmitter systems was found in adult rats treated with Δ^9 -THC, i.e decreased dopaminergic and increased serotonergic activity in the prefrontal cortex and increased dopaminergic and decreased serotonergic activity in the hippocampus compared with the control group. In addition, we found, decreased serotonergic activity in the dorsal striatum, while increased serotonergic activity was observed in the nucleus accumbens. These changes were accompanied with increased protein expression levels of serotonin transporter in the hippocampus, while unaffected DAT protein expression levels were observed. Finally, we observed decreased expression levels of the neuroplasticity marker BDNF in the hippocampus as well as in the prefrontal cortex of Δ^9 -THC-treated rats in adulthood, while increased CB1 receptor levels were measured in the prefrontal cortex.

Conclusions: The results of the present study suggest that adolescent escalating low-dose Δ^9 -THC administration is related to:

- 1) increased motor activity in the novel environment and different pattern of behavioral habituation, which reflects a negative impact on the non-associative learning and memory,
- 2) decreased discrimination ability using the object location task and impaired spatial memory and learning in the Morris Water Maze test,
- 3) dampening of the hyperlocomotion in adult rats treated acutely with d-amphetamine following adolescent Δ^9 -THC exposure,
- 4) opposite pattern of changes regarding dopaminergic and serotonergic activity in crucial brain region related to behavioral functions, such as locomotion, learning and memory and higher-order cognitive functions,
- 5) reduced protein expression levels of BDNF marker in the prefrontal cortex and the hippocampus, which support the involvement of neuroplasticity markers,

6) increased protein expression levels of CB1 receptor in the prefrontal cortex, indicative of the neuromodulatory role of the endocannabinoid system.

Key-words: Δ^9 -THC, escalating low doses, adolescence, adulthood, motor response, cognitive functions, d-amphetamine, neurochemistry, neurobiological indices, hippocampus, prefrontal cortex, psychotic-like symptomatology.

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abboussi, O., Tazi, A., Paizanis, E., El Ganouni, S. 2014. Chronic exposure to WIN 55,212-2 affects more potently spatial learning and memory in adolescents than in adult rats via a negative action on dorsal hippocampal neurogenesis, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 120: 95-102.
- Abush, H., Akirav, I. 2012. Short- and long-term cognitive effects of chronic cannabinoids administration in late-adolescence rats, *PLOS ONE*, 7(2): e31731.
- Alger, E. 2002. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids, *Prog Neurobiol*, 68: 247-286.
- Allen, S.J., Watson, J.J., Shoemark, D.K., Barua, N.U. and Patel, N.K. 2013. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration, *Pharmacol Ther*, 138: 155-75.
- Ameri, A. 1999. The effects of cannabinoids on the brain, *Prog Neurobiol*, 58: 315-348.
- Andréasson, S., Engström, A., Allebeck, P., Rydberg, U. 1987. Cannabis and schizophrenia: A longitudinal study of Swedish conscripts, *The Lancet*, 330(8574): 1483-1486.
- Antoniou, K., Kafetzopoulos, E., Papadopoulou-Daifoti, Z., Hyphantis, T., Marselos, M. 1998. d-amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 23(2): 189-196.
- Antoniou, K., Papathanasiou, G. et al. 2008. Individual responses to novelty are associated with differences in behavioral and neurochemical profiles, *Behavioural Brain Research*, 187(2): 462-472.
- Antoniou, K., Polissidi, A., Delis, F., Poulia, N. 2017. Springer Protocols: In Vivo Neuropharmacology and Neurophysiology, The Impact of Cannabinoids on Motor Activity and Neurochemical Correlates, 121: 341-365. (Κεφάλαιο βιβλίου)
- Arbuthnott, G.W., Fairbrother, I.S, Butcher, S.P. 1990. Dopamine release and metabolism in the rat striatum: An analysis by 'in vivo' brain microdialysis, *Pharmacology & Therapeutics*, 48(3):281-293.
- Arseneault, L., Cannon, M., Poulton, R., Murray, R., Caspi, A. and Moffitt, T.E. 2002. Cannabis use in adolescence and risk for adult psychosis: longitudinal prospective study, *BMJ*, 325: 1212-1213.
- Ashtari, M., Avants, B., Cyckowski, L., Cervellione, K.L., Roofeh, D., Cook, P., Gee, J., Sevy, S. and Kumra, S. 2011. Medial temporal structures and memory functions in adolescents with heavy cannabis use, *J Psychiatr Res*, 45: 1055-1066.
- Aso, E., Ozaita, A., Valdizán, E.M., Ledent, C., Pazos, A., Maldonado, R., Valverde, O. 2008. BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice, *J Neurochem*, 2: 565-572.
- Aso, E., Renoir, T., Mengod, G., Ledent, C., Hamon, M., Maldonado, R., Lanfumey, L., Valverde, O. 2009. Lack of CB1 receptor activity impairs serotonergic negative feedback, *J Neurochem*, 109: 935-944.
- Axelrod, J., and Felder, C.C. 1998. Cannabinoid receptors and their endogenous agonist, anandamide, *Neurochem Res*, 23: 575-581.
- Baker, P.B., Taylor, B.J., Gough, T.A. 1981. The tetrahydrocannabinol and tetrahydrocannabinolic acid content of cannabis products, *J Pharm Pharmacol.*, 33(6): 369-372.
- Balaratnasingam, S., and Janca, A. 2012. Brain Derived Neurotrophic Factor: a novel neurotrophin involved in psychiatric and neurological disorders, *Pharmacol Ther*, 134: 116-124.
- Bambico, F.R., Cassano, T., Dominguez-Lopez, S., Katz, N., Walker, C.D., Piomelli, D., Gobbi, G. 2010. Genetic deletion of fatty acid amide hydrolase alters emotional behavior and serotonergic transmission in the dorsal raphe, prefrontal cortex, and hippocampus, *Neuropsychopharmacology*, 35(10): 1083-1100.

- Bambico, F.R., Katz, N., Debonnel, G., Gobbi, G. 2007. Cannabinoids elicit antidepressantlike behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex, *J. Neurosci*, 27 (43): 11700-11711.
- Bambico, F.R., Nguyen, N.T., Katz, N., Gobbi, G. 2010. Chronic exposure to cannabinoids during adolescence but not during adulthood impairs emotional behaviour and monoaminergic neurotransmission, *Neurobiol. Dis*, 37: 641-655.
- Banerjee, S.P., Snyder, S.H., Mechoulam, R. 1975. Cannabinoids: influence on neurotransmitter uptake in rat brain synaptosomes, *J Pharmacol Exp Ther*, 194: 74-81.
- Barbacid, M. 1995. Neurotrophic factors and their receptors, *Curr Opin Cell Biol*, 7: 148-155.
- Barchukov, V.V., Zhavbert, E.S., Dugina, Y.L. and Epstein, O.I. 2015. The Use of Release-Active Antibody-Based Preparations for Vertigo Prevention in Adults, *Bull Exp Biol Med*, 160: 61-63.
- Barnes, N.M., Sharp, T. 1999. A review of central 5-HT receptors and their function, *Neuropharmacology*, 38(8): 1083-1152.
- Barth, F. and Rinaldi-Carmona, M. 1999. The development of cannabinoid antagonists, *Curr Med Chem*, 6: 745-755.
- Bath, K.G., and Lee, F.S. 2006. Variant BDNF (Val66Met) impact on brain structure and function, *Cogn Affect Behav Neurosci*, 6: 79-85.
- Battistella, G., Forari, E., Annoni, J., Chtioui, H., Dao, K., Fabritius, M., Giroud, C. 2014. Long-term effects of cannabis on brain structure, *Neuropsychopharmacology*, 39: 2041-2048.
- Beyer, C.E., Dwyer, J.M., Piesla, M.J., Platt, B.J., Shen, R., Rahman, Z., Chan, K., Manners, M.T., Samad, T.A., Kennedy, J.D., Bingham, B., Whiteside, G.T. 2010. Depression-like phenotype following chronic CB1 receptor antagonism, *Neurobiol Dis*, 39: 148-155.
- Birrell, J.M. and Brown, V.J. 2000. Medial Frontal Cortex Mediates Perceptual Attentional Set Shifting in the Rat, *Journal of Neuroscience*, 20(11): 4320-4324.
- Biscaia, M., Marin, S., Fernandez, B., Marco, E.M., Rubio, M., Guaza, C., Ambrosio, E. and Viveros, M.P. 2003. Chronic treatment with CP 55,940 during the peri-adolescent period differentially affects the behavioural responses of male and female rats in adulthood, *Psychopharmacology (Berl)*, 170: 301-308.
- Bisogno, T., De Petrocellis, L., Di Marzo, V. 2002. Fatty acid amide hydrolase, an enzyme with many bioactive substrates. Possible therapeutic implications, *Curr Pharm Des*, 8: 533-547.
- Bloomfield, M., Abhishekh, A.P., Volkow, N.D. and Howes, O.D. 2017. The effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on the dopamine system, *Nature*, 539(7629): 369-377.
- Boess, F.G., Martin, I.L. 1994. Molecular biology of 5-HT receptors, *Neuropharmacology*, 33(3-4): 275-317.
- Bothwell, M. 1995. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors, *Annu Rev Neurosci*, 18: 223-253.
- Bosson, M.G., and Niesink, R.J. 2010. Adolescent brain maturation, the endogenous cannabinoid system and the neurobiology of cannabis-induced schizophrenia, *Prog Neurobiol*, 92: 370-385.
- Borde, M., Davis, E.J., Sharma, L.N. 1991. Prediction of outcome in schizophrenia using the subjective response to a test dose of a neuroleptic, *Indian Journal of Psychiatry*, 33(1): 27-32.
- Bortolato, M., Bini, V., Frau, R., Devoto, P., Pardu, A., Fan, Y., Solbrig, M.V. 2014. Juvenile cannabinoid treatment induces frontostriatal gliogenesis in Lewis rats, *European Neuropsychopharmacology*, 24(6): 974-985.

- Bossong, M.G., van Berckel, B.N., Boellaard, R., Zuurman, L., Schuit, R.C., Windhorst, A.D., van Gerven, J.M., Ramsey, N.F., Lammertsma, A.A., Kahn, R.S. 2009. Delta 9-tetrahydrocannabinol induces dopamine release in the human striatum, *Neuropsychopharmacology*, 34: 759–766.
- Bouquet, J.R. 1951. *Bulletin on Narcotics*, 3: 22.
- Bourgeois, J.P., Goldman-Rakic P.S. and Rakic, P. 1994. Synaptogenesis in the prefrontal cortex of rhesus monkeys, *Cereb Cortex*, 4: 78-96.
- Bramham, C.R. and Messaoudi, E. 2005. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis, *Prog Neurobiol*, 76: 99-125.
- Bramness, J.G., Rognli, E.B. 2016. Psychosis induced by amphetamines, *Current Opinion in Psychiatry*, 29(4): 236–241.
- Brook, D.W., Brook, J.S., Zhang, C., Cohen, P., Whiteman, M. 2002. Drug use and the risk of major depressive disorder, alcohol dependence, and substance use disorders, *Archives of General Psychiatry*, 59(11): 1039-1044.
- Buchanan, C.M., Eccles, J.S. and Becker, J.B. 1992. Are adolescents the victims of raging hormones: evidence for activational effects of hormones on moods and behavior at adolescence, *Psychol Bull*, 111: 62-107.
- Burke, A. and Miczek, K. 2014. Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: Role of dopamine, CRF, and HPA axis, *Psychopharmacology*, 231(8): 1557-1580.
- Butovsky, E., Juknat, A., Goncharov, I., Elbaz, J., Eilam, R., Zangen, A., Vogel, Z. 2005. In vivo up-regulation of brain-derived neurotrophic factor in specific brain areas by chronic exposure to Delta-tetrahydrocannabinol, *J Neurochem*, 93: 802-811.
- Butrica James L. 2002. The Medical Use of Cannabis Among the Greeks and Romans, *Journal of Cannabis Therapeutics* 2(2): 51-70.
- Caballero, A., and Tseng, K.Y. 2012. Association of Cannabis Use during Adolescence, Prefrontal CB1 Receptor Signaling, and Schizophrenia, *Front Pharmacol*, 3: 101.
- Cabral, G.A. and Griffin-Thomas, L. 2009. Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation, *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11: e3.
- Cadoni, C., Simola, N., Espa, E., Fenu, S., Di Chiara, G. 2013. Strain dependence of adolescent Cannabis influence on heroin reward and mesolimbic dopamine transmission in adult Lewis and Fischer 344 rats, *Addiction Biology*, 20(1): 132-142.
- Cannon, T.D., Glahn, D.C., Kim, J., van Erp, T.G., Karlsgodt, K., Cohen, M.S., Nuechterlein, K.H., Bava, S., Shirinyan, D. 2005. Dorsolateral prefrontal cortex activity during maintenance and manipulation of information in working memory in patients with schizophrenia, *Arch. Gen. Psychiatry*, 62: 1071-1080.
- Carboni, E., Imperato, A., Pizzani, L., Di Chiara, G. 1989. Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats, *Neuroscience*, 28: 653-661.
- Carr, G.D., White, N.M. 1987. Effects of systemic and intracranial amphetamine injections on behavior in the open field: A detailed analysis, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 27(1): 113-122.
- Casey, B.J., Jones, R.M. and Hare, T.A. 2008. The adolescent brain, *Ann N Y Acad Sci*, 1124: 111-126.
- Cavoy, A. and Delacour, J. 1993. Spatial but not object recognition is impaired by aging in rats, *Physiol Behav*, 53: 527–30.
- Ceccarini, J., Kuepper, R., Kemels, D., van Os, J., Henquet, C. and Van Laere, K. 2013. [18F]MK-9470 PET measurement of cannabinoid CB1 receptor availability in chronic cannabis users, *Addiction Biology*, doi:10.1111/adb.12116.

- Cha, Y.M., White, A.M., Kuhn, C.M., Wilson, W.A, Swartzwelder, H.S. 2006. Differential effects of delta 9-THC on learning in adolescent and adult rats, *Pharmacol. Biochem. Behav*, 83: 448-455.
- Chaperon, F., Thiébot, M.H. 1999. Behavioral effects of cannabinoid agents in animals, *Crit Rev Neurobiol*, 13: 243-281.
- Cheer, J.F., Wassum, K.M., Heien, M.L., Phillips, P.E., Wightman, R.M. 2004. Cannabinoids enhance subsecond dopamine release in the nucleus accumbens of awake rats, *J Neurosci*, 24: 4393-4400.
- Chen, K., Kandel, D.B., Davies, M. 1997. Relationships between frequency and quantity of marijuana use and last year proxy dependence among adolescents and adults in the United States, *Drug Alcohol Depend*, 46: 53-67.
- Chen, J.P., Paredes, W., Lowinson, J.H., Gardner, E.L. 1990a. Delta 9-tetrahydrocannabinol enhances presynaptic dopamine efflux in medial prefrontal cortex, *Eur J Pharmacol*, 190: 259-262.
- Chen, J.P., Paredes, W., Li, J., Smith, D., Lowinson, J., Gardner, E.L. 1990b. Delta 9-tetrahydrocannabinol produces naloxone-blockable enhancement of presynaptic basal dopamine efflux in nucleus accumbens of conscious, freely-moving rats as measured by intracerebral microdialysis, *Psychopharmacology (Berl)*, 102: 156-162.
- Chen, J.P., Paredes, W., Lowinson, J.H., Gardner, E.L. 1991. Strain-specific facilitation of dopamine efflux by delta 9-tetrahydrocannabinol in the nucleus accumbens of rat: an in vivo microdialysis study, *Neurosci Lett*, 129: 136-180.
- Chen, Z.Y., Patel, P.D., Sant, G., Meng, C.X., Teng, K.K., Hempstead, B.L. and Lee, F.S. 2004. Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons, *J Neurosci*, 24: 4401-4411.
- Cheramy, A., Leviel, V., Glowinski, J. 1981. Dendritic release of dopamine in the substantia nigra, *Nature*, 289: 537-543.
- Childers, S.R, Breivogel, C.S. 1998. Cannabis and endogenous cannabinoid systems, *Drug Alcohol Depend.*, 51(1-2): 173-187.
- Choleris, E., Thomas, A.W., Kavaliers, M., Prato, F.S. 2001. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field, *Neurosci Biobehav Rev*, 3: 235-260.
- Churchwell, J.C., Carey, P.D., Ferrett, H.L., Stein, D.J., Yurgelun-Todd, D.A. 2012. Abnormal striatal circuitry and intensified novelty seeking among adolescents that abuse methamphetamine and cannabis, *Developmental Neuroscience*, 34(4): 310-317.
- Clapper, J.R., Mangieri, R.A., Piomelli, D. 2009. The endocannabinoid system as a target for the treatment of cannabis dependence, *Neuropharmacology*, 56 (Suppl. 1): 235-243.
- Cohen, K. and Weinstein, A. 2018. The Effects of Cannabinoids on Executive Functions: Evidence from Cannabis and Synthetic Cannabinoids-A Systematic Review, *Brain Sci.*, 8(3): 40; <https://doi.org/10.3390/brainsci8030040>.
- Commissiong, J.W. 1985. Monoamine metabolites: their relationship and lack of relationship to monoaminergic neuronal activity, *Biochemical Pharmacology*, 34(8): 1127-31.
- Compton, D.R., Johnson, M.R., Melvin, L.S. and Martin, B.R. 1992. Pharmacological profile of a series of bicyclic cannabinoid analogs: classification as cannabimimetic agents, *J Pharmacol Exp Ther*, 260: 201-209.
- Cooper, J.R., Bloom, F.E. and Roth, F.H. 1996. Οι βιοχημικές βάσεις της νευροφαρμακολογίας. 6^η αγγλική έκδοση, Oxford University Press, μετάφραση Σταματόπουλος Κ.Ε, Εκδόσεις Λέξημα, Αθήνα. (Κεφάλαιο βιβλίου)
- Cortright, J.J., Lorrain, D.S., Beeler, J.A., Tang, W. and Vezina, P. 2011. Previous Exposure to Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Enhances Locomotor Responding to but Not Self-Administration of Amphetamine, *J Pharmacol Exp Ther*, 337(3): 724-733.

- Cowansage, K.K., LeDoux, J.E. and Monfils, M.H. 2010. Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity, *Curr Mol Pharmacol*, 3: 12-29.
- Cravatt, B.F. and Lichtman, A.H. 2003. Fatty acid amide hydrolase: an emerging therapeutic target in the endocannabinoid system, *Curr Opin Chem Biol*, 7: 469-475.
- Crean, R.D., Crane, N.A. and Mason, B.J. 2011. An evidence based review of acute and long-term effects of cannabis use on executive cognitive functions, *J Addict Med*, 5: 1-8.
- Cunningham, M.G., Bhattacharyya, S. and Benes, F.M. 2008. Increasing Interaction of amygdalar afferents with GABAergic interneurons between birth and adulthood, *Cereb Cortex*, 18: 1529-1535.
- Dahlstrom, A., and Fuxe, K. 1964. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monamines in the cell bodies of brain stem neurons, *Acta Physiol. Stand. Suppl*, 232 62: 155.
- Dalton, V., Zavitsanou, K., 2010. Differential treatment regimen-related effects of cannabinoids on D1 and D2 receptors in adolescent and adult rat brain, *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 40: 272–280.
- Damsma, G., Day, J., Fibiger, H.C. 1989. Lack of tolerance to nicotine-induced dopamine release in the nucleus accumbens, *Eur J Pharmacol*, 168: 363-368.
- Darmani N.A., Janoyan, J.J., Kumar, N., Crim, J.L. 2003. Behaviorally active doses of the CB1 receptor antagonist SR 141716A increase brain serotonin and dopamine levels and turnover, *Pharmacol Biochem Behav*, 75: 777–787.
- Davis, R.E., Midalia, N.D., Curnow, D.H. 1978. Illegal drugs and nutrition in undergraduate students, *Med J Aust*, 1: 617-620.
- De Chiara, V., Angelucci, F., Rossi, S., Musella, A., Cavasinni, F., Cantarella, C., Mataluni, G., Sacchetti, L., Napolitano, F., Castelli, M., Caltagirone, C., Bernardi, G., Maccarrone, M., Usiello, A., Centonze, D. 2010. Brain-derived neurotrophic factor controls cannabinoid CB1 receptor function in the striatum, *J Neurosci*, 30: 8127-8137.
- Decoster, J., van Os, J., Kenis, G., Henquet, C., Peuskens, J., De Hert, M., van Winkel, R. 2011. Age at onset of psychotic disorder: cannabis, BDNF Val66Met, and sex-specific models of gene-environment interaction, *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 56B: 363-369.
- Degenhardt, L., Hall, W., Lynskey, M. 2003. Exploring the association between cannabis use and depression, *Addiction*, 98(11): 1493-1504.
- de Fonseca, F.R., and Schneider, M. 2008. The endogenous cannabinoid system and drug addiction: 20 years after the discovery of the CB1 receptor, *Addict Biol*, 13: 143-146.
- Delforterie, M. Creemers, H.E., Agrawal, A., Lynskey, M.T., Huizink, A.C. 2015. The influence of age and gender on the likelihood of endorsing cannabis abuse/dependence criteria, *Addictive Behaviors*, 42: 172-175.
- Demuth, D.G. and Molleman, A. 2006. Cannabinoid signaling, *Life Sci*, 78: 549-563.
- De Petrocellis, L., Cascio, M. G. and Di Marzo, V. 2004. The endocannabinoid system: a general view and latest additions, *Br J Pharmacol*, 141: 765-774.
- Devane, W.A., Dysarz, F.A., Johnson, M.R., Melvin, L.S., and Howlett, A.C. 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain, *Mol Pharmacol*, 34: 605-613.
- Dewey, W.L. 1986. Cannabinoid pharmacology, *Pharmacol. Rev*, 38: 151-178.
- Degenhardt, L., Hall, W., Lynskey, M. 2003. Exploring the association between cannabis use and depression, *Addiction*, 98(11): 1493-1504.
- Di Chiara, G., Imperato, A. 1988. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats, *Proc Natl Acad Sci*, 85: 5274-5278.

- Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T. and De Petrocellis, L. 1998. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action, *Trends Neurosci*, 21: 521-528.
- Dougherty, D.M., Mathias, C., Dawes, M., Furr, R.M., Charles, N., Liguori, A., Shannon, E., Acheson, A. 2013. Impulsivity, attention, memory, and decision-making among adolescent marijuana users, *Psychopharmacology*, 226(2): 307-319.
- Drews, E., Schneider, M., Koch, M. 2005. Effects of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on operant behavior and locomotor activity in rats, *Pharmacol Biochem Behav*, 80: 145-150.
- D'Souza, D.C. 2007. Cannabinoids and psychosis, *Int Rev Neurobiol*, 78: 289-326.
- Duckworth, A.L., Quinn, P.D., Lynam, D.R., Loeber, R., Stouthamer-Loeber, M. 2011. Role of test motivation in intelligence testing, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 108(19): 7716-7720.
- Duman, R.S., Aghajanian, G.K., Sanacora, G., and Krystal, J.H. 2016. Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants, *Nat Med*, 22: 238-249.
- Egashira, N., Mishima, K., Katsurabayashi, S., Yoshitake, T., Matsumoto, Y., Ishida, J., Yamaguchi, M., Iwasaki, K., Fujiwara, M. 2002. Involvement of 5-hydroxytryptamine neuronal system in Delta (9)-tetrahydrocannabinol-induced impairment of spatial memory, *Eur J Pharmacol*, 445: 221-229.
- Egerton, A., Brett, R.R.; Pratt, J.A. 2005. Acute Δ 9-tetrahydrocannabinol-induced deficits in reversal learning: Neural correlates of affective inflexibility, *Neuropsychopharmacology*, 30: 1895-1905.
- Egertova, M., and Elphick, M.R. 2000. Localization of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB₁, *J Comp Neurol*, 422: 159-171.
- Ellgren, M., Artmann, A., Tkalych, O., Gupta, A., Hansen, H.S., Hansen, S.H., Devi, L.A. and Hurd, Y.L. 2008. Dynamic changes of the endogenous cannabinoid and opioid mesocorticolimbic systems during adolescence: THC effects, *Eur Neuropsychopharmacol*, 18: 826-834.
- Ellgren, M., Hurd, Y.L., Franck, J. 2004. Amphetamine effects on dopamine levels and behavior following cannabinoid exposure during adolescence, *European Journal of Pharmacology*, 497: 205-213.
- Elphick, M.R., Egertová, M. 2001. The neurobiology and evolution of cannabinoid signaling, *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, 356(1407): 381-408.
- Elsohly, M.A., and Slade D. 2005. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids, *Life Sci*, 78: 539-548.
- Elsworth, J.D., Groman, S.M., Jentsch, J.D., Leranath, C., Redmond, D.E., Kim, J.D., Diano, S., Roth, R.H. 2015. Primate Phencyclidine Model of Schizophrenia: Sex-Specific Effects on Cognition, Brain Derived Neurotrophic Factor, Spine Synapses, and Dopamine Turnover in Prefrontal Cortex, *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(6), pyu048, <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu048>.
- Ennaceur, A. and Delacour, J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats, 1: Behavioral data, *Behav Brain Res*, 31: 47-59.
- Favalli, G., Li, J., Belmonte-de-Abreu, P., Wong, A.H., Daskalakis, ZJ. 2012. The role of BDNF in the pathophysiology and treatment of schizophrenia, *J Psychiatr Res*, 46: 1-11.
- Felder, C.C., Joyce, K.E., Briley, E.M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A.L., and Mitchell, R.L. 1995. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors, *Mol Pharmacol*, 48: 443-450.
- Fergusson, D.M., Horwood, L., Swain-Campbell, N. 2002. Cannabis use and psychosocial adjustment in adolescence and young adulthood, *Addiction*, 97(9): 505-520.

- Fernandez-Espejo, E., Viveros, M.P., Núñez, L., Ellenbroek, B.A., Rodriguez de Fonseca, F. 2009. Role of cannabis and endocannabinoids in the genesis of schizophrenia, *Psychopharmacology*, 206: 531-549.
- Filbey, F.M., Aslan, S., Calhoun, V.D., Spence, J.S., Damaraju, E., Caprihan, A., Segall, J. 2014. Long-term effects of marijuana use on the brain, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 111(47): 16913-16918.
- Fisar, Z. 2009. Phytocannabinoids and Endocannabinoids, *Current Drug Abuse Reviews*, Bentham Science Publishers, 2, 25: 51-75. (Κεφάλαιο βιβλίου)
- Frankle, W.J., Paris, J., Himes, M., Mason, S., Mathis, C.A., Narendran, R. 2018. Amphetamine-Induced Striatal Dopamine Release Measured With an Agonist Radiotracer in Schizophrenia, *Biological Psychiatry*, 83(8): 707–714.
- Freiman, I., and Szabo. B. 2005. Cannabinoids depress excitatory neurotransmission between the subthalamic nucleus and the globus pallidus, *Neuroscience*, 133: 305-313.
- Freund, T.F., Katona, I. and Piomelli, D. 2003. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling, *Physiol Rev*, 83: 1017-1066.
- Fried, P.A., Watkinson, B. and Gray, R. 2005. Neurocognitive consequences of marijuana--a comparison with pre-drug performance, *Neurotoxicol Teratol*, 27: 231-239.
- Fuchs, E., and Gould, E. 2000. Mini-review: in vivo neurogenesis in the adult brain: regulation and functional implications, *Eur J Neurosci*, 12: 2211-4.
- Galanopoulos, A., Polissidis, A. Georgiadou, G., Papadopoulou-Daifoti, Z., Nomikos, G.G., Pitsikas, N., Antoniou, K. 2014. WIN55,212-2 impairs non-associative recognition and spatial memory in rats via CB1 receptor stimulation, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 124: 58-66.
- Galve-Roperh, I., Aguado, T., Palazuelos, J. and Guzman, M. 2007. The endocannabinoid system and neurogenesis in health and disease, *Neuroscientist*, 13: 109-114.
- García-Gil, L., Ramos, J.A., Rubino, T., Parolaro, D., Fernández-Ruiz, J. 1998. Perinatal Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Exposure Did Not Alter Dopamine Transporter and Tyrosine Hydroxylase mRNA Levels in Midbrain Dopaminergic Neurons of Adult Male and Female Rats, *Neurotoxicology and Teratology*, 20(5): 549-553.
- Gardner, E.L. 2002. Addictive potential of cannabinoids: the underlying neurobiology, *Chem Phys Lipids*, 121: 267-290.
- Gardner, E.L. 2005. Endocannabinoid signaling system and brain reward: Emphasis on dopamine, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81(2): 263-284.
- Geyer, M., Krebs-Thomson, K., BraffNeal, D.L., Swerdlow, R. 2001. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review, *Psychopharmacology*, 156(2-3): 117-154.
- Giedd, J.N., Castellanos, F.X., Rajapakse, J.C., Vaituzis, A.C and Rapoport, J.L. 1997. Sexual dimorphism of the developing human brain, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 21: 1185-1201.
- Giedd, J.N., Blumenthal, J., Jeffries, N.O., Castellanos, F.X., Liu, H., Zijdenbos, A., Paus, T., Evans, A.P. and Rapoport, J.L. 1999. Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study, *Nat Neurosci*, 2: 861-863.
- Gilman, J.M., Kuster, J.K., Lee, S., Lee, M.J., Kim, B.W., Makris, N., Breiter, H.C. 2014. Cannabis use is quantitatively associated with nucleus accumbens and amygdala abnormalities in young adult recreational users, *Journal of Neuroscience*, 34(16): 5529-5538.
- Gobbi, G., Bambico, F.R., Mangieri, R., Bortolato, M., Campolongo, P., Solinas, M., Cassano, T., Morgese, M.G., Debonnel, G., Duranti, A., Tontini, A., Tarzia, A., Mor, M., Trezza, V., Goldberg, S.R., Cuomo, V., Piomelli, D.

2005. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 102: 18620–18625.
- Gomes, F.P., Guimarães, F.S., Grace, A.A. 2015. Effects of Pubertal Cannabinoid Administration on Attentional Set-Shifting and Dopaminergic Hyper-Responsivity in a Developmental Disruption Model of Schizophrenia, *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(2).
- Gong, J.P., Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Liu, Q.R., Tagliaferro, P.A., Brusco, A., Uhl, G.R. 2006. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain, *Brain Res*, 3;1071(1): 10-23.
- Gorriti, M.A., Rodriguez de Fonseca, F., Navarro, M., Palomo, T. 1999. Chronic (-)-delta9-tetrahydrocannabinol treatment induces sensitization to the psychomotor effects of amphetamine in rats, *Eur J Pharmacol*, 365: 133-142.
- Green, M.J, Matheson, S.L., Shepherd, A. et al. 2011. Brain-derived neurotrophic factor levels in schizophrenia: a systematic review with meta-analysis, *Mol Psychiatry*, 16: 960-972.
- Green B.E. and Ritter, C. 2000. Marijuana use and depression, *Journal of Health and Social Behavior*, 41(1): 40-49.
- Grotenhermen, F. 2004. Pharmacology of cannabinoids, *Neuroendocrinol Lett*, 25: 14-23.
- Gruber, S.A., Dahlgren, M., Sagar, K.A., Gonenc, A., Killgore, W.D. 2012. Age of onset of marijuana use impacts inhibitory processing, *Neuroscience Letters*, 511(2): 89-94.
- Haj-Dahmane, S. and Shen, R-Y. 2011. Modulation of the serotonin system by endocannabinoid signaling, *Neuropharmacology*, 61(3): 414–420.
- Hanus, L., Gopher, A., Almog, S. And Mechoulam, R. 1993. Two new unsaturated fatty acid ethanolamides in brain that bind to the cannabinoid receptor, *J Med Chem*, 36: 3032-3034.
- Hanus, L., Abu-Lafi, S., Frider, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D.E., Kustanovich, I. and Mechoulam, R. 2001. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 3662-3665.
- Harte-Hargrove, L.C., Dow-Edwards, D. 2012. Withdrawal from THC during adolescence: Sex differences in locomotor activity and anxiety, *Behavioural Brain Research*, 231(1): 48-59.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C. 1991b. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study, *J Neurosci*, 11: 563-583.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R, Rice, K.C. 1990. Cannabinoid receptor localization in brain, *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 1932-1936.
- Hershtkowitz, M., Szechtman, H. 1979. Pretreatment with delta 1-tetrahydrocannabinol and psychoactive drugs: effects on uptake of biogenic amines and on behavior, *Eur J Pharmacol*, 59: 267-76.
- Hibell, B., Andersson, B., Bjarnasson, T., Ahlström, S., Balakireva, O., Kokkevi, A. 2004. The ESPAD Report 2003. The European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs: Alcohol and Other Drug Use Among Students in 35 European Countries. Stockholm: The Swedish Council for Information on Alcohol and Other Drugs and the Council of Europe.
- Higuera-Matas, A., Botreau, F., Miguens, M., Del Olmo, N., Borcel, E., Perez-Alvarez, L., Garcia-Lecumberri, C., Ambrosio, E., Miguéns, M., Pérez-Alvarez, L., García-Lecumberri, C. 2009. Chronic periadolescent cannabinoid treatment enhances adult hippocampal PSA-NCAM expression in male Wistar rats but only has marginal effects on anxiety, learning and memory, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 93: 482-490.
- Higuera-Matas, A., Ucha, M. and Ambrosio, E. 2015. Long-term consequences of perinatal and adolescent cannabinoid exposure on neural and psychological processes, *Neurosci Biobehav Rev*, 55: 119-146.

- Hillard, C.J., and Jarrhian, A. 2003. Cellular accumulation of anandamide: consensus and controversy, *Br J Pharmacol*, 140: 802-808.
- Hiroi, N., White, N.M. 1991. The amphetamine conditioned place preference: differential involvement of dopamine receptor subtypes and two dopaminergic terminal areas, *Brain Research*, 552(1): 141-152.
- Hirvonen, J., Goodwin, R.S., Li, C.T., Terry, G.E., Zoghbi, S.S., Morse, C., Pike, V.W., Volkow, N.D., Huestis, M.A., Innis, R.B. 2012a. Reversible and regionally selective downregulation of brain cannabinoid CB1 receptors in chronic daily cannabis smokers. *Mol Psychiatry*, 17: 642–649.
- Hoffmeister, F., Goldberg, S.R. 1973. A comparison of chlorpromazine, imipramine, morphine and d-amphetamine self-administration in cocaine-dependent rhesus monkeys, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 187: 8-14.
- Homberg, J.R., Molteni, R., Calabrese, F., and Riva, M.A. 2014. The serotonin-BDNF duo: developmental implications for the vulnerability to psychopathology, *Neurosci Biobehav Rev*, 43: 35-47.
- Howes, O.D. and Kapur, S. 2009. The dopamine hypothesis of schizophrenia: Version III-the final common pathway, *Schizophrenia bulletin*, 35(3): 549-562.
- Howlett, A.C., and Mukhopadhyay, S. 2000. Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol, *Chem Phys Lipids*, 108: 53-70.
- Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., Mechoulam, R., Pertwee, R.G. 2002. International Union of Pharmacology: XXVII. Classification of cannabinoid receptors, *Pharmacol Rev*, 54: 161-202.
- Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharane, E.J., Saxena, P.R., Humphrey, P.P. 1994. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin), *Pharmacol Rev.*, 46(2): 157-203.
- Huffman, J.W., Yu, S., Showalter, V., Abood, M.E., Wiley, J.L., Compton, D.R., Martin, B.R., Bramblett, R.D., Reggio, P.H. 1996. Synthesis and pharmacology of a very potent cannabinoid lacking a phenolic hydroxyl with high affinity for the CB2 receptor, *J Med Chem*, 39(20): 3875-3877.
- Ishac, E.J., Jiang, L., Lake, K. D., Varga, K., Abood, M. E. and Kunos, G. 1996. Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves, *Br J Pharmacol*, 118: 2023-2028.
- Jentsch, J.D., Wise, A., Katz, Z., Roth, R.H. 1998. Alpha-noradrenergic receptor modulation of the phencyclidine- and delta9-tetrahydrocannabinol-induced increases in dopamine utilization in rat prefrontal cortex, *Synapse*, 28: 21-26.
- Johnson, K.M., Ho, B.T., Dewey, W.L. 1976. Effects of delta9-tetrahydrocannabinol on neurotransmitter accumulation and release mechanisms in rat forebrain synaptosomes, *Life Sci*, 19: 347-356.
- Kalivas, P.W., Duffy, P. 1990. Effect of acute and daily neurotensin and enkephalin treatments on extracellular dopamine in the nucleus accumbens, *J Neurosci*, 10: 2940-2949.
- Kang, H., and Schuman, E.M. 1995. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus, *Science*, 267: 1658-1662.
- Kano, M., Ohno-Shosaku, T. and Maejima, T. 2002. Retrograde signaling at central synapses via endogenous cannabinoids, *Mol Psychiatry*, 7: 234-235.
- Katona, I. and Freund, T.F. 2012. Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain, *Annual Review of Neuroscience*, 35: 529-558.
- Kelly, P. 1977. Drug-Induced Motor Behavior, *Drugs, Neurotransmitters, and Behavior*, 295-331. (Κεφάλαιο βιβλίου)

- Kimmins, A. 1977. *Tales of hashish*, Published by Morrow.
- Kokras, N., Pastromas, N., Papisava, D., de Bournonville, C., Cornil, C. A., & Dalla, C. 2018. Sex differences in behavioral and neurochemical effects of gonadectomy and aromatase inhibition in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 87: 93-107.
- Koyama, R., Yamada, M.K., Fujisawa, S., Katoh-Semba, R., Matsuki, N. and Ikegaya, Y. 2004. Brain-derived neurotrophic factor induces hyperexcitable reentrant circuits in the dentate gyrus, *J Neurosci*, 24: 7215-7224.
- Krasnova, I.N., Chiflikyan, M., Justinova, Z., McCoy, M.T., Ladenheim, B., Jayanthi, S., Quintero, C., Brannock, C., Barnes, C., Adair, J.E., Lehrmann, E., Kobeissy, F.H., Gold, M.S., Becker, K.G., Goldberg, S.R., Cadet, J.L. 2013. CREB phosphorylation regulates striatal transcriptional responses in the self-administration model of methamphetamine addiction in the rat, *Neurobiology of disease*, 58C: 132-143.
- Krasnova, I.N., Justinova, Z., Ladenheim, B., Jayanthi, S., McCoy, M.T., Barnes, C., Warner, J.E., Goldberg, S.R., Cadet, J.L. 2010. Methamphetamine self-administration is associated with persistent biochemical alterations in striatal and cortical dopaminergic terminals in the rat, *PloS one*, 5: e8790.
- Kuczenski, R., Segal, D.S., Aizenstein, M.L. 1991. Amphetamine, cocaine, and fencamfamine: relationship between locomotor and stereotypy response profiles and caudate and accumbens dopamine dynamics, *J Neurosci*, 11: 2703-2712.
- Laemli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227(5259): 680-685.
- Lamarque, S., Taghzouti, K., Simon, H. 2001. Chronic treatment with Delta(9)-tetrahydrocannabinol enhances the locomotor response to amphetamine and heroin. Implications for vulnerability to drug addiction, *Neuropharmacology*, 41: 118-129.
- Landa, L., Sulcova, A., Slais, K. 2006. Involvement of cannabinoid CB1 and CB2 receptor activity in the development of behavioural sensitization to methamphetamine effects in mice, *Neuro Endocrinol Lett*, 27(1-2): 63-69.
- Lange J.H.M. and Kruse, C.G. 2005. Medicinal chemistry strategies to CB1 cannabinoid receptor antagonists, *Drug Discovery Today*, 10 (10/24): 693-702.
- Le Foll, B. and Goldberg, S.R. 2005. Cannabinoid CB₁ Receptor Antagonists as Promising New Medications for Drug Dependence, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312(3): 875-883.
- Leroy C, et al. 2012. Striatal and extrastriatal dopamine transporter in cannabis and tobacco addiction: A high-resolution PET study, *Addict Biol*, 17(6):981-990.
- Lessmann, V., Gottmann, K. and Malsangio, M. 2003. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects, *Prog Neurobiol*, 69: 341-74.
- Lisdahl, K.M., Wright, N.E., Medina-Kirchner, C., Maple, K.E., Shollenbarger, S. 2014. Considering Cannabis: The Effects of Regular Cannabis Use on Neurocognition in Adolescents and Young Adults, *Current Addiction Reports*, 1(2): 144-156.
- Liy-Salmeron, G. Meneses, A. 2008. Effects of 5-HT drugs in prefrontal cortex during memory formation and the ketamine amnesia-model, *Hippocampus*, 18(9):965-974.
- Llorente-Berzal, A., Puighermanal, E., Burokas, A., Ozaita, A., Maldonado, R., Marco, E.M., Viveros M.-P. 2013. Sex-dependent psychoneuroendocrine effects of THC and MDMA in an animal model of adolescent drug consumption. *PLOS ONE* 8,e78386.
- Logrip, M.L., Janak, P.H. and Ron, D. 2009. Escalating ethanol intake is associated with altered corticostriatal BDNF expression, *J Neurochem*, 109: 1459-1468.

- Lopez-Gallardo, M., Lopez-Rodriguez, A.B., Llorente-Berzal, A., Rotllant, D., Mackie, K., Armario, A., Nadal, R. and Viveros, M.P. 2012. Maternal deprivation and adolescent cannabinoid exposure impact hippocampal astrocytes, CB1 receptors and brain-derived neurotrophic factor in a sexually dimorphic fashion, *Neuroscience*, 204: 90-103.
- Lopez-Rodriguez.A.B., Llorente-Berzal, A., Garcia-Segura, L.M., Viveros, M. 2014. Sex-dependent long-term effects of adolescent exposure to THC and/or MDMA on neuroinflammation and serotonergic and cannabinoid systems in rats, *British Journal of Pharmacology*, 171(6): 1435-1447.
- Lu, B., Nagappan, G., and Lu, Y. 2014. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction, *Handb Exp Pharmacol*, 220: 223-250.
- Luna, B., Thulborn, K.R., Munoz, D.P., Merriam, E.P., Garver, K.E., Minshew, N.J., Keshavan, M.S., Genovese, C.R., Eddy, W.F. and Sweeney, J.A. 2001. Maturation of widely distributed brain function subserves cognitive development, *Neuroimage*, 13: 786-793.
- Lydon, J., Teramura, A. H. and Coffman, C. B. 1987. UV-B radiation effects on photosynthesis, growth and cannabinoid production of two *Cannabis sativa* chemotypes, *Photochem Photobiol*, 46: 201-206.
- Lynskey, M., and Hall, W. 2000. The effects of adolescent cannabis use on educational attainment: a review, *Addiction*, 95: 1621-1630.
- Maj, P.F., Collu, M., Fadda, P., Cattaneo, A., Racagni, G., Riva, M.A. 2007. Long-term reduction of brain-derived neurotrophic factor levels and signaling impairment following prenatal treatment with the cannabinoid receptor 1 receptor agonist (R)-(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinyl-methyl) pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone, *Eur J Neurosci*, 25: 3305-3311.
- Maldonado, R. 2002. Study of cannabinoid dependence in animals, *Pharmacology & Therapeutics*, 95(2): 153-164.
- Maldonado, R., Valverde, O., and Berrendero, F. 2006. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction, *Trends Neurosci*, 29: 225-232.
- Malone, D.T., Hill, M.N. and Rubino, T. 2010. Adolescent cannabis use and psychosis: epidemiology and neurodevelopmental models, *Br J Pharmacol*, 160: 511-522.
- Malone, D.T., Taylor, D.A. 1999. Modulation by fluoxetine of striatal dopamine release following Delta9-tetrahydrocannabinol: a microdialysis study in conscious rats, *Br J Pharmacol*, 128: 21-26.
- Manrique-Garcia, E., Zammit, S., Dalman, C., Hemmingsson, T., Andreasson, S. and Allebeck, P. 2012. Cannabis, schizophrenia and other non-affective psychoses: 35 years of follow-up of a population-based cohort, *Psychol Med*, 42: 1321-1328.
- Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A., Azad, S.C., Cascio, M.G., Gutierrez, S.O., van der Stelt, M., Lopez-Rodriguez, M.L., Casanova, E., Schutz, G., Zieglansberger, W., Di Marzo, V., Behl, C. and Lutz, B. 2003. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity, *Science*, 302: 84-88.
- Martin, B.A. et al., 2008. Expression and Function of CB1 Receptor in the Rat Striatum: Localization and Effects on D1 and D2 Dopamine Receptor-Mediated Motor Behaviors, *Neuropsychopharmacology*, 33: 1667-1679.
- Mato, S., Aso, E., Martin, M., Valverde, O., Maldonado, R., Pazos, A. 2007. CB1 knockout mice display impaired functionality of 5-HT1A and 5-HT2A /C receptors, *J Neurochem*, 103: 2111-2120.
- McFarland, M.J., and Barker, E.L. 2004. Anandamide transport, *Pharmacol Ther*, 104: 117-135.
- McMahon, L.R. 2006. Characterization of cannabinoid agonists and apparent pA2 analysis of cannabinoid antagonists in rhesus monkeys discriminating Δ^9 -tetrahydrocannabinol, *J Pharmacol Exp Ther*, 319: 1211-1218.
- McQueeney, T., Padula, C.B., Price, J., Medina, K.L., Logan, P., Tapert, S.F. 2011. Gender effects on amygdala morphometry in adolescent marijuana users, *Behavioural Brain Research*, 224(1): 128-134.

- Mc Partland, J.M., Glass, M., Petwee, R.G. 2009. Meta-analysis of cannabinoid ligand binding affinity and receptor distribution: interspecies differences, *British Journal of Pharmacology*, 152(5): 583-593.
- Mechoulam, R., and Gaoni Y. 1967. Recent advances in the chemistry of hashish, *Fortschr Chem Org Naturst*, 25: 175-213.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R and et al. 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors, *Biochem Pharmacol*, 50: 83-90.
- Mechoulam, R., Hanus, R., Pertwee, R., Howlett, A. 2015. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond, *Nature Reviews Neuroscience*, 15: 757-764.
- Medina, K.L., Nagel, B.J., Tapert, S.F. 2010. Abnormal cerebellar morphometry in abstinent adolescent marijuana users, *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 182(2): 152-159.
- Meier, M.H., Caspi, A., Ambler, A., Harrington, H., Houts, R., Keefe, R.S., Moffitt, T.E. 2012. Persistent cannabis users show neuropsychological decline from childhood to midlife, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(40): 2657-2664.
- Melvin, L.S., Milne, G.M., Johnson, M.R., Subramaniam, B., Wilken, D.H. and Howlett, A.C. 1993. Structure-activity relationships for cannabinoid receptor-binding and analgesic activity: studies of bicyclic cannabinoid analogs, *Mol Pharmacol*, 44: 1008-1015.
- Mendiguren, A., Aostri, E., Pineda, J. 2018. Regulation of noradrenergic and serotonergic systems by cannabinoids: relevance to cannabinoid-induced effects, *Life Sciences* 192: 115–127.
- Mendiguren, A., Pineda, J. 2009. Effect of the CB1 receptor antagonists rimonabant and AM251 on the firing rate of dorsal raphe nucleus neurons in rat brain slices, *Br. J. Pharmacol*, 158(6): 1579-1587.
- Minassian, A., Young, J., Cope, Z., Henry, B., Geyer, M., Perry, W. 2016. Amphetamine increases activity but not exploration in humans and mice, *Psychopharmacology*, 233(2): 225-233.
- Mitchell, J.B. and Gratton, A. 1992. Partial dopamine depletion of the prefrontal cortex leads to enhanced mesolimbic dopamine release elicited by repeated exposure to naturally reinforcing stimuli, *Journal of Neuroscience*, 12(9): 3609-3618.
- Mogensen, J., Wörtwein, G., Erling, P., Melleru, T. 2003. Serotonin, locomotion, exploration, and place recall in the rat, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(2): 381-395.
- Mokrysz, C., Gage, S., Landy, R., Munafò, M.R., Roiser, J.P., Curran, H.V. 2014. Neuropsychological and educational outcomes related to adolescent cannabis use, a prospective cohort study, *European Neuropsychopharmacology*, 24: 695-696.
- Moore, T.H., Zammit, S., Lingford-Hughes, A., Barnes, T.R., Jones, P.B., Burke, M. and Lewis, G. 2007. Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review, *Lancet*, 370: 319-328.
- Moranta, D., Esteban, S., Garcia-Sevilla, J.A. 2004. Differential effects of acute cannabinoid drug treatment mediated by CB1 receptors, on the in vivo activity of tyrosine and tryptophan hydroxylase in the rat brain, *Naunym-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*, 369: 516–524.
- Morel, L.J., Giros, B., Dauge, V. 2009. Adolescent exposure to chronic delta-9-tetrahydrocannabinol blocks opiate dependence in maternally deprived rats, *Neuropsychopharmacology*, 34: 2469-2476.
- Munro, S., Thomas, K.L. and Abu-Shaar, M. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids, *Nature*, 365: 61-65.
- Müller-Vahl, K.R., Emrich, H.M. 2008. Cannabis and schizophrenia: towards a cannabinoid hypothesis of schizophrenia, *Expert Rev Neurother*, 8: 1037-1048.

- Murray, R.M., Morrison P.D., Henquet C., and Di Forti M. 2007. Cannabis, the mind and society: the hash realities, *Nat Rev Neurosci*, 8: 885-895.
- Musto, D.F. 1991. Opium, Cocaine and Marijuana in American History. *Scientific American*, 265(1): 40-47.
- Nagappan, G., Lu, B. 2005. Activity-dependent modulation of the BDNF receptor TrkB: mechanisms and implications, *Trends Neurosci*, 28: 464-471.
- Nakazi, M., Bauer, U., Nickel, T., Kathmann, M., Schlicker, E. 2000. Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic CB receptors, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 361: 19-24.
- Naneix, F., Marchand, A.R., Di Scala, G., Pape, J.R., Coutureau, E. 2012. Parallel maturation of goal-directed behavior and dopaminergic systems during adolescence, *J Neurosci*, 32: 16223-16232.
- Naneix, F., Marchand, A.R., Di Scala, G., Pape, J.R., Coutureau, E. 2013. Adolescent Stimulation of D2 Receptors Alters the Maturation of Dopamine-dependent Goal-Directed Behavior, *Neuropsychopharmacology*, 38: 1566-1574.
- Navarro, M., Fernandez-Ruiz, J.J., de Miguel, R., Hernandez, M.L., Cebeira, M., Ramos, J.A. 1993a. An acute dose of delta 9-tetrahydrocannabinol affects behavioral and neurochemical indices of mesolimbic dopaminergic activity. *Behav Brain Res*, 57: 37-46.
- Navarro, M., Fernandez-Ruiz, J.J., De Miguel, R., Hernandez, M.L., Cebeira, M., Ramos, J.A. 1993b. Motor disturbances induced by an acute dose of delta 9-tetrahydrocannabinol: possible involvement of nigrostriatal dopaminergic alterations, *Pharmacol Biochem Behav*, 45: 291-298.
- Nomikos, G.G., Spyraiki, C. 1988. Effects of ritanserin on the rewarding properties of d-amphetamine, morphine and diazepam revealed by conditioned place preference in rats, *Pharmacology, biochemistry, and behaviour*, 30: 853-858.
- Ojeda, S. R., Urbanski, H.F. and Ahmed, C.E. 1986. The onset of female puberty: studies in the rat, *Recent Prog Horm Res*, 42: 385-442.
- Okamoto, Y., Wang, J. Morishita, J. and Ueda, N. 2007. Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide, *Chem Biodivers*, 4: 1842-1857.
- Oleson, E.B., Cheer, J.F. 2012. A brain on cannabinoids: the role of dopamine release in reward seeking, *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2doi: 10.1101/cshperspect.a012229.
- Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gong, J.P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P.A., Myers, L., Mora, Z., Tagliaferro, P., Gardner, E., Brusco, A., Akinshola, B.E., Liu, Q.R., Hope, B., Iwasaki, S., Arinami, T., Teasensfitz, L., Uhl, G.R. 2006. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain, *Ann N Y Acad Sci.*, 1074: 514-536.
- O'Shea, M., Singh, M.E., McGregor, I.S. 2004. Chronic cannabinoid exposure produces lasting memory impairment and increased anxiety in adolescent but not adult rats, *Journal of Psychopharmacology*, 18(4): 502-508.
- O'Tuathaigh, C.M.P., Hryniewiecka, M., Behan, A., Tighe, O., Coughlan, C., Desbonnet, L., Cannon, M., Karayiorgou, M., Gogos, J.A., Cotter, D.R., Waddington, J.L. 2010. Chronic adolescent exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol in COMT mutantmice: impact on psychosis-related and other phenotypes. *Neuropsychopharmacology*, 35: 2262-273.
- Padula, C.B., Schweinsburg, A.D., and Tapert, S.F. 2007. Spatial working memory performance and fMRI activation interaction in abstinent adolescent marijuana users, *Psychol Addict Behav*, 21: 478-487.
- Pagotto, U., Marsicano, G., Cota, D., Lutz, B. and Pasquali, R. 2006. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance, *Endocr Rev*, 27: 73-100.

- Panagis, G., Kastellakis, A., Spyraiki, C., Nomikos, G. 2000. Effects of methyllycaconitine (MLA), an alpha 7 nicotinic receptor antagonist, on nicotine- and cocaine-induced potentiation of brain stimulation reward, *Psychopharmacology*, 149: 388-396.
- Paus, T. 2005. Mapping brain maturation and cognitive development during adolescence, *Trends in Cognitive Sciences*, 9(2): 60-68.
- Pertwee, R.G. 1997. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors, *Pharmacol Ther*, 74: 129-180.
- Pertwee, R.G. 2006. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview, *International Journal of Obesity*, 30: S13-S18.
- Pertwee, R.G., Ross, T.M. 1991. Drugs which stimulate or facilitate central cholinergic transmission interact synergistically with delta-9-tetrahydrocannabinol to produce marked catalepsy in mice, *Neuropharmacology*, 30(1): 67-71.
- Petersen, A.C., Silbereisen, R.K. and Androrensen, S. 1996. Adolescent development: A global perspective, New York : Aldine de Gruyter, 3-37.
- Piomelli D. 2003. The molecular logic of endocannabinoid signaling, *Nat Rev Neurosci.*, 4(11): 873-84.
- Pierce, R.C., and Kalivas, P.W. 1997. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants, *Brain Res Brain Res Rev*, 25: 192-216.
- Pistis, M., Ferraro, L., Pira, L., Flore, G., Tanganelli, S., Gessa, G.L., Devoto, P. 2002. Delta(9)-tetrahydrocannabinol decreases extracellular GABA and increases extracellular glutamate and dopamine levels in the rat prefrontal cortex: an in vivo microdialysis study, *Brain Res*, 948: 155-158.
- Pitler, T.A., Alger, B.E. 1992. Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABA_A responses in hippocampal pyramidal cells, *J Neurosci.*, 12(10): 4122-4132.
- Pitsikas, N., Bouladakis, A., Sakellaridis, N. 2008. Effects of sub-anesthetic doses of ketamine on rats' spatial and non-spatial recognition memory, *Neuroscience*, 154: 454-460.
- Pitsikas, N., Brambilla, A., Borsini, F. 1993. DAU 6215, a novel 5-HT₃ receptor antagonist, improves performance in the aged rat in the Morris water maze task, *Neurobiology of Ageing*, 14(6): 561-564.
- Pitsikas, N., Markou, A. 2014. The metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist LY379268 counteracted ketamine- and apomorphine-induced performance deficits in the object recognition task, but not object location task, in rats. *Neuropharmacology*, 85: 27-35.
- Poddar, M.K., Dewey, W.L. 1980. Effects of cannabinoids on catecholamine uptake and release in hypothalamic and striatal synaptosomes, *J Pharmacol Exp Ther*, 214: 63-67.
- Polissidis, A., Chouliara, O., Galanopoulos, A., Naxakis, G., Papahatjis, D., Papadopoulou-Daifoti, Z., Antoniou, K. 2014. Cannabinoids negatively modulate striatal glutamate and dopamine release and behavioural output of acute d-amphetamine, *Behavioural Brain Research*, 270: 261-269.
- Polissidis, A., Chouliara, O., Galanopoulos, A., Rentesi, G., Dosi, M., Hyphantis, T., Marselos, M., Papadopoulou-Daifoti, Z., Nomikos, G.G., Spyraiki, C., Tzavara, E.T., Antoniou, K. 2010 Individual differences in the effects of cannabinoids on motor activity, dopaminergic activity and DARPP-32 phosphorylation in distinct regions of the brain, *International J Neuropsychopharmacol*, 13(9): 1175-1191.
- Polissidis, A., Galanopoulos, A., Naxakis, G., Papahatjis, D., Papadopoulou-Daifoti, Z. and Antoniou, K. 2012. The cannabinoid CB1 receptor biphasically modulates motor activity and regulates dopamine and glutamate release region dependently, *International J Neuropsychopharmacol*, 1-11.
- Polyakova, M., Stuke, K., Schuemberg, K., Mueller, K., Schoenknecht, P., & Schroeter, M. L. 2015. BDNF as a biomarker for successful treatment of mood disorders: a systematic & quantitative meta-analysis, *J Affect Disord*, 174: 432-440.

- Poo M. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2(1): 24-32.
- Popova, N.K., Ilchibaeva, T.V. and Naumenko, V.S. 2017. Neurotrophic Factors (BDNF and GDNF) and the Serotonergic System of the Brain, *Biochemistry (Mosc)*, 82: 308-317.
- Porter, A.C., Sauer, J.M., Knierman, M.D., Becker G.W., Berna, M.J., Bao, J., Nomikos, G.G., Carter, P., Bymaster, F.P., Leese, A.B and Felder, C.C. 2002. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor, *J Pharmacol Exp Ther*, 301: 1020-4.
- Pryor, G.T., Larsen, F.F., Husain, S. 1978. Interactions of Ag-Tetrahydrocannabinol with d-Amphetamine, Cocaine, and Nicotine in Rats, *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 8: 295-318.
- Puente, N., Cui, Y., Lassalle, O., Lafourcade, M., Georges, F., Venance, L., Grandes, P. and Manzoni, O. J. 2011. Polymodal activation of the endocannabinoid system in the extended amygdala, *Nat Neurosci*, 14: 1542-1547.
- Puerves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., Lamantia, A.S., Mcnamara, J.O., Williams, S.M. 2004. *Neuroscience 3rd Edition*, Sinauer Associates Inc Hardcover.
- Puig, M.V., Gullledge, A.T. 2011. Serotonin and Prefrontal Cortex Function: Neurons, Networks, and Circuits, *Molecular Neurobiology*, 44(3): 449-464.
- Quinn, H.R., Matsumoto, I., Callaghan, P.D., Long, L.E., Arnold, J.C., Gunasekaran, N.,Thompson, M.R., Dawson, B., Mallet, P.E., Kashem, M.A., Matsuda-Matsumoto, H., Iwazaki, T., McGregor, I.S. 2008. Adolescent rats find repeated Delta(9)-THC less aversive than adult rats but display greater residual cognitive deficits and changes in hippocampal protein expression following exposure, *Neuropsychopharmacology*, 33: 1113-1126.
- Raiteri, M., Cerrito, F., Cervoni, A.M. and Levi, G. 1979. Dopamine can be released by two mechanisms differentially affected by the dopamine transport inhibitor nomifensine, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 208(2): 195-202.
- Rakic, P., Bourgeois, J.P. and Goldman-Rakic, P.S. 1994. Synaptic development of the cerebral cortex: implications for learning, memory, and mental illness, *Prog Brain Res*, 102: 227-243.
- Ramaekers, J.G., van Wel, J.H., Spronk, D.B., Toennes, S.W., Kuypers, K.P.C., Theunissen, E.L., Verkes, R.J. 2016. Cannabis and tolerance: acute drug impairment as a function of cannabis use history, *Scientific Reports*, 6.
- Rashidi, H., M. T. Akhtar, F. van der Kooy, R. Verpoorte, and W. A. Duetz. 2009. Hydroxylation and further oxidation of delta9-tetrahydrocannabinol by alkane-degrading bacteria, *Appl Environ Microbiol*, 75: 7135-7141.
- Renard, J.M., Krebs, O., Le Pen, G. and Jay, T.M. 2014. Long-term consequences of adolescent cannabinoid exposure in adult psychopathology, *Front Neurosci*, 8: 361.
- Renard, J., Rushlow, W.J. and Laviolette, S.R. 2016. What Can Rats Tell Us about Adolescent Cannabis Exposure? Insights from Preclinical Research, *Can J Psychiatry*, 61: 328-334.
- Rentesi, G., Antoniou, K., Marselos, M., Syrrou, M., Papadopoulou-Daifoti, Z., Konstandi, M. 2013. Early maternal deprivation-induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats, *Behav Brain Res*, 244: 29–37.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Heaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, J., Neliat, G., Caput, D. and et al. 1994. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor, *FEBS Lett*, 350: 240-244.
- Robson, P. 2001. Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids, *Brit. J. Psychiat*, 178: 107-115.
- Rodriguez, J.J., Mackie, K. and Pickel, V.M. 2001. Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus, *J Neurosci*, 21: 823-833.
- Rodriguez de Fonseca, F., Ramos, J.A., Bonnin, A. and Fernandez-Ruiz, J.J. 1993. Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages, *Neuroreport*, 4: 135-138.

- Rodvelt, K.R., Bumgarner, D.M., Putnam, W.C., Miller, D.K. 2007. WIN-55,212-2 and SR-141716A alter nicotine-induced changes in locomotor activity, but do not alter nicotine-evoked [3H]dopamine release, *Life Sci*, 80: 337-344.
- Rogeberg O. 2013. Correlations between cannabis use and IQ change in the Dunedin cohort are consistent with confounding from socioeconomic status, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 110(11): 4251-4254.
- Rowe, M.G., Fleming, M.F., Barry, K.L., Manwell, L.B. and Kropp, S. 1995. Correlates of depression in primary care, *Journal of family practice*, 551-560.
- Rubino, T., and Parolaro, D. 2014. Cannabis abuse in adolescence and the risk of psychosis: a brief review of the preclinical evidence, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 52: 41-44.
- Rubino, T., Viganò, V., Premoli, F., Castiglioni, C., Bianchessi, S., Zippel, R., Parolaro, D. 2006. Changes in the expression of G protein-coupled receptor kinases and β -arrestins in mouse brain during cannabinoid tolerance, *Molecular Neurobiology*, 33(3): 199-213.
- Rubino, T., Prini, P., Piscitelli, F., Zamberletti, E., Trusel, M., Melis, M., Sagheddu, C., Ligresti, A., Tonini, R., Di Marzo, V., Parolaro, D. 2015. Adolescent exposure to THC in female rats disrupts developmental changes in the prefrontal cortex, *Neurobiology of Disease*, 73: 60-69.
- Rubino, T., Realini, N., Braidà, D., Guidi, S., Capurro, V., Viganò, D., Guidali, C., Pinter, M., Sala, M., Bartesaghi, R. and Parolaro, D. 2009. Changes in hippocampal morphology and neuroplasticity induced by adolescent THC treatment are associated with cognitive impairment in adulthood, *Hippocampus*, 19: 763-772.
- Rubino, T., Viganò, D., Realini, N., Guidali, C., Braidà, D., Capurro, V., Castiglioni, C., Cherubino, F., Romualdi, P., Candeletti, S., Sala, M. and Parolaro, D. 2008. Chronic delta 9-tetrahydrocannabinol during adolescence provokes sex-dependent changes in the emotional profile in adult rats: behavioral and biochemical correlates, *Neuropsychopharmacology*, 33: 2760-2771.
- Salzet, M., and Stefano, G. B. 2002. The endocannabinoid system in invertebrates, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 66: 353-361.
- Samuelson, G. 1992. *Drugs of Natural Origin- A Textbook of Pharmacognosy*, Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, (Ελληνικά: Φαρμακευτικά Προϊόντα Φυσικής Προέλευσης. Εγχειρίδιο Φαρμακογνωσίας. Απόδοση: Κορδοπάτης Π, Μάνεση-Ζούπα Ε, Πάϊρας Γ). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο Κρήτης, 1997, 225-231.
- Santiago, M., Westerink, H.C. 1991. Characterization and Pharmacological Responsiveness of Dopamine Release Recorded by Microdialysis in the Substantia Nigra of Conscious Rats, *Journal of Neurochemistry*, 57, (3): 738-747.
- Scallet, A.C. 1991. Neurotoxicology of cannabis and THC: a review of chronic exposure studies in animals, *Pharmacol Biochem Behav*, 40: 671-676.
- Schiørring, E. 1979. An open field study of stereotyped locomotor activity in amphetamine-treated rats, *Psychopharmacology (Berl)*, 66(3): 281-287.
- Schneider, M; Drews, E.; Koch, M. 2005. Behavioral effects in adult rats of chronic prepubertal treatment with the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2, *Behavioural Pharmacology*, 16(5-6): 447-453.
- Schweinsburg, A.D., Nagel, B.J., Schweinsburg, B.C., Park, A., Theilmann, R.J., Tapert, S.F. 2008. Abstinent adolescent marijuana users show altered fMRI response during spatial working memory, *Psychiatry Research*, 163(1): 40-51.
- Semple, D.M., McIntosh, A.M., Lawrie, S.M. 2005. Cannabis as a risk factor for psychosis: Systematic review, *Journal of Psychopharmacology*, 19(2): 187-194.

- Sesack, S., Hawrylak, V., Matus, C., Guido, M. and Levey, A. 1998. Dopamine Axon Varicosities in the Prelimbic Division of the Rat Prefrontal Cortex Exhibit Sparse Immunoreactivity for the Dopamine Transporter, *Journal of Neuroscience*, 18(7): 2697-2708.
- Shen, E., Ali, S.F., Meyer, J.S. 2011. Chronic administration of THC prevents the behavioral effects of intermittent adolescent MDMA administration and attenuates MDMA-induced hyperthermia and neurotoxicity in rats, *Neuropharmacology*, 61(8): 1183-1192
- Showalter, V.M., Compton, D.R., Martin, B.R. and Abood, M.E. 1996. Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands, *J Pharmacol Exp Ther*, 278: 989-999.
- Silva, L., Zhao, N., Popp, S. and Dow-Edwards, D. 2012. Prenatal Tetrahydrocannabinol (THC) alters cognitive function and amphetamine response from weaning to adulthood in the rat, *Neurotoxicol Teratol.*, 34(1): 63-71.
- Sirikantaramas, S., Morimoto, S., Shoyama, Y., Ishikawa, Y., Wada, Y., Shoyama, Y., Taura, F. 2004. The gene controlling marijuana psychoactivity: molecular cloning and heterologous expression of Delta1-tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L., *Journal of Biological Chemistry*, 279 (38): 39767-39774.
- Skaper, S.D., Burianni, A., Dal Toso, R., Petrelli, L., Romanello, S., Facci, L., Leon, A. 1996. The ALIAMide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 30;93(9): 3984-3989.
- Sokal, D.M., Elmes, S.J., Kendall, D.A. and Chapman, V. 2003. Intraplantar injection of anandamide inhibits mechanically-evoked responses of spinal neurones via activation of CB2 receptors in anaesthetised rats, *Neuropharmacology*, 45: 404-411.
- Solinas, M., Goldberg, S.R. and Piomelli, D. 2008. The endocannabinoid system in brain reward processes, *Br J Pharmacol*, 154: 369-383.
- Solowij, N., Stephens, R., Roffman, R.A and Babor, T. 2002. Does marijuana use cause long-term cognitive deficits?, *JAMA*, 287: 2653-2654.
- Sowell, E.R., Peterson, B.S., Thompson, P.M., Welcome, S.E, Henkenius, A.L. and Toga, A.W. 2003. Mapping cortical change across the human life span, *Nat Neurosci*, 6: 309-315.
- Spear, L.P. 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations, *Neurosci Biobehav Rev.*, 24(4): 417-463.
- Spear, L.P. 2007. Assessment of adolescent neurotoxicity: rationale and methodological considerations, *Neurotoxicol Teratol*, 29: 1-9.
- Steeds, H., Carhart-Harris, R.L., Stone, J.M. 2015. Drug models of schizophrenia, *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 5(1): 43-58.
- Steel, R.W., Miller, J.R., Dalice Darren, A.S., Day, J. 2014. Delta-9-tetrahydrocannabinol disrupts hippocampal neuroplasticity and neurogenesis in trained, but not untrained adolescent Sprague-Dawley rats, *Brain Research*, 1548: 12-19.
- Stefanis, N.C., Delespaul, P., Henquet, C., Bakoula, C., Stefanis, C.N., Van Os, J. 2004. Early adolescent cannabis exposure and positive and negative dimensions of psychosis, *Addiction*, 99(10): 1333-1341.
- Stefanis, N.C., Dragovic, M., Power, B.D., Jablensky, A., Castle, D., Morgan, V.A. 2014. The effect of drug use on the age at onset of psychotic disorders in an Australian cohort, *Schizophr Res.*, 156(2-3): 211-216.
- Stefanis, N.C., Dragovic, M., Power, B.D., Jablensky, A., Castle, D., Morgan, V.A. 2013. Age at initiation of cannabis use predicts age at onset of psychosis: the 7- to 8-year trend, *Schizophr Bull*, 39(2): 251-254.

- Stefano, G.B., Salzet, B. and Salzet, M. 1997. Identification and characterization of the leech CNS cannabinoid receptor: coupling to nitric oxide release, *Brain Res*, 753: 219-224.
- Stokes, P.R., Mehta, M.A., Curran, H.V., Breen, G., Grasby, P.M. 2009. Can recreational doses of THC produce significant dopamine release in the human striatum? *Neuroimage*, 48(1): 186–190.
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., and Waku, K. 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain, *Biochem Biophys Res Commun*, 215: 89-97.
- Sullivan, J.M. 2000. Cellular and molecular mechanisms underlying learning and memory impairments produced by cannabinoids, *Learn Mem*, 7: 132-139.
- Svizenska, I., P. Dubovy and Sulcova A. 2008. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review, *Pharmacol Biochem Behav*, 90: 501-511.
- Szutorisz, H., DiNieri, J.A., Sweet, E., Egervari, G., Michaelides, M., Carter, J., Ren, Y., Miller, M.L., Blitzer R.D. and Hurd, Y.L. 2014. Parental THC Exposure Leads to Compulsive Heroin-Seeking and Altered Striatal Synaptic Plasticity in the Subsequent Generation, *Neuropsychopharmacology*, 39: 1315-1323.
- Tanda, G., Goldberg, S.R. 2003. Cannabinoids: reward, dependence, and underlying neurochemical mechanisms--a review of recent preclinical data, *Psychopharmacology*, 169(2): 115-134.
- Tanda, G., Loddo, P., Di Chiara, G. 1999. Dependence of mesolimbic dopamine transmission on delta9-tetrahydrocannabinol, *Eur J Pharmacol*, 376: 23-26.
- Tanda, G., Pontieri, F.E., Di Chiara, G. 1997. Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism, *Science*, 276: 2048-2050.
- Thakur, G.A., Nikas S. P., and Makriyannis A. 2005. CB1 cannabinoid receptor ligands, *Mini Rev Med Chem*, 5: 631-640.
- Thiel, C.M., Huston, J.P., Schwarting, R.K. 1998. Hippocampal acetylcholine and habituation learning, *Neuroscience*, 85:1253-1262.
- Thoenen, H. 1995. Neurotrophins and neuronal plasticity, *Science*, 270: 593-598.
- Tongiorgi, E. 2008. Activity-dependent expression of brain-derived neurotrophic factor in dendrites: facts and open questions, *Neurosci Res*, 61: 335-346.
- Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M.C., Mackie, K., Walker, J.M. 1998. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system, *Neuroscience*, 83: 393-411.
- Turner, S.E, Williams, C.M., Iversen, L. and Whalley B.J. 2017. *Molecular Pharmacology of Phytocannabinoids*, Springer International Publishing Switzerland, 61-101 (Κεφάλαιο βιβλίου)
- Tzavara, E.T., Davis, R.J., Perry, K.W., Li, X., Salhoff, C., Bymaster, F.P., Witkin, J.M., Nomikos, G.G. 2003. The CB1 receptor antagonist SR 141716A selectively increases monoaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex: implications for therapeutic actions, *Br J Pharmacol*, 138: 544–553.
- Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., Marnett, L.J., Di Marzo, V., Pittman, Q.J., Patel, K.D., Sharke, K.A. 2005. Identification and Functional Characterization of Brainstem Cannabinoid CB₂ Receptors, *Science*, 310(5746): 329-332.
- Vargas-Perez H., Ting, R., Kee R., Walton C.H., Micah Hansen, D., Razavi, R., Clarke, L., Bufalino, M.R., Allison, D.W., Steffensen, S.C., van der Kooy, D. 2009. Ventral Tegmental Area BDNF Induces an Opiate-Dependent–Like Reward State in Naïve Rats, *Science*, 324(5935).

- Veen, N.D., Selten, J.P., van der Tweel, I., Feller, W.G., Hoek, H.W., Kahn, R.S. 2004. Cannabis use and age at onset of schizophrenia, *American Journal of Psychiatry*, 161(3): 501-506.
- Vemuri, V.K., Janero, D.R., Makriyannis, A. 2008. Pharmacotherapeutic targeting of the endocannabinoid signaling system: Drugs for obesity and the metabolic syndrome, *Physiology & Behavior*, 93 (4-5): 671-686.
- Villares, J. 2007. Chronic use of marijuana decreases cannabinoid receptor binding and mRNA expression in the human brain, *Neuropharmacology*, 145(1): 323-334.
- Vincent, P., Armstrong, C.M., Marty, A. 1992. Inhibitory synaptic currents in rat cerebellar Purkinje cells: modulation by postsynaptic depolarization, *J Physiol.*, 456: 453-471.
- Vinklerová, J., Nováková, J., Sulcová, A. 2002. Inhibition of methamphetamine self-administration in rats by cannabinoid receptor antagonist AM 251, *J Psychopharmacol*, 16(2): 139-143.
- Vlachou, S., Stamatopoulou, F., Nomikos, G.G., Panagis, G. 2008. Enhancement of endocannabinoid neurotransmission through CB1 cannabinoid receptors counteracts the reinforcing and psychostimulant effects of cocaine, *The international journal of neuropsychopharmacology/official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum*, 11: 905-923.
- Volk, D. and Lewis, D.A. 2016. The Role of Endocannabinoid Signaling in Cortical Inhibitory Neuron Dysfunction in Schizophrenia, *Biological Psychiatry*, 79: 595–603.
- Vorhees, C. and Williams, M. 2006. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory, *Nature Protocol*, 1 (2): 848–58.
- Wegener, N., Koch, M. 2009. Behavioural disturbances and altered Fos protein expression in adult rats after chronic pubertal cannabinoid treatment, *BrainRes*, 1253: 81-91.
- Weickert, C.S., Hyde, T.M., Lipska, B.K., Herman, M.M., Weinberger, D.R., Kleinman, J.E. 2003. Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of patients with schizophrenia, *Mol Psychiatry*, 8: 592-610.
- Wiley, J.L., Barrett, R.L., Britt, D.T., Balster, R.L., Martin, B.R. 1993b. Discriminative stimulus effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and Δ^{9-11} -tetrahydrocannabinol in rats and rhesus monkeys, *Neuropharmacology*, 32: 359-365.
- Wilson, R.I., and Nicoll, R.A. 2002. Endocannabinoid signalling in the brain, *Science*, 296: 678-682.
- Winsauer, P., Filipeanu, C.M., Bailey, E., Hulst, J.L., Sutton, J.L. 2012. Ovarian hormones and chronic administration during adolescence modify the discriminative stimulus effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) in adult female rats, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 102(3): 442-449.
- Wise, R.A. 1987. The role of reward pathways in the development of drug dependence, *Pharmacology & Therapeutics*, 35(1-2): 227-263.
- Zamberletti, E., Beggiano, S., Steardo, L., Prini, Jr.P., Antonelli, T., Ferraro, L., Rubino, T. and Parolaro, D. 2014. Alterations of prefrontal cortex GABAergic transmission in the complex psychotic-like phenotype induced by adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol exposure in rats, *Neurobiol Dis*, 63: 35-47.
- Zamberletti, E., Gabaglio, M., Grilli, M., Prini, P., Catanese, A., Pittaluga, A., Marchi, M., Rubino, T., Parolaro, D. 2016. Long-term hippocampal glutamate synapse and astrocyte dysfunctions underlying the altered phenotype induced by adolescent THC treatment in male rats, *Pharmacological Research*, 111: 459-470.
- Zamberletti, E., Gabaglio, M., Prini, P., Rubino, T., Parolaro, D. 2015. Cortical neuroinflammation contributes to long-term cognitive dysfunctions following adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol treatment in female rats, *European Neuropsychopharmacology*, 25(12): 2404-2415.
- Zamberletti, E., Prini, P., Speziali, S., Gabaglio, M., Solinas, M., Parolaro, D., Rubino, T., 2012. Gender-dependent behavioral and biochemical effects of adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol in adult maternally deprived rats, *Neuroscience*, 204: 245-257.

Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D., and Hogestatt, E.D. 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide, *Nature*, 400: 452-457.

Ελληνόγλωσσες δημοσιεύσεις

Αφεντούλης, Θ. 1875. Φαρμακολογία-Περί Φύσεως και Δυνάμεως και Χρήσεως Φαρμάκων, Εκδόσεις Τυπογραφείου Παλιγγενεσία, Αθήνα. (Κεφάλαιο βιβλίου)

Γεωργιάδης, Ι.Ν. 1932. Τοξικολογία, Περγάμαλης Γ., Αθήνα. (Κεφάλαιο βιβλίου)

Μαρσέλος, Μ. 1997. Εξαρτησιογόνες Ουσίες, Φαρμακολογία, Τοξικολογία, Ιστορία, Κοινωνιολογία, Νομοθεσία, Εκδόσεις Τυπωθήτω/Δαρδανός, Αθήνα. (Κεφάλαιο βιβλίου)

Μαρσέλος, Μ., Καραγιαννίδου, Α. 2005. Τυποθήτω, Cannabis Sativa, Μύθοι, ιστορία και παρόν για ένα φυτό με φίλους και εχθρούς. (Κεφάλαιο βιβλίου)

Παναγής Γεώργιος. 2002. Νευροεπιστημή της συμπεροφοράς, Νευροχημεία και Συμπεριφορά, Ιατρικής Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης, Αθήνα. (Κεφάλαιο βιβλίου)