



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:
«**Βασικών Βιοϊατρικών Επιστημών**»
Κατεύθυνση: «Εφαρμοσμένη Βιοϊατρική»

Διερεύνηση της αντικαταθλιπτικής δράσης της Κανναβιδιόλης

Μεταπτυχιακή Εργασία

Χαράλαμπος Μπρακατσέλος,
Βιολόγος

Επιβλέπουσα: Αικατερίνη Αντωνίου,
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2021



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:
«**Βασικών Βιοϊατρικών Επιστημών**»
Κατεύθυνση: «Εφηρμοσμένη Βιοϊατρική»

Διερεύνηση της αντικαταθλιπτικής δράσης της Κανναβιδιόλης
Μεταπτυχιακή Εργασία

Χαράλαμπος Μπρακατσέλος,
Βιολόγος

Επιβλέπουσα: Αικατερίνη Αντωνίου,
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2021

Περίληψη

Η κανναβιδιόλη, το κυριότερο μη-εθιστικό συστατικό της κάνναβης, έχει μελετηθεί ως πιθανή θεραπευτική επιλογή για διάφορες νευροψυχιατρικές διαταραχές που περιλαμβάνουν την κατάθλιψη. Η αντικαταθλιπτική της δράση δεν έχει καθοριστεί με ακρίβεια και ο μηχανισμός δράσης της είναι άγνωστος. Παράλληλα, οι ήδη υπάρχουσες θεραπείες για τη κατάθλιψη συχνά επιβαρύνουν με ανεπιθύμητες ενέργειες, ενώ τα αντικαταθλιπτικά ταχείας δράσης έχουν μεγάλους περιορισμούς στη χρήση τους.

Η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στην περαιτέρω κατανόηση των αντικαταθλιπτικών ιδιοτήτων της κανναβιδιόλης σε επίμυες και στην ανάδειξη πρακτικών αξιοποίησης τους μέσω της δοκιμασίας εξαναγκασμένης κολύμβησης, λαμβάνοντας υπόψη και το ασφαλές προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών αυτής. Στην κατεύθυνση αυτή διερευνήθηκε η πιθανή συνέργειά της με έναν κλασικό εκλεκτικό αναστολέα επαναπρόσληψης σεροτονίνης, τη φλουοξετίνη και με ένα αντικαταθλιπτικό ταχείας δράσης, την κεταμίνη.

Η κανναβιδιόλη εμφάνισε αντικαταθλιπτική δράση σε δόση υποδεκαπλάσια σε σύγκριση με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα, εμφάνισε συνέργεια με τη φλουοξετίνη, ενώ δεν πέτυχε το ίδιο με την κεταμίνη. Παράλληλα, η αγχολυτική της δράση διαπιστώθηκε μέσω της διάρκειας παραμονής των επίμυων στο κέντρο του κλωβού κατά τη δοκιμασία ανοικτού πεδίου και μέσω της δοκιμασίας υπερυψωμένου λαβυρίνθου σε σχήμα σταυρού.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα της παρούσας εργασίας υποστηρίζουν ότι η κανναβιδιόλη εμφανίζει αντικαταθλιπτικές και αγχολυτικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων και αυτών του αντικαταθλιπτικού ταχείας δράσης. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη αυτή υποστηρίζει την αξία της χρήσης της κανναβιδιόλης για τις διαταραχές της διάθεσης και συνεισφέρει στην αποκωδικοποίηση του ιδιαίτερου φαρμακολογικού προφίλ που διαθέτει. Κρίνεται ωστόσο αναγκαία η περαιτέρω μελέτη του δοσολογικού της προφίλ, των ανεπιθύμητων της ενεργειών και ιδιαίτερα των νευροβιολογικών μηχανισμών που διέπουν τις παραπάνω δράσεις της.

Abstract

Cannabidiol (CBD), a non-psychotomimetic component of *Cannabis sativa* plant, has shown therapeutic potential in neuropsychiatric disorders, including depression. CBD's antidepressant action is not sufficiently understood, while the underlying mechanism remains unknown. In parallel, current antidepressant drugs are linked with undesirable effects, and the fast-acting antidepressants maintain considerable limitations in their use.

This study focuses on the further characterization of CBD's antidepressant properties, while aiming to provide novel strategies for the exploitation of CBD's unique features regarding its complex pharmacodynamic features, and its safe side-effects profile. To this end CBD's antidepressant effects, its potential synergy with a serotonin, a classical selective serotonin reuptake inhibitor, and ketamine, the only approved fast-acting antidepressant, were studied using the forced swim test in rats.

CBD displayed antidepressant effect in 10-fold lower doses as compared with the previously described ones. Additionally, CBD demonstrated a synergistic effect with fluoxetine, but failed to do the same with ketamine. Moreover, CBD's anxiolytic potential was confirmed in the same dosage scale, using center entries in the open field test and the elevated plus maze test.

In conclusion, our findings support that CBD displays antidepressant and anxiolytic effects, including the fast-acting antidepressant action. More specifically, this study indicates that CBD could be used as a potential medication for mood/affective disorders, and provides insights concerning CBD's complex pharmacological properties. However, CBD's beneficial dose range remains to be fully dissected, while the neurobiological underpinnings of its actions need to be addressed.

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία αποτελεί τη μεταπτυχιακή εργασία ειδίκευσης για το πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών «Βασικών Βιοϊατρικών Επιστημών» του τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του ίδιου τμήματος από το Μάιο του 2020 μέχρι το Φεβρουάριο του 2021 υπό την επίβλεψη της κυρίας Κατερίνας Αντωνίου, Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Φαρμακολογίας. Ολοκληρώνοντας την θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέλαβαν στην πραγματοποίησή της.

Αρχικά, την επιβλέπουσα της εργασίας, κυρία Κατερίνα Αντωνίου: Την ευχαριστώ θερμά για την άρτια καθοδήγηση της, το παράδειγμά της, τη διάθεση της να μεταδώσει από την πολυεπίπεδη εμπειρία της, την τεράστια προσπάθεια που καταβάλει για την πρόοδο της ερευνητικής της ομάδας και των όλων των μελών της προσωπικά και για την ατελείωτη υπομονή της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τη Φωτεινή Δελή, έμπειρη μεταδιδακτορική ερευνήτρια στην ερευνητική ομάδα της κυρίας Αντωνίου, για τις καίριες συμβουλές, τις ατέλειωτες γνώσεις της, την πολύτιμη βοήθεια της, την εξαιρετική συνύπαρξη στο εργαστήριο μαζί της και επίσης την υπομονή της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Μαρία Κωνσταντή, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας και τον κύριο Περικλή Παππά, Καθηγητή Φαρμακολογίας, που δέχθηκαν να αποτελούν μέλη της τριμελούς επιτροπής της εργασίας μου και για όλη τη βοήθεια και τις συμβουλές που μου παρέχουν όλα τα χρόνια που βρίσκομαι στο εργαστήριο Φαρμακολογίας.

Θα ήθελα κλείνοντας να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους στην ερευνητική μας ομάδα, ξεκινώντας από το Μιχάλη Ασπρογέρακα, ερευνητή, κάτοχο μεταπτυχιακού, που συνέβαλε πολύ και στο συγκεκριμένο πρότζεκτ. Η πρώτη εικόνα που ανακαλώ από τα σχετικά πειράματα είναι ο μοναδικός του τρόπος του να περιποιείται τα πειραματόζωα μετά τη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αλεξάνδρα Πολύζου και τη Δήμητρα Βλάχα με τις οποίες ακολουθήσαμε παρέα όλη την πορεία του μεταπτυχιακού από την πρώτη διάλεξη μέχρι τις διπλωματικές και το Γιώργο Ντούλα που αν και πρόσφατα έγινε μέλος της ερευνητικής μας ομάδας η συμβολή του είναι ήδη μεγάλη.

Περιεχόμενα

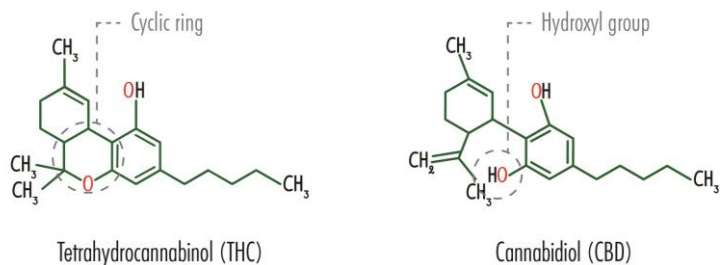
Διερεύνηση αντικαταθλιπτικής δράσης της Κανναβιδιόλης	0
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1. Κάνναβη.....	6
1.2. Κανναβιδιόλη	8
1.3. Κεταμίνη	10
1.4. Φλουοξετίνη.....	14
1.5. Πειραματικά πρότυπα κατάθλιψης	15
1.5.1. Κατάθλιψη.....	15
1.5.2. Πειραματικά Πρότυπα.....	15
Ανάλυση συγκεκριμένων μοντέλων κατάθλιψης	19
1. Δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης.....	19
1.6. Κανναβιδιόλη σε πειραματικά πρότυπα κατάθλιψης	21
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	24
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	25
2.1. Πειραματόζωα.....	25
2.2 Φάρμακα	25
2.3 Πειραματική διαδικασία:	26
4. Στατιστική ανάλυση.....	32
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
Α. Δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης	33
Β.ι. Αξιολόγηση πιθανής διεγερτικής επίδρασης της CBD στην κινητικότητα εξοικειωμένων επιμύων.	36
Γ. Καταγραφή κινητικότητας σε εξοικειωμένους επίμυες.....	36
Δ. Δοκιμασία υπερυψωμένου λαβυρίνθου σε σχήμα σταυρού.....	37
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	38
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	42
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	43

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Κάνναβη

Η κάνναβη (*Cannabis sativa*) είναι ένα ετήσιο φυτό, ενδημικό της κεντρικής Ασίας και της Ινδικής υποηπείρου που η χρήση του από τον άνθρωπο μετρά πολλές χιλιάδες χρόνια. Η καλλιέργεια και η χρήση του φυτού ξεκίνησε με τη δημιουργία των πρώτων οργανωμένων οικισμών με στόχο την εκμετάλλευση των ινών του για την παραγωγή κλωστικών ινών και ανθεκτικών σχοινιών. Ήδη από το 8500 π.Χ. υπάρχουν καταγραφές για τη χρήση του σε αρχαία κινέζικα κείμενα (Li, 1973). Πολλές μεταγενέστερες επιβεβαιώνουν ότι ήδη από την αρχαιότητα ήταν γνωστές διάφορες φαρμακολογικές και θεραπευτικές ιδιότητες του φυτού, ενώ ένα από τα παλαιότερα διασωθέντα εγχειρίδια φαρμακοποιίας αναφέρει διάφορες θεραπευτικές εφαρμογές που είχε στην εποχή συμπεριλαμβανομένης της αντιμετώπισης της μαλάριας, των πόνων μετά από χειρουργική παρέμβαση καθώς και των ρευματικών πόνων (Touw, 1981; Zuardi, 2006). Παράλληλα, η ευφοριογόνος δράση του φυτού είναι γνωστή στον άνθρωπο εδώ και 5000 χρόνια (Μαρσέλος Καραγιαννίδου 2005). Χαρακτηριστικό δε, είναι ένα κείμενο 3000 ετών που αναφέρει τη χρήση της ως ιερού φυτού σε θρησκευτικές τελετουργίες στη Νότιο Ασία, όπου παρομοιάζεται χαρακτηριστικά με πηγή χαράς και ευχαρίστησης (Touw, 1981).

Στο φυτό εμπεριέχονται περισσότερες από 450 αναγνωρισμένες χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων τουλάχιστον 113 κανναβινοειδών (Thakur et al., 2005; Elsaid et al., 2019). Ως κανναβινοειδή ορίζονται μια οικογένεια τερπενοφαινολών που προέρχονται από το φυτό της κάνναβης, καθώς και όλες οι υπόλοιπες συνθετικές ή φυσικές ουσίες που προσομοιάζουν τις δράσεις ή τη δομή των κανναβινοειδών της κάνναβης. Μελέτες πάνω στην Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη (THC) τη χαρακτήρισαν ως το κύριο ψυχοδραστικό συστατικό της κάνναβης δρώντας σε ένα νευροδιαβιβαστικό-νευρορρυθμιστικό σύστημα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), το ενδογενές σύστημα των κανναβινοειδών (ECS). Το ECS αποτελείται από τους ενδογενείς προσδέτες του -ή αλλιώς ενδοκανναβινοειδή- όπως η N-αραχιδονοϋλαιθανολαμίνη (AEA), γνωστή και ως ανανδαμίδη και η 2-αραχιδονυλογλυκερόλη (2-AG), τις πρωτεΐνες μεταφορείς, τους υποδοχείς των κανναβινοειδών (CB1 και CB2), και τα

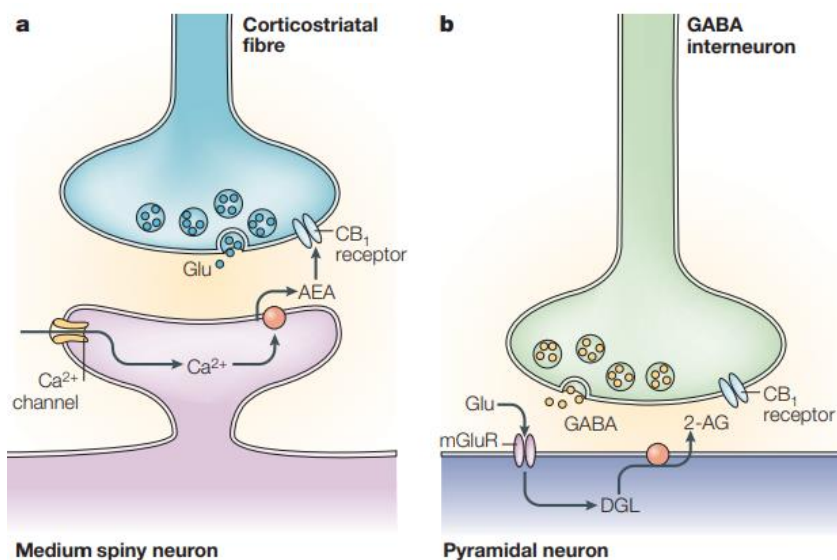


Εικόνα 1: Συντακτικοί τύποι της Δ9-τετραϋδροκανναβινόλης (THC) και της κανναβιδιόλης (CBD) [analytical cannabis website](http://analyticalcannabis.com)

ένζυμα που ελέγχουν τη βιοσύνθεση και την αποικοδόμηση των προσδετών (Lutz, 2007; Lu and MacKie, 2016; Lu and Mackie, 2020).

Το ECS συμμετέχει σε πλήθος φυσιολογικών διεργασιών όπως η ρύθμιση της ενεργειακής ισορροπίας, ο μεταβολισμός λιπιδίων και γλυκόζης, η ανταμοιβή, η ρύθμιση της κίνησης, γνωστικού τύπου διαδικασίες, όπως η μνήμη και η μάθηση, η αντίληψη του πόνου, η ρύθμιση του ανοσοποιητικού μηχανισμού και η αναπαραγωγή. Επιπλέον, η εκτεταμένη παρουσία του στα διάφορα όργανα και ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού καταδεικνύει τον σημαντικό ρόλο του στη ρύθμιση και ομοιοστασία διαφόρων φυσιολογικών λειτουργιών (Pagotto et al., 2006; De Petrocellis et al., 2011; Lu and MacKie, 2016).

Μια ιδιαιτερότητα του ECS και της νευροδιαβίβασης μέσω CB1 υποδοχέων που αξίζει να αναφερθεί αποτελεί το γεγονός ότι το σήμα μεταφέρεται παλίνδρομα από το μετασυναπτικό προς το προσυναπτικό κύτταρο (Alger, 2002), ενώ τα ενδογενή κανναβινοειδή συντίθενται και απελευθερώνονται κατά παραγγελία (on demand) μετά από εκπόλωση ή διέγερση των μετασυναπτικών υποδοχέων και της επακόλουθης εισόδου ιόντων ασβεστίου (Piomelli, 2003). Παρά την ιδιαιτερότητα του το ECS έχει ιδιαίτερα εκτεταμένη παρουσία στο ΚΝΣ. Οι CB1 άλλωστε αποτελούν τους πιο πολυπληθείς συζευγμένους με G-πρωτεΐνες υποδοχείς στον εγκέφαλο (Di Marzo et al. 2004). Ανήκουν στη υπεριοικογένεια των πρωτεϊνών με επτά διαμεμβρανικές περιοχές, οι οποίες δεσμεύονται με G-πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors: GPCRs) του τύπου Gi/o (Elphick και Egertova 2001). Εντοπίζονται προσυναπτικά στις απολήξεις κυρίως κεντρικών αλλά και περιφερικών νευρώνων, όπου ελέγχουν την αναστολή της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή μέσω της διαμεσολάβησης της αναστολής της αδενυλικής κυκλάσης (Howlett AC et al. 2002).



Εικόνα 2: Απεικόνιση του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος σε ένα απλοποιημένο μοντέλο a. διεγερτικής και b. ανασταλτικής σύναψης. Είναι διακριτός ο εντοπισμός των CB₁ υποδοχέων προσυναπτικά και της απελευθέρωσης των ενδοκανναβινοειδών από το μετασυναπτικό κύτταρο, στο πρότυπο της παλίνδρομης σηματοδότησης. Η εικόνα είναι δανεισμένη από τον (Piomelli, 2003), όπου μάλιστα αξιοποιείται σε συνδυασμό με το ακόλουθο κείμενο για την εξήγηση του ρυθμιστικού ρόλου του ECS στη συναπτική πλαστικότητα διεγερτικών και ανασταλτικών συνάψεων.

1.2. Κανναβιδιόλη

Το δεύτερο κυριότερο συστατικό της κάνναβης, η **κανναβιδιόλη (CBD)** δεν παρουσιάζει εθιστικές ιδιότητες ούτε ψυχομιμητική δράση. Η δομή του μορίου χαρακτηρίστηκε από την ερευνητική ομάδα του Mechoulam το 1963, ενώ το μόριο είχε ήδη υποστεί απομόνωση από τη δεκαετία του 1930 (Mechoulam et al., 2002). Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της CBD αποτελεί το γεγονός ότι έχει μια πληθώρα φαρμακολογικών στόχων στο κεντρικό νευρικό σύστημα, με αποτέλεσμα να έχει διερευνηθεί η θεραπευτική της δυναμική (therapeutic potential) για πολλές διαφορετικές νευροψυχιατρικές διαταραχές. Συνοπτικά η κανναβιδιόλη έχει μελετηθεί σε μόριο για την αντιμετώπιση της επιληψίας (ήδη εγκεκριμένο σκεύασμα: Epidyolex®), της Alzheimer's disease, της νόσου του Πάρκινσον, της χορείας του Huntington, του άγχους και της κατάθλιψης, της σχιζοφρένειας, του εθισμού και νευροαναπτυξιακών διαταραχών συμπεριλαμβανομένου του φάσματος του αυτισμού (Elsaid et al., 2019).

✚ Στοιχεία φαρμακοδυναμικής

Η κανναβιδιόλη, φυτοκανναβινοειδές άλλωστε, ασκεί φαρμακολογική δράση στο ενδοκανναβινοειδές σύστημα, χωρίς ωστόσο να περιορίζεται εκεί. Το μεγάλο ρεπερτόριο φαρμακολογικών στόχων της κανναβιδιόλης, σε συνδυασμό με τη δράση της στο ECS το οποίο εν γένει αποτελεί ένα ομοιοστατικό/ρυθμιστικό νευροδιαβιβαστικό σύστημα που μεσολαβεί πολλές φυσιολογικές λειτουργίες και ρυθμίζει την ανάπτυξη και ομαλή λειτουργία άλλων συστημάτων νευροδιαβίβασης, θα μπορούσε παράλληλα να συνδεθεί και με το ευρύ φάσμα φαρμακολογικών δράσεων της ίδιας της κάνναβης οι οποίες αφορούν πολλά διαφορετικά πεδία και με μεγάλη ετερογένεια.

Το πλήθος των φαρμακολογικών ιδιοτήτων της CBD και η ελλιπής προς το παρόν κατανόηση των εμπλεκόμενων μηχανισμών καθιστούν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα τη μελέτη των φαρμακοδυναμικών της ιδιοτήτων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το συγκεκριμένο φυτοκανναβινοειδές έχει πολύ χαμηλή συγγένεια για τους υποδοχείς CB1 και CB2 των κανναβινοειδών, (K_i :4359 nM και 2860 nM αντιστοίχως, υπολογισμένες σε εγκεφαλικό ιστό και μεμβράνες από σπλήνα επίμου) (R.G., 2008). Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίφαση με την πληθώρα πειραματικών και κλινικών παρατηρήσεων που θέλουν τη CBD να ανταγωνίζεται τις δράσεις της THC, οι οποίες μεσολαβούνται από τη δράση της ως μερικός αγωνιστής των υποδοχέων CB1. Ωστόσο, το 2015 οι Laprairie et al., έδειξαν ότι η άμεση φαρμακολογική δράση που ασκεί η κανναβιδιόλη στους CB1 είναι αυτή του αρνητικού αλλοστερικού τροποποιητή (negative allosteric modulator, NAM). Η δράση αυτή από μόνη της συμπνέει με τις παρατηρήσεις σχετικά με τις φαρμακολογικές επιδράσεις της CBD στις δράσεις της THC. Η άλλη μελέτη ωστόσο, αυτή των De Petrocellis et al., (2011) υποστηρίζει ότι η CBD αναστέλλει τη δράση του ενζύμου fatty acid amide hydroxylase (FAAH), εμποδίζοντας τον καταβολισμό της ανανδαμίδης (ενδοκανναβινοειδές). Παράλληλα εμποδίζοντας και την επαναπρόσληψη του ίδιου ενδοκανναβινοειδούς, έχει ως τελικό αποτέλεσμα

την αύξηση του ενδοκανναβινοειδούς τόνου. Τα τελευταία ευρήματα είναι σε συμφωνία και με τους (Leweke et al., 2012) όπου αναφέρουν αυξημένα επίπεδα ανανδαμίδης στον ορό ασθενών με σχιζοφρένεια μετά από χορήγηση CBD, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα ανανδαμίδης συσχετίστηκαν με βελτίωση της κλινικής εικόνας των ασθενών.

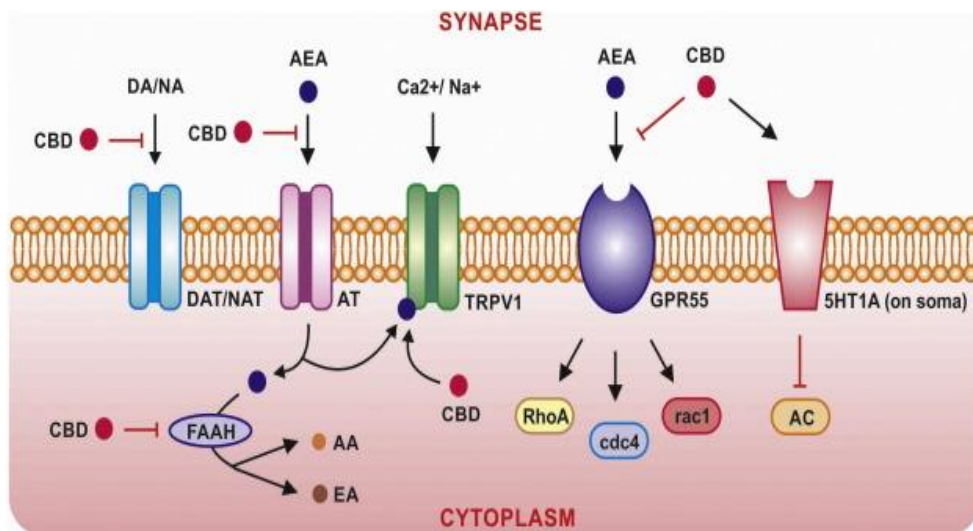
Η κανναβιδιόλη επίσης εμφανίζει ιδιότητες αγωνιστή για τους υποδοχείς βανιλοειδικών τύπου 1 και 2 (TRPV1,2) (Bisogno et al., 2001; Campos and Guimaraes, 2009), και κάποιοι ερευνητές αποδίδουν σε αυτή την ιδιότητα την αναλγητική και αντιφλεγμονώδη δράση του μορίου (Elsaid et al., 2019). Είναι σημαντικό να αναφερθεί το γεγονός ότι οι ιονοτροπικοί αυτοί υποδοχείς έχουν στενή σχέση με το ECS, καθώς η ανανδαμίδα είναι ισχυρός διεγέρτης τους. Μια ακόμα οικογένεια υποδοχέων που σχετίζονται με το ECS είναι οι ορφανοί υποδοχείς που είναι συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες, καθώς υπάρχουν μελέτες που τους χαρακτηρίζουν ως υποδοχείς κανναβινοειδών (Overton et al., 2006; Sharir and Abood, 2010), εστιάζοντας κυρίως στο GPR55 υποδοχέα, του οποίου η CBD αποτελεί ανταγωνιστής, σε αντίθεση με την THC και τα ενδοκανναβινοειδή (Ryberg et al., 2007).

Η δράση της CBD δεν περιορίζεται στο ECS και στα «δορυφορικά» του συστήματα. Σειρές μελετών στη βιβλιογραφία υποστηρίζουν την δράση της CBD ως αγωνιστής στους υποδοχείς τύπου 1A της σεροτονίνης (5HT_{1A}), οι οποίοι είναι συζευγμένοι με Gi/o πρωτεΐνες (Russo et al., 2005; Katsidoni et al., 2013; Fogaça et al., 2014; Norris et al., 2016; Renard et al., 2017). Η αγωνιστική δράση στους 5HT_{1A} έχει συσχετισθεί στενά με τις αγχολυτικές, αντικαταθλιπτικές, και αντιψυχωτικές ιδιότητες της CBD, καθιστώντας τον υποδοχέα έναν από τους κύριους μεσολαβητές των φαρμακολογικών δράσεων του μορίου.

Συνεχίζοντας και σε άλλα νευροδιαβιβαστικά συστήματα, σίγουρα θα πρέπει να αναφέρουμε και μια κλασική μελέτη κινητικής σε παρασκεύασμα φλοιού από επίμου, η οποία έχει δείξει τη δράση της CBD ως αρνητικός αλλοστερικός τροποποιητής των υποδοχέων των οπιουειδών τύπου μ και δ, οι οποίοι είναι συζευγμένοι με Gi/o πρωτεΐνες (Kathmann et al., 2006). Από τη μελέτη αυτή είχε ως αποτέλεσμα η CBD να μελετηθεί ως θεραπευτικός παράγων για τον εθισμό στα οπιουειδή (Elsaid et al., 2019). Μια ακόμα σημαντική κεντρική δράση της CBD είναι αυτή του μερικού αγωνιστή των D_{2HIGH} υποδοχέων της ντοπαμίνης. Ειδικότερα, ο Seeman το 2016 έδειξε ότι η CBD παρουσιάζει ένα διφασικό μοτίβο εκτοπισμού της [3H]domperidone, αντίστοιχο με της αριπιπραζόλης (αντιψυχωσικό, μερικός αγωνιστής ντοπαμινεργικών υποδοχέων), δίνοντας έναν ακόμη πιθανό μηχανισμό για την κατανόηση των αντιψυχωσικών ιδιοτήτων του μορίου.

Ένα ποσοστό της τάξης του 20% των φαρμακολογικών στόχων της κανναβιδιόλης αποτελούν μόρια μεταφορείς (Ibeas Bih et al., 2015). Εκτός του μεταφορέα της ανανδαμίδης που αναφέρθηκε παραπάνω, στη λίστα συγκαταλέγονται και άλλοι οι οποίοι έχουν σίγουρα αντίκτυπο στις κεντρικές δράσεις του μορίου. Συνοπτικά, έχει δειχθεί πειραματικά η δράση της CBD ως αναστολέας του μεταφορέα επαναπρόσληψης της

νοραδρεναλίνης, της ντοπαμίνης, της σεροτονίνης και του GABA (Zhornitsky and Potvin, 2012), ωστόσο το γεγονός ότι η δράση της αυτή δεν είναι σημαντική όταν εφαρμόζεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις *in vitro*, δημιουργεί αμφιβολίες για τη συνεισφορά αυτών των ιδιοτήτων στις κεντρικές φαρμακολογικές δράσεις της κανναβιδιόλης (Ibeas Bih et al., 2015).



Εικόνα 3: Απεικόνιση του σύνθετου φαρμακοδυναμικού προφίλ της κανναβιδιόλης συνοψίζοντας τους βασικούς φαρμακολογικούς της στόχους κεντρικά από τους (Gururajan and Malone, 2016).

⚡ Προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών

Η κανναβιδιόλη φαίνεται ότι παρουσιάζει ένα ασφαλές προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών. Έχουν αναφερθεί αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες όπως: εμβρυοτοξικότητα, ηπατοτοξικότητα, αναπαραγωγική δυσλειτουργία, αύξηση βάρους, υπόταση, διάρροια, κούραση, αυπνία και γαστρεντερικές διαταραχές. Ας σημειωθεί ότι στις περισσότερες περιπτώσεις χαρακτηρίζεται ασφαλής η χρήση CBD και συνήθως είναι σημαντικά πιο ασφαλής έναντι άλλων ουσιών με τις αντίστοιχες φαρμακολογικές ιδιότητες. Γι αυτό το λόγο η κανναβιδιόλη πιθανώς αποτελεί μια ουσία που μπορεί να χρησιμοποιείται αποτελεσματικά ως κύρια η συνοδός θεραπεία, προκειμένου να οδηγήσει στο επιθυμητό θεραπευτικό αποτέλεσμα ή να συμβάλλει σε υπάρχουσες θεραπευτικές επιλογές μειορρυθμίζοντας την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών (Machado Bergamaschi et al., 2011; Iffland and Grotenhermen, 2017; Huestis et al., 2019).

1.3. Κεταμίνη

Η κεταμίνη [(+/-) 2-(2-χλωροφαινυλ)-2-(μεθυλάμινο)-κυκλοεξανόνη] είναι ένας μη συναγωνιστικός αναστολέας του NMDA υποδοχέα. Εμφανίζει δύο οπτικά ισομερή, την S-κεταμίνη (ή αλλιώς εσκεταμίνη) και τη R-κεταμίνη, τα οποία έχουν παρόμοιες χημικές και φυσικές ιδιότητες, με κύρια διαφορά τους την κατά 5 με 8 φορές μεγαλύτερη χημική συγγένια του S-ισομερούς για το σημείο πρόσδεσης στον NMDA R (Tyler et al., 2017).

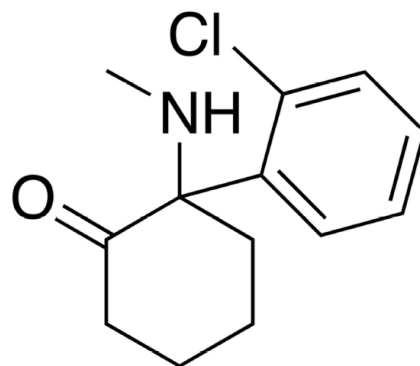
Αποτελεί παράγωγο της φαινυλκυκλιδίνης (PCP) και η σύνθεση της πραγματοποιήθηκε πρώτη φορά το 1962, πέντε χρόνια έπειτα από την σύνθεση της PCP (Thornberg and Saklad, 1996; Domino, 2010). Πρόκειται για ένα μόριο με ποικίλες δράσεις και μεγάλη σημασία για πολλά πεδία της κλινικής πρακτικής και της επιστημονικής έρευνας.

Χαρακτηρίζεται ως διαχωριστικό/διασχιστικό αναισθητικό (Corssen and Domino, 1966), καθώς ο ασθενής φαίνεται να είναι σε εγρήγορση, ενώ στην πραγματικότητα εμφανίζει αμνησία και έντονη αναλγησία, μη μπορώντας να αντιδράσει ή να επεξεργαστεί αισθητικά ερεθίσματα. Σε

υποαναισθητικές δόσεις η κεταμίνη εμφανίζει αμνησιακές και αναλγητικές ιδιότητες, ενώ την τελευταία δεκαετία έχει τραβήξει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας η διερεύνηση των ταχέως εμφανιζόμενων αντικαταθλιπτικών ιδιοτήτων (Berman et al., 2000; Rowland, 2005; Aroni et al., 2009; Niesters and Dahan, 2012). Σήμερα χρησιμοποιείται παγκοσμίως ως αναισθητικό στην κτηνιατρική και λιγότερο ως αναισθητικό και αναλγητικό στην ιατρική (Rowland 2005), ενώ από το 2019 η εσκεταμίνη εγκρίθηκε για τη θεραπεία της κατάθλιψης, ως αντικαταθλιπτικό ταχείας δράσης (σκεύασμα χαμηλής δοσολογίας) υπό τη μορφή του ρινικού σπρέι (Spravato®) ([σύνδεσμος για ανακοίνωση έγκρισης](#)).

Προκλινικές και κλινικές μελέτες έχουν όμως αναδείξει και τις ανεπιθύμητες ενέργειες της κεταμίνης, με προεξέχουσα την πρόκληση συμπτωματολογίας ψυχωτικού τύπου (Krystal et al., 1994). Σε πειραματικά ζωικά πρότυπα η χορήγηση υποαναισθητικών δόσεων κεταμίνης εμφανίζει, παρομοίως, ψυχομιμητικές δράσεις καλύπτοντας όλο το εύρος της ψυχωτικής συμπτωματολογίας: θετικής, αρνητικής και γνωστικής (Frohlich and Van Horn, 2014). Λόγω αυτών της των ιδιοτήτων, η κεταμίνη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βιβλιογραφία ως πειραματικό πρότυπο είτε με σκοπό τη διαλεύκανση ερωτημάτων σχετικά με την παθοφυσιολογία των ψυχώσεων (Becker et al., 2003; Luo et al., 2020), είτε ως επαγωγέας ενός «υποστρώματος» δράσης για την εκτίμηση υποψήφιων αντιψυχωσικών παραγόντων (Koh et al., 2018).

Επίσης η κεταμίνη εντάσσεται στις εξαρτησιογόνες ουσίες και έχει χρησιμοποιηθεί για ψυχαγωγικούς λόγους. Τη δεκαετία του 1970 (Siegel, 1978). Συνηθέστερη οδός χορήγησης είναι η ρινική, αποτελεί ένα εκ των συνηθισμένων Club drugs και μεταξύ χρηστών η κεταμίνη είναι γνωστή με διάφορες ονομασίες όπως Special K, Vitamin K, Purple και Super Acid. Οι περισσότεροι χρήστες περιγράφουν ότι η χρήση της προκαλεί συναισθηματικές μεταπτώσεις συζευγμένες με ονειρικές εμπειρίες ή/και με ψευδαισθήσεις-παραισθήσεις (Corssen and Domino, 1966). Πολλοί χρήστες έχουν αναφερθεί σε μια κατάσταση κατά την οποία αισθάνονται πως γίνονται ένα με το περιβάλλον (“melting into the surrounding”) και σε μια εμπειρία που περιγράφουν πως

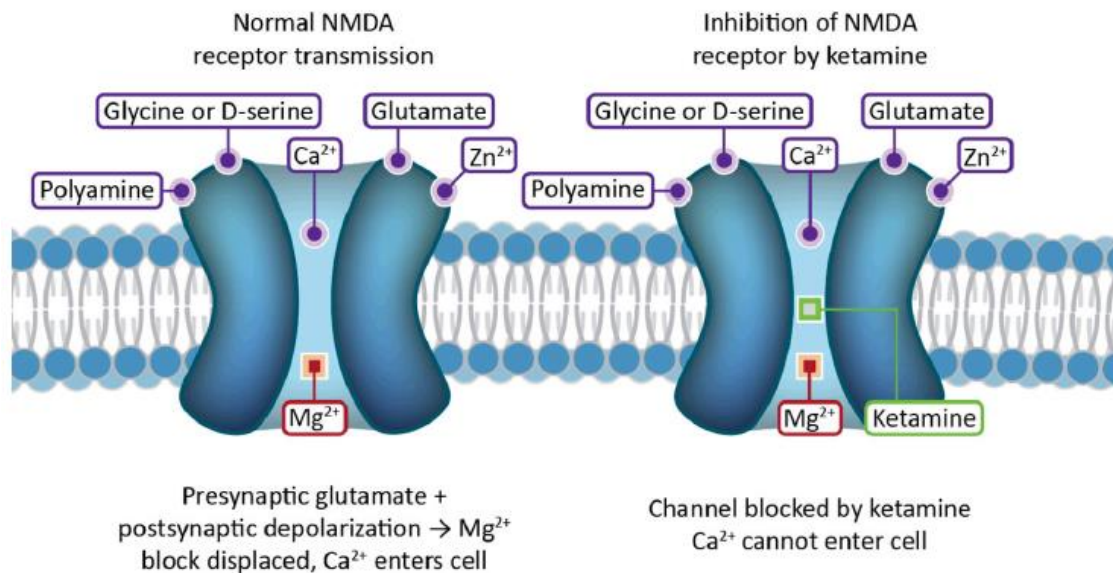


Εικόνα 4: Συντακτικός τύπος κεταμίνης

αντιλαμβάνονται ότι βρίσκονται έξω από το σώμα τους, την οποία ανεπίσημα ονομάζουν “K-hole” και είναι χαρακτηριστική για την κεταμίνη (Muetzelfeldt et al., 2008).

✚ Στοιχεία φαρμακοδυναμικής

Οι κύριες φαρμακολογικές επιδράσεις της κεταμίνης οφείλονται στην ανταγωνιστική της δράση στον NMDA υποδοχέα. Προσδένεται στη θέση δέσμησης της PCP, η οποία είναι διαφορετική από τη θέση δέσμησης του γλουταμικού, (Εικόνα 5), αναστέλλοντας τη λειτουργία του μειώνοντας το ρυθμό διάνοιξης του με αλλοστερικούς μηχανισμούς. Η λειτουργία των υποδοχέων NMDA παίζει καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση της νευροδιαβίβασης και την πλαστικότητα στο ΚΝΣ. Η ανταγωνιστική δράση της κεταμίνης στους συγκεκριμένους υποδοχείς ενδέχεται να εξηγεί κυρίως τις αναισθητικές, αλλά και τις αναλγητικές ιδιότητες του φαρμάκου (Franks and Lieb, 1994; K and Lambert D.G, 1996; Frohlich and Van Horn, 2014; Tyler et al., 2017).



Εικόνα 5: Η Φαρμακολογία των NMDA υποδοχέων και η αναστολή τους από την κεταμίνη: Οι NMDA υποδοχείς είναι ιονοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμικού οξέως και λειτουργούν ως διάλυτοι κατιόντων που ρυθμίζονται από μια πληθώρα προσδετών. Η κεταμίνη είναι ένας εκ των μη συναγωνιστικών ανταγωνιστών που αναστέλλουν τον διάλυο μέσω της πρόσδεσής τους στο σημείο πρόσδεσης της PCP εντός του πόρου. Η γλυκίνη και η D-σερίνη είναι συναγωνιστές που προσδένονται στην εξωκυττάρια επικράτεια του υποδοχέα. Είναι και οι 2 απαραίτητες για την ενεργοποίηση του, ωστόσο ο υποδοχέας θεωρείται γλουταματεργικός επειδή το γλουταμικό είναι ο νευροδιαβιβαστής που απελευθερώνεται από το προσυναπτικό κύτταρο, ενώ οι 2 συναγωνιστές του βρίσκονται συνήθως στην απαιτούμενη συγκέντρωση στο περιβάλλον για να ενεργοποιηθούν οι υποδοχείς. Η λειτουργία του υποδοχέα υφίσταται ρύθμιση ακόμα από πολυαμίνες οι οποίες διαθέτουν το δικό τους σημείο πρόσδεσης στην επιφάνεια του υποδοχέα. Το Mg²⁺ είναι ένας τασεοεξαρτώμενος αναστολέας του καναλιού που μεσολαβεί στον σχηματισμό LTP κατά Hebb. (Frohlich and Van Horn, 2014).

Η κεταμίνη εμφανίζει συγγένεια πρόσδεσης και σε άλλους υποδοχείς του ΚΝΣ. Ζωικά μοντέλα έχουν δείξει ότι ασκεί επίδραση σε όλους τους τύπους οπιοειδών υποδοχέων με διαφορετική ισχύ τον καθένα ($\mu > \kappa > \delta$), ενώ

και εδώ το S(+) ισομερές εμφανίζει 3 με 4 φορές μεγαλύτερη δραστικότητα, στους υποδοχείς τύπου μ και κ. (Smith et al., 1987; Dahan et al., 2001).

Επιπλέον, η κεταμίνη έχει βρεθεί ότι δρα ανασταλτικά στη χολινεργική νευροδιαβίβαση, μέσω της δράσης της στους μουσκαρινικούς και νικοτινικούς χολινεργικούς υποδοχείς των συμπαθητικών γαγγλιακών νευρώνων. Ενδέχεται οι δράσεις αυτές να δικαιολογούν εν μέρει την αντιχολινεργική δράση της κεταμίνης (αρνητικές επιδράσεις στη μνήμη και στο επίπεδο συνείδησης, μείωση μυϊκού τόνου, μυδρίαση, βρογχοδιαστολή) (Kohrs and Durieux, 1998). Ακόμα, υποδοχείς σεροτονίνης 5-HT_{2A} παρουσιάζουν μια σχετικά ασθενή συγγένεια πρόσδεσης με την κεταμίνη (K_i=15 ± 5 μM), οποία ίσως σχετίζεται με τις οπτικές παραισθήσεις που προκαλεί η χορήγηση κεταμίνης, καθώς εμπλέκονται σε τέτοιου είδους παραισθήσεις που επάγονται από σεροτονεργικούς προσδέτες (Frohlich and Van Horn, 2014). Τέλος έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την λειτουργία διαύλων Na⁺ στο ΚΝΣ όταν χορηγείται σε αναισθητικές δόσεις (Tyler et al., 2017).

Αξίζει να αναφερθεί ότι προϊόντα του μεταβολισμού της κεταμίνης ασκούν με τη σειρά τους φαρμακολογική δράση, στοχεύοντας επίσης στη γλουταματεργική νευροδιαβίβαση, τουλάχιστον σε πειραματικά μοντέλα. Συγκεκριμένα η νορκεταμίνη, ένας μεταβολίτης της κεταμίνης φαίνεται να αυξάνει την λειτουργία των AMPA υποδοχέων, ενώ δεν έχει συγγένεια πρόσδεσης με τους NMDA. Η αύξηση της λειτουργίας των AMPA υποδοχέων από την κεταμίνη (σε υποαναισθητικές δόσεις) είναι συνδεδεμένη με τις αντικαταθλιπτικές ιδιότητες του φαρμάκου συναρτήσει μηχανισμών συναπτικής και νευρωνικής πλαστικότητας (Zanos et al., 2016; Zanos and Gould, 2018; Aguilar-Valles et al., 2020).

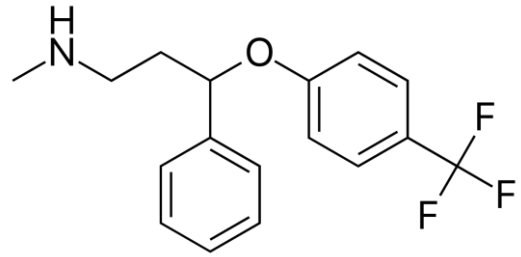
✚ Αντικαταθλιπτική δράση

Είναι διαπιστωμένο σε πειραματικά μοντέλα της νόσου ότι οξεία χορήγηση μικρής δόσης κεταμίνης επιφέρει ταχύτατο και ισχυρό αντικαταθλιπτικό αποτέλεσμα, το οποίο διαρκεί εβδομάδες. Ανάλογη εικόνα προκύπτει και από τις κλινικές μελέτες που δείχνουν ότι μια δόση κεταμίνης προκαλεί ταχύτατη και παρατεταμένη απόκριση στους ασθενείς με μείζων καταθλιπτική διαταραχή (ΜΚΔ).

Παρά την εκτενή μελέτη, ο μηχανισμός της αντικαταθλιπτικής δράσης της κεταμίνης δεν είναι γνωστός, ενώ αναζητούνται μεθοδολογίες για την ασφαλέστερη χρήση της ουσίας. Δεδομένης της πολυπλοκότητας των φαρμακολογικών επιδράσεων του μορίου και του συσχετισμού του με σωρεία ανεπιθύμητων ενεργειών, συμπεριλαμβανομένης και της προαναφερθείσας πρόκλησης συμπτωματολογίας ψυχωτικού τύπου, παραμένει έντονη η ανάγκη καλύτερης αξιοποίησης της εξαιρετικής δυναμικής και ιδιαιτερότητας της κεταμίνης ως αντικαταθλιπτικό φάρμακο ταχείας δράσης.

1.4. Φλουοξετίνη

Η φλουοξετίνη είναι ένα από τα κλασικότερα αντικαταθλιπτικά φάρμακα και ανήκει στην κατηγορία των αναστολέων επαναπρόσληψης σεροτονίνης (Serotonin Selective Reuptake Inhibitors -SSRI). Αποτελεί μάλιστα το πρώτο SSRI που κυκλοφόρησε στην αγορά της Αμερικής και παραμένει προεξέχων λόγω του ηπιού προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών. Αποτελεί κύρια επιλογή για την αντιμετώπιση αρκετών ψυχιατρικών διαταραχών



Εικόνα 6: Συντακτικός τύπος φλουοξετίνης

(συμπεριλαμβανομένης της ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής, της κρίση πανικού και διαταραχών της λήψης τροφής) και την αντιμετώπιση της μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής σε παιδιά και εφήβους (Stahl, 1998). Η σύνθεση της πραγματοποιήθηκε το 1972 από την εταιρεία Eli Lilly and Company, εισήχθη στην κλινική πράξη το 1984 (Benfield et al., 1986; El Refaey, 2007), ενώ πλέον αποτελεί την 31^η πιο συχνή συνταγογραφούμενη θεραπεία στις ΗΠΑ και συγκαταλέγεται στη λίστα των απαραίτητων φαρμάκων (essential medicines) του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Organisation, 2019).

Από φαρμακοδυναμικής σκοπιάς, η φλουοξετίνη, όπως και οι υπόλοιπες ενώσεις που ανήκουν στα SSRI, αναστέλλει εκλεκτικά και ισχυρά την επαναπρόσληψη της σεροτονίνης. Αντίθετα με τα πρώτης και δεύτερης γενιάς αντικαταθλιπτικά, δεν εμφανίζει ιδιαίτερα σημαντική ικανότητα αναστολής επαναπρόσληψης της νορεπινεφρίνης, ενώ έχει πολύ ασθενή ανταγωνιστική δράση για α1 αδρενεργικούς και M1 μωσκαρινικούς υποδοχείς. Η δράση της είναι εκτενέστερα μελετημένη στο προσυναπτικό επίπεδο των συναπτικών απολήξεων, όπου η φλουοξετίνη αναστέλλει τους μεταφορείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (serotonin transporter -SERT), αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα της σεροτονίνης στη συναπτική σχισμή. Νεώτερα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η θεραπευτική ικανότητα του μορίου εξαρτάται από τις δράσεις του στους δενδρίτες των σεροτονεργικών νευρώνων. Κλείνοντας την αναφορά στις φαρμακοδυναμικές ιδιότητες της ένωσης, αξίζει να αναφέρουμε το ότι οι επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις της έχουν σαν αποτέλεσμα την αυξημένη σεροτονίνη στις δενδριτικές συνάψεις στη ραφή όπου εδράζουν 5HT_{1A} αυτοϋποδοχείς, οι οποίοι -όπως προαναφέρθηκε- είναι ανασταλτικοί. Η αυξημένη σεροτονίνη σε βάθος χρόνου απευαισθητοποιεί τους σχετικούς υποδοχείς, προκαλώντας άρση της αναστολής (disinhibition) της σεροτονεργικής νευροδιαβίβασης. Η απευαισθητοποίηση των 1A υποδοχέων της σεροτονίνης, έχει παρατηρηθεί ότι συμπίπτει χρονικά με την έναρξη της αντικαταθλιπτικής δράσης, ενώ πιθανώς να σχετίζεται και με την αντοχή στις ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου, όταν παρατηρούνται (Benfield et al., 1986; El Refaey, 2007).

1.5. Πειραματικά πρότυπα κατάθλιψης

1.5.1. Κατάθλιψη

Η κατάθλιψη αποτελεί μια εκ των σοβαρότερων ψυχιατρικών διαταραχών και την συχνότερη μορφή ψυχικής νόσου, καθώς έχει υπολογιστεί ότι αφορά περίπου το 20% του παγκόσμιου πληθυσμού (Vigo et al., 2016), ενώ ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας την κατατάσσει ως μια από τις κυριότερες μορφές ελαττωμένης λειτουργικότητας (World Health Organisation, 2017). Πέρα από τη δριμύτητα της ως νόσος η κατάθλιψη αποτελεί και σοβαρό κοινωνικό ζήτημα, διότι προκαλεί προβλήματα στις διαπροσωπικές σχέσεις, περιορίζει τις εργασιακές δραστηριότητες του πάσχοντος, επιβάλλει μεγάλο οικονομικό φορτίο στην κοινωνία και έχει θνησιμότητα.

Χαρακτηρίζεται από μελαγχολικό συναίσθημα, ανηδονία, απαισιοδοξία, απελπισία, απώλεια ενδιαφερόντων και συνοδεύεται από δυσκολία στη συγκέντρωση, διαταραχές του ύπνου, της όρεξης και της σεξουαλικής δραστηριότητας, ενώ συχνά περιλαμβάνει και αυτοκαταστροφικές τάσεις. Από το 1960 και μετά η διάγνωση της μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής πραγματοποιείται βάσει των διεθνώς αποδεκτών διαγνωστικών κριτηρίων DSM-V και ICD-10 (Nestler et al., 2002; Krishnan and Nestler, 2008; American Psychiatric Association, 2013; Anon, 2014).

Η παθοφυσιολογία της νόσου είναι ιδιαίτερα πολυπαραγοντική και σύνθετη καθώς εμπλέκει μεγάλο εύρος νευροχημικών παρεκκλίσεων, πλήθος νευροβιολογικών παραγόντων που συμμετέχουν, έχει γενετικό υπόβαθρο, σχετίζεται με τους μηχανισμούς νευρωνικής πλαστικότητας και συμπεριλαμβάνει διαταραχές στη λειτουργία διάφορων κεντρικών νευροβιολογικών κυκλωμάτων (Krishnan and Nestler, 2008). Η προσπάθεια της επιστημονικής κοινότητας να κατανοήσει βαθύτερα τη παθοφυσιολογία της νόσου και να προσφέρει καλύτερες θεραπευτικές απαντήσεις εγείρει και την ανάγκη για τη διαμόρφωση καλών πειραματικών «προσομοιώσεων» της νόσου.

1.5.2. Πειραματικά Πρότυπα

Διαβάζοντας κανείς κείμενα δημοσιευμένα προ εικοσαετίας σχετικά με την ανάπτυξη ιδανικών πειραματικών προτύπων για την προσέγγιση ψυχιατρικών διαταραχών όπως η ΜΚΔ, παρατηρεί ότι όλα ξεκινάνε με την παραδοχή ότι κάτι τέτοιο είναι σχεδόν ακατόρθωτο. Η επανάσταση που έχει μεσολαβήσει στις βιολογικές επιστήμες 20 χρόνια μετά, δείχνει ότι είναι επίσης ακατόρθωτο τα αντίστοιχα μελλοντικά κείμενα να μην ξεκινούν με την ίδια παραδοχή. Παρόλα αυτά έχουν γίνει πολύ αξιόλογες προσπάθειες για τη διαμόρφωση

έγκυρων μοντέλων κατάθλιψης (ή πτυχών αυτής) και κάποια εξ αυτών αποτελούν εξαιρετικά εργαλεία για τη μελέτη της παθοφυσιολογίας της νόσου και των πιθανών θεραπευτικών επεμβάσεων.

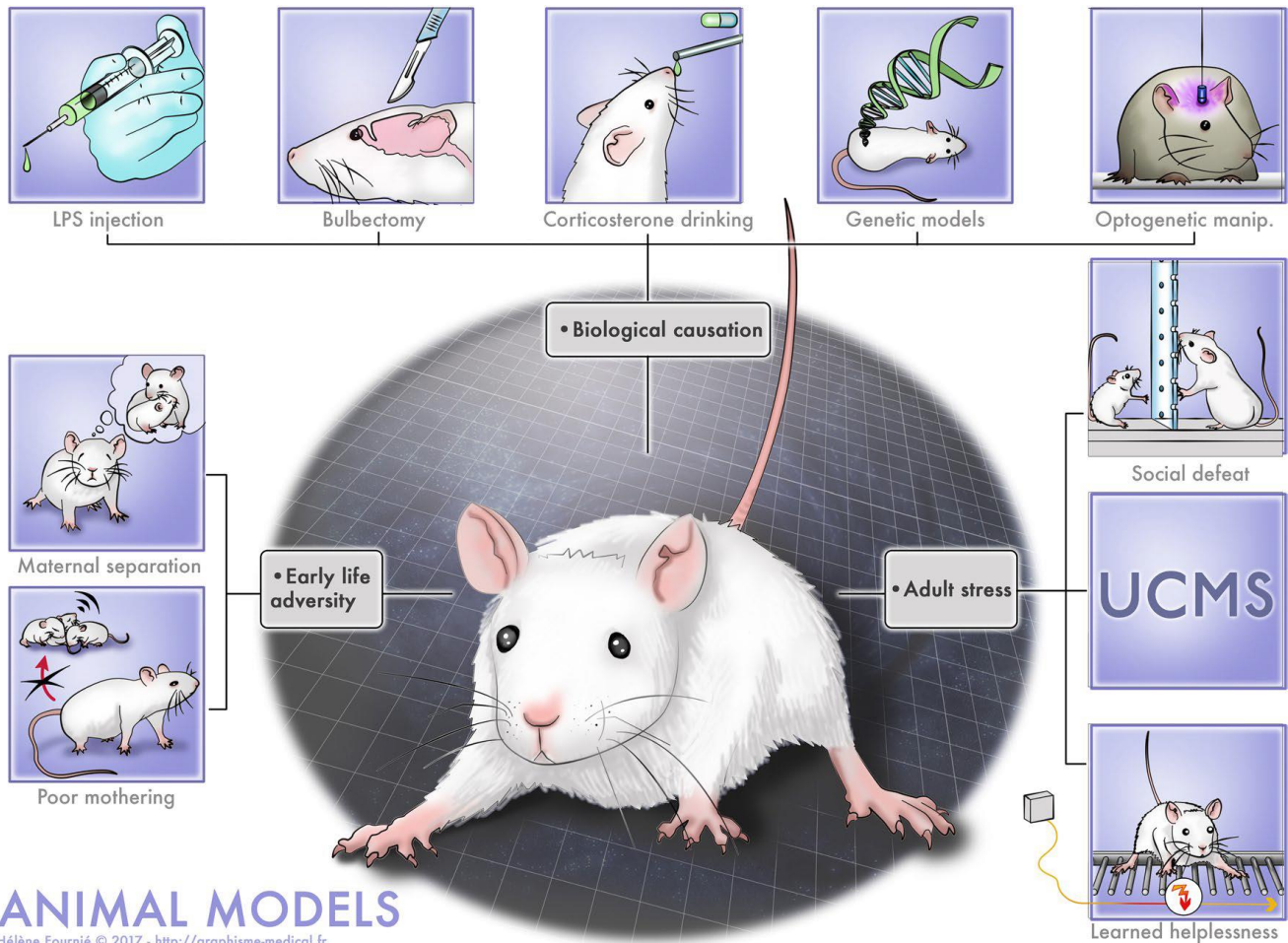
Τέτοια μοντέλα βασίζονται σε φαρμακολογικούς, περιβαλλοντικούς και γενετικούς χειρισμούς, ή επεμβάσεις σε νευρικά κυκλώματα (πχ βλάβες κυτταρικών πληθυσμών ή έλεγχο διεγερσιμότητας κυττάρων με μεθόδους που βασίζονται στη γενετική μηχανική) (Czéh et al., 2016; Hao et al., 2019; Planchez et al., 2019). Χρησιμοποιούνται με τέτοιο τρόπο ώστε συγκεκριμένες μεταβολές στη συμπεριφορά των πειραματικών ζώων, να αντανακλούν καταθλιπτική/καταθλιπτικόμορφη συμπεριφορά. Επειδή η προσομοίωση γενικότερα της νόσου είναι αδύνατη, τα μοντέλα αυτά βασίζονται στην ορθή αντιστοίχιση ορισμένων συμπτωμάτων της νόσου με συγκεκριμένες πειραματικές προσεγγίσεις στα πειραματόζωα, όπως συνοψίζεται και στον πίνακα 1:

Κριτήρια DSM-V	Πειραματική προσέγγιση
Καταθλιπτική διάθεση	Δεν είναι δυνατή
Απώλεια ενδιαφέροντος	Μειωμένη συμπεριφορά κινήτρου
Ανηδονία	Μειωμένη απόκριση σε ευχάριστα ερεθίσματα
Μείωση βάρους	Αλλαγές στο σωματικό βάρος
Διαταραχές ύπνου	Αρχιτεκτονική σταδίων ύπνου
Ψυχοκινητική διέγερση ή καταστολή	Κινητικότητα
Κούραση/Μείωση ενεργητικότητας	Δεν είναι δυνατή
Ενοχικές σκέψεις/Συναισθήματα αναξιοτιίας	Δεν είναι δυνατή
Διαταραχές μνήμης και μάθησης	Λειτουργία μνήμης μάθησης και προσοχής
Αυτοκτονική διάθεση/αυτοκτονία	Δεν είναι δυνατή
Άγχος	Αγχώδης συμπεριφορά/ Σκοτοτακτισμός/ Θιγμόταξη
Αυξημένη δραστηριότητα HPA άξονα	Λειτουργία HPA άξονα

Πίνακας 1: Αντιστοιχία διαγνωστικών με πειραματική προσέγγιση

Καθεμιά από τις πειραματικές προσεγγίσεις του πίνακα 1 αποτελεί τη σύλληψη πίσω από τη διαμόρφωση ενός πειραματικού μοντέλου. Πριν προχωρήσουμε στην ταξινόμηση των μοντέλων και την ανάλυση όσων απασχολούν την παρούσα εργασία, θα πρέπει να εισαγάγουμε τα 3 βασικά κριτήρια που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση αυτών (Wong and Licinio, 2004).

1. Η **προβλεπτική ισχύς** (predictive validity): Εξαρτάται από την ικανότητα του μοντέλου να ανιχνεύει ουσίες με αντικαταθλιπτικές ιδιότητες. Η δυνατότητα διάκρισης των ουσιών που πραγματικά θα μπορέσουν να εμφανίσουν κλινική αντικαταθλιπτική δράση έχει εξέχουσα σημασία και πολλά πειραματικά μοντέλα είναι προσανατολισμένα σε αυτή την κατεύθυνση. Αξίζει να αναφερθεί ότι προκειμένου να θεωρηθεί ότι ένα μοντέλο εμφανίζει ικανοποιητική προβλεπτική ισχύ, θα πρέπει να μπορεί να διακρίνει τα αντικαταθλιπτικά ταχείας δράσης (fast-acting) και τα κλασικά τα οποία απαιτούν το πέρασ εβδομάδων προκειμένου να είναι αποτελεσματικά κατά την κλινική πράξη.
2. Η **φαινομενολογική ομοιότητα** (face validity): Αφορά την εκτίμηση της ομοιότητας/αντιστοίχισης του πειραματικού μοντέλου με την κλινική παρατήρηση/κατάσταση ενδιαφέροντος.
3. Η **θεωρητική λογική** (construct validity): Αναφέρεται στη σχέση του με τους μηχανισμούς πρόκλησης της νόσου ή με το εγγενές υπόστρωμα της νόσου. Στα μοντέλα κατάθλιψης η θεωρητική λογική είναι δύσκολο να εκτιμηθεί καθώς οι μηχανισμοί πρόκλησης της νόσου είναι μερικώς μόνο κατανοητοί.



Εικόνα 7: Γραφική απεικόνιση μιας συλλογιστικής κατηγοριοποίησης των πειραματικών μοντέλων για την προσέγγιση της κατάθλιψης (Planchez et al., 2019).

Τα πειραματικά μοντέλα για την προσέγγιση της κατάθλιψης, σχετικών ενδοφαινότυπων και καταθλιπτικόμορφων συμπεριφορών μπορούν να ταξινομηθούν λειτουργικά βάσει των δεδομένων που στοχεύουν να αντλήσουν για τη νόσο ή/και για υπό εξέταση θεραπευτικές επεμβάσεις:

- **Μηχανιστικά μοντέλα:** Παρέχουν εύκολα μετρήσιμους δείκτες (συμπεριφορικούς, νευροβιολογικούς, νευροχημικούς κ.ο.κ.). Οι δείκτες αυτού δε σχετίζονται απαραίτητα με τους στόχους κάποιας θεραπείας, αλλά με τις αλλαγές του νευροβιολογικού υποστρώματος της νόσου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα γενετικά μοντέλα (5-HT1A KO, serotonin transporter overexpression κλπ) (Homberg, 2011).

- Μοντέλα προσομοίωσης: Στοχεύουν στην προσομοίωση του νευροβιολογικού υποστρώματος της νόσου και τις συμπεριφορικές αποκρίσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα το μοντέλο Χρόνιου ήπιου στρες ή της μητρικής αποστέρησης.
- Μοντέλα screening: Είναι τα μοντέλα που δίνουν ενδείξεις σχετικά με την αντικαταθλιπτική δράση κάποιου χειρισμού, όπως το μοντέλο εξαναγκασμένης κολύμβησης.

Ανάλυση συγκεκριμένων μοντέλων κατάθλιψης

1. Δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης

Το μοντέλο αυτό προσεγγίζει/επιχειρεί τη συμπεριφορική αποτύπωση της εκμαθημένης απόγνωσης σε τρωκτικά και χρησιμοποιείται κυρίως για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας πιθανών αντικαταθλιπτικών ουσιών. Μεθοδολογικά βασίζεται στο ότι όταν τα τρωκτικά τοποθετούνται σε κύλινδρο με νερό αρχικά προσπαθούν να διαφύγουν με ενεργητικές συμπεριφορές (κολύμβηση, σκαρφάλωμα), ενώ αυτό είναι πρακτικά αδύνατο· σταδιακά η ένταση των προσπαθειών φθίνει και τα πειραματόζωα εμφανίζουν συμπεριφορά απελπισίας (behavioral despair), η οποία εκδηλώνεται με διαστήματα ακινησίας. Σε δεύτερη έκθεση στον κύλινδρο 24 ώρες μετά, η συμπεριφορά της ακινησίας αναπτύσσεται πολύ πιο γρήγορα και πιθανώς να αντικατοπτρίζει συμπεριφορά απελπισίας ή/και την ανάπτυξη παθητικής συμπεριφοράς που απωθεί τα πειραματόζωα από την ενεργητική αντιμετώπιση της στρεσογόνου κατάστασης. Οι προς μελέτη ουσίες χορηγούνται συνήθως στο εικοσιτετράωρο που μεσολαβεί μεταξύ των δύο κολυμβητικών συμβάντων όταν η μελέτη γίνεται σε επίμυες. Αυτό το διάστημα έκθεσης είναι αρκετό για τα εγκεκριμένα καταθλιπτικά να αναστείλουν τη συμπεριφορά που ταυτίζεται με την απελπισία, ενώ όταν μια νέα ουσία δίνει θετικά αποτελέσματα με τον ίδιο τρόπο, δίνει τις πρώτες ενδείξεις για εν δυνάμει αντικαταθλιπτική δράση (Antonioni et al., 2004; Slattery and Cryan, 2012; Kokras et al., 2015).

Το μοντέλο αυτό αποτελεί το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο εργαλείο για τη συμπεριφορική διερεύνηση πιθανών αντικαταθλιπτικών ιδιοτήτων καθώς είναι σύντομο, δεν έχει ιδιαίτερες πρακτικές δυσκολίες, παρέχει αξιόπιστα-επαναλείψιμα δεδομένα και χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα υψηλή προβλεπτική ισχύ. Η εκτεταμένη χρήση του μοντέλου είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση του ανά τα χρόνια ώστε να ανιχνεύει αξιόπιστα και τα αντικαταθλιπτικά δεύτερης γενιάς, όπως τα SSRI, ενώ η αναλυτική καταμέτρηση των επιμέρους ενεργητικών συμπεριφορών (κολύμβηση,



Εικόνα 8: Γραφική απεικόνιση της δοκιμασίας εξαναγκασμένης κολύμβησης σε επίμυες

σκαρφάλωμα, κατάδυση, head swinging) το καθιστά ικανό να διακρίνει τα κατεχολαμινεργικά από τα σεροτονεργικά αντικαταθλιπτικά. Η διάκριση αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι η πρώτη κατηγορία αντικαταθλιπτικών μειώνουν την ακινησία αυξάνοντας τη συμπεριφορά σκαρφαλώματος, ενώ τα SSRI αυξάνουν τη συμπεριφορά της κολύμβησης (Kellihier et al., 2003). Με αυτόν τον τρόπο μάλιστα η δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης μπορεί να παρέχει δεδομένα σχετικά με το νευροβιολογικό μηχανισμό δράσης μια νέας/υπό διερεύνηση ουσίας (Slattery et al., 2005).

Είναι σημαντικό να σχολιαστεί ότι έχει προταθεί πως η συμπεριφορά ακινησίας δε σχετίζεται απαραίτητα με συμπεριφορά απελπισίας προσομοιώνοντας το συναίσθημα της απελπισίας που απαντάται στην κατάθλιψη. Υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η συμπεριφορά ακινησίας αποτελεί προσαρμοστικό μηχανισμό η οποία επιτρέπει στο πειραματόζωο να διατηρεί την ενέργεια του αφού καταλάβει ότι οι προσπάθειες διαφυγής δεν πρόκειται να επιτύχουν. Η πιθανότητα να είναι ρεαλιστική αυτή η ερμηνεία αποτελεί μειονέκτημα της μεθόδου, [αν και έρχεται σε αντίθεση με τη γενικότερη αξίωση ότι η κατάθλιψη συνοδεύεται από γνωστικές δυσλειτουργίες οι οποίες αντιμετωπίζονται από τις αντικαταθλιπτικές θεραπείες/αντικαταθλιπτικά φάρμακα]. Ένα ακόμη μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι η οξεία χορήγηση αντικαταθλιπτικών μειώνει τη συμπεριφορά ακινησίας, ενώ στην κλινική πράξη τα αντικαταθλιπτικά εμφανίζουν θεραπευτικό αποτέλεσμα εβδομάδες μετά την έναρξη των χορηγήσεων. Ωστόσο, έχει δειχθεί ότι σε μικρότερες δόσεις τα αντικαταθλιπτικά απαιτούν αντίστοιχα μεγάλο διάστημα για να εμφανίσουν αντικαταθλιπτικό αποτέλεσμα. Παρ' όλα αυτά, το συγκεκριμένο μειονέκτημα σχετίζεται με την περιορισμένη φαινομενολογική ομοιότητα και θεωρητική λογική

του μοντέλου καθώς διαμορφώνει/αναπτύσσει έναν ενδοφαινότυπο απελπισίας μέσα σε ώρες, ενώ η κατάθλιψη είναι μια πολυπαραγοντική νόσος που αναπτύσσεται σε βάθος χρόνου και σε πολλαπλά επίπεδα.

Ένα λεπτό σημείο στη χρήση του μοντέλου για την αξιολόγηση νέων ουσιών αποτελεί το γεγονός ότι ενώ παρουσιάζει καλή εκλεκτικότητα στα αντικαταθλιπτικά φάρμακα, σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να παρουσιάσει false positive για ουσίες που δρουν ως διεγερτικά του ΚΝΣ. Γι' αυτό το λόγο συνηθίζεται σε περιπτώσεις νέων ουσιών να εξετάζεται παράλληλα με τη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης, και η γενικότερη κατάσταση διέγερσης/κινητικότητα του πειραματόζωου μέσω της δοκιμασίας ανοικτού πεδίου, ώστε να αποδοθεί η ακριβέστερη δυνατή ερμηνεία στη μειωμένη συμπεριφορά ακινησίας.

1.6. Κανναβιδιόλη σε πειραματικά πρότυπα κατάθλιψης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η CBD μέσω της δράσης της στους 5HT_{1A} υποδοχείς της σεροτονίνης έχει συνδεθεί με τις αγχολυτικές της ιδιότητες. Παράλληλα οι 1A έχουν συνδεθεί με τη δράση των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (Savitz et al., 2009) -όπως μάλιστα αναλύθηκε και κατά τη φαρμακοδυναμική ανάλυση της φλουοξετίνης-. Στο πλαίσιο αυτό διαμορφώνεται η υπόθεση ότι η κανναβιδιόλη πιθανώς να εμφανίζει αντικαταθλιπτικές ιδιότητες και πράγματι, υπάρχουν μελέτες που την υποστηρίζουν. Τα περισσότερα δεδομένα προέρχονται από την ερευνητική ομάδα των F. Guimarães και S. Joca με μελέτες κυρίως πάνω σε μύες που δείχνουν ότι οξεία χορήγηση κανναβιδιόλης μειώνει τη συμπεριφορά ακινησίας στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης (βλ. Πίνακα 2). Επιπροσθέτως έχουν υποστηρίξει ότι η δράση αυτή της κανναβιδιόλης εξαρτάται από τη δράση της στους 1A υποδοχείς της σεροτονίνης (Zanelati et al., 2010), ενδεχομένως να μεσολαβείται από σηματοδοτικό μονοπάτι BDNF-TrkB-mTOR στον υπόκαμπο (Sartim et al., 2018), ενώ συνδέεται με αύξηση της δενδριτικής πυκνότητας και αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης πρωτεϊνών της σύναψης όπως η συναπτοφυσίνη και η PSD-95 (Sales et al., 2019). Σε πιο πρόσφατη μελέτη σε μύες οι (Sales et al (2021) συσχέτισαν τις επιδράσεις της CBD στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης με αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA σε φλοιό και υπόκαμπο. Σε μια ενδιαφέρουσα εργασία οι Sartim et al (2016) έδειξαν ότι η ενδοεγκεφαλική χορήγηση του φυτοκανναβινοειδούς σε πυρήνες του έσω προμετωπιαίου φλοιού (medial prefrontal cortex - mPFC) παρουσιάζει αντικαταθλιπτική επίδραση στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης.

Συγκεντρωτικά οι παραπάνω μελέτες συγκλίνουν στην αντικαταθλιπτική δράση της CBD κυρίως στους μύες παρουσιάζοντας όμως ασυνέπεια σχετικά με τις δόσεις της CBD που επιτυγχάνουν να μειώσουν τη συμπεριφορά ακινησίας, ενώ οι εργασίες σε επίμυες είναι πολύ λιγότερες, συγκλίνουν ως προς το αποτέλεσμα, αλλά παραδόξως εξετάζουν υψηλότερες δοσολογίες (βλ. πίνακα 2). Μερικές ακόμη εργασίες από άλλες ερευνητικές

ομάδες συμπλέουν στο γενικότερο πλαίσιο και ειδικότερα προσθέτουν ότι η CBD όταν χορηγηθεί χρονίως σε γένη πειραματοζώων που παρουσιάζουν εκ φύσεως καταθλιπτικόμορφη συμπεριφορά [Flinders sensitive line (FSL), Filders resistant line (FSR), Wistar Kyoto rats (WKY)], έχουν επίσης ευεργετικά αποτελέσματα στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης (de Morais et al., 2018; Sales et al., 2018; Shbiro et al., 2019). Η CBD φαίνεται να εμφανίζει αντικαταθλιπτικές ιδιότητες σύμφωνα με τη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης ωστόσο χρειάζονται επιπλέον μελέτες για να διασαφηνιστούν οι συνθήκες στις οποίες συγκεκριμένα δοσολογικά σχήματα CBD αποδίδουν αυτό το αποτέλεσμα με επαναληψιμότητα και να διαλευκανθούν οι υποκείμενοι νευροβιολογικοί μηχανισμοί.

Ο καθορισμός των αποτελεσματικών δοσολογικών σχημάτων CBD θα αποτελέσει έναυσμα για την ερευνητική προσέγγιση της πιθανής συνέργειας με γνωστά αντικαταθλιπτικά αντικαταθλιπτικών με σκοπό την επιθυμητή θεραπευτική παρέμβαση με τις λιγότερες παρενέργειες.

Authors	Subjects	Dosage	Affected markers – potential MoA	Effective dose
(Zanelati et al., 2010) Br J Pharmacol	Male Swiss mice	3, 10, 30, 100 mg/kg acute	5HT _{1A} agonism	30
(El-Alfy et al., 2010) Pharmacol, Biochem and Behav	Male Swiss Webster mice	20, 100, 200 mg/kg acute	-	200
(Réus et al., 2011) Acta Neuropsychopharmacologia	Male Wistar rats	15, 30, 60 mg/kg acute or for 14 d	-	30 acute and chronic
(Sartim et al., 2016) Beh Brain Res	Male Wistar rats	Stereotaxic: intra-IL or intra-PL	CB1, 5HT _{1A} activation	Both regions
(Sartim et al., 2018) J Psychopharmacol	Male Swiss mice	Intra-Hipp or systemic 10 mg/kg	BDNF-TrkB-mTOR signaling	Stereotaxic, 10 mg/kg
(Sales et al., 2018) Progr Neuropsychopharm Biol Psych	Male Swiss mice	3, 7, 10 mg/kg	Increased serotonin	10 mg/kg

(de Morais et al., 2018) Neurosci Letters	Male Wistar rats	Single (acute) or 3 doses of 30 mg/kg	-	30 mg/kg acute or subchronic
(Xu et al., 2019) Environ Toxicol Pharmacol	Male ICR mice after CMS	10 mg/kg i.v. and 10, 100 mg/kg p.o.	Prefrontal and Hipp: BDNF and Synaptophysin	10 i.v. and 100 p.o.
(Shbiro et al., 2019) Physiol Behav	Male Wistar. WKY and FSL	Acute oral 30mg/kg	-	30 mg/kg worked only in WKY and FSL
(Sales et al., 2019) Mol Neurobiology	Male Swiss mice Male SD rats, FSL, FRL	7, 10, 30 mg/kg 10, 30 mg/kg	Synaptophysin and PSD-95 PFC, BDNF (PFC, HIPPI), spine density (mPFC). BDNF-TrkB signalling	10 (30 min or 7 days later) 30 (SD)
(Sales et al., 2020) Beh Brain Res	Male Swiss mice	3, 7, 10 mg/kg	global DNA methylation in the PFC and HPC	10 mg/kg
(Abame et al., 2021) Neurosci Letters	male C57BL/6 J mice	10, 30, 100 mg/kg for 7 days	Increased 5-HT, Noradrenaline levels. NF-κB at Hipp.	100 mg/kg
(Mori et al., 2021) Eur J Neuroscience	male C57BL/6 J mice	10 mg/kg for 3 days	No for FST	10

Πίνακας 2: Οι εργασίες που μελετούν την κανναβιδιόλη στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης μέχρι και Φεβρουάριο του 2021

2. ΣΚΟΠΟΣ

Λαμβάνοντας υπόψη τα ανοικτά ερωτήματα που προκύπτουν σχετικά με τις αντικαταθλιπτικές ιδιότητες της CBD, η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στο να συνεισφέρει στην περαιτέρω κατανόηση αυτών αλλά και στην αναζήτηση μεθόδων αξιοποίησής τους. Παράλληλα, λαμβάνοντας υπόψη και το ασφαλές προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών που παρουσιάζει η CBD σε συνδυασμό με τους υφιστάμενους περιορισμούς στη χρήση των υπάρχοντων αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στη διερεύνηση πιθανής συνέργειας της κανναβιδιόλης με ένα κλασικό αντικαταθλιπτικό που ανήκει στους εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης, τη φλουοξετίνη και με ένα αντικαταθλιπτικό ταχείας δράσης, την κεταμίνη. Οι πειραματικές διαδικασίες υλοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα δοσολογικά σχήματα κατά τη δοκιμασία της εξαναγκασμένης χορήγησης, ενώ παράλληλα εξετάσθηκε η επίδραση των συγκεκριμένων σχημάτων στην κινητικότητα χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία του ανοικτού πεδίου.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η CBD εμφανίζει και αγχολυτικές ιδιότητες, οι οποίες έχουν μελετηθεί σε πειραματικά πρότυπα αγχωδών διαταραχών (Blessing et al., 2015; Elsaid et al., 2019; Paragianni and Stevenson, 2019), καταγράφηκαν και οι αγχολυτικές ιδιότητες της CBD σε αντίστοιχα δοσολογικά σχήματα χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία ανοικτού πεδίου και τη δοκιμασία υπερυψωμένου λαβυρίνθου σε σχήμα σταυρού σε ενήλικες επίμυες.

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1. Πειραματόζωα

Στην παρούσα μελέτη Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί ενήλικες επίμυες του στελέχους Sprague-Dawley. Τα πειραματόζωα αναπαράχθηκαν και διατηρήθηκαν στο εκτροφείο πειραματοζώων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Έπειτα από τον απογαλακτισμό τους τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς κλωβούς διαστάσεων 42.5 x 26.6 x 15.5 cm, ανά δύο, με ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή, σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 21°C ±2°C και υγρασίας και με ημερήσιο κύκλο ημέρας/νύχτας 12 ωρών (έναρξη της φωτεινής περιόδου στις 07.00 πμ.).

Όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα που αφορούσαν τον χειρισμό των ζώων πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις ευρωπαϊκές οδηγίες για τη φροντίδα και τη χρήση των πειραματόζωων (EEC Council 86/609; 27/01/1992, No 116) και οι πειραματικές διαδικασίες σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν η ταλαιπωρία και ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων πειραματόζωων, βάσει των κατευθυντηρίων γραμμών της FELASA (Guillen, 2012). Οι επίμυες υποβάλλονταν σε διαδικασία εξοικείωσης με τον πειραματιστή, ενώ πριν από κάθε πειραματικό χειρισμό υποβάλλονταν σε διαδικασία εξοικείωσης με το χώρο διεξαγωγής των πειραμάτων.

2.2 Φάρμακα

Κανναβιδιόλη: Η CBD (>99%) απομονώθηκε από *C. sativa* inflorescences από την ερευνητική ομάδα του κου Λέανδρου Σκαλτσούνη, Καθηγητή Φαρμακογνωσίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ, μέσω μεθοδολογιών που έχουν ήδη περιγραφεί (Brakatselos et al., 2021; Tzimas et al., 2021). Το τελικό προϊόν διαλύθηκε σε διάλυμα εκδόχου που περιείχε 5% διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO, Sigma) 5% Cremophor EL (Sigma) και 90% φυσιολογικό ορό σε συγκέντρωση 3 mg/mL.

Κεταμίνη: Υδροχλωρική κεταμίνη προερχόμενη από σκεύασμα που προορίζεται για κτηνιατρική χρήση (Ketamidol®) αραιώθηκε σε διάλυμα φυσιολογικού ορού σε συγκέντρωση 3 mg/mL.

Φλουοξετίνη: Υδροχλωρική φλουοξετίνη (>99.8% -Heip pharmaceuticals) διαλύθηκε σε διάλυμα φυσιολογικού ορού στη συγκέντρωση 5 mg/mL.

Όλα τα διαλύματα παρασκευάστηκαν την ίδια μέρα που χορηγήθηκαν. Όλες οι χορηγήσεις πραγματοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις (i.p.).

2.3 Πειραματική διαδικασία:

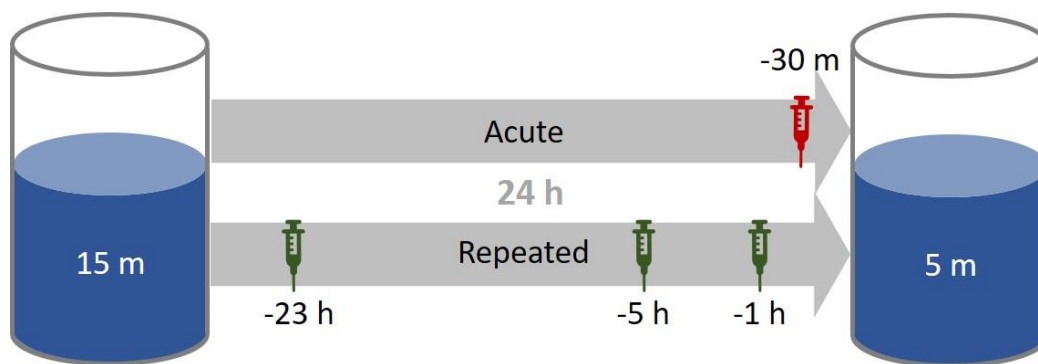
A. Δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης

Ενήλικες αρσενικοί επίμυες ($n=71$) κατανεμήθηκαν με τυχαία επιλογή στις επιμέρους πειραματικές υποομάδες για τη διερεύνηση των επιδράσεων των υπό εξέταση. Κάθε πειραματική υποομάδα υποβλήθηκε σε δύο δοκιμασίες κολύμβησης διάρκειας 15 και 5 λεπτών αντίστοιχα, με την ενδιάμεση μεσολάβηση 24 ωρών. Τα πειραματόζωα ήταν πάντα εξοικειωμένα με τον πειραματικό χώρο και το χειριστή πριν την εκκίνηση των πειραματικών διαδικασιών.

Τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν διαδοχικά σε κύλινδρο κατασκευασμένο από διάφανο πλαστικό (ύψους 60 και διαμέτρου 38 εκατοστών) ο οποίος περιείχε νερό βρύσης (25 ± 1) όπου η στάθμη του έφτανε τα 40 cm και αλλαζόταν μετά από την έξοδο κάθε πειραματοζώου. Μετά το πέρας των 15 λεπτών, το πειραματόζωο τοποθετούταν σε χωριστό κλωβό όπου στέγνωνε με τη χρήση πετσέτας και ζεστού αέρα. Όταν το πειραματόζωο ήταν πλέον στεγνό, επιστρέφονταν στον κλωβό του. Εικοσι-τέσσερις ώρες μετά την πρώτη διαδικασία κολύμβησης τα πειραματόζωα τοποθετούνταν ξανά στον κύλινδρο για το δεύτερο επεισόδιο κολύμβησης, διάρκειας 5 λεπτών όπου η συμπεριφορά του υφίστατο καταγραφή με κάμερα και η επίδοση του πειραματοζώου αξιολογήθηκε από πειραματιστή σε ζωντανό χρόνο με τη χρήση Η/Υ και του προγράμματος Kinoscope (Kokras et al., 2017).

Οι επιμέρους συμπεριφορές των πειραματοζώων καταγράφηκαν ως προς τη συχνότητα και τη συνολική διάρκεια και ήταν οι εξής (ως προς τη διάρκεια, με την εξαίρεση τη συμπεριφορά τινάγματος κεφαλής όπου καταγράφηκε η συχνότητα:

- Σκαρφάλωμα (Climbing): Το πειραματόζωο προσπαθεί να σκαρφαλώσει στα τοιχώματα του κυλίνδρου χρησιμοποιώντας τα 2 μπροστινά ή και τα 4 πόδια.
- Κολύμβηση (Swimming): Κινήσεις ενεργούς κολύμβησης.
- Επίπλευση (Floating): Ακινησία ή μικρές κινήσεις ενός εκ των 2 μπροστινών άκρων για την αποφυγή βυθίσματος.
- Κατάδυση (Diving): Το πειραματόζωο βυθίζεται μέσα στο νερό με το κεφάλι και κολυμπάει έως τον πυθμένα του κυλίνδρου.
- Τίναγμα κεφαλής (Head Swinging): Το πειραματόζωο τινάζει το κεφάλι του με απότομη κίνηση ενώ αυτό είναι πάνω από την επιφάνεια του νερού.



Εικόνα 9: Συνοπτικό σχεδιάγραμμα του σχεδιασμού της δοκιμασίας εξαναγκασμένης κολύμβησης

A.i. Διερεύνηση της αντικαταθλιπτικής δράσης της CBD στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης

Η χορήγηση CBD (3, 10 mg/kg i.p.) ή εκδόχου πραγματοποιήθηκε σε 3 χρονικά σημεία ανάμεσα στις 2 δοκιμασίες κολύμβησης: (23, 5 και 1 ώρα πριν τη δεύτερη συνεδρία, υποξεία χορήγηση). Ακολούθως η συμπεριφορά καταγράφηκε για διάρκεια 5 λεπτών όπως περιεγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο.

A.ii. Διερεύνηση πιθανής συνέργειας της CBD με την κεταμίνη στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης

Μελέτη της οξείας χορήγησης CBD και οξείας χορήγησης κεταμίνης με σκοπό τη διερεύνηση πιθανής συνέργειας ως προς την αντικαταθλιπτική δράση ταχείας δράσης. Η χορήγηση της CBD (3 mg/kg, i.p.) πραγματοποιήθηκε 1 ώρα πριν τη 2^η συνεδρία κολύμβησης. Η χορήγηση κεταμίνης (3 mg/kg, i.p.) πραγματοποιήθηκε μισή ώρα πριν τη 2^η συνεδρία κολύμβησης.

A.iii. Διερεύνηση της πιθανής συνέργειας της CBD με τη φλουοξετίνη στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης.

Η χορήγηση CBD (3 mg/kg i.p.) ή εκδόχου πραγματοποιήθηκε σε 3 χρονικά σημεία ανάμεσα στις 2 δοκιμασίες κολύμβησης: (23, 5 και 1 ώρα πριν τη δεύτερη συνεδρία). Η χορήγηση της φλουοξετίνης (5, mg/kg i.p.) πραγματοποιήθηκε στο ίδιο χρονικό πρότυπο (23, 5 και 1 ώρα πριν τη δεύτερη συνεδρία).

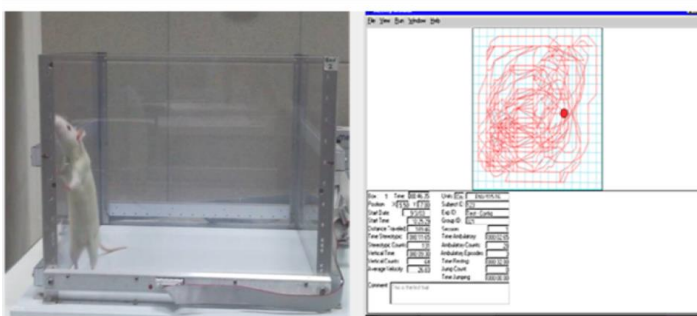
Οι δόσεις της κεταμίνης και της φλουοξετίνης που χρησιμοποιήθηκαν στις 2 ανωτέρω υποπαραγράφους επιλέχθηκαν βάσει προκαταρκτικών πειραμάτων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας οι υποαποτελεσματικές δόσεις καθορίστηκαν για την χορήγηση κεταμίνης: 3mg/kg και φλουοξετίνης: 5mg/kg, ενώ εξετάσθηκε και η

υψηλότερη δόση (10mg/kg, i.p.) η οποία έδειξε αντικαταθλιπτική δράση και για τις δύο χορηγήσεις (κεταμίνης, φλουοξετίνης κατά τη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης.

B. Δοκιμασία ανοικτού πεδίου σε εξοικειωμένου επίμυες

Ο προσδιορισμός και η καταγραφή παραμέτρων της κινητικής συμπεριφοράς των πειραματόζων είναι ένας δείκτης ο οποίος παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την αμυγή κινητικότητα του ζώου, την εξερευνητικότητα και την εσωτερική διεγερσιμότητα-κινητοποίηση (emotionality) (Polissidis et al., 2014; Brakatselos et al., 2021; Roulia et al., 2021). Όταν οι παράμετροι αυτοί επηρεάζονται λόγω κάποιου πειραματικού χειρισμού, όπως η χορήγηση ψυχοδραστικών ουσιών, οι υφιστάμενες αλλαγές αποτυπώνονται και στη μεταβολή της κινητικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της υπερδραστηριότητας που προκαλείται στα πειραματόζωα μέσω της χορήγησης ψυχοδιεγερτικών και ο χαρακτηρισμός του ως πειραματική προσέγγιση ψύχωσης, αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα της σημασίας της μελέτης της κινητικής συμπεριφοράς. Γενικότερα έχει βρεθεί ότι ευφοριογόνες ουσίες προκαλούν κινητική διέγερση σε πειραματόζωα (Antonίου et al., 2004; Polissidis et al., 2014), ενώ όπως προαναφέρθηκε η χορήγηση υψηλών δόσεων κανναβινοειδών επιδρά κατ' αντίθετο τρόπο στην κινητικότητα των πειραματοζώων (Galanopoulos et al., 2014).

Μια εκ των ευρύτερα χρησιμοποιημένων μεθόδων μέτρησης της κινητικότητας είναι η δοκιμασία ανοικτού πεδίου (open field test, OFT). Η πειραματική συσκευή (Εικόνα 10) περιλαμβάνει έναν κλωβό με διαφανή τοιχώματα κατασκευασμένα από Plexiglas, διαστάσεων 40x40x40cm, ανοιχτό από επάνω και εξοπλισμένο με οριζόντιες και κάθετες συστοιχίες 16 φωτοκυττάρων, καθώς επίσης και μια ηλεκτρική μονάδα καταγραφής (ENV515, Activity Monitor, version 5, Med Associates) η οποία είναι συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η κίνηση των πειραματόζων καταγράφεται αυτόματα στο σύστημα λόγω διακοπής των δεσμίδων φωτός των φωτοκυττάρων και οι τιμές των υπό μελέτη παραμέτρων κινητικότητας αποθηκεύονται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.



Εικόνα 10: Η πειραματική συσκευή για τη δοκιμασία ανοικτού πεδίου (Med Associates inc.)

Καταγραφή κινητικής δραστηριότητας

Η καταγραφή της κινητικής δραστηριότητας είχε διάρκεια μιας ώρας. Τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν στον κλωβό 30 λεπτά πριν την χορήγηση των ουσιών και την έναρξη της καταγραφής ώστε να εγκλιματιστούν με αυτόν. Η εξοικείωση με τον κλωβό κινητικότητας (habituation) έχει μεγάλη σημασία για την αξιολόγηση κεντρικών διεγερτικών δράσεων στις παραμέτρους της κινητικότητας, καθώς η συμπεριφορά των μη-εξοικειωμένων πειραματόζωων κατά την έκθεση τους σε ένα άγνωστο περιβάλλον μπορεί να συγκαλύψει την αύξηση της κινητικής (Brakatselos et al., 2021; Poulia et al., 2021).

Οι παράμετροι που καταγράφονται στην OFT είναι η οριζόντια κινητικότητα εκφρασμένη ως διανυθείσα απόσταση, ως διάρκεια και ως συχνότητα εμφάνισης (ambulatory distance, ambulatory time και ambulatory counts, αντίστοιχα) και η κάθετη κινητικότητα, εκφρασμένη βάσει της διάρκειάς και της συχνότητας εμφάνισης (vertical time και vertical counts, αντίστοιχα). Με το πέρας της διαδικασίας της καταγραφής, η οποία διαρκούσε μια ώρα, τα ζώα τοποθετούνταν πίσω στο κλωβό τους.

B.i. Αξιολόγηση πιθανής διεγερτικής επίδρασης της CBD κανναβιδιόλης στην κινητικότητα εξοικειωμένων επιμύων.

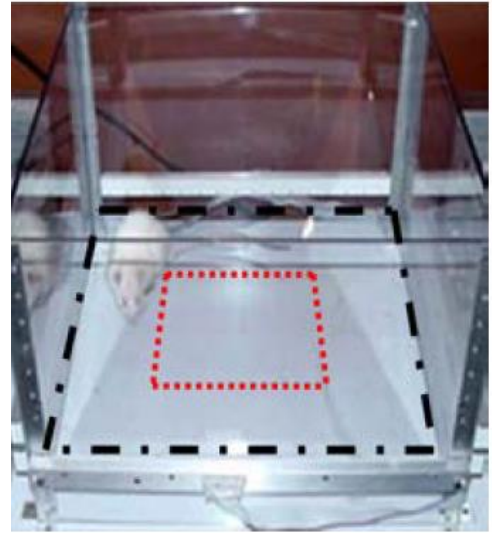
Οι υπό διερεύνηση ουσίες χορηγήθηκαν σε πειραματικές ομάδες που σχηματίστηκαν κατ' αντιστοιχία με τη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης, και συγκεκριμένα με την ενότητα A.i., με τη διαφορά ότι οι χορηγήσεις πραγματοποιήθηκαν 23, 5 και 1 ώρες πριν την έναρξη της καταγραφής της κινητικής δραστηριότητας. Επιπροσθέτως διερευνήθηκε και η οξεία χορήγηση 3 mg/kg CBD 1 ώρα πριν την έναρξη της καταγραφής κατά αντιστοιχία με την A.ii.

Γ. Καταγραφή κινητικότητας σε μη-εξοικειωμένους επίμους

Η μελέτη δεικτών κινητικότητας που σχετίζονται με αγχώδη συμπεριφορά στο ανοικτό πεδίο πραγματοποιήθηκε σε μη εξοικειωμένους επίμους, ώστε η αυθόρμητη απόκριση στο νέο περιβάλλον να τους καθιστά πιο δραστήριους (Brakatselos et al., 2021). Η διάρκεια της καταγραφής ήταν 15 λεπτά, ενώ οι παράμετροι που αξιολογήθηκαν ήταν ο χρόνος παραμονής στο κέντρο του κλωβού κινητικότητας και η θιγμοταξία (thigmotaxis) των πειραματόζωων που προκύπτει από το πηλίκο της διανυθείσας απόστασης στο κέντρο του κλωβού δια την συνολική διανυθείσα απόσταση.

Γ.ι. Διερεύνηση της επίδρασης της κανναβιδιόλης σε δείκτες αγχώδους συμπεριφοράς στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου

Η χορήγηση της CBD (1, 3, 10 mg/kg i.p.) ή του εκδόχου πραγματοποιήθηκε 20 λεπτά πριν την εισαγωγή των πειραματόζων στον κλωβό του ανοικτού πεδίου και την ταυτόχρονη έναρξη της καταγραφής, η οποία διήρκεσε 15 λεπτά, ακολουθώντας πρωτόκολλα που έχουν ήδη περιγραφεί (Brakatselos et al., 2021).



Εικόνα 11: Ένας επίμυς στο ανοικτό πεδίο με ενδεικτικά σχεδιασμένη την περιοχή που ορίζεται ως κέντρο της αρένας

Δ. Δοκιμασία υπερυψωμένου λαβυρίνθου σε σχήμα σταυρού.

Η δοκιμασία του υπερυψωμένου λαβυρίνθου σχήματος σταυρού (Elevated plus maze, EPM) θεωρείται αξιόπιστη εκτίμηση των επιπέδων άγχους τρωκτικών. Η μετακίνηση και παραμονή του πειραματόζωου στα ανοικτά άκρα αποτελεί ένδειξη έλλειψης άγχους, ενώ η αυξημένη διάρκεια παραμονής στα κλειστά άκρα αποτελεί ένδειξη αγχώδους συμπεριφοράς. Το μοντέλο εμφανίζει υψηλή προβλεπτική αξία καθώς τα αγχολυτικά φάρμακα, όπως η διαζεπάμη, αυξάνουν τη συχνότητα εισόδου και τη διάρκεια παραμονής των πειραματόζων στα ανοικτά άκρα του λαβυρίνθου (Nestler and Hyman, 2010; Elsaid et al., 2019).

Για τις ανάγκες του παρόντος πρωτοκόλλου τα πειραματόζωα εγκλιματίστηκαν στο θάλαμο που πραγματοποιήθηκε το πείραμα για τρεις συνεχόμενες ημέρες σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού. Την 4^η ημέρα τα πειραματόζωα εισήχθησαν στον πειραματικό χώρο 1 ώρα πριν την τοποθέτησή τους στο λαβύρινθο. Ο λαβύρινθος βρισκόταν υπερυψωμένος 50 cm πάνω από το έδαφος, και αποτελούνταν από 2 ανοικτούς και 2 κλειστούς βραχίονες με διαστάσεις 50x10 cm. Το ύψος των τοιχωμάτων των κλειστών λαβυρίνθων ήταν 50 cm. Οι 4 βραχίονες συνέκλιναν στο κέντρο της διάταξης το οποίο είχε πλευρά το πλάτος του κάθε βραχίονα (10 cm).

Κατά τη δοκιμασία ο πειραματιστής τοποθετούσε το πειραματόζωο στο κέντρο του λαβυρίνθου έτσι ώστε το κεφάλι του πειραματόζωου να βρίσκεται ακριβώς στο κέντρο και στραμμένο προς έναν ανοικτό βραχίονα. Το ζώο παρέμενε στο λαβύρινθο για διάστημα 5 λεπτών και παράλληλα καταγράφηκε η συμπεριφορά μέσω Η/Υ και του προγράμματος Kinoscope (Kokras et al., 2017).

Οι συμπεριφορές που κατεγράφησαν και αξιολογήθηκαν ήταν η συχνότητα εισόδου στους ανοικτούς βραχίονες, η συχνότητα εισόδου στους κλειστούς βραχίονες και η διάρκεια παραμονής σε ανοικτούς βραχίονες, κλειστούς βραχίονες και το κέντρο του λαβυρίνθου. Μετά την ολοκλήρωση αυτής της συμπεριφορικής δοκιμασίας, τα πειραματόζωα επέστρεφαν στα αρχικά τους κλουβιά και ο λαβύρινθος καθαριζόταν επιμελώς με μικρή ποσότητα διαλύματος αιθανόλης 70%.



Εικόνα 12: Μια ενδεικτική φωτογραφία με έναν επίμου να εξερευνά έναν ανοικτό βραχίονα ενός υπερψωμένου λαβυρίνθου

Δ.ι. Επίδραση οξείας χορήγησης CBD στη δοκιμασία υπερψωμένου λαβυρίνθου:

Τα πειραματόζωα που συμμετείχαν στην παρούσα δοκιμασία κατανεμήθηκαν τυχαία σε 3 επιμέρους υποομάδες, ανάλογα με τη δόση της CBD που θα λάμβαναν (1 mg/kg, 3 mg/kg και ομάδα ελέγχου-VEH). Η χορήγηση των φαρμάκων πραγματοποιήθηκε ενδοπεριτοναϊκά στο θάλαμο που βρισκόταν ο λαβύρινθος, 30 λεπτά πριν την εισαγωγή του πειραματοζώου σε αυτόν. Μετά την τοποθέτηση, τα πειραματόζωα παρέμεναν στο λαβύρινθο για 5 λεπτά, ενώ στο διάστημα αυτό οι δείκτες ενδιαφέροντος από τη συμπεριφοράς τους καταγράφονταν αδιάλειπτα.

4. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού στατιστικών αναλύσεων SPSS (Version 26.0, Windows OS). Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση μεταβλητότητας κατά μια διεύθυνση (one way ANOVA). Ακολούθησαν των αναλύσεων μεταβλητότητας οι απαραίτητες συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών ομάδων πειραματοζώων (Post Hoc τύπου Scheffe).

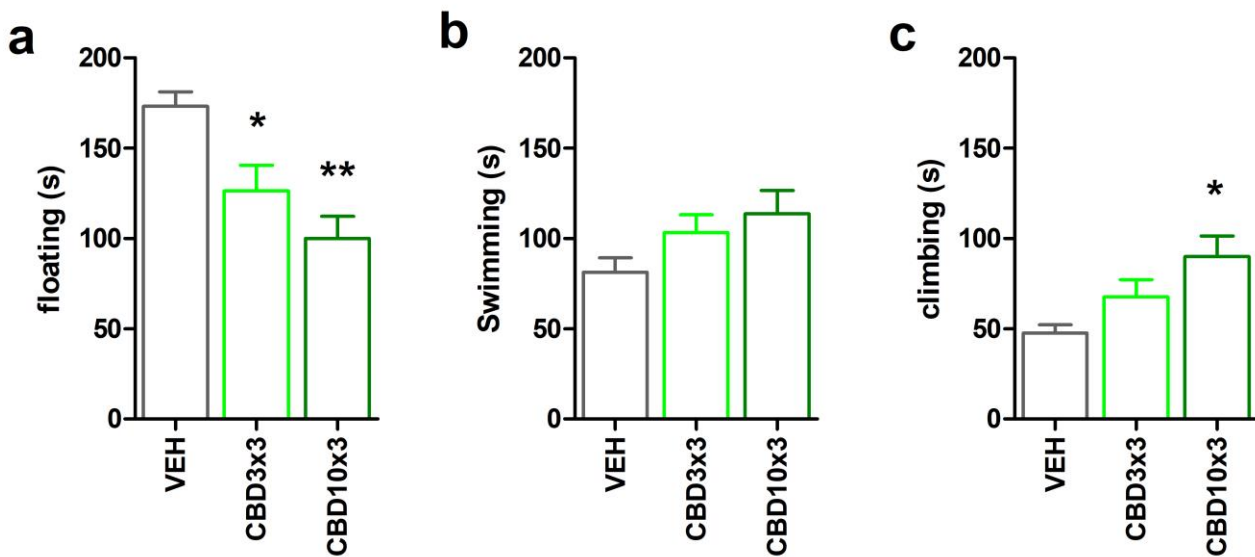
Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε αυτό του 0.05 ($p < 0.05$), ενώ όλα τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος (mean) \pm SEM (Standard Error of the Mean).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. Δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης

Αι. Διερεύνηση της αντικαταθλιπτικής δράσης της CBD στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης

Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά μια διεύθυνση (one-way ANOVA) έδειξε ότι η υποξεία χορήγηση CBD επηρεάζει τις συμπεριφορές επίπλευσης (floating) [$F_{(2,22)}=9.016$, $p=0.002$] και σκαρφαλώματος (climbing) [$F_{(2,22)}=5.261$, $p=0.015$] των επίμυων στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης. Οι ακόλουθες συγκρίσεις των επιμέρους πειραματικών ομάδων (Post Hoc tests τύπου Scheffe) έδειξαν ότι και οι δύο δόσεις της CBD (3, 10 mg/kg) μειώνουν τη συνολική διάρκεια της επίπλευσης των πειραματοζώων ($p<0.05$, $p<0.01$ αντίστοιχα), ενώ μόνο η μεγαλύτερη δόση πέτυχε στατιστικά σημαντική αύξηση της συμπεριφοράς σκαρφαλώματος ($p<0.05$). Η συμπεριφορά κολύμβησης (swimming) δεν επηρεάστηκε από τις χορηγήσεις της CBD [$F_{(2,22)}=2.453$, $p=0.113$] (Γράφημα 1).



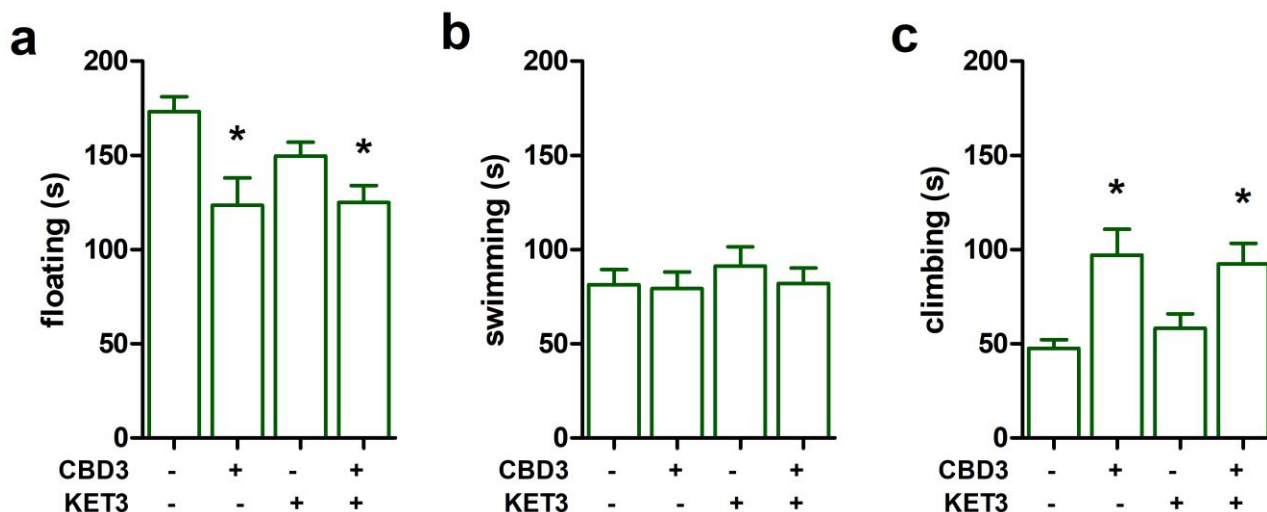
Γράφημα 1: Επίδραση της υποξείας χορήγησης κανναβιδιόλης (CBD) στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης, όπως εκφράζεται από τη συνολική διάρκεια της εμφάνισης της συμπεριφοράς a) επίπλευσης (floating) b) κολύμβησης (swimming) και c) σκαρφαλώματος (climbing). *CBD vs έκδοχο (VEH), $p<0.05$; **CBD vs VEH, $p<0.01$.

Πιλοτικές μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας πάνω στη δράση της φλουοξετίνης (FLU) και της κεταμίνης (KET) στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης έχουν δείξει ότι η χαμηλότερη δόση που εμφανίζει αξιοσημείωτο

αντικαταθλιπτικό αποτέλεσμα για την KET είναι αυτή των 10 mg/kg σε οξεία χορήγηση, ενώ για τη FLU η αντίστοιχη δόση είναι επίσης αυτή των 10 mg/kg αλλά σε υποξεία χορήγηση (3 δόσεις εντός 24 ωρών). Η δόση των 3 mg/kg KET οξέως και των 5 mg/kg FLU υποξέως δεν εμφάνισαν αντικαταθλιπτική δράση στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης και για αυτό το λόγο επιλέχθηκαν ως οι κατάλληλες δόσεις για τη μελέτη πιθανής συνέργειας της CBD με τη FLU και την KET.

A.ii. Διερεύνηση πιθανής συνέργειας της CBD με την KET στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης

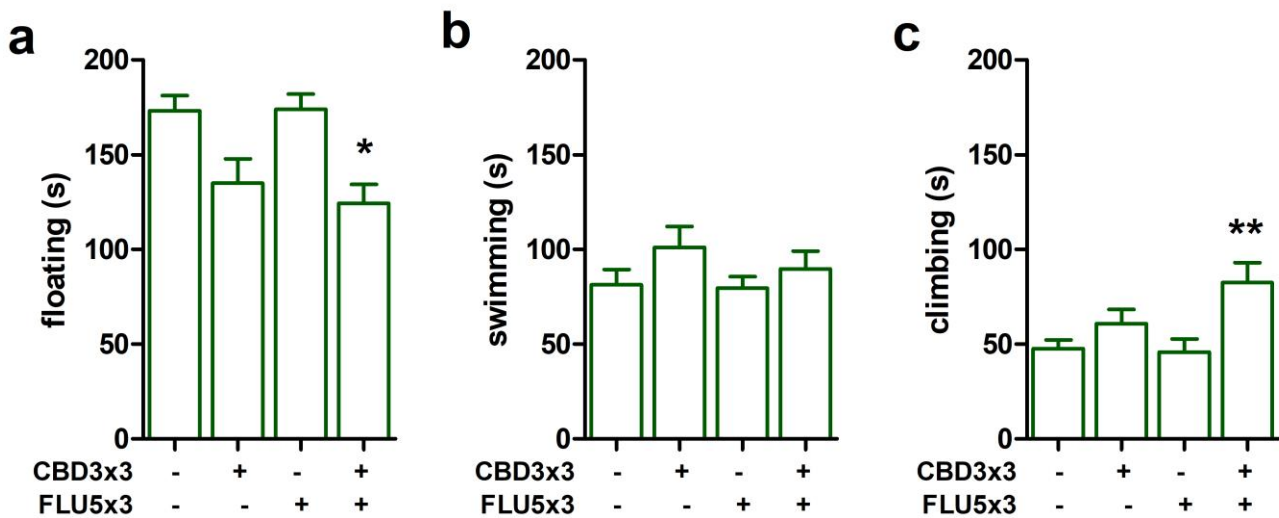
Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η χορήγηση της CBD (3 mg/kg) ή/και της KET (3 mg/kg) επηρέασαν τη συμπεριφορά επίπλευσης [$F_{(3,27)}=5.859$, $p=0.004$] και σκαρφαλώματος [$F_{(3,27)}=6.648$, $p=0.002$], αλλά όχι τη συμπεριφορά κολύμβησης [$F_{(3,27)}=0.360$, $p=0.783$] των επίμυων κατά τη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης. Ειδικότερα, τόσο η οξεία χορήγηση 3 mg/kg CBD, όσο και η συγχορήγηση της μαζί με 3 mg/kg κεταμίνης μείωσαν τη συμπεριφορά επίπλευσης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p<0.05$), ενώ αύξησαν τη συμπεριφορά σκαρφαλώματος και για τα 2 πειραματικά γκρουπ ($p<0.05$) (Γράφημα 2).



Γράφημα 2: Επίδραση της οξείας συγχορήγησης κανναβιδιόλης (CBD) με κεταμίνη (KET) στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης, όπως εκφράζεται από τη συνολική διάρκεια της εμφάνισης της συμπεριφοράς a) επίπλευσης (floating) b) κολύμβησης (swimming) και c) σκαρφαλώματος (climbing). *CBD/SAL, CBD/KET vs ομάδα ελέγχου (VEH/SAL), $p<0.05$.

A.iii. Διερεύνηση της πιθανής συνέργειας της CBD με τη FLU στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης.

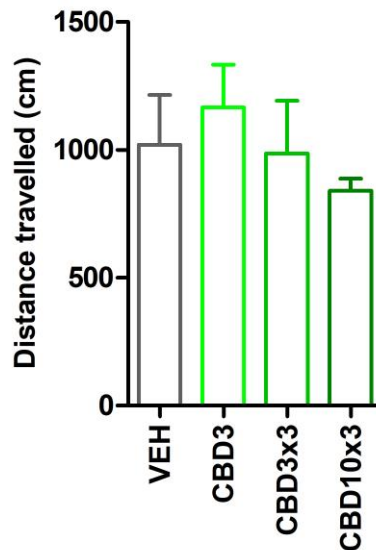
Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η χορήγηση της CBD ή/και της FLU (5 mg/kg) επηρέασαν τη συμπεριφορά επίπλευσης [$F_{(3,24)}=6,773$, $p=0.002$] και σκαρφαλώματος [$F_{(3,24)}=4,839$, $p=0.009$], αλλά όχι τη συμπεριφορά κολύμβησης [$F_{(3,24)}=1,241$, $p=0.317$] των επίμυων κατά τη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης. Συγκεκριμένα, οι ακόλουθες συγκρίσεις μεταξύ των επιμέρους πειραματικών ομάδων (Post Hoc) έδειξαν ότι η χορήγηση 3 mg/kg CBD εμφάνισε τάση για μείωση της συνολικής διάρκειας της συμπεριφοράς επίπλευσης ($p=0.085$). Η πειραματική ομάδα που έλαβε τη συγχορήγηση CBD και FLU εμφάνισε στατιστικά σημαντική μείωση της συμπεριφοράς επίπλευσης ($p<0.05$) και αύξηση στη διάρκεια εκδήλωσης της συμπεριφοράς σκαρφαλώματος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p<0.05$) (Γράφημα 3).



Γράφημα 3: Επίδραση της οξείας συγχορήγησης κανναβιδιόλης (CBD) με φλουοξετίνη (FLU) στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης, όπως εκφράζεται από τη συνολική διάρκεια της εμφάνισης της συμπεριφοράς a) επίπλευσης (floating) b) κολύμβησης (swimming) και c) σκαρφαλώματος (climbing). *CBD/φλουοξετίνη (FLU) vs ομάδα ελέγχου (VEH/SAL), $p<0.05$; **CBD/φλουοξετίνη (FLU) vs ομάδα ελέγχου (VEH/SAL), $p<0.01$.

Β.ι. Αξιολόγηση πιθανής διεγερτικής επίδρασης της CBD στην κινητικότητα εξοικειωμένων επιμύων.

Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά μια διεύθυνση δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιμέρους πειραματικών ομάδων ως προς τη διανυθείσα απόσταση στο ανοικτό πεδίο (γράφημα 4).

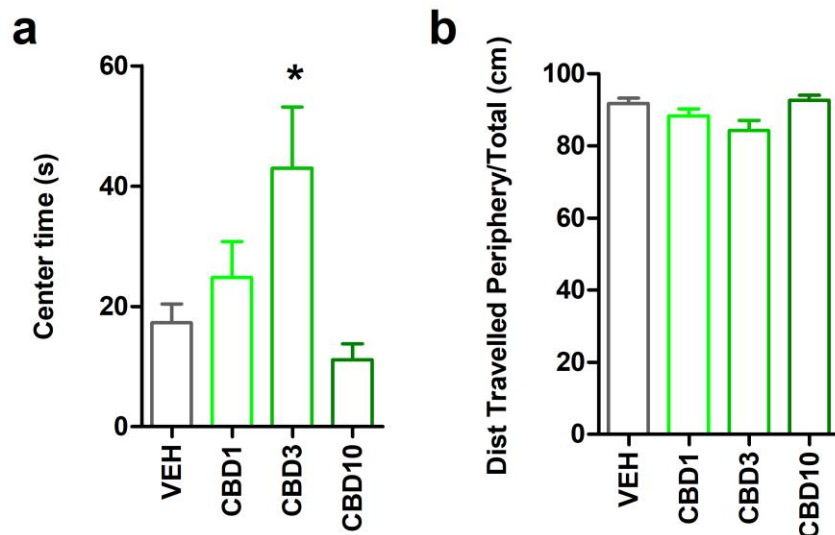


Γράφημα 4: Επίδραση της οξείας και υποξείας χορήγησης κανναβιδιόλης (CBD) στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου σε εξοικειωμένους επίμυες, όπως αντανακλάται από τη συνολική απόσταση που διένυσαν στα 60 λεπτά της καταγραφής.

Γ. Καταγραφή κινητικότητας σε εξοικειωμένους επίμυες

Γ.ι. Διερεύνηση της επίδρασης της κανναβιδιόλης σε δείκτες αγχώδους συμπεριφοράς στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η οξεία χορήγηση CBD προκάλεσε αλλαγές στο χρόνο παραμονής των πειραματόζων στο κέντρο του κλωβού της κινητικότητας [$F_{(3,27)}=7.127$, $p=0.001$] και στη θιγμότητα (διανυθείσα απόσταση στο κέντρο/συνολική διανυθείσα απόσταση) των πειραματόζων [$F_{(3,27)}=4,118$, $p=0.017$]. Ειδικότερα, τα πειραματόζωα που έλαβαν 3 mg/kg CBD εμφάνισαν αυξημένο χρόνο παραμονής στο κέντρο του κλωβού σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (VEH) ($p<0.05$), ενώ παρουσίασαν μη στατιστικά σημαντική τάση για μείωση της θιγμότητας ($p=0.091$) (γράφημα 5).

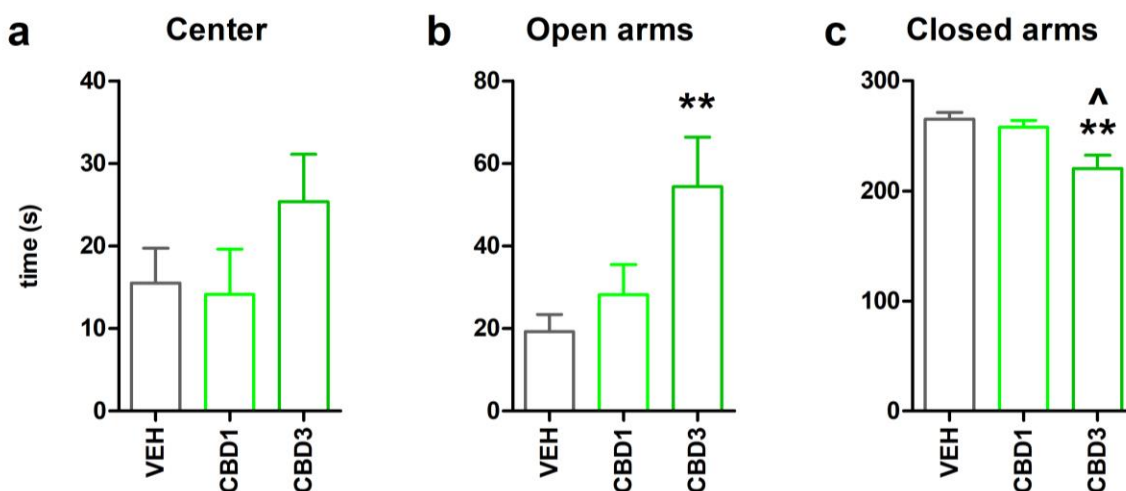


Γράφημα 5: Επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιόλης (CBD) στην αυθόρμητη δραστηριότητα επίμυων στο ανοικτό πεδίο και συγκεκριμένα a) στο συνολικό χρόνο παραμονής στο κέντρο του κλωβού και b) στη θιγμόταξη (διανυθείσα απόσταση στο κέντρο/συνολική διανυθεία απόσταση) που εμφάνισαν τα πειραματόζωα κατά τα 15 λεπτά της καταγραφής. *CBD vs έκδροχο (VEH) ($p < 0.05$).

Δ. Δοκιμασία υπερψωμένου λαβυρίνθου σε σχήμα σταυρού.

Δ.ι. Επίδραση οξείας χορήγησης CBD στη δοκιμασία υπερψωμένου λαβυρίνθου

Η χορήγηση της CBD επηρέασε το συνολικό χρόνο που οι επίμυες παρέμειναν στους ανοικτούς [$F_{(2,31)}=6,614$, $p=0.004$] και τους κλειστούς βραχίονες [$F_{(2,31)}=8,256$, $p=0.001$] του λαβυρίνθου. Ειδικότερα, οι ακόλουθες συγκριτικές αναλύσεις έδειξαν ότι η χορήγηση 3 mg/kg CBD αύξησε το χρόνο που οι επίμυες παρέμειναν στους ανοικτούς ($p < 0.01$), ενώ μείωσε το χρόνο παραμονής στους κλειστούς βραχίονες ($p < 0.01$) (γράφημα 6).



Γράφημα 6: Επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιόλης (CBD) στη δοκιμασία υπερψωμένου σταυρού σε σχήμα λαβυρίνθου (EPM) όπως εκφράζεται από τη συνολική διάρκεια της παραμονής a) στο κέντρο, b) στους ανοικτούς και c) τους κλειστούς βραχίονες του λαβυρίνθου. **CBD vs έκδροχο (VEH), $p < 0.01$; ^ΛCBD3 vs CBD1, $p < 0.05$.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται αποτελέσματα που επιβεβαιώνουν την αντικαταθλιπτική δράση της κανναβιδιόλης στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST) σε επίμυες, χρησιμοποιώντας χαμηλότερες δόσεις σε σχέση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία και παράλληλα υποστηρίζεται η δράση της ως αντικαταθλιπτικό ταχείας δράσης στο ίδιο πρότυπο. Παρουσιάζεται ακόμη η συνέργεια της αντικαταθλιπτικής δράσης του φυτοκανναβινοειδούς με τη φλουοξετίνη (εκλεκτικός αναστολέας επαναπρόσληψης σεροτονίνης), ενώ παρατηρείται η απουσία συνέργειας με την κεταμίνη (ταχείας δράσης αντικαταθλιπτικό). Επίσης, διαπιστώνεται η αγχολυτική δράση της κανναβιδιόλης χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά πειραματικά πρότυπα.

Ai. Διερεύνηση της αντικαταθλιπτικής δράσης της CBD στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης

Η CBD εξετάστηκε στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης σε επίμυες που έλαβαν υποξεία χορήγηση 3 και 10 mg/kg (3 δόσεις εντός 24 ωρών). Η δόση των 3 mg/kg επέφερε στατιστικά σημαντική μείωση της συμπεριφοράς κολύμβησης αλλά δεν επηρέασε τις συμπεριφορές κολύμβησης και σκαρφαλώματος. Η μεγαλύτερη δόση προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της κολύμβησης αλλά και αύξηση στη συμπεριφορά σκαρφαλώματος (γράφημα 1). Η αντικαταθλιπτική δράση της CBD στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης έχει ήδη περιγραφεί στη βιβλιογραφία (βλ. Πίνακα 2), ωστόσο οι μελέτες που διερευνούν τη συστηματική χορήγηση κανναβιδιόλης σε επίμυες είναι μόλις 3 και χρησιμοποιούν μεγαλύτερες δόσεις (Réus et al., 2011; Shbiro et al., 2019). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η CBD στη δόση των 10 mg/kg εμφανίζει την αντικαταθλιπτική δράση μέσω αυξημένης συμπεριφοράς σκαρφαλώματος, ενώ η συμπεριφορά κολύμβησης παραμένει σταθερή. Η εικόνα αυτή παραπέμπει στο πρότυπο αντικαταθλιπτικής δράσης της παλαιότερης γενιάς αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, όπως τα τρικυκλικά (Kelliher et al., 2003; Krishnan and Nestler, 2008).

A.ii. Διερεύνηση πιθανής συνέργειας της CBD με την KET στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης

Οι περισσότερες ως τώρα μελέτες για τη CBD υποστηρίζουν την αντικαταθλιπτική της δράση (βλ. πίνακα 2), όπου σε συνδυασμό με τη διαπιστωμένη δράση του φυτοκανναβινοειδούς σε δείκτες νευρωνικής πλαστικότητας (Campos et al., 2017; Hughes and Herron, 2019; Brakatselos et al., 2021), θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως πιθανό αντικαταθλιπτικό ταχείας δράσης. Από την άλλη η κεταμίνη, κλασικό και εγκεκριμένο αντικαταθλιπτικό ταχείας δράσης, έχει συνδεθεί με πλήθος ανεπιθύμητων ενεργειών, όπως αναλύθηκε στην εισαγωγή, που

περιλαμβάνουν τη συμπτωματολογία ψυχωτικού τύπου. Η κανναβιδιόλη έχει επιβεβαιωμένες αντιψυχωσικές ιδιότητες (Renard et al., 2017; Rodrigues da Silva et al., 2020), ενώ 2 πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν την εξισορροπιστική της δράση σε τέτοιου τύπου επιδράσεις της κεταμίνης (Kozela et al., 2020; Brakatselos et al., 2021), οι οποίες επιβεβαιώνονται και από σειρά αδημοσίευτων ευρημάτων της ερευνητικής ομάδας. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω προκύπτει η ανάγκη να μελετηθεί η πιθανή συνέργεια της CBD με την κεταμίνη ως προς τη ταχεία αντικαταθλιπτική δράση. Γι αυτό το λόγο επιλέχθηκε στο παρόν πείραμα η CBD να χορηγηθεί οξείως στη υποαποτελεσματική δόση (3 mg/kg) μαζί με τη μερικώς αποτελεσματική δόση της κεταμίνης (3 mg/kg), όπως και οι 2 προέκυψαν από πιλοτικές μελέτες. Εν τέλει η χορήγηση της υποαποτελεσματικής δόσης της κεταμίνης δεν προσέθεσε αποτελεσματική ισχύ στη δράση των 3 mg/kg του φυτοκανναβινοειδούς σε καμία από τις διερεύνηση παραμέτρους. Να σημειωθεί ότι η οξεία χορήγηση 3 mg/kg CBD μείωσε τη συμπεριφορά επίπλευσης και αύξησε τη συμπεριφορά σκαρφαλώματος, γεγονός ενδιαφέρον, καθώς η δόση είναι 10 φορές μικρότερη από τη χαμηλότερη οξεία δόση της CBD που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία και είναι σε απόλυτη συμφωνία με τα προαναφερθέντες μελέτες που υποστηρίζουν τη ταχεία δράση της κανναβιδιόλης ως αντικαταθλιπτικό φάρμακο (βλ. πίνακα 2).

A.iii. Διερεύνηση της πιθανής συνέργειας της CBD με τη φλουοξετίνη στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης.

Όπως ήταν αναμενόμενο η υποξεία χορήγηση 5 mg/kg φλουοξετίνης δεν επηρέασε καμία από τις υπό μελέτη συμπεριφορές στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης, ενώ η CBD στη δόση των 3 mg/kg εμφάνισε τάση να μειώσει τη συμπεριφορά επίπλευσης. Η συγχορήγηση των δύο ουσιών πέτυχε τη μείωση της συμπεριφοράς επίπλευσης και την αύξηση της συμπεριφοράς σκαρφαλώματος, γεγονός που υποστηρίζει τη συνέργεια των 2 ουσιών ως προς την αντικαταθλιπτική τους δράση στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης (γράφημα 3). Το αποτέλεσμα αυτό διευρύνει τη μελέτη των (Sales et al., 2018) που πραγματοποιήθηκε σε μύες και στην οποία παρατηρήθηκε ότι η CBD και η φλουοξετίνη εμφανίζουν συνέργεια ως προς τη δράση τους στη συμπεριφορά επίπλευσης κατά τη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης. Το εύρημα αυτό χρειάζεται να επιβεβαιωθεί και σε άλλα πειραματικά πρότυπα κατάθλιψης επειδή η CBD μειώνοντας την ανάγκη για υψηλότερη δόση φλουοξετίνης πιθανώς να λειτουργεί εξισορροπητικά στις ανεπιθύμητες ενέργειες της φλουοξετίνης, δεδομένης της χαμηλότερης δόσης και της ταυτόχρονης παρουσίας του κανναβινοειδούς. Παράλληλα, η παρούσα συνέργεια της CBD με τη φλουοξετίνη σε συνδυασμό με την έλλειψη συνέργειας με την κεταμίνη που αναφέρθηκε παραπάνω, καθώς και με την απουσία συνέργειας με τη δεσιπραμίνη, ενός αναστολέα επαναπρόσληψης νοραδρεναλίνης, (Sales et al., 2018), μπορούν να δώσουν πολύτιμα στοιχεία για την

αναζήτηση μηχανιστικών απαντήσεων σχετικά με την αντικαταθλιπτική δράση του φυτοκανναβινοειδούς. Ας σημειωθεί ότι η αγωνιστική δράση της κανναβιδιόλης στους σεροτονεργικούς υποδοχείς 1A έχει συσχετισθεί με την αντικαταθλιπτική της δράση (Zanelati et al., 2010).

B.i. Αξιολόγηση πιθανής διεγερτικής επίδρασης της CBD κανναβιδιόλης στην κινητικότητα εξοικειωμένων επιμύων.

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η FST μπορεί να επηρεαστεί από τη ψυχοκινητική διεγερσιμότητα του δοσολογικού σχήματος μιας ουσίας (Slattery and Cryan, 2012). Γι' αυτό το λόγο, όταν μια νέα ουσία επιδεικνύει αντικαταθλιπτική δράση στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης, απαιτείται η διερεύνηση της επίδρασης της ουσίας στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα για τη μειωμένη συμπεριφορά επίπλευσης να αποδίδεται σε ψυχοκινητική διέγερση. Γι' αυτό το λόγο όλες οι δόσεις της CBD που μελετήθηκαν στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης, εξετάστηκαν ως προς τη διεγερτική τους δυναμική στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου, σε εξοικειωμένους επίμυες, καθώς έτσι αξιοποιείται καλύτερα η διακριτική ικανότητα της μεθόδου για πιθανές διεγερτικές επιδράσεις (Brakatselos et al., 2021). Στην περίπτωση της CBD παρατηρήθηκε ότι οι δόσεις που εξετάστηκαν δεν επηρέασαν την οριζόντια κινητικότητα των επιμύων, υποδεικνύοντας την απουσία διεγερτικών ιδιοτήτων του φυτοκανναβινοειδούς στα δοσολογικά σχήματα που μελετήθηκαν. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία ανοικτού πεδίου σε συνδυασμό με τα ευρήματα που περιγράφηκαν προηγουμένως, υποστηρίζουν την αντικαταθλιπτική δράση υποξείας και οξείας χορήγησης χαμηλών δόσεων της CBD στην δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης σε επίμυες.

Γ.i. Διερεύνηση της επίδρασης της κανναβιδιόλης σε δείκτες αγχώδους συμπεριφοράς στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου

Η CBD παρουσίασε αγχολυτική δράση μόνο στη δόση των 3 mg/kg, όπως αυτή αντανακλάται από τη διάρκεια παραμονής στο κέντρο του κλωβού, κατά τη δοκιμασία ανοικτού πεδίου σε μη εξοικειωμένους επίμυες. Επιπροσθέτως εμφάνισε τάση για μείωση της θιγμοταξίας στην ίδια δόση η οποία αποτελεί επίσης δείκτη αγχώδους κατάστασης (Nestler and Hyman, 2010). Σε αντίθεση με την προηγούμενη ενότητα (B.i.) η δοκιμασία ανοικτού πεδίου αυτή τη φορά εφαρμόστηκε σε μη-εξοικειωμένους επίμυες, καθώς το στρες της έκθεσης σε νέο περιβάλλον είναι απαραίτητο για να μελετηθούν οι παράμετροι ενδιαφέροντος. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν βρίσκονται σε συμφωνία με την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία η οποία υποστηρίζει την αγχολυτική δράση της CBD (Elsaid et al., 2019; Papagianni and Stevenson, 2019).

Δ.ι. Επίδραση οξείας χορήγησης CBD στη δοκιμασία υπερυψωμένου λαβυρίνθου

Προκειμένου να μελετηθεί περισσότερο η αγχολυτική δράση της CBD στη δόση των 3 mg/kg, πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία υπερυψωμένου λαβυρίνθου σε σχήμα σταυρού, η οποία αποτελεί κλασικό και αμιγές πειραματικό πρότυπο αγχώδους διαταραχής. Η CBD στην ίδια δόση που εμφάνισε την αγχολυτική δράση στη δοκιμασία του ανοικτού πεδίου, πέτυχε αύξηση της διάρκειας παραμονής στους ανοικτούς βραχίονες της πλατφόρμας και μείωση στους κλειστούς βραχίονες, επιβεβαιώνοντας την αγχολυτική της δράση στη δόση των 3 mg/kg.

Ιδιαίτερα ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η συγκεκριμένη δόση του φυτοκανναβινοιδούς εμφανίζει αγχολυτικές και αντικαταθλιπτικές ιδιότητες στο ίδιο δοσολογικό σχήμα. Έχει δειχθεί απεναντίας ότι η έναρξη θεραπείας με αντικαταθλιπτικά και η χορήγησή τους σε πειραματικά πρότυπα αγχωδών διαταραχών, προκαλεί την εμφάνιση ανησυχίας και αγχώδους συμπεριφοράς αντίστοιχα (Zienowicz et al., 2006; Gomez et al., 2015). Το γεγονός αυτό εγείρει την ανάγκη να μελετηθεί η συγχορήγηση της CBD με τη φλουοξετίνη και στο επίπεδο της αντιμετώπισης των ανεπιθύμητων ενεργειών της δεύτερης, όπως άλλωστε προαναφέρθηκε, με έμφαση και στην πρόκληση αγχώδους συμπεριφοράς στα πειραματόζωα που προκαλεί η φλουοξετίνη, αλλά και ύπαρξη αγχολυτικής δράσης όπου απαιτείται σε συμπτωματολογία άγχους κατά την καταθλιπτική συνδρομή.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνολικά τα ευρήματα της παρούσας εργασίας υποστηρίζουν ότι η κανναβιδιόλη, το κυριότερο μη-εθιστικό συστατικό της κάνναβης, εμφανίζει αντικαταθλιπτικές και αγχολυτικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων και αυτών του αντικαταθλιπτικού ταχείας δράσης. Πιο συγκεκριμένα, η παρούσα μελέτη υποστηρίζει την αντικαταθλιπτική δράση της κανναβιδιόλης σε επίμυες χρησιμοποιώντας υποδεκαπλάσιες δόσεις από εκείνες που έχουν ήδη μελετηθεί, ενώ επιβεβαιώνει τη συνέργεια της κανναβιδιόλης με τη φλουοξετίνη, ένα εκλεκτικό αναστολέα επαναπρόσληψης σεροτονίνης, ως προς την αντικαταθλιπτική τους δράση. Επίσης μελετήθηκε η πιθανή συνέργεια της αντικαταθλιπτικής δράσης της κανναβιδιόλης με ένα αντικαταθλιπτικό ταχείας δράσης, την κεταμίνη, χωρίς ωστόσο θετικά αποτελέσματα. Τέλος, η κανναβιδιόλη εμφανίζει αγχολυτική δράση με συνέπεια σε 2 διαφορετικά πειραματικά πρότυπα αγχώδους διαταραχής, όταν χορηγείται σε δόση που στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης εμφανίζει αντικαταθλιπτικές ιδιότητες. Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή υποστηρίζει την αξία της χρήσης της κανναβιδιόλης για τις διαταραχές της διάθεσης και συνεισφέρει στην αποκωδικοποίηση του ιδιαίτερου φαρμακολογικού προφίλ που διαθέτει. Κρίνεται ωστόσο αναγκαία η περαιτέρω μελέτη του δοσολογικού της προφίλ, των ανεπιθύμητων της ενεργειών και ιδιαίτερα των νευροβιολογικών μηχανισμών που διέπουν τις παραπάνω δράσεις της.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abame MA, He Y, Wu S, Xie Z, Zhang J, Gong X, Wu C, Shen J (2021) Chronic administration of synthetic cannabidiol induces antidepressant effects involving modulation of serotonin and noradrenaline levels in the hippocampus. *Neurosci Lett*.
- Aguilar-Valles A, De Gregorio D, Matta-Camacho E, Eslamizade MJ, Khlaifia A, Skaleka A, Lopez-Canul M, Torres-Berrio A, Bermudez S, Rurak GM, Simard S, Salmaso N, Gobbi G, Lacaille JC, Sonenberg N (2020) Antidepressant actions of ketamine engage cell-specific translation via eIF4E. *Nature*.
- Alger BE (2002) Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: Focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol*.
- American Psychiatric Association (2013) DSM-5 Diagnostic Classification. In: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*.
- Anon (2014) ICD-10. In: *Practical Predictive Analytics and Decisioning Systems for Medicine: Informatics Accuracy and Cost-Effectiveness for Healthcare Administration and Delivery Including Medical Research*.
- Antoniou K, Papathanasiou G, Panagis G, Nomikos GG, Hyphantis T, Papadopoulou-Daifoti Z (2004) Individual responses to novelty predict qualitative differences in d-amphetamine-induced open field but not reward-related behaviors in rats. *Neuroscience* 123:613–623.
- Aroni F, Iacovidou N, Dontas I, Pourzitaki C, Xanthos T (2009) Pharmacological aspects and potential new clinical applications of ketamine: Reevaluation of an old drug. *J Clin Pharmacol*.
- Becker A, Peters B, Schroeder H, Mann T, Huether G, Grecksch G (2003) Ketamine-induced changes in rat behaviour: A possible animal model of schizophrenia. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*.
- Benfield P, Heel RC, Lewis SP (1986) Fluoxetine: A Review of Its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Efficacy in Depressive Illness. *Drugs*.
- Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH (2000) Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*.
- Bisogno T, Hanuš L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, Moriello AS, Davis JB, Mechoulam R, Di Marzo V (2001) Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: Effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* 134:845–852 Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11606325/> [Accessed February 18, 2021].

- Blessing EM, Steenkamp MM, Manzanares J, Marmar CR (2015) Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety Disorders. *Neurotherapeutics*.
- Brakatselos C, Delis F, Asprogerakas MZ, Lekkas P, Tseti I, Tzimas PS, Petrakis EA, Halabalaki M, Skaltsounis LA, Antoniou K (2021) Cannabidiol Modulates the Motor Profile and NMDA Receptor-related Alterations Induced by Ketamine. *Neuroscience*.
- Campos AC, Fogaça M V, Scarante FF, Joca SRL, Sales AJ, Gomes F V, Sonogo AB, Rodrigues NS, Galve-Roperh I, Guimarães FS (2017) Plastic and Neuroprotective Mechanisms Involved in the Therapeutic Effects of Cannabidiol in Psychiatric Disorders. *Front Pharmacol* 8:269 Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28588483>.
- Campos AC, Guimarães FS (2009) Evidence for a potential role for TRPV1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray in the attenuation of the anxiolytic effects of cannabinoids. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 33:1517–1521 Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19735690/> [Accessed February 18, 2021].
- Corsen G, Domino EF (1966) Dissociative anesthesia: further pharmacologic studies and first clinical experience with the phencyclidine derivative CI-581. *Anesth Analg*.
- Czéh B, Fuchs E, Wiborg O, Simon M (2016) Animal models of major depression and their clinical implications. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*.
- Dahan A, Sarton E, Teppema L, Olivevier C, Nieuwenhuijs D, Matthes HW, Kieffer BL (2001) Anesthetic potency and influence of morphine and sevoflurane on respiration in mu-opioid receptor knockout mice.[Erratum appears in *Anesthesiology* 2001 Sep;95(3):819]. *Anesthesiology*.
- de Moraes H, Chaves YC, Waltrick APF, Jesus CHA, Genaro K, Crippa JA, da Cunha JM, Zanoveli JM (2018) Sub-chronic treatment with cannabidiol but not with URB597 induced a mild antidepressant-like effect in diabetic rats. *Neurosci Lett* 682:62–68 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.06.006>.
- De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allarà M, Bisogno T, Petrosino S, Stott CG, Di Marzo V (2011) Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol* 163:1479–1494.
- Domino E (2010) Taming the ketamine tiger. 1965.o Title. *Anesthesiology*.
- El-Alfy AT, Ivey K, Robinson K, Ahmed S, Radwan M, Slade D, Khan I, ElSohly M, Ross S (2010) Antidepressant-like effect of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacol*

Biochem Behav 95:434–442 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2010.03.004>.

El Refaey H (2007) Fluoxetine. In: *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, pp 1–9. Elsevier Inc. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29083803/> [Accessed February 18, 2021].

Elsaid S, Kloiber S, Le Foll B (2019) Effects of cannabidiol (CBD) in neuropsychiatric disorders: A review of pre-clinical and clinical findings, 1st ed. Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.06.005>.

Fogaça M V., Reis FMCV, Campos AC, Guimarães FS (2014) Effects of intra-prelimbic prefrontal cortex injection of cannabidiol on anxiety-like behavior: Involvement of 5HT1A receptors and previous stressful experience. *Eur Neuropsychopharmacol*.

Franks NP, Lieb WR (1994) Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature*.

Frohlich J, Van Horn JD (2014) Reviewing the ketamine model for schizophrenia. *J Psychopharmacol* 28:287–302.

Galanopoulos A, Polissidis A, Georgiadou G, Papadopoulou-Daifoti Z, Nomikos GG, Pitsikas N, Antoniou K (2014) WIN55,212-2 impairs non-associative recognition and spatial memory in rats via CB1 receptor stimulation. *Pharmacol Biochem Behav* 124:58–66 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2014.05.014>.

Gomez F, Venero C, Viveros MP, García-García L (2015) Short-term fluoxetine treatment induces neuroendocrine and behavioral anxiogenic-like responses in adolescent male rats. *Exp Brain Res*.

Guillen J (2012) FELASA guidelines and recommendations. *J Am Assoc Lab Anim Sci*.

Gururajan A, Malone DT (2016) Does cannabidiol have a role in the treatment of schizophrenia? *Schizophr Res* 176:281–290.

Hao Y, Ge H, Sun M, Gao Y (2019) Selecting an appropriate animal model of depression. *Int J Mol Sci*.

Homberg JR (2011) A mouse model to address unresolved antidepressant issues. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Huestis MA, Solimini R, Pichini S, Pacifici R, Carlier J, Busardò FP (2019) Cannabidiol Adverse Effects and Toxicity. *Curr Neuropharmacol* 17:974–989 Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31161980/> [Accessed February 18, 2021].

Hughes B, Herron CE (2019) Cannabidiol Reverses Deficits in Hippocampal LTP in a Model of Alzheimer’s Disease. *Neurochem Res*.

Ibeas Bih C, Chen T, Nunn AVW, Bazetot M, Dallas M, Whalley BJ (2015) Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders. *Neurotherapeutics*.

- Iffland K, Grotenhermen F (2017) An Update on Safety and Side Effects of Cannabidiol: A Review of Clinical Data and Relevant Animal Studies. *Cannabis Cannabinoid Res* 2:139–154 Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28861514/> [Accessed February 18, 2021].
- K H, Lambert D.G (1996) Ketamine: its mechanism(s) of action and unusual clinical uses. *Br J Anaesth*.
- Kathmann M, Flau K, Redmer A, Tränkle C, Schlicker E (2006) Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*.
- Katsidoni V, Kastellakis A, Panagis G (2013) Biphasic effects of Δ 9-tetrahydrocannabinol on brain stimulation reward and motor activity. *Int J Neuropsychopharmacol* 16:2273–2284.
- Kelliher P, Kelly JP, Leonard BE, Sánchez C (2003) Effects of acute and chronic administration of selective monoamine re-uptake inhibitors in the rat forced swim test. *Psychoneuroendocrinology*.
- Koh MT, Shao Y, Rosenzweig-Lipson S, Gallagher M (2018) Treatment with levetiracetam improves cognition in a ketamine rat model of schizophrenia. *Schizophr Res*.
- Kohrs R, Durieux ME (1998) Ketamine: Teaching an old drug new tricks. *Anesth Analg*.
- Kokras N, Antoniou K, Mikail HG, Kafetzopoulos V, Papadopoulou-Daifoti Z, Dalla C (2015) Forced swim test: What about females? *Neuropharmacology*.
- Kokras N, Baltas D, Theocharis F, Dalla C (2017) Kinoscope: An open-source computer program for behavioral pharmacologists. *Front Behav Neurosci*.
- Kozela E, Krawczyk M, Kos T, Juknat A, Vogel Z, Popik P (2020) Cannabidiol Improves Cognitive Impairment and Reverses Cortical Transcriptional Changes Induced by Ketamine, in Schizophrenia-Like Model in Rats. *Mol Neurobiol* 57:1733–1747.
- Krishnan V, Nestler EJ (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature*.
- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB, Charney DS (1994) Subanesthetic Effects of the Noncompetitive NMDA Antagonist, Ketamine, in Humans: Psychotomimetic, Perceptual, Cognitive, and Neuroendocrine Responses. *Arch Gen Psychiatry*.
- Laprairie RB, Bagher AM, Kelly MEM, Denovan-Wright EM (2015) Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol*.
- Leweke FM, Piomelli D, Pahlisch F, Muhl D, Gerth CW, Hoyer C, Klosterkötter J, Hellmich M, Koethe D (2012) Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl*

Psychiatry 2:e94.

- Li HL (1973) An archaeological and historical account of cannabis in China. *Econ Bot.*
- Lu HC, Mackie K (2020) Review of the Endocannabinoid System. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging.*
- Lu HC, Mackie K (2016) An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biol Psychiatry.*
- Luo Y, Yu Y, Zhang M, He H, Fan N (2020) Chronic administration of ketamine induces cognitive deterioration by restraining synaptic signaling. *Mol Psychiatry.*
- Lutz B (2007) The endocannabinoid system and extinction learning. *Mol Neurobiol.*
- Machado Bergamaschi M, Helena Costa Queiroz R, Waldo Zuardi A, Alexandre S. Crippa J (2011) Safety and Side Effects of Cannabidiol, a Cannabis sativa Constituent. *Curr Drug Saf* 6:237–249 Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22129319/> [Accessed February 18, 2021].
- Mechoulam R, Parker LA, Gallily R (2002) Cannabidiol: An overview of some pharmacological aspects. *J Clin Pharmacol.*
- Mori MA, Meyer E, da Silva FF, Milani H, Guimarães FS, Weffort de Oliveira RM (2021) Differential contribution of CB1, CB2, 5-HT1A, and PPAR- γ receptors to cannabidiol effects on ischemia-induced emotional and cognitive impairments. *Eur J Neurosci.*
- Muetzelfeldt L, Kamboj SK, Rees H, Taylor J, Morgan CJA, Curran H V. (2008) Journey through the K-hole: Phenomenological aspects of ketamine use. *Drug Alcohol Depend.*
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron.*
- Nestler EJ, Hyman SE (2010) Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci.*
- Niesters M, Dahan A (2012) Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for NMDA receptor antagonists in the treatment of chronic neuropathic pain. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*
- Norris C, Loureiro M, Kramar C, Zunder J, Renard J, Rushlow W, Laviolette SR (2016) Cannabidiol modulates fear memory formation through interactions with serotonergic transmission in the mesolimbic system. *Neuropsychopharmacology.*
- Organisation (WHO) World Health (2019) World health organization model list of essential medicines. *Ment Holist Heal Some Int Perspect.*
- Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MCT, Gardner LS, Griffin G, Jackson HC, Procter MJ, Rasamison CM, Tang-Christensen M, Widdowson PS, Williams GM, Reynet C (2006) Deorphanization of a G protein-coupled

receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab.*

Pagotto U, Cervino C, Vicennati V, Marsicano G, Lutz B, Pasquali R (2006) How many sites of action for endocannabinoids to control energy metabolism? *Int J Obes.*

Papagianni EP, Stevenson CW (2019) Cannabinoid Regulation of Fear and Anxiety: an Update. *Curr Psychiatry Rep.*

Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci.*

Planchez B, Surget A, Belzung C (2019) Animal models of major depression: drawbacks and challenges. *J Neural Transm.*

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. *Behav Brain Res.*

Pouliat N, Delis F, Brakatselos C, Polissidis A, Koutmani Y, Kokras N, Dalla C, Politis PK, Antoniou K (2021) Detrimental effects of adolescent escalating low-dose Δ^9 -tetrahydrocannabinol lead to a specific bio-behavioural profile in adult male rats. *Br J Pharmacol.*

R.G. P (2008) The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol.*

Renard J, Norris C, Rushlow W, Laviolette SR (2017) Neuronal and molecular effects of cannabidiol on the mesolimbic dopamine system: Implications for novel schizophrenia treatments. *Neurosci Biobehav Rev.*

Réus GZ, Stringari RB, Ribeiro KF, Luft T, Abelaira HM, Fries GR, Aguiar BW, Kapczinski F, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA, Quevedo J (2011) Administration of cannabidiol and imipramine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases brain-derived neurotrophic factor levels in the rat amygdala. *Acta Neuropsychiatr* 23:241–248.

Rodrigues da Silva N, Gomes FV, Sonogo AB, Silva NR da, Guimarães FS (2020) Cannabidiol attenuates behavioral changes in a rodent model of schizophrenia through 5-HT1A, but not CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Res* 156 Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32151683/> [Accessed July 17, 2020].

Rowland LM (2005) Subanesthetic ketamine: How it alters physiology and behavior in humans. *Aviat Sp Environ Med.*

- Russo EB, Burnett A, Hall B, Parker KK (2005) Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. *Neurochem Res* 30:1037–1043.
- Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*.
- Sales AJ, Crestani CC, Guimarães FS, Joca SRL (2018) Antidepressant-like effect induced by Cannabidiol is dependent on brain serotonin levels. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 86:255–261 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.06.002>.
- Sales AJ, Fogaça M V., Sartim AG, Pereira VS, Wegener G, Guimarães FS, Joca SRL (2019) Cannabidiol Induces Rapid and Sustained Antidepressant-Like Effects Through Increased BDNF Signaling and Synaptogenesis in the Prefrontal Cortex. *Mol Neurobiol* 56:1070–1081.
- Sales AJ, Guimarães FS, Joca SRL (2020) CBD modulates DNA methylation in the prefrontal cortex and hippocampus of mice exposed to forced swim. *Behav Brain Res* 388:112627 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112627>.
- Sartim AG, Guimarães FS, Joca SRL (2016) Antidepressant-like effect of cannabidiol injection into the ventral medial prefrontal cortex-Possible involvement of 5-HT_{1A} and CB₁ receptors. *Behav Brain Res* 303:218–227 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.01.033>.
- Sartim AG, Sales AJ, Guimarães FS, Joca SRL (2018) Hippocampal mammalian target of rapamycin is implicated in stress-coping behavior induced by cannabidiol in the forced swim test. *J Psychopharmacol*.
- Savitz J, Lucki I, Drevets WC (2009) 5-HT_{1A} receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol*.
- Seeman P (2016) Cannabidiol is a partial agonist at dopamine D₂High receptors, predicting its antipsychotic clinical dose. *Transl Psychiatry*.
- Sharir H, Abood ME (2010) Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor. *Pharmacol Ther* 126:301–313 Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20298715/> [Accessed February 18, 2021].
- Shbiro L, Hen-Shoval D, Hazut N, Rapps K, Dar S, Zalsman G, Mechoulam R, Weller A, Shoval G (2019) Effects of cannabidiol in males and females in two different rat models of depression. *Physiol Behav*.
- Siegel RK (1978) Phencyclidine and ketamine intoxication: a study of four populations of recreational users. *NIDA Res Monogr*.

- Slattery DA, Cryan JF (2012) Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc.*
- Slattery DA, Desrayaud S, Cryan JF (2005) GABAB receptor antagonist-mediated antidepressant-like behavior is serotonin-dependent. *J Pharmacol Exp Ther.*
- Smith DJ, Bouchal RL, DeSanctis CA, Monroe PJ, Amedro JB, Perrotti JM, Crisp T (1987) Properties of the interaction between ketamine and opiate binding sites in vivo and in vitro. *Neuropharmacology.*
- Stahl SM (1998) Basic psychopharmacology of antidepressants, Part 1: Antidepressants have seven distinct mechanisms of action. *J Clin Psychiatry.*
- Thakur G, Nikas S, Makriyannis A (2005) CB1 Cannabinoid Receptor Ligands. *Mini-Reviews Med Chem.*
- Thornberg SA, Saklad SR (1996) A review of NMDA receptors and the phencyclidine model of schizophrenia. *Pharmacotherapy.*
- Touw M (1981) The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. *J Psychoactive Drugs.*
- Tyler MW, Yourish HB, Ionescu DF, Haggarty SJ (2017) Classics in Chemical Neuroscience: Ketamine. *ACS Chem Neurosci.*
- Tzimas PS, Petrakis EA, Halabalaki M, Skaltsounis LA (2021) Effective determination of the principal non-psychoactive cannabinoids in fiber-type Cannabis sativa L. by UPLC-PDA following a comprehensive design and optimization of extraction methodology. *Anal Chim Acta.*
- Vigo D, Thornicroft G, Atun R (2016) Estimating the true global burden of mental illness. *The Lancet Psychiatry.*
- Wong ML, Licinio J (2004) From monoamines to genomic targets: A paradigm shift for drug discovery in depression. *Nat Rev Drug Discov.*
- World Health Organisation (2017) Depression and other common mental disorders: global health estimates. *World Heal Organ.*
- Xu C, Chang T, Du Y, Yu C, Tan X, Li X (2019) Pharmacokinetics of oral and intravenous cannabidiol and its antidepressant-like effects in chronic mild stress mouse model. *Environ Toxicol Pharmacol.*
- Zanelati T V., Biojone C, Moreira FA, Guimarães FS, Joca SRL (2010) Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: Possible involvement of 5-HT 1A receptors. *Br J Pharmacol* 159:122–128.
- Zanos P et al. (2016) NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature.*
- Zanos P, Gould TD (2018) Mechanisms of ketamine action as an antidepressant. *Mol Psychiatry.*

Zhornitsky S, Potvin S (2012) Cannabidiol in humans-The quest for therapeutic targets. *Pharmaceuticals* 5:529–552.

Zienowicz M, Wisłowska-Stanek A, Lehner M, Taracha E, Maciejak P, Sobolewska A, Szyndler J, Turzyńska D, Walkowiak J, Płaźnik A (2006) Fluoxetine-induced anxiety and nervousness. *Pharmacol Reports*.

Zuardi AW (2006) History of cannabis as a medicine: A review. *Rev Bras Psiquiatr*.

Μαρσέλος Μ., Καραγιαννίδου Α.: *Cannabis sativa*. Μύθοι, ιστορία και παρόν για ένα φυτό. Εκδόσεις τυπωθήτω 2005