

## **Indice**

<b>1. Abstract</b>	p. 2
<b>2. Introduzione</b>	p. 5
<b>3. Scopo dello studio</b>	p. 30
<b>4. Materiali e metodi</b>	p. 31
<b>5. Risultati</b>	p. 35
<b>6. Discussione</b>	p. 38
<b>7. Figure e tabelle</b>	p. 42
<b>8. Ringraziamenti</b>	p. 55
<b>9. Bibliografia</b>	p. 56

## **Abstract**

**Introduzione:** Negli ultimi anni è stato evidenziato un ruolo patogenetico degli endocannabinoidi nello sviluppo di diverse malattie neurologiche, come sclerosi multipla, demenza di Alzheimer e stroke. In modelli murini di ischemia cerebrale, è stato dimostrato un aumento dell'espressione di anandamide (AEA) e recettore CB1 nell'area di penombra ischemica e nel core, proporzionale all'area dello stroke ed al deficit neurologico. Inoltre studi con topi knock-out per CB1 sviluppano stroke più estesi, con disabilità neurologica più grave e con maggiore mortalità rispetto ai topi wild-type. Infine gli endocannabinoidi sembrano avere un ruolo neuroprotettivo nello stroke, probabilmente riducendo l'eccitotossicità mediata dall'NMDA.

**Metodi:** Sono stati reclutati 10 pazienti con un primo stroke ischemico nel territorio dell'arteria cerebrale media (MCA) con almeno deficit motorio all'arto superiore (5/5 F/M; età media 70+13 anni; mediana NIHSS 13+8) e 8 controlli matchati per età (4/4 F/M; età media 71+12 anni). I due gruppi sono stati anche matchati per indice di massa corporea (BMI), livelli ematici di glucosio, colesterolo e trigliceridi. Sono stati misurati i livelli plasmatici di AEA, 2-AG e PEA nei soggetti di controllo e nei pazienti ricoverati entro 6 ore dallo stroke in tre momenti: all'ingresso (T0), dopo 12 ore (T1) e dopo 24 ore (T2). Il deficit neurologico è stato valutato mediante l'NIHSS e la Fugl-Meyer Scale-arto superiore (FMS). Inoltre a tutti i pazienti è stata eseguita una TAC cerebrale all'ingresso e a 48 ore dall'esordio della sintomatologia.

I campioni di sangue sono stati analizzati mediante spettrometria di massa accoppiata a cromatografia liquida. I livelli plasmatici grezzi di endocannabinoidi sono stati poi pesati rispetto ai livelli di grassi del sangue.

Le immagini TAC in formato DICOM sono state convertite in quello Analyze e in seguito sono stati calcolati i volumi delle lesioni in maniera semi-automatica utilizzando Analyze 7.5 (Biomedical Imaging Resource, Mayo University). Infine l'analisi statistica è stata condotta con SPSS 12.0, utilizzando test U di Mann-Whitney e test rho di Spearman.

**Risultati:** 1) Al tempo T0 i livelli di AEA (sia grezzi, che pesati) sono risultati significativamente più elevati nei pazienti con stroke rispetto ai controlli, mentre per quanto riguarda i livelli di 2-AG e PEA non si sono rilevate differenze statisticamente significative. 2) Non vi è correlazione tra BMI, livelli di colesterolo, glucosio e trigliceridi e livelli di AEA. 3) Vi è una significativa correlazione inversa al tempo T0 tra i livelli di AEA grezzi, i livelli corretti e i valori di FMS nei pazienti con stroke. Quindi più alti sono i livelli di AEA, maggiore è il deficit neurologico. Inoltre i livelli grezzi e pesati di PEA al tempo T0 sono direttamente proporzionali ai valori di NIHSS; pertanto elevati livelli plasmatici di PEA sono associati a incrementi della disabilità neurologica. Infine vi è una tendenza alla correlazione tra il volume dell'area ischemica ed i livelli di AEA misurati (Spearman  $\rho=0,054$ ).

**Discussione:** Questo è il primo studio in vivo a dimostrare elevati valori di AEA in pazienti con stroke in fase acuta, in linea con studi condotti su modelli murini. Inoltre sembra esserci una correlazione tra il grado di deficit neurologico ed i valori di AEA a 6 ore dall'evento ischemico. E' stato precedentemente ipotizzato che elevati livelli cerebrali di endocannabinoidi dopo uno stroke ischemico possano rappresentare un tentativo di ridurre l'estensione del danno cerebrale agendo sui recettori CB1 E CB2. Pertanto il precoce aumento dei livelli plasmatici di AEA può essere correlato alla severità dello stroke. Inoltre un aumento di AEA centrale e periferico e della sintesi di AEA è stato recentemente descritto anche i pazienti con sclerosi multipla durante le ricadute di malattia, suggerendo un comune meccanismo di difesa contro l'eccitotossicità. Un altro studio più recente ha dimostrato che nello striato, un aumento della produzione di AEA riduce i livelli, il metabolismo e gli effetti fisiologici di 2-AG; tali risultati sono in linea con gli studi precedenti e con il nostro, in cui non era emersa alcuna relazione tra stroke e livelli plasmatici di 2-AG.

## **Abstract**

**Background:** Endocannabinoids have shown neuroprotective properties in murine and neuronal cultural models of stroke, acting on NMDA-mediated excitotoxicity and probably modulating the subsequent neuroinflammatory response.

**Methods:** 10 patients with a first ischemic stroke in the MCA territory with at least hand movement impairment and 8 age-matched control subjects were included. Groups were matched for body mass index (BMI) and plasmatic fasting glucose, cholesterol and triglyceride levels. All control subjects underwent a blood sample collection for anandamide (AEA), 2-arachidonoylglycerol (2-AG) and palmitoylethanolamide (PEA) measurement; patients admitted within 6 hours since stroke onset underwent the same procedure on admittance (T0), after 12 (T1) and after 24 (T2) hours since symptom onset. Patient's neurological impairment was assessed using NIHSS and Fugl-Meyer Scale arm subitem (FMS); stroke volume was determined on 48-hours follow-up brain CT scans. Blood samples were analyzed by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. Statistical analysis was performed with SPSS 12.0, using Mann-Whitney U test and Spearman correlation analysis.

**Results:** 1) The T0 levels of AEA, but not 2-AG and PEA, were significantly higher in stroke patients compared to control subjects. 2) There was a correlation between BMI, cholesterol, glucose and triglyceride plasmatic levels and 2-AG, but not AEA, levels. 3) Stroke patients showed a significant inverse correlation between T0 AEA levels and FMS score: the higher the AEA levels, the worse the neurological arm impairment. PEA T0 levels showed a significant direct correlation with NIHSS score. Finally, a positive correlation trend was found between T0 AEA levels and stroke volume at 48-hours follow-up brain CT scans.

**Conclusions:** This is the first demonstration of elevated peripheral AEA levels in stroke patients; moreover, like in previous murine studies, there seems to be a significant relationship between AEA levels and neurological impairment at 6 hours since stroke onset.

## **Introduzione**

### ***1) Gli endocannabinoidi***

Costituiscono una classe di mediatori lipidici costituiti da amidi, esteri ed eteri di acidi grassi poliinsaturi a lunga catena (N-arachidonoiletanolamina o anandamide o AEA, 2-arachidonoilglicerolo o 2-AG, Palmitoiletanolamide o PEA, Oleiletanolamide od OEA, virodamina, noladina etere) che agiscono su una classe specifica di recettori accoppiati a proteina G e, almeno per i primi due composti, in grado di causare effetti psicotropi simili a quelli del  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo (THC) contenuto nelle infiorescenze di cannabis sativa.

E' infatti noto dal 1988 che il THC esogeno, isolato nel 1964[1], agisca su uno specifico tipo di recettore, denominato CB1[2-3]. Nel 1992 fu per la prima volta isolato il primo ligando endogeno specifico per il recettore CB1, denominato anandamide dalla parola sanscrita "ananda" o "beatitudine eterna".

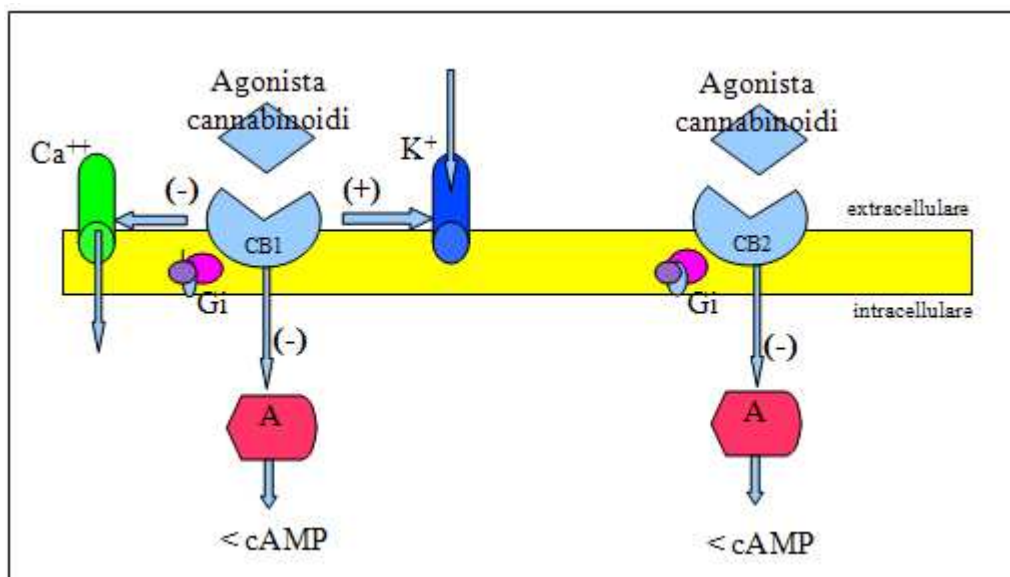
Nonostante esistano preliminari evidenze farmacologiche dell'esistenza di più recettori o sottotipi recettoriali per i cannabinoidi, a tutt'oggi sono unicamente due quelli riconosciuti tali; il secondo è il recettore CB2, clonato da Munro nel 1993[4]. Altri, invece, possono essere ad essi funzionalmente correlati.

CB1 e CB2 appartengono alla superfamiglia dei recettori di membrana metabotropici e sono caratterizzati da 7 domini transmembrana, 3 loop intracellulari, un dominio aminoterminale extracellulare con siti di glicosilazione ed un dominio carbossiterminale intracellulare che interagisce, insieme al terzo loop intracellulare con una proteina G. Questa è di tipo inibitorio ( $G_i$ ), infatti la sua attivazione inibisce l'adenilatociclastasi (AC) e di conseguenza la produzione di cAMP nel terminale presinaptico. Il cAMP determina l'attivazione della proteinchinasi A (PKA) con fosforilazione ed inattivazione dei canali del potassio; una sua modulazione negativa

dovuta a riduzione dei livelli di cAMP attiva tali canali con conseguente accorciamento della depolarizzazione di membrana sinaptica.

Solo i CB1, quando attivati, sono in grado di aprire i canali per il  $K^+$  e chiudere quelli per il  $Ca^{++}$  situati anch'essi sulla membrana presinaptica.

Vie di trasduzione del segnale attivate dagli agonisti dei cannabinoidi

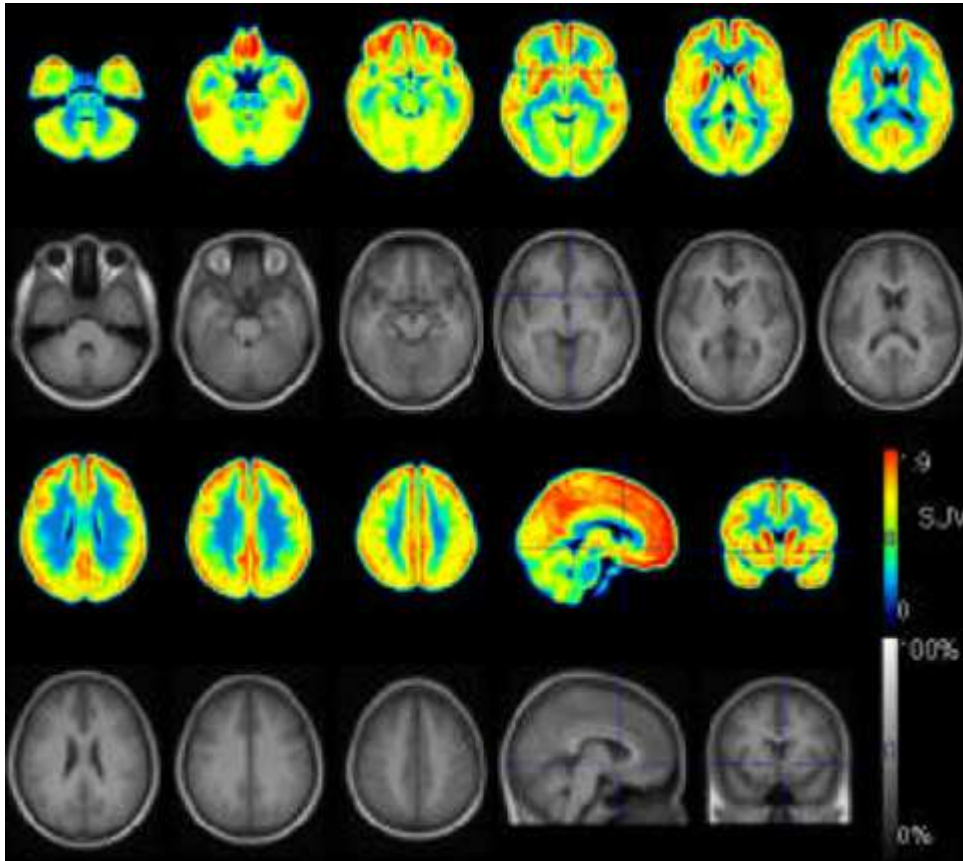


Differente è invece la localizzazione dei recettori; mentre i CB1 sono prevalentemente espressi nel sistema nervoso centrale e periferico, come pure in alcuni tessuti periferici (gh. endocrine, gh. salivari, leucociti, milza, cuore, occhio e parte dell'apparato riproduttivo, urinario e gastrointestinale) i CB2 sono stati finora localizzati in cellule del sistema immunitario ed autonomico; è recente una loro identificazione nel SNC[5].

La misurazione della concentrazione recettoriale CB1 nelle regioni cerebrali trova la maggior densità nei gangli della base (Substantia Nigra, Globus Pallidus, Nucleo Caudato, Putamen) che sono deputati al controllo dei movimenti involontari. Altrettanto ricco è il sistema limbico, soprattutto a livello di Ippocampo (coinvolto nei processi di memorizzazione), Amigdala (coinvolta nel controllo degli stati emozionali quali rabbia, desiderio, paura), Ipotalamo (con funzioni di controllo neuroendocrino come lo stimolo dell'appetito e termoregolatore). Ne è ben

rappresentato anche il cervelletto che controlla l'equilibrio e la coordinazione dei movimenti volontari. Modesta è la densità negli strati 1 e 6 della corteccia (processi cognitivi e apprendimento) mentre è molto limitata a livello di tronco encefalico.

Localizzazione dei recettori CB1 a livello encefalico nell'uomo, visualizzata tramite PET.



A livello midollare sono presenti nella sostanza grigia periacqueduttale e nel corno dorsale (aree coinvolte nella modulazione del dolore) in tre strutture specifiche: terminali dei neuroni che proiettano dal cervello, neuroni intrinseci spinali e neuroni afferenti primari.

I recettori CB2 invece, sono principalmente localizzati nel sistema immunitario, in particolare nella zona marginale della milza, nelle tonsille e nelle cellule immunocompetenti [6-7]. Recenti studi hanno rilevato l'espressione di mRNA del recettore CB2 anche a livello di alcune aree cerebrali come il cervelletto ed il midollo allungato. In quest'ultimo, sono stati trovati nei neuroni all'interno del

nucleo motorio dorsale del vago, nel nucleo ambiguo e nel nucleo trigemino spinale[5]. C'è evidenza della loro presenza anche nella microglia di cervello murino[8].

I primi due endocannabinoidi isolati, sono certamente i più studiati ma tra quelli finora identificati si ricordano:

- N-arachidoniletanolamina (anandamide AEA);
- 2- arachidonoilglicerolo (2-AG);
- 2-arachidonil gliceril etere (noladin-etere 2-AGE);
- O-arachidoniletanolamina (virodamina);
- N-palmitoiletanolamina (PEA)
- N-arachidonoildopamina (NADA);

L'Anandamide lega sia il CB1 che il CB2, comportandosi da agonista parziale con i recettori CB1 e mostrando una minore affinità per i CB2. Tramite modifiche strutturali sono stati derivati degli analoghi ad azione selettiva sul recettore CB1 come la metanandamide, l'arachidonil-2-cloretilamide (ACEA) e l'arachidonilciclopropilamide (ACPA)[9]. E' presente ad elevate concentrazioni nell'ippocampo[10-11-12], nella corteccia, nel talamo[10] e nel cervelletto, ma anche nel sistema limbico, nello striato, nel diencefalo, nel mesencefalo[12].

Il 2-arachidonoilglicerolo differisce dall'anandamide per il fatto di comportarsi come agonista "completo" su CB1-CB2 anche se come l'anandamide mostra una marginale maggiore attività intrinseca sui recettori CB1. Presenta la stessa localizzazione dell'AEA ma a livello centrale è presente a concentrazioni circa 200 volte maggiori.



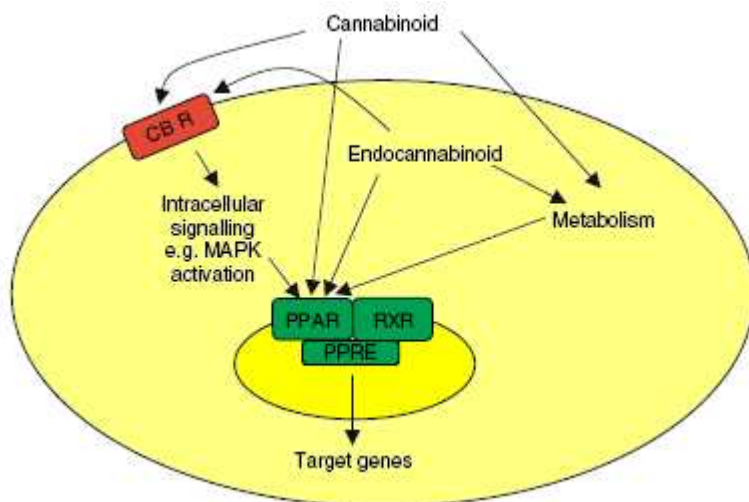
Il noladin-etero lega con alta affinità il CB1 e molto più debolmente il CB2[13]. Si riscontra nel talamo e nell'ippocampo ad alte concentrazioni mentre nel cervelletto e nel midollo spinale ha minor densità[14].

La Virodamina ha la stessa distribuzione della AEA mostrando livelli poco più alti nei tessuti periferici ed in particolare in quelli che esprimono il CB2 sul quale agisce come agonista completo, mentre mostra attività di agonista inverso/antagonista sui recettori CB1[15].

N-palmitoiletanolamina (PEA) non si lega efficientemente ai recettori dei cannabinoidi[16], anche se media effetti simili ad AEA. Infatti PEA ha dimostrato di possedere proprietà antinfiammatorie [17], anti-eccitotossiche [18], analgesiche [19] e attività antiossidante [20]. PEA è inoltre sintetizzata dalle cellule microgliali attivate, come AEA[21]. Insieme ad altri endocannabinoidi (virodamina etero e OEA) PEA sembra agire su *gpr55*, un recettore recentemente scoperto la cui attivazione determina azioni antinfiammatorie e sembra modulare lipolisi e tono vascolare[22].

La molecola N-arachidonoildopamina (NADA) è attiva sui CB1[23].

NADA e Anandamide non si legano solo ai recettori cannabinoidi. A supportare l'ipotesi dell'esistenza di altri recettori o sottotipi recettoriali per l'AEA è il riscontro della sua presenza anche in aree cerebrali e tessuti periferici poveri di recettori CB. Studi recenti dimostrano che sia l'AEA che NADA sono in grado di agire come agonista puro per i recettori vanilloidi (TRPV1) inducendo tipici effetti mediati da questo recettore (entrata di calcio e depolarizzazione)[24]. In tale modo anandamide è in grado sia di ridurre la depolarizzazione a livello pre-sinaptico (attraverso i recettori classici CB1), sia di incrementare l'afflusso citoplasmatico di  $Ca^{2+}$  rendendo le cellule bersaglio maggiormente suscettibili alla depolarizzazione (agendo sui recettori TRPV1).



Infine tali molecole causano parte dei loro effetti specifici grazie alla modulazione dei peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), recettori nucleari, che, dopo il legame con gli agonisti, eterodimerizzano con il recettore X per i

retinoidi (RXR) e si legano a sequenze di DNA, modulandone l'espressione. Esistono tre tipi di PPAR:  $\alpha$  (espresso da tessuti metabolicamente attivi; è il bersaglio dei fibrati nel trattamento delle iperdislipidemie),  $\gamma$  (espresso soprattutto su adipociti e macrofagi) e  $\delta$  (ubiquitario). PEA, AEA, noladina-etero e virodamina attivano PPAR  $\alpha$ , con azioni di tipo lipolitico e antinfiammatoria; AEA, 2-AG e THC modulano l'attività di PPAR  $\gamma$ , determinando azioni di tipo antinfiammatoria e vasodilatatrice [25].

Al contrario di altri mediatori chimici cerebrali, gli endocannabinoidi non sono prodotti e immagazzinati in vescicole secretorie per poi essere rilasciati all'occorrenza ma sintetizzati "on demand" (su stimolo specifico solo quando necessario) a partire da precursori fosfolipidici per azione di fosfolipasi di membrana.

In particolare, l'anandamide viene prodotta dall'idrolisi del NAPE (N-arachidonil-fosfatidiletanolamina), per un processo catalizzato da una fosfolipasi di tipo D. Il NAPE, a sua volta, viene prodotto dalla N-trans-acilazione della fosfatidiletanolamina. Quest'ultima reazione è attivata dagli ioni calcio.

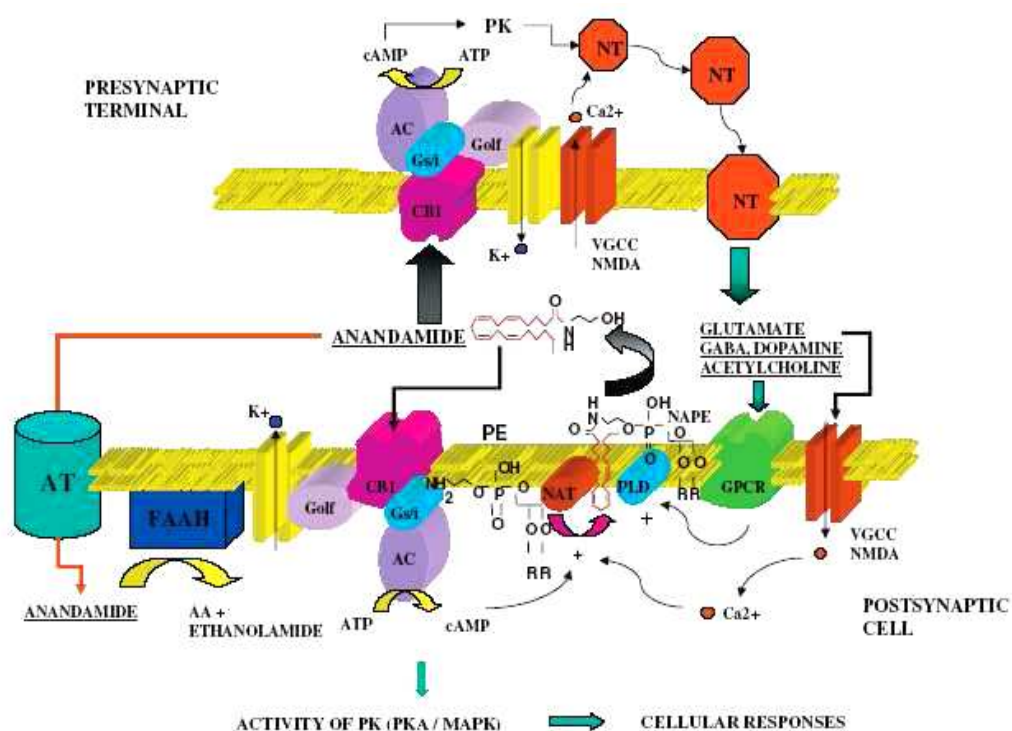
Il 2-AG viene invece prodotto dall'idrolisi enzimatica di diacilgliceroli a loro volta derivanti dall'idrolisi sia del fosfatidilinositolo, catalizzata dalla fosfolipasi di tipo C, sia dell'acido fosfatidico, catalizzata da una specifica fosfolipasi.

Una volta sintetizzati, gli endocannabinoidi si legano ai recettori CB presenti su cellule limitrofe o sulla stessa cellula che li ha prodotti, dando il via, come nel caso del THC, all'inibizione della formazione di AMP ciclico e/o dell'ingresso di ioni calcio nella cellula. Portata a termine la loro funzione, vengono rapidamente disattivati attraverso un meccanismo comprendente vari passaggi:

- processo di ricaptazione che sembrerebbe mediato, nel caso dell'anandamide da un trasportatore di membrana (AMT) della cui esistenza si hanno numerose evidenze, ma non ancora suffragate dalla sua clonazione tale per cui alcuni sostengono che l'AEA passi all'interno delle cellule solo per diffusione passiva;
- idrolisi enzimatica ad Acido Arachidico ed altri metaboliti da parte della idrolasamide degli acidi grassi (FAAH) e, solo per il 2-AG, della monoacilglicerolipasi;
- riesterificazione dei prodotti dell'idrolisi in fosfolipidi di membrana.

FAAH (Fatty Acid Amide Hydrolase), l'enzima di membrana deputato alla degradazione dell'anandamide ad acido arachidonico ed etanolamina è localizzato nel corpo cellulare e nei dendriti dei principali neuroni di corteccia cerebellare (cellule di Purkinje), ippocampo (cellule piramidali) e neocorteccia (cellule piramidali). Studi di immunistochemical ed ibridazione in situ, hanno confermato che l'espressione di questo enzima nelle diverse aree cerebrali è direttamente correlata alla densità recettoriale del CB1, occorrendo in maniera specifica su neuroni post-sinaptici[26].

Vie biochimiche per la sintesi, degradazione e azioni cellulari dell'endocannabinoide anandamide



L'inattivazione del 2-AG sembra coinvolgere anch'essa la FAAH ma solo in parte. Infatti, evidenze sperimentali recenti supportano la presenza di altri enzimi, come la mono-acilglicerolo-lipasi (MAGL), per catalizzare l'idrolisi del 2-AG ad AA e glicerolo. Sono presenti sia a livello di membrana che a livello citosolico soprattutto in quelle zone del cervello dove i recettori CB1 sono più espressi, e soprattutto in sede pre-sinaptica[27].

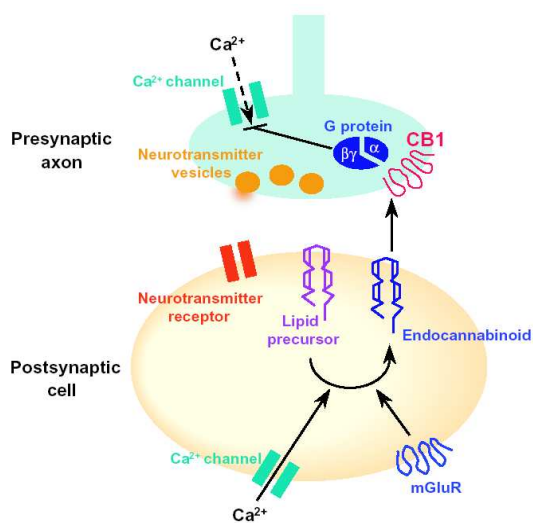
L'esistenza di diversi cammini biosintetici per AEA e 2-AG suggerisce un'azione indipendente dei due endocannabinoidi.

Questi dati, assieme alle osservazioni farmacologiche che hanno riconosciuto in tali metaboliti un comportamento analogo a quello dei preparati della cannabis, sembrano suggerire l'ipotesi che possa trattarsi di un sistema collegato al recupero

dallo stress (simile e complementare a quello esercitato dalle endorfine), che si accende quando l'organismo ha necessità di cibo, di riposo, di contatti sessuali, e si spegne quando tali bisogni sono stati soddisfatti. L'anandamide stessa è stata definita uno "stress-recovery factor" mediatrice del seguente messaggio: "relax, eat, sleep, forget and protect".

Essendo gli endocannabinoidi sintetizzati su richiesta dell'organismo in risposta a particolari stimoli fisiologici o anche patologici, esercitano un effetto di modulazione su interi circuiti neuronali che sovrintendono specifiche funzioni. Questo vale non solo nel sistema nervoso centrale ma anche nel sistema nervoso autonomo, nel sistema endocrino, immunitario, riproduttivo, nel tratto gastro-intestinale e nella microcircolazione[28].

Sono in corso numerosi studi per conoscere i processi che consentono



all'anandamide di esercitare il suo effetto sui recettori presinaptici. Naturalmente, la descrizione dell'effetto del legame dell'anandamide al recettore CB1 non può prescindere dal tipo di neurone cui si riferisce trattandosi di neuroni o eccitatori o inibitori che impiegano mediatori diversi.

A livello di SNC, la presenza dei recettori cannabinoidi sulle sinapsi

GABAergiche e glutamatergiche suggerisce il loro coinvolgimento nella modulazione della trasmissione sinaptica. Come già accennato, una eccitazione protratta del neurone pre-sinaptico determina la depolarizzazione del neurone post-sinaptico, ove attraverso un meccanismo mediato dall'apertura di canali del calcio voltaggio-dipendenti e concomitante attivazione di recettori metabotropici, vengono attivati gli enzimi preposti alla sintesi dell'endocannabinoide a partire da un precursore lipidico. L'endocannabinoide, altamente lipofilo, esce dalla cellula post-sinaptica e, attraverso

una diffusione retrograda, lega il recettore CB1 del neurone pre-sinaptico la cui attivazione blocca transitoriamente l'ingresso di ioni calcio e il rilascio calcio-dipendente del neurotrasmettitore. Quando ciò si verifica a livello dei neuroni GABAergici, determina una riduzione dell'inibizione mediata dal GABA che prende il nome di “depolarization induced suppression of inhibition”, mentre quando avviene a livello dei neuroni glutammatergici determina una riduzione dell'eccitazione mediata dal glutammato, e si definisce “depolarization induced suppression of excitation”[29].

Parte degli effetti farmacologici indotti dagli endocannabinoidi, quindi, possono essere spiegati proprio sulla base delle interazioni con questi sistemi recettoriali. Si è accertato che nella corteccia prefrontale di ratto il trasmettitore inibito è il glutammato, nell'ippocampo l'Acetilcolina e il GABA, nello striato la dopamina, e nei neuroni del grigio periacqueduttale tanto il glutammato quanto il GABA.

Numerosi studi hanno permesso di rilevare come il consumo cronico di Cannabis riduca la memoria a breve termine e ciò conferma che la stimolazione del recettore CB1 da parte degli endocannabinoidi interferisce con i processi di memorizzazione. L'ippocampo, implicato nei processi di apprendimento e consolidazione mnemonica, rappresenta una delle regioni cerebrali a maggiore densità dei recettori CB1. A questo livello gli endocannabinoidi inibiscono il rilascio di diversi neurotrasmettitori, quali GABA, glutammato e acetilcolina[30], e che la riduzione del rilascio di glutammato a livelli inferiori a quelli necessari per l'attivazione dei recettori della N-metil-D-aspartato (NMDA) sia responsabile della riduzione di memoria a breve termine osservata nelle intossicazioni da cannabis. Esperimenti condotti in topi knock-out per CB1 hanno evidenziato un notevole miglioramento della memoria di breve termine.

E' oggettivamente dimostrato che i cannabinoidi esercitano una potente azione sull'attività motoria ma il complesso ruolo svolto sui nuclei della base e cervelletto, le

aree cerebrali deputate al controllo motorio, non è ancora perfettamente chiaro. In esperimenti animali, la somministrazione di dosi crescenti di agonisti per i CB1 a livello dei nuclei della base sembrerebbe determinare un effetto trifasico: dosi molto basse di THC decrementano l'attività locomotoria, dosi intermedie stimolano la locomozione, mentre dosi più alte inducono catalessia. Nell'uomo la cannabis peggiora le prestazioni nei test di equilibrio ed in quelli che richiedono un fine controllo psicomotorio. Gli effetti sono presumibilmente legati alla loro azione modulante sull'attività neurotrasmettitoriale di dopamina, GABA e glutammato[31].

L'effetto analgesico si attribuisce al legame con il recettore CB1 degli interneuroni situati nel grigio periacqueduttale, area che gioca un ruolo centrale nella percezione del dolore delle vie dolorifiche, e al conseguente blocco del rilascio presinaptico del GABA. L'iperalgia indotta dalla somministrazione di antagonisti del recettore CB1, conferma la presenza di un controllo tonico della nocicezione mediato dai recettori CB1.

Gli endocannabinoidi svolgono un ruolo anche nella regolazione dell'assunzione di alimenti e nel controllo del peso. Questo potrebbe essere mediato da un effetto inibitorio degli endocannabinoidi sull'ormone leptina, responsabile della soppressione dell'appetito.

La distribuzione dei recettori cannabinoidi nel cervello suggerisce per gli endocannabinoidi anche un ruolo fisiologico nella regolazione di stati emotivi quali il piacere e l'aggressività e nel controllo di nausea e vomito, nella termoregolazione.

## ***2) Stroke ed endocannabinoidi***

In condizioni normali il flusso ematico cerebrale è di 50-55 ml per 100 gr di tessuto cerebrale per minuto; l'attività e la sopravvivenza del parenchima sono strettamente dipendenti dalla costanza della perfusione. Se il flusso diminuisce al di sotto di determinati valori (0-5 ml/100mg/min) si produce ischemia e si innescano

una serie di alterazioni funzionali, biochimiche e strutturali, che possono condurre rapidamente a danno irreversibile.

Questi processi si realizzano a livello del “core” ischemico, mentre a nella zona circostante dove vi è una ischemia incompleta (la cosiddetta "penombra ischemica"), l’apporto ematico è di poco sotto la soglia ischemica (20-15 ml/100mg/min) ma sufficiente a mantenere le cellule neuronali ancora vitali seppur in uno stato di stretta economia metabolica e come tali, ancora recuperabili con il ripristino del flusso cerebrale prima che il danno diventi irreversibile (6-8 ore circa).

Promuovere la sopravvivenza dei neuroni della penombra, non potendo più recuperare le cellule nervose distrutte, è il solo intervento che potrebbe ridurre l’estensione dell’area di necrosi. E' quindi la penombra ischemica il target principale dei trattamenti neuroprotettivi dell'ischemia focale cerebrale, che pure non hanno sortito fino ad ora alcuna efficacia nell’uomo[32].

I complessi meccanismi neurochimici e le modificazioni metaboliche che sottostanno al deficit di ossigeno ed energia dovuti all’ischemia, si susseguono spaziotemporalmente come una cascata di eventi secondari che include:

- a. la eccitotossicità;
- b. la produzione di radicali liberi reattivi;
- c. la formazione di acidosi tissutale;
- d. la depolarizzazione perinfartuale;
- e. l’infiammazione;
- f. la reazione gliale;
- g. l'apoptosi.



a. Nel 1969 Olney per primo, utilizzò il termine "eccitotossicità" per indicare la neurodegenerazione mediata dal glutammato e dall'aspartato, i due neurotrasmettitori eccitatori normalmente liberati nello spazio sinaptico al momento della depolarizzazione assonale.

Durante l'ischemia cerebrale, si verifica un rilascio sinaptico abnorme di glutammato ed una inibizione del re-uptake che porta ad un ulteriore incremento della sua concentrazione extracellulare. Un suo accumulo si traduce in una iperstimolazione dei recettori glutamatergici ionotropici direttamente coinvolti nell'alterazione dell'omeostasi ionica a livello della membrana neuronale: l'evento secondario più precoce della cascata di eventi tossici. L'NMDA (N-methyl-D-aspartato) rappresenta il maggior imputato nella eccitotossicità perché dipendente dallo ione calcio anche se, l'azione glutamatergica è comunque mediata da un meccanismo congiunto tra i recettori NMDA, AMPA (ingresso intracellulare di soli ioni Na) e Kainato.

Il livello intracellulare del calcio, che si mantiene in concentrazioni molto basse in condizioni fisiologiche, subisce importanti variazioni in condizioni di ipossia. In questo caso la caduta di ATP, per carenza energetica, consente un ingresso anomalo di  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}_2\text{O}$  e contemporaneo flusso di ioni  $\text{K}^+$  in uscita. L'afflusso passivo di acqua nella cellula, con conseguente stato di edema, può spiegare la lisi osmotica nel core dell'area ischemica.

Il sovraccarico di sodio e calcio intracellulare, provoca la liberazione dei neurotrasmettitori eccitatori come il glutammato a sua volta responsabile di un ulteriore accumulo di calcio NMDA-mediato, ma anche di un rimodellamento sinaptico patologico postischemico. Tra i sistemi enzimatici coinvolti: le calpaine, proteasi normalmente implicate nel dinamico rimodellamento del citoscheletro ma capaci di favorirne la distruzione in corso di ischemia[33]; il sistema delle metalloproteasi per danneggiamento della barriera ematoencefalica[34]; le proteinchinasi-C per l'induzione di fosforilazione proteica; le fosfolipasi-A, per la

produzione di acido arachidonico e la formazione di radicali liberi; le fosfolipasi-C per l'aumentato rilascio intracellulare di calcio e la stimolazione della ossido nitrico sintetasi[35].

Vi sono stati studi che dimostravano che il blocco dei recettori glutammatergici ionotropici poteva proteggere contro le conseguenze dell'evento ischemico. Con la scoperta dell'eterogeneità dei recettori NMDA sono stati evidenziati nuovi potenziali bersagli terapeutici. Gli antagonisti selettivi per la subunità NR2B del recettore NMDA potrebbero preservare la cellula durante gli eventi eccitotossici, senza interferire con le attività fisiologiche.

Numerosi studi sperimentali, hanno dimostrato che anche il pre-trattamento con farmaci calcio-antagonisti ed agenti chelanti lo ione  $Ca^{2+}$ , permette una maggior resistenza alle azioni citotossiche.

Osservazioni sperimentali suggeriscono inoltre il coinvolgimento dello scambiatore Na-Ca (NCX). E' il più importante sistema per l'espulsione cellulare del Ca in quanto media lo scambio di uno ione calcio con tre ioni sodio per ogni ciclo. Nonostante le risposte non sempre analoghe delle varie isoforme NCX1, NCX2 e NCX3, sembra che un aumento del NCX sia contemporaneo ad una riduzione del danno ischemico[36].

L'azione eccitatoria del glutammato è anche modulata da una serie di composti endogeni, alcuni dei quali dotati di proprietà neuroprotettive come la colecistochinina (inibizione NMDA) e l'adenosina (inibizione flusso intraneuronale di  $Ca^{2+}$ , aumento conduttanza a  $K^+$  e  $Cl^-$ ) per l'effetto stabilizzante il potenziale di membrana.

b. L'attivazione dei recettori NMDA provoca la produzione di ossido nitrico (NO) che può concorrere alla morte neuronale ipossica favorendo la produzione di radicali liberi, inibendo enzimi mitocondriali, danneggiando direttamente il DNA. Origina dalla L-arginina per azione della ossido nitrico sintetasi (NOS) di cui sono

note tre diverse isoforme: neuronale, endoteliale ed inducibile. Mentre l'attività della NOS endoteliale sembra essere protettiva, promuovendo la vasodilatazione e inibendo l'aggregazione piastrinica[37], la produzione di NO da parte delle NOS neuronale ed inducibile può essere dannosa.

La neurotossicità deriva dal fatto che l'ossido nitrico, reagendo con il radicale superossido, partecipa alla formazione di perossinitriti altamente tossici.

In studi sperimentali, inibitori dell'enzima NO sintetasi hanno ridotto il danno cerebrale ma solo se somministrati a basse dosi (alti dosaggi aumentavano i segni istologici di danno ischemico).

Tra le strategie terapeutiche antiossidanti meritano attenzione anche l'allopurinolo (inibisce la xantina-ossidasi che, in ischemia-riperfusion, produce gli ossidanti superossido ed perossido di idrogeno), gli scavengers dei radicali liberi (catalasi e superossododismutasi che detossificano rispettivamente il superossido ed il perossido d'idrogeno), e la vitamina E (l'alfa tocoferolo blocca la perossidazione lipidica), i glucocorticoidi (glucocorticoidi inibenti la perossidazione a livello dei vasi cerebrali).

c. L'acidosi (ph tissutale <6), aggravata dalla glicolisi anaerobia che si innesca e sfocia in produzione di acido lattico e piruvico, provoca rilascio di ferro dalla transferrina, rigonfiamento delle cellule gliali e morte dei neuroni.

L'effetto deleterio del ferro libero (perossidazione lipidica ferro-dipendente) può essere limitato dall'adozione di chelanti quali la desferriossamina; l'uso di farmaci diuretici potrebbe essere utile per ridurre il rigonfiamento della glia.

d. L'attività metabolica del tessuto coinvolto aumenta marcatamente in risposta alla richiesta di energia dovuta all'attivazione di pompe ioniche necessarie

per il mantenimento di un gradiente elettrico che permetta all'onda di depolarizzazione di auto generarsi[38]. La diffusione del glutammato e del potassio extracellulari porta ad un'onda di depolarizzazione elettrochimica eccitatoria dal core verso l'area di penombra ischemica contribuendo all'ampliamento dell'area lesionale. Questa lenta, transitoria e reversibile depressione dell'attività corticale si diffonde dal punto dove si è verificato il danno ischemico verosimilmente ad una velocità di 2-5 mm<sup>2</sup>/min.

e. La carenza di ossigeno non si manifesta solo con danni intracellulari ma anche vascolari; endotelio danneggiato può infatti innescare una serie di processi infiammatori poche ore dopo l'attacco ischemico. Un aumento dell'esposizione di molecole endoteliali di adesione (ICAM) induce il richiamo di leucociti polimorfonucleati nel tessuto infartuato. L'aggregazione di neutrofili e piastrine all'interno del lume determina ostruzione ed ulteriore danno del microcircolo. In particolare sono i neutrofili a giocare in ruolo rilevante nell'estensione del danno ischemico in quanto una volta adesi all'endotelio danneggiato possono facilmente attraversare la parete del vasi rilasciando radicali liberi e citochine proinfiammatorie che finiscono per determinare un ulteriore danno cellulare.

Nella penombra ischemica sono stati comunque individuati fattori neurotrofici (NGF, TNF alfa, BDNF, lipocortina) che oltre a intervenire nella sopravvivenza delle linee cellulari neuronali, agiscono anche sul sistema glutammatergico e sulla funzione piastrinica. Pertanto i tentativi terapeutici mirano ad aumentare l'espressione di neurotrofine, citochine antiinfiammatorie, o antagonisti del recettore per l'interleuchina I.

f. Il tessuto di sostegno gliale svolge nei confronti della cellula nervosa una complessa serie di funzioni: metabolica, neurotrofica, riparativa; proprio quest'ultima

funzione della glia costituisce un problema di notevole portata clinica, poiché questo specifico processo riparativo conduce generalmente ad una reazione gliale con anomalo orientamento delle cellule che non facilita le potenziali possibilità di riconnessione cellulare.

g. Molte cellule cerebrali, dopo insulti ischemici ripetuti o prolungati, vanno incontro ad apoptosi quale conseguenza di un programma geneticamente determinato che porta alla morte cellulare[39]. L'apoptosi comprende un insieme di eventi che iniziano con la condensazione della cromatina e successiva riduzione del volume cellulare per estrusione attraverso la membrana, di frammenti citoplasmatici che portano alla frammentazione del DNA[40]. Una varietà di geni ad azione potenzialmente neuroprotettiva sono comunque presenti a livello della penombra ischemica come bcl-2, GADD45, hypoxia-inducible factor-1.

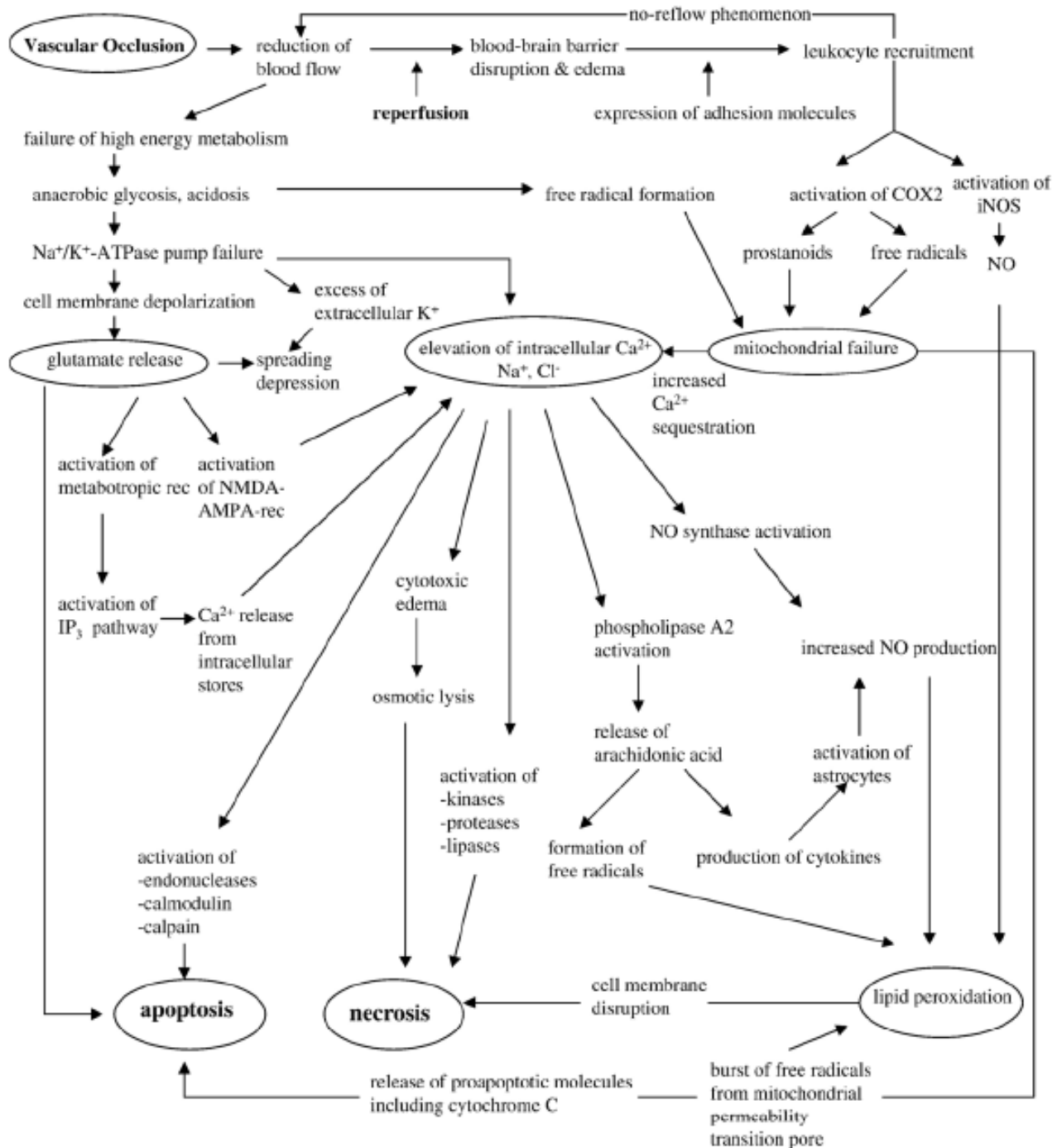
Nonostante gli incoraggianti risultati, nessuno di questi trattamenti eziologici (farmaci antagonisti glutammatergici, farmaci calcio-antagonisti, farmaci antiossidanti) si è dimostrato finora realmente efficace nel migliorare la progressione del danno ipossico-ischemico, probabilmente perché attivi contro uno solo dei meccanismi implicati. Possibile soluzione sarebbe trovare farmaci in grado di neutralizzare l'intera cascata di eventi.

Un intervento non farmacologico per il futuro, è rappresentato dalla ipotermia indotta (32-34°C da 1 a max 4 ore dopo l'insulto per 24-72 ore) perché sembrerebbe esercitare un effetto sinergico quando associata a farmaci neuro protettivi[41].

E' stata studiata da tempo in numerosi ambiti clinici: shock settico, aritmie, carcinoma metastatico, arresto cardiaco; recentemente anche in modelli sperimentali di ischemia cerebrale. E' noto che l'abbassamento di temperatura permette di ridurre la domanda di ossigeno dell'encefalo e quindi promuovere il recupero metabolico

post-ischemico (e prolungare la “finestra terapeutica”), rallentando la deplezione di ATP e riducendo il rilascio di aminoacidi eccitatori come il glutammato ma anche la permeabilità vascolare e la distruzione della BEE[42-43]. Recenti ricerche hanno suggerito l'impiego di caschetti speciali che consentano il raffreddamento soltanto del cranio. I risultati sarebbero già efficaci, negli animali di laboratorio, con l'abbassamento della temperatura di 3°C.

### Fisiopatologia del danno ischemico cerebrale



Il sistema endocannabinoide ha aperto grandi prospettive in questo scenario scientifico.

L'uso di modelli animali di malattie neurodegenerative (animali transgenici), l'impiego di modelli sperimentali di ischemia cerebrale, come l'occlusione sia permanente che transitoria dell'arteria cerebrale media (pMCAO, tMCAO), e di modelli in vitro di danno ischemico, come la deprivazione combinata di ossigeno e glucosio in fettine e colture neuronali si sono dimostrati di grande aiuto nella ricerca delle connessioni esistenti tra area ischemica e attività cannabinergica.

A conferma del ruolo neuroprotettivo è il riscontro della loro sintesi in risposta alla cascata di eventi indotta dall'ischemia e conseguentemente a ciò:

- a) la loro capacità a ridurre l'eccitotossicità interferendo sulla neurotrasmissione glutammatergica;
- b) l'effetto antiossidante sul danno ossidativo indotto da sovraesposizione a glutammato ed altri agenti lesivi;
- c) l'azione immunomodulante (sul rilascio di TNF- $\alpha$ ) e antiinfiammatoria;
- d) la capacità di ridurre la temperatura corporea.

a) L'inibizione del rilascio del glutammato, sia in “vitro” che in “vivo”, ha un ruolo primario nelle azioni neuroprotettive degli endocannabinoidi[44].

Il flusso di Ca<sup>2+</sup> attraverso i canali del recettore NMDA attivato, può stimolare la Fosfolipasi C che dà luogo alla formazione di 2-AG, attraverso la via della Diaciglicerolo lipasi. La formazione di 2-AG può attivare i recettori CB1 sui terminali presinaptici che potrebbero ridurre il rilascio del glutammato, inibire i canali del Ca<sup>2+</sup> e quindi la trasmissione sinaptica.

Anche la sintesi di anandamide e di altri cannabinoidi a struttura acil-etanolamidica (PEA,OEA) è stimolata dalla abnorme concentrazione intracellulare di  $Ca^{2+}$  e successiva attivazione della Fosfolipasi D che idrolizza l'N-arachidonil-fosfatidiletanolamina (NAPE), loro precursore fosfolipidico di membrana. Come per 2-AG, anche il loro effetto neuroprotettivo è legato alla capacità di inibire la trasmissione glutammatergica.

Rimangono ancora da chiarire molti dei meccanismi di sintesi ed anche l'abnorme espressione recettoriale limitata alla zona di penombra ischemica (che inizia dopo le 2 ore dall'insulto ischemico e può perdurare oltre le 72), certo è che il legame ai recettori CB1 rappresenta, al momento, la via principale attraverso cui i cannabinoidi mediano il loro effetto neuro protettivo[45] ma non è l'unica. Le stesse proprietà molecolari cannabinergiche o un'attivazione recettoriale non-CB1 potrebbero avere un ruolo importante.

Il cannabinoide sintetico WIN5212-2, agonista CB1, iniettato a topi sottoposti ad occlusione transitoria dell'arteria cerebrale media, ha ridotto notevolmente il volume di tessuto infartuale riducendo il rilascio di glutammato ma, la somministrazione dell'antagonista CB1, SR141716A, ne ostacolava l'effetto. A conferma di una mediazione CB1, l'evidenza, in tutti i modelli sperimentali knock-out per questi recettori, di una maggiore mortalità nei casi di pMCAO, e di un peggioramento clinico con severi deficit neurologici e maggior estensione dell'area infartuale in caso di tMCAO, ma non solo. Durante la riperfusione fu anche possibile rilevare un minor flusso cerebrale a livello della penombra ischemica e di contro, un abnorme incremento dell'NMDA neurotossico[46].

Un pre-trattamento con 1mg/kg di WIN5212-2, 30 minuti prima l'induzione dell'insulto ischemico, ha mostrato una riduzione dell'area infartuale di circa il 30%. Il farmaco di sintesi determinava un effetto analogo anche se somministrato 30 minuti dopo ma non nelle 2 ore successive. Anche in questo caso la somministrazione dell'antagonista CB1, SR141716A, riduceva l'effetto neuroprotettivo di circa l'80%,



ma solo se dato in contemporanea infatti, una sua pre-somministrazione non creava alcuna interferenza[47].

Sorprendentemente, l'isolato uso di SR141716A ha mostrato di ridurre significativamente il volume di tessuto infartuato (ben il 40%) in un modello di ischemia cerebrale da pMACO. Rimane ancora poco chiaro se il suo effetto sia espressione di un'azione diretta sui CB1 o se ne sia del tutto indipendente. L'ipotesi è che tale molecola possieda proprietà aggiuntive intrinseche neuroprotettive o di parziale agonista. Nello stesso studio si conferma, infatti, una più forte inibizione mediata dall'antagonista MK-801 sul recettore ecitossico NMDA nei topi trattati con SR141716A[48].

In un modello sperimentale di pMCAO, a 30 min dall'ischemia, alcuni topi furono trattati con soluzione salina (controllo), altri con l'antagonista MK-801 o con SR141716A. Si osservò che MK-801, pur attenuando significativamente il rilascio di glutammato, non modificava il volume infartuato contrariamente all'SR141716A. Questo infatti, anche senza modificare la liberazione dell'amminoacido eccitatorio, riduceva significativamente il volume dell'area ischemica. Una sua diretta azione sull'NMDA non è nota[49].

A conferma dell'esistenza di meccanismi non unicamente CB1 mediati vi è uno studio recente di induzione di encefalopatia ipossico-ischemica perinatale (NHIE) da deprivazione combinata di glucosio ed ossigeno (OGD) in estratti di cervello di ratti. Questa condizione determinava un incremento della lattato deidrogenasi, del TNF- $\alpha$  e della ossido nitrico sintetasi contestualmente anche ad una sovraespressione recettoriale CB1 (rispetto al controllo). Seppur non suscettibili di incremento dopo OGD, anche recettori CB2 furono identificati nelle fettine di tessuto analizzate. Il trattamento con WIN determinò una riduzione notevole degli agenti tossici che invece, non si osservò con la co-somministrazione di SR141716A, ma anche di SR144528, l'antagonista dei CB2. Ciò suggerisce una possibile co-partecipazione di entrambi i recettori nella neuroprotezione e fa ritenere il WIN un possibile agonista

CB1-CB2, ipotesi confermata anche dal maggiore effetto neuroprotettivo di WIN rispetto al risultato ottenuto dal trattamento col solo ACEA, agonista CB1, o JW133, agonista CB2[50].

b. Sia il delta-9-THC che il cannabidiolo hanno mostrato di possedere un potente effetto neuroprotettivo e principalmente antiossidante[51]. Il primo attraverso un inequivocabile meccanismo CB1-mediato, il CBD attraverso un meccanismo ancora poco chiaro ma, considerata la sua bassa affinità di legame sia per CB1 che CB2, si ritiene possano essere implicati diversi sistemi recettoriali.

Una riduzione altamente significativa dell'area ischemica è stata conseguente alla somministrazione di CBD nelle tre ore sia antecedenti che successive alla tMCAO in modello animale ma il suo effetto, contrariamente ai dati attesi, non fu inibito né da SR141716A né dall'antagonista VR1 (sebbene sia noto un effetto CB-agonista sui recettori per i vanilloidi). Un'inibizione è stata invece secondaria all'uso del WAY10135, antagonista del recettore per la serotonina 1A (5-HT<sub>1A</sub>), suggerendo una correlazione tra i due non solo come ruolo nell'ansietà e depressione ma anche nella vasodilatazione[52].

Dal confronto con antiossidanti tradizionali come la vitamina C e la E, il CBD è risultato superiore nel prevenire il danno ossidativo indotto da sovraesposizione dei neuroni al glutammato e da liberazione di perossido ed altri agenti lesivi[52]. Questi risultati, ottenuti in laboratorio, hanno avuto una prima conferma da un trial clinico su pazienti con trauma cranico severo utilizzando un cannabinoide sintetico, il dexamabinolo, analogo del CBD, che ha ridotto la pressione endocranica e migliorato l'outcome dei pazienti[53].

c. Un ruolo neuroprotettivo antiinfiammatorio è stato ipotizzato in particolare per i cannabinoidi endogeni a struttura acil-etanolamidica (come anandamide, PEA,

OEA), visto che la loro produzione risulta fortemente aumentata in sede di danno neuronale.

Uno studio eseguito in vivo su un uomo con esteso infarto ischemico cerebrale da occlusione dell'arteria cerebrale media sinistra, ha potuto constatare, attraverso la tecnica di microdialisi, un'alta concentrazione di anandamide, PEA e OEA nella penombra ischemica al primo giorno di ischemia, strettamente correlato agli alti livelli di glutammato, glicerolo e lattato, precoci markers di insulto ipossico. Nello specifico, un risultato altamente significativo è stato riscontrato tra lattato ed anandamide e tra lattato e PEA[54].

Anche la determinazione in tessuto cerebrale murino di danno eccitotossico NMDA-mediato, causava il rilascio di Anandamide nella sede lesionale e la contemporanea invasione di cellule immunitarie cerebrali (microglia) sul microcircolo, facendo supporre un suo intervento nel conseguente specifico “pathway” di segnale molecolare che sopprime la produzione di ossido nitrico, limita le reazioni immunitarie neurodegenerative, riduce l'estensione della risposta infiammatoria. E' solo parziale la conoscenza del meccanismo recettoriale coinvolto. Se è certo che la anandamide moduli la sua azione legandosi preferenzialmente ai recettori CB1 e TRPV1 è altrettanto certo che siano i CB2 i recettori identificabili nella microglia[55].

In vitro, l'uso dell'agonista CB1/CB2 (WIN5212-2) e dell'agonista selettivo per CB2 (JWH-133) ha inibito la migrazione cellulare mentre, nessun loro effetto sarebbe stato riscontrato con la co-somministrazione dell'antagonista CB2 (SR144528).

Anche l'uso in vitro di THC ha inibito la secrezione di citochine e chemochine proinfiammatorie ed anche in questo caso il suo effetto è stato ostacolato dall'antagonista CB2.

Il ruolo dei CB2 nell'effetto immunomodulante e antiinfiammatorio dei cannabinoidi ha suggerito l'ipotesi di una loro potenziale implicazione in una patologia infiammatoria cronica come l'aterosclerosi.

L'analisi in topi apolipoproteina E knockout (ApoE<sup>-/-</sup>), modelli di aterosclerosi, ha mostrato la presenza dei recettori CB2 nell'ateroma e l'immunofluorescenza ne conferma l'espressione su macrofagi e linfociti T presenti a livello della placca ateromasica. Vasi del tutto normali ne risultavano invece privi; nessuna evidenza è stata segnalata per i CB1 sui due modelli di vasi. Il potente effetto anti-aterosclerotico del THC (altamente liposolubile e quindi preferenzialmente distribuito su tessuti ricchi di lipidi, dai livelli ematici molto bassi in topi ipercolesterolemici) è confermato da una sua abolizione in presenza di antagonisti CB2[56].

Anche un recente studio di induzione di ischemia transitoria in un modello murino, ha evidenziato come la somministrazione di agonisti CB2 (O-3853, O-1966) fosse in grado di ridurre l'estensione del volume ischemico e la disabilità neurologica rispetto a un gruppo di controllo. Tale miglioramento si associava a una riduzione dell'adesione dei leucociti a livello endoteliale cerebrale [57].

Infine un altro studio in un modello murino di stroke, è stato documentato un incremento di PEA e AEA a livello dell'area ischemica, contemporaneamente a un incremento della motilità microgliale, suggerendo che tali endocannabinoidi possano modulare l'estensione del danno agendo anche sul controllo dell'attività antinfiammatoria microgliale [58].

d. Il delta-9-THC come altri agonisti CB1, hanno mostrato di possedere un importante effetto ipotermico anch'esso verosimilmente implicato nei meccanismi neuroprotettivi.

In modello animale pMCAO, l'uso del delta-9-THC oltre a ridurre in maniera significativa il volume infartuale nelle 4 ore dall'insulto ischemico ha determinato

anche una riduzione della temperatura rettale. Entrambi i due effetti furono completamente aboliti somministrando SR141716A (per la sua azione di antagonista sui CB1) e/o determinando un rialzo termico che bloccherebbe l'incremento dell'espressione recettoriale CB1 rilevato a a 24 ore dall'ischemia nello striato e in corteccia ma non nell'ipotalamo ciò suggerisce un meccanismo termoregolatore ipotalamo-indipendente[59].

Anche una singola dose di HU210, un potente agonista sintetico CB1, riducendo la temperatura corporea ha garantito una ulteriore protezione in un modello animale di pMCAO[60].

Secondo i risultati ottenuti dalle ricerche in corso, i cannabinoidi sarebbero in grado di salvare ciò che non è ancora irreparabilmente distrutto. Naturalmente, tempi, posologia, modalità di somministrazione, scelta del cannabinoide e l'eventuale sua tossicità influenzano ancora ogni sperimentazione.

## **Scopo dello studio**

Con il presente studio abbiamo voluto indagare il coinvolgimento degli endocannabinoidi nella patogenesi dell'ischemia cerebrale in fase acuta nell'uomo, verificando se:

- 1) il livello ematico dei principali endocannabinoidi (AEA, 2-AG, PEA) in pazienti con stroke ischemico in fase acuta (entro sei ore dall'esordio del quadro clinico) sia maggiore rispetto a una popolazione di controllo;
- 2) l'evoluzione temporale delle concentrazioni periferiche degli endocannabinoidi abbia caratteristiche peculiari (picco iniziale, picco bifasico, picco tardivo);
- 3) le concentrazioni ematiche degli endocannabinoidi nei pazienti con stroke ischemico siano correlate al grado di disabilità neurologica e/o all'estensione della lesione ischemica.

## Materiali e metodi

### Soggetti

Nello studio presente sono stati valutati due gruppi di soggetti: un gruppo di 10 pazienti con stroke ischemico in fase acuta (Gruppo A) e un gruppo di 8 soggetti di controllo (Gruppo B), bilanciati per caratteristiche demografiche (età, sesso) e metaboliche (indice di massa corporea, glicemia, colesterolemia, trigliceridemia).

Sono stati inclusi 10 pazienti (M/F=5/5; età media  $70\pm 13$  anni; mediana NIHSS= $13\pm 8$ ) affetti da primo stroke in territorio di arteria cerebrale media con presenza, quanto meno, di ipostenia all'arto superiore, insorto da non oltre sei ore. I criteri di esclusione prevedevano: pregressi stroke, patologie degenerative del SNC o psichiatriche, uso di sostanze psicotrope, abuso di alcolici, malattie infiammatorie acute o croniche. Tutti i pazienti, al momento dell'inclusione nello studio previo consenso informato, sono stati sottoposti a valutazione clinica generale e neurologica con l'uso di apposite scale di valutazione della disabilità neurologica (NIHSS; subitem per arto superiore della Fugl-Meyer Scale). Inoltre tutti i pazienti sono stati sottoposti a TC cerebrale al momento dell'accesso in Pronto Soccorso (per escludere sanguinamenti intracranici) e a 48 ore dall'esordio del quadro clinico (valutazione estensione del danno ischemico). Infine sono state anche somministrate a tutti i pazienti scale per esclusione di sintomatologia depressiva (Scala di Beck) e di valutazione dello stato funzionale pre-stroke (modified Rankin Scale).

Al momento del ricovero (T0), a 12 ore (T1) e a 24 ore (T2) dall'esordio clinico, tutti i pazienti sono stati sottoposti a prelievo ematico per il dosaggio plasmatico dei livelli di endocannabinoidi (AEA, 2-AG, PEA). Contestualmente al primo prelievo sono stati inoltre valutati glicemia a digiuno, colesterolemia totale,

trigliceridemia; è stato infine misurato l'indice di massa corporea (BMI), secondo la formula:  $BMI = \text{peso(Kg)} / \text{altezza(m)}^2$ .

Per difficoltà organizzative non è stato possibile effettuare i prelievi ematici a T1 e T2 in tre pazienti. Inoltre un paziente è stato sottoposto, dopo il ricovero, a trombolisi sistemica, per cui non è stato possibile determinare il volume ischemico cerebrale a 48 ore dall'esordio clinico.

Gli 8 soggetti di controllo del gruppo B (M/F=4/4; età media  $70 \pm 12$  anni) sono stati reclutati utilizzando i medesimi criteri di esclusione del gruppo A. Tutti i soggetti di controllo, dopo aver fornito consenso informato scritto per aderire allo studio, sono stati sottoposti a prelievo ematico per dosaggio dei livelli plasmatici di endocannabinoidi e dei parametri metabolici (glicemia a digiuno, colesterolemia totale, trigliceridemia), a screening per depressione (tramite Scala di Beck) e a determinazione del BMI.

### **Dosaggio degli endocannabinoidi**

I campioni di sangue, raccolto in provette con EDTA, sono stati immediatamente centrifugati, raccolti in criovials e congelati a  $-80^\circ\text{C}$ .

I sieri ottenuti da centrifugazione, sono stati sottoposti ad un processo di estrazione con una miscela cloroformio/metanolo (2:1), in presenza dei seguenti standard interni: 5 pmol d8-AEA e 50 pmol d8-2-AG (Cayman Chemicals, Michigan, USA). I lipidi contenuti nella fase organica sono stati purificati su colonna di silice mediante open-bed chromatography. Per questo tipo di purificazione, la colonna è stata impaccata con una sospensione di silice in  $\text{CHCl}_3$  (in rapporto di massa 50:1 riferito al peso dell'estratto organico). Il campione è stato caricato e sono state fatte eluire miscele di solventi a polarità crescente: due letti di  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  in rapporto 99:1 la cui frazione era costituita principalmente da steroli; due letti di  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  in rapporto 9:1 contenente le N-aciletanolammine ed i monoacilgliceroli; infine, due



letti di CHCl<sub>3</sub>/MeOH in rapporto 1:1, contenente composti appartenenti alla famiglia delle N-acil-fosfatidil-etanolammine (NAPEs), ivi compreso il NArPE, precursore biosintetico dell'AEA. Le frazioni contenenti AEA e 2-AG sono state analizzate mediante cromatografia liquida ad alta pressione accoppiata a spettrometria di massa (LCAPCI- MS). Le analisi sono state condotte utilizzando un apparecchio Shimadzu per HPLC (LC-10ADVP) accoppiato ad un quadripolo MS (Shimadzu, LCMS-2010) attraverso un'interfaccia APCI (Shimadzu) e una colonna HPLC Phenomenex (C-18, 150 mm, 5 µm, 4.6 mm) a fase inversa. La fase mobile, costituita da una miscela di metanolo/acqua/acido acetico (85/15/0.1), attraversava la colonna ad una velocità di 1 ml/min. La determinazione dello spettro di massa è avvenuta secondo il monitoraggio di ioni selezionati (SIM). Gli ioni selezionati corrispondevano ai valori massa/carica (m/z) di 348 e 356 (ioni molecolari dell'AEA non deuterata e deuterata), 379 e 384 (ioni molecolari del 2-AG non deuterato e deuterato). Il tempo di ritenzione dell'AEA era di 10 minuti, mentre quello del 2-AG era di 13 minuti. Il rapporto delle aree tra il composto endogeno, non deuterato, e quello deuterato, ha permesso di determinare quantitativamente i livelli dell'AEA e del 2-AG. La determinazione dei livelli di AEA e 2-AG è stata ottenuta per diluizione isotopica degli standard interni e le pmol di Endocannabinoidi ottenute (valori "raw") sono state normalizzate per milligrammi di estratto lipidico (valori "corretti").

### **Determinazione del volume ischemico**

Ciascun paziente è stato sottoposto a TC cerebrale utilizzando uno scanner Toshiba Aquilion (Toshiba Medical Systems), ottenendo 28 sezioni contigue con spessore di 5 mm e tempo di acquisizione di 2 s (120 kV, 250 mA). Le TC cerebrali senza mdc eseguite a T0 e a 72 ore dei soggetti affetti da stroke ischemico sono state visualizzate per confermare la presenza di ischemia in sede di arteria cerebrale media. In seguito tali esami sono stati trasformati dal formato DICOM a quello Analyze tramite l'uso di MRicro (<http://www.mricro.com>; Rorden and Brett, 2000) e

sottoposte a valutazione del carico lesionale in maniera semiautomatica, grazie all'uso di Analyze 7.5 (Biomedical Imaging Resource, Mayo University). E' stato delineato il perimetro dell'area ischemica in ogni sezione delle TC (Fig.1); è stata poi in maniera automatica calcolata l'area ischemica per ogni sezione. In seguito ciascuna area è stata moltiplicata per la distanza tra sezioni TC contigue (5 mm) e infine il volume complessivo è stato misurato con la somma delle aree ischemiche relativa a ciascuna sezione TC.

### **Analisi statistica**

Grazie all'uso di SPSS 13.0 (SPSS Inc.) sono state eseguite le seguenti analisi statistiche: 1) le differenze dei livelli di endocannabinoidi tra i due gruppi sono state valutate tramite Mann-Whitney U test (distribuzioni non-normali, campioni di bassa numerosità) con soglia di significatività  $p < 0.05$ ; 2) correlazioni tra disabilità clinica (NIHSS, Fugl-Meyer Scale) e livelli plasmatici di endocannabinoidi nel gruppo di pazienti con primo stroke ischemico; correlazioni tra livelli plasmatici di endocannabinoidi e parametri demografico-laboratoristici (BMI, glicemia, trigliceridemia, colesterolemia) nei soggetti di controllo; correlazioni tra livelli plasmatici di endocannabinoidi e volume lesionale TC cerebrale nei pazienti con stroke ischemico: è stato utilizzato lo Spearman rho test (distribuzioni non-normali; effetti non-lineari).

## **Risultati**

### **Parametri demografici**

I parametri demografici e clinici nei due gruppi di soggetti (pazienti e controlli) non presentano differenze statisticamente significative (Tabelle 1-3 e 2).

La disabilità clinica nei pazienti con stroke ischemico, a sei ore dall'esordio dei sintomi, variava tra 3 e 29 (NIHSS) e tra 8 e 44 (Fugl-Meyer Scale, arto superiore). Tutti i pazienti, nella TC cerebrale di controllo a 72 ore dall'esordio del quadro clinico presentavano una lesione ischemica in territorio di arteria cerebrale media.

### **Livelli plasmatici di endocannabinoidi**

I livelli plasmatici di Anandamide, corretti per mg di lipidi, variavano nei controlli tra 0.5 e 5.0 pmol/mg di lipidi (mediana 1.22 pmol/mg di lipidi), mentre nei pazienti erano compresi tra 1.42 e 9.3 pmol/mg di lipidi (mediana 2.24 pmol/mg di lipidi). I dati provenienti dalla popolazione di controllo, erano in accordo con quelli già esistenti, misurati in maniera analoga[61-62]. I valori plasmatici di Anandamide “raw” variavano invece tra 2.78 e 34.98 pmol/mL nei soggetti sani e tra 11.26 e 52.10 pmol/mL nei pazienti affetti da stroke.

I livelli plasmatici di 2-AG nella popolazione di controllo erano compresi tra 0.83 e 28.54 pmol/mg di lipidi (mediana 3.2 pmol/mg di lipidi), mentre nei pazienti oscillavano tra 0.69 e 23.86 pmol/mg di lipidi (mediana 0.86 pmol/mg di lipidi). I dati provenienti dalla popolazione di controllo erano simili, per quanto concerne il valore della mediana, con quelli pubblicati[63]. I livelli plasmatici di 2-AG “raw” variavano tra 4.84 e 176.97 pmol/mL nei soggetti sani e tra 4.24 e 150.35 pmol/mL nel gruppo di pazienti.

I livelli plasmatici di PEA nella popolazione di controllo erano compresi tra 1.81 e 2.55 pmol/mg di lipidi (mediana 1.96 pmol/mg di lipidi), mentre nei soggetti affetti da stroke erano tra 1.23 e 4.39 pmol/mg di lipidi (mediana 2.45 pmol/mg di lipidi). I valori plasmatici di PEA “raw” oscillavano tra 8.23 e 16.24 pmol/mL nei soggetti sani, del tutto sovrapponibili ai dati riportati dai studi precedenti [64]. Tali valori variavano invece tra 8.16 e 25.93 pmol/mL nei pazienti affetti da stroke.

### **Anandamide e stroke**

Esiste una differenza statisticamente significativa (fig. 2 e 3) tra i livelli plasmatici di anandamide nei due gruppi (Mann-Whitney U test  $<0.05$ ) a T0, tale per cui i pazienti presentavano concentrazioni più elevate dell'endocannabinoide. Al contrario non esistevano differenze significative tra i livelli plasmatici di AEA nei soggetti di controllo e nei pazienti, a timepoint differenti; inoltre non si evidenziano andamenti temporali specifici di tali livelli nel gruppo di pazienti.

All'interno del gruppo A si osservava una correlazione significativa di tipo inverso tra punteggio della Fugl-Meyer Scale e concentrazione plasmatica di anandamide a T0 (Spearman  $\rho = -0.929$  e  $-0.819$  per livelli di AEA “raw” e corretti rispettivamente; Fig. 4 e 5), tale per cui maggiore la concentrazione plasmatica, maggiore la disabilità a carico dell'arto superiore lesa. Non si osservava invece alcuna correlazione tra i livelli di AEA a timepoint differenti e disabilità neurologica.

Si è infine osservato un trend alla correlazione tra volume lesionale calcolato in mL e concentrazioni plasmatiche di AEA a T0 (Spearman  $\rho = 0.650$  e  $0.667$  per livelli di AEA “raw” e corretti), tale per cui a dimensioni ischemiche maggiori corrispondono livelli più elevati di AEA (Fig. 6).

### **Altri endocannabinoidi e stroke**

Non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa dei livelli plasmatici di PEA e 2-AG a ciascun timepoint, tra i due gruppi. Esiste invece una correlazione significativa diretta tra la disabilità valutata con la NIHSS e i livelli plasmatici di PEA (Spearman rho=0.888 e 0.823 per i livelli di PEA “raw” e corretti, rispettivamente; Fig. 7 e 8), tale per cui maggiore la concentrazione plasmatica di PEA, più invalidante lo stroke ischemico.

### **2-AG e metabolismo lipidico**

Nel gruppo di controllo si è evidenziata una correlazione significativa tra livelli plasmatici “raw” di 2-AG e BMI (Spearman rho=0.830; Fig 9) o la colesterolemia (Spearman rho=0.905; Fig. 10), tale per cui a più elevati livelli di 2-AG corrispondevano maggiori valori di BMI e colesterolemia.

## Discussione

Il presente è il primo studio che abbia dimostrato il coinvolgimento del sistema degli endocannabinoidi in vivo, in una coorte di pazienti affetti da primo stroke ischemico, con un significativo incremento dei valori plasmatici di AEA a sei ore dall'esordio dei sintomi, rispetto a una popolazione di controllo bilanciata per stato metabolico, sesso ed età.

In un precedente studio su un modello murino di stroke[65], il contenuto cerebrale di anandamide era aumentato nelle prime ore dopo l'insorgenza del quadro clinico, raggiungendo le concentrazioni di picco a livello di penombra ischemica circa sessanta minuti dopo l'occlusione dell'arteria cerebrale media. Anche in uno studio su un singolo paziente affetto da stroke ischemico molto esteso, tramite microdialisi cerebrale, è stato possibile riscontrare elevate livelli di AEA nella penombra ischemica almeno nella prima giornata; inoltre le concentrazioni centrali di AEA erano correlate con quelle di lattato, indice di danno ipossico[54]. Nel nostro studio i livelli di AEA ottenuti a T1 e T2 non erano statisticamente differenti da quelli misurati nella popolazione di controllo, suggerendo pertanto una progressiva normalizzazione non-lineare delle concentrazioni di AEA, in linea con pregressi studi [54-65]. Dato che gli endocannabinoidi, e in particolare AEA, sembrano agire soprattutto come mediatori locali e non come ormoni circolanti, la rilevanza delle variazioni plasmatiche delle concentrazioni di tali molecole in termini di fisiopatologia dello stroke non è facilmente dimostrabile. Tuttavia è ormai evidente come anche in altre patologie di tipo neurologico o psichiatrico vi siano variazioni significative dei livelli periferici di endocannabinoidi, come nella sclerosi multipla[66], nella Corea di Huntington[67], nell'emicrania[68-69], nella depressione[70], nella schizofrenia[61] e nell'anoressia nervosa[62]. Pertanto, anche se in tali patologie ci si aspetta un coinvolgimento degli endocannabinoidi a livello encefalico, vi è chiaramente un effetto di “spill-over” verso la circolazione periferica, la cui entità verosimilmente riflette la severità della condizione in esame, come nel

presente studio. In accordo con ciò, i livelli periferici di endocannabinoidi sono generalmente minori di una o due ordini di grandezza rispetto al contenuto cerebrale.

Nel nostro studio inoltre il contenuto di AEA era significativamente correlato in maniera diretta con la disabilità neurologica valutata tramite il subitem degli arti superiori della FMS e con il volume ischemico. In uno studio precedente in un modello murino di stroke, erano stati osservati un maggiore coinvolgimento neurologico e una maggiore estensione dello stroke in topi knockout per il recettore CB1 rispetto a topi wild-type, suggerendo la presenza di attività “neuroprotettiva” CB1 dipendente dopo legatura permanente di arteria cerebrale media[46]. In un altro studio, per di più, era stato notato un incremento dell’espressione del recettore CB1 a livello neuronale, nelle zone di confine intorno all’area ischemica (penombra), a partire da due ore dopo l’induzione di stroke in un modello murino[45]. Tutti questi dati permettono pertanto di ipotizzare un rilascio precoce e transitorio di AEA dopo lo sviluppo di ipossia cerebrale focale, in linea con l’ipotesi che tale incremento corrisponda a una reazione di feed-back negativo volta alla riduzione del danno eccitotossico scatenato dall’insulto ischemico, attraverso l’attivazione dei recettori CB1[71]. I nostri dati pertanto suggeriscono come un simile meccanismo di adattamento avvenga anche nelle fasi precoci dopo stroke ischemico nell’uomo.

Nel nostro studio il contenuto plasmatico di PEA non era significativamente diverso da quello dei soggetti di controllo; tuttavia, i livelli periferici di PEA a T0 nei pazienti erano correlati in maniera diretta con la disabilità neurologica valutata tramite NIHSS. In un precedente studio su un modello murino di stroke era stato evidenziato un incremento dei livelli encefalici di PEA e AEA a 24 ore dalla legatura dell’arteria cerebrale media[58]. Inoltre nel già citato studio di micro dialisi in un singolo paziente affetto da stroke, era stato documentato un incremento di PEA e AEA nella penombra ischemica, durante le prime 24 ore dall’esordio clinico[54], suggerendo pertanto un ulteriore coinvolgimento degli endocannabinoidi nella patogenesi del danno ischemico, oltre alla riduzione CB1 mediata della eccito

tossicità. Infatti, oltre alla riduzione di eccitotossicità[18] e di stress ossidativo[20], PEA è in grado di modulare l'attivazione e la proliferazione microgliale[21], che verosimilmente regola le comuni reazioni infiammatorie visibili già 3-4 giorni dopo un evento ischemico cerebrale[72]. In accordo con tali ipotesi e con i nostri dati, sono state osservate importanti variazioni del contenuto cerebrale di PEA in altre patologie di interesse neurologico, quali sclerosi multipla[73], dolore neuropatico[74] e Corea di Huntington[75].

Diversamente da quanto emerso per AEA e PEA, non abbiamo trovato alcuna differenza dei livelli periferici di 2-AG tra i due gruppi, non è stata nemmeno evidenziata alcuna correlazione tra le concentrazioni di tale endocannabinoide e disabilità neurologica. Anche in tutti gli studi su modelli di stroke [54-58-65], tranne uno[76], non è stato dimostrato il coinvolgimento di 2-AG nella patogenesi del danno ischemico. Recentemente è stato pubblicato un secondo lavoro [77] in cui veniva evidenziato un incremento dei livelli centrali di 2-AG dopo induzione di stroke in un modello murino. I risultati di tale studio, tuttavia, potrebbero essere almeno in parte inficiati dalla somministrazione intermittente di oppioidi, visto che già in precedenza era stato dimostrato che l'uso acuto e cronico di tali sostanze determina importanti variazioni del contenuto centrale di AEA e 2-AG [78-79].

Un recente studio in pazienti con sclerosi multipla recidivante-remittente in fase di ricaduta ha dimostrato un incremento dei livelli liquorali e periferici di AEA, che erano correlati con il numero di placche attive in RM cerebrale, suggerendo pertanto un ruolo patogenetico di AEA in differenti patologie neurologiche in fase acuta[66]. Molto recentemente, inoltre, è stato evidenziato come, quanto meno a livello di corteccia striatale di topo, le azioni fisiologiche di AEA e 2-AG siano correlate in maniera inversa; a livelli crescenti di AEA corrispondeva infatti una riduzione delle concentrazioni e della sintesi di 2-AG e viceversa[80].

Nel nostro studio infine, abbiamo osservato una correlazione tra i livelli plasmatici di 2-AG e BMI o colesterolemia totale, ulteriormente supportando i dati



precedenti che evidenziavano un legame tra tale endocannabinoide e il metabolismo lipidico[63-81].

In conclusione i nostri dati, provenienti da pazienti con stroke ischemico, sono in accordo con quanto segnalato per altre patologie neurologiche[82] ed evidenziano un incremento dei livelli di AEA durante le fasi acute, riflettendo probabilmente una insufficiente risposta di feedback al danno neuronale e permettendo di ipotizzare che un “boosting” farmacologico del tono cannabinergico possa esitare in riduzione della perdita neuronale. Al momento attuale diversi studi colturali e in modelli animali hanno documentato come in differenti modelli sperimentali di patologie neurologiche, la somministrazione di agonisti CB1 e/o CB2 conducano a un miglioramento del quadro clinico e/o radiologico[47-50-57-83]. I dati oggi a disposizione inducono quindi, secondo la nostra opinione, il bisogno di ulteriori studi di approfondimento sulle potenzialità terapeutiche della modulazione di AEA e PEA dopo stroke ischemico.

## Tabelle e figure

ID	Sex	Age	AEA	AEA corr	2-AG	2-AG corr	PEA	PEA corr	FMS	Volume (mL)	NIHSS	Glucose	BMI	Cholesterol	Triglycerides
1	F	79	13.39	2.13	150.35	23.86	17.46	2.77	28	41.6	13	99	23	176	118
2	M	66	13.22	2.36	4.59	0.82	19.05	3.40	24	91.5	22	82	27	151	104
3	F	63	52.10	9.30	3.86	0.69	13.75	2.45	8	92.1	5	108	26	237	215
4	F	82	25.95	3.93	8.60	1.30	8.16	1.23	18	76.1	4	111	29	233	84
5	F	83	17.53	1.90	18.67	2.03	25.59	2.78	24	101.3	29	128	28	279	121
6	M	72	17.60	2.55	6.24	0.90	15.45	2.24	20	60.8	3	89	25	264	180
7	F	80	43.12	7.31	16.11	2.73	25.93	4.39	12	164.9	17	92	20	165	75
8	M	74	13.64	1.82	5.48	0.73	18.38	2.45	20	35.8	14	103	27	203	130
9	M	59	13.62	1.47	4.24	0.46	16.13	1.73	24	-	10	105	23	198	114
10	M	42	11.26	1.42	4.98	0.63	10.11	1.28	44	20.9	4	98	24	210	120

**Tab. 1:** Caratteristiche demografiche dei pazienti affetti da stroke (Gruppo A) con concentrazioni plasmatiche degli endocannabinoidi all'ingresso (T0) e volume lesionale al controllo TC a 48 ore dall'esordio clinico. AEA=anandamide corr=valori corretti per mg di lipidi. Livelli di endocannabinoidi "Raw" in pg/mL; livelli di endocannabinoidi corretti in pg/ mg di lipidi.

Subj ID	Sex	Age	AEA	AEA corr	2-AG	2-AG corr	PEA	PEA corr	Glucose	BMI	Cholesterol	Triglycerides
1	F	66	2.78	0.45	73.56	11.86	15.84	2.55	134	28	247	125
2	M	65	7.91	1.16	6.06	0.89	13.02	1.91	102	22	148	141
3	M	79	6.93	1.24	24.52	4.38	11.29	2.02	101	26	204	135
4	F	76	5.75	0.99	4.84	0.83	13.08	2.25	100	21	189	134
5	F	82	8.28	1.33	176.97	28.54	11.21	1.81	102	26	267	123
6	M	79	15.01	3	7.29	1.46	8.23	1.65	107	23	214	103
7	F	81	34.98	5.14	13.76	2.02	16.24	2.39	104	26	191	137
8	M	46	7.68	1.2	28.44	4.44	12.04	1.88	86	25	226	90

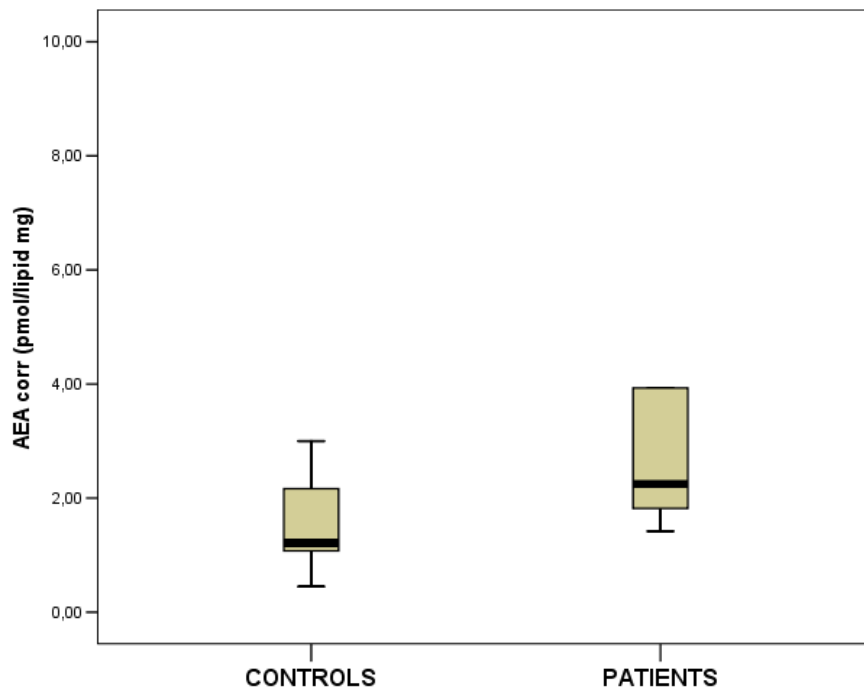
**Tab. 2:** Caratteristiche demografiche dei soggetti di controllo (Gruppo B).  
 AEA=anandamide corr=valori corretti per mg di lipidi. Livelli di endocannabinoidi “Raw” in pg/mL; livelli di endocannabinoidi corretti in pg/ mg di lipidi.

ID	Sex	Age	AEA I	AEA I corr	2-AG I	2-AG I corr	PEA I	PEA I corr	AEA II	AEA II corr	2-AG II	2-AG II corr	PEA II	PEA II corr
1	F	79	27.06	4.36	86.45	13.94	13.42	2.16	56.90	8.62	7.32	1.11	17.31	2.62
2	M	66	9.63	1.30	48.35	6.53	13.24	1.79	22.93	3.95	28.41	4.90	10.89	1.88
3	F	63	17.65	1.46	7.83	0.65	23.14	1.91	8.33	0.82	6.68	0.66	10.66	2.58
4	F	82	15.36	1.92	9.19	1.15	9.07	1.13	9.07	1.08	5.74	0.68	7.71	0.92
5	F	83	10.73	1.31	16.01	1.95	20.20	2.46	11.89	1.52	62.79	8.05	22.01	2.82
6	M	72	14.41	2.12	5.24	0.77	14.71	2.16	23.53	3.73	7.75	1.23	11.66	1.85
7	F	80	19.00	7.60	18.82	7.53	10.89	4.36	11.73	2.35	32.00	6.40	12.57	2.51
8	M	74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	M	59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	M	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

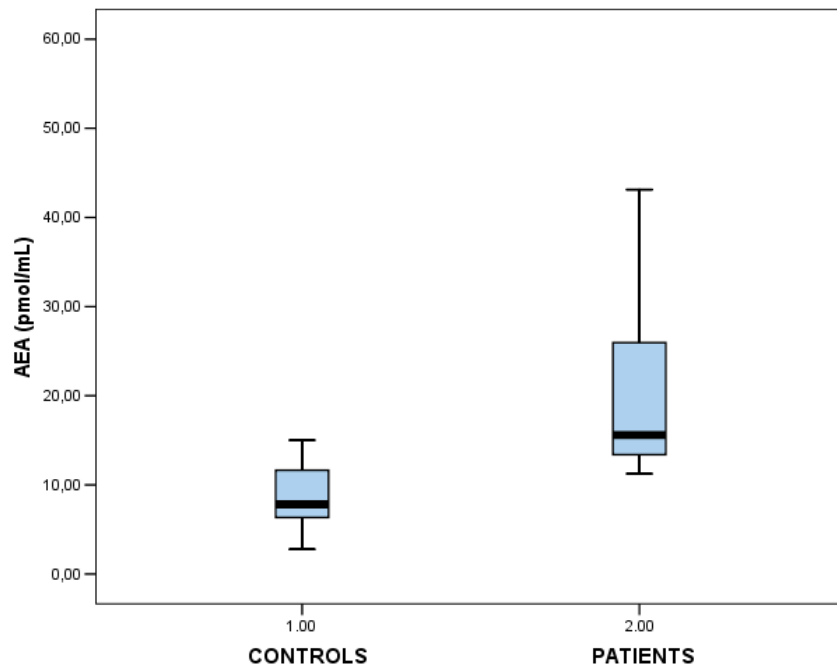
**Tab. 3:** Livelli periferici di endocannabinoidi nel Gruppo A a T1 e T2. AEA=anandamide corr=valori corretti per mg di lipidi. Livelli di endocannabinoidi “Raw” in pg/mL; livelli di endocannabinoidi corretti in pg/mg di lipidi.



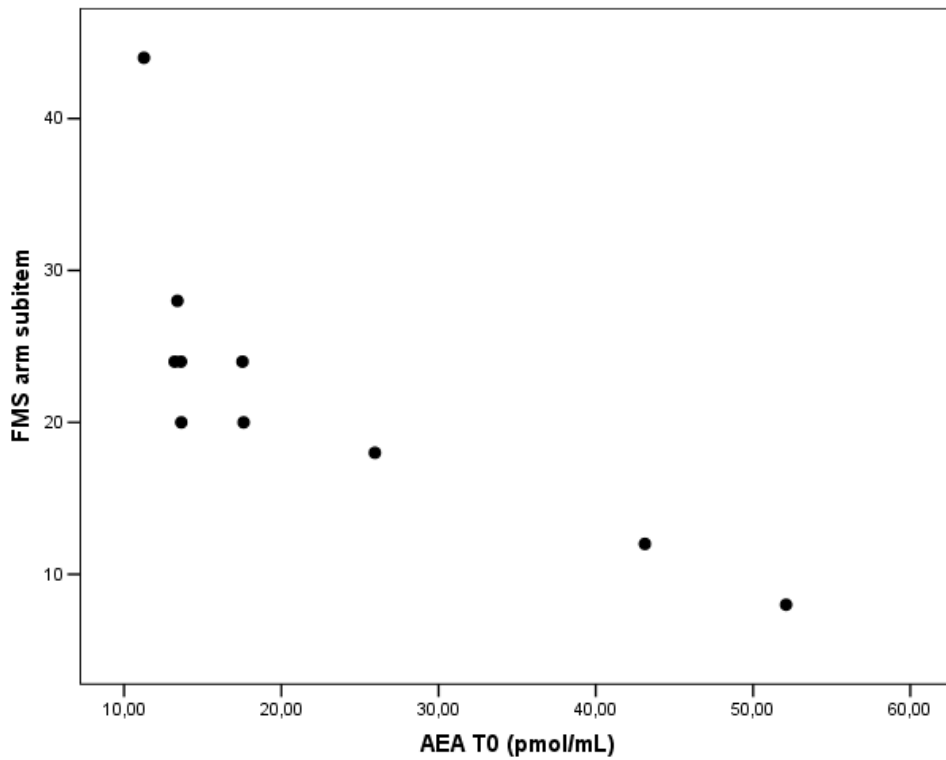
**Fig. 1:** Immagine esemplificativa di delimitazione della lesione ischemica per il calcolo del volume lesionale.



**Fig. 2:** Box-plot dei livelli corretti di anandamide nei due gruppi. Mann-Whitney U test  $p < 0.05$ .

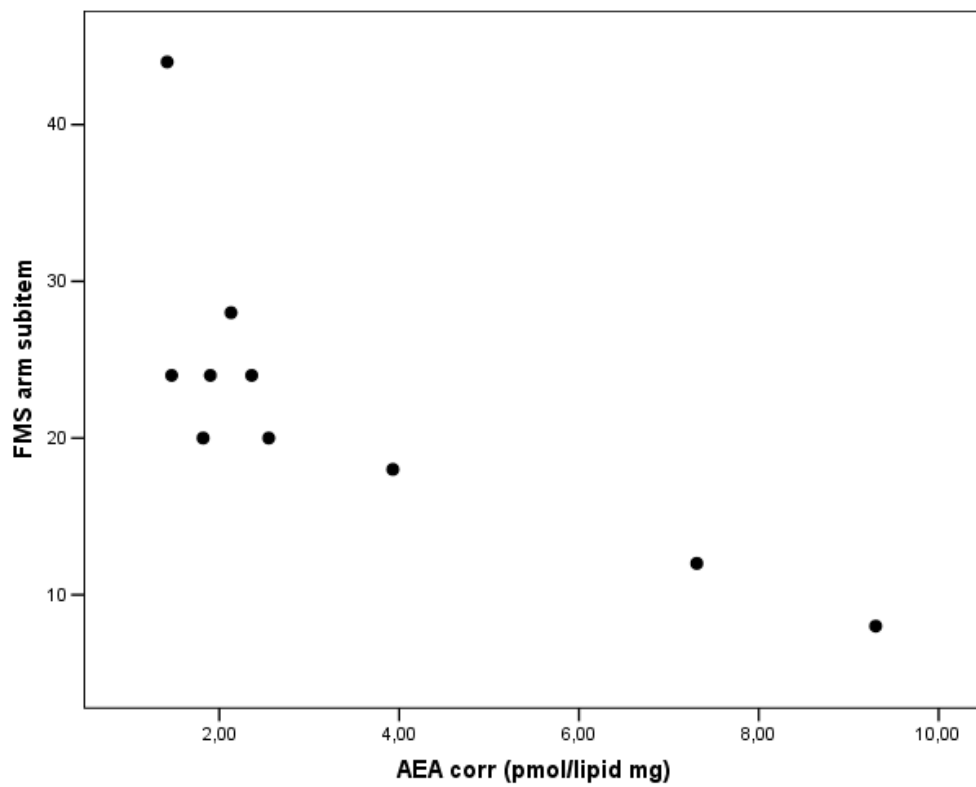


**Fig 3:** Box-plot dei livelli “raw” di anandamide nei due gruppi. Mann-Whitney U test  $p < 0.05$ .

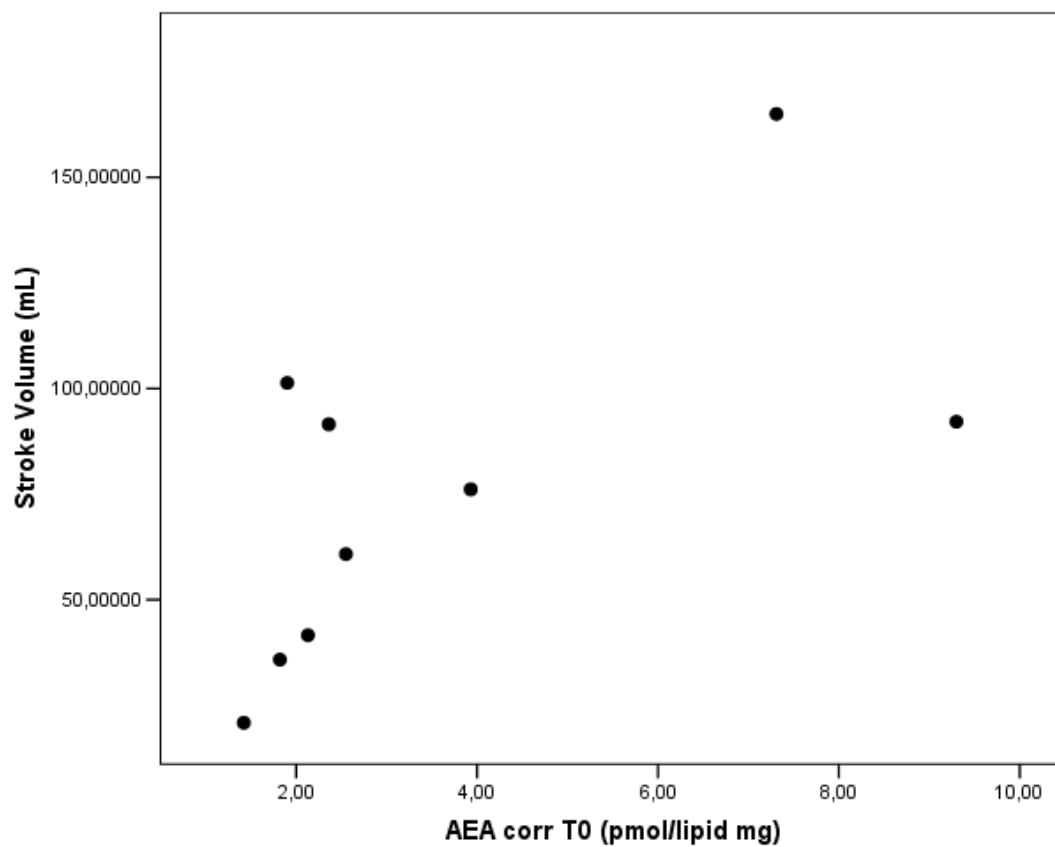


**Fig. 4:** Scatterplot dei livelli “raw” di anandamide a T0 rispetto al punteggio della Fugl-Meyer Scale (subitem arti superiori) nel Gruppo A. Spearman rho=-0.929.

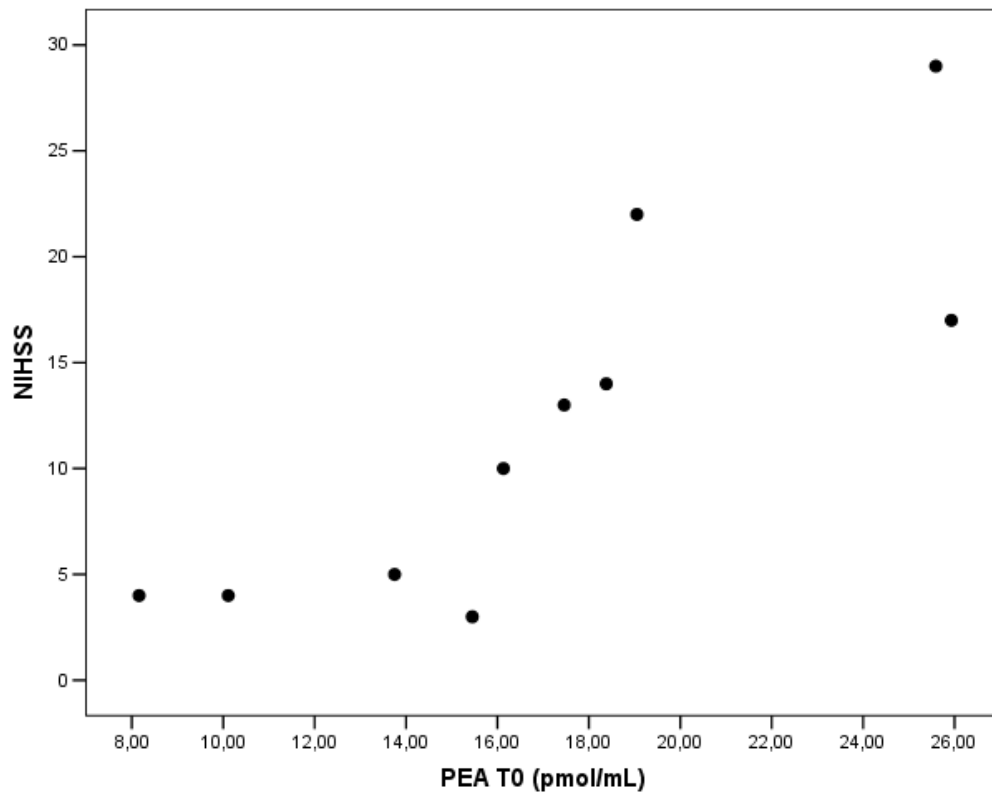




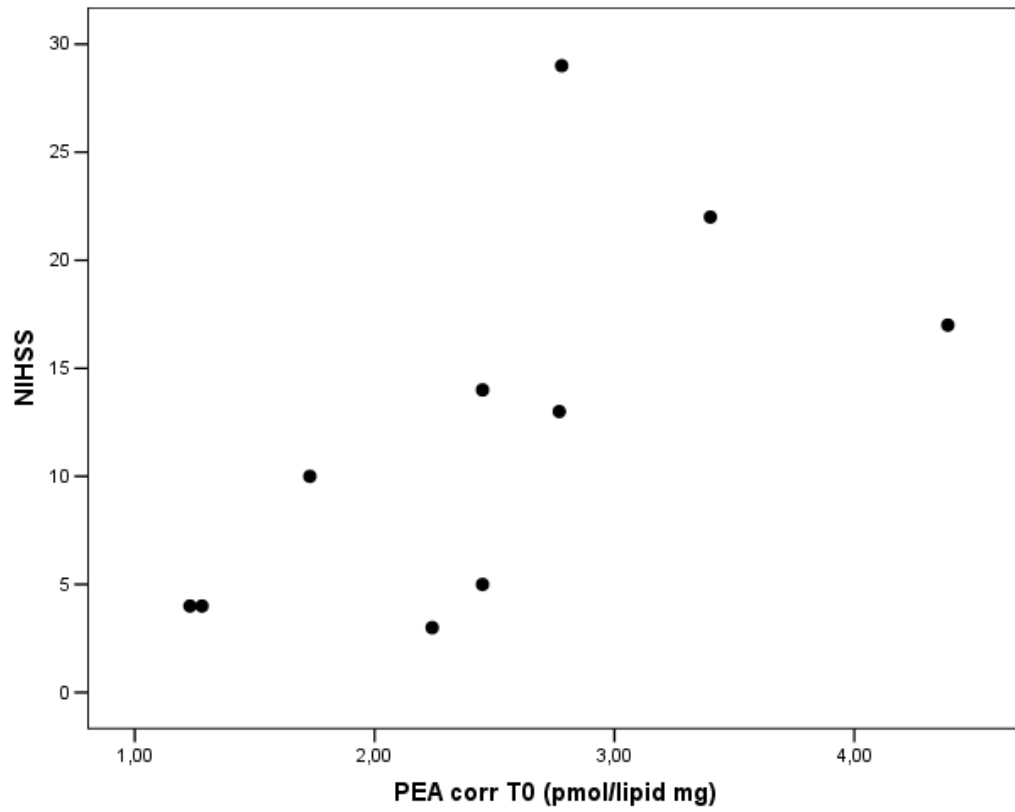
**Fig. 5:** Scatterplot dei livelli corretti di anandamide a T0 rispetto al punteggio della Fugl-Meyer Scale (subitem arti superiori) nel Gruppo A. Spearman rho=-0.819.



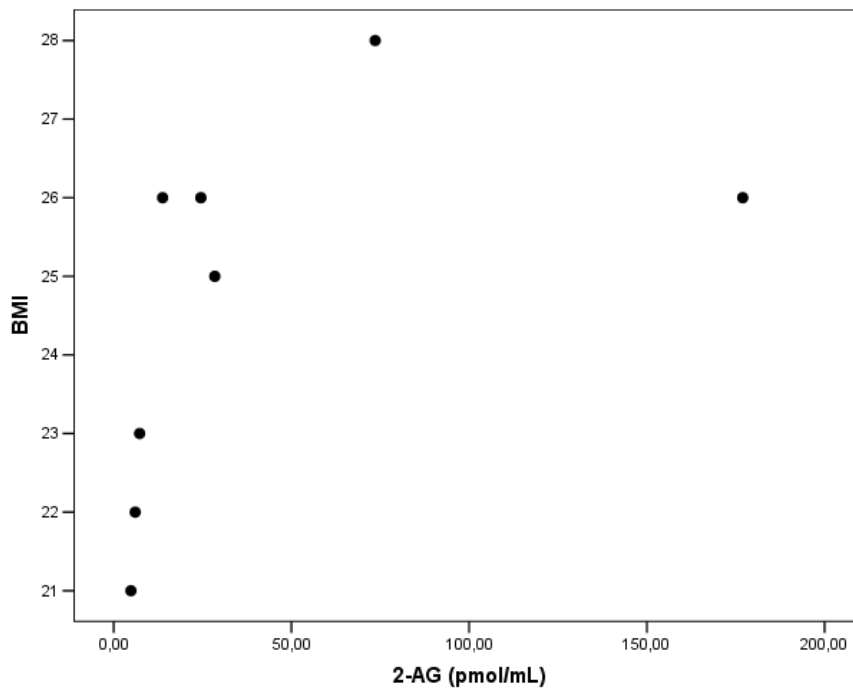
**Fig. 6:** Scatterplot dei livelli corretti di anandamide a T0 rispetto al volume lesionale espresso in mL nel Gruppo A. Spearman rho=0.667.



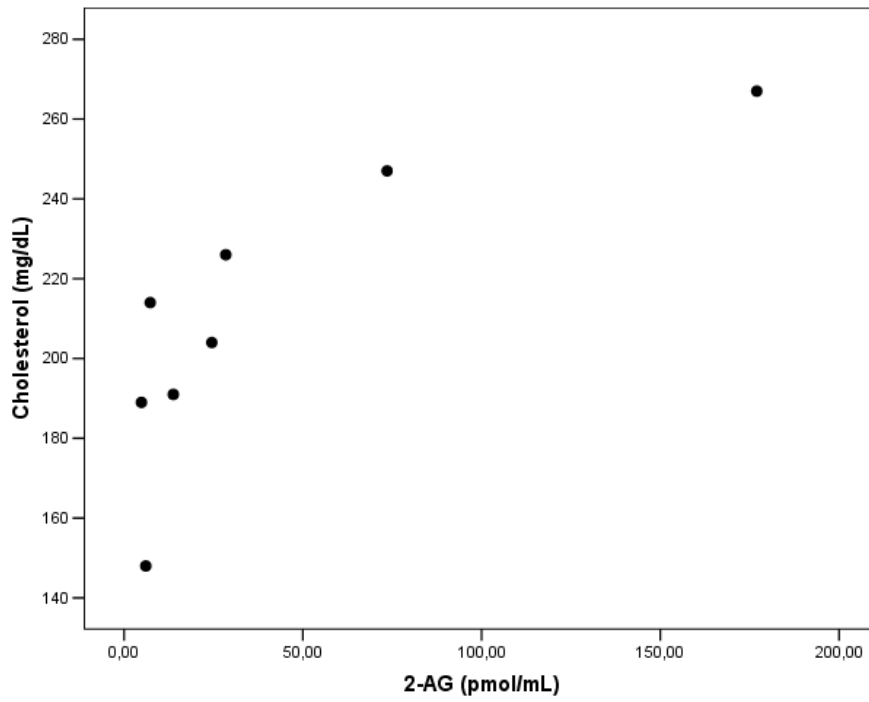
**Fig. 7:** Scatterplot dei livelli “raw” di PEA a T0 rispetto al punteggio NIHSS nel Gruppo A. Spearman rho=0.888.



**Fig. 8:** Scatterplot dei livelli corretti di PEA a T0 rispetto al punteggio NIHSS nel Gruppo A. Spearman rho=0.823.



**Fig. 9:** Scatterplot dei livelli “raw” di 2-AG rispetto all’indice di massa corporea (BMI) nel Gruppo B. Spearman rho=0.830.



**Fig. 10:** Scatterplot dei livelli “raw” di 2-AG rispetto alla colesterolemia totale nel Gruppo B. Spearman rho=0.905.

## **Ringraziamenti**

Il presente studio è stato finanziato da Giuliani Farmaceutici spa ed Epitech Italia.

Ringrazio sentitamente il dott. V. Di Marzo, la dott.ssa D. Pizzuti e la dott.ssa S. Petrosino per la preziosa collaborazione offertami; il Prof. G. Pizzolato, il Prof. L. Battistin e il Prof. R. Naccarato per i preziosi consigli.

Un ringraziamento anche al Dipartimento Immunotrasfusionale e alla Radiologia dell'Azienda Ospedali Riuniti di Trieste.

## Bibliografia

- 1) Gaoni Y, Mechoulam R. The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. *J Am Chem Soc.* 93(1):217-224,1971.
- 2) Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 34(5):605-613,1988.
- 3) Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 346(6284):561-564,1990.
- 4) Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 365(6441):61-65,1993.
- 5) Van Sickle MD, Duncan M, Kingley PJ, et al. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science.* 310(5746):329-32,2005.
- 6) Daaka Y, Klein TW, Friedman H. Expression of cannabinoid receptor mRNA in murine and human leukocytes. *Adv Exp Med Biol.* 373:91-96,1995.
- 7) Schatz AR, Lee M, Condie RB, et al. Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol.* 142(2):278-87,1997.
- 8) Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral GA. Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int Immunopharmacol.* 2(1):69-82,2002.
- 9) Pertwee RG, Ross RA. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 66(2-3):101-21,2002.
- 10) Felder CC, Nielsen A, Brieley EM, et al. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett.* 393(2-3):231-235, 1996.



- 11) Koga D, Santa T, Fukushima T, Homma H, Imai K. Liquid chromatographic-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric determination of anandamide and its analogs in rat brain and peripheral tissues. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 690(1-2):7-13,1997.
- 12) Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, et al. Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun.* 256(2):377-80,1999.
- 13) Huang SM, Strangman NM, Walker JM. 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids.* 108(1-2):89-106,2000.
- 14) Fezza F, Bisogno T, Minassi A, et al. Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues. *FEBS Lett.* 13(2-3):294-298,2002.
- 15) Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, et al. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 301(3):1020-1024,2002.
- 16) Lambert DM, Di Marzo V. The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas : are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Curr Med Chem.* 6(8):757-773,1999.
- 17) Costa B, Conti S, Giagnoni G, Colleoni M. Therapeutic effect of the endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, in rat acute inflammation: inhibition of nitric oxide and cyclo-oxygenase systems. *Br J Pharmacol.* 137(4):413-20,2002.
- 18) Skaper S.D., Buriani A., Dal Toso R., Petrelli L., Romanello S., Facci L., Leon A. The ALIamide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(9):3984-3989,1996.
- 19) Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature.* 394(6690):277-81,1998.
- 20) Lombardi G., Miglio G., Varsaldi F., Minassi A., Appendino G. Oxyhomologation of the amide bond potentiates neuroprotective effects of

- the endolipid N-palmitoylethanolamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 320(2):599-606,2007.
- 21) Muccioli G.G., Stella N. Microglia produce and hydrolyze palmitoylethanolamide. *Neuropharmacology* 54(1):16-22,2008.
- 22) Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci.* 27(1):1-4,2006.
- 23) Bisogno T, Melck D, Bobrov MY, et al. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J.* 351 Pt 3:817-824,2000.
- 24) Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sörgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature.* 400(6743):452-7,1999.
- 25) O'Sullivan SE. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol.* 152:576–582,2007.
- 26) Dutta AK, Ryan W, Thomas BF, Singer M, Compton DR, Martin BR, Razdan RK. Synthesis, pharmacology, and molecular modeling of novel 4-alkoxy indole derivatives related to cannabimimetic aminoalkyl indoles (AAIs). *Bioorg Med Chem.* 5(8):1591-600,1997.
- 27) Di Marzo V, Bisogno T, Sugiura T, et al The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells: connections with anandamide. *Biochem J.* 331( Pt 1):15-19,1998.
- 28) Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, et al. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* 21(12):521-528,1998.
- 29) Wilson RI, Kunos G, Nicoll RA. Presynaptic specificity of endocannabinoid signalling in the hippocampus. *Neuron.* 31(3):453-462,2001.

- 30) Gessa GL, Mascia MS, Casu MA, Carta G. Inhibition of hippocampal acetylcholine release by cannabinoids: reversal by SR 141716A. *Eur J Pharmacol.* 327(1):R1-2,1997.
- 31) Romero J, Hillard CJ, Calero M, Rábano A. Fatty acid amide hydrolase localization in the human central nervous system: an immunohistochemical study. *Brain Res Mol Brain Res.* 100(1-2):85-9,32002.
- 32) Rother J. Neuroprotection does not work! *Stroke* 39;523-524,2008.
- 33) Goll DE, Thompson VF, Li H, et al. The calpain system. *Physiol Rev.* 83(3):731-801,2003.
- 34) Horstmann S, Kalb P, Koziol J, Gardner H, Wagner S. Profiles of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and laminin in stroke patients: influence of different therapies. *Stroke.* 34(9):2165-2170,2003.
- 35) Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Phospholipase A2, hydroxyl radicals, and lipid peroxidation in transient cerebral ischemia. *Antioxid Redox Signal.* 5(5):647-654,2003.
- 36) Pignataro G, Gala R, Cuomo O, et al. Two sodium/calcium exchanger gene products, NCX1 and NCX3, play a major role in the development of permanent focal cerebral ischemia. *Stroke.* 35(11):2566-2570,2004.
- 37) Taka T, Ohta Y, Seki J, Giddings JC, Yamamoto J. Impaired flow-mediated vasodilation in vivo and reduced shear-induced platelet reactivity in vitro in response to nitric oxide in prothrombotic, stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 32(4):184-189,2002.
- 38) Kocher M. Metabolic and hemodynamic activation of postischemic rat brain by cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab.* 10(4):564-571,1990.
- 39) Paschen W. Endoplasmic reticulum dysfunction in brain pathology: critical role of protein synthesis. *Curr Neurovasc Res.* 1(2):173-181,2004.
- 40) Zhu C, Qiu L, Wang X, et al. Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Neurochem.* 86(2):306-317,2003.

- 41) Zhao H, Yenari MA, Sapolsky RM, et al. Mild postischemic hypothermia prolongs the time window for gene therapy by inhibiting cytochrome C release. *Stroke*. 35(2):572-577,2004.
- 42) Mishima K, Ikeda T, Yoshikawa T, et al. Effects of hypothermia and hyperthermia on attentional and spatial learning deficits following neonatal hypoxia-ischemic insult in rats. *Behav Brain Res*. 151(1-2):209-217,2004.
- 43) Krieger DW, Yenari MA. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: what do laboratory studies teach us? *Stroke* 35(6):1482-1489,2004.
- 44) Kim S.H., Won S.J., Mao X.O., Jin K., Greenberg D.A. Molecular Mechanisms of Cannabinoid Protection from Neuronal Excitotoxicity. *Mol Pharmacol*. 69:691-696, 2006.
- 45) Jin K., Mao X.O., Goldsmith P.C., Greenberg D.A. CB1 cannabinoid receptor induction in experimental stroke. *Ann. Neurol*. 48:257-261,2000.
- 46) Parmentier-Batteur S., Jin K, Mao X.O., Xie L., Greenberg D.A. Increased severity of stroke in CB1 cannabinoid receptor knock-out mice. *J. Neurosci*. 22(22):9771-9775,2002.
- 47) Nagayama T., Sinor A.D., Simon R.P., Chen J., Graham S.H., Jin K., Greenberg D.A. Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J. Neurosci*. 19(8):2987-2995,1999.
- 48) Sommer C, Schomacher M, Berger C, et al. Neuroprotective cannabinoid receptor antagonist SR141716A prevents downregulation of excitotoxic NMDA receptors in the ischemic penumbra. *Acta Neuropathol Berger*. 112(3):277-286,2006.
- 49) Berger C., Schmid P.C., Schabitz W.R., Wolf M., Schwab S., Schmid H.H.O. Massive accumulation of N-acylethanolamines after stroke. Cell signalling in acute cerebral ischemia? *J. Neurochem*. 88:1159-1167,2004.
- 50) Fernández-López D, Martínez-Orgado J, Nuñez E, et al. Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vitro model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Pediatr Res*. 60(2):169-173,2006.

- 51) Hampson AJ, Grimaldi M, Axelroad J, et al. Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(14):8268-8273,1998.
- 52) Hayakawa K, Mishima K, Abe K, et al. Cannabidiol prevents infarction via the non-CB1 cannabinoid receptor mechanism. *Neuroreport*. 15(15):2381-2385,2004.
- 53) Knoller N, Levi L, Shoshan I, Reichenthal E, Razon N, Rappaport ZH, Biegon A. Dexanabinol (HU-211) in the treatment of severe closed head injury: a randomized, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Crit Care Med*. 30(3):548-554,2002.
- 54) Schabitz W.R., Giuffrida A., Berger C., Aschoff A., Schwaninger M., Schwab S., Piomelli D. Release of fatty acid amides in a patient with hemispheric stroke. *Stroke* 33:2112-2114,2002.
- 55) Ashton J.C, Rahman R.M.A., Nair S.M., Sutherland B.A., Glass M., Appleton I. Cerebral hypoxia-ischemia and middle cerebral artery occlusion induce expression of the cannabinoid CB2 receptor in the brain. *Neurosci. Lett*. 412(2):114-117,2007.
- 56) Steffens S, Mach F. Cannabinoid receptors in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 17(5):519-526,2006.
- 57) Zhang M., Martin B.R., Adler M.W., Razdan R.K., Jallo J.I., Tuma R.F. Cannabinoid CB(2) receptor activation decreases cerebral infarction in a mouse focal ischemia/reperfusion model. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 27(7):1387-1396,2007.
- 58) Franklin A., Parmentier-Batteur S., Walter L., Greenberg D.A., Stella N. Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility. *J. Neurosci*. 23(21):7767-7775,2003.
- 59) Hayakawa K., Mishima K., Nozako M., Hazekawa M., Ogata A., Fujioka M., Harada K., Mishima S., Orito K., Egashira N., Iwasaki K., Fujiwara M.  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta$  9-THC) prevents cerebral infarction via hypothalamic-independent hypothermia. *Life Sciences* 80:1466-1471,2007.

- 60) Leker RR, Gai N, Mechoulam R, et al. Drug-induced hypothermia reduces ischemic damage: effects of the cannabinoid HU-210. *Stroke*. 34(8):2000-2006,2003.
- 61) De Marchi N., De Petrocellis L., Orlando P., Daniele F., Fezza F., Di Marzo V. Endocannabinoid signalling in the blood of patients with schizophrenia. *Lipids Health Dis* 2:5,2003.
- 62) Monteleone P., Matias I., Martiadis V., De Petrocellis L., Maj M., Di Marzo V. Blood levels of the endocannabinoid anandamide are increased in anorexia nervosa and in binge-eating disorder, but not in bulimia nervosa. *Neuropsychopharmacology* 30:1216-1221,2005.
- 63) Blüher M., Engeli S., Klötting N., Berndt J., Fasshauer M., Batkai S., Pacher P., Schön M.R., Jordan J., Stumvoll M. Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. *Diabetes* 55:3053-3060,2006.
- 64) Zolese G., Bacchetti T., Ambrosini A., Wozniak M., Bertoli E., Ferretti G. Increased plasma concentrations of Palmitoylethanolamide, an endogenous fatty acid amide, affect oxidative damage of human low-density lipoproteins: An in vitro study. *Atherosclerosis* 182:47-55,2005.
- 65) Muthian S., Rademacher D.J., Roelke C.T., Gross G.J., Hillard C.J. Anandamide content is increased and CB1 cannabinoid receptor blockade is protective during transient, focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 129:743-750,2004.
- 66) Centonze D., Bari M., Rossi S., Prosperetti C., Furlan R., Fezza F., De Chiara V., Battistini L., Bernardi G., Bernardini S., Martino G., Maccarrone M. The endocannabinoid system is dysregulated in multiple sclerosis and in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 130:2543-2553,2007.
- 67) Battista N., Bari M., Tarditi A., Mariotti C., Bachoud-Lévi A.C., Zuccato C., Finazzi-Agrò A., Genitrini S., Peschanski M., Di Donato S., Cattaneo E., Maccarrone M. Severe deficiency of the fatty acid amide hydrolase (FAAH) activity segregates with the Huntington's disease mutation in peripheral lymphocytes. *Neurobiol. Dis.* 27(1):108-116,2007.

- 68) Cupini L.M., Bari M., Battista N., Argirò G., Finazzi-Agrò A., Calabresi P., Maccarrone M. Biochemical changes in endocannabinoid system are expressed in platelets of female but not male migraineurs. *Cephalalgia* 26(3):277-281,2006.
- 69) Rossi C, Pini L.A., Cupini M.L., Calabresi P., Sarchielli P. Endocannabinoids in platelets of chronic migraine patients and medication-overuse headache patients: relation with serotonin levels. *Eur J Clin Pharmacol.* 64(1):1-8,2008.
- 70) Hill M.N., Miller G.E., Ho W.S., Gorzalka B.B., Hillard C.J. Serum endocannabinoid contents are altered in females with depressive disorders: a preliminary report. *Pharmacopsychiatry* 41(2):48-53,2008.
- 71) Marsicano G., Goodenough S., Monory K., Hermann H., Eder M., Cannich A., Azad S.C., Cascio M.G., Gutierrez S.O., van der Stelt M., Lopez-Rodriguez M.L., Casanova E., Schütz G., Zieglgänsberger W., Di Marzo V., Behl C., Lutz B. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302(5642):84-88,2003.
- 72) Saleh A., Schroeter M., Ringelstein A., Hartung H.P., Siebler M., Modder U., Jander S. Iron oxide particle-enhanced MRI suggests variability of brain inflammation at early stages after ischemic stroke. *Stroke* 38:2733-2737,2007.
- 73) Baker D., Pryce G., Croxford J.L., Brown P., Pertwee R.G., Makriyannis A., Khanolkar A., Layward L., Fezza F., Bisogno T., Di Marzo V. Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *FASEB J.* 15(2):300-302,2001.
- 74) Petrosino S., Palazzo E., De Novellis V., Bisogno T., Rossi F., Maione S., Di Marzo V. Changes in spinal and supraspinal endocannabinoid levels in neuropathic rats. *Neuropharmacology* 52(2):415-422,2007.
- 75) Bisogno T., Martire A., Petrosino S., Popoli P., Di Marzo V. Symptom-related changes of endocannabinoid and palmitoylethanolamide levels in brain areas of R6/2 mice, a transgenic model of Huntington's disease. *Neurochem Int.* 52(1-2):307-313,2008.

- 76) Melis M., Pillolla G., Bisogno T., Minassi A., Petrosino S., Perra S., Muntoni A.L., Lutz B., Gessa G.L., Marsicano G., Di Marzo V., Pistis M. Protective activation of the endocannabinoid system during ischemia in dopamine neurons. *Neurobiol. Dis* 24:15–27,2006.
- 77) Degn M., Lambersten K.L., Petersen G., Meldgaard M., Artmann A., Clausen B.H., Hansen S.H., Finsen B., Hansen H.S., Lund T.M. Changes in brain levels of N-acylethanolamines and 2-arachidonoylglycerol in focal cerebral ischemia in mice. *J. Neurochem.* 103:1907–1916,2007.
- 78) Viganò D., Valenti M., Cascio M.G., Di Marzo V., Parolaro D., Rubino T. Changes in endocannabinoid levels in a rat model of behavioural sensitization to morphine. *Eur. J. Neurosci.* 20(7):1849-1857,2004.
- 79) Viganò D., Cascio M.G., Rubino T., Fezza F., Vaccani A., Di Marzo V., Parolaro D. Chronic morphine modulates the contents of the endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol, in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 28(6):1160-1167,2003.
- 80) Maccarrone M., Rossi S., Bari M., De Chiara V., Fezza F., Musella A., Gasperi V., Prosperetti C., Bernardi G., Finazzi-Agrò A., Cravatt B.F., Centonze D. Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. *Nat. Neurosci.* 11(2):152-159,2008.
- 81) Coté M., Matias I., Lemieux I., Petrosino S., Alméras N., Després J.P., Di Marzo V. Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *Int. J. Obes. (Lond)* 31(4):692-699,2007.
- 82) Centonze D., Rossi S., Finazzi-Agrò A., Bernardi G., Maccarrone M. (Endo)cannabinoid system in multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Int. Rev. Neurobiol.* 82:171-186,2007.
- 83) Zani A., Braidà D., Capurro V., Sala M. Delta9-tetrahydrocannabinol (THC) and AM 404 protect against cerebral ischaemia in gerbils through a mechanism involving cannabinoid and opioid receptors. *Br. J. Pharmacol.* 152(8):1301-1311,2007.