

Prace poglądowe i monografie

RECEPTORY KANNABINOIDÓW I ICH ENDOGENNE I EGZOGENNE LIGANDY

Bogdan Szukalski

Zakład Biochemii Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

CANNABINOID RECEPTORS AND THEIR ENDOGENOUS AND EXOGENOUS LIGANDS.

ABSTRACT – Considerable progress has been noted in recent years in the research into cannabinoid action, due to the discovery of two separate receptors (CB1 and CB2) and two endogenous agonists of these receptors (anandamide and 2AG). The course of biosynthesis and metabolism of anandamide has been identified and a number of its decomposition inhibitors have been synthesized. The latter contribute to the explanation of the endogenous agonists role in the regulation of various physiological processes. Many exogenous receptor agonists with a high power of action have been obtained, including not only structural analogs of cannabinoids, but also compounds from other chemical groups: derivatives of aminoalkylindole, diarylpyrazole, arylbenzofuran and arylbenzothiophen. Owing to these substances, CB1 and CB2 receptors' biochemical and pharmacological properties, as well as their localization in the brain, in the immunological system and in other tissues have been established. On the grounds of the existing research findings highly selective new agonists and antagonists can be expected to appear not only for CB1, but also for CB2.

The discovery of the endogenous cannabinoid system has revealed new perspectives for application of both natural cannabinoids and their synthetic analogs, as well as structurally different ligands of receptors. A number of new compounds (agonists and antagonists) have been developed: they may modulate the system either directly (through selective activation or inhibition of CB1 and/or CB2) or indirectly (through inhibition of these receptors endogenous ligands uptake to tissues or their enzymatic hydrolysis).

Attempts have been made to apply some cannabinoids in therapy, namely of cannabidiol (having a neuroprotective action), CT3 (analgesic and anti-inflammatory action), anandamide (analgesic and antineoplastic action), and S141716A (antipsychotic action).

Thus, research into cannabinoid receptors has increased our knowledge about their structure, joint action with biologically active proteins, and their mechanisms underlying signal transmission. These research findings are of not only cognitive, but also practical value – some ligands of CB1 and CB2 receptors may be expected to be applied as medication in the treatment of various diseases in the near future.

Key words: CB1 and CB2 receptors, G proteins, exogenous ligands, anandamide.

WSTĘP

Dowody stosowania rośliny *Cannabis sativa* przez ludzi istnieją od ponad 4000 lat (33), a obecnie marihuana jest najpowszechniej używanym narkotykiem. W Ameryce Północnej i Europie używa ją regularnie ponad 20 milionów ludzi, a

wiele tysięcy pacjentów cierpiących na AIDS, stwardnienie rozsiane, jaskrę i inne choroby stosuje ją nielegalnie w przekonaniu, że przyniesie ulgę w ich dolegliwościach (31). Tak więc kannabis i otrzymywane z niego produkty należy obecnie rozpatrywać nie tylko jako narkotyki, ale także jako potencjalne środki lecznicze.

Nowoczesne badania nad kannabinoidami rozpoczęły się w roku 1964, kiedy Gani i Mechoulam (10) rozszyfrowali strukturę tetrahydrokannabinolu (Δ^9 -THC) – głównego psychoaktywnego składnika kannabis. Oprócz niego z *Cannabis sativa* izolowano kilkadziesiąt innych związków o strukturze dibenzopirany, tylko jednak Δ^9 -THC i Δ^8 -THC wykazują wyraźne działanie psychotropowe.

Działanie innych, np. kannabinolu, kannabidiolu i kannabichromenu, jest bardzo słabe. Podobnie produkty metabolizmu Δ^9 -THC i Δ^8 -THC, który polega na licznych hydroksylacjach oraz na utlenianiu niektórych grup alkoholowych do karboksylowych, wykazują na ogół znacznie mniejszą (lub żadną) aktywność biologiczną. Wyjątek stanowią 11-hydroksy- Δ^9 -THC i 11-hydroksy- Δ^8 -THC, których działanie znieczulające jest porównywalne z działaniem związków macierzystych. Chociaż Δ^9 -THC izolowano z materiału roślinnego i otrzymano w postaci oczyszczonej ponad 30 lat temu (10), biochemiczny mechanizm aktywności kannabinoidów jeszcze przez wiele następnych lat pozostawał niewyjaśniony. W latach 70. i na początku 80. powszechne było przekonanie, że podstawą farmakologicznej aktywności kannabinoidów jest ich bardzo wysoka lipofilność powodująca kumulację i długotrwałe utrzymywanie się w tkankach. Przeciwbólowe działanie Δ^9 -THC porównywano „z przewlekłymi skutkami małych dawek anestetyków i rozpuszczalników” (organicznych) i nie szukano innych sposobów tłumaczenia efektów wywieranych przez kannabinoidy, np. w oparciu o mechanizm receptorowy.

Wątpliwości pojawiły się, gdy stwierdzono, że syntetyczny Δ^9 -THC wykazuje zaledwie 5-10% aktywności kannabimimetycznej naturalnego Δ^9 -THC, a (-) enancjomer 11-hydroksy-dimetyloheptylo- Δ^8 -tetrahydrokannabinolu (11-OH- Δ^8 -THC-DMH; HU-210), wielokrotnie silniejsze działanie biologiczne niż jego (+) enancjomer (HU-211). Ta enancjoselektywność par enancjomerów poszczególnych kannabinoidów wskazywała na wysoką stereospecyficzność mechanizmu warunkującego ich efekty i na jego receptorowy charakter.

Molekularny mechanizm działania Δ^9 -THC na mózg i tkanki obwodowe pozostawał jednak niewyjaśniony aż do roku 1987, kiedy Allyn Hewlett i jej współpracownicy z St. Louis University Medical School oraz koncernu Pfizera donieśli o odkryciu w mózgu szczura receptorów kannabinoidów, rozpoczynając nowoczesną erę badań nad aktywnymi składnikami *Cannabis sativa*. Stwierdzili oni, że kannabinoidy hamują gromadzenie się cyklicznego monofosforanu adenozyny (cAMP), co stanowi mocny argument przemawiający za udziałem w tym procesie receptorów sprzężonych z białkami G. Wykazano również dobrą korelację między siłą farmakologicznego działania kannabinoidu i jego powinowactwem do selektywnych miejsc receptora (20).

Dalsze prace doprowadziły do izolowania z mózgu, sklonowania i ustalenia sekwencji pierwszego receptora kannabinoidowego, nazwanego CB₁. Później odkryto, sklonowano i ustalono sekwencję drugiego receptora CB₂, który wykazuje podobny do pierwszego profil farmakologiczny. CB₂ występuje głównie w tkankach obwodowych, natomiast w mózgu jest obecny w bardzo małych ilościach.

Warto podkreślić, że zagęszczenie receptora CB₁ w mózgu ssaków jest wyraźnie wyższe niż innych receptorów sprzężonych z białkami G.

Budowa receptorów kannabinoidowych i ich interakcja z białkami G

Receptory kannabinoidów należą do receptorów sprzężonych z tzw. białkami G. Dotychczas wykryto około 50 odrębnych systemów receptorowych związanych z tymi białkami, które na podstawie pokrewieństwa budowy i mechanizmu działania dzieli się na kilka grup, m.in. Gs, Gi, G2 i G12.

Receptory mają postać nici (serpentyń) białkowej penetrującej siedmiokrotnie błonę komórkową w postaci ślimakowatej spirali, która tworzy w błonie 7 transmembranowych segmentów (TM1-TM7) połączonych sześcioma pętlami. Trzy są zlokalizowane zewnątrzkomórkowo, a trzy zanurzone w cytoplazmie. Każdy z segmentów zawiera 22-28 reszt aminoacylowych tworzących helisę. Receptory te są często nazywane serpentynowymi lub węzłowatymi.

Uważa się, że cytoplazmatyczna część receptora jest zakotwiczona przez jonowe interakcje dodatnio naładowanych reszt lizyny lub argininy z ujemnie naładowanymi elementami fosfolipidów. W przypadku receptorów kannabinoidowych helisa II jest prawdopodobnie pozbawiona tego typu zakotwiczenia.

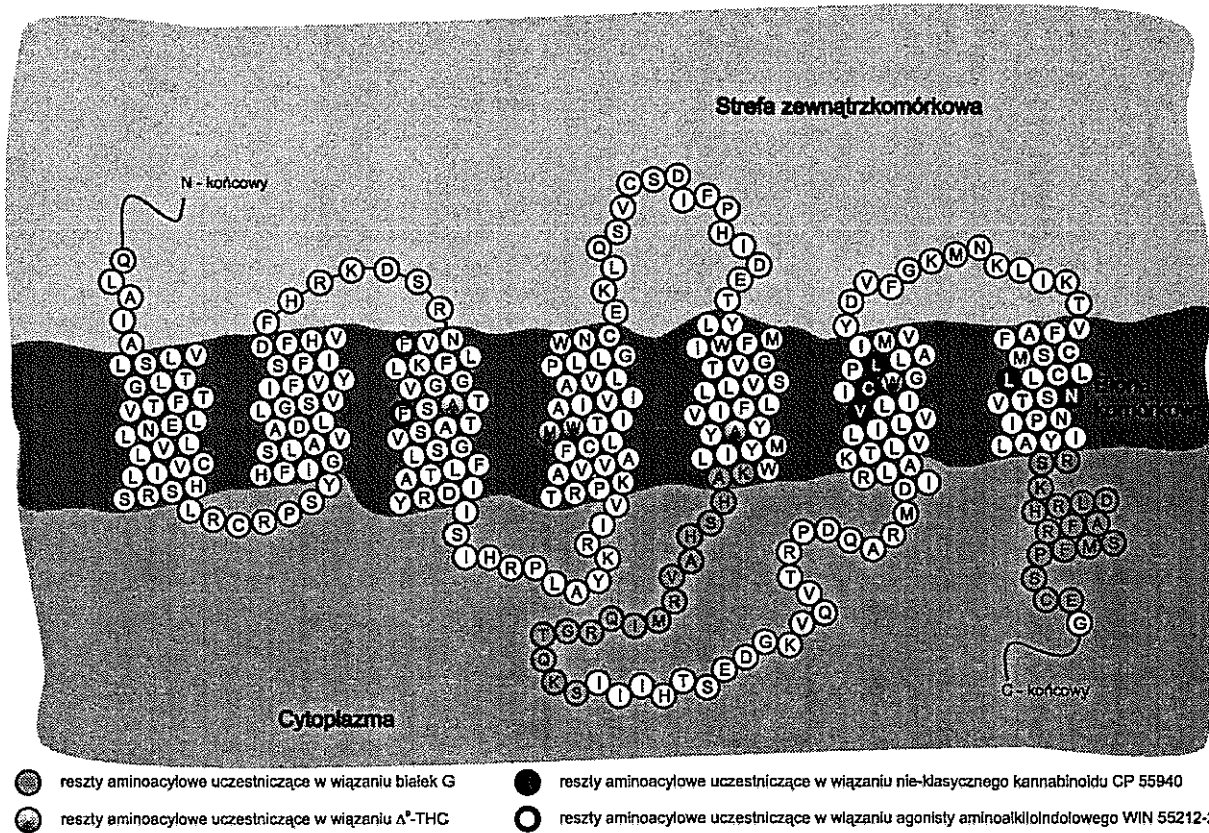
Można założyć, że struktura receptora jest zachowana w stanie niepobudzonym przez sieć interakcji między helisami (oddziaływania elektrostatyczne, hydrofobowe, wiązania wodorowe), które ulegają rozbiciu, gdy agonista zwiąże się z receptorem wywołując jego aktywację.

Niektóre związki o strukturze kannabinoidowej nie wykazują wyraźnego powinowactwa do receptorów prawdopodobnie dlatego, że w ich strukturze występują zaawy steryczne utrudniające wniknięcie do wnętrza receptora.

Sprzężone z receptorami białka G są zlokalizowane na cytozolowej powierzchni błony. Przenoszą one stan pobudzenia receptora do wewnątrzkomórkowych efektorów, które wywołują zmiany stężenia wtórnych przekaźników informacji i stymulują powstanie odpowiedzi komórkowych. Za pośrednictwem białek G receptory kannabinoidów regulują wewnątrzkomórkowe stężenie cAMP i wpływają na funkcje kanałów jonowych. Interakcja z białkami G zachodzi prawdopodobnie w trzeciej wewnątrzkomórkowej pętli receptora.

Białka G zbudowane są z trzech podjednostek oznaczonych literami α , β i γ (tzw. heterotrimerowe białka G), do których przyłączona jest cząsteczka guanozynodifosforanu (GDP).

Niepobudzony receptor pozostaje niezwiązany z białkami G, w których podjednostki α , β i γ są ze sobą połączone. Można to zapisać w skrócie G (GDP) lub $\alpha\beta\gamma$ (GDP).



Ryc. 1. Budowa receptora CB₁, izolowanego z tkanek człowieka (wg (26) zmodyf.).

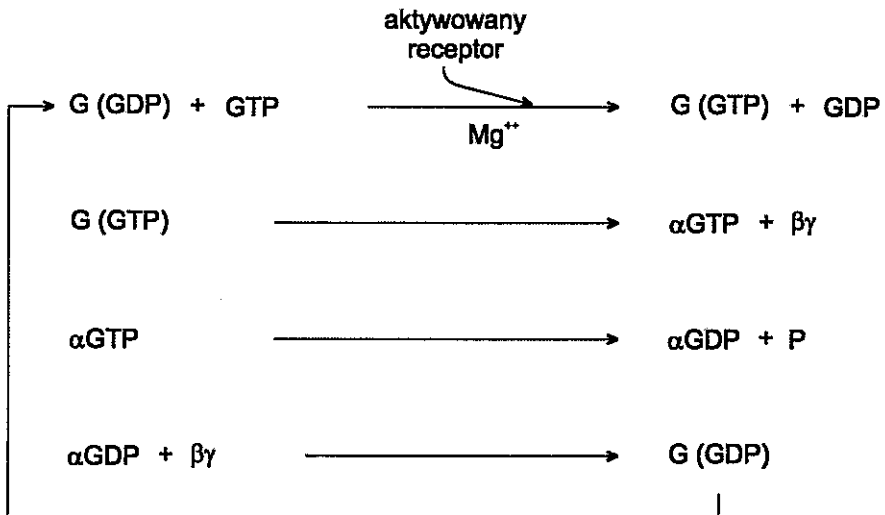
Oznaczenia: A – alanina; C – cysteina; D – kwas asparaginowy; E – kwas glutaminowy; F – fenyloalanina; G – glicyna; H – histydyna; I – izoleucyna; K – lizyna; L – leucyna; M – metionina; N – aspargina; P – prolina; Q – glutamina; R – arginina; S – seryna; T – treonina; V – walina; W – tryptofan; Y – tyrozyna.

Związanie się specyficznego liganda z receptorem wywołuje konformacyjne zmiany w strukturze receptora, które są przenoszone do jego trzeciej (najczęściej) pętli po cytozolowej stronie błony (28).

W wyniku aktywacji białka G przez kompleks receptora z ligandem następuje rozbiecie białka na podjednostkę α GDP i dimer $\beta\gamma$ oraz przejście podjednostki α ze stanu, w którym wykazuje ona wyższe powinowactwo do GDP niż do GTP w stan, w którym powinowactwo podjednostki do GDP jest niższe niż do GTP. Od podjednostki α odłącza się wtedy GDP, a na jego miejsce wchodzi GTP. Podjednostki α GTP i $\beta\gamma$ wchodzi w interakcje z cząsteczkami efektorów, takich jak cyklaza adenylnowa i kanały jonowe. Sygnał pobudzenia jest przenoszony głównie przez podjednostkę α GTP, ale rolę tę może również spełniać dimer $\beta\gamma$ (16).

Działanie na efekторы trwa do momentu defosforylacji cząsteczki GTP do GDP pod wpływem związanej z podjednostką α aktywności GTP-azowej. Powstaje wtedy kompleks α GDP, który łączy się z dimerem $\beta\gamma$, rekonstruując wyjściowy układ G (GDP) gotowy do reinicjacji cyklu.

Przebieg zmian zachodzących w białkach G można zapisać tak:



Toksyna cholery stabilizuje kompleks białka G z GTP (znosi aktywność GTP-azową podjednostki α), a toksyna ksztuśca – formę z GDP.

Jednym ze sposobów wykrywania interakcji receptorów z białkami G jest badanie szybkości hydrolizy [3H]-GTP w odpowiedzi na działanie agonistów. Druga metoda polega na pomiarze zastępowania GDP przez [^{35}S] GTP γ S. Ponieważ GTP γ S trudno ulega hydrolizie do GDP, pozostaje on na podjednostce α i gromadzi się w odpowiedzi na stymulację receptora przez agonistę.

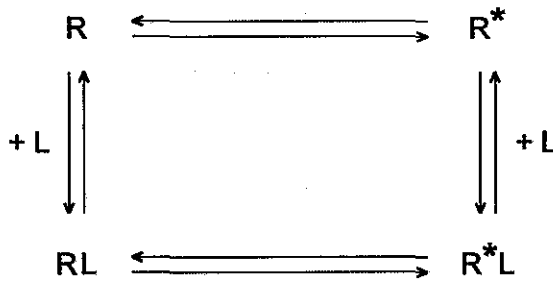
Mechanizm przekazywania informacji za pośrednictwem białek G wyjaśnili Martín Rodbel i Alfred Gilman, którzy za cykl prac na ten temat zostali uhonorowani w roku 1994 nagrodą Nobla.

Obecnie wiadomo, że aktywacja receptora może również nastąpić spontanicznie, bez udziału agonisty. Model obrazujący mechanizm wiązania agonistów z receptorami i aktywacji białek G zakłada występowanie dwóch stanów receptora kannabinoidowego: aktywnej (R^*) i nieaktywnej (R).

Aktywna forma receptora R^* inicjuje kaskadę sygnałów modyfikujących powinowactwo białka G do GDP i GTP i powoduje wzrost stężenia kompleksu G z GTP. Nieaktywna forma receptora nie wpływa na wymianę nukleotydów guaninowych.

Obie formy receptora, aktywna i nieaktywna, są w stanie równowagi. Przyłączenie liganda przesuną tę równowagę w kierunku jednej z form. Jeśli ligand wykazuje większe powinowactwo do aktywnej formy receptora, równowaga ulega przesunięciu w kierunku form aktywnych R^* i LR^* . Taki typ liganda przyspiesza powstawanie kaskady sygnałów i jest agonistą. Jeśli jednak ligand wykazuje większe powinowactwo do nieaktywnej formy receptora (R) równowaga ulega przesunięciu w kierunku postaci nieaktywnej i następuje zahamowanie kaskady sygnałów. Taki ligand jest odwrotnym agonistą (inverse agonist) (4).

Ligand wykazujący jednakowe powinowactwo do obu form receptora nie wpływa na zmianę równowagi i jest klasycznym antagonistą.

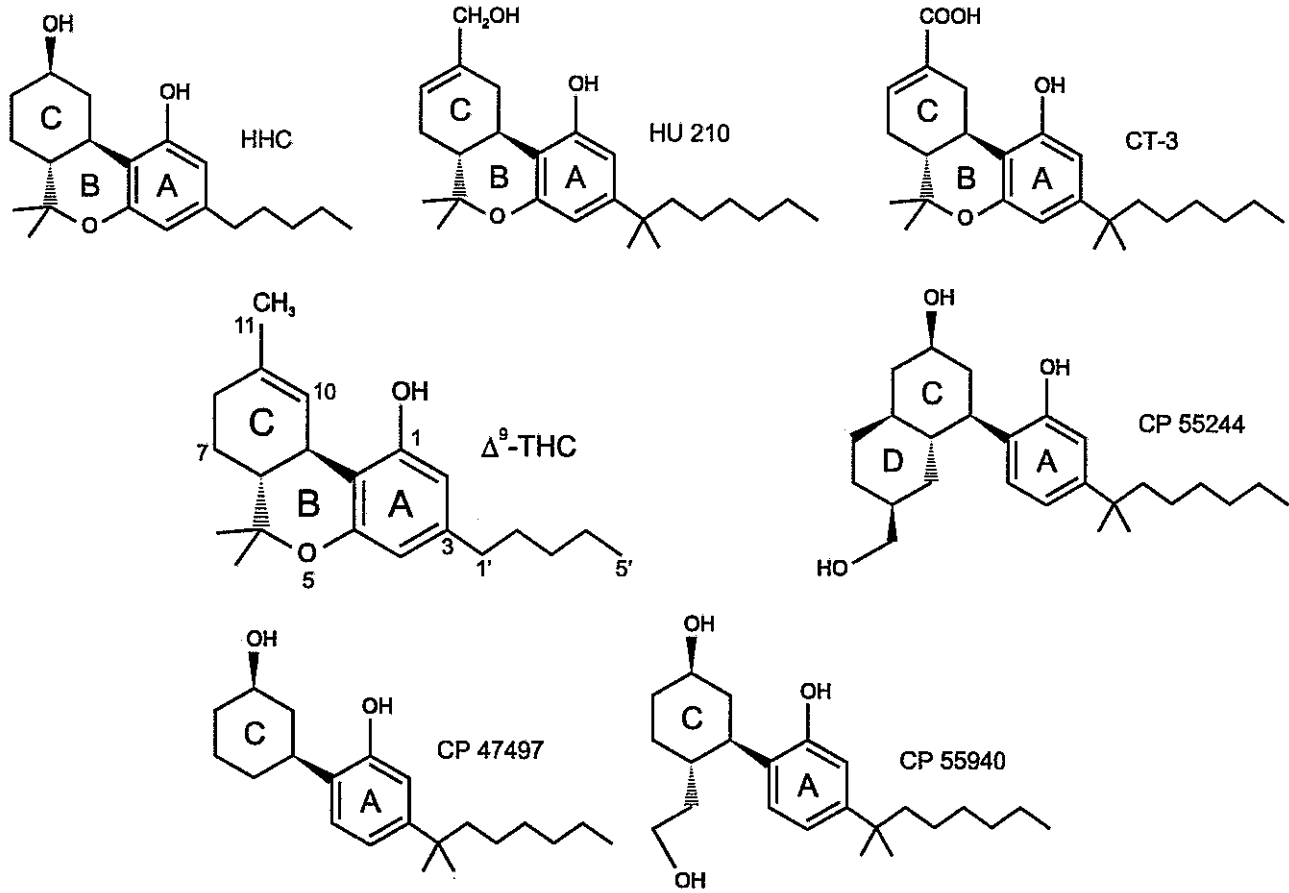


To odkrycie doprowadziło do reklasyfikacji antagonistów jako obojętnych antagonistów lub odwrotnych agonistów.

EGZOGENNE LIGANDY RECEPTORÓW KANNABINOIDOWYCH

W koncernie Pfizera zsyntetyzowano serię tzw. nie-klasycznych kannabinoidów (non-classical cannabinoids), będących dwu- i trójpierścieniowymi, nietypowymi analogami naturalnych kannabinoidów, otrzymanymi w wyniku modyfikacji ich struktury. Działają one analgetycznie, zmniejszają aktywność motoryczną i wywołują hypotermię. Zwykle dzieli się je na trzy grupy różniące się liczbą lub układem pierścieni: analogi ABC – trójpierścieniowe, AC – dwupierścieniowe i ACD – trójpierścieniowe.

Analogi ABC – trójpierścieniowe zachowują układ dibenzopirany a modyfikacje strukturalne dotyczą łańcucha bocznego i grup funkcyjnych. Najbardziej znanym przedstawicielem tej grupy ligandów jest 9-nor-9 β -hydroksyheksahydrokannabinol (HHC), który od Δ^9 -THC różni się obecnością grupy hydroksylowej na miejscu metylowej przy C-9



Ryc. 2. Tzw. „nie-klasyczne kannabinoidy”, czyli analogi strukturalne naturalnych kannabinoidów: ABC – trójpierścieniowe (HHC, H_μ 210, CT-3), ACD – trójpierścieniowe (CP 55244) oraz AC – dwupierścieniowe (CP 55940, CP 47497). Dla porównania podano budowę Δ^9 -THC.

oraz brakiem wiązania podwójnego między węglami 9 i 10 (Ryc. 2). Do tej grupy należą również analogi o symbolach L759633, L759656, JWH-133, JWH-139 i JWH-051.

Do grupy analogów AC – dwupierścieniowych należy CP 47497 o strukturze zbliżonej do HHC, ale bez pierścienia piranowego i z dimetyloheptylowym łańcuchem bocznym (Ryc. 2). Dołączenie do pierścienia C grupy hydroksypropylowej daje silnie działający związek CP 55940. Był on pierwszym ligandem, który zastosowano w postaci znakowanej do badania lokalizacji receptorów CB₁. Do analogów ACD – trójpierścieniowych należy CP 55244 (Ryc. 2)

Zespół badawczy Sterling-Winthropa otrzymał grupę ligandów receptorów kannabinoidowych o strukturze bardzo różnej od klasycznych i nie-klasycznych kannabinoidów wywodzącą się z niesterydowego leku przeciwpalnego – prawadoliny. Związki te, z uwagi na obecność w ich cząsteczkach układu indolowego, nazwano aminoalkilindolami (AAI). Prototypem tej grupy jest (+) WIN 55212, który wykazuje znaczne powinowactwo do obu receptorów i dużą skuteczność agonistyczną. Jest on jednak słabszym agonistą niż CP 55940. Jego enancjomer (-) WIN 55212 nie wykazuje wyraźnego powinowactwa do żadnego receptora.

Analogami WIN 55212 wykazującymi wyższe powinowactwo do CB₂ niż do CB₁ są: L768242, JWH-015 i 6-jodoprawadolina (AM 630).

Zastosowanie specyficznych ligandów, zwłaszcza znakowanych trytem, pozwoliło szczegółowo określić dystrybucję receptorów CB₁ w mózgu szczura i człowieka. Ich lokalizacja dobrze koreluje ze znanym wpływem kannabinoidów na pamięć, percepcję i kontrolę ruchów. Duże zgrupowania CB₁ występują w hipokampie, korze mózgowej, mózdzku i zwojach podstawy. Natomiast w pniu mózgu, rdzeniu i wzgórzu receptor ten występuje w bardzo małych ilościach lub w ogóle go nie ma, co może tłumaczyć, ogólnie biorąc, brak zagrażających życiu efektów nadużywania kannabinoidów (13).

Ostatnio zidentyfikowano receptory CB₁ również w szeregu tkanek obwodowych – jądrach, jelicie cienkim, pęcherzu moczowym, powrózku nasiennym, w komórkach mięśniówki gładkiej naczyń mózgowych oraz w presynaptycznych odcinkach zakończeń nerwów współczulnych. mRNA receptora CB₁ zaobserwowano w nadnerczach, sercu, płucach, prostaty, szpiku kostnym, grasicy i migdałkach, chociaż donoszono również o braku mRNA CB₁ w tych narządach. Receptor CB₂ sklonowano z tkanek człowieka, szczura oraz myszy i wykazano jego niską homologię sekwencji aminokwasów z receptorami CB₁ (44% przy porównaniu całej cząsteczki, a 68% przy porównaniu części transmembranowej). CB₂ występuje w brzeżnej warstwie śledziony, migdałkach, komórkach układu immunologicznego (komórki B, monocyty, komórki T) i w hodowlach mikrogleju szczura (15). Charakterystykę receptorów CB₁ i CB₂ przedstawia Tabela 1, a zestawienie ważniejszych agonistów CB₁ i CB₂ według malejącej siły wiązania z receptorami – Tabela 2.

Z zestawień tych wypływa wniosek, że próby uznania receptorów CB₁ jako wyłącznie neuronalnych, a receptorów CB₂ jako obwodowych są zbyt daleko idącym uproszczeniem, chociaż CB₁ rzeczywiście dominuje w tkance nerwowej, a CB₂ – w tkankach obwodowych.

TABELA 1
Charakterystyka receptorów kannabinoidowych (wg 32).

Nazwy receptorów	CB ₁	CB ₂
Liczba reszt aminoacylowych w cząsteczce receptora	472 (tkanka ludzka)	360 (tkanka ludzka)
Lokalizacja	Głównie mózg. W mniejszym stopniu tkanki obwodowe	Komórki układu immunologicznego
Endogenni agoniści receptorów	Anandamid 2-arachidonoilglicerol	Anandamid
Agoniści	Δ ⁹ -THC CP 55940 WIN 55212-2 HU 210 Lewonantradol Nabilon	Δ ⁹ -THC CP 55940 WIN 55212-2 HU 210 Lewonantradol Nabilon JWH-015
Selektywni antagoniści	SR 141716A LY 320135	SR 144528
Mechanizm przetwarzania sygnałów	Gi (modulacja cAMP) Hamowanie adenocyklazy Hamowanie napięciowo zależnych kanałów wapniowych Wzrost przewodnictwa w kanałach potasowych	Gi (modulacja cAMP) Hamowanie adenocyklazy
Radioligandy używane do badań	[³ H]-CP 55940 [³ H]-WIN 55212-2 [³ H]-SR 141716A [³ H]-HU 243	[³ H]-CP 55940 [³ H]-WIN 55212-2 [³ H]-HU 243

TABELA 2
Zestawienie ważniejszych agonistów CB₁ i CB₂ według malejącej siły wiązania z receptorami i wywoływanej odpowiedzi biologicznej.

Agoniści CB ₁	Agoniści CB ₂
CP 55244; HU 210	11-OH- Δ ⁹ -THC
CP 55940; Dezacetyllewanantradol	Δ ⁹ -THC; Kannabinol
WIN 55212-2; 11-OH- Δ ⁹ -THC	Anandamid
Δ ⁹ -THC	Kannabidiol
Δ ⁹ -THC; Anandamid; 2-AG	
Kannabinol	
Kannabidiol	
HU 211; CP 55243	

Ostatnio wyhodowano myszy z genetyczną delecją receptorów CB₁ i CB₂, co może pomóc odpowiedzieć na pytanie, czy istnieją inne receptory z tej grupy.

Zdecydowana większość otrzymanych syntetycznie ligandów CB₁ i CB₂ posiada cechy agonistów. Tymczasem precyzyjne określenie udziału każdego z receptorów w farmakologicznych efektach kannabinoidów i endobinoidów¹, po-

¹ Porównaj rozdział pt. „Endogenne ligandy receptorów kannabinoidowych”.

znanie fizjologicznej roli tzw. endogennego układu kannabinoidowego (receptory, anandamid i 2-arachidonoliglicerol) oraz skutków zachwiania równowagi tego układu jest możliwe jedynie przy pomocy selektywnych antagonistów. Dlatego ich poszukiwaniom poświęcano od początku wiele uwagi. Otrzymywaniem antagonistów zainteresowane są również koncerny farmaceutyczne pragnące wypromować nowe leki do leczenia ewentualnych dysfunkcji układu receptory-*endobinoidy* (2).

Pod koniec lat 80. badano pod tym kątem naturalne kannabinoidy, które były wówczas jedynymi dostępnymi ligandami receptorów. Pierwsze raporty wskazywały, że kannabinol i kannabidiol osłabiają efekty Δ^9 -THC, ale wynika to raczej z sumowania się przeciwstawnych efektów farmakologicznych niż właściwości antagonistycznych. Próbowano więc modyfikować strukturę Δ^9 -THC w taki sposób, aby osłabić własności kannabimimetyczne nie zmieniając zdolności rozpoznawania związku przez receptor. Podstawiając wodór grupy hydroksylowej alkilami o różnej liczbie atomów węgla lub aminoalkilami otrzymano szereg nowych połączeń, które okazały się jednak słabymi ligandami, pozbawionymi w dodatku właściwości antagonistycznych. Tak więc poszukiwanie antagonistów wśród pochodnych Δ^9 -THC zakończyło się niepowodzeniem.

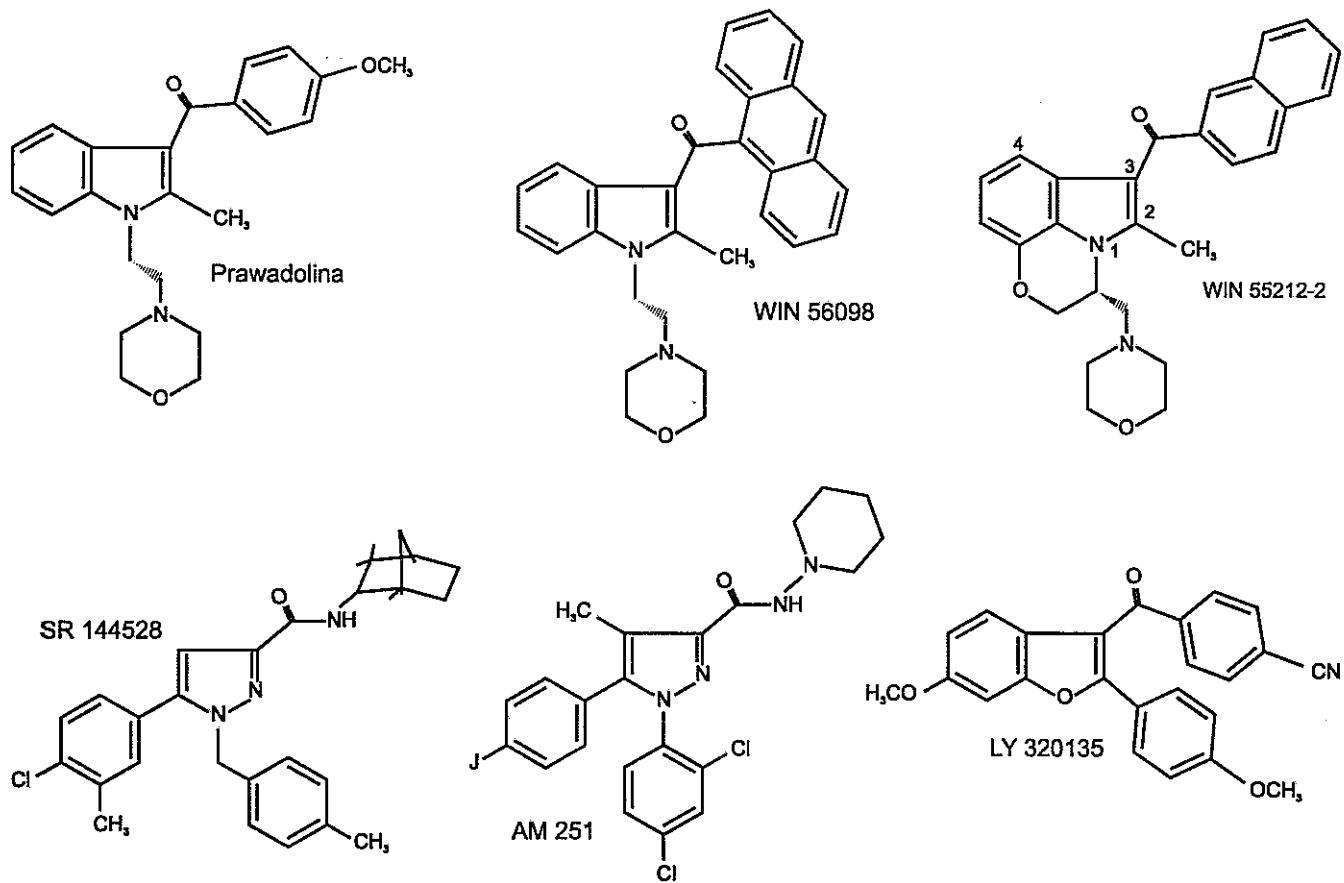
W grupie aminoalkilindolowych ligandów receptorów kannabinoidowych zsyntetyzowanych na początku lat 90. przez zespół Sterling-Winthropa, działanie antagonistyczne wykazywały dwie pochodne prawadolinylu: 9-antracenylokarbonylo pochodna (WIN 56098) (Ryc. 3) i 6-bromopochodna (WIN 54461).

WIN 56098 selektywnie osłabia wywołane przez agonistów hamowanie zarówno produkcji cAMP i elektrycznie wzbudzonych skurczów powrózka nasiennego myszy (Mouse Vas Deferens – MVD). Podobnie WIN 54461 antagonizuje hamujące efekty WIN 55212-2 i innych kannabinoidowych agonistów w teście MVD. Jednakże oba te związki są słabymi ligandami kannabinoidowymi i nie wykazują aktywności *in vivo*, co nie może dziwić, gdyż różnią się tylko nieznacznie budową od WIN 53365 – typowego agonisty z grupy aminoalkilindoli. Również inne związki z grupy AAI nie wykazywały cech selektywnych antagonistów (14).

Pierwszy potężny antagonist, znany pod kryptonimem SR 141716, wywodzi się z grupy pochodnych 1,5-diarylopirazolu i został otrzymany przez grupę Sanofi Recherche.

Jest on nie tylko bardzo silnym i selektywnym ligandem CB₁ (K_i dla tego receptora wynosi 11,8 nmoli, podczas gdy dla CB₂ > 1000 nmoli) (Tabela 3), ale także wykazuje aktywność przy podaniu doustnym, blokując zarówno *in vitro* jak i *in vivo* większość efektów agonistów kannabinoidowych, jak Δ^9 -THC, CP 55940 i WIN 55212-2. SR 141716A blokuje bodźce antynocyceptywne oraz efekty działania agonistów na serce, układ oddechowy i pamięć, a także przyspiesza wystąpienie objawów odstawiennych u szczurów i myszy, którym przewlekłe podawano Δ^9 -THC (34).

Otrzymano również znakowane ligandy z tej grupy ułatwiające badanie lokalizacji receptorów: [³H]-SR141716, jego fluorową pochodną – [¹⁸F]-SR144358 oraz dwa



Ryc. 3. Ligandy receptorów CB_1 i CB_2 o strukturze aminoalkiloindoli (Prawadolina, WIN 55212-2, WIN 56089), diarylopirazoli (AM 251, SR 144528) i benzofuranów (LY 320135).

TABELA 3

Powinowactwo egzo- i endogennych ligandów do receptorów CB₁ i CB₂ (wg 23 – zmodyf.)

Ligand	CB ₁ K _i (nmole)	CB ₂ K _i (nmole)	CB ₁ K _i / CB ₂ K _i	CB ₂ K _i / CB ₁ K _i
ACEA	1,4	> 2000	< 0,0007	> 1428
SR 141716A	11,8	1320	0,0009	1118,6
ACPA	2,2	715	0,003	325,0
LY 320135	141	14900	0,0095	105,7
Metanandamid	17,9	868	0,02	48,5
O-585	8,6	324	0,027	37,7
O-689	5,7	132	0,043	23,16
Anandamid	89	371	0,24	4,17
AM 404	1760	13000	0,14	7,4
CT-3	32,3	170,5	0,19	5,28
11-OH-CBN-DMH	0,1	0,2	0,50	2,00
HU 210	0,061	0,524	0,12	8,62
HU 211	1990	> 10000	< 0,2	> 5,0
O-1184	5,25	7,41	0,71	1,41
Δ ⁹ -THC	53,3	75,3	0,71	1,4
Nabilon	1,84	2,19	0,84	1,19
Δ ⁸ -THC	47,6	39,3	1,21	0,83
Δ ⁹ -THC-DMH	0,241	0,199	1,21	0,83
CBN-DMH	2	1,5	1,33	0,75
CP 55940	5	1,8	2,78	0,36
11-OH-CBN	38	26,6	1,43	0,7
Kannabidiol	4350	2860	1,52	0,66
Kannabinol	211,2	126,4	1,67	0,60
CP 56667	61,7	23,6	2,61	0,38
11-OH-Δ ⁸ -THC	25,8	7,4	3,49	0,29
1-deoksy-Δ ⁸ -THC-DMH	23	2,9	7,93	0,13
(+)WIN 55212	9,94	16,2	0,61	1,63
JWH 015	383	13,8	27,75	0,036
L768242	1917	12	159,8	0,0063
JWN 139	2290	14	163,57	0,0061
AM 630	5152	31,2	165,13	0,0061
JWH 133	677	3,4	199,12	0,005
1-deoksy-Δ ⁸ -THC	8770	32	274,1	0,0037
L759633	1043	6,4	162,97	0,0061
L759656	4888	11,8	414,24	0,0024
SR 144528	437	0,60	728,3	0,0014

jodowe analogi AM 251 i AM 281. Podjęto również badania własności farmakologicznych i ewentualnych zastosowań terapeutycznych SR 141716A.

Badacze Pfizer'a otrzymali inną pochodną diarylopirazolową wykazującą własności antagonisty – CP 272871, która różni się od SR 141716A obecnością grupy

nitrylowej w miejsce metylowej w pozycji 4 pierścienia pirazolowego oraz rodnika fenylowego w miejsce piperydynowego przy grupie amidowej. Nie wykazuje ona jednak wyraźnej wybiórczości w stosunku do któregoś z receptorów.

W roku 1998 zespół Rinaldi-Carmony wykonał syntezę pierwszego silnego antagonisty receptora CB₂, który oznaczono symbolem SR 144528 (27). Jest to pochodna diarylopirazolowa o budowie zbliżonej do SR 141716A. Różnica polega na zastąpieniu rodnika fenylowego przy N-1 przez rodnik benzoilowy oraz grupy aminopiperydynowej na ugrupowanie endo-fenchylaminy. W wyniku tych zmian nastąpiła całkowita inwersja selektywności w porównaniu z SR 141716A. Powinowactwo nowego związku do CB₂, mierzone wartością K_i, wynosi 0,6 nmoli, podczas gdy do CB₁ jest blisko 700 razy niższe (K_i = 437 nmoli) (Tabela 3). SR 144528 jest aktywny przy podaniu doustnym i selektywnie antagonizuje wpływ CP 55940 na cyklazę adenylanową. Stanowi on wartościowe narzędzie do badania własności receptora CB₂ (28).

W tym samym roku badacze koncernu Eli Lilly otrzymali związek z grupy arylo-benzofuranów, oznaczony kryptonimem LY 320135, o cechach antagonisty wobec receptora CB₁. Jego powinowactwo do CB₁ jest ponad 100-krotnie wyższe niż do CB₂ (Tabela 3). Uważa się, że antagonistyczne własności LY 320135 są uwarunkowane obecnością grupy nitrylowej oraz brakiem grup mogących być donorami wiązań wodorowych.

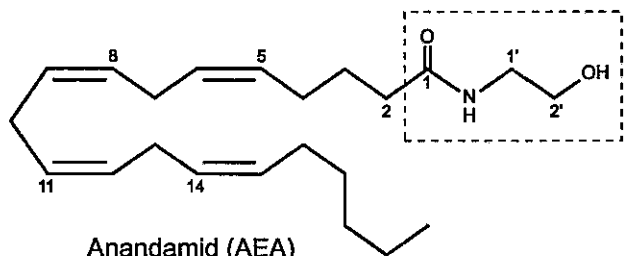
Z antagonistami receptorów CB₁ i CB₂ związane są nadzieje ich terapeutycznych zastosowań, np. do leczenia zaburzeń łaknienia, deficytów pamięci, a także jako czynników zapobiegających wytwarzaniu się zależności od opiatów oraz innych substancji psychoaktywnych. Również do zmniejszenia dyskinezy w chorobie Parkinsona.

Endogenne ligandy receptorów kannabinoidowych

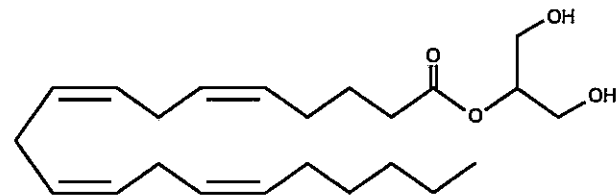
Odkrycie receptorów kannabinoidów skierowało uwagę badaczy na poszukiwanie endogennych ligandów tych receptorów, które określano niefortunnie mianem endokannabinoidów (endocannabinoids)².

Zgodnie z przyjętym założeniem, że podobnie jak ligandy egzogenne (naturalne kannabinoidy i ich syntetyczne analogi), powinny one mieć charakter hydrofobowy, analizowano dokładnie ekstrakty z tkanki mózgowej wieprza uzyskane za pomocą rozpuszczalników organicznych, głównie mieszaniny chloroformu i metanolu. To teoretyczne założenie sprawdziło się w praktyce, gdyż udało się izolować silnie hydrofobową substancję lipidową – arachidonoilietanolamid, która wypierała specyficznego, znakowanego agonistę kannabinoidów z błon komórek mózgu szczura.

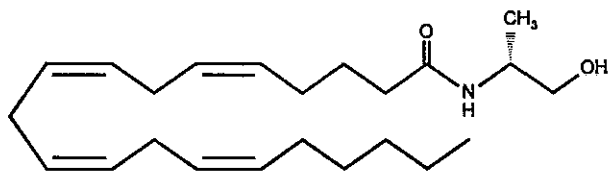
² Termin ten wprowadza w błąd sugerując endogenne powstawanie kannabinoidów. Powinno być „endogenne ligandy receptorów kannabinoidowych”, albo „endogenne związki kannabimimetyczne”. Termin „kannabinoidy” zastrzeżony jest dla trójcyklicznych pochodnych dibenzopiranu, a zarówno anandamid jak i 2-AG należą do acyklicznych eikozanoidów, czyli pochodnych kwasu arachidonowego. Interesująca wydaje się propozycja, aby związki te nazywać „endobinoidami” (endogenous cannabinoids), analogicznie do powszechnie stosowanego terminu „endorfiny” (endogenous morphines), określającego endogenne ligandy receptorów opioidowych.



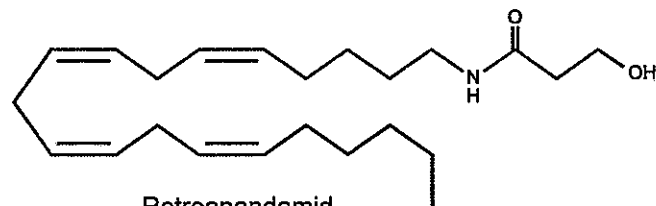
Anandamid (AEA)



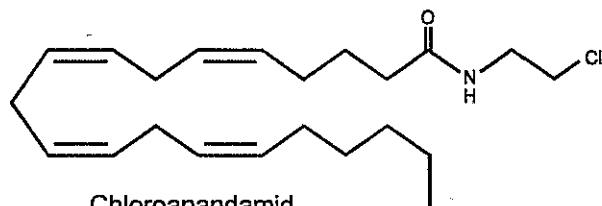
2-arachidonoliglycerol (2-AG)



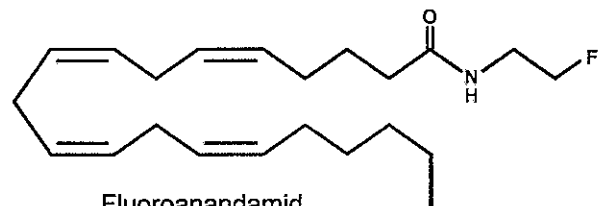
Metanandamid



Retroanandamid



Chloroanandamid



Fluoroanandamid

Ryc. 4. Endogenne ligandy receptorów CB_1 i CB_2 (AEA, 2-AG) i ich syntetyczne analogi strukturalne.

Substancję tę nazwano anandamidem od sanskryckiego słowa „ananda” oznaczającego błogostan, z końcówką podkreślającą strukturę amidową związku, który jest połączeniem kwasu arachidonowego i etanolaminy (Ryc. 4).

Anandamid wykryto również w mózgu owcy i krwi oraz w jądrach szczura (22). Po raz pierwszy syntezę anandamidu wykonano w pracowni Mechaulama, potwierdzając ostatecznie strukturę związku naturalnego. Wywołuje on efekt identyczny jak klasyczni agoniści kannabinoidów: hamowanie reakcji katalizowanej przez cyklazę adenylanową i efekt hamujący na kanały wapniowe, a także objawy obserwowane po przyjęciu Δ^9 -THC, jak hypotermia, analgezia, zmniejszona ruchliwość i katepsja. Jednakże pojawiają się one dopiero przy wysokich stężeniach anandamidu, gdy z jakichś powodów ulegnie zahamowaniu jego metabolizm.

Stosunkowo niskie powinowactwo anandamidu do CB_1 pozwalało przypuszczać, że mogą istnieć jeszcze inni endogenni agoniści o wyższym powinowactwie do receptora lub – odwrotnie – inne, dotąd nieodkryte, miejsca receptorowe, wykazujące wyższe powinowactwo do anandamidu. Rzeczywiście, wkrótce został wykryty drugi endogenny agonista receptora CB_1 – 2-arachidonoiloglicerol (2-AG) (Ryc. 4). Izolowano go najpierw z jelita psa, a później z komórek neuroblastomy myszy i mózgu szczura, gdzie poziomy 2-AG były blisko 200 razy wyższe niż anandamidu. Jednakże 2-AG, podobnie jak anandamid, wykazuje stosunkowo niskie powinowactwo zarówno do CB_1 , jak i CB_2 (22).

Obecnie główny wysiłek badawczy koncentruje się na poznawaniu biosyntezy i metabolizmu endogennych agonistów oraz ich roli w prawidłowych procesach fizjologicznych (9).

Anandamid działa szybciej, ale krócej niż Δ^9 -THC i jest bardziej wrażliwy na działanie amidaz. Wiąże się on z receptorem CB_1 , wykazując powinowactwo o połowę niższe niż Δ^9 -THC (K_i dla anandamidu = 89 nmoli, a dla Δ^9 -THC = 41 nmoli).

Compton i wsp. (6) stwierdzili, że farmakologiczne działanie anandamidu ulegało wyraźnemu nasileniu, gdy przed jego podaniem myszy otrzymywały inhibitor amidohydrolazy – fenylometrylosulfonylofluorek (PMSF).

Utrzymywanie się efektów anandamidu po spadku stężenia w mózgu poniżej granicy wykrywalności (19) może wskazywać, że za jego farmakologiczne działanie odpowiedzialne są w jakimś stopniu również metabolity związku. Ciekawą właściwością anandamidu jest dwufazowe działanie na zachowanie myszy: w wysokich dawkach tradycyjny wpływ hamujący, a w dawkach niskich – stymulujący. Anandamid występuje w mózgu w środowisku innych etanolamidów i amidów nienasyconych kwasów tłuszczowych, z których większość nie wiąże się z CB_1 , ale przynajmniej dwa: homo- γ -linoleoiloeanolamid oraz dokozatetraenoiloeanolamid wykazują pewną aktywność kannabimimetyczną (18). Również drugiemu endogennemu ligandowi receptorów kannabinoidowych, 2-AG, towarzyszą w tkankach liczne estry kwasów tłuszczowych i glicerolu, z których 2-lineoiloglicerol (2-Lino-Gl) oraz 2-palmitoiloglicerol (2-Palm-Gl) bardzo wyraźnie nasilają proces wiązania 2-AG z receptorem, chociaż same się z nim nie wiążą. Efekt ten (tzw. „entourage effect”) może być jednym z elementów molekularnej regulacji aktywności endogennych ligandów.

W mózgu ludzkim stężenie anandamidu jest stosunkowo wysokie (dużo wyższe niż u kilku badanych gatunków zwierząt) i wynosi ponad 100 pmoli/g tkanki w hipokampie, 75 pmoli/g we wzgórzu i ok. 60 pmoli/g w mózdzku. W śledzienie i sercu poziomy te nie przekraczają 10 pmoli/g, a w surowicy, osoczu i płynie mózgowo-rdzeniowym jego stężenie jest jeszcze niższe.

Sugiura i wsp. (30) wykryli anandamid w jądrach szczura, a Schmid i wsp. (wg 19) w macicy. Jego stężenie maleje w okresie gotowości macicy do implantacji jaja, a rośnie – gdy macica jest oporna na implanty. Spostrzeżenia te pomogą, być może, lepiej zrozumieć fizjologię płodności ssaków.

Historia badań prowadzonych nad receptorami kannabinoidów w latach 90. przypomina wcześniejsze o 20 lat badania nad opiatami. W obu przypadkach mamy do czynienia w psychoaktywnymi substancjami izolowanymi z roślin, z występowaniem w tkankach (głównie w mózgu) swoistych receptorów (μ , δ , κ dla opiatów oraz CB_1 i CB_2 dla kannabinoidów) a także endogennych agonistów tych receptorów: endorfin i enkefalin dla opiatów oraz anandamidu i 2-AG dla kannabinoidów.

Biosynteza i katabolizm endogennych agonistów

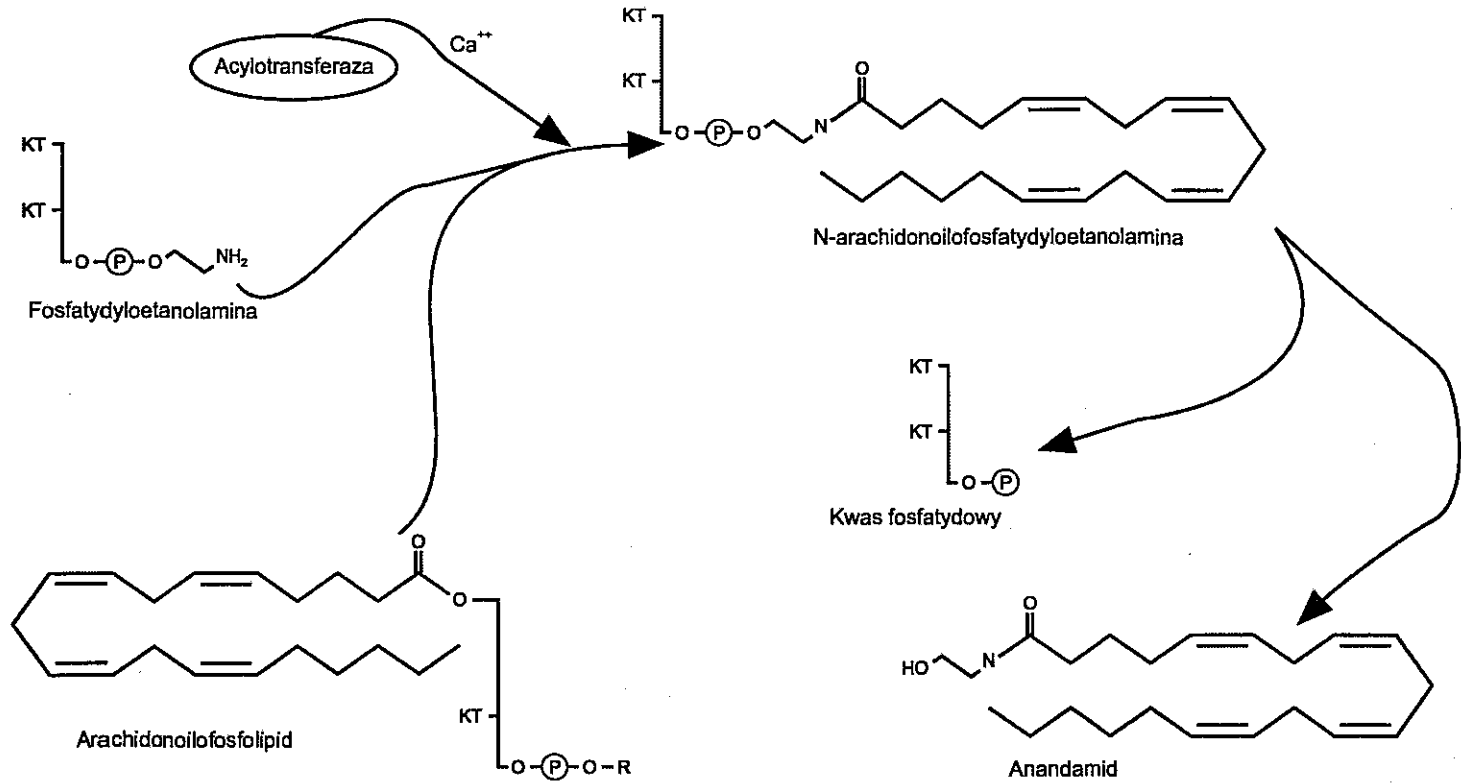
Nie ma pełnej zgodności na temat biologicznego mechanizmu syntezy anandamidu w komórkach. Jednym z możliwych mechanizmów mogłaby być kondensacja kwasu arachidonowego z etanolaminą katalizowana przez hydrolazę działającą w odwrotnym kierunku. Wątpliwość budzą jednak wysokie stężenia substratów konieczne do przebiegu tej reakcji (K_m dla etanolaminy = 25-130 mmoli, a dla kwasu arachidonowego 7-100 mmoli). Dlatego obecnie przyjmuje się, że anandamid występuje w błonach w postaci fosfolipidowego prekursora, N-arachidonoilofosfatydyloetanolidu, który tworzy się z fosfatydyloetanolidu i fosfolipidu zawierającego kwas arachidonowy w wyniku działania acylotransferazy aktywowanej przez wzrost stężenia jonów wapnia (Ryc. 5). Acylotransferaza przenosi kwas arachidonowy z fosfolipidu na fosfatydyloetanolidinę i łączy go wiązaniem peptydowym z jej grupą aminową (Ryc. 5).

Uwolnienie anandamidu z cząsteczki prekursora następuje pod wpływem fosfolipazy D (PLD), stymulowanej przez niskie stężenie jonów wapnia. Eliminacja anandamidu następuje w wyniku wychwytu zwrotnego i metabolizmu (Ryc. 5).

W mechanizmie wychwytu uczestniczy przenośnik wysycalny, selektywny, zależny od temperatury i niezależny od jonów sodu. Przenośnik ten obniża biologiczne efekty anandamidu ponieważ transportuje go z przestrzeni pozakomórkowej do komórek, w których anandamid ulega metabolizmowi, polegającemu na hydrolizie katalizowanej przez związaną z błoną amidohydrolazę zwaną amidohydrolazą anandamidu (AAH) lub amidohydrolazą kwasów tłuszczowych (FAAH)³.

Dlatego warunkiem degradacji anandamidu jest jego dyfuzja lub wychwyt do cytoplazmy. Ostatnio skłonowano amidohydrolazę i stwierdzono, że jest ona błonowym białkiem o ciężarze cząsteczkowym 60-65 KDa.

³ Inna nazwa tego enzymu spotykana w piśmiennictwie to amidaza anandamidu.



Najwyższą aktywność enzymu stwierdzono w gałce bladej i hipokampie, regionach odznaczających się wysoką gęstością CB₁. 2-AG wykazuje również duże powinowactwo do przenośnika i jest przy jego udziale przenoszony do wnętrza komórek. Przenośnik odznacza się dużą stereoselektywnością. Np. S-metanandamid jest czterokrotnie bardziej efektywny niż R-metanandamid w hamowaniu transportu anandamidu (17).

N-(4-hydroksyfenylo)-arachidonamid (AM 404) jest silnym inhibitorem wychwytu anandamidu do neuronów i astrocytów. Hamowanie to ma charakter kompetycyjny, co sugeruje, że może on służyć jako pseudosubstrat transportu. Jego izomer różniący się jedynie lokalizacją grupy hydroksylowej, N-(3-hydroksyfenylo)-arachidonamid (AM 403), wykazuje działanie podobne, ale dziesięciokrotnie słabsze.

Arachidonamid i N-(O-hydroksyfenylo)-arachidonamid są lepszymi substratami AAH od anandamidu; ich hydroliza przebiega dwukrotnie szybciej. Przez wprowadzenie grupy metylowej w pozycje C2, C1' lub C2' anandamidu otrzymuje się analogi metabolicznie stabilne. Przedstawicielem tej grupy związków jest R-1' metyloanandamid (AM 356), wykazujący czterokrotnie wyższe powinowactwo do CB₁ niż anandamid.

AAH odznacza się dużą stereoselektywnością: R-1'-metanandamid i S-2'-metanandamid są 10-19 razy bardziej stabilne metabolicznie niż ich odpowiednie enancjomery.

Wkrótce po wykryciu amidohydrolazy otrzymano szereg jej inhibitorów, które hamują metabolizm anandamidu powodując wzrost jego stężenia w tkankach. Są to głównie pochodne kwasu arachidonowego:

- metyloarachidonoilofluorofosforan (MASF);
- diazometyloarachidonoiloketon (ADMK, DAAK);
- arachidonoilochlorometyloketon (ACMK);
- acetyloarachidonoilohydroksamian (ACANA);
- arachidonoilotrifluorometyloketon (ATFMK);
- a także związki o nieco innej strukturze – fenylometrylosulfonylofluorek (PMSF)

i palmitylosulfonylofluorek (AM 374). Ten ostatni działa 50 razy silniej niż ATFMK i 20 razy silniej niż PMSF.

Również niektóre kannabimimetyczne ligandy, strukturalnie bardzo różne od anandamidu, potrafią rozpoznawać i kompetycyjnie hamować AAH, nie wiadomo jednak, co warunkuje takie działanie. I tak np. niesterydowy lek przeciwzapalny, ibuprofen, hamuje metabolizm anandamidu, natomiast inne preparaty przeciwzapalne: kwas acetylosalicylowy, acetaminofen, sulindak, ketoprofen i naproksen nie wykazują takich własności.

Ciekawe, że naturalne kannabinoidy, jak Δ^8 -THC, kannabidiol i kannabinol, również hamują hydrolizę anandamidu. Działanie to ulega osłabieniu w przypadku kannabinoidów zawierających dodatkową grupę hydroksylową i dłuższy łańcuch boczny, takich jak 11-hydroksy-DMH- Δ^8 -THC i nie-klasyczne kannabinoidy CP 55940 i CP 55244.

Metabolizm 2-AG nie został dotąd dokładnie zbadany. Bisgono i wsp. (3) wykazali, że subkomórkowe frakcje komórek N18TG2 zawierają aktywność enzymatyczną,

która szybko rozkłada syntetyczny [^3H]2-AG na kwas [^3H]-arachidonowy. Goparaju i wsp. (12) stwierdzili, że amidohydrolaza rozkłada również 2-AG.

Perspektywy terapeutycznych zastosowań agonistów i antagonistów CB_1 i CB_2

W badaniach nad kannabinoidami, które oprócz szkodliwego wpływu na organizm ludzki mogą wywierać również pewne działania lecznicze, zawsze przewijała się myśl, a może raczej pobożne życzenie, że uda się oddzielić ich szkodliwe efekty psychotropowe od niektórych korzystnych działań somatycznych. Odkrycie receptorów kannabinoidów i ich endogennych agonistów oraz otrzymanie na drodze syntezy licznej grupy kannabimimetycznych ligandów o bardzo zróżnicowanej strukturze chemicznej przyczyni się, być może, w jakimś stopniu do spełnienia tych nadziei.

Można wymienić trzy podstawowe kierunki leczniczych zastosowań naturalnych kannabinoidów: działanie analgetyczne, przeciwwymiotne i przeciwjaskrowe.

Spośród wielu farmakologicznych własności kannabinoidów analgezja ma chyba największe szanse praktycznych zastosowań, gdyż ich własności antynocyceptywne wykazano zarówno u zwierząt doświadczalnych, jak i ludzi.

Po wykryciu receptorów kannabinoidowych oraz ich endogennych agonistów wiadomo, że mamy do czynienia z drugim, obok opioidowego, endogennym systemem kontroli bólu.

Δ^9 -THC jest stosowany w postaci preparatów leczniczych – Drobinolu i Marinolu produkowanych przez United Pharmaceuticals (USA), a jego syntetyczny analog w postaci Nabilonu.

Badacze z koncernu Pfizera opisali znieczulający i przeciwwymiotny lek levonantradol oraz serię dwu i trójpierścieniowych kannabinoidów (23).

Levonantradol wywołuje analgezję na różnych modelach antynocycepcji u gryzoni i przeszedł próby kliniczne jako środek usuwający ostre bóle pooperacyjne. Levonantradol i jego metabolit – dezacetylolevonantradol okazały się silnymi agonistami kannabimimetycznymi w testach na hypertermię i zmniejszoną ruchliwość oraz regulację cyklazy adenylanowej *in vitro*.

Nie brak zwolenników poglądu, że mimo pewnego ryzyka marihuana powinna być dostępna dla pacjentów, którzy nie reagują, lub źle reagują na inną terapię (1, 5, 7).

Kannabinol jest słabym agonistą a kannabidiol – antagonistą działającym w zakresie mikromolowych stężeń. Dlatego zmieniający się stosunek tych składników w różnych próbkach marihuany może wpływać na jej efekty farmakologiczne. Naturalne i syntetyczne kannabinoidy, podobnie jak inne narkotyki, stymulują za pośrednictwem CB_1 , w sposób zależny od dawki, mezolimbiczne neurony dopaminergiczne, co tłumaczy uzależniające własności marihuany (11).

Δ^9 -THC za pośrednictwem CB_1 i CB_2 hamuje nocycepcję (przewodzenie bólu) oraz nasila antynocyceptyjne działanie morfiny u myszy (29).

Niektóre nieaktywne estry glicerołu i kwasów tłuszczowych towarzyszące 2-AG nasilają jego wiązanie z receptorami, zmniejszają wychwytywanie do komórek i hamują hydrolizę, co wywołuje wyraźne wzmocnienie efektów. Chociaż anandamid,

SR141716A i CP55940 konkurują o CB_1 , SR141716A nie blokuje farmakologicznych efektów anandamidu. Może to wskazywać, że nie wszystkie efekty anandamidu są wynikiem bezpośredniej interakcji z receptorem.

HU-211 (Deksanabinol) – niepsychotropowy optyczny enancjomer HU-210 jest obecnie badany przez Pharmos Corporation (w USA i Izraelu) jako czynnik neuroprotekcyjny w leczeniu uszkodzeń mózgu związanych z udarem, zatrzymaniem akcji serca, urazami mózgu. Podobne działanie przypisuje się również kannabidiolowi.

Fazę badań klinicznych, prowadzoną w Izraelu na pacjentach z ciężkimi urazami głowy, uznano za obiecującą, chociaż liczba pacjentów była za mała, by można było uzyskać wyniki statystycznie znaczące. Próby te są jednak ważne, gdyż brak leków neuroprotekcyjnych zapobiegających śmierci komórek po urazach mózgu.

Rozkurczające naczynia krwionośne działanie anandamidu i 2-AG może wynikać z ich udziału w uwalnianiu NO (25) i świadczyć, że są one ważnym elementem regulacji ciśnienia krwi (21). Wykrycie CB_1 i anandamidu w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych u ludzi może wskazywać na rolę anandamidu w modulacji napięcia naczyniowego (30).

Inne wyniki sugerują, że wazodylatacyjne efekty anandamidu nie wiążą się z działaniem na CB_1 , lecz są spowodowane przez powstający w wyniku jego hydrolizy kwas arachidonowy, który ulega przemianie w obdarzone wazodylatacyjnym działaniem eikozanoidy (24).

Stwierdzono, że anandamid silnie i selektywnie hamuje proliferację komórek raka piersi pobranych od kobiet. Odbywa się to przez redukcję komórek w fazie S cyklu komórkowego. Spostrzeżenie to może mieć znaczenie praktyczne (8).

Dwaj agoniści receptorów znaleźli zastosowanie kliniczne do łagodzenia mdłości i wymiotów wywołanych podawaniem leków przeciwnowotworowych oraz do zwiększenia łaknienia u chorych na AIDS. Są to Δ^9 -THC (Dronabil) oraz jego syntetyczny analog – Nabilon. Inne możliwe terapeutyczne zastosowania agonistów receptorów to łagodzenie bólów pooperacyjnych, bólów związanych z chorobą nowotworową, bólów neuropatycznych, tłumienie pewnych objawów stwardnienia rozsianego oraz urazów kręgosłupa.

Strukturalny analog Δ^9 -THC-9-nor-9 β -hydroksyheksahydrokannabinol (HHC) jest prototypem grupy syntetycznych analgetyków kannabinoidowych, z której wywodzą się związki działające silniej niż naturalne kannabinoidy.

Agoniści receptorów kannabinoidowych mogą być również pomocni w leczeniu jaskry, astmy oskrzelowej i zaburzeń typu zapalnego.

Antagonista receptora CB_1 , SR141716A, może pomóc w zmniejszaniu deficytów pamięci związanych z wiekiem i chorobami neurologicznymi.

Istotnym celem poszukiwań nowych środków terapeutycznych jest opracowanie strategii minimalizującej występowanie efektów niepożądanych bez osłabienia działań leczniczych.

Jedną z dróg polega na aktywacji endogennego układu kannabinoidów i zwiększeniu stężeń endogennych agonistów w bezpośrednim sąsiedztwie receptorów, aby leki nie działały jednocześnie na wszystkie elementy endogennego układu kannabinoido-

wego, lecz tylko na miejsca, w których trwa produkcja endogennych agonistów. Istnieją już związki hamujące transport endogennych ligandów z przestrzeni pozakomórkowej do wnętrza komórek i niedopuszczające tym samym do ich rozkładu przez wewnątrzkomórkową amidohydrolazę.

Co się tyczy bezpośredniej aktywacji receptorów CB_1 , możliwe jest minimalizowanie niepożądanych efektów ośrodkowych przez podawanie agonisty receptorów CB_1 o wysokim powinowactwie i małej skuteczności.

Agonista CB_1 o wysokim powinowactwie, ale słabych, niepożądanych właściwościach, pozwala osiągnąć efekty pożądane. Takim związkiem jest ligand o wysokim powinowactwie do CB_1 oznaczony kryptonimem (0-832).

Interesujące efekty terapeutyczne mogą posiadać również agoniści receptora CB_1 , którzy nie przechodzą łatwo przez barierę krew-mózg, łatwo natomiast docierają do receptorów kannabinoidów w tkankach obwodowych. Mogą one, na przykład, okazać skuteczność w leczeniu niektórych zaburzeń układu pokarmowego, moczopłciowego i sercowo-naczyniowego, gdyż w układach tych występują receptory CB_1 , które w stanie zaktywowanym modulują uwalnianie neuroprzebieżników.

Doniesiono już o otrzymaniu efektywnego antagonisty receptora CB_1 , który nie przechodzi przez barierę krew-mózg.

Kwas dimetyloheptylo- Δ^9 -THC-karboksylowy, ze względu na silne właściwości przeciwwzapalne może być uważany za potencjalny lek o tym kierunku działania.

STRESZCZENIE

W ciągu ostatnich lat w badaniach nad działaniem kannabinoidów dokonał się znaczny postęp związany z odkryciem dwóch odrębnych receptorów CB_1 i CB_2 oraz dwóch endogennych agonistów tych receptorów – anandamidu i 2AG. Poznano przebieg biosyntezy i metabolizmu anandamidu oraz zsyntetyzowano szereg inhibitorów jego rozkładu, które pomagają wyjaśnić rolę endogennych agonistów w regulacji różnych procesów fizjologicznych. Otrzymano wielu egzogennych agonistów receptorów o wysokiej sile działania, zarówno analogów strukturalnych kannabinoidów, jak i związków z innych grup chemicznych: pochodnych aminoalkilindolu, diarylopirazolu, arylobenzofuranu i arylobenzotiofenu, dzięki którym poznano rozmieszczenie receptorów CB_1 i CB_2 w mózgu, układzie immunologicznym i innych tkankach oraz ich właściwości biochemiczne i farmakologiczne. W oparciu o wyniki dotychczasowych badań można przewidywać, że pojawią się nowi agoniści i antagoniści o wysokiej selektywności nie tylko dla CB_1 , ale również dla CB_2 .

Odkrycie endogenego układu kannabinoidowego ukazało nowe perspektywy zastosowań zarówno naturalnych kannabinoidów i ich syntetycznych analogów, jak i strukturalnie odmiennych ligandów receptorów. Opracowano szereg nowych związków (agonistów i antagonistów) mogących modulować ten układ albo bezpośrednio – przez selektywną aktywację lub blokowanie CB_1 i/lub CB_2 , albo pośrednio – przez hamowanie wychwytu do tkanek lub hydrolizy enzymatycznej endogennych ligandów tych receptorów.

Podjęto próby zastosowania niektórych kannabinoidów w terapii: kannabidiolu (działanie neuroprotecyjne), CT_3 (działanie analgetyczne i przeciwzapalne), anandamidu (działanie analgetyczne i przeciwnowotworowe) oraz SR141716A (działanie antypsychotyczne).

Tak więc badania nad receptorami kannabinoidów, które doprowadziły do poznania ich struktury, współdziałania z aktywnymi biologicznie białkami oraz mechanizmów przekazywania sygnałów, mają nie tylko charakter poznawczy, ale również użyteczny i można oczekiwać, że w niedalekiej przyszłości niektóre ligandy receptorów CB_1 i CB_2 znajdą zastosowanie jako leki w różnych jednostkach chorobowych.

Słowa kluczowe: receptory CB_1 i CB_2 , białka G, egzogenne ligandy, endobinoidy, anandamid.

PIŚMIENNICTWO

1. Abrams D.I.: Medical marijuana: tribulations and trials. *J. Psych. Drugs*, 1998, 30, 187-196.
2. Barth F., Rinaldi-Carmona M.: The Development of Cannabinoid Antagonists. *Curr. Med. Chem.*, 1999, 6, 745-755.
3. Bisogno T., Sepe N., Melck D., Maurelli S., De-Petrocellis L., Di Marzo V.: Biosynthesis release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. *Biochem. J.*, 1997, 322, 671-677.
4. Bouaboula M., Dussossoy D., Casellas P.: Regulation of Peripheral Cannabinoid Receptor CB_2 Phosphorylation by the Inverse Agonist SR 144528. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 20397-20405.
5. Chan G.C., Hinds T.R., Impey S., Storm D.R.: Hippocampal neurotoxicity of D^9 -tetrahydrocannabinol. *J. Neurosci.*, 1998, 18, 5322-5332.
6. Compton D., Martin B.: The effect of the enzyme inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride on the pharmacological effect of anandamide in the mouse model of cannabimimetic activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1997, 283, 1138-1143.
7. Crites-Leoni A.: Medicinal use of marijuana. *J. Leg. Med.*, 1998, 19, 273-304.
8. De Petrocellis L., Melck D., Palmisano A., Bisogno T., Laezza C., Bifulco M., Di Marzo V.: The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1998, 95, 8375-8380.
9. Felder C.C., Glass M.: Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1998, 38, 179-200.
10. Gaoni Y., Mechoulam R.: Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, 86, 1646-1647.
11. Gessa G.L., Melis M., Muntoni A.L., Diana M.: Cannabinoids activate mesolimbic dopamine neurons by an action on cannabinoid CB_1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 1998, 341, 39-44.
12. Goparaju S., Ueda N., Yamaguchi H., Yamamoto S.: Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett.*, 1998, 422, 69-73.
13. Howlett A., Bonner T., Cabral G., Casellas P., Devane W., Felder C., Herkenham M., Martin B., Mechoulam R., Pertwee R.: Cannabinoid Receptors. *The IUPHAR Compendium of Re-*

- ceptor Characterization and Classification, Eds. T. Gotfraind, P. Humphrey, R. Ruffolo, P. Vanhoutte, IUPHAR Media, 1998, 97-104.
14. Huffman J.W.: Cannabimetic Indoles, Pyrroles and Indenes, *Curr. Med. Chem.*, 1999, 6, 705-720.
 15. Kearn C., Hillard C. J.: Evidence for peripheral-type cannabinoid receptors (CB₂) on rat microglial cells, *NIDA Res. Monogr.Ser.*, 1998, 178, 93.
 16. Kearn C., Greenberg M.J., DiCamelli R., Kurzawa K., Hillard C.J.: Relationship Between Ligand Affinities for the Cerebellar Cannabinoid Receptor CB₁ and the Induction of GDP/GTP Exchange. *J. Neurochem.*, 1999, 72, 2379-2387.
 17. Khanolkar A.D., Makriyannis A.: Structure-activity relationships of anandamide, an endogenous cannabinoid ligand. *Life Sci.*, 1999, 65, 607-616.
 18. Lambert D.M., Mar D.: The Palmitoylethanolamide and Oleamide Enigmas: Are These Two Fatty Acid Amides Cannabimimetic? *Curr. Med. Chem.*, 1999, 6, 757-773.
 19. Martin B.R., Mechoulam R., Razdan R.K.: Discovery and characterization of endogenous cannabinoids. *Life Sci.*, 1999, 65, 573-595.
 20. McIntosh H.H., Song C., Howlett A.C.: CB₁ cannabinoid receptor: cellular regulation and distribution in N18TG2 neuroblasma cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1998, 53, 163-173.
 21. Mechoulam R., Fride E., Ben-Shabat S., Meiri U., Horowitz M.: Carbachol, an acetylcholine receptor agonist, enhances production in rat aorta of 2-arachidonoylglycerol, a hypotensive endocannabinoid. *Eur. J. Pharmacol.*, 1998, 362, R1-R3.
 22. Pertwee R.G.: Pharmacological, physiological and clinical implications of the discovery of cannabinoid receptors. *Biochem. Soc. Transact.*, 1998, 26, 267-272.
 23. Pertwee R.G.: Pharmacology of Cannabinoid Receptor Ligands, *Curr. Med. Chem.*, 1999, 6, 635-664.
 24. Pop E.: Cannabinoids, endogenous ligands and synthetic analogs. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1999, 3, 418-425.
 25. Randall M.D., Kendal D.A.: Endocannabinoids: a new class of vasoactive substances. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1998, 19, 55-58.
 26. Reggio P.H.: Ligand-Ligand and Ligand-Receptor Approaches to Modeling the Cannabinoid CB₁ and CB₂ Receptors: Achievements and Challenges, *Curr. Med. Chem.*, 1999, 6, 665-683.
 27. Rinaldi-Carmona M., Barth F., Millan J., Derocq J., Casellas P., Congy C., Oustric D., Sarran M., Bouaboula M., Calandra B., Portier M., Shire D., Breliere J.C., Le Fur G.L.: SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB₂ cannabinoid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1998, 284, 644-650.
 28. Shire D., Calandra B., Bouaboula M., Barth F., Rinaldi-Carmona M., Casellas P., Ferrara P.: Cannabinoid receptor interactions with the antagonists SR 141716A and SR 144528. *Life Sci.*, 1999, 65, 627-635.
 29. Smith F.L., Cichewicz D., Martin Z.L., Welch S.P.: The enhancement of morphine antinociception in mice by D⁹-tetrahydrocannabinol. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1998, 60, 559-566.
 30. Sugiura T., Kodaka T., Nakane S., Kishimoto S., Kondo S., Waku K.: Detection of an endogenous cannabimimetic molecule, 2-arachidonoylglycerol, and cannabinoid CB₁ receptor

mRNA in human vascular cells: is 2-arachidonoylglycerol a possible vasomodulator? *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1998, 243, 838-843.

31. Szukalski B.: Kannabis – biochemia, farmakologia i toksykologia. *Alkoholizm i Narkomania* 1997, 27, 123-145.
32. The RBJ Handbook of Receptor Classification and Signal Transduction. Ed.: K.J. Watling, RBI, Natick. MA, *Cannabinoid Receptors*, 1998, 18-19.
33. Vincent B.J., McQuiston D.J., Einhorn L.H., Nagy C.M., Brames M.J.: Review of cannabinoids and their antiemetic effectiveness. *Drugs*, 1983, 25 (Suppl. 1), 52-62.
34. Vivian J.A., Kishioka S., Butelman E., Broadbear J., Lee K., Woods J.H.: Analgesic, respiratory and heart rate effects of cannabinoid and opioid agonists in rhesus monkeys: antagonists effects of SR 141716A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1998, 286, 697-703.