

КУРСОВА РАБОТА

ЕНДОКАНАБИНОИДНА СИСТЕМА

Курсов ръководител:
Доц.д-р Радой Иванов

Изготвил:
Мария Антонинова Нинова
МБ, ф.н. 9834

София 09/2007

Съдържание:

Резюме.....	1
Що е ендоканабиноидна система? История.....	2
Лиганди	2
Рецептори – локализация и структура.....	4
Механизми на действие на ЕКС	
Общи положения.....	7
Синтез и освобождаване на ендоканабиноиди.....	9
Действие на ендоканабиноидните рецептори.....	11
○ СВ1	
○ СВ2	
○ Други	
Прекратяване на действието на ендоканабиноидите: разграждане.....	16
Физиологична роля на ЕКС:	
Роля на ЕКС в ЦНС.....	17
Роля на ЕКС в метаболизма на глюкозата и мастните киселини.....	23
Роля на ЕКС в имунна система.....	25
Роля на ЕКС в сърдечно-съдовата система.....	27
Роля на ЕКС в репродуктивната система.....	28
ЕКС и рак	
31	
Заклучение.....	32
Литература	
34	

Ендогенната канабиноидна система (ендоканабиноидна система, ЕКС) е повсеместно разпространена липидна сигнална система, която се появява на ранен етап от еволюцията и има важна регулаторна функция. Тя включва трансмембранни ендоканабиноидни рецептори (канабиноидни "CB" рецептори), техните ендогенни лиганди (ендоканабиноиди), белтъците, участващи в синтеза и инактивирането на тези лиганди, както и вътреклетъчните сигнални пътища, които се намират под въздействието на ендоканабиноидите. Названието "Ендогенна Канабиноидна Система" произлиза от латинското име на растението индийски коноп (*Cannabis sativa*), тъй като веществата, на които се дължат неговите психоактивни и физиологични свойства са първите открити канабиноиди.

Най-разпространените известни ендогенни канабиноиди са естери на арахидоновата киселина, които се свързват с поне два познати вида рецептори CB₁ и CB₂ (характерни основно за белите кръвни клетки). Канабиноидните рецептори са G-протеин свързани белтъци, разпространени в множество органи и системи, като една от най-ярките им роли е на модулатори на предаването на нервни импулси. За разлика от класическите невротрансмитери, ендоканабиноидите не се съхраняват във везикули в пресинаптичната мембрана, а се синтезират директно след действието на сигнал от липидни предшественици в постсинаптичната мембрана. Оттам по пътя на ретроградната сигнализация се освобождават и свързват с рецепторите, разположени в пресинаптичната мембрана. В резултат на това се задействат редица биохимични процеси, като е известно инхибирането на цАМФ/ПКА пътищата, регулация на Ca²⁺ и K⁺ йонни канали, фосфолипаза С пътя, MAPK и синтеза на NO. Задействането на всички изброени каскади води до разнообразни ефекти в различните органи и системи.

В ЦНС действието на ендоканабиноидната система е свързано с общо задържане на освобождаването на медиатори, потискане на растежа на нервните влакна и образуването на нови синапси, потискане на функции като памет, обучение, движение, апетит. Взаимодействието на ендоканабиноидната система с опиоидни и допаминови рецептори е има отношение към мозъчната система за възнаграждане и съответно състоянията на нервност и изграждането на зависимости.

Освен че участва в нервната регулация на апетита, ендоканабиноидната система играе роля в метаболизма на мазнините и глюкозата, като действието ѝ е свързано с натрупването на мазнини и съответно затлъстяване.

Ендоканабиноидни рецептори се откриват в клетки на имунната, сърдечно-съдовата и репродуктивната система. Имуномодулиращото действие на ендоканабиноидите се изразява в общо потискане на възпалителните процеси, а в кръвоносните съдове агонистите на канабиноидните рецептори водят до вазодилатация. Що се отнася до репродуктивната система, ендоканабиноидите изглежда имат отношение към процесите на оплождане и имплантация на ембриона. Всички тези аспекти са разгледани по-подробно в настоящото изложение.

ИСТОРИЯ

Двадесет и четири години на изследвания делят идентификацията на главния психоактивен компонент на *Cannabis sativa* (фиг.1) и откритието и клонирането на неговите клетъчни мишени – канабиноидните рецептори.

През 1964 година за първи път е установен основният активен агент на марихуаната, а именно Δ -9-тетрахидроканабинолът (THC) (Gaoni and Mechoulam, 1964; Mechoulam, 1970). Характерните вторични метаболити на канабиса са наречени канабиноиди, а изследванията се насочват към техните психофизиологични функции.



Фиг.1 *Cannabis sativa*

В началото на 90-те години са открити и клонирани специфични рецептори за канабиноидите (Matsuda et al., 1990), а скоро след това е идентифициран и първия ендогенен канабиноид – анандамид (арахидоноил етаноламид, АЕА). С последващото описание на сложните биохимични пътища на синтезата, освобождаването, транспорта и разграждането на ендоканабиноидите се изгражда една по-пълна представа за новооткритата ендоканабиноидна сигнална система.

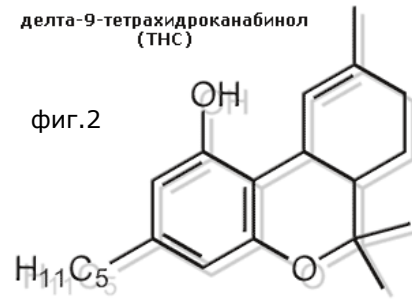
Днес тази система се приема за модулатор на функциите не само на централната нервна система, но също така на автономната нервна система, ендокринната, имунната, репродуктивната система, гастроинтестиналния тракт и кръвообращението.

ЛИГАНДИ

Наличието на рецептори за THC предполага съществуването на съответните им ендогенни лиганди. Широката дефиниция за “канабиноиди” се отнася до група вещества, които структурно наподобяват тетрахидроканабинола (THC) или се свързват с канабиноидните рецептори. Това определение включва разнообразни химични класове: класическите канабиноиди с подобна на THC структура; некласическите канабиноиди, аминоквалиндолите, ейкозаноидите, свързани с ендоканабиноидите, 1,5 - диарилпиразолите, хинолоните и арилсулфонамидите и други съставки, които не попадат в тези химически класове, но се свързват с канабиноидни рецептори.

Според настоящата класификация, канабиноидите се делят на три основни групи: растителни канабиноиди, ендогенни канабиноиди и синтетични канабиноиди.

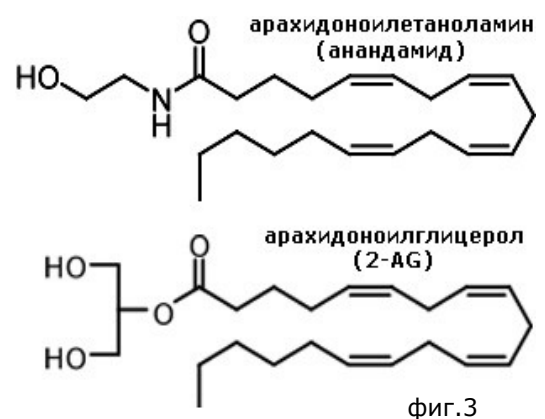
Растителните канабиноиди, наричани още естествени или класически, са разтворими в липиди, алкохоли и други неполярни органични разтворители вещества. Те са вторични метаболити на *Cannabis sativa* и се откриват се единствено в него. Днес са известни около седемдесет естествени канабиноиди, на които няма да се спираме в настоящото изложение. Най-важният от тях е Δ-9-тетрахидроканабинолът (ТНС, фиг.2), психоактивния компонент на растението. В медицинско отношение той може да се използва за намаляване на болката, като антиемитик или с невропротективни цели. Влияе основно върху нервната система.



Синтетични канабиноиди са разработвани отдавна. В началото били базирани на структурата на растителните канабиноиди, а по-късно – на ендогенните. Синтетичните канабиноиди са особено полезни в експериментите за определяне на връзката между структура и активност на канабиноидните вещества. Съществуват редица лекарствени препарати, аналози на канабиноидите, които се използват за стимулиране на апетита, против гадене, като болкоуспокояващо средство и др.

По-подробно ще се спрем на третата група канабиноиди, а именно *ендоканабиноидите*. Те са естествени продукти на метаболизма на животните и човека. В химично отношение, ендогенните канабиноиди са производни на арахидоновата киселина, подобно на други трансмитери с липидна природа (ейкозаноиди като простагландините и левкотрените), която е естерифицирана с етаноламин или глицерол.

Първият открит ендоканабиноид е арахидоноилетаноламин (АЕА), наречен *анандамид* (думата произхожда от санскрит и означава “вътрешно блаженство”). Във фармакологично отношение анандамидът наподобява ТНС, но химичната му структура се различава значително. Анандамидът се свързва и с двата известни канабиноидни рецептора, CB₁ и CB₂ (на чиято структура ще се спрем по-късно), и е установен в разнообразни тъкани много систематични групи животни. Силата му на действие е близка до тази на ТНС.



Подобна фармакология притежават и два анандамидни аналози, 7,10,13,16 докосатетраеноилетаноламид и хомо-гама-леноленоилетаноламин. Всички те са членове

на фамилията на сигналните липиди, наречени N-ацилетаноламиди, която включва и не-канабиноидите палмитоилетаноламин и олеоилетаноламин, притежаващи съответно противовъзпалително и стимулиращо апетита действие.

2-арахидоноил глицеролът (2-AG) е друг важен ендоканабиноид, който също се свързва с двата вида канабиноидни рецептори. Той притежава по-изразена активност по отношение на рецептор-зависимата G-протеинова активност в мембраните.

През 2001 година се съобщава за изолирането на нов канабиноид от мозък на свиня: 2-арахидонил глицеролов етер (ноладин), който се свързва с CB₁ рецептора и притежава седативен ефект и предизвиква хипотермия, потискане на перисталтиката и усещане за болка при мишки. Свързва се слабо с CB₂ рецептора.

Всички изброени ендоканабиноиди са открити в мозъка, кръвната плазма и периферните тъкани, макар че значението на ноладина е спорно, тъй като концентрацията му в мозъка е твърде ниска. Мозъчната концентрация на анандамид е около 200 пъти по-ниска от тази на 2-AG, така че последният се счита за най-разпространен. Моноглицеридът 2-AG е междинен метаболит от липидния метаболизъм, докато анандамидът е продукт от разграждането на мембранен фосфолипид. Все пак, за кратък период от време след деполяризация или рецепторна стимулация (например допамин-D₂-рецептор-медирана) концентрацията на анандамид може да се покачи до 5-12 пъти.

РЕЦЕПТОРИ

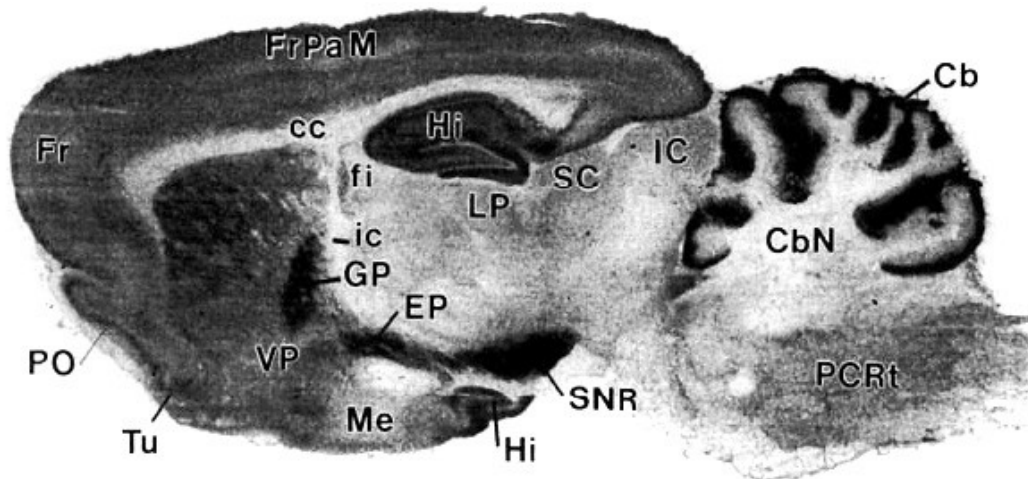
Понастоящем са известни са два канабиноидни рецептора: CB₁ и CB₂, принадлежащи към фамилията на G-протеин куплираните рецептори.

Локализация

CB₁ е първият открит и клониран рецептор за канабиноиди. Той е най-широко разпространеният G-протеин свързан рецептор в мозъка. Разпространението му е уникално както по отношение на плътността, така и на динамиката неговата на синтеза и транспорт. Концентрацията на ендоканабиноидните рецептори в мозъка е между 10 и 50 пъти по-висока от тази на рецепторите за класическите трансмитери, например допаминовите рецептори, но афинитетът им е по-нисък. Изследванията сочат, че канабиноидните рецептори се синтезират в телата на невроните и се транспортират до краищата на аксоните, т.е. локализиран са основно върху пресинаптичните мембрани. Нервните клетки, които експресират CB₁-рецептори са основно GABA-ергични неврони, в т.ч. холицистокинин съдържащи неокортикални, амигдални и хипокампови неврони и динорфин (ендогенен опиоиден пептид) и субстанция P(друг невропептид)-екс пресиращи

средни шипови неврони от еферентните ядра на базалния ганглий. Някои глутаматергични и холинергични неврони на крайния и малкия мозък също експресират CB₁ рецептори. В периферната нервна система CB₁ рецепторите са локализирани в сетивните неврони. Голямата плътност на CB₁ рецептори в малкия мозък, хипокампа, стриатума, globus pallidum и субстанция нигра е показател за биологичната им роля.

Експресията на CB₁ рецептори в хипоталамуса и хипофизата говори за участието им в отговора на стреса и модулирането на хипоталамо-хипофизно-адренортикалната ос. В хипоталамуса се намират центрове за контрол на приема на калории и регулирането на енергетичния обмен, следователно CB₁ рецепторите изглеждат са интегрален компонент на системите за контрол на апетита и приема на храна. CB₁ рецепторите са експресирани в голямо количество в мезолимбичните допаминови системи за възнаграждение, където се обработват възприятията свързани с удоволствие от вкусовете и стимулиране на апетита. Стимулирането на CB₁ рецептори в модулиращите апетита системи за възнаграждение се счита за двигател на предпочитанието към определени храни.



Разпространение на канабиноидните CB₁ рецептори в мозък на плъх (авторадиография с радиоактивно белязан антагонист).

Cb-малък мозък; **CbN**-вътрешни церебеларни ядра; **EP** – ентопедункуларно ядро, **fi**-fimbria hippocampus; **Fr**-фронтална кора; **FrPaM** –моторна зона на фронтално-париеталната кора; **GP** - globus pallidus; **Hi** - хипокампа; **IC** - inferior colliculi; **LP** – латерален постериорен таламус; **Me** – медиално ядро на амигдалата; **PO** - първична обонятелна кора; **PCRt** - nucleus reticularis parvocellularis; **SNR** - substantia nigra reticulata; **Tu** – обонятелен туберкул; **VP** – вендропостериорен таламус.

CB₁ -рецептори се откриват и в различни периферни тъкани като мастна тъкан, черен дроб, сърце, мускули, гастроинтестинален тракт, панкреас и други жлези, включително полови; физиологичната им роля ще бъде разгледана по-подробно по-късно.



CB₂ рецепторите първоначално са открити при множество лимфоидни органи, като най-висока експресия се наблюдава в В-лимфоцитите, умерена в моноцитите и полиморфонуклеарните неутрофили и най-ниска в Т-лимфоцитите. Изглежда че CB₂ рецепторите играят роля в макрофаг-медираното активиране на Т-хелпери, тъй като THC инхибира активирането на Т-клетките. По-късно подобни рецептори са открити в микроглиалните клетки при възпалителни процеси, а последни проучвания с човешки неутрофили показват, че вероятно CB₂ рецепторите потискат миграцията на неутрофили при възпаление.

Фармакологичните изследвания разкриват съществуването на други мишени за ендоканабиноидите, включително ванилоидни рецептори и поне още два близки до CB₁ и CB₂ рецептори, единия локализиран в кръвоносните съдове, а другия - в окончанията на аксоните на глутаматергичните неврони. Съществуването на тези и други предполагаеми канабиноидни рецептори и тяхната роля във физиологията може да бъде изяснена само след молекулярно-биологичното им изследване.

Интересен аспект на ендоканабиноидните рецептори е тяхната експресия по време на развитието на мозъка, при което те участват в контрола на клетъчната диференциация, както и присъствието им в производни на глията и епитела туморни клетки.

Структура

Канабиноидните рецептори, особено CB₁ рецепторите, са изключително консервативни. При човек, мишка и плъх се наблюдава 97-99% сходство в аминокиселинната и последователност. Консервативността вероятно означава, че това е древна сигнална система при гръбначните и някои безгръбначни с важни функции.

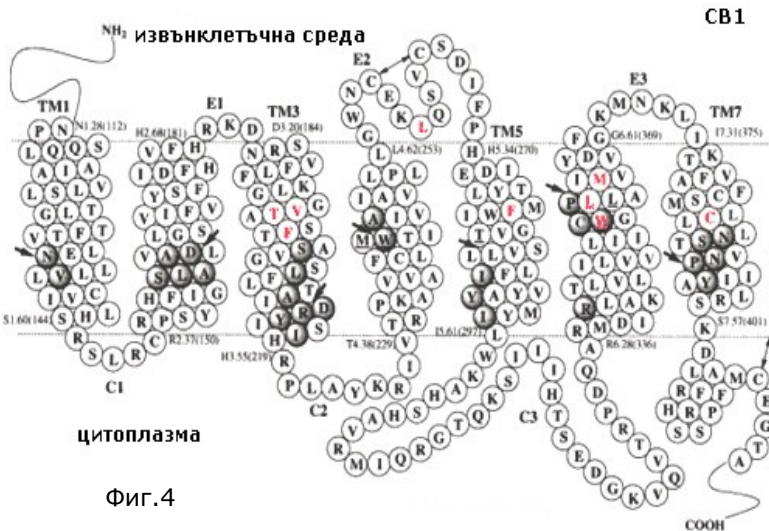
CB₁ рецепторът (фиг.4) е член на субфамилията на родопсина от групата на G-протеин свързаните рецептори и се състои от седем трансмембранны домена. Генът за този

рецептор се намира върху хромозома 6 (6q14-q15). СВ₂ рецепторите имат подобна структура и е установена локализацията им върху хромозома 1.

Доказано е, че СВ₁ рецепторите могат да формират както хомо-, така и хетеродимери. Хетеродимери се формират с D₂ допаминови

рецептори, някои опиатни рецептори и вероятно орексинови рецептори от тип 1. Значението на тази димеризация все още не е напълно изяснено.

Заклучението, че именно тези рецептори са мишени за канабиноидите, е направено след установяване на функционално инхибиране на аденилил циклазатната активност при добавяне на Δ-9-тетрахидроканабинол в клетки от невробластома. Третирането с пертусис токсин блокира този ефект, което доказва, че действието на канабиноидите е свързано с G_{i/o}-протеин (пертусис токсинът блокира активирането на G_i-протеините чрез добавяне на АДФ-рибозна група към специфичен цистеинов остатък на С-края на G_{iα}). Понякога СВ₁ рецепторите могат да бъдат двойно куплирани с G_s и G_{i/o} протеини (таблица). Необходими са допълнителни изследвания за установяване на физиологичната роля на двойното куплиране.



Фиг.4

МЕХАНИЗМИ НА ДЕЙСТВИЕ НА ЕКС

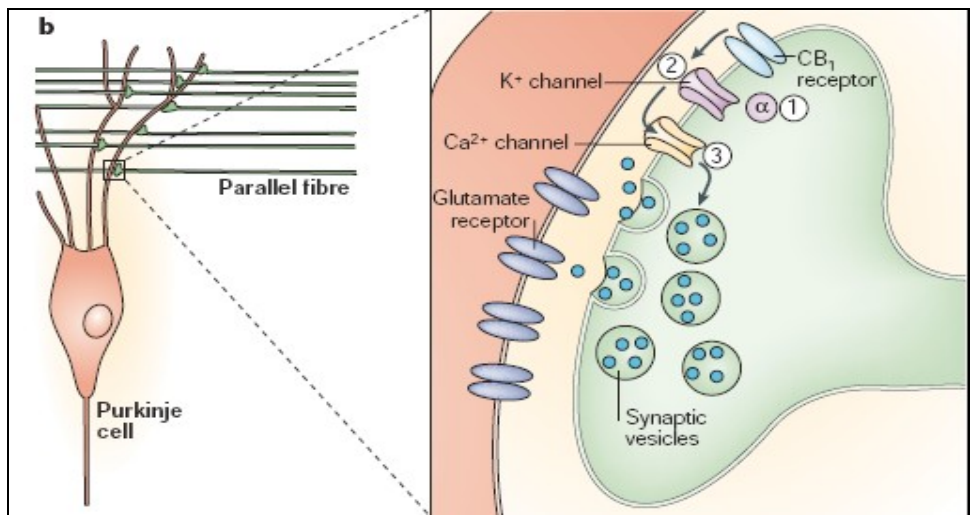
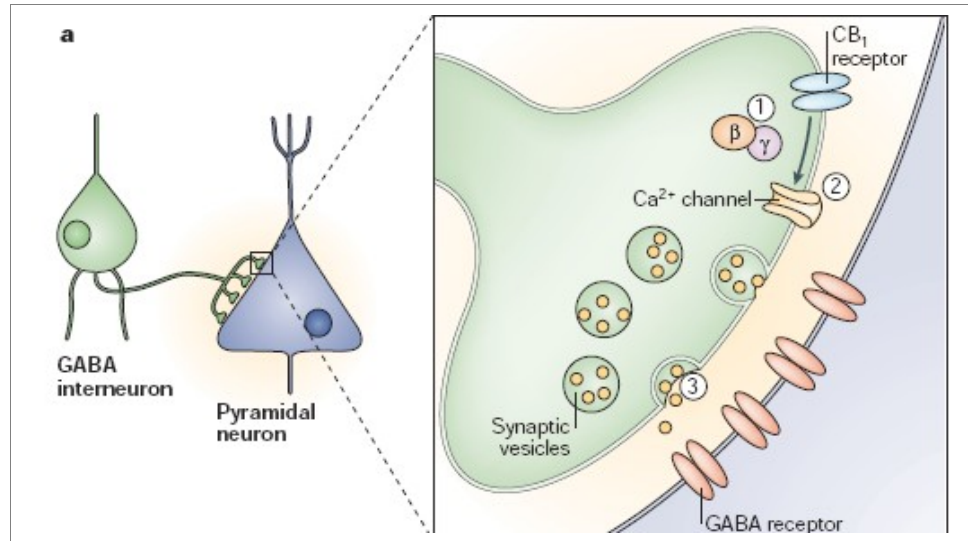
Видове сигнализация

И двата вида канабиноидни рецептори са свързани със сходни каскадни процеси.

Ендоканабиноидите участват в предаването на нервните импулси. Характерен и интересен аспект от действието на ендоканабиноидната система е т.нар. **ретроградното предаване**. В класическото предаване в химичните синапси импулсите се предават едностранно от пресинаптичната към постсинаптичната мембрана. Това се осъществява чрез освобождаване на съхранявани във везикули медиатори от пресинаптичната мембрана, които, свързвайки се с рецептори на постсинаптичната мембрана, генерират постсинаптичен потенциал.

Ендоканабиноидите не се съхраняват във везикули. Те се синтезират от липидни предшественици в постсинаптичната мембрана. Освобождането на ендоканабиноидите се осъществява след клетъчна деполяризация или калциево-свързана рецепторна стимулация. Веднъж освободени, те дифундират в синаптичната цепка и се свързват с рецептори върху пресинаптичната мембрана, като оказват инхибиторно действие върху освобождането на невромедиатори. Именно този обратен път се означава като ретроградна сигнализация (фиг.5а и б)

(5а) Примерно действие на ЕКС:
В синапсите между ГАМК-ергичните и пирамидалните неврони действието на канабиноидите води до серия от събития: (1) Активиране на G-протеиновите субединици; (2) затваряне на Ca^{2+} канали; (3) потискане на освобождането на ГАМК



(5б) Примерно действие на ЕКС:
В синапсите между клетките на Пуркиние и паралелните влакна: (1) Активиране на G-протеиновите субединици; (2) отваряне на K^+ канали водещо до мембранна деполяризация; (3) намаляване на навлизането на Ca^{2+} потискане на освобождането на глутамат

Съществуването на ретроградната сигнализация се подкрепя от два факта: високата концентрация на CB_1 рецептори в пресинаптичните терминали и инхибиторния ефект на CB_1 -рецепторните агонисти върху освобождането на гама-аминомаслена киселина, глутамат, ацетилхолин, норадреналин през определени синапси.

Като цяло, ендоканабиноидите играят ролята на локални сигнали, които регулират пластичността на синапсите и допринасят за елиминирането на потоци информация

Огромното влияние на стимулирането на канабиноидните рецептори върху вторичните посредници е от значение не само за синаптичното ремоделиране, но и за невронната диференциация и клетъчен цикъл. Ендоканабиноидната система представлява основен хомеостатичен механизъм, който осигурява регулацията на обработването на информация в мозъка и запазването на структурата и функциите му.

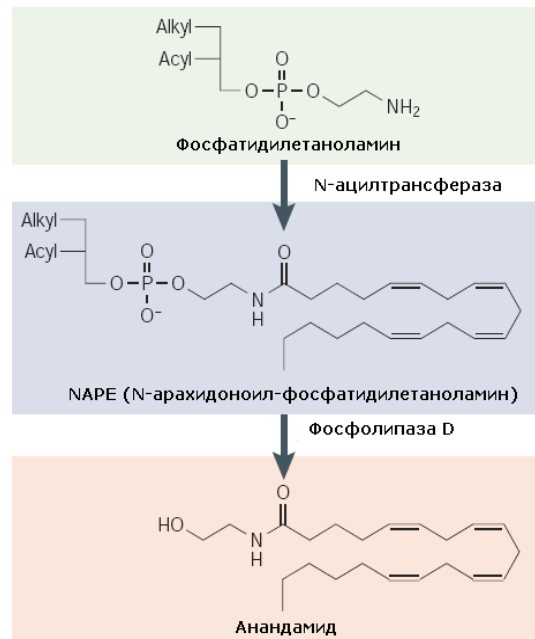
Освен това канабиноидите могат да изпълняват автокринна функция, свързвайки се с CB₁ рецептори на същата клетка, или паракринна, въздействайки на околни клетки, което е по-характерно за различни периферни тъкани.

Синтез и освобождаване на ендоканабиноиди

Синтезата и освобождаването на двата най-важни ендогенни канабиноида, анандамида и 2-арахидоноилглицерола се осъществяват по два различни биохимични пътя под действието на различни сигнали.

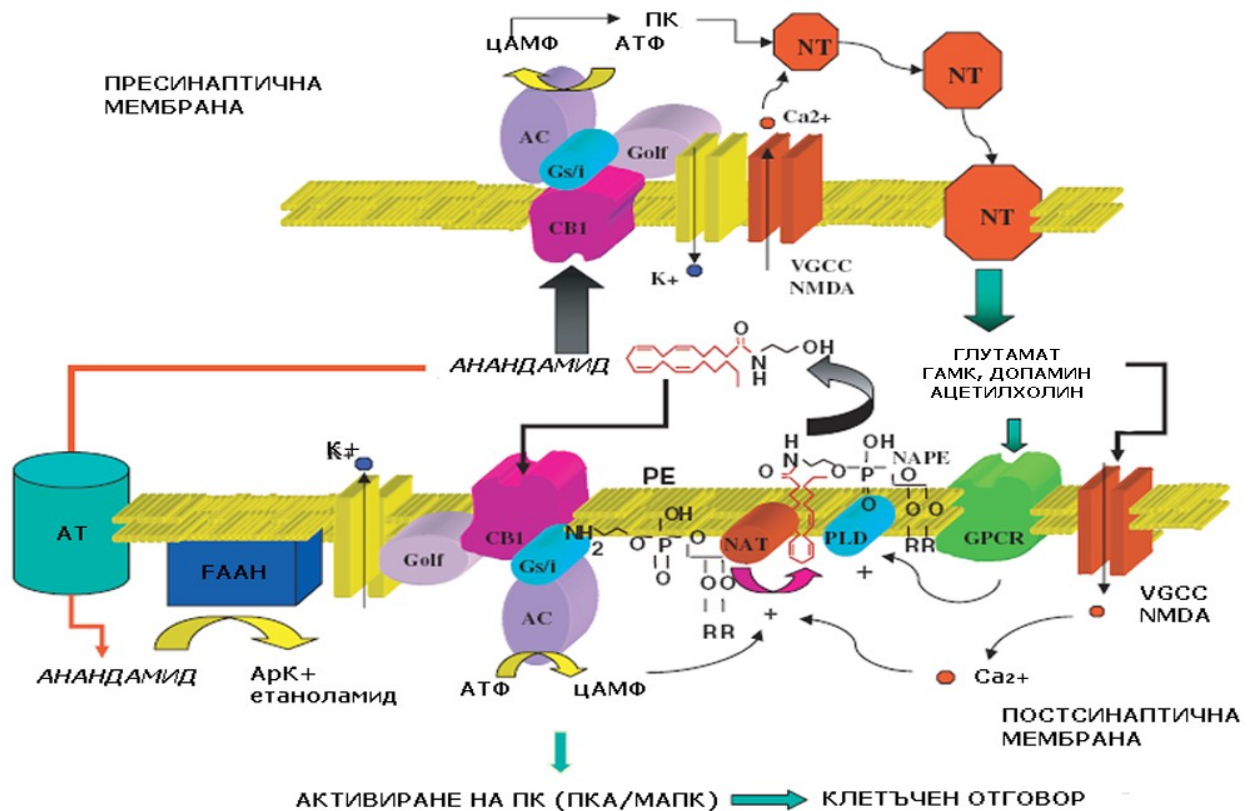
Анандамидът се отцепва от фосфолипиден предшественик, N-арахидоноил-фосфатидилетаноламин (NAPE), който от своя страна се синтезира с участието на ензима N-ацилтрансфераза (NAT). Този ензим катализира пренасянето на арахидоновата киселина от фосфатидилхолин към фосфатидилетаноламин и е активен в присъствието на Ca²⁺; регулацията му се осъществява чрез цАМФ-зависимата протеин киназа А, която го активира чрез фосфорилиране.

Освобождаването на анандамида от NAPE е катализирано от специфична наскоро клонирана фосфолипаза D (PLD), която не е хомоложна на познатите PLD-ензими и е класифицирана като член на цинк-металохидролазната фамилия. Концентрацията ѝ е най-висока в мозъка, бъбреците и тестисите. Активността на специфичната PLD се регулира от деполяризация или активиране на *йонотропни* глутамат/N-метил-D-аспартат (NMDA) рецептори или никотинови α7 невронни рецептори, както и от стимулацията на



фиг.6 Схема на биосинтезата на анандамид

метаботропни рецептори на основни невротрансмитери като допамин, глутамат и ацетилхолин. Подробния път е изобразен на фигура 7:



Фиг 7: Анандамидът се освобождава от мембранен липиден прекурсор (**NAPE**) под действието на фосфолипаза D (**PLD**, в синьо), активирана при деполяризация или чрез стимулация на G-протеин куплиран рецептор (**GPCR**). Синтезата на NAPE пък се катализира от мембранен ензим – NAT (N-ацилтрансфераза), активирана от калций и цАМФ. Анандамидът играе ролята на ретрограден сигнал за пресинаптичните канабиноидни рецептори (**CB1**), където регулира освобождаването на невротрансмитери (**NT**) чрез вторични сигнални системи [основно свързани с Ca²⁺ чрез потенциал-зависими калциеви канали (**VGCC**) или глутамат-(**NMDA** N-метил-D-аспартат)-рецептори]. Анандамидът работи и като невромодулятор на основни трансмитерни системи, вкл. допаминова, на постсинаптичните мембрани, където регулира възбудимостта и синаптичната пластичност чрез модулиране на калиеви канали, и регулиране на широк спектър протеин кинази (**ПК**), вкл. **PKA** и **MAPK**. Действието на анандамида се прекратява чрез двустъпален процес, включващ клетъчното му поглъщане от специфичен анандамиден транспортер (**AT**) и ензимното му разграждане до арахидонова киселина (**АрК**) и етаноламид от мембранно-свързания ензим **FAAH** (fatty acid Amidohydrolase).

Синтезата и освобождаването на 2-AG се различава от това на анандамида. 2-AG е моноглицерид и образуването му е тясно свързано с метаболизма на триацилглицеролите, основно чрез рецептор-зависимо активиране на фосфатидилинозитол-специфична фосфолипаза C (PLC). Според общоприетия модел, активирането на метаботропни рецептори, свързани с PLC и диацилглицерол липази

пътища, биха довели до повишаване на продукцията на 2-AG. Образоването на 2-AG също зависи от концентрацията на Ca^{2+} , но неговата регулация е независима от синтезата и освобождаването на анандамид.

Действие на ендоканабиноидите. CB_1 и CB_2 рецептор-свързани сигнални пътища

CB_1 -рецептор свързани сигнални пътища

При свързването на ендоканабиноидите с CB_1 рецепторите се отключват няколко различни сигнални пътища.

При свързване на ендоканабиноиди с канабиноидните рецептори първоначално е установено инхибиране на спрегнатото с G_i -протеини образуване на цАМФ, което води до намаляване на протеин киназа А-зависимото фосфорилиране в клетката, механизъм, стоящ в основата на множество биохимични каскади. При следващите проучвания се открива, че канабиноидните рецептори са свързани с йонни канали чрез Голф(специфични G-протеин свързани белтъци)-протеини и активирането им води до намален поток на Ca^{2+} през калциеви канали от N, P/Q и L-тип, както и предизвикването калиеви потоци към цитоплазмата. Тези действия са свързани с модулирането на освобождаването на невротрансмитери и синаптичната пластичност. Други проучвания установяват куплирането на CB_1 и CB_2 рецепторите с митоген-активирани протеин кинази (МАП-кинази), фосфатидилинозитол 3-кинази (PL3K), FA киназа (focal adhesion kinase), церамидната сигнализация и продукцията на азотен оксид. И накрая, последните проучвания разкриват, че при определени условия CB_1 рецепторите могат да стимулират образуването на цАМФ чрез куплиране с G_s протеини.

$G_{i/o}$ -медирана регулация на вътреклетъчния цАМФ и Протеин Киназа А (ПКА)

При CB_1 -експресиращи неврони на мозъчна тъкан се наблюдава инхибиране на продукцията на цАМФ под действието на агонисти на канабиноидните рецептори. Процесът може да бъде блокиран от пертусис-токсин, което показва участието на $G_{i/o}$ протеини.

Фосфорилирането на йонни канали на невроните от цАМФ-зависима ПКА е ключов механизъм за модулирането на отговора на йонотропни невротрансмитери. Например при хипокампусни неврони на плъх, увеличаването на концентрацията на вътреклетъчния цАМФ и съответното активиране на ПКА води до фосфорилиране на калиеви канали, при което те се инактивират. Свързването на лиганд към CB_1

рецепторите води до намаляване на вътреклетъчния цАМФ, респ. калиевите потоци се увеличават т.е. потискането на фосфорилирането на йонните канали води до хиперполяризация на мембраната на аксона и намален отговор на дразнене.

ЦАМФ/ПКА регулаторният път участва и в клетъчните промени в невронната структура, необходими за осигуряване на синаптичната пластичност. В модел на невробластома се наблюдава скъсяване на израстъците на нервните клетки в резултат на действието на СВ₁-рецепторен агонист. Вероятният механизъм на тази реакция е свързан с ендоканабиноид-медирана модулация на действието или на FAK (focal adhesion kinase), вид тирозин-киназа, участваща в цитоскелетните изменения при сигналната трансдукция, или на други FAK-свързани протеини. Анандамидът и други агонисти, както и различни инхибитори на ПКА стимулират FAK и FAK-свързаните протеини, докато 8-Br-cAMP потиска тяхното действие. Всичко това подсказва, че този път е свързан с G_i-медирано инхибиране на аденилил циклазната активност.

В нервни прогениторни клетки съдържащи СВ₁ рецептор, анандамидът и сходни вещества проявяват инхибиращо действие върху диференциацията и растежа на нервните влакна. Освен че за растежа е необходим цАМФ, чието формиране се потиска от канабиноидите, осъществяването му се стимулира от нервен растежен фактор (NGF), който се свързва със съответен рецептор (Trk-A) и повишава активността на необходимата за осъществяването му МАП-киназа. Някои антагонисти на СВ₁ рецепторите имат подобно стимулиращо действие. Наблюдението, че хормон-стимулираната продукция на цАМФ и анандамид имат противоположен ефект, говори за участието на ендоканабиноидната регулация в цАМФ/ПКА-регулацията на Trk-A рецепторния път.

G_{i/o}-медирана регулация на фосфолипаза C (PLC), водеща до освобождаването на инозитол трифосфат (IP3) и мобилизацията на вътреклетъчен Ca²⁺

Под действието на 2-AG и 1(3)-AG в нервни клетки се наблюдава краткотрайно повишаване на концентрацията на вътреклетъчния Ca²⁺. Подобен, но по-слаб ефект проявяват THC, анандамида и R-метанандамида. Инхибиторите на СВ₁ и пертусис-токсинът блокират процеса, което доказва участието на G_{i/o}-протеин свързани СВ₁ рецептори. Изглежда СВ₁ рецепторите активират фосфолипаза C, което води до освобождаване на инозитолтрифосфат и последващото увеличаване на вътреклетъчната

концентрация на Ca^{2+} , макар че регулацията на PLC от канабиноидни рецептори не е добре проучена.

Регулация на йонни канали чрез β γ субединици

Анандамидът взаимодейства с CB_1 рецептори, свързани с K_{ir} -йонни канали (изнасящи калий), което води до тяхното активиране. Блокирането на процеса от пертусис-токсин доказва участието на $G_{i/o}$ протеин.

Анандамидът се явява инхибитор на Ca^{2+} канали от L-тип в клетки на гладка мускулатура на мозъчни артерии на котка с доказана експресия на CB_1 рецептори. Ефектът се блокира от пертусис-токсин и антагонисти на CB_1 , което има фармакологично значение за отпускането на церебралните артерии. $G_{i/o}$ -свързаният CB_1 рецептор доказано инхибира и потенциал-зависимите Ca^{2+} канали от N-тип в диференцирана невробластома N18, NG108-15 невробластома-глиома хибридни клетки и др. 2-AG е действа като пълнен, а AEA – частичен агонист на CB_1 рецепторите при потискането на повишаването на клетъчния Ca^{2+} в резултат на деполяризация. Анандамидът и други канабиноиди инхибират и калциевите канали от Q-тип в експресиращи CB_1 клетки на хипофиза. Участието на $G_{i/o}$ -протеин се доказва от факта, че пертусис-токсинът потиска тяхното действие. Инхибирането на P/Q- Ca^{2+} потоци в резултат на действието на анандамид с доказано участие на $G_{i/o}$ -протеини е наблюдавано и в кората на главния мозък на плъх.

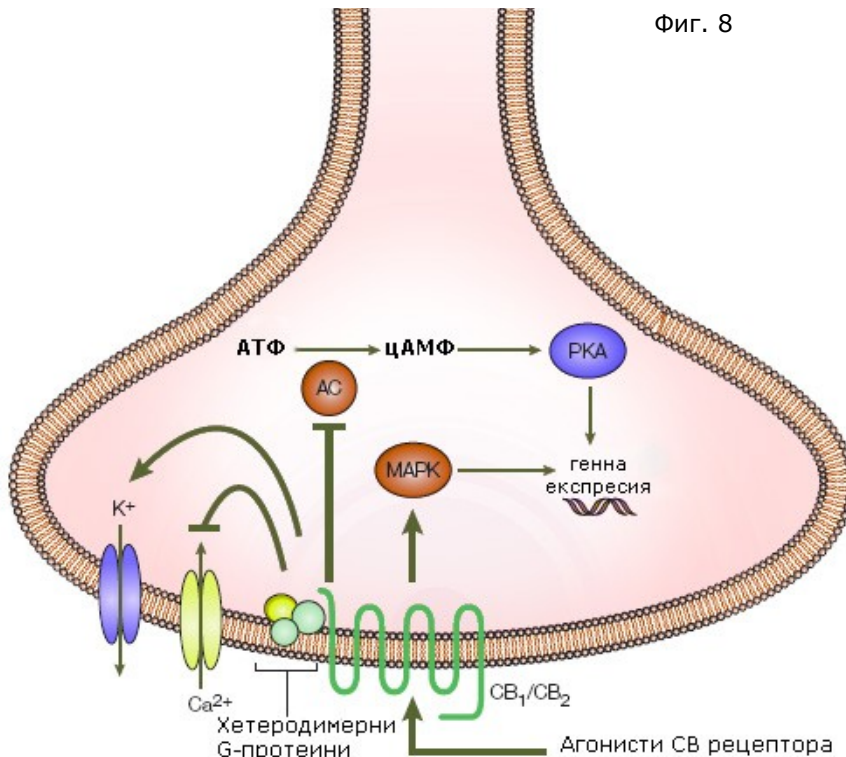
Изброените ефекти върху йонните канали показват общото инхибиращо действие на ендоканабиноидите.

Сигнална трансдукция чрез МАП-киназа и фосфатидил инозитол-3-киназа

В определени клетки, експресиращи CB_1 рецептори, в т.ч. СНО-клетки (клетки на яйчник), човешки ендотелни клетки, фибробласти, астроцити и др. се наблюдава активирането на МАП-кинази. Участието на $G_{i/o}$ -протеин е доказано чрез блокирането на процесите с пертусис-токсин.

Вероятният механизъм за активация на МАПК включва каскада, при която CB_1 -свързан $G_{i/o}$ протеин води до активирането на фосфатидилинозитол-3-киназа и последващото фосфорилиране по тирозин и активиране на raf-1, а след това и на p42/p44 МАПК. Активирането на МАПК вероятно е свързано с експресията на определени гени и активирането на транскрипционни фактори, оказващи влияние върху важни функции като клетъчен цикъл и диференциация.

Фиг. 8



Фиг. 8: Схемата обобщава някои от най-важните известни ефекти от свързването на съответните агонисти към СВ рецепторите

Регулация на NO-синтазата (NOS)

Доказано е, че анандамидът предизвиква синтеза на азотен оксид в няколко клетъчни типа. В хипоталамус на плъх този процес се свързва с участието на CB₁, който дава началото на серия биохимични процеси, водещи до активиране на NOS и освобождаването на NO. Анандамидът и други агонисти стимулират производството на NO и при човешки ендотелни клетки, включително ендотел на умбиликалната вена, както и при моноцити. В артериалните ендотелни клетки генерирането на NO се предшества от рязко увеличение на вътреклетъчната концентрация на калций и се осъществява чрез Ca²⁺-зависима NOS, а за образуването му във венозния епител вероятно е необходим и извънклетъчен източник на калций.

CB₂ рецептор зависими сигнални пътища

При човешки лимфоцити и клетки от далак на мишка, експресиращи CB₂-рецептори, се наблюдава инхибиране на продукцията на цАМФ. Тъй като това рецепторно-медирано инхибиране се блокира от пертусис токсин, следва че CB₂ рецепторите са свързани с G_i-протеини, подобно на CB₁. 2-AG проявява най-силен ефект, докато анандамидът и други ендоканабиноиди са частични агонисти за потискането на образуването на цАМФ.

Агонистите на CB₂ рецепторите активират и МАП-киназите в човешки промиелоцити, но подобен ефект за сега не е наблюдаван в други клетки.

Новооткрит сигнален път, регулиран от CB₂ рецепторите, е свързан със синтеза на церамид. Церамидът е сигнална молекула с липидна природа, която участва в индуцирането на апоптоза. Канабиноидните агонисти, в т.ч. Δ-9-THC, както и ендоканабиноидите анандамид и 2-арахидоилглицерол, проявяват антипролиферативен ефект върху щамове на C6 глиома на плъх, въздействайки както на CB₁, така и на CB₂ рецептори. CB₂ рецепторите играят роля в регулацията на серин-палмитоил трансферазата - ензим, участващ в синтеза на церамид.

Повечето характерни за CB₁ рецепторите сигнални пътища не са открити при CB₂ рецепторите. При CB₂ досега не е наблюдавано активиране на фосфолипаза C в отговор на анандамид или инхибиране на различните типове потенциал-зависими Ca²⁺ канали.

Ендотелен анандамиден рецептор: фармакология и сигнални пътища

Наскоро бе открит отделен, различен от CB₁ и CB₂ рецептор за анандамида, разположен в мембраните на ендотелните клетки. Основният физиологичен отговор, регулиран от този рецептор, е вазорелаксацията. Това е доказано при препарати от артерии на гризачи и аорта на заек. За потвърждение на откритието са използвани кръвоносни съдове от трансгенни CB₁/CB₂ (-/-) мишки. Агонистите, предизвикващи отпускане на кръвоносните съдове включват анандамид, R-метанандамид и анормален канабидиол. Трябва да се отбележи, че мощни агонисти на CB като Δ-9-THC тук не предизвикват отговор.

Вазорелаксацията в резултат на различните агонисти е чувствителна на пертусис токсин, което показва, че ендотелния рецептор е куплиран с G_{i/o}-протеин. Тя се потиска от инхибитори на NOS, следователно производството на NO е важен етап от този път.

При други клетки обаче нещата стоят по различен начин. Вазорелаксацията в отговор на анандамид в коронарна артерия на плъх и на анормален канабидиол в други артерии се блокира от харибдотоксин (токсин, блокиращ калций-зависимите калиеви йонни канали), което предполага участието на калиеви канали.

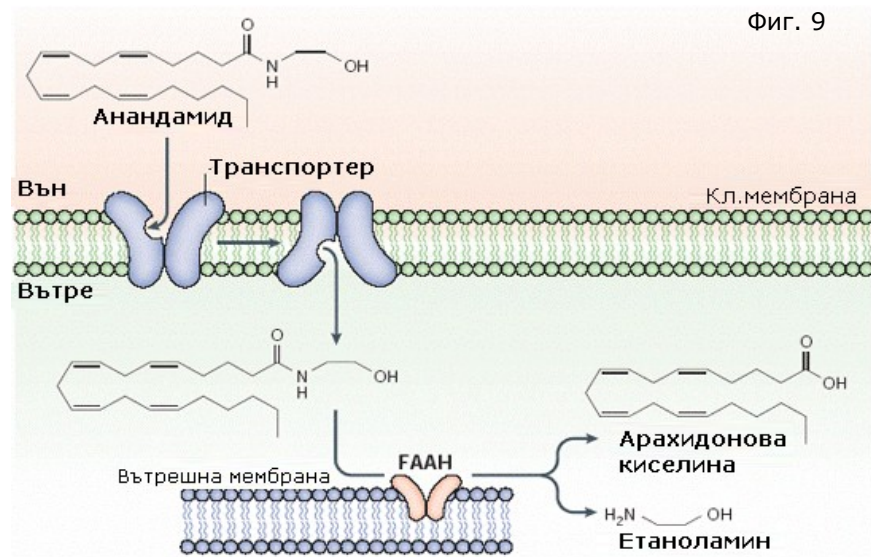
Необходими са допълнителни проучвания за изясняване на ролята на ендотелния анандамиден рецептор в процесите на вазодилатация и молекулярните механизми на тяхното осъществяване.

Прекратяване на действието на ЕК: Поемане и разграждане.

След като изпълнят сигналната си функция, канабиноидите подлежат на двустъпален процес на транспорт в клетките и хидролиза от две специфични ензимни системи. Тези стъпки са особено важни за строгия контрол на нивото на ендоканабиноидите в тъканите. Поемането на ендоканабиноидите се осъществява от широко разпространен в мозъка транспортер. Действието му е подобно на това на други липидни преносители: чрез енергетично-независим облекчен транспорт. Според последните данни, транспорта и разграждането на

ендоканабиноидите са независими процеси.

Разграждането на АЕА (фиг.9) и 2-AG се осъществява съответно от две специфични ензимни системи: fatty acid amide hydrolase (FAAH) и моноацилглицерид липаза (MAGL).



ФИЗИОЛОГИЧНА РОЛЯ НА ЕНДОКАНАБИНОИДНАТА СИСТЕМА

Повсеместната експресия на различни компоненти на ендоканабиноидната система, както и присъствието ѝ в по-нисши организми, показва нейната ключова роля за нормалната физиология. За установяването на значението на ендоканабиноидната система в организма са използвани различни похвати: потискане на дейността ѝ чрез СВ-рецепторни антагонисти, стимулиране на СВ рецепторите, използване на “knockout” мишки, лишени от СВ-рецептори и пр.

Ендоканабиноидната система участва в широк спектър физиологични процеси, включително ноцирецепция, двигателен контрол, памет и обучение, апетит, хранене, енергиен баланс, страх, нервност, модулиране на липидния и глюкозен метаболизъм. Освен това ендоканабиноидната система има отношение и към функциите на имунната система, фертилността, костната маса, но тези аспекти са проучени по-слабо проучени.

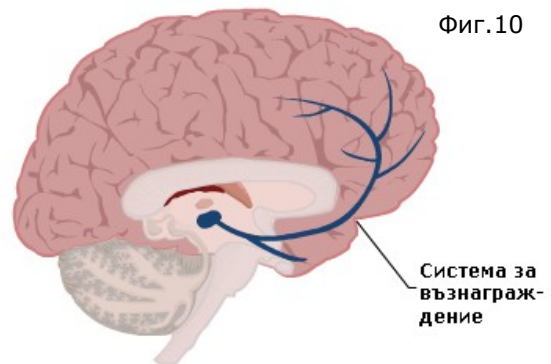
Роли на ЕКС в централната нервна система

Сред множеството функции на ендоканабиноидната система специално внимание заслужава ролята ѝ хомеостатичния контрол на емоциите и регулацията на мотивираното поведение поради тяхното влияние върху различни заболявания, включително и пристрастяването към наркотични вещества. Не по-малко важно е и влиянието на ЕКС върху апетита, което е свързано с наболелия в модерното общество проблем със затлъстяването. Освен това ендоканабиноидната система участва в процесите, свързани с ноцирецепцията, паметта и според някои изследвания притежава невропротективен ефект.

Както беше споменато при описанието на рецепторите, в ЦНС се наблюдава широко разпространение на рецептори от типа CB₁. Най-важните класове неврони, които експресират канабиноидни рецептори в мозъка са ГАМК- и глутаматергичните неврони на хипокампа, амигдалата, мозъчната кора, малкия мозък и пр., а също така подобни рецептори се срещат и в други мозъчни структури и аксоните на неврони извън ЦНС. Активирането на CB₁ рецепторите води до потискането на освобождаването на невротрансмитерите аминокиселини и моноамини. Ще разгледаме някои от по-важните познати ефекти на ЕКС върху нервната система на бозайници.

Системи за възнаграждение и изграждане на зависимости. Връзки с други медиаторни системи

Открити са доказателства, че ЕКС вероятно играе важна роля в системите за възнаграждение на мозъка, като това се осъществява чрез взаимодействие с мезолимбичната допаминаргична система. Тя представлява съвкупност от мозъчни структури, която включват мозъчния ствол, амигдалата и кората на предния мозък, и участва в регулацията на поведението и усещанията за удоволствие. Ендоканабиноидната система е разпространена в септума, амигдалата, области на таламуса и на базалните ганглии, които участват в контрола на мотивираното поведение и емоционалния отговор. Тази хипотеза се подкрепя от два факта: след въвеждането на канабиноидни антагонисти се наблюдава инхибиране на мотивираното поведение, а след



блокиране на CB_1 рецепторите при мишки се отчитат нарушения системата за възнаграждение.

Изследванията върху невробиологичната основа на ендоканабиноидните ефекти върху мотивираното поведение са фокусирани върху взаимодействието ендоканабиноид-допамин, както и върху ролята на ендоканабиноидната система в изграждането на условни рефлексии и обучението.

При мишки THC и други агонисти на CB_1 рецепторите регулират освобождаването на ГАМК и глутамат в nucleus accumbens, тегментума и префронталния кортекс. Потискането на освобождаването на задържни медиатори като ГАМК от своя страна води до увеличаване на освобождаването на допамин в nucleus accumbens и префронталния кортекс и повишаване активността на допаминергичните клетки на VTA (ventral tegmental area – tegmentum или покрив – част от средния мозък, богата на допаминергични неврони). Ефектът на повечето наркотици, към които може да се развие зависимост, е свързан именно с повишената активност и освобождаването на допамин от тези групи неврони. Съществуват доказателства за подобни ефекти и в стриатума на маймуни и плъхове. Например е известно, че интравенозното въвеждане на AEA при плъхове е свързано с повишени нива на извънклетъчен допамин в nucleus accumbens.

В резултат на посоченото действие на канабиноидите върху системата за възнаграждение, при системно подлагане на действието им се проявява характерната за пристрастяването поведенческа сенсибилизация. (За разлика от повечето наркотици обаче, към канабиноидите се изгражда т.нар. обратна толерантност, при която с течение на времето необходимата доза за постигане на определен ефект намалява. При хронично третиране с канабиноиди в много области на мозъка се наблюдава намалена експресия на CB_1 рецептори.)

Освен че косвено увеличава освобождаването на допамин, ендоканабиноидната система вероятно взаимодейства и с допаминовата рецепторна системи чрез формиране на хетеродимери между канабиноидни и допаминови рецептори. Действително, доказано е наличието на подобни хетеродимери между канабиноидни CB_1 и допаминови D_2 рецептори. Когато се стимулират поотделно, всеки рецептор инхибира вътреклетъчната аденилил циклаза, но активирането на хетеродимерния комплекс води до стимулиране на АЦ, както и МАПК. Този ефект се отдава на куплиране на хетеродимерите със стимулиращи G-протеини.

ЕКС взаимодейства и с мозъчната опиоидна система и това е подкрепено от изследвания, според които опиоидният антагонист налаксон и CB_1 – антагониста SR141716 (римонабант) показват синергестични ефекти при дози, които не са ефективни при

отделното им прилагане. Опиоидните рецептори (μ , δ , и κ) и CB_1 рецепторите се ко-експресират в едни и същи субклетъчни компартменти и са вързани с подобни вътреклетъчни сигнални пътища. И двата вида рецептори инхибират аденилил циклазата чрез активиране на инхибиторни G-протеини. Наскоро бе доказано, че едновременното активиране на μ опиоидните рецептори и CB_1 рецепторите води до по-силен ефект по отношение на потискането на неврогенезата ин витро в сравнение с отделното им активиране.

Откритията във връзка с действието на ендоканабиноидната система върху мозъчните системи за възнаграждение са важни, тъй като засягат механизмите за изграждане на зависимости и съответното им потискане. Това може да бъде от значение за фармакологията. Антагонистите на CB_1 рецепторите потискат поемането на съответните вещества при изградена зависимост. Например при гризачи, подложени на ендоканабиноидни антагонисти, се наблюдава понижен прием на опиати. Тези проучвания са разширени и е установена ролята на анандамида и CB_1 рецепторите за изграждането на алкохолна зависимост. Агонистите на CB_1 рецепторите повишават консумацията на алкохол, а антагонистите я понижават, особено в случаите на алкохолна зависимост. Молекулярните изследвания показват, че хроничният прием на алкохол е свързан с образуването на анандамид и неговия предшественик NAPE, както и на другия главен ендоканабиноид – 2-AG. Освен това експресията на CB_1 рецепторите се влияе от последователни цикли на употреба и прекъсване на приема на алкохол. Всичко това показва приноса на ендогенната канабиноидна система към алкохолизма. Генетичните изследвания при хора подкрепят тази хипотеза, тъй като се открива връзка между клиничните форми на алкохолизма с полиморфизми и/или мутации на гените, кодиращи CB_1 рецепторите или FAAH (ензимът, свързан с инактивирането на AEA).

Подобно на опиатите и алкохола, съществува връзка между канабиноидите и изграждането на зависимост към никотина, метаамфетамините и други наркотични вещества, действащи върху мезолимбичната допаминергична система. На базата на антагонисти на CB_1 рецепторите биха могли да се разработят фармакологични препарати за лечение на различните видове зависимости.

Ендоканабиноидната система е свързана и с емоционалните процеси. Амигдалният комплекс е основна зона на ендоканабиноидната регулация на емоциите, свидетелство за което е високата концентрация на CB_1 рецептори в нея. Според последните проучвания, повишеното освобождаване на канабиноиди в лимбичната система води до анксиолиза.

Това твърдение се подкрепя и от предизвикването на нервност в резултат на действието на антагонисти на канабиноидните рецептори.

Влиянието на канабиноидите върху нервността обаче силно зависи от дозата и физиологичното състояние, като при определени условия могат да проявяват обратни на посочените ефекти. Съществуват няколко хипотези за двойственото действие - едни предполагат участието на различни рецептори, а други на CB_1 рецептори с различна чувствителност, но са необходими още проучвания за потвърждаването им. Механизмите, отговорни за ефектите на канабиноидите върху състоянието на нервност, са комплексни и вероятно включват модулацията на множество невротрансмитерни системи. Например стимулацията на CB_1 при гризачи активира хипоталамо-хипофизо-адреналната ос чрез освобождаването на кортикотропин освобождаващ фактор, което може да доведе до анксиогенни ефекти. Съществува и обратният случай на отрицателно модулиране на същата ос. Както беше посочено, ендоканабиноидната система е свързана и с опиоидната, което вероятно също допринася за конкретните ефекти. Всички тези факти демонстрират многостранното действие на ЕКС върху състоянието на нервност и необходимостта от още проучвания за установяването на ролята ѝ.

Друга роля на ендоканабиноидната система в ЦНС засяга функциите на паметта - сензорната, краткосрочната и дълговременната памет. Свидетелство за това са сходните ефекти при въвеждане на високи дози канабиноиди и отстраняване на хипокампа (мозъчна структура с доказана роля за консолидацията на паметта и своеобразен субстрат на краткосрочната памет), както и голямата му наситеност с канабиноидни рецептори. Наличието на подобни рецептори е доказано в пресинаптичните мембрани на аксоните на ГАМК-ергични, глутаматергични и други неврони на хипокампа и амигдалата, като действието на канабиноидите се проявява в потискане на предаването на нервни импулси. В подкрепа на това е доказано, че CB_1 агонистите инхибират освобождаването на ацетилхолин в дорзалния хипокамп, а антагонистите предотвратяват този ефект; при други експерименти, в клетъчни култури от хипокамп на плъх се наблюдава задържане на освобождаването на глутамат. Съществуват и доказателства за инхибиране на Ca^{2+} канали от N и P/Q тип в резултат на активиране на CB_1 рецептори. Тези канали са необходими за предаването на импулси през хипокампа синапси. Във въпросните култури канабиноидите инхибират и аденилил циклазната активност и увеличават действието на потенциал-зависимите калиеви канали, което също би довело до понижаване на нервната проводимост. И не на последно място, доказано е, че канабиноидите потискат удължената възбудимост и реактивност на хипокампа неврони, явление с предполагаема роля в паметта и обучението. Смята се, този ефект на

канабиноидите е свързан с потискането на освобождаването на глутамат чрез CB₁ канабиноидни рецептори.

Счита се, че процесите на памет и обучение са свързани с изграждането на нови синаптични връзки между невроните. Това е свързано с действието на редица фактори, включително и на нервния растежен фактор. Известно е, че CB₁ агонистите инхибират действието на NGF (вж. *G_{1/0}-медирана регулация на вътреклетъчния цАМФ и Протеин Киназа А (ПКА)*).

Експериментите с животни потвърждават проявата на общи нарушения в паметта и обучението в резултат на третиране с канабиноиди.

В ЦНС, ендоканабиноидната система има значение за невропротекцията както при остри мозъчни нарушения (травми, инсулт, епилепсия), така и при хронични невродегенеративни заболявания, като множествена склероза, болест на Паркинсон, болест на Хънтингтън, амиотрофична латерална склероза, болест на Алцхаймер. Макар че механизмите на тези процеси не са напълно ясни, невропротективния ефект на канабиноидите вероятно е свързан с множество рецептор-зависими и независими процеси. Те включват регулация на освобождаването на глутамат и на синаптичната пластичност чрез пресинаптични CB₁ рецептори, регулация на имунния отговор и освобождаване на възпалителни медиатори от CB₁, CB₂ и не-CB рецептори на невроните, астроцитите, микроглията, макрофагите, неутрофилите и лимфоцитите; активиране на цитопротективните сигнални пътища, модулиране на пропускливостта на йонните канали на мембраните и вътреклетъчните депа, антиоксидантните свойства на канабиноидите и CB₁ рецепторно-медираната хипотермия, която вероятно се дължи на понижаването на метаболитната активност и необходимостта от кислород. Оксидативният стрес, който води до дегенерация на невроните при различните заболявания, се дължи на свръхактивирането на рецепторите за глутамат. Канабиноидите противодействат на освобождаването на глутамат и по този начин вероятно проявяват невропротективен ефект.

Фармакологичното приложение на канабиноиди за лечение на различни нервни увреждания обаче изисква още проучвания, тъй като резултатите относно ефектите им са твърде противоречиви. Съществуват и рязко различаващи се експериментални данни, които демонстрират токсичност на канабиноидите при клетъчни култури от хипокамп, а други автори отдават гореспоменатите протективни ефекти единствено на антиоксидантните им свойства, дължащи се високите им редокс-потенциали, но не и на специализирани механизми, участващи в невропротекцията.

Смесените данни за невротоксичен и невропротективен ефект са объркващи, но все пак първият се наблюдава най-вече ин витро, докато ин vivo изглежда преобладава вторият.

Друг важен аспект на действието на ендоканабиноидната система в мозъка е регулацията на апетита и енергийния баланс. Това са сложни физиологични процеси, включващи взаимодействие между множество невромодулаторни системи в мозъка. Ключовите зони за регулация на приема на храна, енергийния баланс и телесното тегло са хипоталамуса и мозъчния ствол, а лимбичната система е свързана с вкусовите предпочитания и апетита. Всъщност стимулирането на апетита от канабиноидите е познато от дълбока древност. Ендоканабиноидната система пряко регулира хранителното поведение и енергийния баланс. Доказателство за това е едновременната експресия в хипоталамуса на CB_1 рецептори и неврпептиди, участващи в приема на храна, като меланин-концентриращ хормон, кокаин- и амфетамин-свързан транскрипт, и препро-орексин. Въвеждането на 2-AG в nucleus accumbens предизвиква краткотрайна хиперфагия, а блокирането на CB_1 рецепторите прекратява този ефект. Нивата на ендоканабиноидите в лимбичната част на предния мозък са пряко свързани с хранителния статус – те се увеличават при гладуване и намаляват с храненето. За сравнение, нивата им в малкия мозък не се променят.

ЕКС влияе върху апетита и чрез взаимодействието с други системи. Съществуват доказателства за възможни функционални взаимодействия между CB_1 рецептори с орексинови рецептори от тип 1. Орексигенните (стимулиращи апетита) неврпептиди включват NPY и орексини А и В. Орексин А се свързва с OX1 рецептор, който, подобно на CB_1 рецепторите, се експресира в хипоталамуса. Наблюдавано е повишаване в МАП-киназната активност в клетки, в които едновременно се експресират CB_1 и OX1. Този ефект изглежда е специфичен за OX1 рецептора, тъй като CB_1 рецептора не повишава NPY-индуцираната МАПК активност. Освен това двата вида рецептори са близко разположени върху клетъчната мембрана, които дава възможност за формиране на хетероолигомери.

Друга мишена за регулация на приема на храна от ендоканабиноидната система вероятно е блуждаещия нерв. Холицистокинина, който се секретира от панкреаса по време на хранене, се свързва със специфични рецептори на аферентните краища на вагуса. От там, информацията се предава по аферентен път, достига хипоталамуса, където се интегрира с други сигнали и води до намаляването на приема на храна. В аферентните неврони на вагуса е открита иРНК на CB_1 рецептора, като експресията ѝ се повишава при гладуване и намалява при хранене или въвеждане на холицистокинин. Следователно вероятно намалената чрез холицистокинина активност на ендоканабиноидната система може да предизвика усещане за заситеност. Хипоталамусните ендоканабиноиди са под отрицателен контрол и на лептина, хормон, продуциран основно от мастната тъкан, който предизвиква анорексигенни сигнали в хипоталамуса. При затлъстели мишки с нарушена

лептинова сигнализация се наблюдават по-високи нива на ендоканабиноиди в сравнение с животни от див тип. Изкуственото въвеждане на лептин при животните с нарушения намалява ендоканабиноидните нива.

Ендоканабиноидите също така са свързани с модулирането на апетит-стимулиращия ефект на стомашния хормон грелин. Нивата на грелин се повишават преди хранене, а въвеждането му в паравентрикуларното ядро на хипоталамуса е свързано с удвоен прием на храна. Доказателство за участието на ендоканабиноидната система е блокирането на този ефект след предварително въвеждане на CB₁ антагонисти.

Поради участието ѝ в регулацията на метаболизма, ролята на ЕКС е обект на интензивни проучвания. Селективното блокиране на CB₁ рецепторите може да се използва в клиничната практика при нарушения в метаболизма като затлъстяване и диабет от тип 2. За съжаление в настоящия момент употребата им е ограничена поради страничните ефекти, свързани с останалите въздействия на канабиноидите върху централната нервна система.

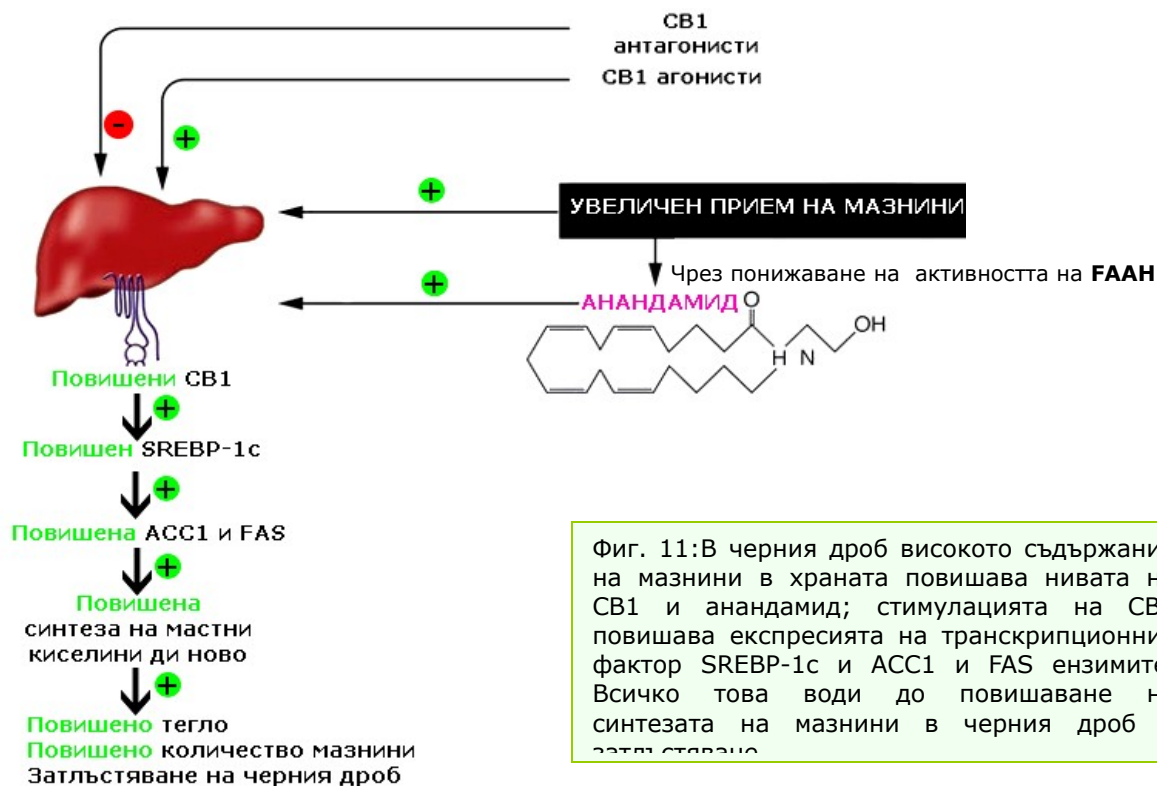
Роля на ЕКС в метаболизма на мазнините и глюкозата

Метаболизъм на мазнините

Ролята на ендоканабиноидната система в метаболизма на мазнините включва регулацията на активността на липопротеин липазата (ензим, участващ в натрупването на мазнини) и продукцията на адипонектин.

Съществуват доказателства за ролята на ЕКС в метаболизма на мастната тъкан са експресията на CB₁ и FAAH в човешки адипоцити и корелацията между затлъстяването и повишената експресия на CB₁. ЕКС пряко повишава активността на липопротеин липазата и в черния дроб и регулира чернодробната липогенеза.

Активирането на CB₁ рецепторите повишава синтезата на мастни киселини. Един от основни молекулярни пътища включва активирането на транскрипционен *фактор sterol regulatory element-binding protein-1c* (SREBP-1c) и свързаните с него ензими, ацетил КоА карбоксилаза 1 (ACC1) и синтазата на мастни киселини (FAS). Ролята на ЕКС в тези процеси е доказана с опити върху гризачи. Активирането на CB₁ рецептора с мощен агонист повишава експресията на гореспоменатите фактори. Освен това, ЕКС инхибира *adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase* (AMPK), ензим, стимулиращ окислението на мастни киселини. Следователно повишеното ниво на канабиноиди е свързано с увеличаване на синтезата на мастни киселини и намаляване на разграждането им. Антагонистите на CB₁ рецепторите прекратяват изброените ефекти. (вж. фиг. 11)



Освен това агонистите на CB₁ в адипоцитите стимулират тяхната диференциация и липогенезата, а антагонистите блокират тези процеси. Ендоканабиноидите (особено 2-AG) са значително увеличени при затлъстели мишки.

Метаболизъм на глюкозата

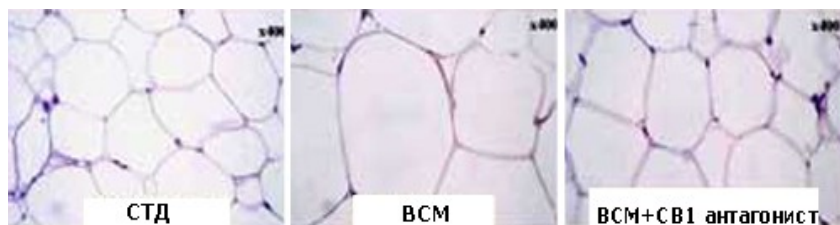
ЕКС участва и в метаболизма на глюкозата. Пероралното третиране с антагонист на CB₁ рецептора повишава експресията на важни регулатори на глюкозния метаболизъм, включително четири от гликолитичните ензими, откривани в мастната тъкан. Следователно стимулацията на CB₁ рецепторите е свързана с промени в експресията на гени, свързани с глюкозния метаболизъм.

Инсулинът е ключов хормон в хомеостазата на глюкозата, който се секретира от бета-клетките на панкреаса. В лангерхансовите острови на мишки доказано е наличието на CB₁ и CB₂ рецептори както в алфа-клетките (продуциращи глюкагон), така и в секретиралите инсулин бета клетки. Изследванията сочат, че активирането на CB₁ рецепторите силно стимулира секрецията на инсулин; антагонистите на CB₁ сами по себе си не инхибират секрецията, но блокират ефектите на агонистите. Все пак съществуват много неясноти и са необходими повече проучвания за ролята на ендоканабиноидната система в панкреаса.

Важен фактор под влияние на ЕКС, участващ в метаболизма както на мазнините, така и на глюкозата, е *адипонектина*. Действието му е свързано с повишение окислението на мастни киселини в скелетната мускулатура и вероятно предотвратяване на прекомерното натрупване на триглицериди в тъканите; инхибиране на експресията на ензими на глюконеогенезата, респективно степента на ендогенна продукция на глюкоза.

Промените в нивата на адипонектин са свързани с промени в серумния инсулин и съдържанието на глюкоза. Нивата на адипонектин се намаляват при повишено действие на ЕКС и обратно. Нарушенията в ЕКС могат да доведат до намалени нива на адипонектин, което да доведе до промени в липидния профил на кръвта и затлъстяване, както и нарушения на метаболизма на глюкозата.

От написаното дотук следва, че блокирането на CB_1 рецепторите може да доведе не само до намаляване на телесното тегло, но и обратимост на морфологичните промени в мастната тъкан, дължащи се на затлъстяване; подобряване на нивата на плазмените липиди и съдържанието на мазнини в черния дроб. Освен това блокирането на CB_1 рецепторите може да увеличи съдържанието на адипонектин, което също да доведе до намаляването на телесното тегло, както и да подобрени на глюкозния метаболизъм. Докато адипоцитите на мишки, подложени на диета с високо съдържание на мазнини са големи хетерогенни, тези на мишки, третирани с антагонист на CB_1 са със значително по-малки размери.



Фиг.12: На фигурата са показани адипоцити на мишки на стандартна диета(СТД), диета с високо съдържание на мазнини (VSM) и диета с високо съдържание на мазнини+ CB_1 антагонист.

Всички тези открития доказват ефекта на ЕКС върху липогенезата и потвърждават мнението, че мастната тъкан е важна мишена за ЕКС.

Роля на ЕКС в имунната система

Първите доказателства за въздействието на ендоканабиноидната система върху имунната система се появяват през 70те години, когато е открито, че употребата на канабис е свързана с повишена заболяемост от вирусни инфекции и алергии.

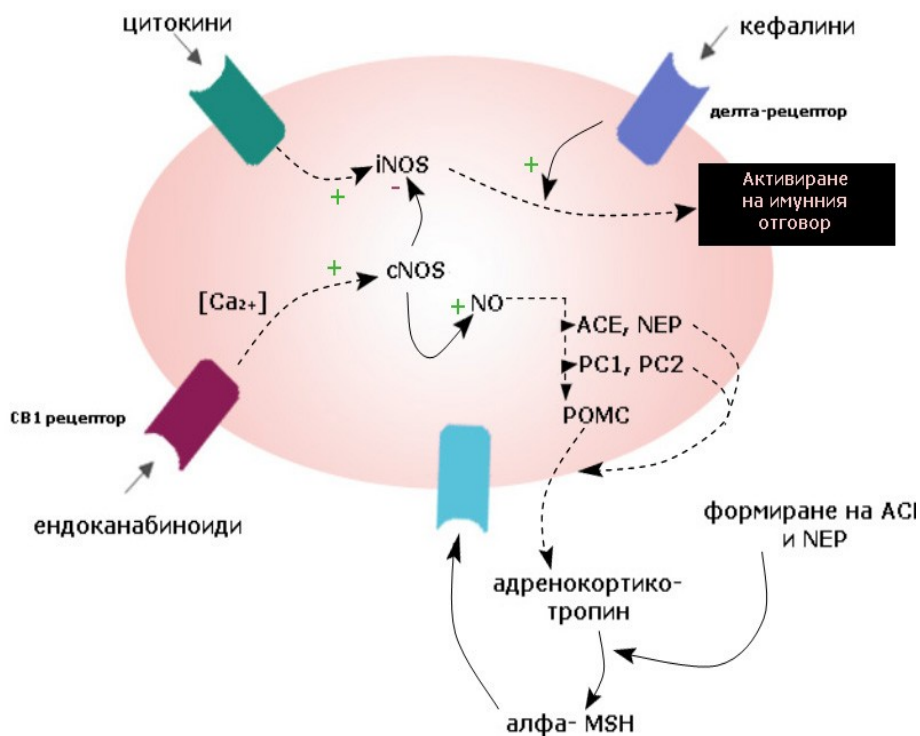
Въпреки това за естествената функция на ендоканабиноидите в имунната система има много неясноти. Имунните клетки отговарят на действието на канабиноиди по различен

начин, в зависимост от множество експериментални условия като концентрацията на въвеждания канабиноид, период на въвеждане, вида на имунната клетка.

CB₂ рецепторите са доминиращата група канабиноидни рецептори, експресирани левкоцитите в нормално състояние. В този случай експресията на CB₁ е ниска, но с активирането на клетките, тя се увеличава. Следователно CB₁ рецепторите може би играят роля само при стимулиран имунен отговор, но физиологичния смисъл на това явление не е изяснен.

Свързването на лиганди както към CB₁, така и към CB₂ рецепторите е съпроводено с инхибиране аденилил циклазата и съответното намаление на продукцията на цАМФ. Тъй като понижаването на количеството цАМФ води до отслабване на имунния отговор, следва да се предположи, че като цяло канабиноидите имат общо потискащо действие върху имунната система.

Вероятният механизъм на действие включва участието на NO, който е междинна сигнална молекула за активирането на множество имуномодулатори.



Фиг.13 Модел на имунен отговор

След свързване към CB₁ рецепторите, ендоканабиноидите стимулират продукцията на NO от cNOS чрез индуциране на потоци на калций към цитоплазмата. NO стимулира POMC (про-опиомеланокортин, про-хормон конвертаза (PC1/PC2), ангиотензин конвертиращ ензим (ACE) и неутрална ендо-пептидаза (NEP) както на транскрипционно, така и на транслационно ниво, и инхибира iNOS чрез потискане на аденилил циклазата. Всичко това води до зреене на POMC, освобождаване на адренокортикотропин (ACTH) и продукция на меланотропин (MSH). Всичко това понижава действието на имунните клетки. Следователно ендоканабиноидите, за разлика от цитокините и

Действително, в много случаи е доказано, че канабиноидите потискат пролиферацията на човешките Т-лимфоцити, а ин витро проучванията с миши клетъчни култури показват и инхибиращо действие върху пролиферацията на В-клетките.

Анандамидът, 2-AG, както и растителният THC модулират лимфоцитната пролиферация в отговор на митогени. Освен върху Т и В клетки, канабиноидните рецептори CB₁ и CB₂ се откриват и в макрофаги, неутрофили и мастни клетки, които синтезират/деактивират АЕА и 2-AG под действието на различни вещества – йономицин, анти-IgE и тромбоцит-активиращ фактор. При инкубация на култура от макрофаги с канабиноиди се наблюдава потискане на синтеза на ДНК и фагоцитозата.

Канабиноидите намаляват и активността на цитотоксичните клетки, например NK и LAK-клетките. Ендоканабиноидите регулират формата и функционалността на лимфоцитите. При третиране на макрофаги с анандамид се наблюдава тяхното закръгляне и загуба на подвижността. Това действие се блокира от селективен CB₁ антагонист. При инжектиране на мишки с канабиноиди, включително 2-AG и АЕА, и инфектирането им с херпес симплекс вирус, се наблюдава понижено отделяне на интерферон (основен цитокин при вирусни заболявания); образуването на IL-2 и TNF (интерлевкин-2 и тумор-некротичен фактор - цитокини при бактериални инфекции и тумори) също се потиска.

Противовъзпалителният ефект на канабиноидите би могъл да се използва във фармакологията като средство срещу автоимунни заболявания или успокояване на болка в резултат на възпалителен процес. Например при експерименти с плъхове с енцефаломиелит (модел, използван за изучаването на множествената склероза), канабиноидите намаляват симптомите на нарушение на ЦНС. Има и данни за аналгетичен ефект на ендогенни канабиноиди, базиран на възможността им да потискат болката, свързана с локално възпаление. АЕА може да повиши серумните нива на адреналокортикотропина и кортикостерона, които са свързани с намаляване на възпалението и болката.

Влияние на ЕКС върху функциите на сърдечно-съдовата система

Освен невро-поведенческите и имунологичните ефекти, канабиноидите и синтетичните им аналози засягат функциите на сърдечно-съдовата система. Механизмите на тези ефекти са комплексни и включват пряко действие върху съдовете и миокарда, както и модулиране на автономната нервна система. Що се отнася до ендогенните канабиноиди, техните ефекти допълнително се усложняват от бързият им метаболизъм, свързан с освобождаването арахидонова киселина, която след това може да бъде метаболизирана във вазоактивни простаноиди (подгрупа ейкозаноиди). Досегашните изследвания сочат, че CB₁ рецепторите са много по важни от CB₂ рецепторите за кардиоваскуларната регулация, като за вторите е известно само участие в исхемичните нарушения на миокарда.

CB₁ рецептори са открити в миокард на човек и гризачи, където са свързани с намаляване на ударния обем на сърцето, както и в кръвоносни съдове, където активирането им води до вазодилатация. И двете функции отразяват хипотензивния ефект на анандамида.

Сипматикусовите нервни окончания съдържат CB₁ рецептори в пресинаптичните си мембрани. Стимулирането им инхибира освобождаването на норадреналин, което допринася за брадикардичния ефект на анандамида *in vivo*.

Вазорелаксацият ефект на ендоканабиноидите и синтетичните канабиноиди е комплексен и се различава в различните тъкани и при различните видове животни. Вероятно участват механизми, свързани с CB₁, TRPV1- рецептори, зависими и независими от NO.

Според проучванията, интравенозното въвеждане на анандамид предизвиква трифазова промяна на кръвното налягане при гризачи, при което удължения хипотензивен ефект (фаза III) е предшестван от кратко, медирано от вагуса намаляване на сърдечната честота и кръвното налягане и повишено периферно съпротивление (фаза I), последвано от кратък отговор, свързан с повишена сърдечна контрактилност (фаза II). Подобни на анандамид-индуцираното понижено кръвно налягане в третата фаза и понижената контрактилност ефекти се наблюдават и в отговор на синтетични канабиноиди и се осъществяват с участието на CB₁ рецептори.

Във връзка с хипотензивния ефект още преди тридесет години са провеждани проучвания за използването на канабиноиди за лечение на високо кръвно налягане. За съжаление, големите начални очаквания не са оправдани, тъй като много бързо се развива толерантност към хипотензивния и брадикардичен ефект на прилагания THC, а освен това кардиоваскуларния ефект на канабиноидите не може да се отдели от невроповеденческия.

Роля на ЕКС в репродукцията: оплождане, развитие и имплантация на ранния ембрион

Канабиноидни рецептори се откриват и в репродуктивните системи на двата пола.

Анандамидната сигнализация изглежда е свързана с регулирането на функциите на спермата за оплождането при безгръбначни и гръбначни животни, включително човек. Свързването на АЕА към СВ рецепторите намалява оплодителната способност. Сперматозоидите притежават всички биохимични механизми за свързване (CB₁), синтеза (NAPE-PLD) и разграждане (AMT и FAAH) на анандамид. За разлика от другите животни, за да придобият способност за оплождане, сперматозоидите на бозайниците трябва да претърпят процес, наречен капацитация, засягащ главичката и свързан с акрозомата и

опашката, което е свързано с моториката. Доказано е, че активирането на CB_1 от аналози на АЕА пречатства капацитацията, респективно способността на сперматозоидите да взаимодействат с протеините на *zona pellucida* и протичането на акрозомна реакция. Смята се, че АЕА инхибира акрозомната реакция чрез стабилизация на мембраната на акрозомата.

Освен това, при човек е доказано намаляване на подвижността на сперматозоидите чрез потискане на митохондриалната активност в резултат на действието на АЕА.

Тези ефекти се предотвратяват от антагонисти на CB_1 рецепторите, което доказва участието им в посочените процеси. Действието на ЕКС може да има двустранна физиологична роля. От една страна, присъствието на АЕА в семенната течност може да оказва предпазващо действие срещу ненавременната капацитация. От друга страна, съществуват спекулации, че сперматозоидите се излагат на постепенно намаляваща концентрация на АЕА в проксималния женски генитален тракт, а капацитацията се осъществява като следствие от намаляването на инхибирането от АЕА. Наблюденията, свързани с участието на ЕКС в оплождането открива нови перспективи към лечението на проблеми с мъжката фертилност.

Ендогенните канабиноиди са доста разпространени в репродуктивната система на жената. Анандамидът има плейотропен ефект върху репродукцията при човек и експериментални животински модели. Той изглежда е важен медиатор, участващ в развитието на бластоцистата, транспорта по фалопиевите тръби и имплантацията.

Високи нива на CB_1 рецептор, анандамид и FAAH се откриват в преимплантационния ембрион и в матката. При мишки, в маточните тръби и матката се експресира само CB_1 , а в бластоцистата още от едноклетъчния стадий се наблюдава експресия на CB_1 и CB_2 . АЕА и THC инхибират образуването на цАМФ, което е обратимо под действието на пертусис токсин, следователно в процеса участват инхибиторни G-протеини. Присъствието на активни CB_1 рецептори в бластоцистата предполага, че ранния ембрион е мишена за канабиноидите. Доказано е, че третирането както с ендогенни, така и с растителни и синтетични канабиноиди блокира развитието на бластоцистата или най-малко редуцира броя клетки в трофоектодермалния слой. Този ефект се пречатства от селективни антагонисти на CB_1 , но не и на CB_2 , следователно вторият вид рецептори не се експресира в трофодермата, което се подкрепя и от молекулярните изследвания на ембрионалните клетки. Съществуват доказателства, че ефектите на ендоканабиноидите се проявяват в различна степен в зависимост от ембрионалния стадий и нивата им в маточната среда. Бластоцисти в култура с ниски концентрации на АЕА показват ускорен растеж и диференциация на трофобласта, докато високите дози на АЕА забавят тези

процеси, което показва двойната функция на АЕА в зависимост от локалната концентрация.

Така че ЕКС в ранния ембрион действа основно чрез CB_1 рецептори, а ролята на CB_2 рецепторите все още не е изяснена. Във всеки случай, при мутантни линии мишки с липсващи CB_1 , CB_2 или и двата рецептора се наблюдават нарушения в развитието и имплантацията на ембрионите.

Освен това ендоканабиноидите очевидно играят роля за имплантацията на ембриона в матката. Тук отново концентрацията на ендоканабиноиди е от съществено значение.

На фигурата може да се види различната концентрация на ендоканабиноидите и ензима в различните зони на матката. В зоната на имплантиране на ембриона се наблюдават ниски концентрации на ендоканабиноиди, докато в околните зони те са завишени, както е видно на фигурата:

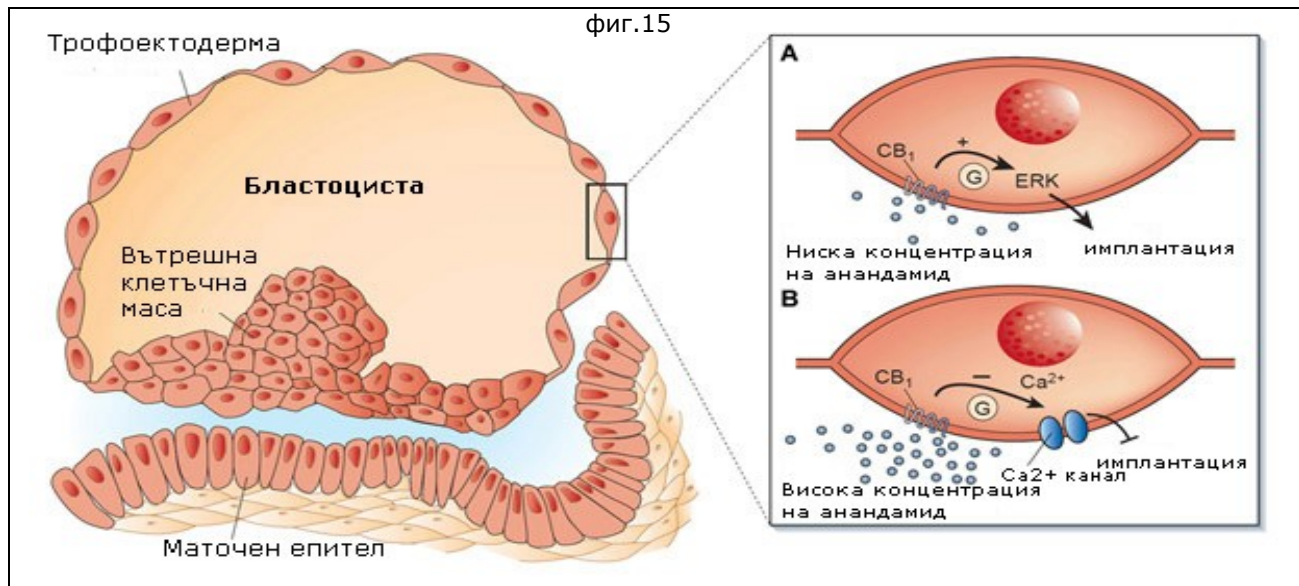


Фиг. 14 :
От фигурата и
прилежащата
експериментална
графика ясно личи
по-ниската

Така че маточните нива на АЕА са важни за регулацията на зоната на имплантацията, като участват в синхронизацията на диференциацията на трофобласта и подготвянето на матката за приемане на ембриона.

Според изследванията, механизмът на действието на АЕА при имплантацията на бластоцистата е свързано с CB_1 рецепторите, а концентрацията му зависи от FAAH.

Установено е, че инхибиторното и стимулиращото действие на АЕА в зависимост от концентрацията се осъществява по два различни сигнални пътя. Анандамидът в ниски концентрации активира ERK (extracellular signal-regulated kinase)- киназата чрез CB_1 рецепторите, а действието му при високи концентрации е свързано с потискане на освобождаването на калций (фиг.15):



Наблюдението на високи нива на АЕА при спонтанен аборт при жени съответства на експерименталните данни, получени при изследвания на мишки. Във връзка с това съществуват и доказателства, че активирането на CB_1 инхибира разрастването на децидуата и предизвиква апоптоза на децидуалните клетки *ин витро*.

Ендоканабиноидна система и рак

Множество проучвания предполагат, че канабиноидите може би директно инхибират туморния растеж. Предложените механизми са комплексни и вероятно включват индукция на апоптоза в туморните клетки, антипролиферативно и антиметастатично действие чрез инхибиране на ангиогенезата и миграцията на туморните клетки. Различни канабиноиди, в това число канабидиол, анандамид и 2-AG *ин витро* предизвикват апоптоза и инхибират пролиферацията и миграцията на няколко вида туморни клетки на човек и мишки, включително глиома, олигодендроглиома, глиобластома мултиформе, астроцитома, невробластома, рак на щитовидната жлеза, някои видове левкемия и лимфоидни тумори с участието на CB_1/CB_2 и VR1 рецептор-зависими или независими механизми. И което е по важно, систематичното или локално третиране с канабиноиди потиска растежа на различни видове тумори *ин vivo*, в т.ч. карцинома на белия дроб, глиома, лимфома, кожна карцинома при мишки.

Проапоптотичният ефект на канабиноидите за туморните клетки е комплексен и вероятно включва повишен синтез на проапоптотичния сфинголипид церамид, церамид-зависима стимулация на стресовия протеин $p8$ и експресия на други свързани със стреса гени, както и регулация на активността на MAPK. Канабиноидите вероятно също така потискат

пролиферацията на някои туморни клетки чрез инхибиране на аденилил циклазата и цАМФ/протеин киназа А-пътя, индукция на циклин-зависим киназен инхибитор p27kip1, намаляване на експресията на рецептори за епидермален растежен фактор и тирозинкиназната активност и намаляване на активността и/или експресията на тирозинкиназните рецептори за нервния растежен фактор и васкуларния ендотелен растежен фактор и пролактина. В допълнение към проапоптотичното и антипролиферативното действие при туморните клетки, канабиноидите също така инхибират експресията на проангиогенни медиатори или техните рецептори (например VEGF) и редуцират разрастването на кръвоносните съдове и клетъчната миграция, което е важно за туморния растеж и образуването на метастази.

Все пак е важно да се отбележи изключителното значение на концентрацията на канабиноидите за техния антипролиферативен антитуморен ефект. При експерименти с наномоларни и микромоларни концентрации на различни канабиноиди, включително АЕА и ТНС е доказано, че по-ниските концентрации не само че не проявяват споменатите ефекти, но и водят до увеличаване на експресията на рецептори за растежни фактори. По-високите концентрации пък потискат туморния растеж. Освен това както беше споменато в раздела за имунната система, канабиноидите имат инхибиращ ефект върху нея, включително и върху антитуморния имунитет. Следователно тяхната роля в канцерогенезата не бива да се разглежда едностранно.

Вероятно канабиноидите проявяват антитуморно действие в случаите на ракови клетки с висока експресия на CB₁ и CB₂ рецептори, като например глиомите, но да имат обратен ефект при туморните клетки които не експресират канабиноидни рецептори поради потискането на антитуморния имунитет.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

След повече от десетилетие на проучвания на биологията на ендоканабиноидната система са направени множество нови открития. Установено е, че мозъкът и периферните тъкани съдържат канабиноидни рецептори и техните липидни лиганди – ендоканабиноидите, които се синтезират от мембранни предшественици. Става ясно, че тези сигнални молекули имат различен механизъм на действие от този на традиционните трансмитери и освен на ЦНС, влияят и на различни периферни органи и системи.

Въпреки този прогрес, все още липсват множество важни сведения за функционирането на ендоканабиноидната система. Необходимо е по-точно определяне на биохимични процеси, в които участват АЕА и 2-AG, както и участващите в тях ензими. Освен това трябва да се изяснят процесите на взаимодействие между ендоканабиноидите и

различните невротрансмитери, както и лекарствените препарати и наркотиците, и да се изследват функционалните последици от тези взаимодействия.

И накрая, но не на последно място, биха могли да се разработят селективни фармакологични вещества, които да взаимодействат с канабиноидните рецептори и механизмите на канабиноидната биосинтеза и деактивация с цел лечение на различни заболявания.

Макар и непълни, досегашните открития на различните функции на ендоканабиноидната система са многообещаващ старт за бъдещото ѝ по-добро опознаване и манипулиране с медицински цели.

Источници:



THE ENDOCANNABINOID SYSTEM AND ITS EXPLOITATION

NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY VOLUME 3 | SEPTEMBER 2004

THE MOLECULAR LOGIC OF ENDOCANNABINOID SIGNALING

NATURE REVIEWS | NEUROSCIENCE VOLUME 4 | NOVEMBER 2003

THE NEUROBIOLOGY AND EVOLUTION OF CANNABINOID SIGNALING

The royal society, 2001

CANNABINOIDS AND THE ENDOCANNABINOID SYSTEM

Cannabinoids 2006;1(1):10-14 ,nova-Institut, Goldenbergstraße 2, D-50354 Hürth, Germany

THE ENDOCANNABINOID SYSTEM: PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY

Alcohol & Alcoholism Vol. 40, No. 1, pp. 2–14, 2005

CANNABINOID RECEPTOR LOCALIZATION IN BRAIN

Proc.Nati.Acad.Sci.USA Vol. 87, pp. 1932-1936, March 1990 Neurobiology

CANNABIS AND THE BRAIN

Brain (2003), 126

ROLE OF CANNABINOID RECEPTOR IN THE BRAIN AS IT RELATES TO DRUG REWARD

Jpn J.Pharmacol, 84, 229-236 (2000)

CIRCUITRY FOR ASSOCIATIVE PLASTICITY IN THE AMYGDALA INVOLVES ENDOCANNABINOID SIGNALING

The Journal of Neuroscience, November 3, 2004 • 24(44):9953–9961 • 9953

CANNABINOIDS REVEAL THE NECESSITY OF HIPPOCAMPAL NEURAL ENCODING FOR SHORT-TERM MEMORY IN RATS

The Journal of Neuroscience, December 1, 2000

CANNABINOIDS INHIBIT THE FORMATION OF NEW SYNAPSES BETWEEN HIPPOCAMPAL NEURONS IN CULTURE

The Journal of Neuroscience, 2001, Vol. 21 RC146

CENTRAL NERVOUS SYSTEM CONTROL OF FOOD INTAKE

Nature © 2000 Nature Publishing Group Volume 404(6778) 6 April 2000 pp 661-671

FOOD FOR THOUGHT: ENDOCANNABINOID MODULATION OF LIPOGENESIS

THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION VOLUME 115 NUMBER 5 MAY 2005

COMPARATIVE BIOLOGY OF THE ENDOCANNABINOID SYSTEM

Possible role in the immune response

Eur. J. Biochem. 267, 4917±4927 (2000) q FEBS 2000

MOLECULAR CLONING OF A HUMAN CANNABINOID RECEPTOR WHICH IS ALSO EXPRESSED IN TESTIS

Biochem. J. (1991) 279, 129-134

ENDOCANNABINOID SIGNALING IN FERTILITY

Endocrine Reviews. Published ahead of print May 8, 2006 as doi:10.1210/er.2006-0006

ENDOCANNABINOID SIGNALING DIRECTS PERIIMPLANTATION EVENTS

The AAPS Journal 2006; 8 (2) Article 50

EFFECTS OF CANNABINOIDS ON PREIMPLANTATION MOUSE EMBRYO

DEVELOPMENT AND IMPLANTATION ARE MEDIATED BY BRAIN-TYPE CANNABINOID RECEPTORS

BIOLOGY OF REPRODUCTION 58, 1490-1495 (1998)

THE ENDOCANNABINOID SYSTEM AS AN EMERGING TARGET OF PHARMACOTHERAPY

Pharmacol Rev 58:389–462, 2006

THE ENDOCANNABINOID SYSTEM AS A TARGET FOR THERAPEUTIC DRUGS

TiPS – June 2000 (Vol. 21)



EUREKAH BIOSCIENCE DATABASE: <http://www.eurekah.com/> -

Cannabinoid Receptors and Signal Transduction

ECSN: Endocannabinoid system network <http://www.endocannabinoid.net>

ERG: Endocannabinoid research group <http://bruksy.icmib.na.cnr.it/erg>

ICRS: <http://www.cannabinoidsociety.org>