

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
FEDERICO II**

**FACOLTA' DI FARMACIA**

**Dipartimento di Farmacologia Sperimentale**

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA**

**IN**

**SCIENZA DEL FARMACO**

**XVIII CICLO (2002-2005)**

**CANNABINOIDI E PATOLOGIE INTESTINALI**

**Tutor:**

**Ch.mo Prof.**

**Nicola Mascolo**

**Coordinatore:**

**Ch.mo Prof.**

**Enrico Abignente**

**Candidato:**

**Dott. Raffaele Capasso**

## ***RINGRAZIAMENTI***

Desidero innanzitutto ringraziare il mio tutor, Prof. Nicola Mascolo, per la preziosa e costante supervisione.

Un particolare ringraziamento al Prof. Angelo Izzo, che mi ha sostenuto e seguito con attenzione dandomi sempre preziosi consigli durante tutto il mio lavoro di ricerca.

Ringrazio inoltre la Dott.ssa Francesca Borrelli che mi ha sempre incoraggiato nella mia ricerca.

Un ringraziamento affettuoso alla Dott.ssa Valeria Ascione ed alla Dott.ssa Gabriella Aviello, preziose compagne di lavoro, nonché alle studentesse interne Adriana Iovino, Marta Compagnone e Barbara Romano, valide collaboratrici nel corso del mio dottorato di ricerca.

Infine, ringrazio il coordinatore del dottorato di ricerca, Prof. Enrico Abignente, per la cortese disponibilità che ha sempre avuto nei miei confronti.

# INDICE

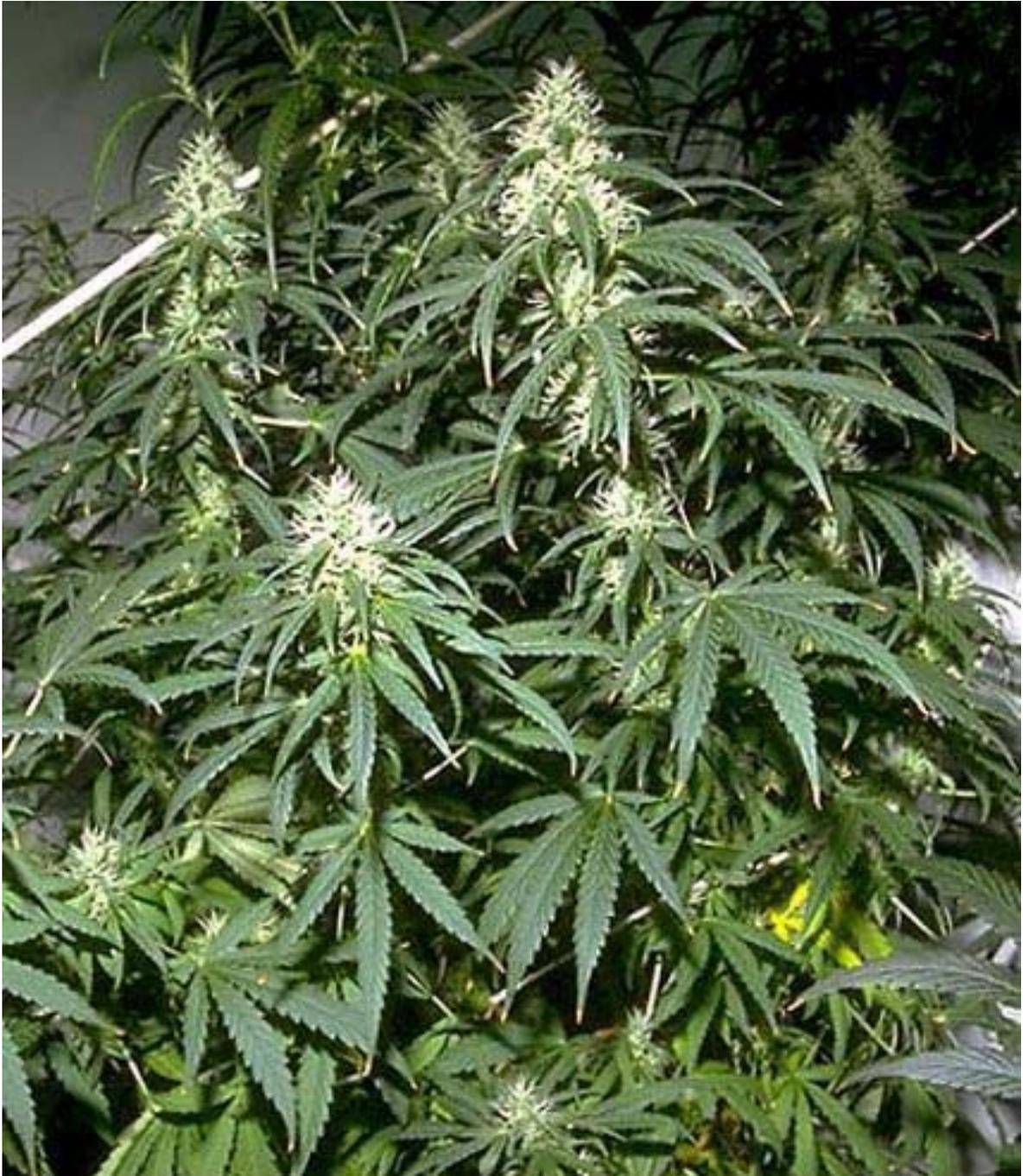
<b>1.0</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	pag. 4
<b>2.0</b>	<b>BASE DI PARTENZA SCIENTIFICA ED OBIETTIVO DELLA RICERCA</b>	pag. 24
<b>3.0</b>	<b>MATERIALI E METODI</b>	pag. 26
3.0.1	Animali	
3.0.2	Accumulo di fluido intestinale indotto dalla tossina colerica	pag. 26
3.0.3	Transito intestinale nel tenue	pag. 28
3.0.4	Colite ulcerosa in pazienti	pag. 30
3.0.5	Western blot	pag. 30
3.0.6	Dosaggio degli endocannabinoidi	pag. 31
3.0.7	Attività dell'enzima anandamide amidoidrolasi	pag. 32
3.0.8	Immunoistochimica	pag. 32
3.0.9	Analisi RT-PCR semi-quantitativa	pag. 35
3.1.0	Farmaci utilizzati	pag. 36
3.1.1	Analisi statistica	pag. 38
<b>4.0</b>	<b>RISULTATI</b>	pag. 39
4.1	Accumulo di fluido indotto dalla tossina colerica	pag. 39
4.2	Valutazione dei livelli degli endocannabinoidi e dell'attività dell'anandamide amidoidrolasi	pag. 43
4.3	Immunoistochimica	pag. 46
4.4	Studio dell'espressione dell'mRNA dei recettori CB <sub>1</sub> mediante RT-PCR semiquantitativa	pag. 49
4.5	Effetto degli agonisti dei recettori dei cannabinoidi sul transito intestinale durante un processo infiammatorio	pag. 51
4.6	Effetto della palmitoiletanolamide nel controllo della motilità intestinale in animali in condizioni fisiopatologiche	pag. 55
4.7	Livelli dell'anandamide e della palmitoiletanolamide in pazienti affetti da colite ulcerosa	pag. 64
<b>5.0</b>	<b>DISCUSSIONE</b>	pag. 67
<b>6.0</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	pag. 76
<b>7.0</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 78

## 1.0 INTRODUZIONE

La canape indiana è costituita dalle infiorescenze femminili disseccate di una varietà fisiologica di *Cannabis sativa L.var.indica* (canape indiana propriamente detta). *Cannabis* deriva dal greco *kanaboi* e significa acqua stagnante; infatti la pianta si sviluppa meglio in luoghi umidi.

E' una pianta erbacea annuale (Figura 1), che può raggiungere anche i 2-4 metri d'altezza. Originaria dell'Asia centrale e occidentale, cresce in numerose regioni tropicali e temperate dove è utilizzata per la produzione di fibre e semi. Le fibre del caule sono lunghe e resistenti e sono adoperate per la produzione di corde e tappeti. I semi contengono un olio fisso che è usato a scopo industriale. Il caule, del diametro di circa 10 cm, è eretto, semplice o ramificato ed è ricoperto di brevi peli. Le foglie sono peziolate, ruvide e stipolate; quelle inferiori appaiono palmate, composte e lanceolate mentre quelle superiori sono alterne, decrescenti fino a ridursi a tre segmenti, talora ad uno solo.

La specie è dioica, con fiori maschili e femminili in piante separate. Sia la specie dioica che monoica produce principi attivi, ma è preferita la prima perchè fornisce una resina con alta concentrazione di sostanze psicoattive. Le foglie di entrambi i tipi di piante presentano peli protettori con apice appuntito e base slargata, contenente un cistolito di carbonato di calcio. Le foglie e le brattee hanno anche peli ghiandolari, con peduncolo pluriseriato e una capocchia che presenta cellule disposte a raggiera, che secernono una



**Figura 1.** *Cannabis sativa*

resina ricca di principi attivi. Sia i fiori maschili che quelli femminili sono ascellari: ramificati e penduli i primi, eretti e più piccoli i secondi. Il frutto è un achenio uniloculare, ovale, lungo 5 mm., largo 2 mm.

La *Cannabis* coltivata *ab antico* è stata usata per millenni come pianta tessile e come fonte di medicinali. Si suppone, infatti, che il suo uso risalga all'età neolitica nei territori situati a sud-ovest del Mar Caspio e corrispondenti all'attuale Afghanistan. La canape era conosciuta anche dai cinesi che sono stati i primi a descriverne le proprietà medicinali e dagli indiani che preparavano un infuso chiamato *bhang* assunto durante particolari riti religiosi. Gli Assiri bruciavano nei loro templi una sostanza chiamata *qunnabu*, mentre Caldei e Persiani la conoscevano rispettivamente con il nome di *kanbun* e *kenab*. Nel mondo islamico la canape indiana era tenuta in grandissima considerazione: *hashish* in arabo significa erba anzi l'erba per eccellenza.

In Europa l'uso voluttuario della canape fu introdotto nell'800 in seguito alla conquista dei territori dell'impero ottomano da parte delle truppe napoleoniche. La canape fu oggetto di attenzione anche da parte dei medici europei, infatti, William O'Shaughnessy nel 1842 la introdusse per curare diverse patologie (dolore, spasmi muscolari, convulsioni, reumatismi, epilessia), entrando così a far parte della medicina occidentale e successivamente di quella americana. Durante il periodo in cui fu utilizzata nella medicina occidentale, la canape ebbe applicazioni anche nel campo

dei disturbi gastrointestinali: dolori addominali, gastroenteriti e diarrea. A questi usi possono essere associati anche i racconti aneddotici che indicano l'uso di preparazioni a base di canape per alleviare i sintomi del morbo di Crohn e della gastroparesi diabetica.

Tuttavia con il passare del tempo si cominciò a scoraggiarne l'uso ed i motivi principali di questo declino furono molteplici e complessi. Rimane traccia nei testi dell'epoca di un'imprevedibilità dell'azione degli estratti dovuta all'estrema variabilità della loro potenza, dell'impossibilità di ottimizzarne il dosaggio e della presenza degli effetti collaterali dovuti all'azione sul sistema nervoso centrale.

Con l'avvento dei farmaci di sintesi (anestetici, aspirina, barbiturici e benzodiazepine, fenotiazine) le preparazioni di canape andarono rapidamente in disuso e vennero cancellate dalla Farmacopea Britannica (1932), da quella americana (1942) e da quella italiana (nell'edizione successiva al 1940) e la sua notorietà si legò all'uso illegale.

Nella seconda metà del XX secolo con l'isolamento e l'identificazione dei cannabinoidi si è rinnovato l'interesse della comunità scientifica nei confronti della canape. Più di 70 cannabinoidi sono stati identificati e tra questi il più abbondante è il  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC), ritenuto il principale ma non il solo responsabile dei suoi effetti farmacologici. Altri costituenti sono il cannabinolo, il cannabidiolo, il cannabigerolo, il cannabicromene ed i relativi acidi.

Le principali preparazioni si ottengono utilizzando le infiorescenze femminili della canape indiana, raccolte poco prima della fioritura (generalmente in aprile) quando le foglie incominciano ad ingiallire. Tra queste ricordiamo:

- *ganja* o *genjha* costituita dagli steli lunghi circa un metro, privati delle foglie e disposti in pacchi recanti all'estremità le infiorescenze femminili. Tra tutte è la più pregiata e ricca di resine;
- *marihuana* o *manancha* costituita unicamente dalle infiorescenze femminili disseccate;
- *hashish* o *bhang* o *kif* o *charas*, costituita dall'essudato resinoso che si ricava dalle sommità fiorite, sia femminili che maschili e dalle foglie. Anche se meno pregiata quest'ultima è la qualità più comune nei mercati europei.

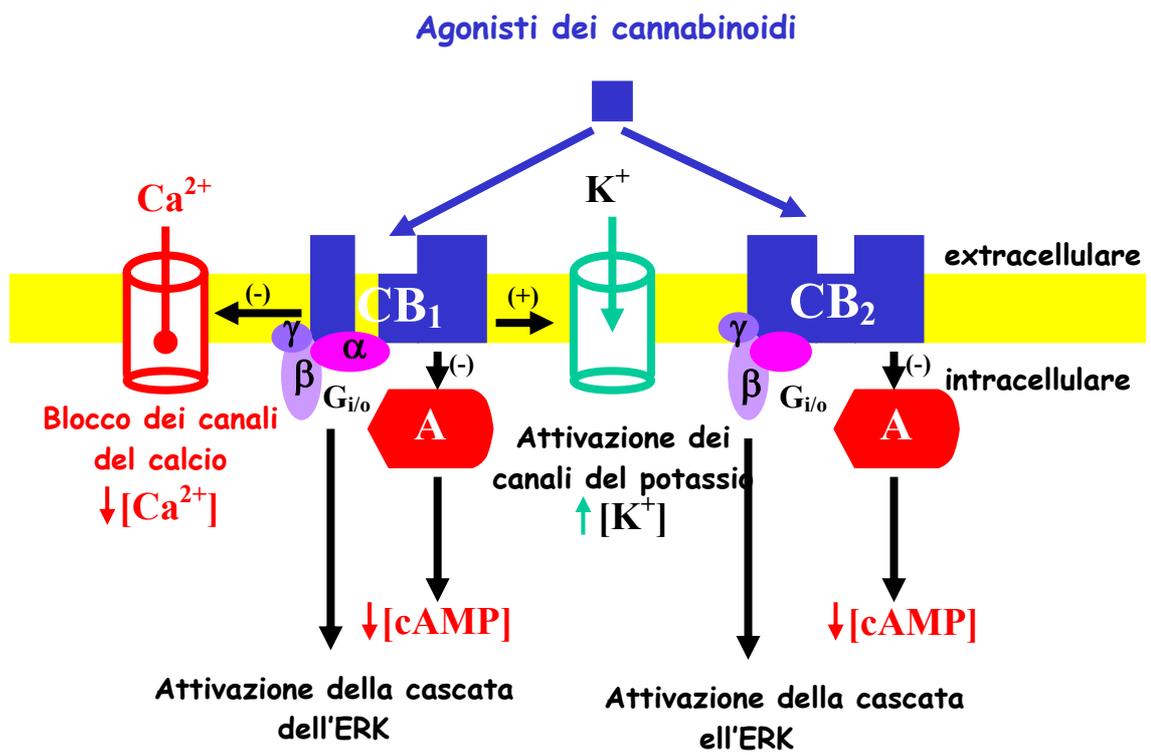
Gli effetti farmacologici della canape variano in dipendenza della dose, della via di somministrazione, della vulnerabilità agli effetti psicoattivi e delle condizioni di utilizzo.

Il più comune ed apparentemente più efficace metodo per somministrare la canape è il fumo: circa il 20 % del  $\Delta^9$ -THC contenuto in una sigaretta di *cannabis* viene assorbito. Gli effetti compaiono rapidamente e persistono per circa due ore. La via parenterale, praticamente non usata, ha tempi ancora più brevi. La sua somministrazione orale è meno efficace e la biodisponibilità è molto variabile rispetto a quando la droga viene fumata

(Mechoulam, 1996). Gli effetti ottenuti con la *cannabis* variano notevolmente in relazione al contenuto in principi attivi della preparazione usata, alle modalità di assunzione, alla velocità con cui è metabolizzata, alla durata ed all'intensità dell'abuso. Altri fattori importanti sono rappresentati dalla personalità del soggetto, dal suo stato d'animo, dalle aspettative, da precedenti esperienze e dalle condizioni ambientali. L'intossicazione da canape indiana produce cambiamenti nell'umore, nelle percezioni e nelle motivazioni. Si instaura uno stato onirico con ideazione sconnessa ed incontrollabile, alterazione della percezione spazio-tempo, allucinazioni visive ed un senso psichico e fisico di benessere. Il tono dell'umore è esaltato, sono assai frequenti scoppi di ilarità immotivata. Durante lo stato di euforia vi è compromissione delle funzioni cognitive e percettive, del tempo di reazione, dell'apprendimento e della memoria con complessi cambiamenti comportamentali quali incostanza e aumentato desiderio di cibo. Sebbene alcuni fumatori riferiscano, un stato di euforia, un aumento della libido e un maggior senso di consapevolezza di sé, questi effetti non sono stati confermati. Si possono verificare anche reazioni spiacevoli quali: panico, psicosi acuta e sdoppiamento della personalità. Non sono riportati finora casi di intossicazione mortale né la comparsa di grave dipendenza fisica ma solo casi di tolleranza e di tossicomania. La dipendenza fisica è stata comunque documentata nell'animale di laboratorio.

Il meccanismo d'azione del  $\Delta^9$ -THC è stato per anni ignoto. Non più di 20 anni fa si riteneva che, il  $\Delta^9$ -THC, essendo una sostanza molto lipofila agisse per un'interazione aspecifica con le membrane cellulari. Nel 1988 si è dimostrata l'esistenza di specifici recettori per i cannabinoidi. Il recettore  $CB_1$  è stato infatti identificato da Devane e collaboratori (1988) e successivamente clonato nel 1990 (Matsuda e coll.), mentre il recettore  $CB_2$  è stato clonato nel 1993 (Munro e coll.). Entrambi i recettori appaiono accoppiati a proteine  $G_{i/o}$  e determinano inibizione dell'adenilato ciclasi e dei canali del  $Ca^{2+}$  di tipo N o P/Q (Figura 2) ed attivazione dei canali del  $K^+$  (Di Marzo e coll., 2000; Izzo e coll., 2001a).

I recettori  $CB_1$  sono localizzati sia nel sistema nervoso centrale (dove sono responsabili dei caratteristici effetti dei cannabinoidi in particolare quelli sulla cognizione e sulla memoria, l'analgesia e la depressione dell'attività motoria) che in diversi organi periferici (cuore, occhio, deferente, intestino, vescica). Nel sistema nervoso periferico i recettori  $CB_1$  sono localizzati presinapticamente o pregiunzionalmente e la loro attivazione è messa in relazione con gli effetti dei cannabinoidi quali stimolazione dell'appetito, vasodilatazione (particolarmente evidenti a livello dei vasi congiuntivali), tachicardia, ritenzione urinaria ed inibizione della motilità intestinale (Pertwee, 1999).



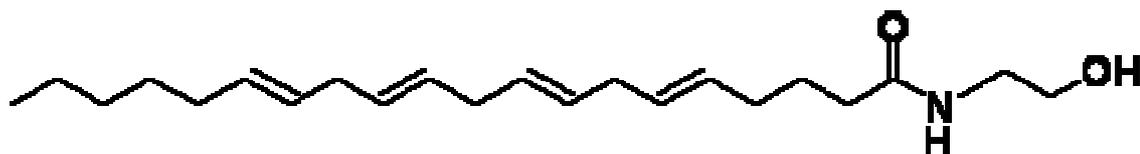
**Figura 2.** Vie di trasduzione del segnale attivate dagli agonisti dei cannabinoidi

Per i recettori CB<sub>2</sub> l'unica localizzazione nota è a livello periferico ed in particolare essi sembrano essere espressi principalmente sulle cellule del sistema immunitario (Mechoulam e coll., 1998).

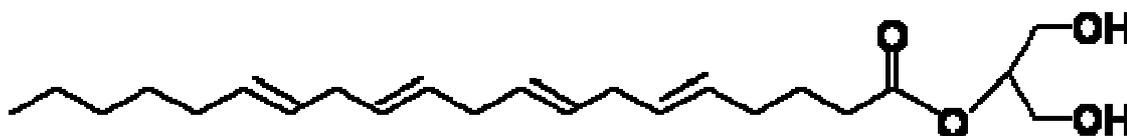
Come per la morfina la scoperta dei recettori per i cannabinoidi di origine vegetale ha fatto ipotizzare la presenza di cannabinoidi endogeni in grado di legarsi a questi recettori. Infatti l'arachidoniletanolamide detta anche anandamide (dal termine sanscrito *ananda* che vuol dire felicità perfetta) il 2-arachidonilglicerolo (2-AG) e più recentemente il 2-arachidonil gliceril etere (noladin etere) sono stati identificati nei tessuti dei mammiferi (Figura 3) (Devane e coll., 1992; Mechoulam e coll., 1995; Sugiura e coll., 1995; Stella e coll., 1997; Martin e coll., 1999; Hanus e coll., 2001). Per l'anandamide e per il 2-AG è stato descritto un meccanismo di ricaptazione sinaptico, attraverso un carrier (trasportatore di membrana dell'anandamide-AMT) e la successiva idrolisi all'interno della cellula, ad acido arachidonico ed etanolamide, ad opera dell'enzima anandamide amidoidrolasi (o amide idrolasi degli acidi grassi, FAAH) (Di Marzo e coll., 2000) (Figura 4).

L'insieme dei recettori per i cannabinoidi, degli endocannabinoidi e degli enzimi che partecipano alla loro inattivazione è definito "sistema cannabinoide endogeno" (Di Marzo e coll., 2000).

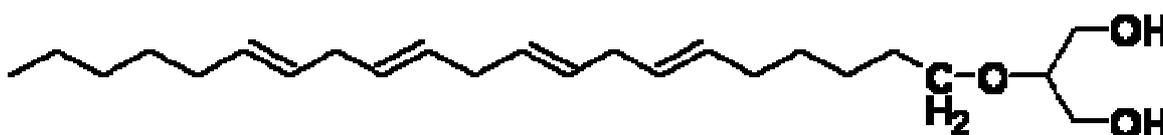
I farmaci che influenzano il sistema cannabinoide endogeno attualmente noti possono essere divisi in tre classi principali: agonisti recettoriali,



**Anandamide**

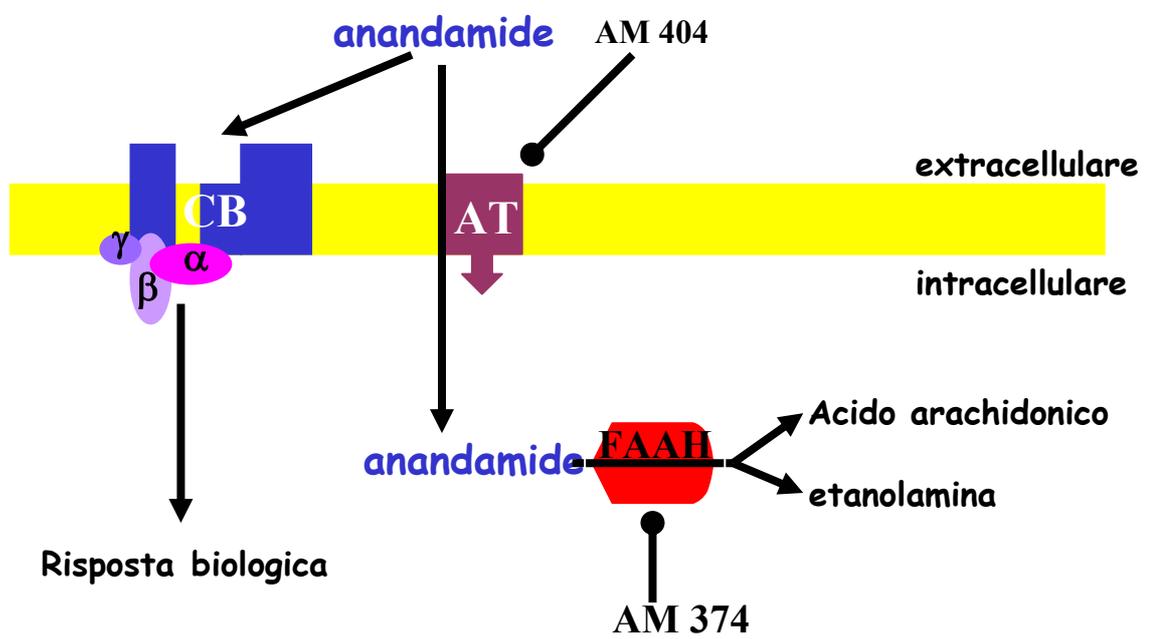


**2- Arachidonilglicerolo**



**Noladin Etere**

**Figura 3.** Struttura chimica dei cannabinoidi endogeni



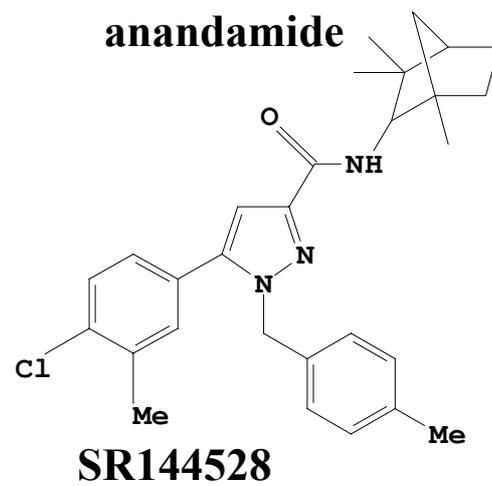
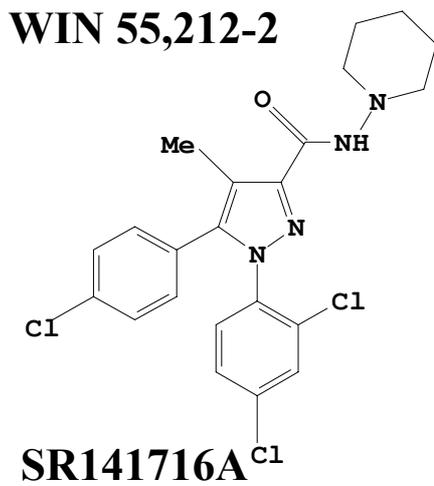
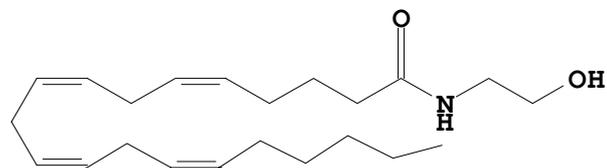
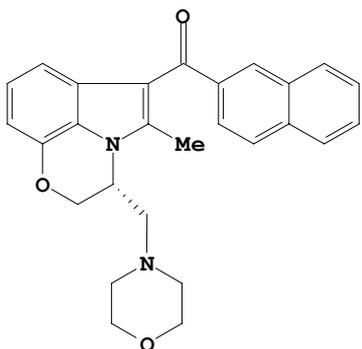
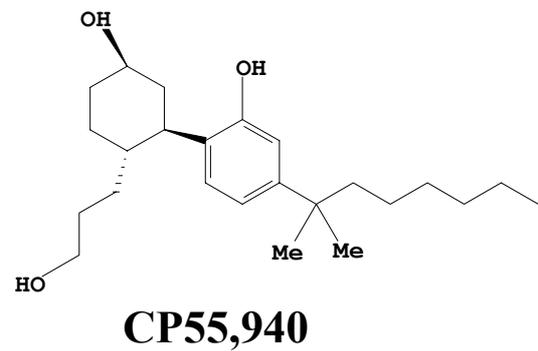
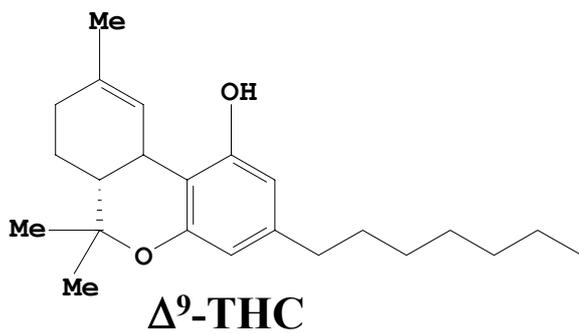
**Figura 4.** Meccanismo d'azione ed inattivazione dell'anandamide

antagonisti recettoriali ed inibitori della ricaptazione enzimatica e della degradazione dell'anandamide.

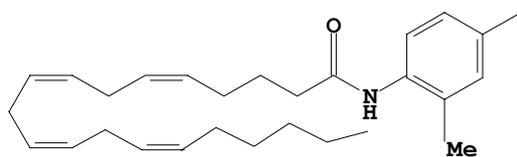
Gli agonisti, in base alla loro struttura chimica, sono solitamente classificati in quattro classi principali: classici, non classici, aminoalchilindoli ed eicosanoidi (Nocerino e coll., 2000; Pertwee e Ross, 2002; Reggio, 2002).

I cannabinoidi classici sono derivati dibenzopiranicici. Appartengono a questo gruppo i cannabinoidi di origine vegetale  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^8$ -THC, il cannabinolo ed i loro analoghi sintetici come HU-210 (11-idrossi- $\Delta^8$ -THC-demetileptil). Il  $\Delta^9$ -THC ed il  $\Delta^8$ -THC si legano sia ai recettori CB<sub>1</sub> (agonisti parziali) che ai recettori CB<sub>2</sub> (Pertwee e Ross, 2002; Reggio, 2002). L'analogo sintetico HU210, si lega ad entrambi i tipi di recettori e manifesta effetti farmacologici eccezionalmente lunghi.

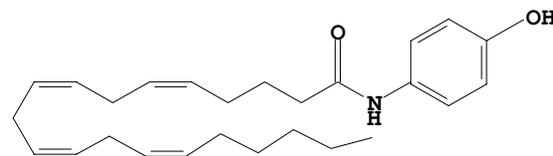
I cannabinoidi non classici sono analoghi ciclici e biciclici del  $\Delta^9$ -THC privi dell'anello piranico (Nocerino e coll., 2000). Il prototipo è rappresentato dal CP 55,940 potente agonista di entrambi i tipi di recettori dei cannabinoidi (Figura 5). I derivati aminoalchilindolici sono strutturalmente differenti dai due gruppi precedenti (Pertwee e Ross, 2002). Tra i composti più rappresentativi ricordiamo il WIN 55,212-2 dotato di alta affinità per i recettori CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> ed il JWH-015 che mostra elevata affinità per i recettori CB<sub>2</sub> (Pertwee e Ross, 2002; Howlett e coll., 2002; Reggio, 2002) (Figura 5).



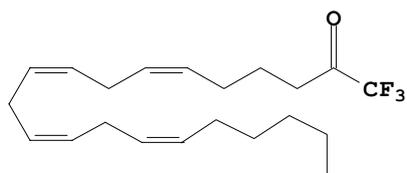
**Figura 5.** Struttura chimica dei farmaci cannabinoidergici



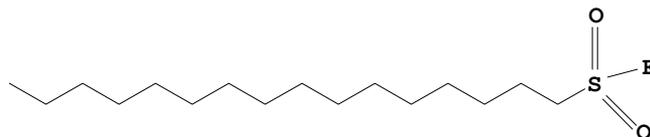
**VDM11**



**AM404**



**ATFMK**



**AM347**

**Figura 5.** Struttura chimica dei farmaci cannabinoidergici (segue)

Gli eicosanoidi comprendono i cannabinoidi isolati nei tessuti animali ed i loro analoghi. A questo gruppo appartengono l'anandamide, il 2-AG, il noladin etere ed altri analoghi sintetici (Pertwee, 2000; Mechoulam e coll., 2002) L'anandamide si comporta da parziale agonista dei recettori CB<sub>1</sub> e mostra una minore attività intrinseca sui recettori CB<sub>2</sub> rispetto ai recettori CB<sub>1</sub> (Pertwee, 2000; Pertwee e Ross, 2002). Tramite modifiche strutturali sono stati derivati degli analoghi come la metanandamide, l'arachidonil-2-cloretilamide (ACEA) e l'arachidonilciclopropilamide (ACPA) ad azione selettiva sul recettore CB<sub>1</sub> (Pertwee e Ross, 2002; Howlett e coll., 2002). Il secondo cannabinoide endogeno 2-AG è agonista di entrambi i recettori dei cannabinoidi e come l'anandamide mostra una marginale maggiore attività intrinseca sui recettori CB<sub>1</sub> rispetto ai recettori CB<sub>2</sub> (Pertwee, 2000; Howlett e coll., 2002; Mechoulam e coll., 2002). Il noladin etere, isolato di recente è il meno conosciuto degli endocannabinoidi ed appare un agonista selettivo dei recettori CB<sub>1</sub> (Hanus e coll., 2001).

Gli studi intrapresi in questo campo da Sanofi-Recherche (Montpellier, Francia) hanno portato alla sintesi di due antagonisti selettivi dei recettori CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> entrambi molto attivi chiamati rispettivamente SR141716A e SR144528 (Pertwee e Ross, 2002; Howlett e coll., 2002) Analoghi strutturali dell'SR141716A sono AM251 ed AM281 che manifestano una minore potenza.

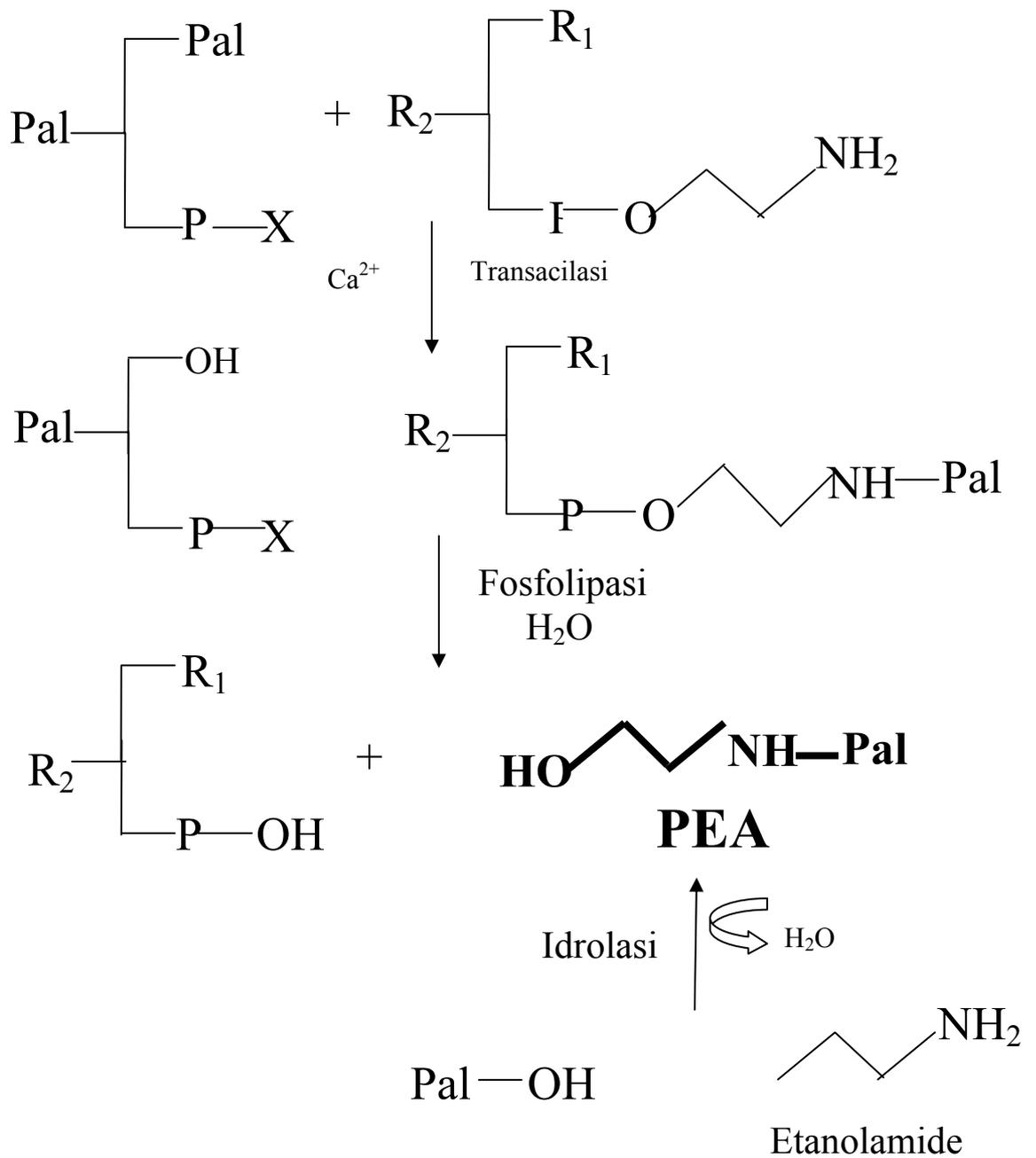
Alcuni composti sono in grado di inibire l'inattivazione degli endocannabinoidi e di conseguenza di incrementare la loro concentrazione sul sito d'azione. Lo sviluppo di farmaci basati su tale meccanismo d'azione può presentare vantaggi, poiché essi agiscono solo quando la trasmissione viene attivata e solo là dove gli endocannabinoidi sono presenti. Attualmente sono stati studiati alcuni inattivatori del trasporto (ricaptazione) dell'anandamide, quali AM404 e VDM11 (Piomelli e coll., 2000; De Petrocellis e coll., 2000; Giuffrida e coll., 2001; Fowler e coll., 2002) e dell'enzima FAAH, responsabile della degradazione enzimatica dell'anandamide con dei suoi analoghi strutturali quali l'arachidonil trifluorometil-chetone (ATMK), l'AM381 e l'AM374 (De Petrocellis e coll., 2000; Piomelli e coll., 2000; Giuffrida e coll., 2001) (Figura 5).

Un analogo saturo dell'anandamide è la palmitoiletanolamide (PEA), che è stata identificata più di 40 anni fa come componente attivo di frazioni ad attività antinfiammatoria ottenute dall'albume di uovo e dalla lecitina di soia (Kuehl e coll., 1957); nel 1965 Bachur e collaboratori trovarono la PEA in diversi tessuti, soprattutto nel cervello, fegato e muscolatura scheletrica di ratto (Lambert & Di Marzo, 1999). In seguito la PEA è stata identificata nei macrofagi (Schmid e coll., 1997) e nei leucociti (Bisogno e coll., 1999) peritoneali, nel plasma di ratto (Giuffrida e Piomelli, 1998), nel

cuore di cane (Epps e coll., 1979), nella pelle (Calignano e coll., 1998) e nel testicolo (Kondo e coll., 1998) di ratto.

La PEA è prodotta a livello tissutale tramite reazioni enzimatiche simili a quelle dell'anandamide (Di Marzo e coll., 1994) e può essere rilasciata con l'anandamide in seguito a depolarizzazione dei neuroni (Di Marzo e coll., 1994; Izzo e coll., 2000a).

Due vie biosintetiche sono state proposte per la PEA (Figura 6). La prima prevede la condensazione dell'etanamide e dell'acido palmitico ed è catalizzata da una sintetasi. Poiché sono necessarie concentrazioni millimolari dei due substrati affinché l'enzima riesca a catalizzare la reazione (probabilmente perché la sintetasi catalizza normalmente la reazione inversa, ovvero l'idrolisi della PEA), è stata proposta un'altra via biosintetica. Questa prevede l'idrolisi di un precursore fosfolipidico, l'N-palmitoil-fosfatidiletanamide (NPPE), catalizzata da una fosfolipasi. A sua volta l'NPPE è prodotto dall'aggancio di un radicale palmitico sull'amino-gruppo della fosfatidiletanamina, reazione catalizzata da un aciltransferasi calcio dipendente.



**Figura 6.** Biosintesi della Palmitoiletanolamide (PEA)

La PEA possiede diverse attività biologiche simili all'anandamide, ma diversamente dall'anandamide non si lega efficientemente ai recettori dei cannabinoidi CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> (Lambert e Di Marzo, 1999); la PEA, come l'anandamide, riduce l'attività spontanea nel topo (Adams e coll., 1995), possiede attività analgesica (Calignano e coll., 1998), antiinfiammatoria (Berdyshev e coll., 1998) ed è in grado di rilassare in vitro l'arteria mesenterica di ratto (White e Hiley, 1998).

I cannabinoidi hanno una grande varietà di effetti biologici e le potenziali applicazioni terapeutiche di interesse storico e contemporaneo includono il trattamento del dolore, dell'asma, dei disturbi neurodegenerativi e muscoloscheletrici, glaucoma, infiammazione e cancro. Benché gli studi sulla biochimica, fisiologia e patofisiologia del sistema endocannabinoide siano ancora agli inizi appare chiaro che una modulazione farmacologica del sistema cannabinoide possa fornire nuovi farmaci per il trattamento di diverse patologie.

Le attuali conoscenze del sistema cannabinoide endogeno suggeriscono che potrebbero essere valutate potenziali applicazioni terapeutiche dei cannabinoidi nel trattamento del dolore, nelle malattie neurodegenerative e muscoloscheletriche, nell'obesità, nella cirrosi epatica, nel glaucoma, nelle

malattie infiammatorie ed in alcune patologie dell'apparato digerente  
(Nocerino e coll., 2000; Pertwee e coll., 2001; Pinto e coll., 2002a).

## **2.0 BASE DI PARTENZA SCIENTIFICA ED OBIETTIVO DELLA RICERCA**

In studi precedenti condotti, *in vitro* ed *in vivo* è stato dimostrato che l'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub> riduce la motilità intestinale. Gli studi *in vitro* hanno mostrato che l'attivazione di tali recettori determina un'inibizione della trasmissione eccitatoria nell'ileo di cavia (Izzo e coll., 1998a) e tale effetto è associato ad una diminuzione del rilascio di acetilcolina dai neuroni enterici (Coutts e Pertwee, 1997) e ad una riduzione dell'efficienza della peristalsi intestinale (Izzo e coll., 2000c), inoltre studi *in vivo* hanno evidenziato che in condizioni fisiologiche l'attivazione di tali recettori riduce la motilità intestinale (Izzo e coll., 2000b) e lo svuotamento gastrico (Izzo e coll., 1999a).

Tuttavia questi studi non hanno chiarito il ruolo dei cannabinoidi endogeni nella regolazione della motilità intestinale in condizioni patologiche.

L'obiettivo della nostra ricerca è stato quello di studiare il ruolo del sistema endocannabinoide endogeno nella regolazione della secrezione e della motilità *in vivo* in condizioni patologiche, diarrea indotta da tossina colerica e infiammazione intestinale. A tal fine sono stati valutati gli effetti di 1) agonisti ed antagonisti recettoriali ed inibitori dell'inattivazione dell'anandamide; 2) misurati i livelli intestinali degli endocannabinoidi; 3) valutata l'attività dell'enzima anandamide amidoidrolasi; 4) identificati, mediante tecniche di Western blot e tecniche di immunistochemica, i

recettori dei cannabinoidi CB<sub>1</sub> nell'intestino tenue di topo; 5) quantificati i livelli di mRNA dei recettori CB<sub>1</sub> mediante retrotrascrizione e reazione a catena della polimerasi (RT-PCR).

L'obiettivo finale è stato quello di identificare nuovi bersagli molecolari per lo sviluppo di composti capaci di regolare la secrezione e la motilità intestinale in condizioni patologiche attraverso una modulazione farmacologica del sistema cannabinoide endogeno.

### **3.0 MATERIALI E METODI**

#### **3.0.1 Animali**

Per i nostri studi sono stati utilizzati topi ICR (Harlan Italy, San Pietro al Natisone, Udine, Italy) di sesso maschile (18-22 g).

I topi sono stati alimentati *ad libitum* con una dieta standard fornita dalla ditta Mucedola Mangimi, Settimo Milanese (MI) tranne che nelle 16 ore precedenti l'esperimento. I topi avevano libero accesso all'acqua durante le 16 ore di digiuno ma questa veniva allontanata dopo la somministrazione della CT.

Tutti gli animali prima di essere utilizzati per gli esperimenti sono stati lasciati stabulare per 7 giorni alle seguenti condizioni: temperatura  $23\pm 2^\circ$  C, umidità 60%, cicli di luce-buio di 12 ore.

#### **3.0.2 Accumulo di fluido intestinale indotto dalla tossina colerica**

La valutazione dell'accumulo di fluido intraluminale nell'intestino tenue è stata eseguita mediante la tecnica dell'enteropooling. La tossina colerica (CT) (10  $\mu$ g /topo in 0.3 ml di TRIS buffer 0.05 M, pH 7,4) è stata somministrata mediante un sondino orogastrico. Dopo 6 ore l'intero intestino dal piloro alla valvola ileo-cecale è stato isolato e manipolato con cura per evitare la rottura del tessuto e la perdita di fluido. I tessuti mesenterico e connettivo sono stati rimossi e l'intestino è stato opportunamente essiccato.

L'accumulo di fluido è stato espresso come:

$$(W_1 - W_2) \times 10^{-6} / W_2$$

dove  $W_1$  è il peso dell'intestino dopo il prelievo e  $W_2$  è il peso dell'intestino dopo l'espulsione del contenuto (Rivière e coll., 1991). Le dosi di CT ed altri dettagli sperimentali sono stati selezionati sulla base di precedenti studi presenti in letteratura (Gabriel e coll., 1994).

Il CP55,940 (0.03-3 mg/kg), l'ACEA (0,1-10 mg/kg), il JWH-015 (1-10 mg/kg), l'SR141716A (0.1-3 mg/kg), l'SR144528 (0.1-3 mg/kg), il VDM11 (10 mg/kg), la clorisondamina (5 mg/kg), la capsazepina (3-30 mg/kg) o il veicolo [salina, dimetilsolfossido (DMSO), o etanolo, 10 µl/topo] sono stati somministrati intraperitonealmente (ip) 30 minuti prima della somministrazione della tossina colerica (o del veicolo).

In altri esperimenti gli antagonisti dei recettori dei cannabinoidi (SR141716A o SR144528 a dosi di 0.3 e 3 mg/kg rispettivamente) o la clorisondamina (5mg/kg) sono stati somministrati (ip) 30 minuti prima degli agonisti. Le dosi del VDM11 e della clorisondamina sono state scelte in base a precedenti studi presenti in letteratura (Delbro e Lange, 1997; Pinto e coll., 2002b ).

### **3.0.3 Transitto intestinale nel tenue**

Il transitto intestinale nel tenue è stato studiato utilizzando la tecnica descritta da Izzo e coll. (2000b). In pratica gli animali erano tenuti a digiuno per 6 ore prima della misurazione del transitto e per 18 ore prima dell'induzione della flogosi intestinale. Durante il digiuno, gli animali venivano posti in gabbie munite di una rete a maglie larghe posta 5 cm al di sopra del pavimento per facilitare la caduta delle feci e impedire la coprofagia. Dopo 30 minuti dalla somministrazione delle sostanze in esame, tutti gli animali ricevevano, mediante sondino gastrico, 0.2 mL di una sospensione di carbone vegetale (marker) al 10%, in gomma arabica al 5%. Venti minuti dopo la somministrazione del marker gli animali erano sacrificati in ambiente di CO<sub>2</sub> e la distanza percorsa dal carbone veniva misurata a partire dal piloro, sia negli animali di controllo che in quelli trattati. I risultati sono stati espressi come percentuale della distanza percorsa dal marker rispetto alla lunghezza dell'intestino tenue.

Il CP 55,940 ( 0.0003-0.1 mg/kg ) , il cannabinolo (0.1-30 mg/kg) e la PEA (2.5-30 mg/kg) o il veicolo [dimetilsolfossido (DMSO), o etanolo] sono stati somministrati intraperitonealmente (ip) 20 minuti prima della

somministrazione del marker (o del veicolo).

In altri esperimenti gli animali, 30 minuti prima della somministrazione della PEA e degli agonisti dei cannabinoidi CP 55,940 e cannabinoles erano pretrattati per via intraperitoneale con gli antagonisti dei recettori dei cannabinoidi (SR141716A o SR144528 a dosi di 0.3 e 1 mg/kg rispettivamente), la clorisondamina (5mg/kg), l' esametonio (1 mg/kg), la ioimbina (1 mg/kg), il naloxone (2 mg/kg), L-NAME (25 mg/kg). In altri esperimenti gli animali, 10 minuti prima della somministrazione della PEA erano pretrattati per via intraperitoneale con PMSF (30 mg/kg). Queste dosi sono state stabilite sulla base di precedenti lavori (Santos e Rao, 1999; Izzo e coll., 2001b; Wiley e coll., 2000).

Il transito intestinale nel tenue è stato studiato anche in animali a cui veniva prodotto uno stato flogistico. L'infiammazione è stata indotta pretrattando gli animali con 0.02 mL di olio di croton per due giorni consecutivi; il quarto giorno dopo la prima somministrazione di olio di croton, veniva misurato il transito (Puig e Pol, 1998).

### **3.0.4 Colite ulcerosa in pazienti**

Per i nostri esperimenti i tessuti provenienti da 8 pazienti di controllo [5 maschi e 3 femmine (età  $41.5 \pm 17.5$ ): 3 pazienti con ematochezia, 3 con carcinoma del colon (diagnosi negativa), 3 con dolori addominali] ed 8 pazienti affetti da colite ulcerosa (6 maschi e 2 femmine di età  $49.8 \pm 17.1$ ).

I tessuti biopsici venivano conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  prima del dogaggio.

### **3.0.5 Western blot**

Il digiuno è stato omogenato in un tampone contenente: 100 mM di HEPES, NaCl 1M, 200 mM di EDTA, 100 mM di EGTA, ditiotreitolo 1M, 100 mM di PMSF, 15/ml di inibitore della tripsina, 750  $\mu\text{l/ml}$  di pepstatina A, 10 mM di benzamidina 10, glicerolo al 20 % v/v, 100 mM di  $\text{MgCl}_2$ , 1% di Nonidet P40,  $\text{H}_2\text{O}$ , con un omogeneatore di vetro ed un pestello di teflon. L'omogenato è stato centrifugato a  $4^{\circ}\text{C}$  a 13,000 rpm per 15 minuti ed il surnatante è stato separato, aliquotato e conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La concentrazione delle proteine è stata determinata con il metodo Bio-Rad. L'elettroforesi è stata eseguita come descritto precedentemente da Melk e collaboratori (2000). Un equivalente di 100  $\mu\text{g}$  di proteine provenienti dall'omogenato intestinale sono state separate su gel di poliacrilamide SDS-PAGE. Le proteine sono state poi trasferite su membrane di nitrocellulosa. Le membrane sono state poi saturate con un tampone

contenente “non fat dry milk” in PBS e incubate per tutta la notte a 4°C con un anticorpo specifico (anti-CB<sub>1</sub> dil. 1:800; Cayman Chemicals). Dopo ripetuti lavaggi con PBS contenente Triton X-100 all’1% queste sono state incubate con un anticorpo secondario anti-IgG di coniglio (per CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>) coniugato ad una perossidasi per 1 h a temperatura ambiente. Infine le bande proteiche sono state visualizzate mediante chemiluminescenza (ECL; Amersham), scannerizzate ed analizzate attraverso un densiometro GS 700 (Bio-Rad) ed un programma computerizzato (Molecular Analyst IBM).

### **3.0.6 Dosaggio degli endocannabinodi**

L’intestino tenue dei topi di controllo e di quelli trattati con CT è stato prelevato (6 ore dopo la somministrazione orale di CT o del veicolo) ed il tessuto biopsici prelevato da pazienti di controllo che con colite ulcerosa era pesato ed immerso in azoto liquido, conservato a -70° e immediatamente trasferito presso i laboratori del CNR (Dott. V. Di Marzo) di Arco Felice (NA). Qui il tessuto è stato estratto con una miscela di cloroformio/metanolo (2:1) contenente 1 nmole di d<sub>8</sub>-anandamide, d<sub>4</sub>-palmitoiletanolamide e d<sub>8</sub>-2-arachidonilglicerolo, sintetizzati come descritto da Bisogno e collaboratori (1997). I lipidi estratti sono stati separati su colonna cromatografica di silice e poi su HPLC (Bisogno e coll., 1997). Le frazioni corrispondenti

all'anandamide/palmitoiletanolamide (tempo di ritenzione 26-27 minuti) o al 2-arachidonilglicerolo (tempo di ritenzione 18-22 minuti) sono state analizzate mediante gas-cromatografia e spettrometria di massa (GC-MS) (Bisogno e coll., 1999). I risultati sono stati espressi come pmol/g o nmol/g di tessuto fresco.

### **3.0.7 Attività dell'enzima anandamide amidoidrolasi**

Per misurare l'attività dell'anandamide amidoidrolasi è stata utilizzata l'anandamide marcata [ $^{14}\text{C}$ ] ( $5 \text{ mCi nmol}^{-1}$ ) sintetizzata come descritto da Bisogno e collaboratori (1997) a partire da [ $^{14}\text{C}$ ] etanolamina ed acido arachidonico a concentrazioni di  $10 \mu\text{M}$ . Sono state dosate frazioni di membrana ottenute da segmenti di intestino provenienti da animali di controllo e da animali quelli trattati con CT (Bisogno e coll., 1999). Il saggio è stato eseguito in  $50 \text{ nmol/L}$  di Tris  $-\text{HCl}$ , pH 9, a  $37^\circ\text{C}$  per 30 minuti. L'etanolamina [ $^{14}\text{C}$ ] prodotta dalla reazione di degradazione dell'anandamide [ $^{14}\text{C}$ ] è stata misurata come precedentemente descritto (Bisogno e coll., 1997). L'attività è stata espressa come pmol di etanolamina [ $^{14}\text{C}$ ] prodotta per min/mg di proteine.

### **3.0.8 Immunoistochimica**

I campioni ottenuti dagli animali di controllo e da quelli trattati con CT sono stati prelevati (6 ore dopo la somministrazione orale di CT o del

veicolo) dalla porzione intermedia del digiuno. Il materiale è stato immediatamente fissato per 2 h, in paraformaldeide sciolta al 2% in soluzione salina tamponata (PBS), 0.1 M, a pH 7.4 in ghiaccio. Dopo fissazione, i campioni sono stati lavati diverse volte in PBS e poi messi in soluzioni crescenti di saccarosio disciolto in PBS (dal 10 al 30%) e conservati in frigo a 4°C. Quindi il materiale è stato congelato e conservato in azoto liquido fino al successivo taglio al criostato. Le sezioni criostatate di 10 µm di spessore sono state montate su vetrini portaoggetto pretrattati con Vectabond (Vector, Burlingame, CA).

Le sezioni criostatiche contenenti il plesso mienterico sono state sottoposte al protocollo di immunofluorescenza di semplice e doppia marcatura.

Sono stati utilizzati due anticorpi policlonali ottenuti in coniglio e diretti contro la porzione N-terminale del recettore CB<sub>1</sub> a sequenza umana ( 1-14 aa e 1-16 aa rispettivamente), acquistati dalla Cayman Chemicals (diluizione di 1: 600; Ann Arbor, Michigan, USA) e dalla Biosource Int (diluizione di 1: 250; Camarillo, CA, USA) applicati da soli sulle sezioni, o diluiti con un anticorpo policlonale ottenuto da capra, che riconosce e si lega all'enzima acetilcolintransferasi (ChAT) umano diluito 1:50 (Chemicon International, Temecula, CA, USA). Le incubazioni secondarie comprendevano anticorpi (immunoglobuline G ottenute da asino: Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) coniugati rispettivamente ai

fluorocromi: isotiocianato di fluoresceina (FITC), con Rosso Rodamina<sup>TM</sup>-X e con l'acido 7 amino-4 metilcumarin 3 acetico (AMCA).

In breve le sezioni di tessuto venivano reidratate in PBS (pH 7.4) per 10 minuti, incubate in Triton X-100 allo 0,4% e albumina bovina al 3% (Sigma Chemical Co., ST. Louis, MO, USA) in PBS per 30 minuti per bloccare il legame non specifico (Mascolo e coll., 2002; Pinto e coll., 2002b). Le sezioni venivano simultaneamente incubate con due anticorpi primari ottenuti in coniglio ed in capra rispettivamente, per tutta la notte a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi in PBS, le sezioni venivano simultaneamente incubate per 1 ora al buio con l'anticorpo secondario diluito nello stesso buffer, coniugato con i fluorocromi FICT ed AMCA. Dopo diversi lavaggi in PBS, le sezioni sono state montate con Vectashield (Vector Laboratori, Burlingame, CA, USA). Tutti gli anticorpi usati sono stati diluiti in soluzioni di PBS contenenti IgG di topo e di asino al 3%. Sono state anche valutate possibili reazioni crociate tra gli anticorpi secondari ed i primari delle diverse specie. Tutti i controlli hanno dato risultati negativi.

Le sezioni tissutali sono state osservate con un microscopio Nikon Eclipse 600, provvisto di lampada a mercurio di 100W. I fotogrammi sono stati ottenuti con un sistema fotografico Nikon. Sono state usate pellicole trasparenti Provia 400 (Fuyj, Tokio, Japan). Le immagini scelte sono state scannerizzate con uno scanner FS 2710 (Canon Inc, Japan) e

successivamente mediante il programma Adobe Photoshop (ver. 6) si sono allestite le tavole fotografiche.

### **3.0.9 Analisi RT-PCR semi-quantitativa**

L'RNA totale dalla parte intermedia del digiuno di ogni animale (sei ore dopo la somministrazione orale della CT o del veicolo) è stato estratto usando il reagente Trizol. Dopo l'estrazione, l'RNA è stato precipitato usando isopropanolo freddo e successivamente risospeso in acqua RNAase-free (Sigma). L'integrità dell'RNA è stata analizzata mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1% contenente bromuro di etidio. L'RNA è stato poi trattato con DNAsi I RNAse-free (kit Ambion DNA-free™) per digerire il DNA genomico contaminante e successivamente per rimuovere la DNAsi ed i cationi bivalenti.

L'espressione dell'mRNAs per la GAPDH (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi) e per i recettori CB<sub>1</sub> è stata studiata mediante retrotrascrizione e reazione a catena della polimerasi (RT-PCR). L'RNA totale è stato retrotrascritto usando oligo dT come primers. L'amplificazione del DNA è stata ottenuta in un buffer per PCR (Q-Biogen) contenente 2µl di cDNA, 500 µM di dNTP, 2 mM di MgCl<sub>2</sub>, 0.8 µM di ogni primer e 0.5 U di Taq polimerasi (Q-Biogen).

Le tappe della reazione a catena erano: i) denaturazione a 94°C per 1 min; ii) appaiamento a 60°C per 1 min; iii) estensione a 72°C per 1 min. E' stata

poi fatta un'estensione finale di 10 minuti a 72°C. I cicli PCR di amplificazione sono stati 30. La reazione è stata fatta in un PE Gene Amp PCR Sistema 9600 (Perkin Emer). Dopo la reazione gli amplificati sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio al 2% contenente bromuro di etidio ed osservati successivamente all'UV.

Gli oligonucleotidi specifici sono stati sintetizzati sulla base delle sequenze di cDNA della GAPDH e dei recettori CB<sub>1</sub> comuni al ratto ed al topo. Per la GAPDH, le sequenze dei primers erano 5'-CCCTTCATTGACCTCAACTACATGGT-3' (nt 208-233; sense) e 5'-GAGGGCCATCCACAGTCTTCTG-3' (nt 655-677; antisense). I primers CB<sub>1</sub> sense e antisense erano 5'-GATGTCTTTGGGAAGATGAACAAGC-3' (nt 365-373) e 5'-AGACGTGTCTGTGGACACAGACATGG-3' (nt 460-468), rispettivamente. Le dimensioni dei frammenti amplificati erano 470 bp per la GAPDH e 309 bp per i CB<sub>1</sub>. L'espressione del gene per la GAPDH è stata utilizzata per valutare le variazioni nel contenuto di RNA e nella sintesi di cDNA per le differenti preparazioni. Nessun prodotto della PCR era ottenuto quando la tappa della retrotrascrizione veniva eliminata (dati non mostrati).

### **3.1.0 Farmaci utilizzati**

Sono stati utilizzati i seguenti farmaci: l'ACEA [(all Z)-N-(2-cloroetil)-5,8,11,14-eicosatetraenamida], il CP55,940 (-)-cis-3-[2-Hydroxy-4-(1,1-

dimethylheptyl)phenyl]-trans-4-(3-hydroxypropyl)cyclohexanol, JWH-015 (2-metil-1-propil-1H-indol-3-yl)-1-naftalenilmetanone, la clorisondamina e la palmitoiletamolamide acquistati presso la ditta Tocris Cookson (Bristol, UK). La tossina colerica (da *Vibrio cholerae*), l'esametonio, il cannabinolo, la ioimbina, il naloxone, l'estere metilico della N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NAME), il fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) e la capsazepina sono state acquistate dalla ditta Sigma Chemical Co. (Milano, Italia). L'SR141716A [(N-piperidin-1-yl)-5-(4-clorofenil)-1-2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazolo-3-carboxamide cloridrato] e l'SR144528 (N-[-1S-endo-1,3,3-trimetil biciclo[2.2.1] eptan-2-yl]-5-(4-cloro-3-metilfenil)-1-(4-metilbenzil)-pirazolo-3-carboxamide) sono stati forniti dalla Dott.ssa Madaleine Mossè e da Francis Barth (SANOFI-Recherche, Montpellier, France). Il composto VDM11 [(all Z) N-(2-metil-3-idrossi-fenil)-5,8,11,14-eicosa-tetraenamida] è stato fornito dal Dott. V. Di Marzo [CNR di Arco Felice (NA)] (De Petrocellis e coll., 2000).

Il CP55,940, il JWH-015, la capsazepina, l'SR141716A e l'SR144528 sono stati solubilizzati in dimetilsolfossido (DMSO); l'ACEA ed il VDM11 sono stati solubilizzati in etanolo, mentre la clorisondamina in fisiologica. Il DMSO e l'etanolo, alle concentrazioni di 10 µL/topo ip, non avevano alcun effetto significativo sulla secrezione intestinale.

### **3.1.1 Analisi statistica**

I risultati rappresentano la media  $\pm$  e.s degli esperimenti. Per determinare la significatività statistica, sono stati usati il *t*-test di Student (differenza tra due medie) e l'analisi della varianza seguita dal test di Tukey-Kramer (differenza tra più di due medie). Un valore di  $P < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo.

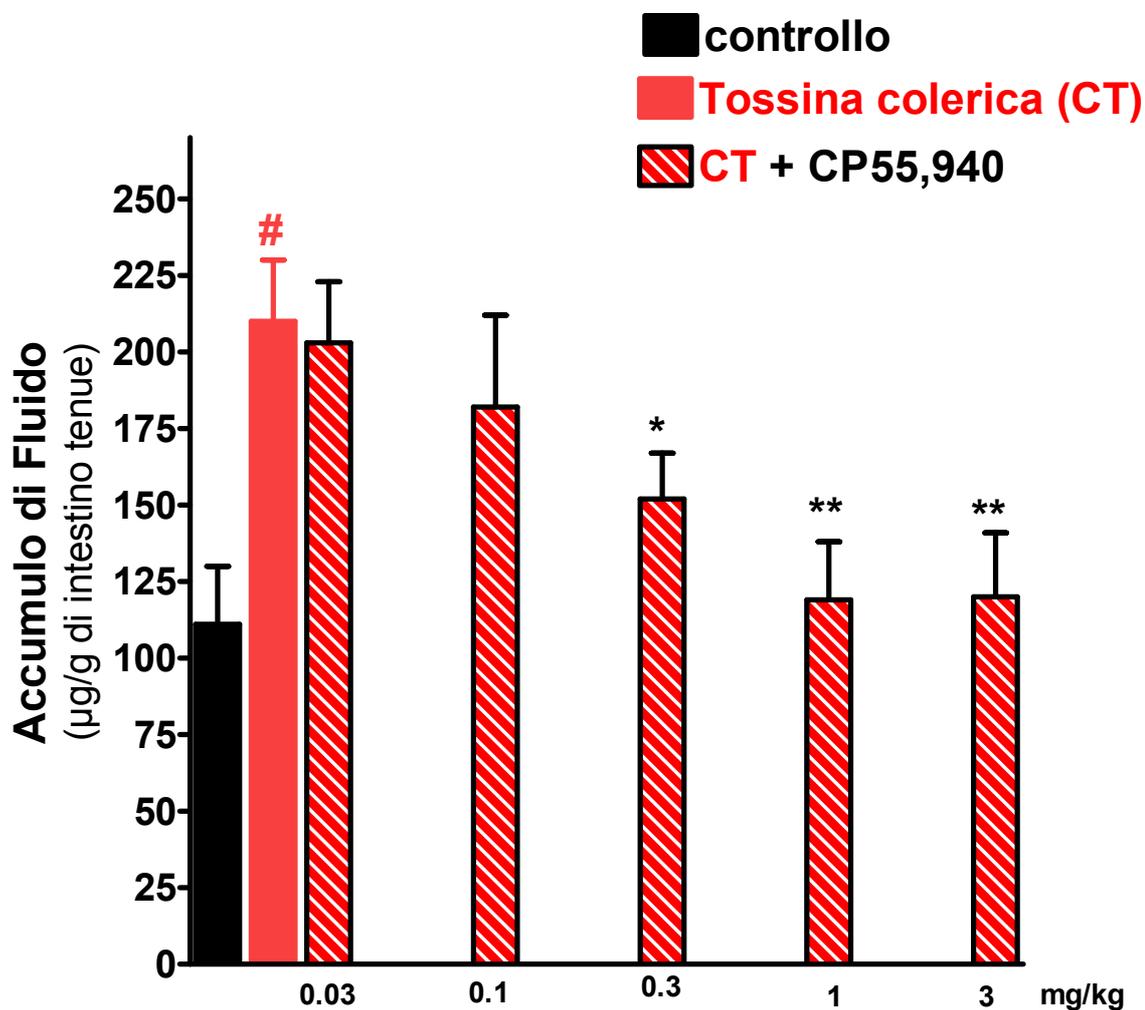
## 4.0 RISULTATI

### 4.1 Accumulo di fluido intestinale indotto dalla tossina colerica

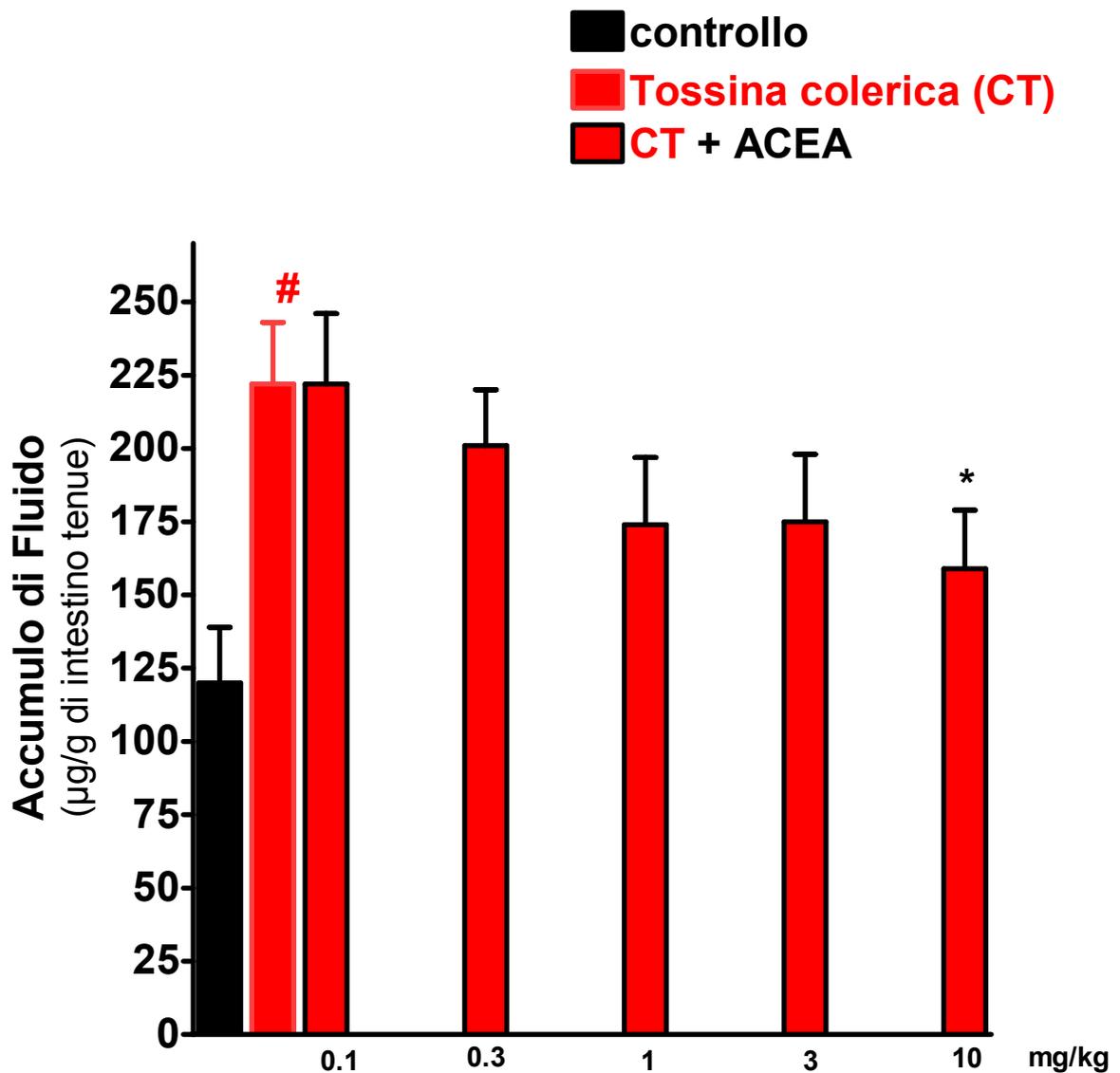
La somministrazione orale della CT (10 µg/topo) determinava un significativo accumulo di fluido nell'intestino tenue (Figura 7). Gli agonisti dei recettori dei cannabinoidi ACEA (0.1-10 mg/kg,) e CP55,940 (0.03-3 mg/kg) producevano una riduzione dose-dipendente dell'accumulo di fluido intraluminale (Figura 8).

Il composto SR141716A (0.3 mg/kg), un antagonista dei recettori CB<sub>1</sub>, annullava l'effetto dell'ACEA (10 mg/kg) e del CP55,940 (0.3 mg/kg), mentre l'SR144528, un antagonista dei recettori CB<sub>2</sub>, (3 mg/kg) non aveva alcun effetto (Figura 9). L'accumulo di fluido indotto dalla CT (µg/g tenue: CT, 221±25; CT + JWH-015, 239±21; n=8, P>0.2 vs CT) non era però modificato dall'agonista selettivo dei recettori CB<sub>2</sub>, JWH-015 (10 mg/kg). Inoltre la somministrazione della capsazepina un'antagonista dei recettori VR1 dei vanilloidi, non modificava l'accumulo di fluido indotto dalla CT (µg/g di intestino tenue: CT, 231±211; CT+capsazepina 3 mg/kg, 228±19; capsazepina 10 mg/kg, 235±22; capsazepina 30 mg/kg, 219±20; n=10-12; P>0.2 vs CT).

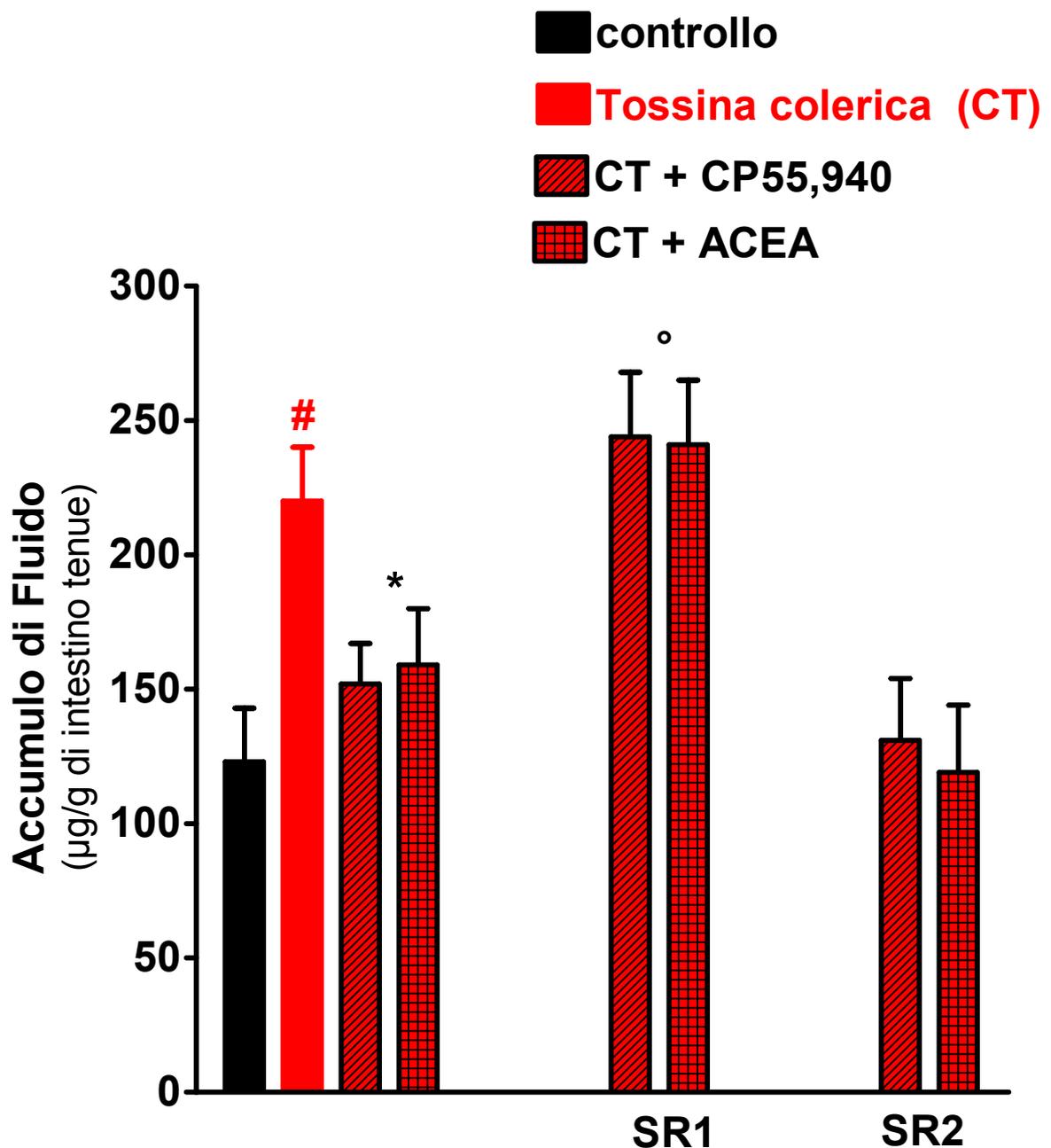
La clorisondamina (5 mg/kg), un bloccante gangliare, somministrata da sola riduceva l'effetto della CT di circa il 50%. Quando il CP55,940 (1 mg/kg) veniva somministrato dopo la clorisondamina, inibiva in maniera significativa (P<0.05) l'accumulo



**Figura 7.** Effetto del CP55,940 (0.03-3 mg/kg, ip) sull'accumulo di fluido indotto dalla tossina colerica (CT). L'accumulo di fluido è stato misurato 6 ore dopo la somministrazione della CT (10 µg/topo *per os*). Ogni punto rappresenta la media ± SEM di 10-12 topi. <sup>#</sup>P<0.01 vs controllo; <sup>\*</sup>P<0.05 e <sup>\*\*</sup>P<0.01 vs CT.



**Figura 8.** Effetto dell'ACEA (0.1-10 mg/kg, ip) sull'accumulo di fluido indotto dalla tossina colerica (CT). L'accumulo di fluido è stato misurato 6 ore dopo la somministrazione della CT (10 µg/topo *per os*). Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  SEM di 10-12 topi. #P<0.01 vs controllo; \*P<0.05 vs CT.



**Figura 9.** Accumulo di fluido indotto dalla CT nel topo.

Effetto antisecretorio del CP55,940 (0.3 mg/kg, ip) e dell'ACEA (10 mg/kg, ip) da soli o in topi protrattati con l'antagonista dei recettori CB<sub>1</sub> SR141716A (SR1, 0.3 mg/kg, ip) o con l'antagonista dei recettori CB<sub>2</sub> SR144528 (SR2, 3 mg/kg, ip). L'accumulo di fluido è stato misurato 6 ore dopo la somministrazione della CT (10 µg/topo *per os*). Ogni punto rappresenta la media ± SEM di 10-12 topi. #P<0.01 vs controllo; \*P<0.05 vs CT, °P<0.05 vs CP55,940 (o ACEA).

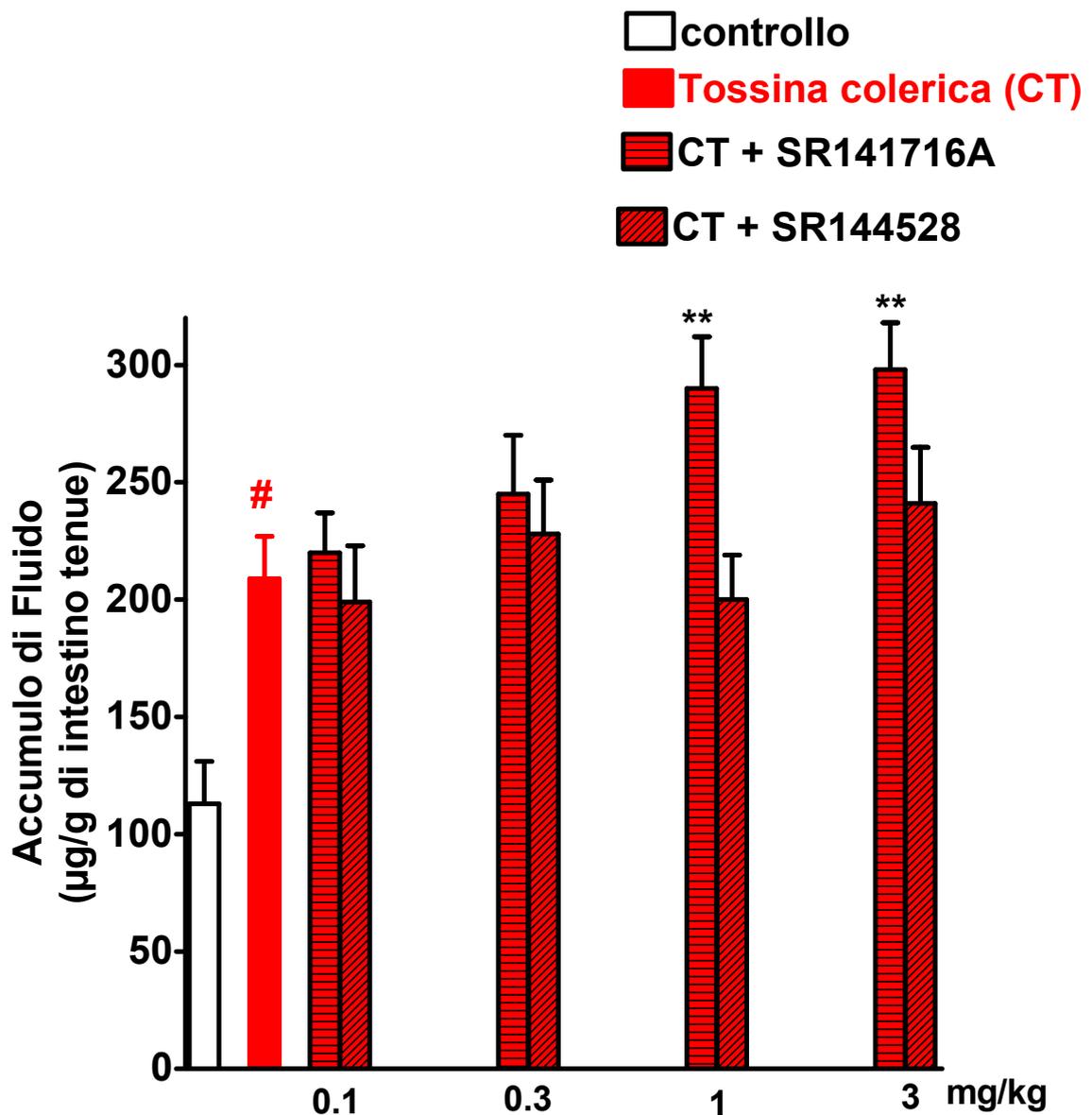
di fluido indotto dalla CT ( $\mu\text{g/g}$  di intestino tenue: controllo,  $128\pm 21$ ; CT,  $235\pm 26$ ; CT + clorisondamina,  $178\pm 15$ ; CT + clorisondamina + CP55,940;  $131\pm 21$ ;  $n=8-10$ ).

L'SR141716A (0.1-3 mg/kg) somministrato da solo, determinava un incremento dose-dipendente dell'accumulo di fluido intraluminale, un effetto che era statisticamente significativo a dosi di 1 mg/kg (Figura 10). Al contrario il composto SR144528 (0.1-3 mg/kg), non modificava significativamente l'accumulo di fluido indotto dalla CT.

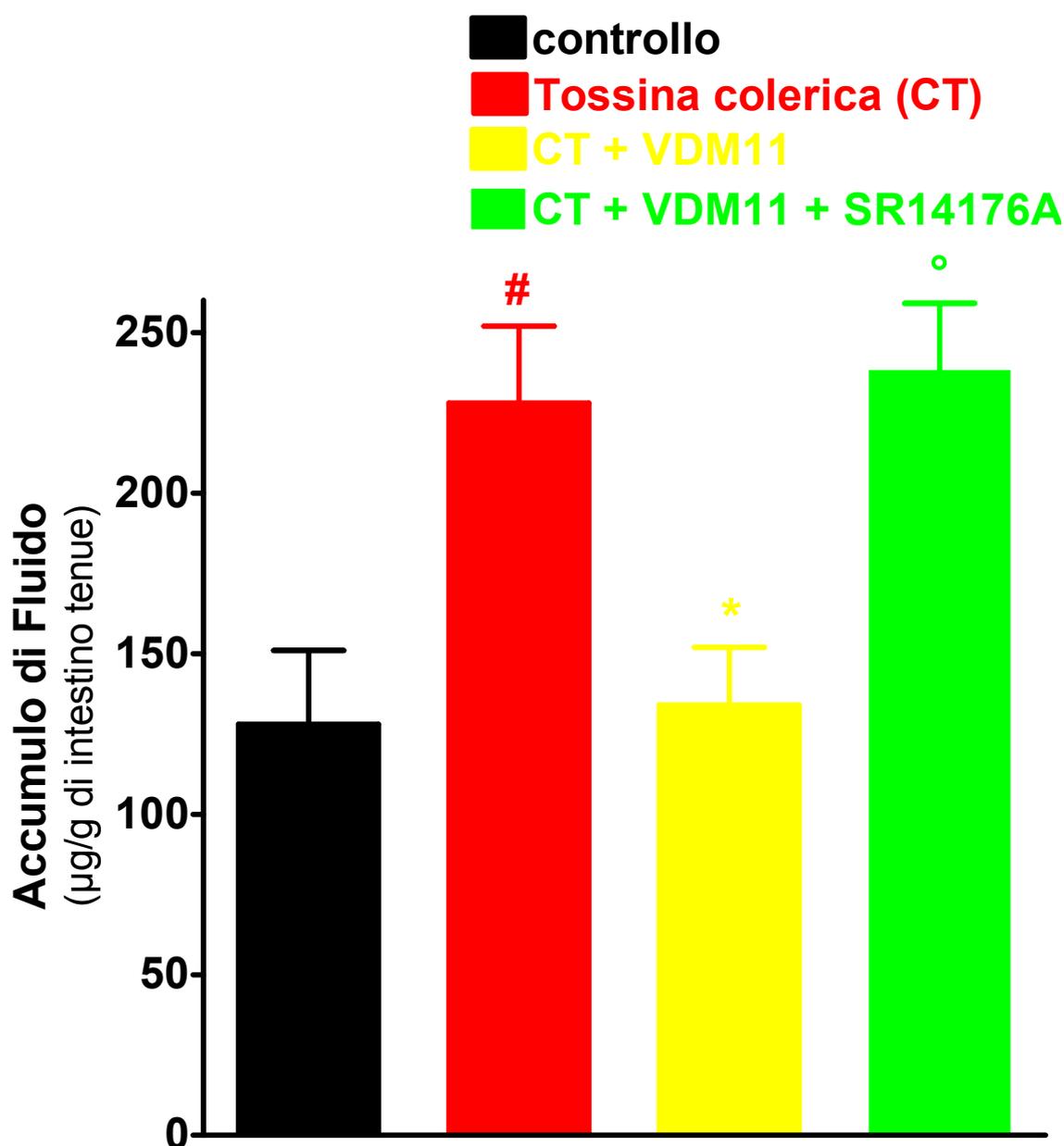
Il composto VDM11 (10 mg/kg), un inibitore selettivo della ricaptazione dell'anandamide, riduceva significativamente l'accumulo di fluido indotto dalla CT e questo effetto era antagonizzato da una dose inattiva di SR141716A (0.3 mg/kg) (Fig. 5). Ad alte dosi il CP55,940, l'ACEA l'SR141716A, il VDM11, la capsazepina ed il JWH-015 non modificavano l'accumulo di fluido intestinale negli animali di controllo (animali che ricevevano il veicolo usato per solubilizzare la CT) (dati non mostrati).

#### **4.2 Valutazione dei livelli degli endocannabinoidi e dell'attività dell'anandamide amidoidrolasi**

Nella Tabella 1 sono riportati i livelli di endocannabinoidi, cioè anandamide, 2-arachidonilglicerolo (2-AG) e palmitoiletanolamina (PEA) nell'intestino tenue dei topi di controllo e trattati con CT. Come si può osservare i livelli di anandamide ma non di 2-AG o PEA aumentavano



**Figura 10.** Effetto dell'antagonista dei recettori CB<sub>1</sub> SR141716A (SR1, 0.1-3 mg/kg, ip) e dell'antagonista dei recettori CB<sub>2</sub> SR144528 (SR2, 0.1-3 mg/kg, ip) sull'accumulo di fluido indotto dalla CT nel topo. L'accumulo di fluido è stato misurato 6 ore dopo la somministrazione della CT (10 µg/topo *per os*). Ogni punto rappresenta la media ± SEM di 10-12 topi. #P<0.01 vs controllo; \*\*P<0.01 vs CT.



**Figura 11.** Effetto dell'inibitore del re-uptake dell'anandamide VDM11 (10 mg/kg, ip) da solo o in topi protrattati con l'antagonista dei recettori CB<sub>1</sub> SR141716A (SR1, 0.3 mg/kg, ip) sull'accumulo di fluido indotto dalla CT nel topo. L'accumulo di fluido è stato misurato 6 ore dopo la somministrazione della CT (10 µg/topo *per os*). Ogni punto rappresenta la media ± SEM di 8-10 topi. #P<0.01 vs controllo; \*P<0.01 vs CT; °P<0.01 vs VDM11.

dopo la somministrazione della CT. L'aumento dei livelli di anandamide non era dovuto a variazioni della sua idrolisi enzimatica, in quanto non si osservavano variazioni nei campioni di intestino tenue degli animali trattati con CT della capacità di idrolizzare la [<sup>14</sup>C]anandamide (Tabella 1).

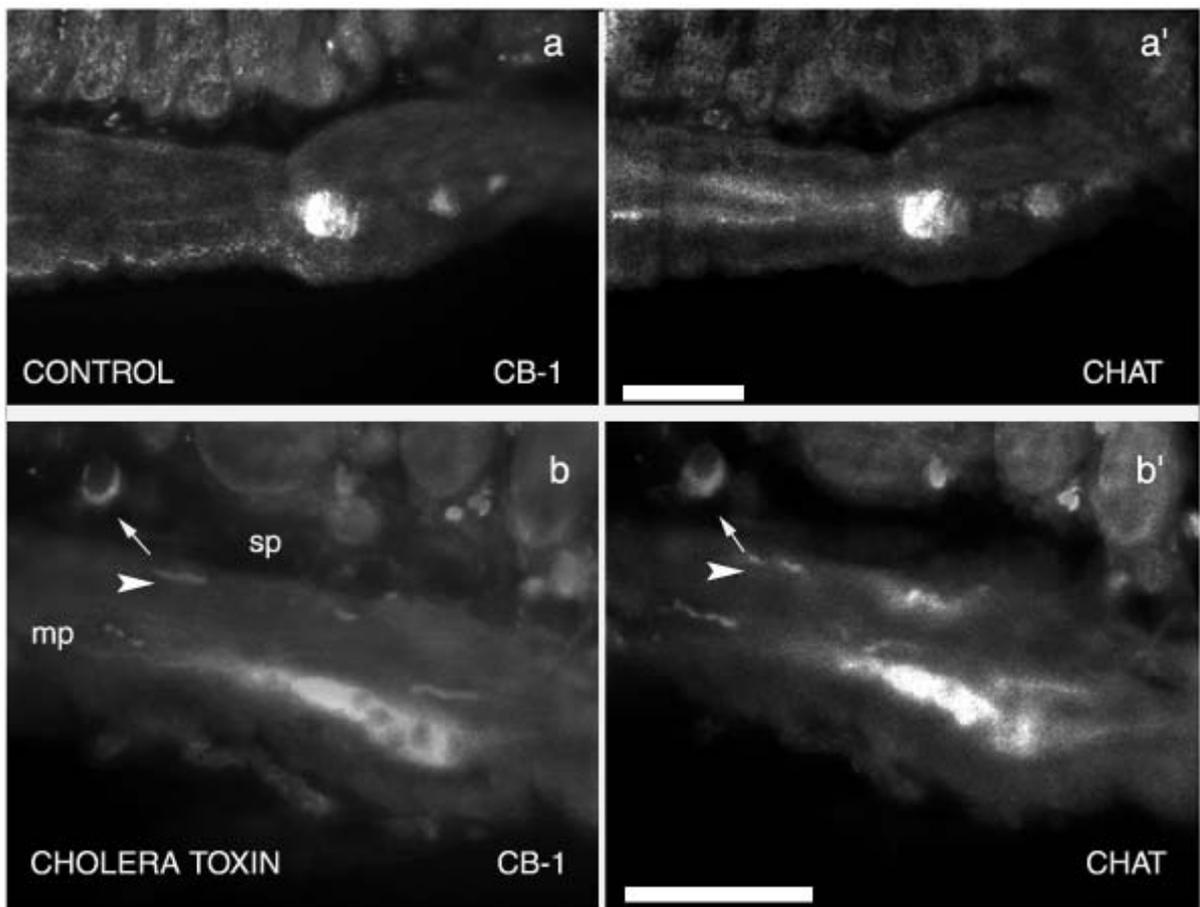
### **4.3 Immunoistochimica**

Mediante l'immunofluorescenza indiretta di marcatura semplice è stato possibile dimostrare che nell'intestino tenue degli animali di controllo, i recettori CB<sub>1</sub> sono distribuiti sui corpi neuronali e sulle fibre nervose del plesso mienterico, (Figura 12a) e, più raramente, sulle fibre nervose della lamina sottomucosa. Pochi recettori CB<sub>1</sub> sono stati localizzati sulle fibre nervose che innervano la muscolatura circolare. L'immunofluorescenza indiretta di doppia marcatura, ha mostrato la presenza dei recettori CB<sub>1</sub> sui corpi neuronali e sulle fibre nervose mienteriche, che risultavano immunoreattive anche alla acetilcolintransferasi (ChAT) (Figura 12a-a'), enzima utilizzato come marker rivelatore dei neuroni colinergici.

Negli animali trattati con la CT si osservava un lieve aumento della densità dei recettori CB<sub>1</sub>, espressi dai neuroni del plesso mienterico, dalle fibre nervose della muscolatura circolare e dai neuroni del plesso sottomucoso. (Figura 12b). Colorazioni di doppia marcatura hanno confermato la presenza dei recettori CB<sub>1</sub> sui neuroni colinergici mienterici e sottomucosi (Figura 12b- b') immunoreattivi alla ChAT.

**Tabella 1.** Effetto della tossina colerica sui livelli di anandamide, 2-arachidonil-glicerolo e sulla palmitoiletanolamina e sull'attività dell'anandamide amidoidrolasi nell'intestino tenue di topo. I risultati sono la media+SEM di n=4 differenti esperimenti fatti in duplicato. \*P<0.01 vs controllo, come determinato mediante l'ANOVA seguito dal test di Bonferroni. N.S., differenza significativa vs il controllo, P>0.05.

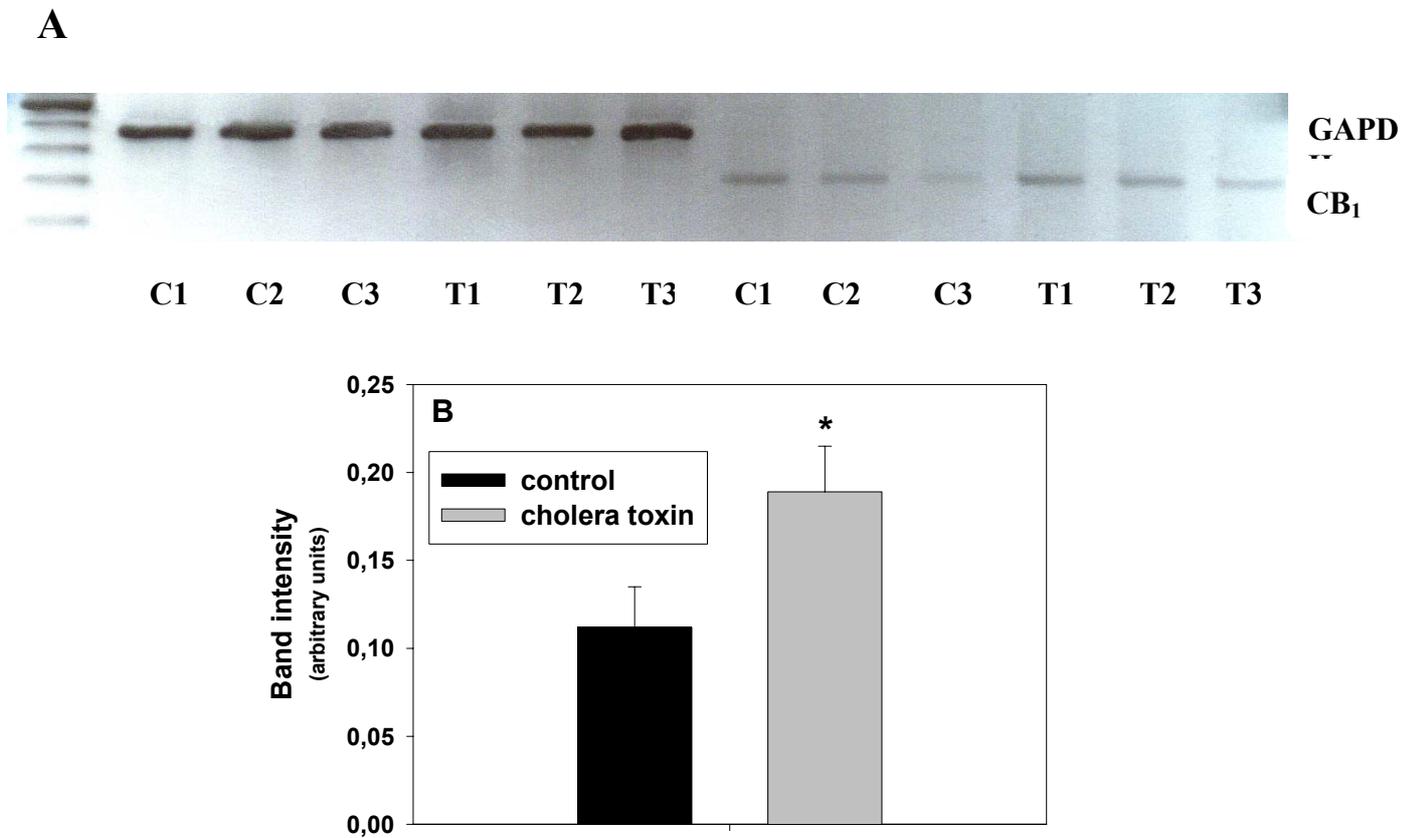
	<b>Controllo</b>	<b>Trattato</b>
<b>Anandamide</b> (pmol/g tessuto)	33.2±7.2	92.8±4.6*
<b>2-Arachidonil-glicerolo</b> (nmol/g tessuto)	46.8±8.2	93.8±32.3 (N.S.)
<b>Palmitoiletanolamina</b> (pmol/g tessuto)	526.0±93.2	458.0±40.0 (N.S.)
<b>Anandamide Amidoidrolasi</b> (pmol/min x mg proteina)	14.6±1.6	16.2±2.0 (N.S.)



**Figura 12.** (a-a') Co-localizzazione dei recettori  $CB_1$  dei cannabinoidi e della ChAT (marker colinergico) nelle fibre nervose del plesso mienterico dei topi di controllo. (b-b'): un'elevata densità recettoriale si può osservare nei neuroni  $CB_1$ /ChAT immunoreattivi del plesso mienterico, del plesso sottomucoso e nelle fibre che innervano la muscolatura circolare dei topi trattati con la tossina colerica. Calibrazione bar: 200 Mp: plesso mienterico; Sp plesso sottomucoso ChAT: colina acetil transferasi.

#### **4.4 Studio dell'espressione dell'mRNA dei recettori CB<sub>1</sub> mediante RT-PCR semiquantitativa**

L'analisi su gel di agarosio dei prodotti della RT-PCR dall'RNA totale dell'intestino di topo ha mostrato una intensa banda corrispondente all'mRNA dei recettori CB<sub>1</sub> (309 bp) e all'mRNA della GAPDH (470 bp) usando i rispettivi primers. Le bande corrispondenti ai trascritti per il recettore CB<sub>1</sub> sono state analizzate mediante densitometria e normalizzate utilizzando le bande corrispondenti ai trascritti della GAPDH. I risultati mostravano bande più intense nei campioni provenienti dai topi trattati con CT rispetto ai controlli (Figura 13). I nostri dati suggeriscono che l'aumento di immunoreattività dei recettori CB<sub>1</sub> osservato nell'intestino tenue dei topi trattati con CT è dovuto ad una maggiore espressione dei recettori CB<sub>1</sub> a livello trascrizionale.



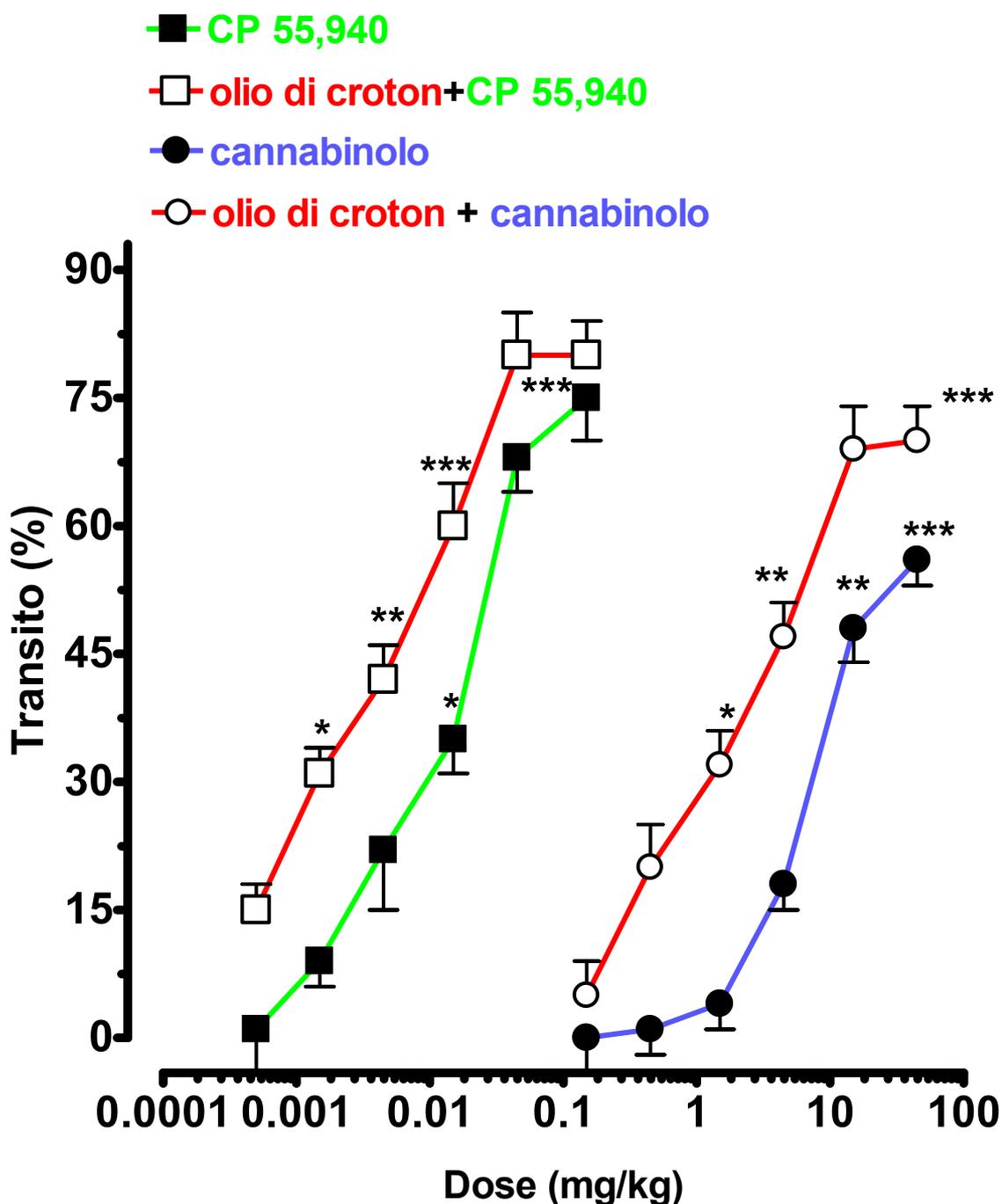
**Figura 13.** A: Analisi su gel di agarosio con la tecnica RT-PCR dell'mRNA totale dell'intestino tenue trattato con il veicolo (C1, C2, C3) o con la tossina colerica (CT) (T1, T2, T3). B: come si osserva dall'analisi densitometrica le bande ottenute dall'RNA dell'intestino tenue dei topi trattati con CT sono più intense rispetto a quelle ottenute con i topi di controllo (media  $\pm$  SEM, n=3, P<0.05).

#### **4.5 Effetto degli agonisti dei recettori dei cannabinoidi sul transito intestinale durante un processo infiammatorio**

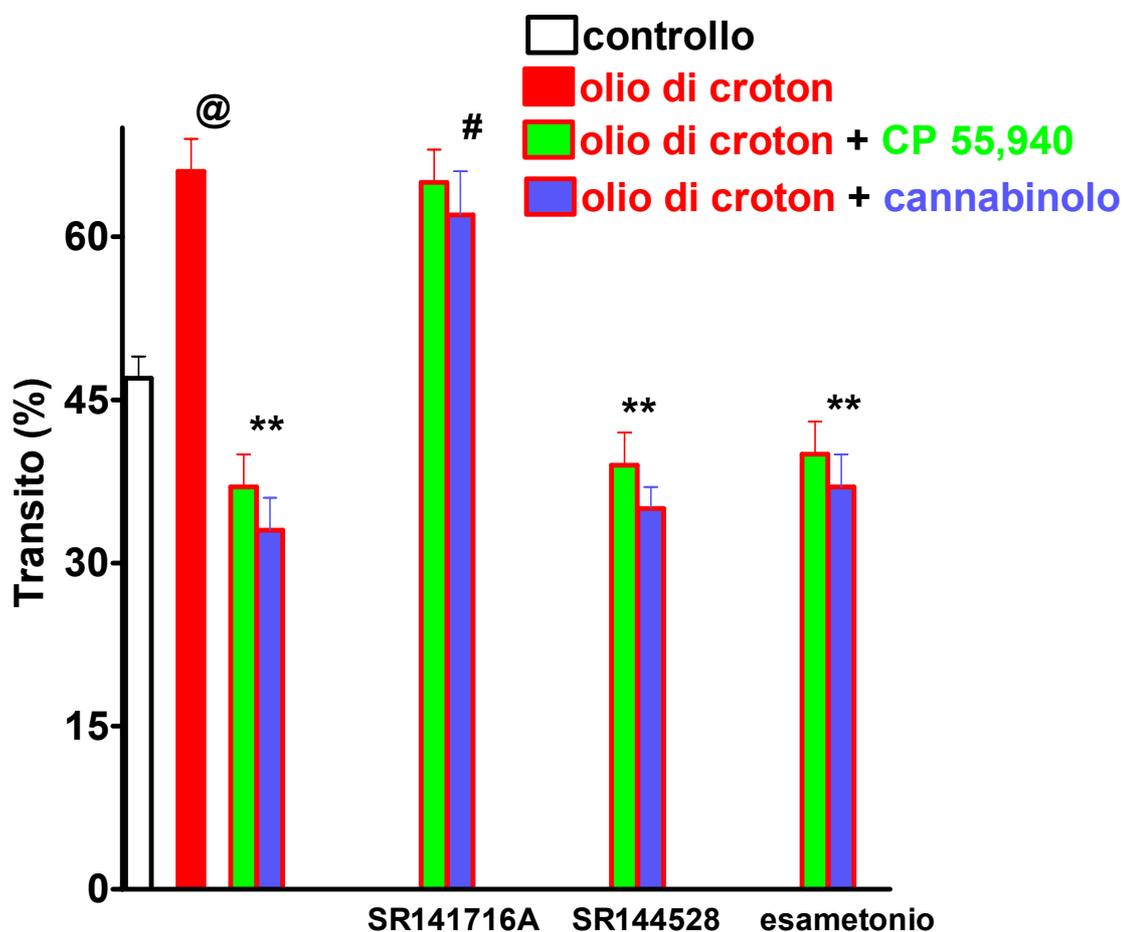
Gli agonisti dei recettori dei cannabinoidi il CP 55,940 e il cannabinoide inibivano in maniera dose-dipendente il transito gastrointestinale sia negli animali di controllo che in quelli in cui con infiammazione intestinale. Come si può osservare dalla Figura 14 in animali con infiammazione intestinale erano richieste dosi inferiori di agonisti per ottenere una inibizione significativa della motilità intestinale.

Il composto SR141716A (0.03 mg/kg, ip), antagonista dei recettori CB<sub>1</sub> ma non il composto SR144528 (1 mg/kg, ip) antagonista dei recettori CB<sub>2</sub> annullava l'effetto inibitorio del CP 55,940 e del cannabinoide nei topi trattati con olio di croton (Figura 15).

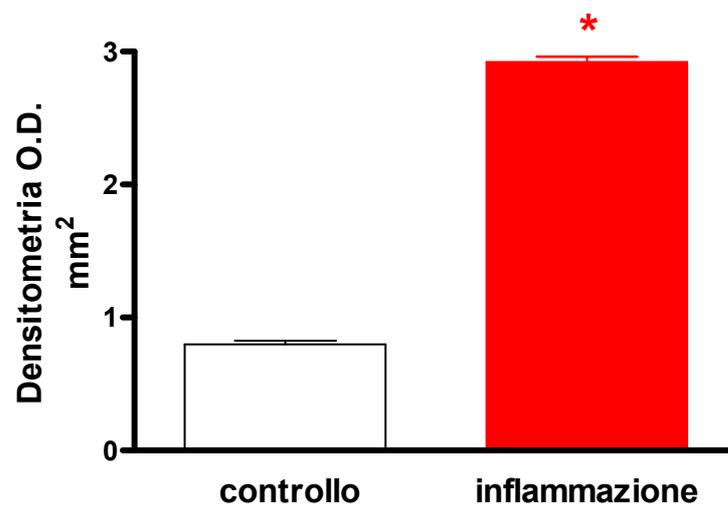
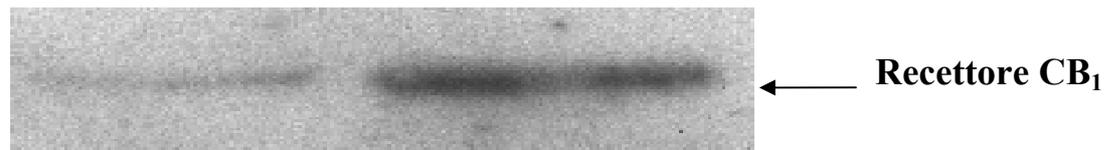
L'esametonio (1 mg/kg, ip) non modificava significativamente l'effetto di entrambi gli agonisti iniettati ip nei topi trattati con olio di croton (Figura 15) e somministrato da solo non modificava il transito gastrointestinale ( $12 \pm 6\%$  di incremento,  $n=10$ ,  $P>2$ ). Inoltre l'analisi densitometrica delle bande immunoreattive mostrava un significativo incremento ( $P<0.01$ ) dell'espressione dei recettori CB<sub>1</sub> nell'intestino infiammato rispetto a quello dei topi di controllo (Figura 16).



**Figura 14.** . Effetto del CP 55,940 (0.0003-0.1 mg/kg, ip) e del cannabidiolo (0.1-30 mg/kg, ip) sul transito intestinale sia negli animali di controllo che durante un processo infiammatorio. Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  SEM di 10-12 animali, \*P<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.0001 vs controllo



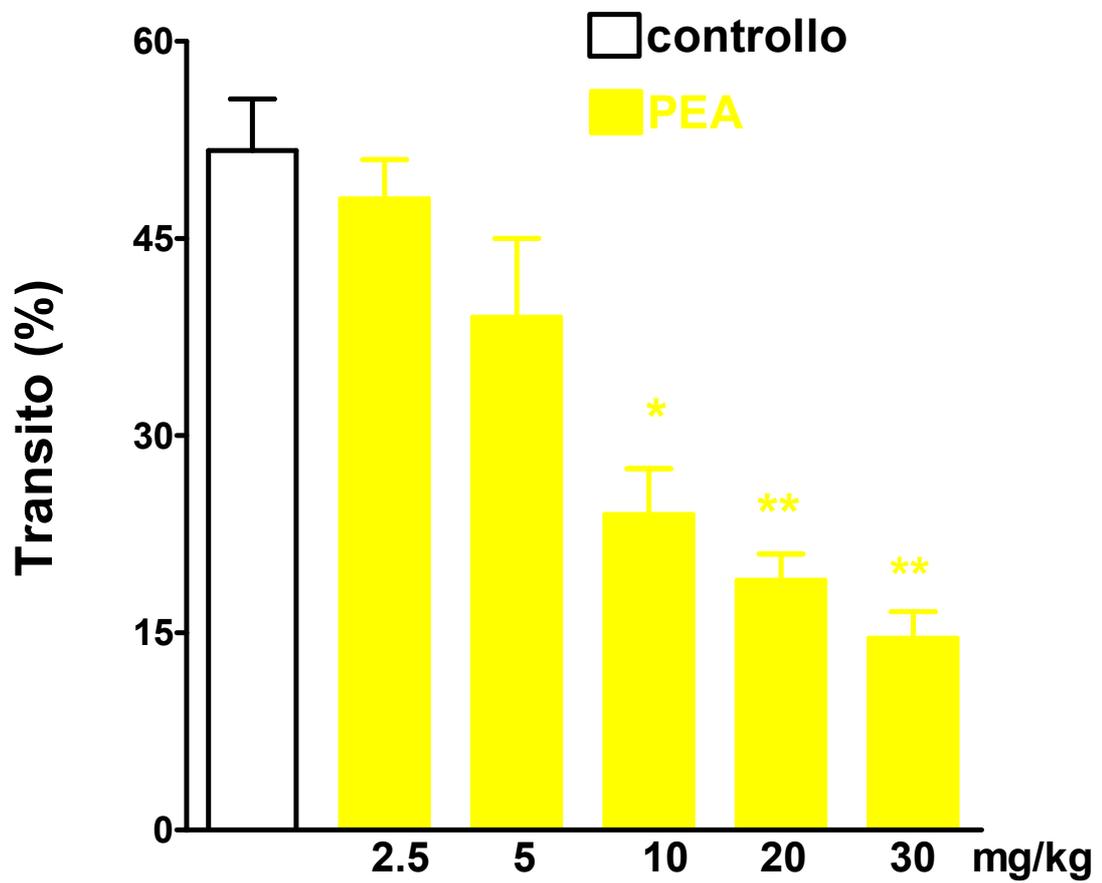
**Figura 15.** Effetto del CP 55,940 (3  $\mu$ g/kg, ip) e del cannabino (1.25 mg/kg) somministrati da soli o in presenza dell'antagonista dei recettori CB<sub>1</sub> SR141716A (SR1, 0.3 mg/kg, ip), dell'antagonista dei recettori CB<sub>2</sub> SR144528 (SR2, 1 mg/kg, ip) o dell'antagonista dei recettori nicotinici a livello gangliare esametonio (1 mg/kg, ip) durante un processo infiammatorio sul transito intestinale. Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  SEM di 10-12 animali, <sup>@</sup>P<0.05 vs controllo, <sup>\*\*</sup>P<0.001 olio di croton, <sup>#</sup>P<0.01 vs CP 55,940 (o cannabino).



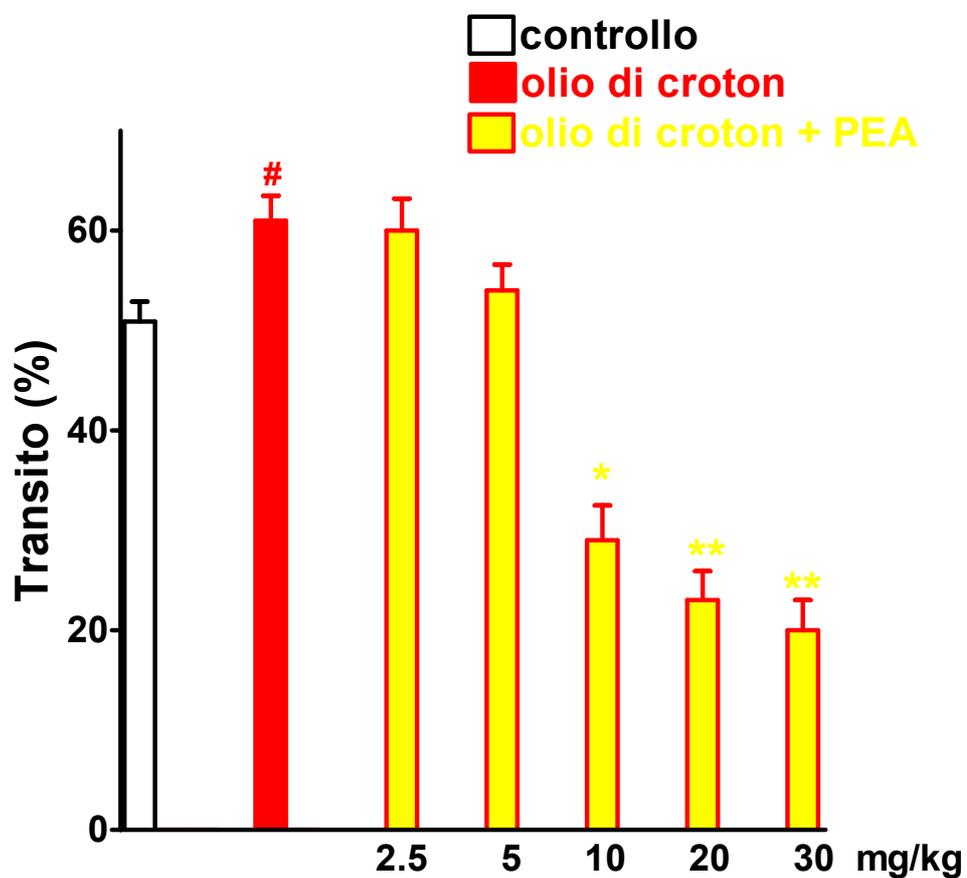
**Figura 16.** Western blot mostrante l'aumento dell'espressione dei recettori CB<sub>1</sub> nell'intestino sia negli animali di controllo che in quelli trattati con olio di croton. I risultati sono la media di n= 3 esperimenti

#### **4.6 Effetto della palmitoiletanolamide nel controllo della motilità intestinale in animali in condizioni fisiopatologiche**

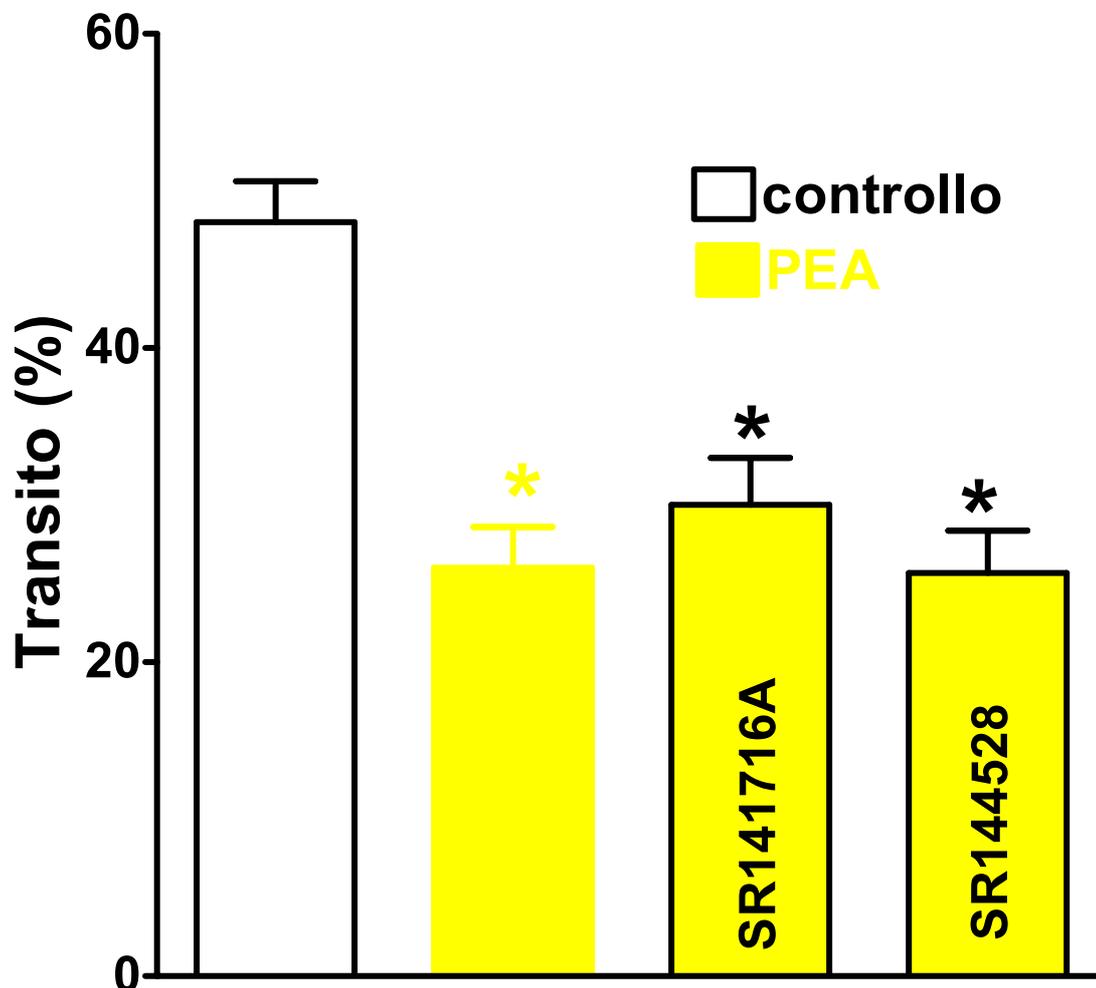
L'effetto della PEA (2.5-30 mg/kg, ip), sul transito intestinale è mostrato in figura 17. La PEA era in grado di inibire in maniera dose-dipendente e significativamente ( $P < 0.05$ ) il transito intestinale. Questo effetto, evidente sia nel gruppo degli animali di controllo ( $ED_{50}$  PEA:  $7.25 \pm 0.85$  mg kg<sup>-1</sup>) che in quello degli animali con infiammazione intestinale (Figura 18), non veniva modificato da un pretrattamento degli animali con i composti SR141716A (0.3 mg/kg) e SR144528 (1 mg/kg), antagonisti rispettivamente dei recettori CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> (Figure 19 e 20).



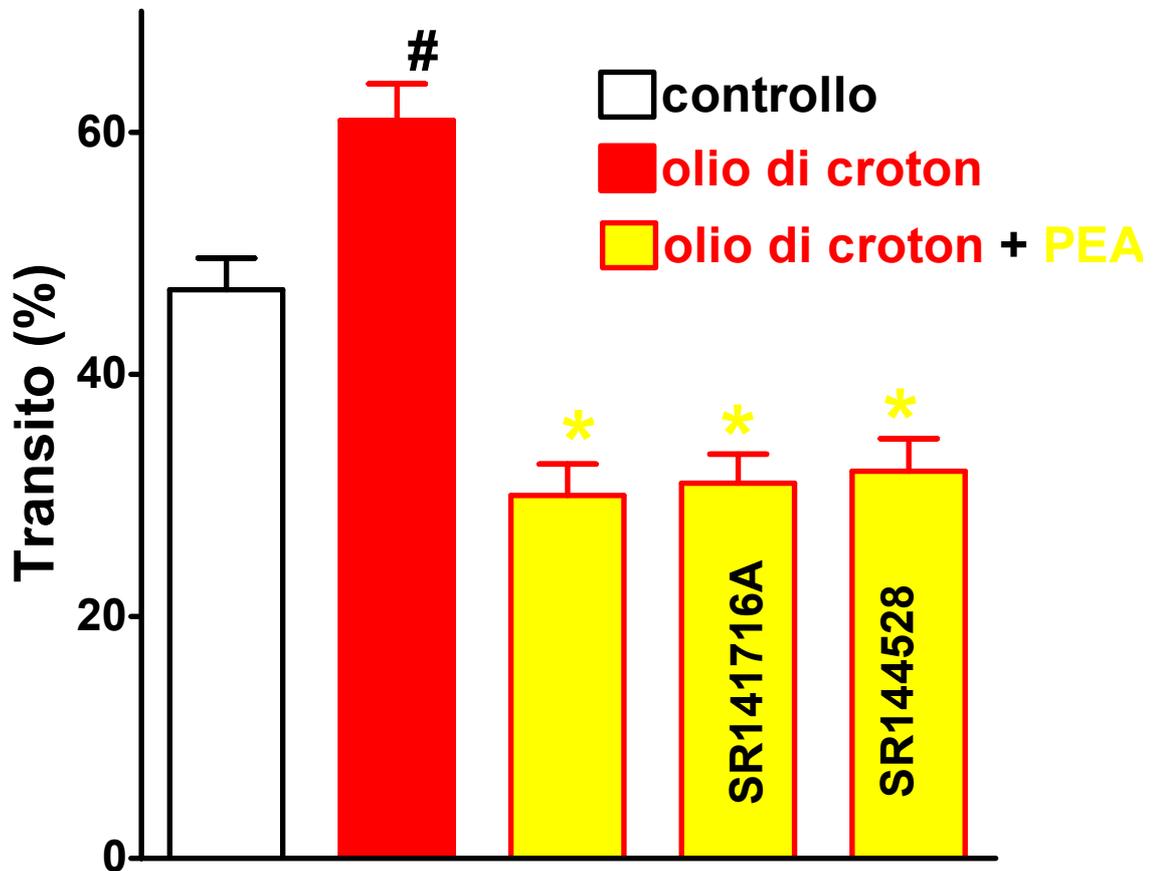
**Figura 17.** Effetto della palmitoiletanolamide (PEA) sul transito intestinale. Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  SEM di 10-12 animali, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs controllo.



**Figura 18.** Effetto della palmitoiletanolamide (PEA, ip) sul transito intestinale durante un processo infiammatorio. Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  SEM di 10-12 animali, #P<0.05 vs controllo; \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs olio di croton.



**Figura 19.** Effetto della palmitoiletanolamide (PEA, 10 mg/kg, ip) somministrata da sola o in presenza dell'antagonista dei recettori CB<sub>1</sub> SR141716A (SR1, 0.3 mg/kg, ip) e dell'antagonista dei recettori CB<sub>2</sub> SR144528 (SR2, 1 mg/kg, ip) sul transito intestinale. Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  SEM di 10-12 animali, \*P<0.05 vs controllo.

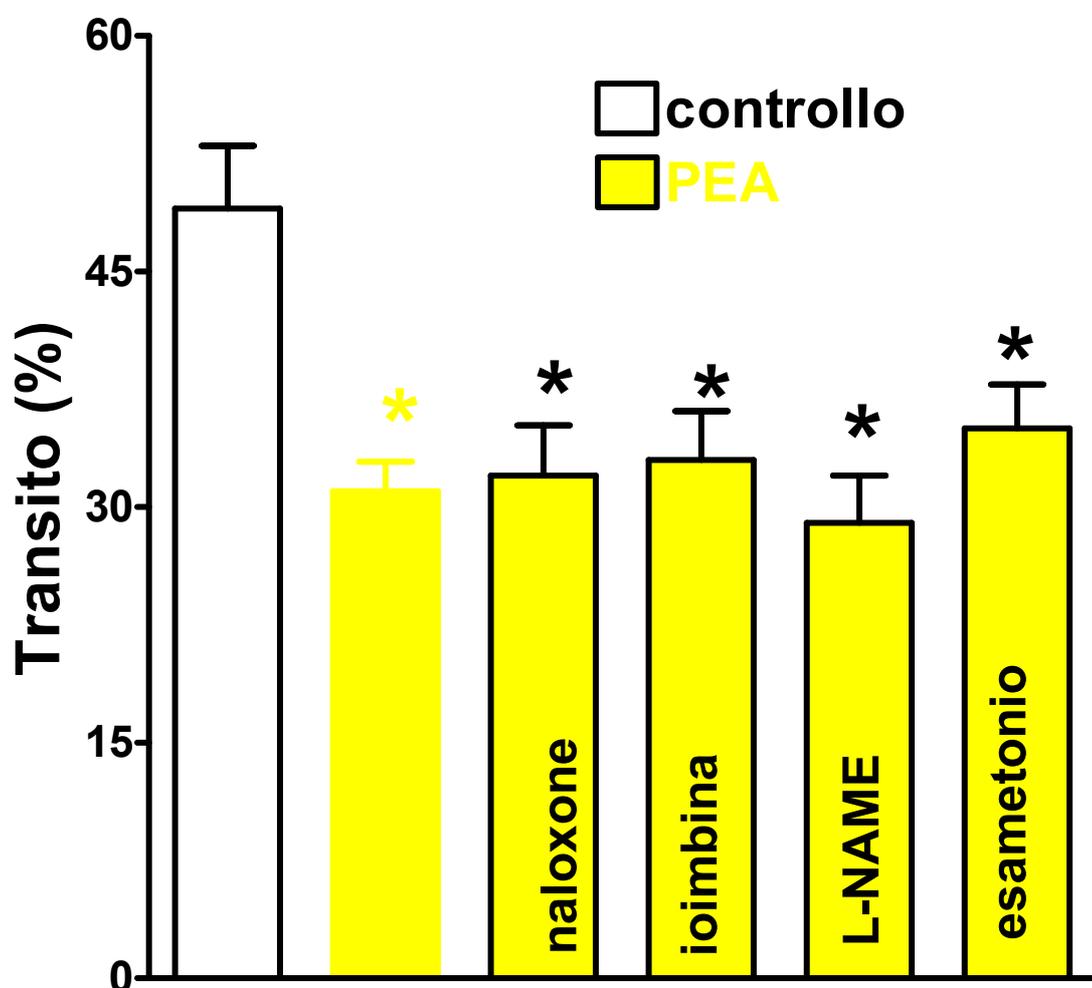


**Figura 20.** Effetto della palmitoiletanolamide (PEA, 10 mg/kg, ip) somministrata da sola o in presenza dell'antagonista dei recettori CB<sub>1</sub> SR141716A (SR1, 0.3 mg/kg, ip) e dell'antagonista dei recettori CB<sub>2</sub> SR144528 (SR2, 1 mg/kg, ip) durante un processo infiammatorio sul transito intestinale. Ogni punto rappresenta la media ± SEM di 10-12 animali, \*P<0.05 vs controllo.

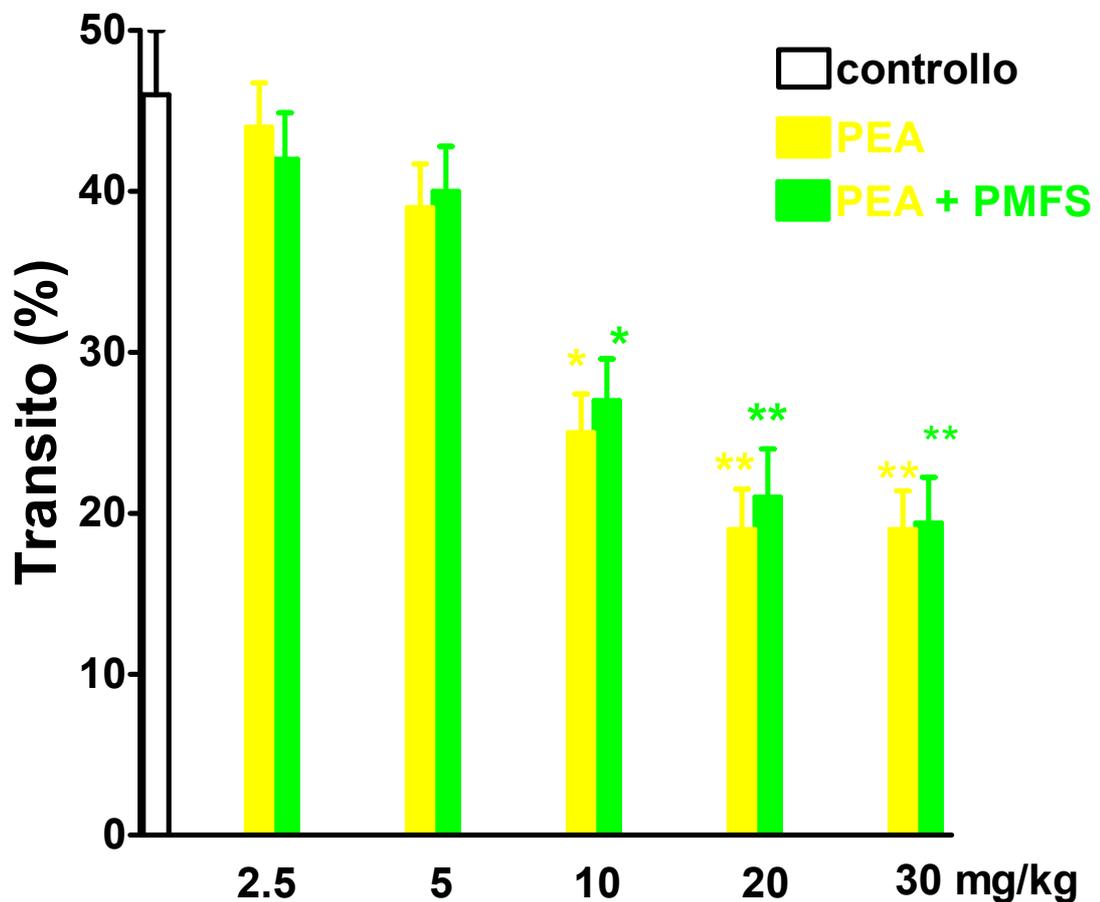
Così pure l'effetto inibitorio della PEA non veniva modificato da un pretrattamento degli animali con L-NAME (25 mg/kg), iombina (1 mg/kg), naloxone (2 mg/kg), esametonio (1 mg/kg) e PMSF (30 mg/kg) (figure 21, 22, e 23).

I composti SR141716A e SR144528, L-NAME, iombina, naloxone, esametonio e PMSF somministrati da soli alle stesse dosi non modificavano il transito del carbone vegetale sia negli animali di controllo sia in quelli a cui era stato indotto uno stato di flogosi (dati non mostrati).

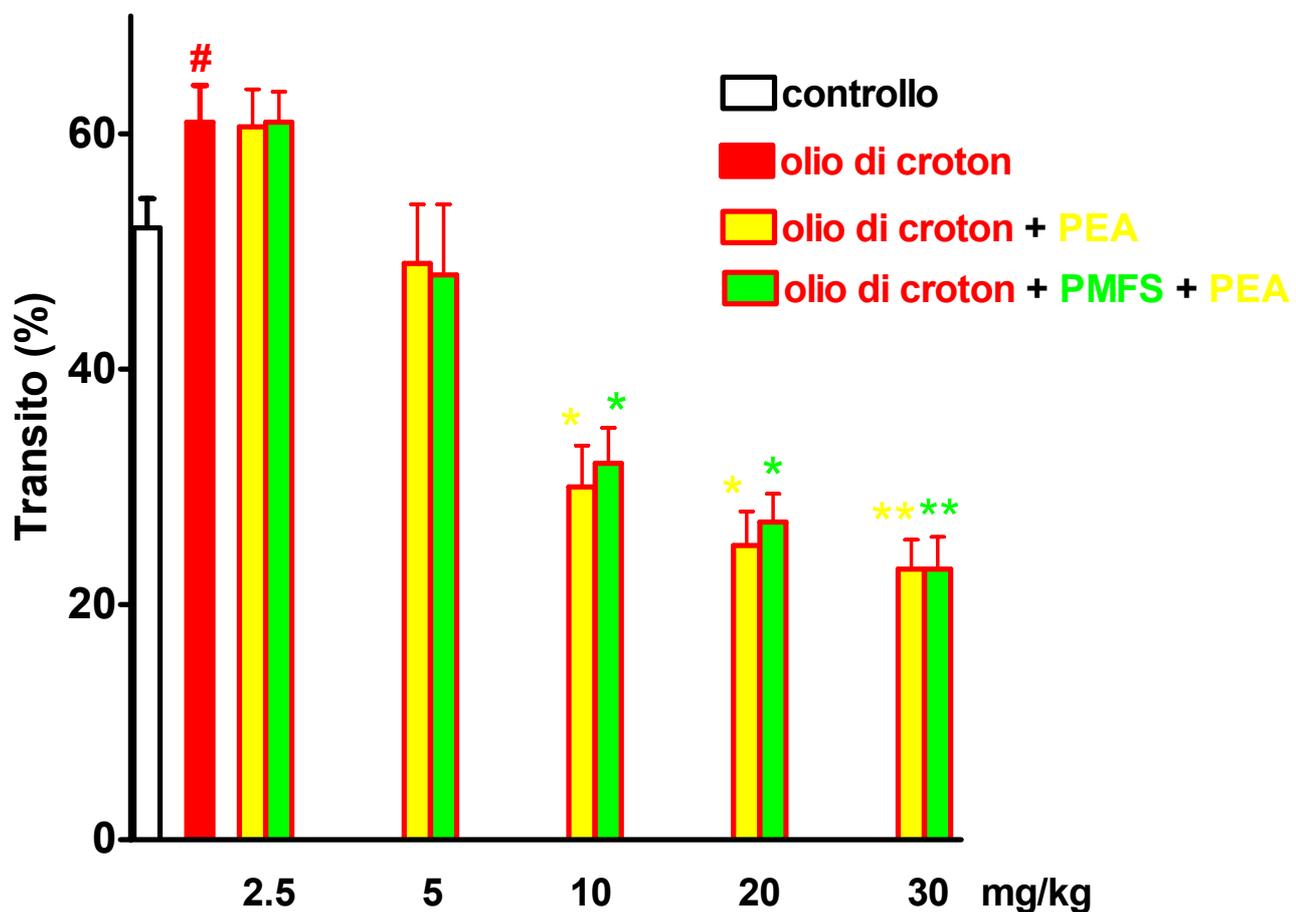
L'etanolo o il DMSO, usati come veicoli dei farmaci in studio, non mostravano possedere alle concentrazioni utilizzate nessun effetto sulla motilità intestinale (dati non mostrati).



**Figura 21.** Effetto della palmitoiletanolamide (PEA, 10 mg/kg, ip) somministrata da sola o in presenza dell'antagonista dei recettori degli oppioidi naloxone (2 mg/kg, ip), dell'antagonista dei recettori  $\alpha$ -adrenergici ioimbina (1 mg/kg, ip), dell'antagonista dei recettori nicotinici a livello gangliare esametonio (1 mg/kg, ip) e dell' inibitore della sintesi del monossido d'azoto L-NAME (25 mg/kg, ip) sul transito intestinale. Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  SEM di 8-10 animali, \* $P < 0.05$  vs controllo.



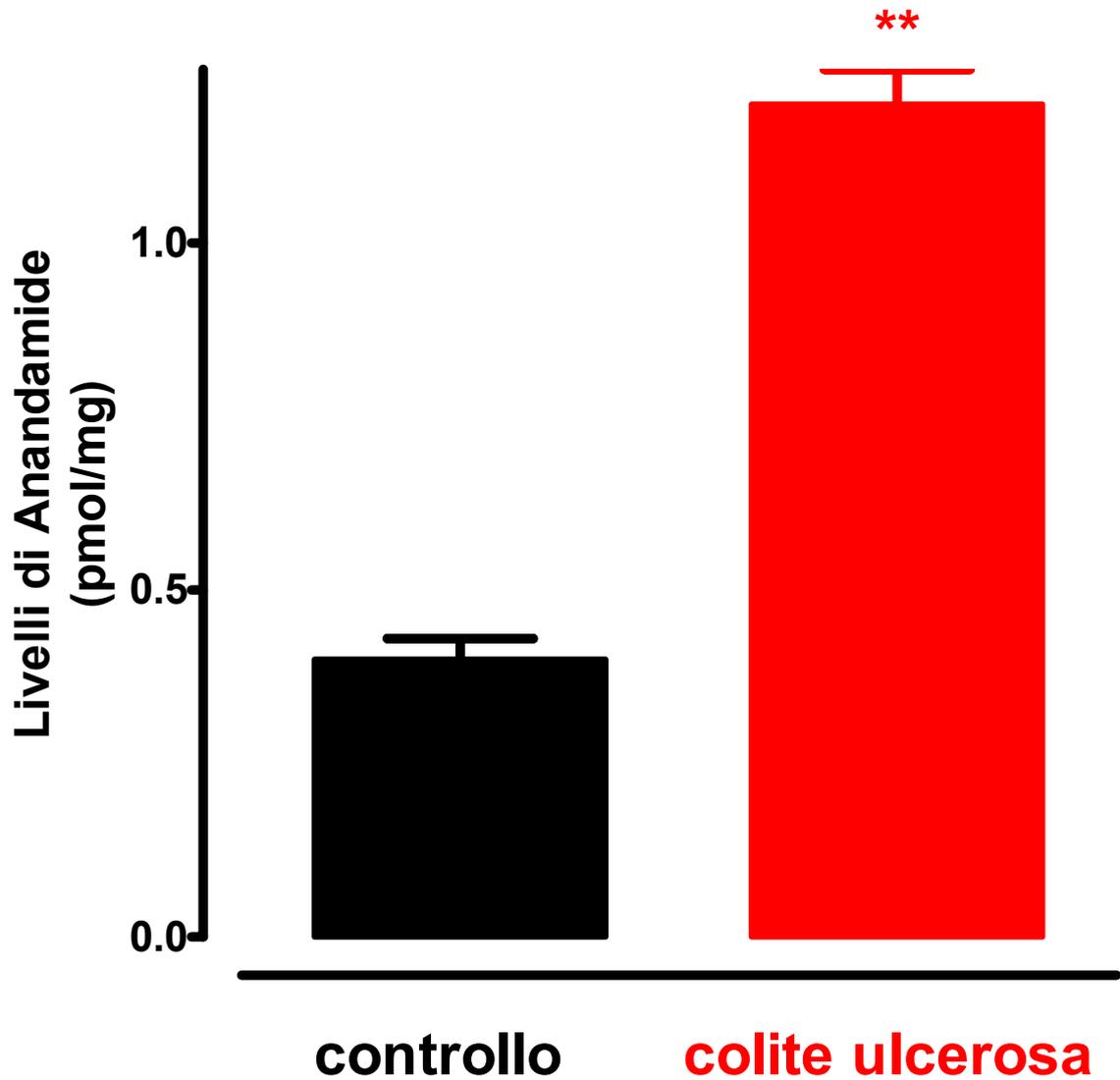
**Figura 22.** Effetto della palmitoiletanolamide (PEA, 10 mg/kg, ip) somministrata da sola o in presenza di un inibitore specifico dell'anandamide idrolasi (PMFS 30 mg/kg, ip) sul transito intestinale. Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  SEM di 6-8 animali, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs controllo.



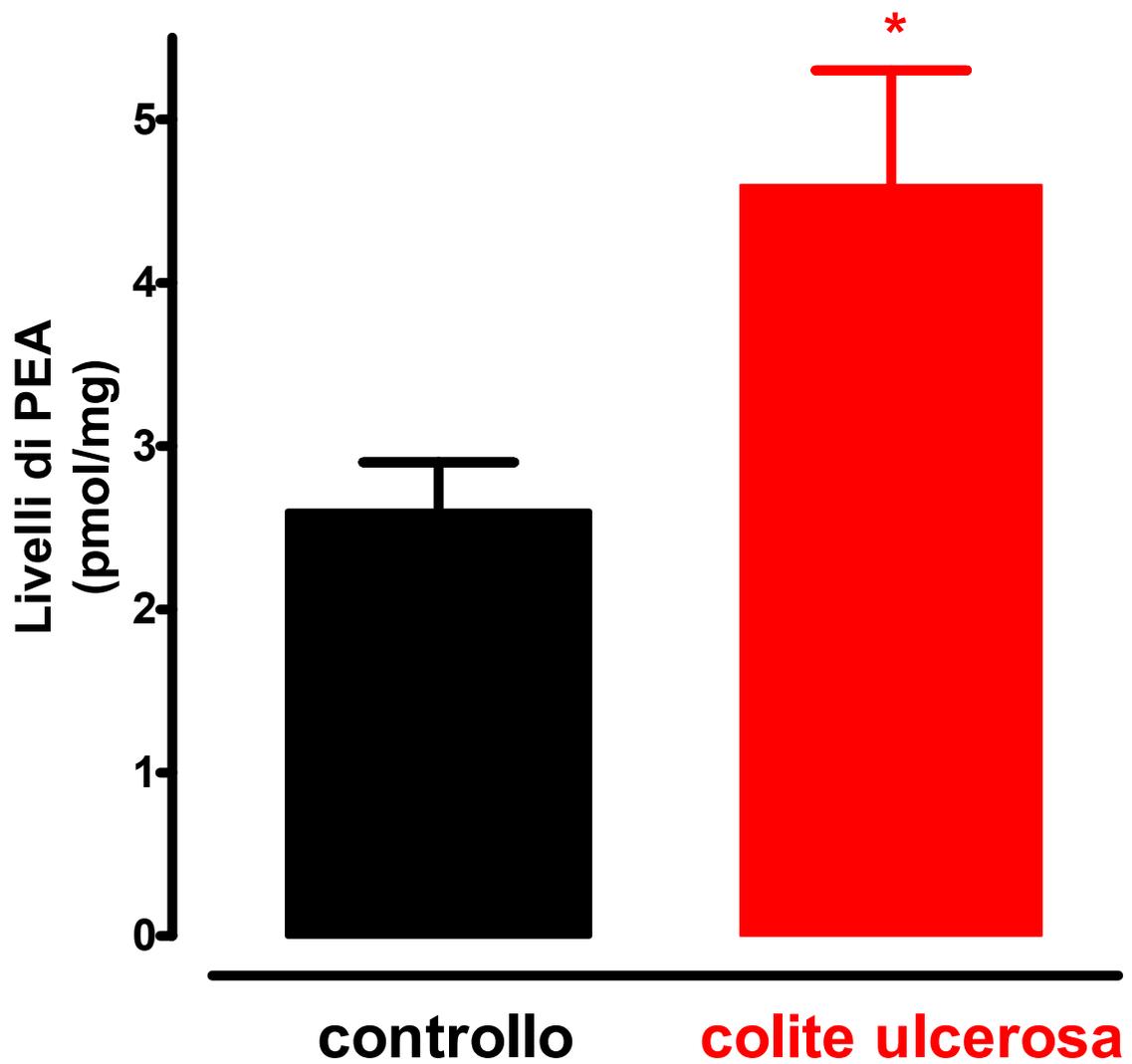
**Figura 23.** Effetto della palmitoiletanolamide (PEA, 10 mg/kg, ip) somministrata da sola o in presenza di un inibitore specifico dell'anandamide idrolasi (PMFS 30 mg/kg, ip) sul transito intestinale durante un processo infiammatorio. Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  SEM di 6-8 animali, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs controllo.

#### **4.7 Livelli dell' anandamide e della palmitoiletanolamide in pazienti affetti da colite ulcerosa**

In figura 24 e 25 sono riportati i livelli di anandamide e di PEA contenuti sia nel colon di pazienti di controllo sia in pazienti con colite ulcerosa. Come si può osservare il contenuto di anandamide e di PEA è sensibilmente e significativamente aumentato nel colon proveniente da pazienti affetti di colite ulcerosa.



**Figura 24.** Livelli di anandamide nel colon sia di pazienti di controllo che affetti da colite ulcerosa. Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  SEM di 6-8 pazienti, \* $P < 0.05$  vs controllo.



**Figura 25.** Livelli di palmitoiletanolamide (PEA) nel colon sia di pazienti di controllo che affetti da colite ulcerosa. Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  SEM di 6-8 pazienti, \* $P < 0.05$  vs controllo.

## **5.0 DISCUSSIONE**

### **Effetto degli agosti dei cannabinoidi sulla diarrea indotta da tossina colerica**

Studi precedenti hanno mostrato che l'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub> provoca una riduzione della motilità esofagea (Lehman e coll., 2002) e gastrointestinale (Izzo e coll., 2001a; Pertwee, 2001; Pinto e coll., 2002a) sia nel tessuto umano (Croci e coll., 1998; Manara e coll., 2002) che in un modello sperimentale di diarrea nel topo (Izzo e coll., 2000b). Nei nostri esperimenti abbiamo dimostrato che l'agonista non selettivo CP55,940 e l'agonista selettivo dei recettori CB<sub>1</sub>, ACEA, riducevano la secrezione intestinale stimolata da CT nell'intestino tenue di topo.

L'effetto antidiarroico degli agonisti dei cannabinoidi è probabilmente mediato dai recettori CB<sub>1</sub> in quanto: 1) l'effetto del CP55,940 e dell'ACEA era annullato dall'SR141716A, un antagonista dei recettori CB<sub>1</sub>; 2) l'SR144528 un antagonista dei recettori CB<sub>2</sub>, non modificava l'effetto antisecretorio del CP55,940; 3) l'ACEA, un agonista selettivo dei recettori CB<sub>1</sub>, riduceva la secrezione intestinale stimolata dalla CT; 4) il JWH-015 un agonista dei recettori CB<sub>2</sub>, risultava inattivo.

L'effetto antisecretorio degli agonisti dei cannabinoidi, somministrati per via sistemica (intraperitoneale), coinvolge probabilmente meccanismi periferici in quanto l'effetto del CP55,940 e dell'ACEA non era modificato dal bloccante gangliare clorisondamina.

I nostri risultati *in vivo*, confermano gli studi di Tyler e collaboratori (2000) che avevano dimostrato che l'agonista dei recettori dei cannabinoidi WIN 55,212-2 inibiva (mediante l'attivazione di recettori CB<sub>1</sub>) la secrezione intestinale *in vitro*.

Un altro dato importante emerso dal nostro studio è rappresentato dal fatto che la secrezione indotta dalla CT era associata ad un significativo incremento dei livelli di anandamide (ma non di 2-AG e PEA) nell'intestino tenue di topi trattati rispetto ai controlli. Non si osservavano però significative differenze tra i topi di controllo e quelli trattati con CT nell'attività dell'anandamide amidoidrolasi, l'enzima responsabile della degradazione fisiologica dell'anandamide, la cui presenza nell'intestino di topo (Izzo e coll., 2001a; Mascolo e coll., 2002; Pinto e coll., 2002b) e di ratto (Katayama e coll., 1997) è stata già precedentemente dimostrata.

Questi risultati suggeriscono che l'incremento dei livelli di anandamide riscontrati nell'intestino dei topi trattati con CT non era causato da una riduzione della sua degradazione metabolica.

La CT esplica la sua azione secretoria attraverso l'attivazione di riflessi nervosi secretori nel sistema nervoso enterico che coinvolgono i neuroni colinergici enterici (Lundgren e Jodal, 1997). Numerosi studi di immunostochimica hanno evidenziato la presenza dei recettori CB<sub>1</sub> sui neuroni enterici di varie specie animali, incluso topi, ratti, cavie e maiali (Kulkarni-Narla e Brown 2000; van Sickle e coll., 2001; Kulkarni-Narla e

Brown, 2001; Adami e coll., 2002; Coutts e coll., 2002; Mascolo e coll., 2002; Pinto e coll., 2002b). In questo studio i recettori CB<sub>1</sub> sono stati localizzati sui neuroni enterici e sulle fibre nervose che risultavano immunoreattive anche alla ChAT (un marker colinergico); questi dati sono in accordo con esperimenti funzionali che hanno evidenziato la capacità degli agonisti dei recettori dei cannabinoidi di ridurre (attraverso l'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub>) il rilascio di acetilcolina dai neuroni enterici (Coutts e Pertwee, 1997).

Ulteriori esperimenti hanno mostrato che l'ipersecrezione intestinale indotta da CT è caratterizzata da un aumento dell'espressione dell'mRNA per i recettori CB<sub>1</sub>. Questi dati, insieme all'incremento dei livelli di anandamide nell'intestino tenue di animali trattati con CT, suggeriscono che l'attività degli endocannabinoidi, mediata dai recettori CB<sub>1</sub>, è aumentata, verosimilmente, per contrastare l'ipersecrezione intestinale indotta da CT.

Allo scopo di confermare tale ipotesi, sono stati eseguiti una serie di esperimenti funzionali sulla secrezione intestinale valutando l'effetto degli antagonisti dei recettori dei cannabinoidi. I nostri risultati hanno mostrato un aumento della secrezione intestinale in seguito alla somministrazione dell'SR141716A, un antagonista dei recettori CB<sub>1</sub>, nei topi trattati con CT ma non nei topi di controllo.

Esperimenti condotti con un'altra specie (ratto) e con differenti dosi e tempi di somministrazione hanno evidenziato che l'SR141716A determinava un accumulo basale di fluido intraluminale (Izzo e coll., 1999b).

Precedenti osservazioni hanno suggerito che l'anandamide attiva i recettori VR1 dei vanilloidi (Zygmund e coll., 1999) e che recettori VR1 immunoreattivi sono presenti nell'intestino dei roditori (Anavi-Goffer e coll., 2002). Tuttavia è improbabile che l'anandamide endogena o un altro endovanilloide eserciti il suo effetto antisecretorio attraverso tale recettore in quanto la capsazepina, un antagonista dei recettori VR1 (fino a dosi di 30 mg/kg), non modificava la secrezione intestinale indotta dalla CT. Altri ricercatori hanno recentemente riportato che la somministrazione intraluminale di anandamide causa un'inflammatione simile a quella causata dalla tossina A del *Clostridium difficile* nell'ileo di ratto e che quest'effetto è significativamente inibito dalla capsazepina. (McVey e coll., 2003).

Infine abbiamo dimostrato come una modulazione farmacologica dei livelli di anandamide con un inibitore della sua inattivazione possa ridurre l'effetto sulla secrezione intestinale della CT.

Infatti, studi condotti utilizzando il composto VDM11 hanno mostrato un'inibizione della secrezione intestinale indotta da CT fornendo un'ulteriore evidenza sul ruolo funzionale del trasporto dell'anandamide e

sul ruolo protettivo (antisecretorio) dell'anandamide endogena nella patologia indotta da CT. Inoltre poiché l'effetto del VDM11 era antagonizzato da una dose sub-massimale di SR141716A si può ipotizzare un aumento dei livelli degli endocannabinoidi e quindi un'indiretta attivazione dei recettori CB<sub>1</sub>.

### **Effetto degli agonisti dei cannabinoidi sulla motilità intestinale in condizioni patologiche**

L'effetto degli agonisti dei cannabinoidi è stato poi approfondito in un modello di infiammazione cronica indotta da olio di croton. In questo modello sperimentale sono stati valutati l'espressione dei recettori CB<sub>1</sub>, i livelli intestinali di endocannabinoidi e l'attività dell'enzima anandamide idrolasi.

Durante il processo infiammatorio non sono state osservate variazioni nei livelli di endocannabinoidi mentre risultavano aumentati i livelli dell'enzima anandamide idrolasi. Tali risultati indicano, pertanto, un probabile aumento del turnover (sintesi e degradazione) degli endocannabinoidi durante un processo infiammatorio intestinale

Inoltre è stato da noi dimostrato che questo modello intestinale di infiammazione era associato ad un aumento dei recettori intestinali CB<sub>1</sub> (analisi effettuata mediante Western Blot). In accordo con questi risultati gli agonisti dei recettori dei cannabinoidi riducevano la motilità intestinale

a dosi minori di quelle che occorre per produrre un uguale effetto in animali di controllo.

Dati ottenuti con il bloccante gangliare esametonio e con il composto SR141716A, hanno altresì confermato che l'effetto inibitorio sul transito gastrointestinale coinvolgeva i recettori CB<sub>1</sub> periferici.

Questi risultati appaiono interessanti alla luce di un possibile utilizzo clinico dei cannabinoidi nei disordini della motilità intestinale associati a patologie croniche intestinali, quali per esempio il morbo di Crohn.

### **Effetto della PEA sulla motilità intestinale in condizioni fisiopatologiche**

L'anandamide, come altri agonisti cannabinoidi, naturali e sintetici, attivando i recettori CB<sub>1</sub> a livello enterico, è in grado di ridurre la motilità intestinale sia *in vitro* (Pertwee e coll., 1995; Izzo e coll., 1998a) che *in vivo* (Fride, 1995; Calignano e coll., 1997; Izzo e coll., 2001b). Nel presente studio abbiamo dimostrato che l'antagonista selettivo del recettore CB<sub>1</sub>, il composto SR141716A, non modificava quello della PEA e questo sia negli esperimenti in cui erano utilizzati animali di controllo sia in quelli in cui erano utilizzati animali ai quali era stata indotta una flogosi intestinale. In letteratura è riportato che alcuni effetti della PEA possono essere antagonizzati da un antagonista selettivo del recettore CB<sub>2</sub>, il composto SR144528 (Facci e coll., 1995; Calignano e coll., 1998). Al

contrario dei risultati ottenuti da questi Autori nei nostri studi non si sono mai osservati gli stessi risultati. Questo fatto non ci sorprende in quanto i substrati biologici utilizzati sono diversi tra loro.

I risultati dei nostri studi indicano quindi che l'effetto della PEA sulla motilità intestinale, in condizioni fisiopatologiche, non è mediato né dall'attivazione dei recettori dei cannabinoidi (così come dimostrato dai risultati ottenuti in animali pretrattati con i composti SR141716A ed SR144528) né dall'attivazione di altri sistemi recettoriali come per esempio quello degli oppioidi, alfa-adrenergico, colinergico gangliare e quello enzimatico della monossido d'azoto sintasi (così come dimostrato dai risultati ottenuti in animali pretrattati con naloxone, ioimbina, esametonio ed L-NAME). Altri studi hanno mostrato che la PEA inibiva la produzione di NO nei macrofagi del topo e che questo effetto non sembrava essere mediato dai recettori dei cannabinoidi (Ross e coll., 2000).

Il PMSF è un inibitore aspecifico dell'anandamide idrolasi. Ricerche precedenti hanno mostrato che il PMSF aumenta l'attività dell'anandamide (Wiley e coll., 2000; Lambert & Di Marzo, 1999), e quindi la sua capacità di ridurre la motilità intestinale (Pertwee e coll., 1995). Nei nostri studi, il PMSF utilizzato a dosi in grado di potenziare l'attività dell'anandamide (Wiley e coll., 2000), non modificava l'effetto inibitorio della PEA sulla motilità intestinale.

L'inefficacia del PMSF non ci sorprende visto che la PEA non viene idrolizzata dall'anandamide idrolasi così come avviene invece per l'anandamide (Lambert & Di Marzo, 1999), ma da un tipo diverso di amidasi insensibile al PMSF (Ueda e coll., 1999).

### **Determinazione dei livelli di anandamide e di PEA in paziente affetti da colite ulcerosa**

I mastociti che sono coinvolti nella colite ulcerosa (Winterkamp e coll., 2002; Kim e coll., 2003), producono un elevato aumento dei livelli di PEA (Bisogno e coll., 1997) che inibisce la motilità intestinale, come descritto precedentemente ciò suggerisce suggerendo che questo mediatore svolge una azione protettiva nelle infiammazioni del tratto gastrointestinale.

Il blocco dei recettori dei vanilloidi TRPV1 localizzati sui neuroni enterici (Ward e coll., 2003; Coutts, 2004), uno dei target molecolari della PEA, è stato proposto come possibile strategia terapeutica per trattare le infiammazioni del tratto gastrointestinale (Kihara e coll., 2003; Geppetti e Trevisani, 2004).

I recettori CB<sub>1</sub> sono presenti sia sui neuroni colinergici autonomi che su quelli sensoriali e sono ampiamente co-localizzati con quelli dei recettori TRPV1 (Kulkarni-Narla e Brown, 2001; Coutts, 2004) ed anche sulle cellule epiteliali e della mucosa (Ligresti e coll., 2003). Infine gli elevati livelli di PEA nei pazienti con colite ulcerosa, confermano l'ipotesi che la

PEA sia coinvolta nel controllo della motilità intestinale durante condizioni neuroinfiammatorie; inoltre abbiamo osservato che gli elevati livelli di anandamide erano significativamente elevati, facendo ipotizzare che l'azione della PEA in queste condizioni è potenziata dall'azione dell'anandamide sui recettori CB<sub>1</sub> e TRPV1, come suggerito precedentemente studi condotti *in vitro* (Di Marzo e coll., 2001; De Petrocellis e coll., 2001).

## 6.0 CONCLUSIONI

Le conoscenze aneddotiche degli effetti terapeutici attribuiti tradizionalmente alla canape possono essere oggi verificate alla luce delle conoscenze sui meccanismi biologici coinvolti nell'azione dei cannabinoidi. Le attuali evidenze sostengono l'ipotesi che il sistema cannabinoide endogeno possa costituire la chiave per interpretare nuove applicazioni terapeutiche anche in alcune patologie dell'apparato digerente.

I nostri risultati supportano l'ipotesi che l'endocannabinoide anandamide eserciti un ruolo protettivo sull'accumulo di fluido indotto dalla CT mediante attivazione dei recettori CB<sub>1</sub> dei cannabinoidi iper espressi sui neuroni colinergici enterici, inoltre gli agonisti dei cannabinoidi riducono la motilità intestinale durante un flogosi mediante l'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub> dei cannabinoidi mentre l'effetto inibente della PEA non è dovuto all'attivazione di essi. Inoltre gli elevati livelli di PEA nei pazienti con colite ulcerosa ci fanno intendere che la PEA endogena svolge un ruolo protettivo in tale patologia. Dal punto di vista clinico questi risultati indicano che due possibili strategie potrebbero essere seguite per ottenere nuovi farmaci cannabinoideici capaci di bloccare la diarrea e l'iperomotilità intestinale in condizioni patologiche e privi dei caratteristici effetti collaterali psicotropici (euforia, alterazione della percezione spaziotemporale ecc.) e cardiovascolari (ipotensione). La prima è quella di disporre di agonisti selettivi dei recettori CB<sub>1</sub> sul modello dell'agonista

oppioide loperamide, che abbiano la minima capacità di attraversare la barriera emato-encefalica ed agire quindi sui recettori CB<sub>1</sub> dei cannabinoidi localizzati a livello enterico; la seconda strategia sarà quella di usare inibitori dell'inattivazione degli endocannabinoidi [in maniera simile all'inibitore dell'encefalinasasi acetorfano (Guandalini, 2002)] che mediante un incremento locale dei livelli di anandamide (patologico) possono avere un'elevata selettività farmacologica allo stesso modo dei farmaci che agiscono direttamente sui recettori CB<sub>1</sub> dei cannabinoidi.

## 7.0 BIBLIOGRAFIA

ADAMI M., FRATI P., BESTINI S., KULKARNI-NARLA A., BROWN D.R., DE CARO G., CORUZZI G., SOLDANI G., (2002). Gastric antisecretory role and immunohistochemical localization of cannabinoid receptors in the rat stomach. *Br. J. Pharmacol.*, 135: 1598-1606.

ADAMS I.B., TYAN W., SINGER M., THOMAS B.F., COMPTON D.R., RAZDAN R.D., MARTIN B.R., (1995). Evaluation of cannabinoid receptor binding and in vivo activities for anandamide analogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 273: 1172-1181.

ANAVI-GOFFER S., MCKAY N.G., ASHFORD M.L., COUTTS A.A., (2002). Vanilloid receptor type 1-immunoreactivity is expressed by intrinsic afferent neurones in the guinea-pig myenteric plexus. *Neurosci. Lett.*, 319: 53-57.

BACHUR N.R., MASEK K., MELMON K.L., UDENFRIEND S., (1965). Fatty acid amides of ethanolamine in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.* 240: 1019-1024.

BERDYSHEV E., BOICHOT E., CORBEL M., GERMAIN N., LAGENTE V., (1998). Effect of cannabinoid receptor ligands on LPS-induced pulmonary inflammation in mice. *Life Sci.*, 63: PL125-PL129.

BISOGNO T., MAURELLI S., MELCK D., DE PETROCELLIS L., DI MARZO V., (1997). Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *J. Biol. Chem.*, 272: 3315-3323.

BISOGNO T., BERRENDERO F., AMBROSINO G., CEBEIRA M., RAMOS J.A., FERNANDEZ-RUIZ J.J., DI MARZO V., (1999). Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 256: 377-380.

CALIGNANO A., LA RANA G., MAKRIAYANNIS A., LIN S.Y., BELTRAMO M., PIOMELLI D., (1997). Inhibition of intestinal motility by anandamide, an endogenous cannabinoid. *Eur. J. Pharmacol.*, 340: R7-R8.

CALIGNANO A., LA RANA G., GIUFFRIDA A., PIOMELLI D., (1998). Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*, 394: 277-281.

COUTTS A.A., PERTWEE R.G., (1997). Inhibition by cannabinoid receptor agonists of acetylcholine release from the guinea-pig myenteric plexus. *Br. J. Pharmacol.*, 12: 1557-1566.

COUTTS A.A., IRVING A.K., MACKIE K., PERTWEE R.G., ANAVI-GOFFER S., (2002). Localisation of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor immunoreactivity in the guinea pig and rat myenteric plexus. *J. Comp. Neurol.*, 448: 410-422.

COUTTS A.A., (2004). Cannabinoid receptor activation and the endocannabinoid system in the gastrointestinal tract. *Curr. Neuropharmacol.* 2: 91-102.

CROCI T., MANARA L., AUREGGI G., GUAGNIN F., RINALDI-CARMONA M., MAFFRAND J.P., LE FUR G., MUKENGE S., FERLA G., (1998). *In vitro* functional evidence of neuronal cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors in human ileum. *Br. J. Pharmacol.*, 125: 1393-1396.

DE PETROCELLIS L., BISOGNO T., DAVIS J.B., PERTWEE R.G., DI MARZO V., (2000). Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. *FEBS Lett.*, 483: 52-56.

DE PETROCELLIS L., DAVIS J.B., DI MARZO V., (2001). Palmitoylethanolamide enhances anandamide stimulation of human vanilloid VR1 receptors, *FEBS Lett.* 506: 253-256.

DELBRO D.S, LANGE S., (1997). Effect of ganglionic blocking compounds on in vivo fluid secretion in the rat small intestine. *J. Pharm. Pharmacol.*, 49: 1109-1113.

DEVANE W.A., DYSARZ F.A., JOHNSON M.R., MELVIN L.S., HOWLETT A.C., (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.*, 34: 605-613.

DEVANE W.A., HANUS L., BREUER A., PERTWEE R.G., STEVENSON L.A., GRIFFIN G., GIBSON D., MANDELBAUM A., ETINGER A., MECHOULAM R., (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258: 1946-1949.

DI MARZO V., FONTANA A., CADAS H., SCHINELLI S., CIMINO G., SCHWARTZ J.C., PIOMELLI D., (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372: 686-691.

DI MARZO V., BISOGNO T., DE PETROCELLIS L., (2000). Endocannabinoids: new targets for drug development. *Curr. Pharm. Des.*, 6 : 1361-1380.

DI MARZO V., MELCK D., ORLANDO P., BISOGNO T., ZAGOORY O., BIFULCO M., VOGEL Z., DE PETROCELLIS L., (2001). Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells, *Biochem. J.*, 358: 249-255.

EPPS D.E., SCHMID P.C., NATARAJAN V., SCHMID H.H., (1979). N-acylethanolamine accumulation in infarcted myocardium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 90: 628-633.

FACCI L., DAL TOSO R., ROMANELLO S., BURIANI A., SKAPER S.D., LEON A. (1995). Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 394: 277-281.

FRIDE E., (1995). Anandamides: tolerance and cross-tolerance to delta 9-tetrahydrocannabinol. *Brain Res.*, 697: 83-90.

FOWLER C.J., JACOBSSON S.O.P., (2002). Cellular transport of anandamide, 2-arachidonoylglycerol and palmitoylethanolamide targets for drug development?. *Prostaglandins Leukotr. Essent. Fatty Acids*, 66: 193-200.

GABRIEL S.E., BRIGMAN K.N., KOLLER B.H., BOUCHER R.C, STUTTS M.J., (1994). Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science*, 266: 107-109.

GEPPETTI P., TREVISANI M., (2004). Activation and sensitisation of the vanilloid receptor: role in gastrointestinal inflammation and function. *Br. J. Pharmacol.*, 141: 1313-1320.

GIUFFRIDA A., PIOMELLI D., (1998). Isotope dilution GC/MS determination of anandamide and other fatty acylethanolamides in rat blood plasma. *FEBS Lett.*, 422: 373-376.

GIUFFRIDA A., BELTRAMO B., PIOMELLI D., (2001). Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 298: 7-14.

GUANDALINI S., (2002). The treatment of acute diarrhea in the third millennium: a pediatrician's perspective. *Acta Gastroenterol. Belg.*, 65: 33-36.

HANUS L., ABU-LAFI S., FRIDE E., BREUER A., VOGEL Z., SHALEV D.E., KUSTANOVICH I., MECHOULAM R., (2001). 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 3662-3665.

HOWLETT A.C., BARTH F., BONNER T.I., CABRAL G., CASELLAS P., DEVANE W.A., FELDER C.C., HERKENHAM M., MACKIE K., MARTIN B.R., MECHOULAM R., PERTWEE R.G., (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.*, 54: 161-202.

IZZO A.A., MASCOLO N., BORRELLI F., CAPASSO F., (1998). Excitatory transmission to the circular muscle of the guinea-pig ileum: evidence for the involvement of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor. *Br. J. Pharmacol.*, 124: 1363-1368.

IZZO A.A., MASCOLO N., CAPASSO R., GERMANO M.P., DE PASQUALE R., CAPASSO F., (1999a). Inhibitory effect of cannabinoid

agonists on gastric emptying in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 360: 221-223.

IZZO A.A., MASCOLO N., BORRELLI F., CAPASSO F., (1999b). Defaecation, intestinal fluid accumulation and motility in rodents: implications of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 359: 65-70.

IZZO A.A., MASCOLO N., CAPASSO F., (2000a). Marijuana in the new millennium: perspectives for cannabinoid research. *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 281-282.

IZZO A.A., PINTO L., BORRELLI F., CAPASSO R., MASCOLO N., CAPASSO F., (2000b). Central and peripheral cannabinoid modulation of gastrointestinal transit in physiological states or during the diarrhoea induced by croton oil. *Br. J. Pharmacol.*, 129: 1627-1632.

IZZO A.A., MASCOLO N., TONINI M., CAPASSO F., (2000c). Modulation of peristalsis by cannabinoid CB<sub>1</sub> ligands in the isolated guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* 129: 984-990.

IZZO A.A., MASCOLO N., CAPASSO F., (2001a). The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 1: 597-603.

IZZO A.A., CAPASSO R., PINTO L., DI CARLO G., MASCOLO N., CAPASSO F., (2001b). Effect of vanilloid drugs on gastrointestinal transit in mice. *Br. J. Pharmacol.*, 132: 1411-1416.

KIHARA N., DE LA FUENTE S.G., FUJINO K., TAKAHASHI T., PAPPAS T.N., MANTYH C.R., (2003). Vanilloid receptor-1 containing primary sensory neurones mediate dextran sulphate sodium induced colitis in rats, *Gut*, 52: 713-719.

KIM J.A., CHOI S.C., YUN K.J., KIM D.K., HAN M.K., SEO G.S., YEOM J.J., KIM T.H., NAH Y.H., LEE Y.M., (2003). Expression of protease-activated receptor 2 in ulcerative colitis, *Inflamm. Bowel Dis.*, 9: 224-229.

KUEHL F.A., JACOB T.A., GANLEY O.H., ORMOND R.E., MEISINGER M.A.P., (1957). The identification of N-(2-hydroxyethyl)-palmitamide as a naturally occurring anti-inflammatory agent. *J. Am. Chem. Soc.*, 79; 5577-5578.

KULKARNI-NARLA A., BROWN D.R., (2000). Localization of CB<sub>1</sub>-cannabinoid receptor immunoreactivity in the porcine enteric nervous system. *Cell Tissue Res.*, 302: 73-80.

KULKARNI-NARLA A., BROWN DR. (2001). Opioid, cannabinoid and vanilloid receptor localization on porcine cultured myenteric neurons. *Neurosci. Lett.*, 308: 153-156.

KONDO S., SUGIURA T., KODAKA T., KUDO N., WAKU K., TOKUMURA A., (1998). Accumulation of various N-acylethanolamines including N-arachidonoylethanolamide (anandamide) in cadmium chloride-administered rat testis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 354: 303-310.

LAMBERT D.M., DI MARZO V., (1999). The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas: are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Curr. Med. Chem.*, 6: 757-773.

LEHMAN A., ASHLEY BLACKSHAW L., BRANDEN L., CARLSSON A., JENSEN J., NYGREN E., SMID S.D., (2002). Cannabinoid receptor agonism inhibits transient lower esophageal sphincter relaxations and reflux in dogs. *Gastroenterology*, 123: 1129-1134.

LIGRESTI A., BISOGNO T., MATIAS I., DE PETROCELLIS L., CASCIO M.G., COSENZA V., D'ARGENIO G., SCAGLIONE G., BIFULCO M., SORRENTINI I., DI MARZO V., (2003). Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth, *Gastroenterology*, 125: 677-687.

LUNDGREN O., JODAL M., (1997). The enteric nervous system and cholera toxin-induced secretion. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118A: 319-327.

MANARA L., CROCI T., GUAGNINI F., RINALDI-CARMONA M., MAFFRAND J-P, LE FUR G., MUKENGE S., FERLA G., (2002). Functional assessment of neuronal cannabinoid receptors in the muscular layers of human ileum and colon. *Digest. Liver Dis.*, 34: 262-269.

MARTIN B.R., MECHOULAM R., RADZAN R.K., (1999). Discovery and characterization of endogenous cannabinoids. *Life Sci.*, 65: 573-595.

MASCOLO N., IZZO A.A., LIGRESTI A., COSTAGLIOLA A., PINTO L., CASCIO M. G., MAFFIA P., CECIO A., CAPASSO F., DI MARZO V., (2002). The endocannabinoid system and the molecular basis of paralytic ileus in mice. *FASEB J.*, 16, 1973-1975.

MATSUDA L.A., LOLAIT S.J., BROWNSTEIN B.J., YOUNG A.C., BONNER T.L., (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346: 561-564.

MCVEY D.C., SCHMID P.C., SCHMID H.H., VIGNA S.R., (2003). Endocannabinoids induce ileitis in rats via the capsaicin receptor (VR1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 304: 713-722.

MECHOULAM R., BEN-SHABAT S., HANUS L., LIGUMSKY M., KAMINSKI N. E., SCHATZ A.R., GOPHER A., ALMOG S., MARTIN B.R., COMPTON D.R., PERTWEE R.G., GIFFIN G., BAYEWITCH M., BRAG J., VOGEL Z., (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to a cannabinoid receptor. *Biochem. Pharmacol.*, 50: 83-90.

MECHOULAM R., (1996). The pharmacology of *Cannabis sativa*. In: Mechoulam R ed Cannabinoids as therapeutic agents. CRC Press Inc., Boca Raton.

MECHOULAM R., FRIDE E., DI MARZO V., (1998). Endocannabinoids. *Eur. J. Pharmacol.*, 359: 1-18.

MECHOULAM R., (2002). Discovery of endocannabinoids and some random thoughts on their possible roles in neuroprotection and aggression. *Prostaglandins Leukotr. Essent. Fatty Acids*, 66: 93-99.

MELK D., DE PETROCELLIS L., ORLANDO P., BISOGNO T., LAEZZA C., BIFULCO M., DI MARZO V. (2000). Suppression of nerve growth factor Trk receptors and prolactin receptors by endocannabinoids leads to inhibition of human breast and prostate cancer cell proliferation. *Endocrinology*, 141: 118-126.

MUNRO S., THOMAS K.L., SHAAR M., (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365: 61-65.

NOCERINO, E., AMATO, M., IZZO, A.A., (2000). *Cannabis* and cannabinoid receptors. *Fitoterapia*, 71: S6-S12.

PERTWEE R.G., FERNANDO S.R., GRIFFIN G., ABADJI V., MAKRIAYANNIS A., (1995). Effect of phenylmethylsulphonyl fluoride on the potency of anandamide as an inhibitor of electrically-evoked contractions in two isolated tissue preparations. *Eur. J. Pharmacol.*, 272: 73-78.

PERTWEE R.G., (1999). Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr. Med. Chem.*, 6: 635-664.

PERTWEE R.G., (2000). Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations relevant to future drug discovery and development. *Expert. Opin. Invest. Drugs*, 9: 1553-1571.

PERTWEE R.G., (2001). Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut*, 48: 859-867.

PERTWEE R.G., ROSS R.A., (2002). Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandin. Leukotr. Essent Fatty Acids*, 66: 101-121.

PINTO L., CAPASSO R., DI CARLO G., IZZO A.A., (2002a). Endocannabinoids and the gut. *Prostaglandins Leukotr. Essent. Fatty Acids* 66: 333-341.

PINTO L., IZZO A. A., CASCIO M. G., BISOGNO T., HOSPODAR-SCOTT K., BROWN D. R., MASCOLO N., DI MARZO V., CAPASSO F., (2002b) Endocannabinoids as physiological regulator of colonic propulsion in mice. *Gastroenterology*, 123: 227-234.

PIOMELLI D., GIUFFRIDA A., CALIGNANO A., RODRIGUEZ DE FONSECA F., (2000). The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol. Sci.*, 21: 218-224.

PUIG M.M., POL O., (1998). Peripheral effects of opioids in a model of chronic intestinal inflammation in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 284: 644-650.

REGGIO P.H., (2002). Endocannabinoid structure-activity relationships for interaction at the cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukotr. Essent. Fatty Acids*, 66: 161-172.

RIVIERE P.J., FARMER S.C., BURKS T.F., PORRECA F., (1991). Prostaglandin E<sub>2</sub>-induced diarrhea in mice: importance of colonic secretion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 256: 547-552.

ROSS R.A., BROCKIE H.C., PERTWEE R.G., (2000). Inhibition of nitric oxide production in RAW264.7 macrophages by cannabinoids and palmitoylethanolamide. *Eur. J. Pharmacol.* 401: 121-130.

SANTOS R.A., RAO V.S.M., (1999). Quinine-induced inhibition of gastrointestinal transit in mice: possible involvement of endogenous opioids. *Eur. J. Pharmacol.*, 364: 193-197.

SCHMID P.C., KUWAE T., KREBSBACH R.J., SCHMID H.H., (1997). Anandamide and other N-acyl ethanolamines in mouse peritoneal macrophages. *Chem. Phys. Lipids.*, 87: 103-110.

STELLA N., SCHWEITZER P., PIOMELLI D., (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388: 773-778.

SUGIURA T., KONDO S., SUKAGAWA A., NAKANE S., SHINODA A., ITOH K., YAMASHITA A., WAKU K., (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 215: 89-97.

TYLER K., HILLARD C.J., GREENWOOD-VAN MEERVELD B., (2000). Inhibition of small intestinal secretion by cannabinoids is CB<sub>1</sub> receptor-mediated in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 409: 207-211.

UEDA N., YAMANAKA K., TERASAWA Y., YAMAMOTO S., (1999). An acid amidase hydrolyzing anandamide as an endogenous ligand for cannabinoid receptors. *FEBS Lett.*, 454: 267-270.

VAN SICKLE M.S., OLAND L.D., HO W., HILLARD C.J., MACKIE K., DAVISON J.S., SHARKEY K.A., (2001). Cannabinoids Inhibit Emesis Through CB<sub>1</sub> Receptors in the Brainstem of the Ferret. *Gastroenterology*, 121: 767-774.

WARD R.C., (Ed.) *Foundations for osteopathic medicine*, second ed (2003), Williams and Wilkins, Philadelphia.

WHITE R., HILEY R., (1998). The actions of some cannabinoid receptor ligands in the rat isolated mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.*, 125: 533-541.

WINTERKAMP S., WEIDENHILLER M., OTTE P., STOLPER J., SCHWAB D., HAHN E.G., RAITHEL M., (2002). Urinary excretion of N-methylhistamine as a marker of disease activity in inflammatory bowel disease, *Am. J. Gastroenterol.*, 97: 3071-3077.

WILEY J.L., DEWEY M.A., JEFFERSON R.G., WINCLER R.L., TROY BRIDGEN D., WILLOUGHBY K.A., MARTIN B.R., (2000). Influence of

phenylmethylsulfonyl fluoride on anandamide brain levels and pharmacological effects. *Life Sci.*, 67: 1573-1583.

ZYGMUNT P.M., PETERSSON J., ANDERSSON D.A., CHUANG H., SORGARD M., DI MARZO V., JULIUS D., HOGESTATT ED., (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400: 452-457.