

MARIA RUTKOWSKA

Wpływ związków pobudzających układ kannabinoidowy na pobieranie pokarmu przez szczury

Effects of Compounds Stimulating the Cannabinoid System on Food Intake in Rats

Katedra i Zakład Farmakologii AM we Wrocławiu

Streszczenie

Wprowadzenie. Endogenny układ kannabinoidowy, z udziałem receptorów CB₁, uczestniczy w ośrodkowej regulacji łaknienia. Działanie agonistów receptorów kannabinoidowych jest jednak niejednoznaczne. Opisano wzrost, spadek lub brak wpływu na pobieranie pokarmu.

Cel pracy. Zbadanie wpływu związków pobudzających układ kannabinoidowy na pobieranie pokarmu.

Materiał i metody. Doświadczenia wykonano na szczurach niegłodzonych. Badano wpływ: (R)-(+)-[2,3-dihydro-5-metylo-3-(4-morfolinylo-metylo)pirolo[1,2,3,4-de]benzoksazyn-6-ylo]-1-naftalenylometanonu (WIN 55, 212-2, 1 i 2 mg/kg i.p.) – agonisty receptorów kannabinoidowych CB₁ i CB₂, fluorku fenylo-metylosulfonu (PMSF, 15 i 30 mg/kg) – inhibitora hydrolazy amidów kwasów tłuszczowych i (5Z, 8Z, 11Z, 14Z)-N-(4-hydroksy-2-metylofenylo)-5,8,11,14-ejkozetetraenamidu (VDM11, 1,5 i 3 mg/kg) – inhibitora transportera anandamidu.

Wyniki. Spośród badanych związków tylko WIN 55, 212-2 w dawce 2 mg/kg istotnie zwiększał pobieranie pokarmu w 4. godzinie od podania.

Wnioski. Uzyskane wyniki potwierdzają hipotezę, że pobudzenie układu kannabinoidowego może zwiększać łaknienie (Adv Clin Exp Med 2005, 14, 1, 17–21).

Słowa kluczowe: CB₁ receptory, kannabinoidy, WIN 55, 212-2, PMSF, VDM11, pobieranie pokarmu.

Abstract

Background. The endocannabinoid system participates through CB₁ receptors in a central regulation of appetite. However, the effects of cannabinoids receptors agonists are inconsistent. An increase, suppression or no effect on food intake were reported.

Objectives. The aim of this work was to investigate the effect of compounds stimulating the cannabinoid system on food intake.

Material and Methods. The experiments were carried out in free-feeding rats. Effects of (R)-(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone (WIN 55, 212-2, 1 and 2 mg/kg) – the CB₁ and CB₂ receptors agonist, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 15 and 30 mg/kg) – an inhibitor of fatty acid amide hydrolase and (5Z,8Z,11Z,14 Z)-N-(4-hydroxy-2-methylphenyl)-5, 8,11,14-eicosa-tetraenamide (VDM11, 1 and 5 mg/kg) – an inhibitor of the anandamide transporter were studied.

Results. Among tested compounds only WIN55, 212-2 at a dose of 2 mg/kg significantly increased food intake at 4h after injection.

Conclusion. The obtained results support the hypothesis that the stimulation of cannabinoids system may enhance the appetite (Adv Clin Exp Med 2005, 14, 1, 17–21).

Key words: CB₁ receptors, cannabinoids, WIN 55, 212-2, PMSF, VDM11, food intake.

Jednym z charakterystycznych objawów obserwowanych u palaczy haszysz i marihuany, zawierających psychoaktywne kannabinoidy, jest wzrost łaknienia [1]. Stosunkowo niedawno stwierdzono,

że u jego podłoża leży stymulacja swoistych receptorów kannabinoidowych w ośrodkowym układzie nerwowym. Zidentyfikowano dwa typy receptorów: CB₁ zlokalizowany głównie ośrodkowo, w mózgu

(w korze, hipokampie, mózdzku, zwojach podstawnych) i w rdzeniu kręgowym, oraz CB₂ zlokalizowany obwodowo [3, 9]. Są to receptory sprzężone z białkiem G, hamujące cyklazę adenylanową i czynność niektórych kanałów jonowych [2, 10, 16].

Endogennymi ligandami receptorów kannabinoidowych są pochodne kwasu arachidonowego: anandamid (arachidonoilietanolamid), 2-arachidonoiloglicerol, eter noladyny (eter arachidoniloglicerolowy) i wirodhamina (ester kwasu arachidonowego i etanolaminy) [8, 20, 21].

Na udział endogenego układu kannabinoidowego w ośrodkowej regulacji łaknienia wskazuje wiele danych doświadczalnych. Stwierdzono, że bezpośrednio podanie anandamidu do bocznego podwzgórza, gdzie znajduje się ośrodek głodu, powoduje wzrost pobierania pokarmu [11]. Wykazano również dodatnią korelację między stężeniem 2-arachidonoiloglicerolu w przodomózgowiu i podwzgórzu a stymulacją pobierania pokarmu u szczurów [14]. Badania na myszach z wyłączonym genem kodującym receptor CB₁ (*knockout* CB₁) wskazują, że oreksygeniczne działanie kannabinoidów jest realizowane za pośrednictwem receptora CB₁. *Knockout* CB₁ myszy jedzą mniej, a antagoniści receptora CB₁ hamują łaknienie u myszy niezmodyfikowanych genetycznie, ale nie u *knockout* CB₁ [4, 17]. Przeciwdziałają także hiperfagii wywoływanej przez anandamid i tetrahydrokannabinol, podczas gdy antagoniści receptora CB₂ nie wykazują takiego działania [26, 27].

Antagoniści receptora CB₁ budzą duże zainteresowanie jako potencjalne leki anorektyczne. Jeden z pierwszych związków tego typu – SR141716A, N-(piperidyn-1-yl)-5-(4-chlorofenyl)-1-(2,4-dichlorofenyl)-4-metylo-1*H*-pirazolo-3-karboksamid, znajduje się obecnie w III fazie badań klinicznych [22, 24].

W przeciwieństwie do dobrze udokumentowanej aktywności anorektycznej antagonistów receptora CB₁ [5, 22, 24], wyniki badań z zastosowaniem agonistów nie są jednoznaczne. W różnych modelach doświadczalnych obserwowano zarówno spadek, wzrost, jak i brak zmian łaknienia u zwierząt [7, 15, 26, 27].

Celem pracy było zbadanie wpływu związków pobudzających bezpośrednio lub pośrednio endogeny układ kannabinoidowy na pobieranie pokarmu przez szczury niegłodzone.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na szczurach, samcach szczepu Wistar o masie ciała 180–230 g. Zwierzęta przebywały w pomieszczeniach o tem-

peraturze $20 \pm 1^\circ\text{C}$, w cyklu dobowym 12 h : 12 h (światło o 7⁰⁰ h). Grupy badane i kontrolne liczyły po 6 zwierząt.

Badanie przeprowadzono na szczurach niegłodzonych. Szczury umieszczano pojedynczo w klatkach z wodą i pożywieniem. Po 24 godzinach adaptacji usuwano niezjedzoną karmę, pozostawiając wodę. Bezpośrednio po podaniu badanych związków do klatek wstawiano nowe, odważone z dokładnością do 0,1 g porcje paszy. Ilość spożytego pokarmu określano po 4 i 24 h.

Badane substancje:

– WIN 55, 212-2 ((*R*)-(+)-[2,3-dihydro-5-metylo-3-(4-morfolinylo-metylo)pirolo[1,2,3-*de*]-1,4-benzoksazyn-6-yl]-1-naftalenylometanon, Tocris) – agonista receptorów CB₁ i CB₂,

– PMSF (fenylometylosulfon, Sigma) – odwracalny inhibitor hydrolazy amidów kwasów tłuszczowych (FAAH),

– VDM11 (5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-*N*-(4-hydroksy-2-metylofenyl)-5,8,11,14-eikozatetraenamid, roztwór etanolowy 5 mg/ml, Tocris) – wybiórczy inhibitor transportera anandamidu.

WIN 55, 212-2 rozpuszczano w mieszaninie etanol:kremofor:sól fizjologiczna (1:1:18), a PMSF w oleju kukurydzianym. VDM 11 rozcieńczano solą fizjologiczną z dodatkiem kremoforu (18:1). Związki podawano dootrzewnowo w objętości 4 ml/kg, w następujących dawkach: WIN 55, 212-2 – 1 i 2 mg/kg, PMSF – 15 i 30 mg/kg, VDM11 – 1,5 i 3 mg/kg. Grupy kontrolne otrzymywały odpowiednie *vehiculum* w takiej samej objętości.

Protokół doświadczenia został zaaprobowany przez komisję etyczną.

Do oceny statystycznej wyników zastosowano analizę wariancji jednoczynnikowej ANOVA w połączeniu z testem Tukeya (różnice uznano za istotne dla $p \leq 0,05$).

Wyniki

WIN 55, 212-2 w dawce 2 mg/kg zwiększał pobieranie pokarmu po 4 godzinach od podania do 177% ($p \leq 0,05$) w porównaniu do kontroli. Po podaniu PMSF w dawce 30 mg/kg obserwowano także wzrost spożycia pokarmu, ale uzyskana różnica była statystycznie nieistotna ($p \leq 0,1$). Po podaniu WIN 55, 212-2 w dawce 1 mg/kg i PMSF – 15 mg/kg oraz VDM 11 – 1,5 mg/kg ilość spożytego pokarmu była zbliżona do kontroli. VDM 11 w dawce 3 mg/kg powodował niewielki spadek (o około 20%, różnica statystycznie nieistotna) spożycia (tab. 1).

Tabela 1. Wpływ WIN 55, 212-2, PMSF i VDM11 na pobieranie pokarmu przez szczury niegłodzone**Table 1.** Effect of WIN 55, 212-2, PMSF and VDM11 on food intake in free-feeding rats

Dawka (Dose) mg/kg	Ilość spożytego pokarmu (Food intake) g \pm SEM	
	Czas (Time) h	
	4	24
Kontrola (Control) WIN 55, 212-2	1,83 \pm 0,316	16,95 \pm 1,526
1	2,30 \pm 0,521	17,83 \pm 2,795
2	3,23 \pm 0,238*	19,47 \pm 2,047
Kontrola (Control) PMSF	1,38 \pm 0,307	14,58 \pm 1,374
15	1,17 \pm 0,361	16,72 \pm 1,882
30	2,28 \pm 0,172	15,78 \pm 1,516
Kontrola (Control) VDM11	2,08 \pm 0,558	20,72 \pm 1,428
1,5	2,23 \pm 0,600	18,63 \pm 2,375
3,0	1,63 \pm 0,284	17,0 \pm 1,532

* $p \leq 0,05$ w porównaniu do kontroli.* $p \leq 0.05$ compared to the control.

Omówienie

Endogenne układy kannabinoidowy prawdopodobnie współuczestniczy w zależnej od leptyny ośrodkowej regulacji łaknienia. Badania na zwierzętach wskazują na ujemną korelację między stężeniem leptyny a endokannabinoidami. Stwierdzono, że podanie leptyny zmniejsza zarówno poziom anandamidu, jak i 2-arachidonoglicerolu w podwzgórzu szczura. Genetycznym defektem prowadzącym do osłabienia sygnału leptynowego towarzyszy wzrost poziomu endokannabinoidów. U szczurów Zucker z genetycznie uwarunkowaną otyłością i cukrzycą, charakteryzujących się mutacją receptora leptynowego, występuje zwiększone stężenie 2-arachidonoglicerolu. Podobny efekt obserwowano u myszy *ob/ob* niewytwarzających leptyny, natomiast u myszy *db/db*, z mutacją genu kodującego receptor leptynowy, podniesiony poziom obu przekazników: 2-arachidonoglicerolu i anandamidu [4, 13].

Kannabinoidy włączają się do zależnego od leptyny obiegu sygnałów kontrolujących masę ciała, działając prawdopodobnie równolegle do klasycznego szlaku oreksygenicznego kontrolowanego przez neuropetyd Y. Jak się wydaje, kannabinoidy stymulują łaknienie, potęgując pozytywnie wzmacniające (nagradzające) działanie pokarmu [4].

Ta hipoteza znajduje uzasadnienie w ścisłym powiązaniu układu kannabinoidowego z mechanizmami wzmocnienia pozytywnego. Stwierdzono, że kannabinoidy zwiększają transmisję dopaminergiczną w jądrze półleżącym przegrody, stanowiąc neurochemiczną podstawę systemu nagrody [6].

Analiza wpływu anandamidu i tetrahydrokannabinolu na aktywność pokarmową szczurów wykazała, że oba związki, podobnie jak dopamina, zwiększają spożycie głównie przez pobudzenie fazy apetytywnej, a ich rola w fazie konsumacyjnej procesu pobierania pokarmu jest mniej istotna [26].

Spośród zastosowanych w badaniach związków pobudzających układ kannabinoidowy tylko WIN 55, 211-2, agonista receptorów kannabinoidowych, w dawce 2 mg/kg zwiększał w sposób istotny pobieranie pokarmu przez szczury niegłodzone. Wzrost spożycia obserwowano po 4 godzinach od dootrzewnowego podania związku. W przedziale czasowym 4–24 h nie stwierdzono kompensacyjnego spadku pobierania pokarmu.

WIN 55, 212-2 jest agonistą niewybiórczym, wykazuje powinowactwo do obu typów receptorów, obserwowany wzrost łaknienia jest jednak prawdopodobnie skutkiem pobudzenia receptora CB₁. Receptor CB₂ występuje na obwodzie, głównie w układzie immunologicznym i nie uczestniczy w ośrodkowej regulacji przyjmowania pokarmu [3, 24].

Jak wskazują badania, związki hamujące dwustopniowy proces inaktywacji anandamidu mogą wywoływać niektóre z typowych dla kannabinoidów efektów farmakologicznych [12, 19, 25]. Odnosnie do badanych związków stwierdzono, że PMSF, będący inhibitorem FAAH enzymu hydrolicznego anandamidu, wykazuje działanie przeciwbólowe i obniża temperaturę ciała [25], a VDM11, inhibitor wychwyty zwrotnego anandamidu, podobnie jak agoniści receptorów kannabinoidowych, hamuje motorykę jelita cienkiego u myszy [19]. W przeprowadzonych badaniach tylko po podaniu PMSF w dawce 30 mg/kg obserwowano zwiększenie pobierania pokarmu, uzyskana różnica nie była jednak statystycznie istotna.

Wywoływany przez WIN 55, 212-2 wzrost spożycia pokarmu jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami o stymulującym wpływie endo- i egzogennych agonistów receptorów kannabinoidowych – anandamidu i tetrahydrokannabinolu, na łaknienie. Efekt ten, podobnie jak w przeprowadzonych badaniach, obserwowano przy swobodnym dostępie zwierząt do pożywienia. W modelach z ograniczonym dostępem, np. w progresywnym schemacie wzmocnienia lub też międzyprzebiegowym schemacie wzmocnienia, gdzie po-

karm występuje jako nagroda w odruchu instrumentalnym, agonści receptorów kannabinoidowych, w tym WIN 55, 212-2, nie zwiększały pobierania pokarmu [5]. Również w badaniach na szczurach głodzonych, przeprowadzonych przez Golianiego et al. [7], agonista receptorów kannabinoidowych – HU 210 nie pobudzał łaknienia, a zwiększenie jego dawki prowadziło do anoreksji i spadku masy ciała. Ponieważ efekt anorektyczny nie był skutkiem działania uspokajającego, charakterystycznego dla dużych dawek kannabinoidów, zdaniem autorów jego przyczyną mogły być zaburzenia osi podwzgórze–przysadka–nadnercza. Kannabinoidy zwiększają uwalnianie CRH (kortykoliberyny), ACTH (adrenokortykotropiny) i kortyzolu. Są to zaburzenia charakterystyczne dla

działania przewlekłego stresu, który także prowadzi do anoreksji [23].

Rozpatrując udział układu kannabinoidowego w procesie pobierania pokarmu, należy także wziąć pod uwagę jego wpływ na funkcjonowanie przewodu pokarmowego. Badania na psach i gryzoniach wykazały, że aktywacja receptorów CB₁ zmniejsza wydzielanie soku żołądkowego, opóźnia opróżnianie żołądka i hamuje perystaltykę jelit [18]. Wiadomo, że niedokwaśność i hamowanie motoryki przewodu pokarmowego zmniejsza łaknienie.

Złożony wpływ kannabinoidów na proces pobierania pokarmu wskazuje na konieczność podjęcia dalszych badań nad rolą układu kannabinoidowego w mechanizmach kontroli łaknienia i bilansu energetycznego organizmu.

Piśmiennictwo

- [1] **Abel EL:** Cannabis: effects on hunger and thirst. *Behav Biol* 1975, 15, 255–281.
- [2] **Caulfield MP, Brown DA:** Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells *via* a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br J Pharmacol* 1992, 106, 231–232.
- [3] **Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC:** Determination and characterization of cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 1988, 34, 605–613.
- [4] **Di-Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G:** Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 2001, 410, 822–825.
- [5] **Freedland CS, Poston JS, Porrino LJ:** Effects of SR141716A, a central cannabinoid receptor antagonist, on food-maintained responding. *Pharmacol Biochem Behav* 2000, 67, 265–270.
- [6] **Gardner EL, Vorel SR:** Cannabinoid transmission and reward-related events. *Neurobiol Dis* 1998, 5, 502–533.
- [7] **Guliani D, Ottani A, Ferrari F:** Effect of the cannabinoid receptor agonist, HU 210 on ingestive behaviour and body weight of rats. *Eur J Pharmacol* 2000, 391, 275–279.
- [8] **Hanus L, Abu-Lafi SE, Bruer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R:** 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB₁ receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98, 3662–3665.
- [9] **Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG:** International Union of Pharmacology XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 2002, 54, 161–202.
- [10] **Howlett AC:** Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. *Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes*. *Mol Pharmacol* 1985, 27, 429–426.
- [11] **Jamshidi N, Taylor DA:** Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol* 2001, 134, 1151–1154.
- [12] **Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valino F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, Piomelli D:** Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med* 2003, 9, 76–80.
- [13] **Kirkham TC, Williams CM:** Endogenous cannabinoids and appetite. *Nutr Res Rev* 2001, 14, 65–86.
- [14] **Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di MV:** Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol* 2002, 136, 550–557.
- [15] **Koch JE:** Δ⁹-THC stimulates food intake in Lewis rats: effects on chow, high-fat and sweet high-fat diets. *Pharmacol Biochem Behav* 2001, 68, 539–543.
- [16] **Mackie K, Hille B:** Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89, 3825–3829.
- [17] **Mechoulam R, Friede E:** A hunger for cannabinoids. *Nature* 2001, 410, 763–765.
- [18] **Pertwee RG:** Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* 2001, 48, 859–867.
- [19] **Pinto L, Izzo AA, Cascio MG, Bisogno T, Hospodar-Scott K, Brown DR, Mascol N, Di-Marzo V, Capasso F:** Endocannabinoids as physiological regulators of colonic propulsion in mice. *Gastroenterology* 2002, 123, 227–234.
- [20] **Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC:** Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB₁ receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2002, 301, 1020–1024.
- [21] **Sanudo-Pena MC, Walker JM:** A novel neurotransmitter system involved in the motor behavior by the basal ganglia. *Ann NY Acad Sci* 1998, 860, 475–479.

- [22] **Simiand J, Keane M, Keane PE, Soubrie P:** SR1716, a CB1 cannabinoid receptor antagonist, selectively reduces sweet food intake in marmoset. *Behav Pharmacol* 1998, 9, 179–181.
- [23] **Valles A, Marti O, Garcia A, Armario A:** Single exposure to stressors causes long-lasting, stress-dependent reduction of food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000, 279, R1138– R1144.
- [24] **Werner NA, Koch JE:** Effects of the cannabinoids antagonists AM281 and AM630 on deprivation induced intake in Lewis rats. *Brain Res* 2003, 967, 290–292.
- [25] **Wiley JL, Dewey MA, Jefferson RG, Wincler RL, Bridgen DT, Willoughby KA, Martin BR:** Influence of phenylmethylsulfonyl fluoride on anandamide brain levels and pharmacological effects. *Life Sci* 2000, 67, 1573–1583.
- [26] **Williams CM, Kirkham TC:** Observational analysis of feeding induced by Δ^9 -THC and anandamide. *Physiol Behav* 2002, 2, 241–250.
- [27] **Williams CM, Kirkham TC:** Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoids receptors. *Psychopharmacology* 1999, 143, 315–317.

Adres do korespondencji:

Maria Rutkowska
Katedra i Zakład Farmakologii AM
ul. Mikulicza-Radeckiego 2
50-345 Wrocław

Praca wpłynęła do Redakcji: 13.03.2004 r.

Po recenzji: 5.04.2004 r.

Zaakceptowano do druku: 21.05.2004 r.

Received: 13.03.2004

Revised: 5.04.2004

Accepted: 21.05.2004