

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Adiktologie



Martin Hronec

Výzkum úlohy ghrelinu/GHS-R1A v kanabinoidní závislosti
Research of the role of ghrelin/GHS-R1A in the cannabinoid
addiction

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce:

PharmDr. Magdaléna Šustková, CSc.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literatury. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systém meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 18.04.2021

MARTIN HRONEC

.....
Podpis

Identifikační záznam:

HRONEC, Martin. *Výzkum úlohy ghrelinu/GHS-R1A v kanabinoidní závislosti.*
[Research of the role of ghrelin/GHS-R1A in the cannabinoid addiction]. Praha, 2021. 40s.
Bakalářská práce (Bc.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Klinika adiktologie.
Vedoucí práce Šustková, Magdaléna.

Abstrakt

Východiska: Konopné látky jsou nejčastěji užívané nelegální drogy vůbec. Aktuálně nejrozšířenější typy konopí s vysokým obsahem tetrahydrokanabinolu (THC) jsou spojeny s vyšším rizikem navození závislosti. Studie prokázaly roli ghrelinu a jeho receptoru GHS-R1A v mozgovém systému odměny, jež je zásadní pro posilovací mechanismy příjmu potravy i návykových látek. Protože účast ghrelinu v odměňovacích účincích kanabinoidů byla studována minimálně, experimentálně jsme tento vztah otestovali pomocí metody podmíněné preference místa (CPP).

Cíl: V potkaním modelu zjistit zda: **(A)** akutní premedikace GHS-R1A antagonistou ovlivní projevy tetrahydrocannabinolem podmíněné preference místa; **(B)** ko-aplikace GHS-R1S antagonisty spolu s THC během podmiňování potlačí rozvoj CPP.

Metodika: Potkaní samci (Wistar) byli rozděleni v rámci obou uspořádání vždy do tří skupin (dávka JMV2959 0, 1 nebo 3 mg/kg). První den jsme u potkanů zjistili přirozenou preferenci jednoho z kompartmentů (20 min). 2.-9. den probíhalo podmiňování s aplikací THC (0,3 mg/kg i.p.) v méně preferovaném kompartmentu a fyziologického roztoku v kompartmentu preferovaném. 10. den jsme znovu sledovali preferenci potkanů. V uspořádání **(A)** proběhla premedikace JMV2959 akutně 10. den před závěrečným testem; v uspořádání **(B)** jsme ko-aplikovali JMV2959 spolu s THC během podmiňování.

Výsledky: **(A)** Aplikace JMV2959 významně a v závislosti na dávce snížila u potkanů projevy THC podmíněné preference místa resp. vyhledávání THC. **(B)** Aplikace JMV2959 současně s THC během podmiňování významně a v závislosti na dávce snížila vytvoření vazby místa s aplikací resp. odměnou THC.

Závěr: Experiment prokázal významnou účast ghrelinu/GHS-R1A v posilovacích a podmiňovacích účincích THC. Naše výsledky tak podporují další výzkum ghrelinového antagonizmu jako potenciální nové strategie v léčbě kanabinoidní závislosti.

Klíčová slova: tetrahydrokanabinol - závislost - ghrelinový antagonismus - podmíněná preference místa

Abstract

Background: Cannabinoids are the most widely used illicit substances. Cannabis strains with high THC content, which are currently the most common, are linked to higher risk of addiction development. Studies proved the role of ghrelin and its receptor GHS-R1A in the brain reward system, which is crucial for reinforcing effects of palatable food and drugs of abuse. Because the role of ghrelin in rewarding effects of cannabinoids wasn't widely studied, we tested this relationship using the conditioned place preference (CPP) method.

Aim: Using the rat model, to find out if: (A) acute premedication with GHS-R1A antagonist influences the manifestation of THC-induced place preference; (B) co-administration of the GHS-R1A antagonist together with THC during conditioning suppresses the development of CPP.

Methods: Male rats (Wistar) were separated into three groups for both experimental arrangements (JMV2959 dosage of 0, 1 or 3 mg/kg). First day we determined natural preference of the rats for one of the compartments (20 min). 2-9th day the conditioning took place, where THC (0,3 mg/kg i.p.) in the less preferred compartment and saline in the preferred compartment were administered. 10th day we again observed preference of the rats for one of the compartments. In arrangement (A) acute application of JMV2959 on the 10th day, prior to the test session, was performed. In arrangement (B) JMV2959 was co-administered with THC during conditioning.

Results: (A) acute JMV2959 administration significantly and dose-dependently reduced the THC-induced CPP manifestation/THC-seeking behavior. (B) Repeated administration of JMV2959 together with THC during conditioning significantly attenuated the THC rewarding/reinforcing effects, which consequently reduced the THC - place association, thus the CPP development.

Conclusion: The experiment demonstrated an important role of ghrelin/GHS-R1A in reinforcing/rewarding effects of THC. Our results support further research of ghrelin antagonism as a potential new strategy in cannabis addiction treatment.

Key words: tetrahydrocannabinol - addiction - ghrelin antagonism - conditioned place preference

Poděkování

Děkuji především své školitelce PharmDr. Magdaléně Šustkové, CSc., za její svědomité a pečlivé vedení této absolventské práce a za poskytnutí mnoha cenných rad, připomínek a informací během jejího zpracování. Rovněž také děkuji své rodině a blízkým za trpělivost, pochopení a podporu.

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Konopí a konopné drogy.....	9
2.1 Kanabinoidní receptory.....	9
2.2 Endokanabinoidy	10
2.3 Kanabinoidy a konopí jako droga	11
2.4 Kanabinoidní závislost.....	12
3. Ghrelin	14
3.1 Ghrelinový receptor	14
3.2 Acylace ghrelinu	15
4. Ghrelin a závislost	16
4.1 Ghrelin a alkohol	16
4.2 Ghrelin a nikotin	17
4.3 Ghrelin a stimulanty.....	17
4.4 Ghrelin a opioidy	18
4.5 Ghrelin a kanabinoidy.....	18
5. Animální modely ve výzkumu závislosti.....	20
5.1 Mikrodialýza mozkových struktur “in vivo”	20
5.2 Drug discrimination / Rozpoznání látky	21
5.3 Self-administration / Metoda autoaplikace	22
5.4 Intrakraniální stimulace	22
5.5 Podmíněná preference místa	22
5.5.1 Interpretace výsledků – statické vyhodnocení CPP	24
5.5.2 Použití	24
7. Hypotéza a cíle.....	25
8. Metodika	26
8.1. Pokusná zvířata	26
8.2 Chemikálie	26
8.3 Uspořádání metody podmíněné preference místa (CPP).....	27
8.4 Statistická analýza.....	29
9. Výsledky	30
10. Diskuze a závěr.....	32
10.1 Závěr	33
Literatura.....	34

1. Úvod

Nejčastěji užívanými nelegálními drogami v České republice i v Evropě jsou konopné látky. Aktuálně nejrozšířenější typy konopí s vysokým obsahem tetrahydrokanabinolu (THC) jsou spojeny s vyšším rizikem navození závislosti a její léčba je obtížná. Řada recentních studií prokázala roli ghrelinu a jeho receptoru GHS-R1A v mozkovém systému odměny, včetně mesolimbicko-mezokortikální dopaminergní projekce, jež je zásadní pro posilovací mechanismy příjmu kalorické potravy i návykových látek. Protože účast ghrelinu v odměňovacích účincích kanabinoidů byla popsána minimálně, experimentálně jsme tento vztah otestovali. Zvolili jsme potkaní model závislosti, který testuje schopnost vytváření podmíněných vazeb prostředí s pocitem odměny navozené drogou, tedy metodu podmíněné preference místa (CPP).

Práce popisuje experiment výzkumného týmu farmakologického ústavu 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, na kterém jsem se podílel. Vedoucí výzkumu je PharmDr. Magdaléna Šustková, CSc. Výzkum byl podpořen granty PROGRES Q35 a 260533/SVV/2020 a v čase odevzdání této práce byl už publikován.

2. Konopí a konopné drogy

Konopné látky patří k vůbec nejstarším užívaným látkám sloužících k navození změněných stavů vědomí a k léčebným účelům (Miovský, 2008). Dnes stoupá na významu využití konopí v moderní medicíně, a to hlavně v léčbě chronické bolesti a spasticity, nicméně neporovnatelně častější, než medicínské užívání konopí je užívání rekreační (Curran et al., 2016). Konopné drogy i přes jejich ilegální status, který platí ve většině Evropských zemí včetně České republiky, představují nejdostupnější nelegální drogy v Evropě a nejčastěji užívané nelegální drogy vůbec (EMCDDA, 2019).

Pozitivní celoživotní prevalenci užití konopí hlásí víc než čtvrtina obecné populace České republiky nad 15 let, což je výrazně víc než u ostatních nelegálních drog (např. extáze jenom 5,3 %, ostatní ještě méně). Užití konopí za poslední rok uvádí 7,9 % a za poslední měsíc 2,9 % dotázaných, znovu výrazně víc oproti jiným ilegálním drogám. Tyto procentuální podíly jsou dvojnásobné u mladé populace ve věku 15-34 let. Dle studie ESPAD užilo konopí za poslední rok 40,8 % studentů středních škol ve věku 17-18 let (Mravčík et al., 2019).

Konopí ve svých početných kultivarových variantách obsahuje řádově 100 různých aktivních látek, kanabinoidů, ze kterých nejvýznamnější jsou $\Delta 9$ -tetrahydrokanabinol ($\Delta 9$ -THC), hlavní psychoaktivní komponenta konopí, a kanabidiol (CBD) (Miovský, 2008). Tyto dvě sloučeniny mají celou řadu často protichůdných účinků na lidskou neurofiziologii a chování. Například, $\Delta 9$ -THC akutně negativně ovlivňuje učení, zvyšuje anxieta a může indukovat psychóze podobný stav, zatímco CBD může pozitivně ovlivnit učení a má anxiolytické a antipsychotické účinky. Užito spolu s $\Delta 9$ -THC, CBD může zmírňovat jeho některé negativní účinky (Curran et al., 2016). Proto je významný poměr $\Delta 9$ -THC/CBD obsažený v dané rostlině konopí a tento poměr se za poslední dvě desetiletí dramaticky zvýšil. Na Evropském trhu dominuje konopí vysoké potence s obsahem $\Delta 9$ -THC ~15 % a méně než 0.1 % CBD (Hardwick & King, 2008). Toto vysoce (THC)potentní konopí je pro uživatele rizikovější co do navození psychiatrických komplikací i závislosti. Podle současných kvalifikovaných odhadů asi 9 % chronických uživatelů konopí vykazuje znaky a symptomy závislosti podle klasifikace WHO resp. DSM-V kritérií (Zehra et al., 2018).

2.1 Kanabinoidní receptory

Kanabinoidy obecně účinkují přes aktivaci kanabinoidních receptorů, ze kterých nejlépe popsán jsou CB1 a CB2. CB1 receptor (CB1R) je v hojné míře exprimován v mozkové tkáni, ale také na periférii, zatímco CB2R se nachází především v buňkách imunitního systému. Oba kanabinoidní receptory patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteinem. Aktivace CB1Rs inhibuje aktivitu adenylátcyklázy, aktivuje draslíkové kanály a inhibuje napětově řízené vápníkové kanály (Iversen, 2003; Volkow et al., 2017). CB1Rs se ve většině případů vyskytují na presynaptickém neuronu, kde modulují účinek excitačních či inhibičních neurotransmiterů zpravidla inhibicí jejich uvolňování (Maldonado et al., 2011). $\Delta 9$ -THC je parciální agonista CB1R a CB2R. Účinek CBD je komplexní. Má malou afinitu k CB1R, ale přesto i v malých koncentracích dokáže tlumit

centrální účinky CB1R agonistů, tedy centrálně působí jako funkční antagonist. Na druhou stranu snižuje reuptake a hydrolýzu endokanabinoidu anandamidu (Pertwee, 2008).

CB1 receptory lokalizované na glutamatergických neuronech působí neuroprotektivně proti excitotoxicitě a odpovídají za schopnost THC ovlivnit lokomoci a navodit hypotermii a analgesii. Naproti tomu CB1 receptory GABAergních neuronů jsou kritické pro paměťový deficit vyvolaný THC a pro mechanismy stresu a odměny (Maldonado et al., 2011). Důležitá je také anatomická lokalizace CBRs v kortexu, cerebellu, hippocampu, bazálních gangliích a mezokortikolimbických dopaminergních dráhách. Vysoké denzité kanabinoidních receptorů v těchto oblastech se pak při intoxikaci exokanabinoidy připisují klinické koreláty: fragmentované myšlení (mozková kůra), poruchy paměti (hippokampus, prefrontální kortex, amygdala), motorické koordinace (mozeček) a euforie (neuromodulace v dopaminergních dráhách) (Vyskočilová and Praško, 2015). Vliv na paměť se dále vysvětluje tím, že Δ^9 -THC porušuje mechanismy synaptické plasticity; dlouhodobou potenciací (LTP) a dlouhodobou depresí (LTD) v hippocampu. Relativní absence CBRs v mozковém kmeni může částečně vysvětlovat nízkou toxicitu kanabinoidů při předávkování (Iversen, 2003).

2.2 Endokanabinoidy

Endokanabinoidy (eKB) jsou tělu vlastní ligandy kanabinoidních receptorů, které participují na řadě neurálních procesů, včetně odměny, motivace, emocionální homeostázy, zpracování bolesti a synaptické plasticity, a tedy učení a paměti (Curran et al., 2016). Chemicky jde o lipidy, deriváty kyseliny arachidonové (Hillard, 2015). Typičtí zástupci endokanabinoidů jsou anandamid, resp. N-arachidonoyl etanolamid (AEA) a 2-arachidonoylglycerol (2-AG). Anandamid působí jako parciální agonista CB1R a CB2R, 2-AG je plný agonista těchto receptorů (Maldonado et al., 2011). Syntézu anandamidu katalyzuje fosfolipáza D hydrolýzou prekurzoru N-arachidonoyl fosfatidylethanolaminu, zatímco 2-AG vzniká štěpením inositol-1,2-diacylglycerolu katalyzovaným fosfolipázou C (Iversen, 2003). AEA a 2-AG nejsou skladovány v buněčných vezikulách, ale jsou syntetizovány a vylučovány lokálně dle potřeby. Zároveň jsou lokálně velmi rychle inaktivovány kombinací transportních mechanismů a enzymů: hydroláza amidů mastných kyselin (FAAH) pro anandamid a monoacylglycerol lipáza (MGL) pro 2-AG. V důsledku toho jsou hladiny eKB v mozku závislé na rovnováze mezi biosyntézou a následnou degradací enzymatickou hydrolýzou. (Curran et al., 2016; Maldonado et al., 2011).

Na synapsi eKB fungují jako retrogradní signální molekuly a neuromodulátory. Retrogradní signalizace je umožněna presynaptickou lokalizací CB1R; po uvolnění z postsynaptického neuronu se eKB naváží na presynaptické axonální receptory a následně jsou inaktivovány FAAH / MGL po reuptaku do postsynaptického kompartmentu. Neuromodulační efekt na presynaptický neuron spočívá v inhibici uvolnění neurotransmiterů (Iversen, 2003; Hillard, 2015).

2.3 Kanabinoidy a konopí jako droga

Nejčastějším způsobem užití je inhalace (převážně kouřením, nově vapováním). Rozdrcené samičí květenství a listy rostliny *Cannabis sativa* nebo *indica*, někdy smíchané s tabákem, se kouří v cigaretách, “jointech”, dýmkách, vodních dýmkách nebo “bluntech” (doutník z marihuany, rolovaný v listu tabáku zpravidla z vysypaného tabákového doutníku). Rostlinu je možné užívat i v podobě konopného mléka nebo její olejové extrakty mohou být přidány do jídla atp. Intravenózní aplikace kanabinoidů je značně komplikovaná, díky jejich nízké rozpustnosti ve vodě (Miovský, 2008). Další konopnou drogou je hašiš, pryskyřice z konopných samičích květenství. Nejčastěji se aplikuje inhalačně nebo orálně (Volkow et al., 2014). Poslední kategorií jsou syntetické kanabinoidy. Jejich četnost výskytu je stále vysoká. Do roku 2019 bylo v Evropě zachyceno více než 180 různých struktur syntetických kanabinoidů. V Evropě tak představují nejrozšířenější skupinu nových syntetických drog spolu se syntetickými katinony (EMCDDA, 2019).

Projevy intoxikace konopí jsou vysoce individuálně variabilní, závislé na užití dávce, okolnostech a prostředí, na očekávání uživatele. Často zahrnují euforii, rozvolněné, asociativní myšlení, intenzivnější vnímání hudby a barev, zvýšený apetit a distorzi času (Iversen, 2003). Dochází k ovlivnění kognice (viz níže). Konec intoxikace provází útlum a ospalost (Vyskočilová and Praško, 2015). Nepříjemné zážitky po užití konopí se manifestují jako úzkost a panické reakce (souvisí s vyššími dávkami THC) a v největší míře jsou hlášené naivními uživateli (Maldonado et al., 2011). Somatické příznaky zahrnují xerostomii, červené, “nastříknuté spojivky”, poruchy pohybové koordinace a sympatomimetické účinky (mydriáza, tachykardie, třes). Smrtelná předávkování v souvislosti s užitím konopí jsou velmi vzácná a většinou jsou způsobena nevhodnými kombinacemi a specifickými predispozicemi uživatele. Řada syntetických kanabinoidů je mnohem toxičtější než konopí a k fatálním předávkováním může dojít snáze (EMCDDA, 2019).

Nejvyšší riziko vzniku somatických a psychických komplikací s sebou nese vzorec užívání s každodenní nebo téměř každodenní frekvencí po dobu několika let. Toto je typické jenom pro malou část uživatelů. Z chronických somatických komplikací se popisují dopady na dýchací soustavu, zdraví ústní dutiny a reprodukci. Dlouhodobé kouření marihuany je asociováno se symptomy chronické bronchitidy, jako kašel, stridor a nadprodukce hlenu. Zároveň jsou indukovány histopatologické změny plicního parenchymu, které mohou být prekancerózním stavem, vzhledem k tomu, že kouř vzniklý hořením konopí i tabáku obsahují podobné karcinogenní látky. Ukazuje se, že poškození plicního parenchymu kouřením tabáku a konopí jsou aditivní. Kromě toho, abúzus konopí koreluje se zvýšeným rizikem vzniku zubního kazu a paradentózy. Pokusy na experimentálních zvířatech ukázaly mutagenní působení vysokých dávek kanabinoidů na plod (Vyskočilová and Praško, 2015; Hall and Solowij, 1998).

Negativní psychické dopady dlouhodobého užívání zahrnují riziko vzniku závislosti a případného syndromu z odnětí, možné zhoršení kognitivních funkcí a výskyt psychiatrických komplikací. Existuje korelace mezi užíváním konopí a schizofrenií, kde konopí může u vnímavých jedinců nemoc spustit nebo zhoršit její průběh. Nejde ale o

častý jev, a např. vznik závislosti je u uživatelů konopí 9x pravděpodobnější než rozvoj schizofrenie (Curran et al., 2016).

Celá řada výzkumů se věnuje tomu, jak kanabis ovlivňuje kognitivní schopnosti jako paměť a pozornost. Akutně (tj. 5 - 120 minut při inhalační aplikaci), jedna dávka konopí nebo $\Delta 9$ -THC významně a závisle na velikosti dávky negativně ovlivňuje pracovní a epizodickou paměť. Zhoršení paměti nastává nezávisle na způsobu aplikace, nicméně nástup je rychlejší při inhalačním nebo intravenózním podáním oproti orálnímu. Omezené je specificky kódování nových paměťových stop během intoxikace, a proto je následně problém s vybavováním těchto vzpomínek. Naopak vybavování starších paměťových stop, které už byly konsolidovány není ovlivněno (Crane et al., 2012; Curran et al. 2002).

Z chronických účinků se popisuje zhoršení paměťových schopností především u těžkých uživatelů, nicméně je složité dokázat kauzální vztah mezi užíváním konopí a těmito dlouhodobými změnami kvůli četným zavádějícím/zkreslujícím faktorům: bazální kognitivní funkce před začátkem užívání, užívání dalších drog omezujících kognici (alkohol), typ užívaného konopí, věk začátku užívání a mentální problémy, včetně deprese a závislosti na kanabinoidech (Curran et al., 2016). Kognitivní změny v důsledku dlouhodobého užívání se zdají být reverzibilní, a většinou nepřetrvávají déle než 4-6 týdnů po abstinenci (Pope, 2001; Schreiner & Dunn, 2012). Reverzibilita účinků se také projevuje v rychlé zpětné “up regulaci” CB1Rs po dlouhodobé “down regulaci” během užívání (Hirvonen et al., 2011).

Konopné drogy mohou ovlivnit neurokognitivní vývoj, jsou-li užívány během adolescence. Endokanabinoidní systém se významně účastní na maturačních procesech mozku, jako je vývoj bílé hmoty a synaptický “pruning” (zánik redundantních synapsí), které ve zvýšené intenzitě během adolescence probíhají. Vzhledem k tomu, že exogenní kanabinoidy ovlivňují fungování endokanabinoidního systému, předpokládá se, že při prolongovaném užívání v této kritické periodě dojde i k ovlivnění procesů dozrávání mozku (Lubman et al., 2015). Preklinický výzkum ukázal, že opakovaná expozice $\Delta 9$ -THC měla výraznější negativní efekt na pracovní paměť adolescentních zvířat oproti dospělým a bylo pozorováno přetrvávající zhoršení, ke kterému u dospělých zvířat nedošlo. Akutně více narušené byly i mechanismy učení. (Lubman et al., 2015; Schneider & Koch, 2007). Důkazy u lidí také nasvědčují tomu, že kognice a mozková architektura jsou konopím výrazněji ovlivněny u uživatelů, kteří ho začali užívat v adolescenci oproti těm, kteří začali v dospělosti, nicméně je obtížné jednoznačně identifikovat kauzální vztah (Jacobus & Tapert, 2014).

2.4 Kanabinoidní závislost

MKN 10 definuje syndrom závislosti jako soubor behaviorálních, kognitivních a fyziologických stavů, který se vyvíjí po opakovaném užití substance a který typicky zahrnuje: 1) silné přání/touha užít drogu, 2) porušená kontrola při jejím užívání 3) přetrvávající užívání této drogy i přes škodlivé následky 4) priorita v užívání drogy před ostatními aktivitami a závazky 5) zvýšená tolerance pro drogu a někdy 6) somatický odvykací stav. Diagnóza F12.2: Poruchy duševní a poruchy chování způsobené užíváním kanabinoidů, syndrom závislosti, aplikuje tato všeobecná kritéria na užívání konopí. Jako

vždy, je nutná přítomnost minimálně tří z uvedených příznaků za poslední rok, nebo více příznaků současně v kratší době. Od syndromu závislosti se odlišuje tzv. škodlivé užívání (abúzus), což je užití psychoaktivní látky vedoucí k poruše zdraví, somatické nebo psychické (MKN-10). Americký DSM V definuje 11 kritérií pro tzv. “Cannabis use disorder”, které se ve velké míře překrývají s kritérii MKN 10. Body 1, 2 odpovídají ztrátě kontroly nad užíváním/dávkováním, 3,5,7 zanedbávání povinností a sociálních aktivit, 4 popisuje craving, 6,8,9 pokračování i přes negativní důsledky, 10 rozvoj tolerance a 11 odvykací stav (Miller, 2017).

Syndrom z odnětí drogy u konopí typicky začíná 1-2 dny po ukončení frekventovaného užívání a vrcholem intenzity příznaků mezi 2 - 6 dnem. Tyto zahrnují craving, poruchy spánku, noční můry, dysforie, podrážděnost, hněv, nauzeu a snížený apetit (Iversen, 2003; Curran et al., 2016).

Odhaduje se, že při dlouhodobém pravidelném užívání konopí je šance na rozvoj závislosti 8,9 % (Lopez-Quintero et al., 2011). Počet žádostí o léčbu kanabinoidní závislosti neustále roste. Závislost na konopných drogách je 3. nejčastější důvod žádostí o léčbu v adiktologických službách v ČR, a stejně tak 3. nejčastější důvod u prvožadatelů (po alkoholu a stimulantech) (Mravčík et al., 2019).

3. Ghrelin

Ghrelin je peptidický hormon skládající se z 28 aminokyselin, je sekretován především parietálními buňkami sliznice fundu žaludku (Kojima, 1999). V menším množství se uvolňuje i v mozku (Panagopoulos & Ralevski, 2014). Je kódován genem pro preproghrelin, který kóduje také malý signální peptid a hormon obestatin. Ghrelin působí jako endogenní ligand, agonista - receptoru 1A pro sekretagog růstového hormonu (GHS-R1A). Aktivace GHS-R1A iniciuje významné zvýšení hladiny růstového hormonu sekrecí z adenohipofýzy (odtud “ghrelin”, *ghre* je proto-indoevropský kořen slova *růst*) (Kojima et al. 1999).

V raných fázích výzkumu se objevil model charakterizující ghrelin jako “hormon hladu” a tato charakteristika se používá dodnes. Skutečně, zvýšené hladiny ghreluinu v krvi korelují s pocitem hladu, jeho hladina stoupá preprandiálně a při hypoglykémii, a prudce klesá po najedení (Müller et al., 2015). Ghrelin prochází hematoencefalickou bariérou a v mozku ovlivňuje příjem potravy působením na centra regulující energetickou homeostázu (hypotalamus, zadní mozek) i centra pro hedonickou regulaci příjmu potravy (mesolimbický systém odměny) (Cummings, 2006).

Postupně se ukázalo, že regulační funkce ghreluinu jsou mnohem komplexnější, a byla popsána celá řada jeho periferních i centrálních účinků. Ghrelin stimuluje motilitu střeva a sekreci žaludeční šťávy, ovlivňuje kardiovaskulární, pulmonální i imunitní funkce, proliferaci buněk, fyziologii kostí a chrání před svalovou atrofií. Účastní se regulace glukózového metabolismu a suprese hnědé tukové termogeneze. Zároveň ovlivňuje spánek, učení a paměť, vnímání chuti, stres a anxieta, a také se účastní centrálních mechanismů odměny (Müller et al., 2015).

3.1 Ghrelinový receptor

Receptor 1A pro sekretagog růstového hormonu (GHS-R1A) je kódován GHSR1 genem, spolu s jeho izoformou GHS-R1B. Jde o receptor asociovaný s G-proteinem. (Gnanapavan et al., 2002) Následná signalizační kaskáda je tkáňově specifická. Např. v somatotropních buňkách adenohipofýzy působí GHS-R1A přes G_q protein na fosfolipázu C. Ta štěpí fosfolipidy buněčné membrány za vzniku inositol trifosfátu (IP3) a diacylglycerolu (DAG). Následně, IP3 způsobuje uvolnění kalcia z intracelulárních zásob a DAG aktivuje proteinkinázu C. V neuronech nucleus arcuatus hypotalamu působí ghrelin přes G_s stimulaci adenylátcyklázy a zvýšení intracelulárního cAMP, naopak v buňkách ostrůvků pankreatu navozuje snížení cAMP. GHS-R1A vykazuje vysokou konstitutivní signalizační aktivitu. Vytváří homodimery a také oligomery a heterodimery s jinými receptory (např. GHS-R1B, dopaminový rec. 1 a 2 nebo 5HT_{2C} rec.) (Schellekens, Dinan & Cryan, 2013).

GHS-R1A je exprimován především v adenohipofýze, Langerhansových ostrůvcích, nadledvinách, štítné žláze, myokardu, nucleus arcuatus hypothalamu, v hippocampu, v substantia nigra, ve ventrální tegmentální oblasti (VTA), nucleus accumbens a nuclei raphe (Müller et al., 2015).

3.2 Acylace ghrelinu

Aby se ghrelin mohl vázat na GHS-R1A a plnit svou fyziologickou funkci, je nutná vazba acylového (n-oktanoylového) zbytku na 3. aminokyselinu jeho molekuly posttranslační modifikací. Takhle upravený se nazývá acyl-ghrelin nebo n-oktanoyl ghrelin. Naopak samotná molekula ghrelinu bez acylového zbytku se nazývá desacyl-ghrelin, a tento představuje většinu cirkulujícího ghrelinu u člověka. Součet koncentrace obou molekul je potom celkový ghrelin. Posttranslační modifikaci katalyzuje enzym ghrelin O-acyl transferáza (GOAT) (van der Lely, Tschöp, Heiman & Ghigo, 2004).

4. Ghrelin a závislost

Pocit odměny je mediován pravděpodobně cholinergně-dopaminergní mesolimbickou signalizační dráhou. Dráha je tvořena cholinergním výstupem z laterodorzálního tegmenta (LDTg) do mezolimbické dopaminergní projekce, což jsou dopaminergní neurony, které mají perikarya ve VTA a vysílají axony do nucleus accumbens (NAc) (Jerlhag et al., 2007). V experimentech na hlodavcích bylo opakovaně potvrzeno, že ghrelin může ovlivnit cholinergně-mesolimbickou projekci. Neurony v LDTg i ve VTA exprimují ghrelinové receptory (Howard, 1996). Lokální podání ghreluinu do LDTg stimulovalo lokomoci a vedlo k vyplavení dopaminu v NAc (Jerlhag et al., 2007). Ghrelin vpravený do VTA se vázal na lokální neurony a zvýšil jejich elektrickou aktivitu, formaci synapsí a dopaminový (DA) obrat v NAc (Abizaid et al., 2006). Intracerebroventrikulární podání ghreluinu zvýšilo fázické výboje DA neuronů a fázické uvolnění dopaminu v NAc, vyvolané podmíněným stimulem spárovaným s příjmem potravy (Cone et al., 2015). I systémová aplikace ghreluinu ovlivnila mesolimbickou projekci, což se projevilo ve zvýšené lokomoční aktivitě, indukci CPP, a zvýšením hladiny DA v NAc (Jerlhag, 2008). Výsledky preklinického výzkumu potvrzuje studie na zdravých dobrovolnících, kde po intravenózním podání ghreluinu při prezentaci obrázků jídla funkční magnetická rezonance ukázala zvýšenou neuronální aktivitu v oblastech mozku spojených se zpracováním odměny, včetně ventrálního striata (Malik et al., 2008).

Přes dopaminergní dráhu odměny posiluje ghrelin chování, které vede k přirozené odměně (příjemný pocit/odměna z přirozených zdrojů uspokojení, např. získání jídla). Stejný posilovací mechanismus se ale uplatňuje i u umělé odměny, jako např. při užití návykových látek. Představa, že centrální ghrelinové signalizační mechanismy by se mohly uplatnit v posilování akcí vedoucích k odměně přirozené i nepřirozené vedlo k závěru, že zkoumáním těchto mechanismů můžeme lépe porozumět patofyziologii závislosti a potenciálně identifikovat nové postupy léčby (Jerlhag et al., 2010; Panagopoulos and Ralevski, 2014). Proto máme v současnosti k dispozici již řadu studií zkoumajících vztah mezi ghrelinem a návykovými látkami/drogami různých kategorií.

4.1 Ghrelin a alkohol

Dosavadní preklinický výzkum konzistentně prokázal zásadní roli ghreluinu v mediaci pocitu odměny při užití alkoholu. Centrální aplikace ghreluinu, do mozkových komor, LDTg nebo VTA zvýšila konzumaci alkoholu u myši (2-bottle free choice model). Ve stejném modelu podání antagonisty GHS-R1A vedlo ke snížení konzumace alkoholu (Jerlhag et al., 2009). Odměňující účinky alkoholu, měřitelné pomocí např. zvýšené lokomoční stimulace, podmíněnou preferencí místa a zvýšeným uvolňováním DA v NAc, jsou sníženy jak ve farmakologických (antagonismus ghrelinového receptoru) tak genetických (GHS-R1A knockoutované myši) modelech utlumené ghrelinové signalizace/ghrelinové antagonizace. (Cepko et al., 2014; Bahi et al., 2013; Jerlhag et al., 2009).

U lidí závislých na alkoholu, intravenózní podání ghreluinu významně zvýšilo craving/touhu po alkoholu vyvolanou specifickými stimuly, a postinfúzní koncentrace

ghrelinu pozitivně korelovala s mírou zvýšení cravingu. Navazující studie prokázala, že i.v. podání ghrelinu zvýšilo self-administraci/auto-aplikaci alkoholu a modulovalo neuronální mozkovou aktivitu v oblastech souvisejících s odměnou a stresem (Farokhnia et al., 2017). Zároveň existuje pozitivní korelace mezi sérovou koncentrací endogenního ghrelinu a intenzitou alkoholového cravingu (Leggio et al., 2011).

Zdá se, že podobně, jako ghrelin ovlivňuje užívání alkoholu, tak abusus alkoholu ovlivňuje endogenní ghrelinový systém. Hladiny sérového ghrelinu jsou vyšší u abstinujících závislých na alkoholu než u zdravé populace, ale jsou nižší u těch, kteří v současnosti užívají alkohol (Addolorato et al., 2006; Koopmann et al., 2012).

Nedávno proběhla první klinická studie ve fázi 1b s inverzním agonistou ghrelinového receptoru, látkou PF-5190457, u pacientů závislých na alkoholu. Nebyla zaznamenána žádná závažná nežádoucí reakce a zdá se, že látka je tolerována při denním užívání, i při koaplikaci s alkoholem (Lee et al., 2018). Vztahy ghrelinového antagonismu a dalších návykových látek zatím v klinice studovány nebyly.

4.2 Ghrelin a nikotin

Studií zkoumajících souvislost mezi ghrelinem a aplikací nikotinu je málo. V experimentu, kde byli potkaní samci během 4 týdnů vystaveni cigaretovému kouři signifikantně stoupla hladina acylghrelinu v krvi, přičemž des-acylghrelin nebyl ovlivněný (Tomoda et al., 2012). Nikotinem indukovaná stimulace lokomoce, vyplavení dopaminu v NAc i podmíněná preference místa byly redukovány po podání antagonisty GHS-R1A (Jerlhag & Engel, 2011).

4.3 Ghrelin a stimulanty

Preklinické studie ukázaly, že ghrelin může zvyšovat odměňovací/posilovací biochemické a behaviorální efekty stimulantů. Premedikace acylghrelinem posílila kokainem indukovanou podmíněnou preferenci místa (CPP) u potkanů, přičemž dávka kokainu byla nižší než prahová dávka nutná pro vyvolání CPP bez současného podání ghrelinu (Davis et al., 2007). Aplikace ghrelinového antagonisty JMV2959 (Moulin et al., 2007; Moulin et al., 2012) snížila u myši kokainem a amfetaminem indukovanou stimulaci lokomoce, vylití dopaminu v NAc i schopnost navodit CPP. (Jerlhag et al., 2010). Genomová a farmakologická ablace GHS-R1A snížila kokainem indukovanou lokomoční stimulaci a behaviorální senzitivizaci (Wellman et al., 2013). V modelu intravenózní self-administrace metamfetaminu (fixed ratio FR1) u potkanů premedikace ghrelinovým antagonistou signifikantně snížila počet stlačení aktivní páčky a celkový příjem metamfetaminu. Zároveň došlo k redukcí vyhledávání metamfetaminu po období nucené abstinence, tedy k redukcí tendence k relapsu/relapse-like chování. Akutní premedikace JMV2959 snížila projevy metamfetaminem navozené CPP a koaplikace JMV2959 s metamfetaminem během podmiňování snížila rozvoj CPP (Havlickova et al., 2018).

4.4 Ghrelin a opioidy

Souvislost mezi ghrelinovými a opioidními mechanismy se nabízí, protože endogenní opioidy se účastní modulace odměňujících účinků jídla (a dalších přirozených zdrojů odměny), což ilustruje fakt, že akutní podání agonistů μ -opioidních receptorů zvyšují příjem potravy podobně jako ghrelin (Nogueiras et al., 2012).

Ghrelinový receptor se účastní opioidy vyvolaných změn mesolimbického systému odměny. Podání antagonisty GHS-R1A významně snížilo morfinem indukovaný eflux dopaminu v NAc u potkanů. Zároveň došlo k redukci morfinem navozené behaviorální stimulace (zejména stereotypního chování) (Sustkova-Fiserova et al., 2014). Dále, aplikace JMV2959 ztlumila manifestaci morfinem navozené CPP a navíc v subchronické studii s opakovanou aplikací morfinu, redukovala po proběhlé abstinenci challenge dávkou morfinu vyvolanou dopaminergní senzitivizaci v NAc i behaviorální senzitivizaci (Jerabek et al., 2017). Stejně účinky ghrelinového antagonismu na morfinem indukovanou CPP, vyplavení DA v NAc a lokomoční stimulaci byly následně potvrzeny u myši (Engel et al., 2015).

V pokusech se syntetickým opioidem fentanylem aplikace ghrelinového antagonisty zvrátila vyplavení anandamidu a zabránila vyplavení GABA v NAc (tyto mediátory se také podílí na posilujících účincích opioidů). Zároveň došlo ke snížení fentanylem navozené behaviorální stimulace (Sustkova-Fiserova et al., 2017). Další studie prokázala schopnost GHR-R1A antagonisty redukovat fentanylem vyvolané vyplavení DA v NAc, a stejně tak snížit intravenózní self-administraci, vyhledávání fentanylu/tendenci k relapsu a podmíněnou preferenci místa vyvolanou fentanylem u potkanů (Sustkova-Fiserova et al., 2019).

4.5 Ghrelin a kanabinoidy

Data o vztahu mezi ghrelinem a kanabinoidy jsou omezená. Bylo prokázáno, že u potkanů bez přístupu k jídlu může periferní aplikace antagonisty CB1 receptoru snížit hladinu sérového acyl ghrelinu. Zároveň při periferní aplikaci CB1 antagonisty dochází ke snížení sekrece růstového hormonu ghrelin-dependentním mechanismem (Al-Massadi et al., 2010).

Řada výzkumných prací se zabývala funkčním vztahem mezi ghrelinovou a endokanabinoidní signalizací v kontrole apetitu a příjmu potravy. Antagonista kanabinoidního CB1 receptoru (rimonabant) úplně zablokoval orexigenní účinky centrálně podaného ghrelinu (Alen et al., 2013). Série studií zkoumala úlohu AMP-aktivované proteinkinázy (AMPK), enzymu důležitého pro regulaci energetické homeostázy a chuti k jídlu. Společná schopnost ghrelinu a kanabinoidů ovlivnit apetit by mohla být zprostředkována aktivací hypotalamické AMPK. U pokusných "wild type" myši centrální aplikace ghrelinu zvýšila kromě příjmu potravy taky aktivitu AMPK a hladinu endokanabinoidů v hypothalamu. Ani jeden z těchto efektů nenastal u CB1R knockoutovaných myši. Antagonista CB1R inhiboval ghrelinem navozenou zvýšenou aktivitu AMPK a zvýšení hladiny endokanabinoidů. Z toho vyplývá, že intaktní endokanabinoidní signalizace je nezbytná pro stimulační účinky ghrelinu na AMPK a

příjem potravy. (Kola et al., 2008). Pro funkční provázanost endokanabinoidního a ghrelinového systému prostřednictvím AMPK dále svědčí zjištění, že u GHSR knockoutovaných myší nenastalo zvýšení aktivity AMPK po podání ghrelinu ani agonisty CB1R (Lim et al., 2013).

Recentní studie zkoumala účast endokanabinoidní signalizace na účinku ghrelinu v modulaci aktivity mesolimbického systému odměny. Bylo zjištěno u myší, že periferní podání CB1 antagonisty snížilo centrálně (intracerebroventrikulárně) aplikovaným ghrelinem navozenou lokomoční stimulaci a vylití dopaminu v NAc. Zároveň ale nedošlo ke snížení příjmu potravy stimulovaného ghrelinem. V dalším pokusu byl ghrelin vpraven přímo do VTA, přičemž došlo ke stimulaci pohybu a zvýšení apetitu. Aplikace rimonabantu do VTA blokovala efekt ghrelinu na lokomoci, ale neovlivnila příjem běžné potravy. Zdá se teda, že v rámci ghrelinových a endokanabinoidních mechanismů existuje disociace mezi regulací příjmu běžné potravy a aktivací mesolimbického dopaminergního systému (Kalafateli et al., 2018).

Další práce, jež vznikla na pracovišti školitelky, se zabývala úlohou ghrelinu/GHS-R1A v odměňovacích a pro-aditivních účincích kanabinoidů. Ukázalo se, že premedikace GHS-R1A antagonistou, látkou JMV2959, snížila dopaminový efflux v NAcSh (nucleus accumbens shell, mozková struktura významně se podílející na impulzu spuštění procesu závislosti) vyvolaný podáním WIN55,212-2 (syntetický CB1R/CB2R agonista) do VTA. Ghrelinový antagonist taktéž redukoval vyplavení endokanabinoidů anandamidu a 2-AG v NAcSh navozené účinkem WIN55,212-2. Zvýšení hladiny gama-aminomáselné kyseliny v nucleus accumbens po podání kanabinoidu bylo rovněž sníženo JMV2959. Kromě toho, behaviorální studie v kleci LABORAS ukázala, že kanabinoidem/WIN55,212-2 navozená behaviorální stimulace byla taktéž snížena podáním ghrelinového antagonisty (Charalambous et al., 2021a).

Letos publikovaná práce stejného výzkumného týmu se rovněž zabývala úlohou ghrelinu/GHS-R1A v odměňovacích/posilovacích účincích kanabinoidů. Její součástí byl pokus s THC-navozenou podmíněnou preferencí místa, který je předmětem experimentální části této bakalářské práce. Další pokus zahrnoval intravenózní autoaplikaci (IVSA) látky WIN55,212-2. Bylo zjištěno, že podání ghrelinového antagonisty (JMV2959) akutně před testováním IVSA mělo za následek snížení počtu aktivních stlačení páčky (při FR1), snížení počtu infuzí a příjmu kanabinoidu. Zároveň JMV2959 redukoval u potkanů relapse-like chování, tj. vyhledávání WIN55,212-2 po periodě vynucené abstinence. Naopak, premedikace ghrelinem významně zvýšila autoaplikaci kanabinoidu i tendenci k relapsu/relapse-like chování u potkanů. Koaplikace ghrelinu a JMV2959 měla za následek snížení signifikance účinku ghrelinového antagonisty na autoaplikaci WIN55,212-2. Předmětem studie bylo i testování THC-indukované behaviorální stimulace v kleci LABORAS, kterou podání JMV2959 významně snížilo. Na základě těchto výsledků autoři vyvozují, že ghrelin/GHS-R1A má významnou roli v odměňovacích/posilovacích účincích kanabinoidů (Charalambous et al., 2021b).

5. Animální modely ve výzkumu závislosti

Přestože závislost je unikátně lidský fenomén, některé její patognomické znaky mohou být modelovány na úrovni pokusných zvířat. Tyto znaky zahrnují např. navození euforického pocitu “high” po užití drogy, dysforických pocitů při odnětí drogy, návrat k droze/relaps po období abstinence atp. Pro tyto znaky existují zvířecí modely. Zvířecí modely závislosti umožňují testovat vliv vybraných vlivů/podmínek ve srovnání vůči kontrolní skupině zvířat. Lze sledovat neurobiologické dopady konkrétních vnějších podmínek (sociální stres, podmiňování “cues” v okolí spojených s účinkem drogy atp.) nebo změn vnitřního nastavení zvířete např. hladovění, deprese, úzkosti atp., lze užít specificky geneticky modifikovaných zvířat. V neurobehaviorálních metodách lze sledovat účinky (auto)aplikace návykových látek, potenciálních léčiv či specifických receptorových ligand na chování zvířete i neurotransmitterové/molekulární mozkové změny atp. Jde o zjednodušené experimentální modely, jejichž výstupy/závěry je nutné následně ověřovat v klinickém výzkumu (kombinací citlivých zobrazovací technik, epidemiologických, genetických metod atp.). Animální modely významně přispívají k poznání mechanismů závislosti i k nalezení potenciálních terapeutických přístupů a mají v adiktologickém výzkumu dlouhodobě nezastupitelnou úlohu (Gardner, 2008; Koob & Volkow, 2009).

Drogou navozený pocit odměny a s tím související vyhledávání drogy napodobují a umožňují zkoumat metody autoaplikace drogy (IVSA) a testování prahu odměny, metoda podmíněné preference místa (CPP), mozkové stimulace a test rozpoznávání drogy. Výskyt negativních příznaků v souvislosti s užíváním / odnětím drogy testuje např. metoda podmíněné averze k místu a testování zvýšeného prahu odměny. Pro zkoumání vyhledávání drogy/tendence k relapsu se používá metoda drogy, případně připomínkou/“cue” navozeného návratu k droze - obnova příjmu drogy (Šustková, 2015).

Vzhledem k tomu, že u různých savců jsou hlavní morfologické a biochemické principy fungování mozku podobné, lze zvířecích modelů (nejčastěji za použití hlodavců) využít i k jejich zkoumání. Metody jako např. CNS mikrodialýza “in vivo” představují cenný, efektivní nástroj pro zkoumání neurochemie závislosti (Müller, 2017; Pushkina & Šustková-Fišerová, 2014).

5.1 Mikrodialýza mozkových struktur “in vivo”

Mikrodialýza umožňuje stanovovat koncentrace nízkomolekulárních látek v intersticiální tekutině různých orgánových systémů, jako krev, oko, játra nebo svaly. Nejrozšířenější je užití mikrodialýzy v neurovědách při měření koncentrací monoaminových a aminokyselinoých neurotransmiterů a acetylcholinu, stejně tak jako jejich metabolitů a neuropeptidů v extracelulární tekutině mozku pokusných zvířat (hlodavců, primátů) (Darvesh et al., 2011).

Metoda je založena na principu difuze, samovolného pohybu částic přes semipermeabilní membránu po koncentračním gradientu (Fickův zákon). Semipermeabilní membrána je součástí mikrodialyzační sondy, která je chirurgicky zavedena do zkoumané

oblasti (např. konkrétní mozkové struktury). Sonda je perfuzní pumpou promývána mikrodialyzačním roztokem s nulovou koncentrací velmi pomalým tempem (maximálně 2 $\mu\text{l}/\text{min}$). Po vyrovnání koncentrací molekul mezi tkáňovou tekutinou a perfuzním roztokem je dialyzát ve vybraných intervalech jímán do mikrozkuumavek. Díky nízké propustnosti (cut off) membrány dialyzát neobsahuje krev, proteiny nebo buněčný detritus, a tak může být i přímo analyzován. Koncentrace zkoumaných látek jsou nano/pikomolární, proto je nutná velmi citlivá analytická metoda. Používá se např. HPLC s elektrochemickou detekcí nebo hmotnostní spektrometrií (Koob et al., 2007; Darvesh et al., 2011)

Metoda je unikátní v tom, že umožňuje sledovat změny hladin neuromediátorů v konkrétních strukturách u bdělých, volně se pohybujících zvířat. Tohle lze provádět opakovaně v rámci chronických modelů, nebo kombinovat s behaviorálními testy (autoaplikace, CPP, test sociální interakce). Lze sledovat neurochemickou reakci na fyziologické i farmakologické podněty a lze monitorovat více neurotransmiterů/látek najednou. Pomocí mikrodialyzační kanyly lze látky také aplikovat, farmaka s nízkou molekulární hmotností, včetně těch, které neprochází hematoencefalickou bariérou (Torregrossa & Kalivas; 2008; Šustková, 2003).

V adiktologii je mikrodialýza používána ke sledování mozkových mediátorových změn vyvolaných drogou, potenciálním léčivem závislosti atp. (Pushkina & Šustková-Fišerová, 2014).

5.2 Drug discrimination / Rozpoznání látky

Metoda vychází ze schopnosti vyšších obratlovců rozlišovat různé typy centrálních účinků, resp. různé stavy vědomí (Glennon & Young, 2011).

V typickém experimentu jsou zvířata trénována rozlišit injekci určité dávky konkrétního farmaka od injekce stejné dávky placebo (saline). Prvním krokem je vybudování asociace mezi zmáčknutím páčky v operantní komoře se získáním jídla (zvířata mohou být deprivovány potravy k urychlení učení). Následně je v určitém intervalu před experimentem podána buď droga nebo placebo. V případě podání drogy je úkolem zvířete zmáčknout páčku (jednu ze dvou možných) předem označenou jako “drogová”, aby získalo jídlo. Zmáčknutí druhé páčky nemá efekt. Naopak po podání placebo musí zvíře zmáčknout druhou páčku, a analogicky mačknání první, “drogové” páčky, nemá efekt. Diskriminace látky probíhá na základě jejích subjektivních účinků na pokusné zvíře. Trénování probíhá tímto způsobem, dokud zvíře není schopné spolehlivě vybrat správnou páčku (Colpaert, 1999; Pushkina & Šustková-Fišerová, 2014) s minimálně 80 % spolehlivostí správných operantních odpovědí z celkového počtu (Carter & Griffiths, 2009).

Pomocí drug discrimination lze zkoumat centrální účinky farmak a zjišťovat parametry jako je latence a doba trvání účinku, vliv způsobu podání na efekt látky a vliv příslušných receptorových agonistů a antagonistů. Zároveň lze testovat efekt nových např. syntetických drog: pokud nová droga vyvolá operantní odpověď jako předtím nacvičená klasická droga, pravděpodobně vyvolává podobnou změnu vědomí a patří do stejné skupiny (Glennon & Young, 2011; Carter & Griffiths, 2009).

5.3 Self-administration / Metoda autoaplikace

Tato metoda je zlatým standardem preklinického testování schopnosti látek vyvolat závislost pro svou vysokou validitu a prediktivní schopnost. Látky, které jsou auto-aplikovány pokusnými zvířaty, mají většinou také odměňovací/posilovací účinky u lidí (Carter & Griffiths, 2009).

Z behaviorálního hlediska lze auto-aplikaci rozdělit na operantní a ne-operantní. U ne-operantní auto-aplikace je droga aplikována výhradně orální cestou. Nejčastěji se používá ve výzkumu alkoholu, ale lze ji použít i u jiných drog. U auto-aplikace alkoholu má zvíře k dispozici 2 nebo více lahví; jednu lahev s vodou, ostatní s alkoholem o různé koncentraci a sleduje se konzumace obsahů a preference lahví. Výsledkem testu je informace o celkovém objemu zkonsumovaného etanolu, preference některé z koncentrací alkoholu a celkový příjem tekutin (Spanagel, 2017).

Operantní metoda znamená, že získání odměny je podmíněno vykonáním určitého úkonu (např. stlačení páky/tlačky). Procedura není omezena na jeden typ aplikace, je možná intravenózní, intraventrikulární, intrakraniální, intragastrická i orální (Sanchis-Segura & Spanagel, 2006). Nejčastější variantou je tzv. *fixed ratio* (fixovaný poměr), kdy je látka aplikována vždy po určitém definovaném počtu úkonů (např. FR2 znamená aplikace po každém druhém stlačení páčky). *Progressive ratio* je potom varianta, kdy se požadovaný počet úkonů zvyšuje geometrickou řadou. Výstupem je tzv. *breaking point*, což je nejvyšší počet úkonů které zvíře provede pro získání drogy, a je výrazem míry motivace získat drogu, resp. značí míru návykového potenciálu látky/drogy (Spanagel, 2017; Pushkina & Šustková-Fišerová, 2014).

5.4 Intrakraniální stimulace

Tato metoda se užívá k výzkumu schopnosti návykových látek ovlivnit mozkový systém odměny. Pokusným zvířatům je po vykonání určitého úkonu aplikován elektrický pulz prostřednictvím elektrody implantované v oblasti mozku, kde se nachází struktury odměny. Tato stimulace má odměňující účinky, které se sčítají s těmi, které vyvolá podání návykové látky, a dochází ke snížení prahu (minimálního proudu) potřebného pro stimulaci. Naopak pokud má látka averzivní účinky, dojde ke zvýšení prahu. Tímto způsobem je možné stanovit intenzitu odměňujících účinků dané látky (Gardner, 2008).

5.5 Podmíněná preference místa

Conditioned place preference (CPP), drogou podmíněná preference místa je metoda preklinického behaviorálního výzkumu, která umožňuje zkoumat odměňovací nebo averzivní účinky dané látky v kontextu s okolním prostředím. Protože jsem právě tuto metodu používal v experimentální části své práce, budou její principy popsány podrobněji.

Metoda se řídí mechanismem Pavlova/klasického podmiňování, kdy dochází ke vzniku vazby mezi stimulem (drogou) a prostředím. Odměňující účinky po podání drogy (nepodmíněný stimulus) jsou opakovaně párovány s určitými charakteristickými znaky

definovaného prostředí (na začátku neutrální stimulus). Postupně dochází k přenesení subjektivně pociťovaných účinků látky/drogy na původně neutrální znaky prostředí a vzniká podmíněný stimulus, který zvíře vyhledává, pokud efekt látky pociťuje jako odměňující (více se zdržuje v prostředí spojeném s aplikací drogy), nebo se mu naopak vyhýbá, pokud efekt látky pociťuje jako nepříjemný (averzivní účinky podané latky) (Prus et al., 2008; Gardner, 2008).

CPP lze provést v *biased* nebo *unbiased* uspořádání. V *unbiased* uspořádání výzkumník vybírá kompartment pro párování s drogou bez ohledu na přirozenou preferenci testovaných subjektů pro jeden nebo druhý kompartment před začátkem podmiňování. Naopak o *biased* modelu mluvíme tehdy, je-li před podmiňováním pro každé pokusné zvíře zjištěna a zhodnocena přirozená/spontánní preference místa a droga je podávána v tom kompartmentu, který je méně preferovaný (Prus et al., 2008).

Samotná aparatura pro CPP není výrazně složitější než soustava tří průchozích komor. Postranní komory jsou stejně velké, ale jednoznačně odlišitelné určitými znaky (např. jemný rošt a horizontální pruhy na stěnách, vs. dno tvořené hrubším roštem a jednobarevná stěna bez pruhů). Uprostřed je menší, vzhledově i taktilně neutrální kompartment, který oba postranní kompartmenty propojuje gilotinovými dveřmi (Pushkina & Šustková-Fišerová, 2014).



Obrázek 1: aparatura pro experiment CPP (zdroj: <https://conductscience.com>)

Celý experiment probíhá ve třech fázích. Během první fáze (preconditioning) se zjistí u subjektů/zvírat přirozená preference prostředí/kompartmentu. Zvíře se umístí do centrálního kompartmentu s otevřenými dvířky a měří se čas, který stráví v každém z bočních kompartmentů (podíl z celkového času, např. 20 min). Komora, ve které stráví méně času, se určí jako nepreferovaný kompartment, druhá je preferovaný kompartment.

Ve druhé fázi (conditioning, podmiňování) se zvíře opakovaně vždy po aplikaci drogy umístí do nepreferované komory (*biased CPP*), resp. po aplikaci vehikula do preferované komory, na přesně určený čas (podle typu drogy) při zavřených dveřích. Tato fáze podmiňování prostředí s drogou trvá několik dní a zde dochází k spárování efektu drogy s podněty v prostředí. Poslední fáze je závěrečný test preference a probíhá analogicky k první fázi. Neaplikuje se droga ani placebo a zvíře se umístí do centrálního kompartmentu s otevřenými dvířky. Znovu se monitoruje čas strávený v obou postranních kompartmentech (Prus et al., 2008; Gardner, 2008; Planeta, 2013).

5.5.1 Interpretace výsledků – statické vyhodnocení CPP

Pokud zvíře stráví statisticky významně víc času v původně nepreferovaném kompartmentu (tom, kde se podávala testovaná látka/droga), znamená to, že látka vyvolala podmíněnou preferenci místa (CPP). Naopak pokud se tomuto kompartmentu zvíře ještě více vyhýbá / stráví významně víc času v původně preferovaném kompartmentu, došlo k navození podmíněné averze k místu (CPA).

Podmíněná preference místa svědčí pro odměňovací účinky testované látky. Zvíře vyhledává danou komoru, protože s pobytem v ní asociuje libý pocit navozený drogou (Lynch et al., 2010).

Některé látky mohou navozovat jak CPP tak CPA, v závislosti na podané dávce. Vedle velikosti dávky je důležitá latence a délka účinku (látky s rychlým nástupem a kratším působením mají výraznější posilovací účinky). Výsledek je dále ovlivněn způsobem aplikace, a také počtem podmiňovacích sezení (látky s nižším odměňovacím potenciálem potřebují více podmiňovacích sezení) (Prus et al., 2008; Bardo et Bevins, 2000).

5.5.2 Použití

CPP je levná, relativně časově nenáročná a poměrně jednoduchá metoda, která testuje přítomnost odměňovacích nebo averzivních účinků zkoumané látky v kontextu s prostředím. Umožňuje zkoumat potenciál látek navodit závislost resp. vyvolat vyhledávání látky. V adiktologickém výzkumu při hledání nových potenciálních léčiv závislosti umožňuje hodnotit schopnost látky snížit odměňovací účinek drogy (resp. snížit vytváření podmíněných vazeb látky s prostředím a navození CPP) a také následně vyhledávání/craving navozený drogou (resp. snížit expresi CPP, které droga vyvolala) (Lynch et al., 2010; Gardner, 2008; Liu et al., 2008).

7. Hypotéza a cíle

Práce se zabývá problematikou uplatnění ghrelinových signalizačních mechanismů v odměňovacích a posilovacích účincích kanabinoidů, konkrétně THC. Na základě předešlých experimentů a dostupné literatury (Charalambous et al., 2021a; Charalambous et al., 2021b) předpokládáme/hypotetizujeme, že farmakologickou blokadou ghrelinového receptoru dojde ke snížení odměňovacích/posilovacích účinků THC, tak jak je kvantifikuje model podmíněné preference místa (CPP), oproti kontrolní skupině.

Naším cílem bylo v potkaním modelu CPP za použití JMV2959, antagonisty GHS-R1A, zjistit zda:

A) akutní premedikace GHS-R1A antagonistou ovlivní projevy THC-navozené preference místa (CPP), tedy znaky „cravingu“ navozeného THC (vyhledávání THC)

B) společná aplikace GHS-R1A antagonisty s THC během podmiňování potlačí vytvoření vazby THC s daným prostředím/potlačí rozvoj CPP, tedy sníží pocit odměny indukovaný podáním THC

8. Metodika

8.1. Pokusná zvířata

Dospělí potkaní samci kmene Wistar (Velaz, Praha, Česká republika) vážící 200-220g na začátku experimentu byli rozděleni do skupin v rámci dvou uspořádání (A: N=8-11, B: N=9-10). 7 dní před začátkem experimentu a mezi experimenty byli potkani umístěni v klecích po 3-4, kde měli volný přístup k vodě a krmivu. V místnosti byla udržována konstantní vlhkost vzduchu (50-60 %), teplota (22-24 °C) a 12hodinový cyklus světla a tmy (6:00-18:00). Přístroj CPP byl standardně osvětlen (45 Lux).

Experimentální postupy zahrnující zvířata a péče o zvířata proběhly v souladu s mezinárodními právními předpisy. Protokoly se řídily směrnicí Rady Evropské unie (86/609/EU, 24 Listopad 1986) a směrnicí EU (2010/63/EU, 22 září 2010) a instrukcemi Národního výboru pro péči a používání laboratorních zvířat. Pokusy schválila Odborná komise pro ochranu pokusných zvířat 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a proběhly v souladu se Zákonem České národní rady na ochranu zvířat (246/1992 Sb, 15. duben 1992).

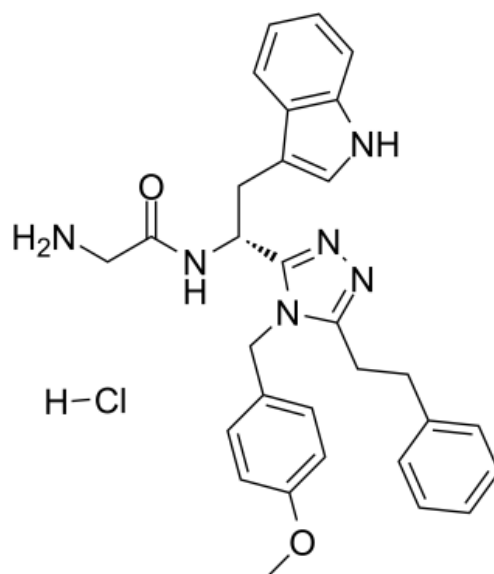
8.2 Chemikálie

Tetrahydrokanabinol/THC bylo připraveno na Ústavu chemie přírodních látek VŠCHT. Sloučeninu JMV2959, derivát 1,2,4-triazolu, prokazaného antagonisty ghrelinového receptoru (Moulin et al., 2007) dodal Anton Bepalov, AbbVie, Ludwigshafen/Rhein, Německo. Obě látky byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku (0,9% NaCl), který byl zároveň použitý jako placebo v kontrolní skupině zvířat. Vzhledem k obtížné rozpustnosti ve vodě, bylo THC nejprve rozpuštěno v jedné kapce Tween 80.

Agonisté kanabinoidních CB1R receptorů (včetně THC) vykazují duální/bifázický efekt: vyšší dávky mají tendenci u pokusných zvířat navodit averzivní a tlumivé účinky, naopak nižší dávky navozují odměňovací a behaviorálně stimulační účinky (Foll et al. 2006). Proto byla pro podmiňování zvolena nižší/odměňovací dávka 0,3 mg/kg. THC bylo podáváno intraperitoneálně (i.p.) v objemu 0,1 ml/100 g tělesné hmotnosti.

Dávky JMV2959 (1 a 3 mg/kg) byly určeny na základě předešlých studií s potkany kmene Wistar (Jerabek et al., 2017, Sustkova-fiserova et. al., 2014) a literatury (Clifford et al., 2012, Jerlhag, 2010). Samotný JMV2959 ve zvolených dávkách neměl významný efekt na lokomoční chování zvířat. JMV2959 bylo rovněž podáváno i.p., v objemu 0,1 ml/100 g tělesné hmotnosti, a to buď 20 minut před závěrečným testem CPP (první uspořádání pokusu), nebo během podmiňovacího procesu spolu s THC (druhé uspořádání). Všechny použité chemikálie byly analytické čistoty a kvality.

JMV2959 bylo na pracovišti školitelky testováno v Morrisově vodním bludišti pro zjištění potenciálního vlivu na paměť. Dávky JMV 1 a 3 mg/kg byly podávány akutně i subchronicky a paměťové funkce u dospělých potkaních samců Wistar nebyly významně ovlivněny v žádném z testovaných uspořádání (v přípravě k publikaci).



Obrázek 2: Molekula JMV2959 hydrochloridu (zdroj: <https://www.medchemexpress.com>)

8.3 Uspořádání metody podmíněné preference místa (CPP)

Metoda *biased conditioned place preference* (CPP) (podrobně popsaná výše) byla použita ve dvou experimentálních uspořádáních. Celý box byl rozdělen na 3 kompartmenty, konstantně osvětlený intenzitou 45 lux. Prostřední kompartment byl neutrální, oddělený od dvou bočních uzavíratelnými dvířky. Pravý boční kompartment měl na stěnách horizontální černobílé pruhy, zatímco levý měl pruhy vertikální, což umožnilo vizuální rozlišení. Zároveň byl v rozdílu v šířce mřížky tvořící podlahu boxu (taktilní rozlišení).

Experiment v jednom uspořádání vždy probíhal 10 dní. 1. den (preconditioning) se zjistilo, který ze 2 kompartmentů potkan preferuje, tj. při možnosti volně se pohybovat v něm stráví větší část (%) celkového času (20 minut). V této fázi se nepodávaly žádné chemikálie. V následujících osmi dnech probíhalo samotné podmiňování (conditioning).

V prvním uspořádání byl dopoledne aplikován fyziologický roztok, vždy v preferovaném kompartmentu (20 min), odpoledne pak THC v kompartmentu nepreferovaném (40 min). Po 4 dnech podmiňování se pořadí prohodilo (THC podáváno dopoledne, fyziologický roztok odpoledne). 10. Den experimentu (postconditioning) byl randomizovaně třetině potkanů aplikován fyziologický roztok, třetině JMV2959 (1 mg/kg) a třetině JMV 2959 (3 mg/kg) 20 minut před testem. Následně se znovu měřil čas strávený v jednotlivých kompartmentech při možnosti volně se pohybovat v propojených boxech.

Ve druhém uspořádání byl dopoledne aplikován fyziologický roztok (20 min), odpoledne THC (40 min), tentokrát zároveň s JMV2959 (1 nebo 3 mg/kg) nebo placebem (fyziologický roztok). 10. den se pouze monitorovala/změřila preference kompartmentů při možnosti volného pohybu v boxech

CPP bylo vždy vypočteno jako rozdíl procentuálních podílů z celkového pokusného času (20 min) stráveného v méně preferovaném kompartmentu před a po podmiňování s THC. JMV2959 ani fyziologický roztok samy o sobě nemají vliv na navození CPP (Jerlhag et al. 2009).

Biased CPP: Uspořádání A		
den 1	přirozená preference místa	Přirozená preference jednoho z kompartmentů
den 2 - 5	podmiňování	Dopoledne aplikace fyziologického roztoku (i.p.) Odpoledne aplikace THC (0,3 mg/kg i.p.)
den 6 - 9	podmiňování	Dopoledne aplikace THC (0,3 mg/kg i.p.) Odpoledne aplikace fyziologického roztoku (i.p.)
den 10	testování CPP	Premedikace JMV2959 (1 nebo 3 mg/kg i.p.) nebo fyziologický roztok (i.p.) 20 min před testem

Tabulka 1: harmonogram experimentu v prvním uspořádání

Biased CPP: Uspořádání B		
den 1	přirozená preference místa	Přirozená preference jednoho z kompartmentů
den 2 - 5	podmiňování	Dopoledne aplikace fyziologického roztoku (i.p.) Odpoledne aplikace THC (0,3 mg/kg i.p.) +JMV2959 (1 nebo 3 mg/kg) nebo placebo
den 6 - 9	podmiňování	Dopoledne aplikace THC (0,3 mg/kg i.p.) +JMV2959 (1 nebo 3 mg/kg) nebo placebo Odpoledne aplikace fyziologického roztoku (i.p.)
den 10	testování CPP	Testování podmíněné preference místa

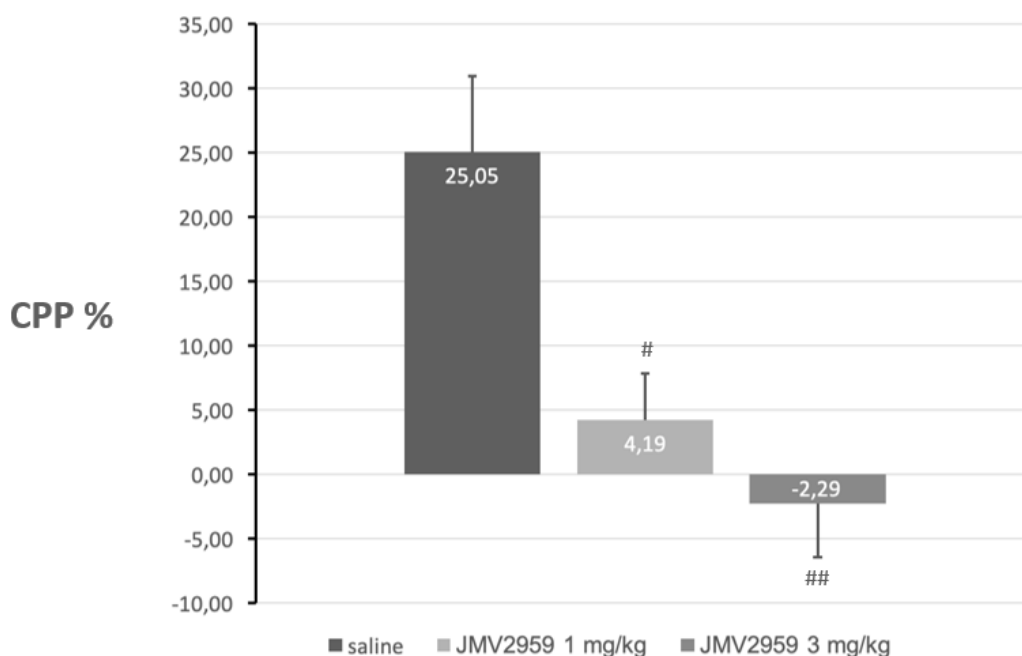
Tabulka 2: harmonogram experimentu ve druhém uspořádání

8.4 Statistická analýza

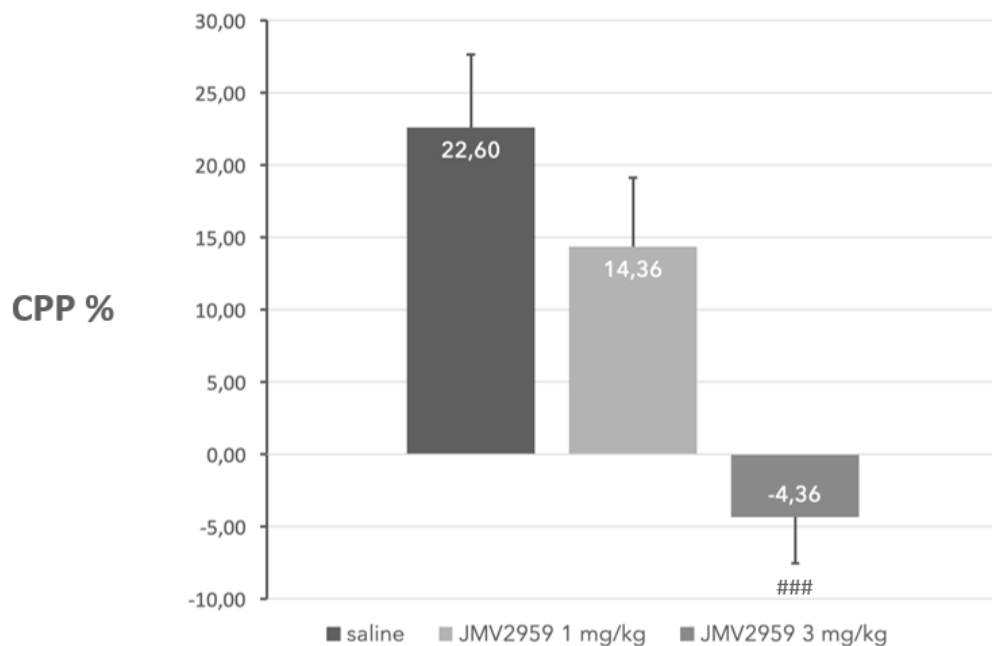
Pro statistickou analýzu dat byl použit program Sigma Plot 13 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). Míra preference místa (CPP) byla vypočtena jako rozdíl procentuálních podílů celkového času stráveného v kompartmentu spárovaném s THC (spontánně méně preferovaném) po podmiňování a před ním. Významnost rozdílu mezi skupinami byla hodnocena jednocestnou analýzou rozptylu ANOVA s následným Holm-Sidakovým post-hoc testem.

9. Výsledky

Podmiňování THC během 8 dní bylo úspěšné a dávka 0,3 mg/kg měla zřetelné odměňovací účinky (navodila podmíněnou preferenci místa). V uspořádání A akutní podání JMV2959 20 minut před postconditioning testem statisticky významně snížilo manifestaci CPP v obou dávkách (1 a 3 mg/kg) v porovnání s kontrolní skupinou, a míra efektu byla závislá na dávce ($p_1=0.013$ a $p_3=0.001$, viz graf 1). V uspořádání B, koaplikace JMV2959 během podmiňování spolu s THC statisticky významně snížila navození CPP v dávce 3 mg/kg ($p<0.001$, viz graf 2). Dávka 1 mg/kg rovněž snížila navození CPP, ale nevýznamně. Oba grafy znázorňují rozdíl procentuálních podílů celkového času stráveného v kompartmentu spárovaném s THC (spontánně méně preferovaném) po podmiňování a před ním (CPP %).



Graf 1: Účinky akutní aplikace antagonisty GHS-R1A na THC-indukovanou CPP u potkanů. Uspořádání A: akutní aplikace JMV2959 20 minut před testem po 8 dnech podmiňování THC dávkou 0,3 mg/kg i.p. u potkanů významně a v závislosti na dávce snížila projevy THC podmíněné preference místa. Efekt JMV2959 ve srovnání s kontrolní skupinou vyjádřen jako # ($p=0.013$); ## ($p=0.001$); saline $N=11$; JMV2959 skupiny $N=8$; průměry \pm SEM



Graf 2: Účinky antagonisty GHS-R1A aplikovaného současně s THC během podmiňování/ rozvoje CPP u potkanů. Uspořádání B: opakovaná aplikace JMV2959 1 mg/kg během podmiňování spolu s THC (0,3 mg/kg i.p) během 8 dní nevýznamně ve srovnání s kontrolní skupinou snížila proces podmiňování místa s aplikací THC ($p=0.404$). Dávka 3 mg/kg snížila rozvoj CPP významně; efekt JMV2959 3 mg/kg ve srovnání s kontrolní skupinou vyjádřen jako ### ($p<0.001$); saline N=10; JMV2959 skupiny N=9; průměr \pm SEM

10. Diskuze a závěr

Výsledky našeho experimentu pokud je nám známo poprvé demonstrovaly, že antagonismus GHS-R1A významně snížil rozvoj i projevy kanabinoidem/THC navozené podmíněné preference místa (CPP) u potkanů. Prezentovaný experiment je součástí recentně publikovaného článku v časopise s quartilem Q1 (Charalambous et al 2021).

Metoda CPP zkoumá hlavně vytváření podmíněných vazeb/asociací podnětů prostředí (cues) s účinkem aplikované drogy, což hraje významnou roli v rozvoji a udržení závislosti (Bardo & Bevins, 2000). Kanabinoidy, včetně tetrahydrokanabinolu/THC, jsou známé svým obecně bifázickým/duálním efektem (Lupica, Riegel & Hoffman, 2004). Nižší dávky THC (mezi 0,1-0,3 mg/kg) jsou spojeny s odměňovacími a stimulačními účinky, zatímco vyšší dávky (1 mg/kg a vyšší) navozují hypoaktivitu a averzi (Foll et al. 2006). V souladu s dostupnou literaturou, podmiňování potkanů v našem experimentu dávkou THC 0,3 mg/kg i.p. navodilo CPP.

Antagonista GHS-R1A (1 a 3 mg/kg JMV2959), aplikován společně s THC během podmiňování, závisle na dávce snížil rozvoj (biased) CPP, avšak pouze vyšší dávka měla statisticky významný efekt ($P < 0.001$). Je dobře doloženo, že kanabinoidy navozují CPP aktivací CB1 receptorů, vzhledem k tomu, že antagonizace těchto receptorů (látkou SR141716A) může účinek zvrátit (Gardner, 2002; Tanda & Goldberg, 2003). Odměňovací/posilující účinky kanabinoidů/THC jsou s největší pravděpodobností zprostředkované mesolimbickými CB1 receptory, spuštěním vyplavení dopaminu v NAc, podobně jako u jiných návykových látek (Manzanares et al. 2018; Tanda et al. 1997; Volkow et al. 2017; Zehra et al. 2018).

Bylo popsáno, že premedikace JMV2959 u hlodavců významně snížila nebo úplně zablokovala vylítní dopaminu indukované alkoholem (Jerlhag et al. 2009), stimulanty (kokain, nikotin, amfetamin) (Jerlhag et al. 2010; Jerlhag & Engel 2011) a opiáty (Engel et al. 2015; Sustkova-Fiserova et al. 2014; Sustkova-Fiserova et al. 2019). V recentním experimentu bylo zároveň zjištěno, že JMV2959 snížilo i vyplavení dopaminu v NAc vyvolané WIN55,212-2 (syntetický CB1R/CB2R agonista) (Charalambous et al., 2021a). Na základě toho předpokládáme, že odměňovací/posilovací účinky THC byly alespoň částečně redukovány antagonizací GHS-R1A-podmíněného vyplavování dopaminu během conditioning fáze, což mělo za následek snížený rozvoj CPP.

Aplikace 1 a 3 mg/kg JMV2959 významně ($P < 0.001$) a v závislosti na dávce redukovala projevy předem THC-navozené CPP, tj. redukovala manifestaci navozené podmíněné preference místa opakovanou zkušeností s THC. To naznačuje, že GHS-R1A antagonismus snížil anticipaci předtím prožívané odměny navozené THC (atribut cravingu). Tomu odpovídají výsledky studií na myších/potkanech, kde ghrelinový antagonismus snížil projevy CPP navozené alkoholem (Jerlhag et al. 2009), stimulanty (Havlickova et al. 2018; Jerlhag et al. 2010; Jerlhag & Engel 2011) a opioidy (Engel et al. 2015; Jerabek et al. 2017; Sustkova-Fiserova et al. 2019). Prezentované výsledky byly nedávno publikovány (Charalambous et al 2021b).

Předchozí studie prokázaly, že JMV2959 samotné nenavozuje CPP (Jerlhag et al. 2009) ani podmíněnou averzi místa (Rodriguez et al. 2018). JMV2959 (1, 3 a 6 mg/kg) taktéž významně neovlivnilo lokomoční aktivitu potkanů (monitorováno od 25. do 45. minuty po administraci JMV2959) (Jerabek et al. 2017).

10.1 Závěr

Prezentované výsledky dokládají účast ghrelinu/GHS-R1A v posilovacích a podmiňovacích účincích tetrahydrokanabinolu (THC). Prokázali jsme, že GHS-R1A antagonismus snížil v modelu s THC u potkanů jak projevy CPP/znak "cravingu", tak snížil rozvoj/navození CPP, pravděpodobně v důsledku redukce pocíťované kanabinoidní odměny. Naše výsledky podporují další výzkum těchto vztahů s potenciálním výhledem nalezení nových možností pro léčbu závislosti na konopí/kanabinoidech.

Literatura

1. Abizaid, A., Liu, Z., Andrews, Z., Shanabrough, M., Borok, E., Elsworth, J., Roth, R., Sleeman, M., Picciotto, M., Tschöp, M., Gao, X. and Horvath, T., 2006. Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *Journal of Clinical Investigation*, 116(12), pp.3229-3239.
2. Addolorato, G., Capristo, E., Leggio, L., Ferrulli, A., Abenavoli, L., & Malandrino, N. et al. (2006). Relationship Between Ghrelin Levels, Alcohol Craving, and Nutritional Status in Current Alcoholic Patients. *Alcoholism: Clinical And Experimental Research*, 30(11), 1933-1937. doi: 10.1111/j.1530-0277.2006.00238.x
3. Alen, F., Crespo, I., Ramírez-López, M., Jagerovic, N., Goya, P., & de Fonseca, F. et al. (2013). Ghrelin-Induced Orexigenic Effect in Rats Depends on the Metabolic Status and Is Counteracted by Peripheral CB1 Receptor Antagonism. *Plos ONE*, 8(4), e60918. doi: 10.1371/journal.pone.0060918
4. Al-Massadi, O., Gabellieri, E., Trujillo, M., Señaris, R., Pagotto, U., & Pasquali, R. et al. (2010). Peripheral Endocannabinoid System-Mediated Actions of Rimonabant on Growth Hormone Secretion are Ghrelin-Dependent. *Journal Of Neuroendocrinology*, 22(11), 1127-1136. doi: 10.1111/j.1365-2826.2010.02065.x
5. Bahi, A., Tolle, V., Fehrentz, J., Brunel, L., Martinez, J., Tomasetto, C., & Karam, S. (2013). Ghrelin knockout mice show decreased voluntary alcohol consumption and reduced ethanol-induced conditioned place preference. *Peptides*, 43, 48-55. doi: 10.1016/j.peptides.2013.02.008
6. Bardo, M., & Bevins, R. (2000). Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward?. *Psychopharmacology*, 153(1), 31-43. doi: 10.1007/s002130000569
7. Carter, L., & Griffiths, R. (2009). Principles of laboratory assessment of drug abuse liability and implications for clinical development. *Drug And Alcohol Dependence*, 105, S14-S25. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2009.04.003
8. Cepko, L., Selva, J., Merfeld, E., Fimmel, A., Goldberg, S., & Currie, P. (2014). Ghrelin alters the stimulatory effect of cocaine on ethanol intake following mesolimbic or systemic administration. *Neuropharmacology*, 85, 224-231. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.05.030
9. Clifford, P.S.; Rodriguez, J.; Schul, D.; Hughes, S.; Kniffin, T.; Hart, N.; Eitan, S.; Brunel, L.; Fehrentz, J.A.; Martinez, J.; et al. Attenuation of cocaine-induced locomotor sensitization in rats sustaining genetic or pharmacologic antagonism of ghrelin receptors. *Addict. Biol.* 2012, 17, 956–963.
10. Colpaert, F. (1999). Drug Discrimination in Neurobiology. *Pharmacology Biochemistry And Behavior*, 64(2), 337–345.
11. Cone, J., Roitman, J. and Roitman, M., 2015. Ghrelin regulates phasic dopamine and nucleus accumbens signaling evoked by food-predictive stimuli. *Journal of Neurochemistry*, 133(6), pp.844-856.
12. Crane, N., Schuster, R., Fusar-Poli, P., & Gonzalez, R. (2012). Effects of Cannabis on Neurocognitive Functioning: Recent Advances, Neurodevelopmental Influences, and Sex Differences. *Neuropsychology Review*, 23(2), 117-137. doi: 10.1007/s11065-012-9222-1

13. Cummings, D., 2006. Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiology & Behavior*, 89(1), pp.71-84.
14. Curran, H., Freeman, T., Mokrysz, C., Lewis, D., Morgan, C., & Parsons, L. (2016). Keep off the grass? Cannabis, cognition and addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(5), 293-306. doi: 10.1038/nrn.2016.28
15. Curran, V., Brignell, C., Fletcher, S., Middleton, P., & Henry, J. (2002). Cognitive and subjective dose-response effects of acute oral Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) in infrequent cannabis users. *Psychopharmacology*, 164(1), 61-70. doi: 10.1007/s00213-002-1169-0
16. ČR, ÚZIS. (2020). MKN-10 klasifikace. Retrieved 2 November 2020, from <https://mkn10.uzis.cz/prohlizec/F12>
17. Darvesh, A., Carroll, R., Geldenhuys, W., Gudelsky, G., Klein, J., Meshul, C. and Van der Schyf, C., 2011. In vivobrain microdialysis: advances in neuropsychopharmacology and drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 6(2), pp.109-127.
18. Davis, K., Wellman, P., & Clifford, P. (2007). Augmented cocaine conditioned place preference in rats pretreated with systemic ghrelin. *Regulatory Peptides*, 140(3), 148-152. doi: 10.1016/j.regpep.2006.12.003
19. Engel, J., Nylander, I., & Jerlhag, E. (2015). A ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonist attenuates the rewarding properties of morphine and increases opioid peptide levels in reward areas in mice. *European Neuropsychopharmacology*, 25(12), 2364-2371. doi: 10.1016/j.euroneuro.2015.10.004
20. Engel, J., Nylander, I., & Jerlhag, E. (2015). A ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonist attenuates the rewarding properties of morphine and increases opioid peptide levels in reward areas in mice. Retrieved 1 November 2020, from
21. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2019). European Drug Report 2019: Trends and Developments. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
22. Farokhnia, M., Grodin, E., Lee, M., Oot, E., Blackburn, A., & Stangl, B. et al. (2017). Exogenous ghrelin administration increases alcohol self-administration and modulates brain functional activity in heavy-drinking alcohol-dependent individuals. *Molecular Psychiatry*, 23(10), 2029-2038. doi: 10.1038/mp.2017.226
23. Foll, B., Wiggins, M., & Goldberg, S. (2006). Nicotine pre-exposure does not potentiate the locomotor or rewarding effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in rats. *Behavioural Pharmacology*, 17(2), 195-199. doi: 10.1097/01.fbp.0000197460.16516.81
24. Gardner, E. (2002). Addictive potential of cannabinoids: the underlying neurobiology. *Chemistry And Physics Of Lipids*, 121(1-2), 267-290. doi: 10.1016/s0009-3084(02)00162-7
25. Gardner, E., 2008. Use of animal models to develop antiaddiction medications. *Current Psychiatry Reports*, 10(5), pp.377-384.
26. Glennon, R., & Young, R. (2011). An introduction to drug discrimination. In R. Glennon & R. Young, *Drug Discrimination: Applications to Medicinal Chemistry and Drug Studies*, (1st ed.). Wiley.
27. Gnanapavan, S., Kola, B., Bustin, S., Morris, D., McGee, P., Fairclough, P., Bhattacharya, S., Carpenter, R., Grossman, A. and Korbonits, M., 2002. The Tissue Distribution of the mRNA of Ghrelin and Subtypes of Its Receptor, GHS-R, in

- Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(6), pp.2988-2991.
28. Hall, W., & Solowij, N. (1998). *Adverse effects of cannabis*. Lecture.
 29. Hardwick, S., & King, L. (2008). *Home Office cannabis potency study 2008*. St Albans: Home Office Scientific Development Branch.
 30. Havlickova, T., Charalambous, C., Lapka, M., Puskina, N., Jerabek, P., & Sustkova-Fiserova, M. (2018). Ghrelin Receptor Antagonism of Methamphetamine-Induced Conditioned Place Preference and Intravenous Self-Administration in Rats. *International Journal Of Molecular Sciences*, 19(10), 2925. doi: 10.3390/ijms19102925
 31. Hillard, C. (2015). The Endocannabinoid Signaling System in the CNS. *International Review Of Neurobiology*, 1-47. doi: 10.1016/bs.irn.2015.10.001
 32. Hirvonen, J., Goodwin, R., Li, C., Terry, G., Zoghbi, S., & Morse, C. et al. (2011). Reversible and regionally selective downregulation of brain cannabinoid CB1 receptors in chronic daily cannabis smokers. *Molecular Psychiatry*, 17(6), 642-649. doi: 10.1038/mp.2011.82
 33. Charalambous, C., Lapka, M., Havlickova, T., Syslova, K., & Sustkova-Fiserova, M. (2021a). Alterations in Rat Accumbens Dopamine, Endocannabinoids and GABA Content During WIN55,212-2 Treatment: The Role of Ghrelin. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(1), 210. doi: 10.3390/ijms22010210
 34. Charalambous, C., Havlickova, T., Lapka, M., Puskina, N., Šlamberová, R., Kuchar, M., & Sustkova-Fiserova, M. (2021b). Cannabinoid-Induced Conditioned Place Preference, Intravenous Self-Administration, and Behavioral Stimulation Influenced by Ghrelin Receptor Antagonism in Rats. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(5), 2397. doi: 10.3390/ijms22052397
 35. Iversen, L. (2003). Cannabis and the brain. *Brain*, 126(6), 1252-1270. doi: 10.1093/brain/awg143
 36. Jacobus, J., & Tapert, S. (2014). Effects of Cannabis on the Adolescent Brain. *Current Pharmaceutical Design*, 20(13), 2186-2193. doi: 10.2174/13816128113199990426
 37. Jerabek, P., Havlickova, T., Puskina, N., Charalambous, C., Lapka, M., Kacer, P., & Sustkova-Fiserova, M. (2017). Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced conditioned place preference and behavioral and accumbens dopaminergic sensitization in rats. *Neurochemistry International*, 110, 101-113. doi: 10.1016/j.neuint.2017.09.013
 38. Jerlhag, E., & Engel, J. (2011). Ghrelin receptor antagonism attenuates nicotine-induced locomotor stimulation, accumbal dopamine release and conditioned place preference in mice. *Drug And Alcohol Dependence*, 117(2-3), 126-131. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2011.01.010
 39. Jerlhag, E., 2008. Systemic administration of ghrelin induces conditioned place preference and stimulates accumbal dopamine. *Addiction Biology*, 13(3-4), pp.358-363.
 40. Jerlhag, E., Egecioglu, E., Dickson, S., & Engel, J. (2010). Ghrelin receptor antagonism attenuates cocaine- and amphetamine-induced locomotor stimulation, accumbal dopamine release, and conditioned place preference. *Psychopharmacology*, 211(4), 415-422. doi: 10.1007/s00213-010-1907-7

41. Jerlhag, E., Eggecioglu, E., Dickson, S., Douhan, A., Svensson, L. and Engel, J., 2007. Ghrelin administration into tegmental areas stimulates locomotor activity and increases extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens. *Addiction Biology*, 12(1), pp.6-16.
42. Jerlhag, E., Eggecioglu, E., Landgren, S., Salome, N., Heilig, M., & Moechars, D. et al. (2009). Requirement of central ghrelin signaling for alcohol reward. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 106(27), 11318-11323. doi: 10.1073/pnas.0812809106
43. Kalafateli, A., Vallöf, D., Jörnulf, J., Heilig, M., & Jerlhag, E. (2018). A cannabinoid receptor antagonist attenuates ghrelin-induced activation of the mesolimbic dopamine system in mice. *Physiology & Behavior*, 184, 211-219. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.12.005
44. Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., & Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402.
45. Kola, B., Farkas, I., Christ-Crain, M., Wittmann, G., Lolli, F., & Amin, F. et al. (2008). The Orexigenic Effect of Ghrelin Is Mediated through Central Activation of the Endogenous Cannabinoid System. *Plos ONE*, 3(3), e1797. doi: 10.1371/journal.pone.0001797
46. Koob, G., & Volkow, N. (2009). Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217-238. doi: 10.1038/npp.2009.110
47. Koob, G., Caine, F., Roberts, B. and Parsons, L., 2007. Drug self-administration and microdialysis in rodents. In: J. Crawley, ed., *What's wrong with my mouse? Strategies for rodent behavior phenotyping*. San Diego, CA: Society for Neuroscience, pp.35-54.
48. Koopmann, A., von der Goltz, C., Grosshans, M., Dinter, C., Vitale, M., Wiedemann, K., & Kiefer, F. (2012). The association of the appetitive peptide acetylated ghrelin with alcohol craving in early abstinent alcohol dependent individuals. *Psychoneuroendocrinology*, 37(7), 980-986. doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.11.005
49. Lee, M., Tapocik, J., Ghareeb, M., Schwandt, M., Dias, A., & Le, A. et al. (2018). The novel ghrelin receptor inverse agonist PF-5190457 administered with alcohol: preclinical safety experiments and a phase 1b human laboratory study. *Molecular Psychiatry*, 25(2), 461-475. doi: 10.1038/s41380-018-0064-y
50. Leggio, L., Ferrulli, A., Cardone, S., Nesci, A., Miceli, A., & Malandrino, N. et al. (2011). Ghrelin system in alcohol-dependent subjects: role of plasma ghrelin levels in alcohol drinking and craving. *Addiction Biology*, 17(2), 452-464. doi: 10.1111/j.1369-1600.2010.00308.x
51. Lim, C., Kola, B., Feltrin, D., Perez-Tilve, D., Tschöp, M., Grossman, A., & Korbonits, M. (2013). Ghrelin and cannabinoids require the ghrelin receptor to affect cellular energy metabolism. Retrieved 1 November 2020, from
52. Liu, Y., Foll, B. L., Liu, Y., Wang, X., & Lu, L. (2008). Conditioned place preference induced by licit drugs: establishment, extinction, and reinstatement. *The Scientific World Journal*, 8, 1228–1245.
53. Lopez-Quintero, C., Cobos, J., Hasin, D., Okuda, M., Wang, S., Grant, B., & Blanco, C. (2011). Probability and predictors of transition from first use to dependence on nicotine, alcohol, cannabis, and cocaine: Results of the National

- Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions (NESARC). *Drug And Alcohol Dependence*, 115(1-2), 120-130. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2010.11.004
54. Lubman, D., Cheetham, A., & Yücel, M. (2015). Cannabis and adolescent brain development. *Pharmacology & Therapeutics*, 148, 1-16. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.009
 55. Lupica, C., Riegel, A., & Hoffman, A. (2004). Marijuana and cannabinoid regulation of brain reward circuits. *British Journal Of Pharmacology*, 143(2), 227-234. doi: 10.1038/sj.bjp.0705931
 56. Lynch, W. J., Nicholson, K. L., Dance, M. E., Morgan, R. W., & Foley, P. L. (2010). Animal models of substance abuse and addiction: implications for science, animal welfare, and society. *Comparative medicine*, 60(3), 177-188.
 57. Maldonado, R., Berrendero, F., Ozaita, A., & Robledo, P. (2011). Neurochemical basis of cannabis addiction. *Neuroscience*, 181, 1-17. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.02.035
 58. Malik, S., McGlone, F., Bedrossian, D. and Dagher, A., 2008. Ghrelin Modulates Brain Activity in Areas that Control Appetitive Behavior. *Cell Metabolism*, 7(5), pp.400-409.
 59. Manzanares, J., Cabañero, D., Puente, N., García-Gutiérrez, M., Grandes, P., & Maldonado, R. (2018). Role of the endocannabinoid system in drug addiction. *Biochemical Pharmacology*, 157, 108-121. doi: 10.1016/j.bcp.2018.09.013
 60. Miovský, M. (2008). Konopí a konopné drogy, Adiktologické kompendium (1st ed.). Praha: Grada.
 61. Moulin, A., Brunel, L., Boeglin, D., Demange, L., Ryan, J., & M'Kadmi, C. et al. (2012). The 1,2,4-triazole as a scaffold for the design of ghrelin receptor ligands: development of JMV 2959, a potent antagonist. *Amino Acids*, 44(2), 301-314. doi: 10.1007/s00726-012-1355-2
 62. Moulin, A., Ryan, J., Martinez, J., & Fehrentz, J. (2007). Recent Developments in Ghrelin Receptor Ligands. *Chemmedchem*, 2(9), 1242-1259. doi: 10.1002/cmdc.200700015
 63. Mravčík, V., Chomynová, P., Grohmannová, K., Janíková, B., Černíková, T., & Rous, Z. et al. (2019). Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2018. Praha: Úřad vlády České republiky.
 64. Müller, T., Nogueiras, R., Andermann, M., Andrews, Z., Anker, S., Argente, J., Batterham, R., Benoit, S., Bowers, C., Broglio, F., Casanueva, F., D'Alessio, D., Depoortere, I., Geliebter, A., Ghigo, E., Cole, P., Cowley, M., Cummings, D., Dagher, A., Diano, S., Dickson, S., Diéguez, C., Granata, R., Grill, H., Grove, K., Habegger, K., Heppner, K., Heiman, M., Holsen, L., Holst, B., Inui, A., Jansson, J., Kirchner, H., Korbonits, M., Laferrère, B., LeRoux, C., Lopez, M., Morin, S., Nakazato, M., Nass, R., Perez-Tilve, D., Pfluger, P., Schwartz, T., Seeley, R., Sleeman, M., Sun, Y., Sussel, L., Tong, J., Thorner, M., van der Lely, A., van der Ploeg, L., Zigman, J., Kojima, M., Kangawa, K., Smith, R., Horvath, T. and Tschöp, M., 2015. Ghrelin. *Molecular Metabolism*, 4(6), pp.437-460.
 65. Nogueiras, R., Romero-Picó, A., Vazquez, M., Novelle, M., López, M., & Diéguez, C. (2012). The Opioid System and Food Intake: Homeostatic and Hedonic Mechanisms. *Obesity Facts*, 5(2), 196-207. doi: 10.1159/000338163
 66. Panagopoulos, V. and Ralevski, E., 2014. The role of ghrelin in addiction: a review. *Psychopharmacology*, 231(14), pp.2725-2740.

67. Panagopoulos, V., & Ralevski, E. (2014). The role of ghrelin in addiction: a review. *Psychopharmacology*, 231(14), 2725-2740. doi: 10.1007/s00213-014-3640-0
68. Pertwee, R. (2008). The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. *British Journal Of Pharmacology*, 153(2), 199-215. doi: 10.1038/sj.bjp.0707442
69. Planeta, C. S. (2013). Animal models of alcohol and drug dependence. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 35(2), 140–146.
70. Pope, H., Gruber, A., Hudson, J., Huestis, M., & Yurgelun-Todd, D. (2001). Neuropsychological Performance in Long-term Cannabis Users. *Archives Of General Psychiatry*, 58(10), 909. doi: 10.1001/archpsyc.58.10.909
71. Prus, A. J., James, J. R., & Rosecrans, J. A. (2008). Conditioned place preference. In: Buccafusco, J. J. (Ed.), *Methods of behavior analysis in neuroscience*, 2nd edition (s. 59–76). Boca Raton (FL): CRC Press.
72. Pushkina, N., & Šustková-Fišerová, M. (2014). Pre-clinical Addiction Research: Selected Methods [Vybrané metody preklinického výzkumu v adiktologii]. *Adiktologie*, 14(3), 264–283.
73. Rodriguez, J., Fehrentz, J., Martinez, J., Ben Haj Salah, K., & Wellman, P. (2018). The GHR-R antagonist JMV 2959 neither induces malaise nor alters the malaise property of LiCl in the adult male rat. *Physiology & Behavior*, 183, 46-48. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.10.017
74. Sanchis-Segura, C., & Spanagel, R. (2006). Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addiction Biology*, 11.
75. Schellekens, H., Dinan, T. and Cryan, J., 2013. Ghrelin At the Interface of Obesity and Reward. *Vitamins & Hormones*, pp.285-323.
76. SCHNEIDER, M., & KOCH, M. (2007). The effect of chronic peripubertal cannabinoid treatment on deficient object recognition memory in rats after neonatal mPFC lesion. *European Neuropsychopharmacology*, 17(3), 180-186. doi: 10.1016/j.euroneuro.2006.03.009
77. Schreiner, A., & Dunn, M. (2012). Residual effects of cannabis use on neurocognitive performance after prolonged abstinence: A meta-analysis. *Experimental And Clinical Psychopharmacology*, 20(5), 420-429. doi: 10.1037/a0029117
78. Sustkova-Fiserova, M., Charalambous, C., Havlickova, T., Lapka, M., Jerabek, P., Puskina, N., & Syslova, K. (2017). Alterations in Rat Accumbens Endocannabinoid and GABA Content during Fentanyl Treatment: The Role of Ghrelin. *International Journal Of Molecular Sciences*, 18(11), 2486. doi: 10.3390/ijms18112486
79. Sustkova-Fiserova, M., Jerabek, P., Havlickova, T., Kacer, P., & Krsiak, M. (2014). Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced accumbens dopamine release and behavioral stimulation in rats. *Psychopharmacology*, 231(14), 2899-2908. doi: 10.1007/s00213-014-3466-9
80. Sustkova-Fiserova, M., Puskina, N., Havlickova, T., Lapka, M., Syslova, K., Pohorala, V., & Charalambous, C. (2019). Ghrelin receptor antagonism of fentanyl-induced conditioned place preference, intravenous self-administration, and dopamine release in the nucleus accumbens in rats. *Addiction Biology*, 25(6). doi: 10.1111/adb.12845
81. Šustková, M., 2015. Neurobiologie závislostí. In: K. Kalina., *Klinická adiktologie*.

82. Tanda, G. (1997). Cannabinoid and Heroin Activation of Mesolimbic Dopamine Transmission by a Common μ 1 Opioid Receptor Mechanism. *Science*, 276(5321), 2048-2050. doi: 10.1126/science.276.5321.2048
83. Tanda, G., & Goldberg, S. (2003). Cannabinoids: reward, dependence, and underlying neurochemical mechanisms? a review of recent preclinical data. *Psychopharmacology*, 169(2), 115-134. doi: 10.1007/s00213-003-1485-z
84. Tomoda, K., Kubo, K., Nishii, Y., Yamamoto, Y., Yoshikawa, M., & Kimura, H. (2012). Changes of ghrelin and leptin levels in plasma by cigarette smoke in rats. *The Journal Of Toxicological Sciences*, 37(1), 131-138. doi: 10.2131/jts.37.131
85. Torregrossa, M., & Kalivas, P. (2008). Microdialysis and the neurochemistry of addiction. *Pharmacology Biochemistry And Behavior*, 90(2), 261-272. doi: 10.1016/j.pbb.2007.09.001
86. van der Lely, A., Tschöp, M., Heiman, M. and Ghigo, E., 2004. Biological, Physiological, Pathophysiological, and Pharmacological Aspects of Ghrelin. *Endocrine Reviews*, 25(3), pp.426-457.
87. Volkow, N., Baler, R., Compton, W., & Weiss, S. (2014). Adverse Health Effects of Marijuana Use. *New England Journal Of Medicine*, 370(23), 2219-2227. doi: 10.1056/nejmra1402309
88. Volkow, N., Hampson, A., & Baler, R. (2017). Don't Worry, Be Happy: Endocannabinoids and Cannabis at the Intersection of Stress and Reward. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology*, 57(1), 285-308. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-104615
89. Wellman, P., Clifford, P., & Rodriguez, J. (2013). Ghrelin and ghrelin receptor modulation of psychostimulant action. *Frontiers In Neuroscience*, 7. doi: 10.3389/fnins.2013.00171
90. Zehra, A., Burns, J., Liu, C., Manza, P., Wiers, C., Volkow, N., & Wang, G. (2018). Cannabis Addiction and the Brain: a Review. *Journal Of Neuroimmune Pharmacology*, 13(4), 438-452. doi: 10.1007/s11481-018-9782-9