

Parte Quarta

Approfondimenti

CAPITOLO IV.1.

RISULTATI DEI PROGETTI DEL NETWORK NAZIONALE DI RICERCA SULLE DIPENDENZE

Centri Collaborativi del DPA:

- Centro di Neurofarmacologia presso Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano
- Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro".
- Dipartimento di Sanità Pubblica e Medicina di Comunità, Sez. Farmacologia, Università di Verona
- Dipartimento delle Dipendenze, Azienda ULSS 20 Verona
- Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Reparto di Neuroscienze Comportamentali, Istituto Superiore di Sanità
- Servizio Tossicodipendenze ed Alcolologia ASL BIELLA
- Dipartimento di Genetica, Biologia dei Microrganismi, Antropologia, Evoluzione, Università degli Studi di Parma
- Dipartimento di Farmacologia Chemioterapia Tossicologia Medica, Università degli Studi di Milano
- Dipartimento di Psichiatria, Seconda Università di Napoli
- Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica (ora Sanità Pubblica e Medicina di Comunità), sezione di Medicina Legale, Università degli Studi di Verona
- Dipartimento di Tossicologia, Università degli Studi di Cagliari
- Laboratorio di Analisi Farmaco-Tossicologica, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Facoltà di Farmacia, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

IV.1 Risultati dei progetti di Ricerca

Il piano progetti 2010 ha previsto il finanziamento a sostegno della realizzazione di ricerche sperimentali cliniche e precliniche utili a migliorare la conoscenza su meccanismi genetici, biologici farmacologici e comportamentali che connotano il consumo di sostanze stupefacenti. Molti studi sono condotti in ambito sperimentale di laboratorio per poi poter proiettare i risultati ottenuti e le evidenze osservate sull'uomo (ricerca traslazionale).

Sono stati approvati 15 progetti di ricerca per un totale di 492.000€, pari al 4% del budget complessivo finanziato (oltre 26.000.000€).

Dei 15 Enti di ricerca che hanno usufruito dei finanziamenti, la maggior parte sono Centri Universitari distribuiti su tutto il territorio nazionale: ogni sede coinvolta è stata identificata anche come Centro collaborativo del DPA all'interno del Network Nazionale di Ricerca sulle Dipendenze (NNRD).

Figura IV.4.1: Network Nazionale di Ricerca sulle Dipendenze



Fonte: Dipartimento Politiche Antidroga

Si riporta una rassegna sintetica dei principali risultati fino ad ora ottenuti dalle ricerche avviate, molte delle quali sono ancora in corso di completamento.

Visti i contenuti altamente tecnici e scientifici dei contributi originali pervenuti, ove possibile è stato condotto un adattamento dei testi per renderli maggiormente comprensibili anche ai non esperti.

Progetto CAINO: Alterazioni cerebrali indotte dall'uso di cannabinoidi e cocaina in età adolescenziale: studio dei meccanismi molecolari in modelli sperimentali

Titolo progetto

Fabio Fumagalli, Lucia Caffino, Giuseppe Giannotti, Francesca Bamberghi, Giorgio Racagni

Autore/i

Centro di Neurofarmacologia presso Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano

Ente Affidatario
Centro collaborativo**Obiettivi**

Valutare la possibilità che l'esposizione precoce a cocaina o cannabinoidi possa determinare modificazioni persistenti nella funzionalità del sistema nervoso centrale attraverso una riduzione della plasticità cellulare nell'animale da laboratorio.

Metodi

Gli esperimenti sono stati effettuati secondo queste modalità e tempistiche:

Esperimento 1: gli animali sono stati divisi in due gruppi (n=10 per gruppo); un gruppo ha ricevuto iniezioni quotidiane di salina e un gruppo di cocaina (20 mg/kg) a partire dal giorno post-natale (PND) 29 fino al giorno PND 42. Gli animali sono stati quindi lasciati fino al PND 90 nelle loro gabbie e quindi sacrificati.

Esperimento 2: gli animali sono stati divisi in due gruppi (n=10 per gruppo); un gruppo ha ricevuto iniezioni quotidiane di salina e un gruppo di cocaina (20 mg/kg) a partire dal giorno PND 29 fino al giorno PND 42. Gli animali sono stati quindi lasciati fino al giorno 45 nelle loro gabbie, cioè tre giorni dopo l'ultima iniezione, e quindi sacrificati.

Sono quindi stati estratti i tessuti cerebrali di interesse (corteccia prefrontale e nucleo accumbens) ed analizzati mediante la tecnica di Western blotting.

Risultati

Nel nucleus accumbens, abbiamo osservato un aumento della fosforilazione delle subunità NR1 ed NR2B del recettore NMDA e della fosforilazione della subunità GluR1 del recettore AMPA, senza nessun cambiamento di espressione della proteina. Non si sono invece osservate modificazioni significative nella corteccia prefrontale.

Di contro, nell'animale diventato adulto, abbiamo osservato una marcata riduzione dell'espressione e della fosforilazione della principale subunità AMPA GluR1 in corteccia prefrontale. Nessun effetto significativo è stato invece osservato nel nucleo accumbens.

Conclusioni

Globalmente, questi risultati indicano che il trattamento adolescenziale con cocaina provoca dei cambiamenti a breve e lungo termine del sistema glutammatergico che potrebbero rappresentare la base per comportamenti alterati in età adulta o, addirittura, predisporre all'uso di stupefacenti.

Una prima osservazione identifica quindi un ruolo preciso del nucleo accumbens, come area cerebrale responsabile degli effetti glutammatergici a breve termine dello psicostimolante durante l'adolescenza, indicando quindi un effetto transeunte della attivazione della sinapsi glutammatergica. Tale effetto è

particolarmente interessante in quanto il nucleo accumbens è cruciale per i meccanismi di ricompensa e 'drug-seeking'.

La seconda osservazione riguarda l'effetto del trattamento cronico adolescenziale con cocaina sull'attivazione ed espressione della subunità GluR1 dei recettori AMPA che si riduce in modo significativo e marcato 48 giorni dopo l'ultima somministrazione, cioè nell'animale adulto. Questo potrebbe alterare i processi di apprendimento nell'individuo dipendente da cocaina, individuo che quindi non sarebbe più in grado di percepire il comportamento di dipendenza dalla cocaina come deleterio.

Tuttavia, sulla base dei nostri risultati, non possiamo escludere che la riduzione dell'espressione dell'attività e dell'espressione del recettore GluR1 sia un effetto causato dall'astinenza dalla cocaina.

Globalmente, i nostri risultati indicano il sistema glutammatergico come un bersaglio preferenziale dell'esposizione cronica a cocaina durante l'adolescenza.

Progetto CITOS: Valutazione della risposta immunitaria cellulo-mediata verso il virus HCV nella popolazione tossicodipendente da eroina o in trattamento sostitutivo

Titolo progetto

Giuseppa Occhino, Rosalba Minisini, Elisa Boccatto e Mario Pirisi.

Autore/i

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro"

Ente Affidatario
Centro collaborativo*Obiettivi*

Il 50-90% dei tossicodipendenti risulta cronicamente infetto dal virus dell'epatite C (HCV). Molti infettivologi ed epatologi considerano a tutt'oggi questi pazienti non proponibili per il trattamento antivirale, a causa dello stato di immunosoppressione provocato dalle sostanze d'abuso. Dati recenti hanno, però, messo in evidenza come al trattamento farmacologico con metadone, oppioide a lunga emivita, segua un recupero delle funzioni immunitarie. Obiettivo principale dello studio, quindi, è verificare il ripristino dell'immunità cellulo-mediata nei confronti di specifici epitopi del virus C dell'epatite, in pazienti in trattamento sostitutivo con oppiacei a lunga emivita e confermare il potenziale protettivo di immunostimolazione dei suddetti farmaci.

Metodi

Il disegno sperimentale si propone di analizzare tre categorie di soggetti: pazienti HCV tossicodipendenti da oppiacei; pazienti HCV in trattamento con metadone; donatori sani. La tecnica prescelta per l'analisi è l'Elispot, una metodica immunoenzimatica che sfrutta la stimolazione diretta dei linfomonociti (PBMC) con epitopi scelti ad hoc.

Risultati

Inizialmente sono stati selezionati dalla letteratura scientifica due peptidi della proteina core di HCV. I risultati ottenuti sui soggetti sani mostravano un alto background ed una risposta paragonabile ai pazienti HCV.

Conclusioni

Attualmente sono stati testati soggetti sani e pazienti HCV con valori rilevabili di viremia e siamo in attesa dell'autorizzazione del comitato etico per l'arruolamento dei pazienti tossicodipendenti.

Progetto COMET STUDY: Valutazione di effetti citotossici e genotossici in soggetti esposti a tetraidrocannabinoli (THC)

Titolo progetto

Fracasso Maria Enrica^a, Doria Denise^a, Scotton Alessia^a, Gomma Maurizio^b, Bosco Oliviero^b.

Autore/i

^aDipartimento di Sanità Pubblica e Medicina di Comunità, Sez. Farmacologia, Università di Verona

Ente Affidatario
Centro collaborativo

^bDipartimento delle Dipendenze, Azienda ULSS 20 Verona

Obiettivi

Il progetto si propone di verificare se soggetti abituali utilizzatori di cannabinoidi presentano danni al DNA in cellule della mucosa buccale, e se la frequenza e l'intensità del danno genotossico variano in funzione dell'età, dell'entità di esposizione e/o della co-assunzione di altre droghe.

Metodi

Lo studio è stato condotto su un campione di soggetti (n=44) afferenti al Dipartimento delle Dipendenze e ai Servizi per le Dipendenze di Verona. Ai partecipanti è stato sottoposto un questionario per la raccolta di informazioni riguardo l'uso di droghe e presenza di eventuali elementi di confondimento. Un analogo gruppo (n=30) di soggetti fumatori di tabacco (15-20 sigarette al giorno) è stato considerato come gruppo di controllo.

La presenza del danno genotossico è stata valutata in campioni di cellule della mucosa buccale prelevati da ciascun partecipante alla ricerca. Il prelievo di cellule della mucosa buccale è stato effettuato mediante l'utilizzo di uno spazzolino citologico.

Il rilevamento del danno di base del DNA è stato studiato mediante "Comet assay". Il danno al DNA viene valutato come: i) percentuale del DNA nella coda della cometa (% DNA), ii) lunghezza della coda (μm), misurata dal centro della testa della cometa (TL), e iii) momento della coda (TM), definito come prodotto integrato dei due precedenti parametri.

Risultati

I risultati ottenuti mediante comet assay in cellule della mucosa buccale mettono in evidenza un aumento, anche se non significativo, del TM nei soggetti abituali utilizzatori di THC (n=44) rispetto ai valori medi riscontrati nel gruppo di controllo. La percentuale di DNA (%DNA) e la lunghezza della coda (TL) risultano immutate rispetto ai controlli fumatori (n=30).

E' da notare che dall'analisi dei singoli dati un piccolo gruppo di soggetti-THC (11) presenta valori minimi di danno più alti rispetto ai controlli, in tutti e tre i parametri del comet, mentre i valori massimi sono analoghi in ambedue i gruppi.

La valutazione del danno citogenetico nelle cellule della mucosa buccale, mediante il test dei micronuclei, indica che l'abituale utilizzo di cannabinoidi da parte dei soggetti analizzati produce un aumento significativo nella frequenza dei MN ($p=0.031$) e dei Bud nucleari ($p=0.016$) rispetto al gruppo di controllo, la percentuale di cellule binucleate (BN) risulta immutata.

In questo test citogenetico, i valori minimi di danno registrati sono del tutto simili nei due gruppi, mentre i valori di danno più alti si riscontrano nel gruppo-THC rispetto ai valori di controllo.

Conclusioni

I dati ottenuti utilizzando il comet assay come marker di danno precoce indicano che le cellule della mucosa buccale provenienti dai soggetti che assumono THC mediamente non presentano un significativo aumento nei parametri caratterizzanti il danno al DNA, rispetto ai valori ottenuti nel gruppo di controllo.

Il test dei micronuclei, che rivela danni citogenetici che si producono durante la replicazione cellulare, indica invece che il gruppo che assume THC presenta un significativo aumento nella frequenza di cellule con micronuclei (MN, perdita di materiale genetico dal nucleo centrale) e Bud (cellula con gemma nucleare) rispetto al gruppo di controllo.

Questi dati (dopo aver ottenuto una casistica sufficiente) verranno successivamente analizzati correlando i danni al DNA cellulare con dati di anamnesi (fumo, alcol, ecc.) e con altri parametri urinari, quali presenza di THC o altre sostanze assunte.

Progetto ECS EMOTION: Il sistema endocannabinoide nelle regolazioni emozionali: identificazione di fattori di rischio e protezione in fasi precoci dello sviluppo

Titolo progetto

Simone Macrì e Giovanni Laviola

Autore/i

Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Reparto di Neuroscienze Comportamentali, Istituto Superiore di Sanità

Ente Affidatario
Centro collaborativo

Obiettivi

L'obiettivo generale dello studio è quello di comprendere, tramite l'utilizzo di modelli sperimentali animali, il coinvolgimento del sistema endocannabinoide nelle regolazioni emozionali e come l'organizzazione neurobiologica finale sia sotto modulazione di eventi ambientali di varia natura in fase precoce per l'individuazione di fattori di rischio e protezione

Metodi

Al fine di esporre i roditori a stress durante la fase di gravidanza sono state adottate due metodologie: in un primo studio, femmine di ratto gravide, sono state sottoposte a stress da contenzione durante sessioni giornaliere di 45 minuti, nell'ultimo terzo (dal giorno 14 al giorno 21) della gestazione. Nello stesso studio, al fine di fornire una stimolazione ritenuta potenzialmente positiva e quindi in grado di contrastare le conseguenze dello stress precoce, è stata fornita ai ratti l'opportunità di interazioni sociali affiliative durante l'adolescenza. In un secondo studio, con lo scopo di modulare in maniera sistematica i livelli di stress precoce, femmine di topo sono state trattate in gravidanza con dosi moderate o viceversa elevate di corticosterone (33 e 100mg/l nell'acqua da bere). Questo ormone viene generalmente secreto in seguito a stress di diversa entità e, durante la gravidanza, attraversando la placenta viene così direttamente trasmesso al feto. La somministrazione di questo ormone è volta a mimare le conseguenze di stress lievi o intensi percepiti dalla madre durante la gravidanza. Successivamente, al fine di analizzare le conseguenze sulla prole di questi eventi stressanti, sono state effettuate le seguenti analisi: (i) misurazione delle concentrazioni di endocannabinoidi in specifiche aree cerebrali e del comportamento emozionale in ratti neonati in risposta a una breve separazione dalla madre; (ii) valutazione, mediante spettroscopia a risonanza magnetica (MRS) di indici di metabolismo cerebrale in conseguenza di un trattamento in adolescenza con un agonista indiretto dei recettori CB1 (URB597, un inibitore dell'enzima di degradazione dell'anandamide), in soggetti resi vulnerabili dallo stress prenatale; (iii) negli stessi soggetti sono stati anche analizzati gli stati emozionali. In particolare, sono stati valutati sia parametri di base come l'attività locomotoria e la crescita ponderale, sia risposte a test atti a valutare sintomi isomorfi all'ansia (test del *plus-maze*) e all'anedonia (ovvero la scarsa propensione ad adoperarsi per ottenere un rinforzo), sintomo cardine degli stati depressivi.

Risultati

Nel primo studio abbiamo osservato che, sebbene lo stress prenatale alteri la capacità dei neonati di interagire efficacemente con la madre (ridotta emissione di vocalizzazioni ultrasoniche), questo non modifichi i livelli cerebrali di endocannabinoidi AEA e 2-AG. Viceversa, l'esposizione a uno stress acuto in fase neonatale (una breve separazione dalla madre), oltre a indurre una forte

attivazione emozionale che si associa a un aumento dei livelli di corticosterone, riduce notevolmente i livelli di AEA nell'area ippocampale. Infine, l'esposizione a stimoli sociali positivi in adolescenza stimola significativamente i livelli di AEA in specifiche aree cerebrali. Nel secondo studio abbiamo osservato che i topi sottoposti a stress in gravidanza non presentano la normale risposta di ipoattività locomotoria indotta dall'URB597. Inoltre, la somministrazione di URB597 in adolescenza si associa a un profilo di anedonia a lungo termine. Lo stress prenatale, oltre ad avere effetti analoghi sull'attività locomotoria, sembra aumentare i livelli d'ansia a lungo termine. Infine, entrambi i fattori (stress prenatale e stimolazione farmacologica del sistema endocannabinoide in adolescenza) alterano alcuni parametri del metabolismo cerebrale a lungo termine, studiato con spettroscopia a risonanza magnetica. In particolare l'URB597 riduce i livelli di inositolo e di taurina nella corteccia prefrontale, mentre lo stress precoce sembra ridurre i livelli di inositolo nell'ipotalamo.

Conclusioni

Gli studi condotti supportano l'ipotesi che i sistemi fisiologici preposti alla risposta di stress, e quelli responsabili degli effetti neurobiologici della *cannabis*, interagiscono direttamente nella regolazione delle emozioni. Inoltre, i dati raccolti nel modello animale suggeriscono che l'interazione tra questi sistemi sia bidirezionale: in particolare, così come esperienze precoci di tipo stressogeno alterano la regolazione e la maturazione del sistema endocannabinoide cerebrale, al tempo stesso, una modulazione farmacologica di questo sistema, modifica le regolazioni emozionali individuali. Infine, dati preliminari suggeriscono come esperienze a valenza 'positiva' abbiano la capacità di contrastare le conseguenze a lungo termine dello stress precoce, sia a livello comportamentale sia a livello neurobiologico.

Progetto FARMAGEN: Caratteristiche farmaco genetiche e psicobiologiche e risposta ai trattamenti farmacologici con metadone e buprenorfina.

Titolo progetto

Lorenzo Somaini

Autore/i

Servizio Tossicodipendenze a Alcologia, ASL di Biella

Ente Affidatario
Centro collaborativo

Obiettivi

Scopo primario del progetto Farmagen è la valutazione delle caratteristiche genetiche, psicobiologiche in grado di influenzare la risposta ai trattamenti con oppioidi long-acting nella dipendenza da eroina. Gli obiettivi specifici sono la valutazione dei polimorfismi dei geni in grado di influenzare la risposta ai trattamenti farmacologici; correlare le risposte ai trattamenti farmacologici con le caratteristiche psicobiologiche che degli individui oggetti di studio; valutare negli stessi individui i livelli plasmatici di alcuni indicatori neuroendocrini espressione del turnover di dopamina, noradrenalina, serotonina; valutare i livelli serici dei farmaci oppioidi long-acting utilizzati nel trattamento della dipendenza da eroina. Il progetto a carattere multidisciplinare ha coinvolto varie figure, ciascuna in relazione alla propria professionalità e si è articolato in moduli, prevedendo indagini psicobiologiche, valutazione dei livelli plasmatici dei farmaci definiti long-acting (ed eventuali metaboliti), studio dei polimorfismi genetici ed analisi di importanti marker neuroendocrini coinvolti nel meccanismo della dipendenza da sostanze d'abuso.

Metodi

Un obiettivo del presente progetto riguarda la valutazione dei livelli plasmatici dei farmaci long-acting (metadone, buprenorfina e associazione buprenorfina/naloxone) utilizzati nella *terapia sostitutiva* per il trattamento della dipendenza da eroina, utilizzando un innovativo metodo analitico sensibile e selettivo in grado di quantificare simultaneamente buprenorfina, norbuprenorfina, metadone e naloxone in matrice plasmatica.

Per le indagini neuroendocrine dei processi fisiopatologici correlati alla terapia sostitutiva con oppioidi long-acting si è ottimizzata una precedente metodica analitica per la determinazione della serotonina, del suo principale metabolita acido 5-idrossiindolacetico (5-HIAA) e dell'acido omovanillico (HVA).

Per la valutazione della componente genetica sono state messe a punto le metodiche di analisi genetica relative alla determinazioni dei diversi polimorfismi genetici oggetto dello studio.

Tutti i pazienti coinvolti nello studio sono stati valutati anche attraverso specifiche scale psicometriche (BDHI, WURS, CECA-Q, ACES, PBI) che sono tuttora in fase di elaborazione.

Risultati

La concentrazione plasmatica dei diversi farmaci oggetto dello studio sono stati analizzati campioni di sangue provenienti dai 25 soggetti arruolati con la valutazione del dosaggio plasmatico di metadone, buprenorfina e suo metabolita e del naloxone.

Sono tuttora in corso le indagini dei markers neuroendocrini su matrici biologiche di pazienti in terapia con Suboxone® e metadone. Tali procedure sono già state applicate su un numero di 25 pazienti.

Per quanto concerne le valutazioni genetiche sono state messe a punto

inizialmente su un numero di 25 soggetti sani ed attualmente sono in fase di valutazione su 25 pazienti sottoposti a trattamento farmacologico.

Al fine di verificare l'esistenza di differenze di metabolizzazione di buprenorfina è stata valutata su un numero di 60 pazienti la frequenza di distribuzione di diversi citocromi epatici.

Conclusioni

Sono in corso l'analisi e la valutazione delle diverse scale psicometriche con l'eventuale correlazione con i dati sperimentali laboratoristici.

Progetto GENERISK: Valutazione di vulnerabilità genetica – individuazione di fattori a rischio relativi all’abuso di cannabinoidi e di disordini psichiatrici correlati

Titolo progetto

Claudia Donnini

Autore/i

Dipartimento di Genetica, Biologia dei Microrganismi, Antropologia, Evoluzione –
Università di Parma

Ente Affidatario
Centro collaborativo

Obiettivi

Il progetto si prefigge di identificare fattori di rischio genetici e ambientali relativi all’abuso di cannabinoidi.

I soggetti in analisi sono individui cannabis-dipendenti e individui non cannabis-dipendenti (controlli). I polimorfismi dei geni scelti per lo studio sono quelli coinvolti, secondo la letteratura, nel determinare il tono dei cannabinoidi endogeni e della dopamina che presenta con il pathway degli endocannabinoidi complesse interazioni. Lo studio vuole anche verificare la possibile associazione di queste varianti dei geni con i tratti della personalità, i temperamenti a rischio ed eventuali sintomi psichiatrici. La identificazione di fattori genetici e ambientali quali fattori di rischio relativi alla vulnerabilità ai cannabinoidi e a disordini psichiatrici correlati consentirà la realizzazione di iniziative di carattere preventivo più incisive e specifiche nella lotta all’abuso di sostanze

Metodi

Il metodo prescelto di analisi è lo studio di associazione nella popolazione.

Nello specifico l’analisi prevede:

- la raccolta di campioni (sangue o saliva) dopo informato consenso scritto;
- estrazione, purificazione e amplificazione del DNA, analisi elettroforetica e/o per sequenziamento degli amplificati.

I genotipi verranno poi correlati con la disponibilità a sperimentare sostanze psicoattive e con indicatori psicometrici che mireranno ad individuare per ogni soggetto in esame i tratti della personalità e del temperamento, i disturbi psichiatrici concomitanti con la dipendenza da sostanze e gli aspetti del comportamento aggressivo. Sono anche condotte valutazioni retrospettive inerenti le condizioni di trauma, abuso, negligenza emozionale, la percezione delle cure parentali e dell’attaccamento genitore-bambino, le esperienze avverse durante l’infanzia e l’adolescenza consentiranno di ricostruire i percorsi di vulnerabilità.

Risultati

In una prima fase sono state messe a punto le metodiche di analisi genetica relative alla determinazione dei polimorfismi di tutti i geni.

Sono poi stati eseguiti una buona parte dei test genetici previsti nel progetto.

Conclusioni

Sebbene preliminari e ottenuti per ora in un piccolo campione di soggetti, i risultati suggeriscono che alcuni alleli dei geni FAAH, COMT, ANKK1 e DRD4 prevalentemente identificati nella popolazione di cannabis dipendenti rispetto alla popolazione di controllo contribuiscano alla vulnerabilità all’uso ed abuso di cannabis.

Progetto MESI: Impatto a breve e lungo termine dell'assunzione di marijuana in età adolescenziale sulla funzionalità immunitaria. Studio traslazionale nell'animale da esperimento e nell'uomo

Titolo progetto

Paola Sacerdote, Sarah Moretti, Silvia Franchi, Alberto E. Panerai

Autore/i

Dipartimento di Farmacologia Chemioterapia Tossicologia Medica, Università di Milano

Ente Affidatario
Centro collaborativo

Obiettivi

Il consumo di marijuana ha caratteristiche di esordio molto precoci, a partire dai 12 anni di età, ed è stato riportato che più del 25% degli adolescenti abbiano utilizzato tale sostanza durante la loro vita. Anche in Italia l'uso è particolarmente elevato nei giovani di età compresa tra i 14 ed i 25 anni.

Tra le tante conseguenze riconducibili all'uso della cannabis recentemente sta sempre più emergendo come il D9-tetraidrocannabinolo (THC), così come i cannabinoidi endogeni, siano in grado di influenzare alcune funzioni del sistema immunitario.

Gli obiettivi della ricerca sono quelli di valutare se l'utilizzo di cannabis in età adolescenziale induca degli effetti sul sistema immunitario e se questi effetti possono perdurare nel tempo. Il progetto è stato condotto in un modello animale, in quanto l'utilizzo di modelli sperimentali permette di controllare meglio le variabili dello studio.

Metodi

Come parametri immunitari nel nostro studio abbiamo preso in considerazione sia l'immunità innata sia quella acquisita, in quanto abbiamo valutato la produzione di citochine prodotte dai linfociti T o dai macrofagi.

Il THC viene somministrato alla dose di 25 mg/Kg sia in somministrazione acuta sia in somministrazione ripetuta per 10 giorni. Come controllo sono stati utilizzati topi della stessa età trattati con il solo veicolo per la stessa durata di tempo.

Alcuni gruppi di animali vengono sacrificati per le misurazioni immuni immediatamente alla fine dei 10 giorni di trattamento, mentre altri gruppi vengono lasciati indisturbati fino all'età adulta di 70 giorni e poi vengono eseguite le valutazioni immunologiche su citochine linfocitarie e funzionalità macrofagica.

Risultati

Dopo somministrazione acuta di THC, la produzione della citochina TH1 IL-2 era significativamente diminuita sia nei topi giovani sia nei topi vecchi, mentre non si evidenziavano ancora delle differenze significative nella produzione di IFN-gamma. La IL-4 dopo trattamento era invece aumentata. Quando il trattamento era ripetuto per 10 giorni, sia nei topi giovani sia nei topi adulti era presente una significativa riduzione della produzione di IL-2 e IFN γ . Al contrario i livelli della citochina TH2 IL-4 apparivano aumentati in modo significativo.

A distanza di 2 mesi dall'ultima somministrazione di THC era ancora presente una generalizzata immunosoppressione.

Per quanto riguarda la funzionalità macrofagica, la somministrata acuta di THC a topi giovani o vecchi non risultava alterare in modo significativo la produzione della citochina IL-1, mentre era presente un rilevante aumento dei livelli della citochina antinfiammatoria IL-10.

Particolarmente interessanti erano però i risultati ottenuti in animali trattati con THC da giovani, che indicano che il sistema monocito/macrofagico è

profondamente alterato dal trattamento con THC, con la presenza di una risposta generale disregolata e non finalizzata.

Conclusioni

In conclusione possiamo affermare che la somministrazione di THC in età giovanile modula il sistema immune e ne altera la corretta maturazione.

Progetto NEUROTRAINING & TMS: Progetto nazionale per l'integrazione di interventi psicoeducativi e neuropsicologici nella prevenzione e nella gestione delle recidive in soggetti tossicodipendenti "no o low responder" ai trattamenti convenzionali: utilizzo di tecniche di stimolazione magnetica transcranica (rtms e tdc) a bassa intensità e neurotraining

Titolo progetto

Francesco Bricolo, Maurizio Gomma, Elisa Bellamoli

Autore/i

Azienda ULSS 20 – Dipartimento delle Dipendenze – Unità di Neuroscienze

Ente Affidatario
Centro collaborativo

Obiettivi

L'obiettivo generale del progetto è l'introduzione di un approccio neuropsicologico ad integrazione dei trattamenti convenzionali di tipo medico, psicologico, educativo e sociale. Si vuole promuovere una più approfondita conoscenza di questa disciplina attraverso la produzione di materiale informativo, conferenze, convegni per specialisti per introdurli alle conoscenze di base riguardo la neuroanatomia, le funzioni neuropsicologiche e la loro alterazione.

Parte integrante del progetto riguarda la disponibilità di alcuni specialisti ad organizzare eventi formativi per medici, psicologi, educatori, assistenti sociali ed infermieri. Lo scopo di questi eventi è di introdurre le varie figure professionali che lavorano a diverso titolo nella tossicodipendenza ai fondamenti della neuropsicologia.

La persona che soffre di tossicodipendenza può accedere a specifiche valutazioni neuropsicologiche che sono in grado di definire eventuali alterazioni delle funzioni neuropsicologiche. Laddove è stata identificata la compromissione di una funzione che si pensa correlata o associata all'uso di droghe, è possibile attivare specifici training di potenziamento cognitivo o di riabilitazione delle funzioni deficitarie. Un altro trattamento in fase di valutazione è l'utilizzo della stimolazione magnetica transcranica per aumentare l'attivazione di determinate aree cerebrali che si pensano fondamentali per il decision making e per l'inibizione dei comportamenti a rischio. Uno dei nostri obiettivi è quello di sperimentare l'efficacia di questa tecnica.

Metodi

Per definire il modello teorico di riferimento è stata identificata la letteratura esistente dai database più aggiornati ed è stato steso un testo con allegati i riferimenti bibliografici.

Per definire i protocolli e le procedure per l'utilizzo delle tecniche neuropsicologiche sono state svolte delle riunioni.

Per sottoporre al Comitato Etico Provinciale la Domanda di autorizzazione per la sperimentazione con Stimolazione Magnetica Transcranica è stata fatta la lista dei documenti richiesti da allegare e delle informazioni necessarie per compilarli ed arrivare ad una loro stesura corretta e completa.

Per produrre materiale informativo di base di carattere neuropsicologico da mettere a disposizione di educatori ed educandi è stato acquisito materiale di testo ed immagini da cui prendere spunto ed organizzare poi secondo modalità comunicative di cui sia riconosciuta l'efficacia.

Per formare gli specialisti al fine di acquisire specifico know-how in ambito neuropsicologico è stato utilizzato un format in grado di trasmettere informazioni corrette e di far apprendere le modalità operative.

Risultati

Il 7-8-9 giugno 2010 è stato organizzato a Verona il 2° Congresso Nazionale “Neuroscience of addiction. Neurobiologia, neuroimaging e aspetti educativi delle dipendenze”, dedicato alle neuroscienze legate al mondo delle dipendenze.

E’ stata curata l’edizione di una pubblicazione “Elementi di Neuroscienze e Dipendenze: manuale per operatori dei Dipartimenti delle Dipendenze.” La Grafica 2010 pp. 208 Serpelloni G, Bricolo F, Gomma M. (a cura di). In questa pubblicazione sono stati inseriti 26 capitoli di cui 8 sono stati scritti da membri della nostra Unità di Neuroscienze.

Il volume e tutto il materiale prodotto per il Congresso sono stati resi disponibili sui siti <http://www.dronet.org> e www.neuroscienzedipendenze.it

Sono stati scritti tutti i documenti da allegare alla Domanda di autorizzazione per la sperimentazione con Stimolazione Magnetica Transcranica “La rTMS sulla corteccia dorsolaterale sinistra in un gruppo di soggetti alcoldipendenti e/o tossicodipendenti in trattamento: studio di cross over” e in data 11/02/2011 è stata trasmessa la decisione del Comitato Etico della Provincia di Verona che ha approvato lo studio.

Conclusioni

Come evento formativo è stato organizzato il 2° Congresso Nazionale "Neuroscience of addiction. Neurobiologia, neuroimaging e aspetti educativi delle dipendenze" dedicato alle neuroscienze legate al mondo delle dipendenze. Si è svolto il 7-8-9 giugno 2010 a Verona.

E’ stata curata l’edizione di una pubblicazione “Elementi di Neuroscienze e Dipendenze: manuale per operatori dei Dipartimenti delle Dipendenze.” La Grafica 2010 pp. 208 Serpelloni G, Bricolo F, Gomma M. (a cura di).

Tutto il materiale prodotto (pubblicazione, slide e video del congresso) è stato reso disponibile on-line.

Il Comitato Etico ha approvato lo studio “La rTMS sulla corteccia dorsolaterale sinistra in un gruppo di soggetti alcoldipendenti e/o tossicodipendenti in trattamento: studio di cross over” alla seconda valutazione.

Progetto SCHIZCA: Caratteristiche cliniche, personologiche, neuropsicologiche e biologiche della schizofrenia collegata all'uso di cannabis

Titolo progetto

P. Monteleone, S. Galderisi, C. Di Filippo, P. Bucci, P. Scognamiglio, W. Milano, G. Corrivetti, V. Martiadis, Mario Maj

Autore/i

Dipartimento di Psichiatria, Seconda Università di Napoli, Napoli

Ente Affidatario
Centro collaborativo*Obiettivi*

L'uso di cannabis nell'adolescenza aumenta di 2-3 volte il rischio di sviluppare sintomi psicotici e tale rischio è maggiore per quei soggetti che fanno un uso più frequente di detta sostanza. Il presente progetto si è proposto di confrontare un campione di pazienti che hanno sviluppato una psicosi schizofrenica successivamente all'uso di cannabis con un campione di pazienti con schizofrenia non connessa con l'uso di cannabis, relativamente ad una serie di variabili cliniche, personologiche, neuropsicologiche e biologiche al fine di individuare fattori predittori del rischio e/o indicatori di esito.

Metodi

In questa prima fase della ricerca, sono stati reclutati 42 pazienti con schizofrenia, in trattamento farmacologico stabile da almeno tre mesi. Essi sono stati sottoposti alle seguenti valutazioni cliniche: 1) conferma della diagnosi di schizofrenia e valutazione della comorbidità psichiatrica di Asse I e II mediante somministrazione dell'interviste diagnostiche strutturate SCID-I e SCID-II; 2) somministrazione dell'intervista strutturata Symptom Onset in Schizophrenia per la definizione dell'esordio della malattia; 3) compilazione di una scheda anamnestica preparata ad hoc, 4) somministrazione del Temperament and Character Inventory-Revised di Cloninger per la valutazione delle caratteristiche di personalità; 5) somministrazione della Scala per i Sintomi Positivi e Negativi (PANSS) per la valutazione del quadro psicopatologico.

Risultati

Ventuno pazienti sono risultati affetti da schizofrenia cannabis-collegata e 21 da schizofrenia non cannabis-collegata. L'età della comparsa dei primi sintomi psicotici e della sindrome completa sono risultate significativamente più basse nei pazienti con schizofrenia cannabis-collegata ($P < 0.01$). Questi ultimi, inoltre, hanno presentato valori significativamente più elevati nella dimensione caratteriale "ricerca della novità" ($p < 0.03$) e significativamente più bassi in quella di "evitamento del danno" ($p < 0.01$). Dal punto di vista psicopatologico, i pazienti con schizofrenia cannabis-collegata hanno presentato un maggiore punteggio nella dimensione dei sintomi negativi e nel punteggio totale della PANSS.

Conclusioni

Questi risultati confermano che l'esordio clinico è più precoce nella schizofrenia cannabis-collegata e suggeriscono che i pazienti con detta sindrome psicotica hanno caratteristiche di personalità che li distinguono da quelli affetti da schizofrenia non cannabis-collegata e che potrebbero rappresentare fattori di rischio per lo sviluppo di detta sindrome.

Progetto SMART SEARCH: Ricerca di composti farmacologicamente attivi e potenzialmente pericolosi in prodotti di libero commercio attraverso l'impiego di spettrometria di massa ad elevata risoluzione

Titolo progetto

Jennifer P. Pascali, Rossella Gottardo, Eloisa Liotta, Federica Bortolotti, Franco Tagliaro

Autore/i

Università degli Studi di Verona, Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica (ora Sanità Pubblica e Medicina di Comunità), sezione di Medicina Legale

Ente Affidatario
Centro collaborativo

Obiettivi

La diffusione di prodotti pubblicizzati come coadiuvanti delle performances fisiche e/o psichiche disponibili in libero commercio, ma spesso contenenti sostanze potenzialmente inducenti dipendenza e/o tossiche è un fenomeno diffuso in Europa, ma piuttosto recente in Italia. Tali composti/preparazioni sono identificati con il nome generico di Smart Drugs.

Il Progetto Smart Search, quindi, è nato con lo scopo di studiare e caratterizzare il “fenomeno Smart Drugs” sul territorio italiano a partire dai primi mesi del 2010.

Tra gli obiettivi si propone dunque:

1. un monitoraggio del fenomeno, attraverso l'acquisto diretto (nei cosiddetti Smart Shops o via Internet) o l'acquisizione attraverso le Forze di Polizia;
2. l'identificazione e la caratterizzazione dei composti di interesse mediante metodiche analitiche ad elevato potere identificativo;
3. la successiva segnalazione ai centri preposti allo scopo di proporre normative regolamentatorie con finalità preventive.

Metodi

1. Ricercare, identificare e acquistare preparazioni commerciali presso Smart Shops o tramite e-commerce, che per gli effetti dichiarati e/o riferiti dai consumatori suggeriscono la presenza nelle medesime di composti farmacologicamente attivi (Smart Drugs).
2. Analizzare le preparazioni acquistate mediante l'impiego di tecniche ad elevato potere identificativo (LC-ESI-TOF, LC-ESI-IT, GC-MS) ed individuare le molecole di interesse anche se “nuove” e quindi non contenute nelle banche dati tossicologiche tradizionali (screening HRMS).
3. Segnalare i risultati qualitativi al Sistema Nazionale di Allerta Precoce e Risposta Rapida per le Droghe (NEWS)
4. Eseguire determinazioni quantitative delle molecole identificate nelle preparazioni recuperate previa acquisizione degli standard puri.
5. Segnalare i risultati quantitativi al Sistema Nazionale di Allerta Precoce e Risposta Rapida per le Droghe (NEWS)

Risultati

Nuovi metodi analitici:

- una procedura di screening ultrarapido basato sulla MALDI-TOF MS (dati in corso di pubblicazione);
- 2 metodiche di screening qualitativo HRMS (ESI-TOF, ESI ion-trap);

- 6 metodiche quantitative (GC-MS per cannabinoidi sintetici, analoghi del sildenafil, composti stimolanti, allucinogeni; CE-DAD per caffeina).

Origine dei campioni:

- prodotti acquistati direttamente in Smart Shop. n. 31;
- prodotti acquistati da Internet n. 3;
- prodotti sequestrati da A.G. n. 22.

Regioni finora interessate nel campionamento: Veneto, Friuli Venezia Giulia, Piemonte, Lombardia, Emilia Romagna, Calabria.

Tipologia dei campioni:

- profumatori per ambiente n. 38;
- capsule/caramelle n. 6;
- polveri n. 5;
- funghi essiccati n. 3;
- bevande n. 4.

Dati prodotti:

Mediante HRMS stati identificati nei campioni analizzati i seguenti composti assimilabili alle Smart Drugs:

- cannabinoidi sintetici (JWH 018, JWH 073, JWH 250, JWH 200, JWH 081, JWH 210, JWH 019, JWH 122, AM 694),
- 3 analoghi del sildenafil,
- composti stimolanti (caffeina, MDPV)
- allucinogeni (mitraginina, acido ibutenico).

Mediante GC-MS, ove possibile per disponibilità di standard puri, è stata determinata la concentrazione di principio attivo nelle varie preparazioni.

Sono stati prodotti un totale di 22 report al NEWS riguardanti uno o più prodotti.

Conclusioni

La diffusione delle Smart Drugs deriva essenzialmente dalla mancata tabellazione dei principi attivi in esse contenuti, del tutto nuovi nel campo delle droghe d'abuso, che favorisce la loro commercializzazione.

L'applicazione di strumenti analitici sofisticati basati sulla spettrometria di massa ha permesso in tempi rapidi l'identificazione di composti nuovi (Smart Drugs) nei prodotti analizzati e in molti casi la loro quantificazione.

Progetto THCGATE: Influenza della sensibilizzazione indotta dall'esposizione al tetraidrocannabinolo durante l'adolescenza sull'acquisizione di un comportamento di autosomministrazione endovenosa di eroina e sull'induzione di disturbi cognitivi a lungo termine in un modello animale di predisposizione genetica.

Titolo progetto

Cristina Cadoni, Daniele Lecca, Valentina Valentini, Nicola Simola, Gaetano di Chiara
Università degli Studi di Cagliari, Dipartimento di Tossicologia

Autore/i

Ente Affidatario
Centro collaborativo

Obiettivi

1. Studiare in due ceppi di ratti inincrociati (inbred) (Fischer344 e Lewis) diversamente sensibili alle droghe, lo sviluppo di sensibilizzazione comportamentale e biochimica all'eroina indotta dalla pre-esposizione al THC.
2. Studiare l'effetto della pre-esposizione al THC durante l'adolescenza sulle proprietà di rinforzo dell'eroina in età adulta, saggiate in un paradigma di auto somministrazione endovenosa.
3. Verificare la possibilità che l'esposizione al THC in età adolescenziale induca disturbi cognitivi o emozionali in età adulta.

Metodi

Impiego di un modello animale di vulnerabilità genetica alle tossicodipendenze (ratti inbred Fischer344 e Lewis). Esposizione in età adolescenziale ad un protocollo di sensibilizzazione con THC. Impianto di probe da microdialisi cerebrale nel nucleo accumbens (NAc) shell e core in età adulta e monitoraggio simultaneo della risposta comportamentale e biochimica ad una iniezione acuta di THC o eroina. Esperimenti di auto somministrazione di eroina in età adulta in altri gruppi di animali secondo protocolli di Fixed Ratio.

Esperimenti comportamentali volti a rilevare eventuali deficit cognitivi e/o emozionali.

Risultati

Il THC libera dopamina selettivamente nella shell del NAc del ceppo Lewis (addiction prone). La pre-esposizione al THC è in grado di indurre modificazioni della trasmissione dopaminergica mesolimbica di lunga durata in entrambi i ceppi di ratti. Mentre in entrambi i genotipi si osserva nel NAc core un potenziamento della risposta dopaminergica all'iniezione di eroina, solo il ceppo Lewis mostra un drammatico incremento della risposta dopaminergica nella shell del NAc.

Tali differenze della funzionalità della trasmissione dopaminergica nel NAc appaiono associate ad una maggiore facilità di acquisizione di un comportamento di auto somministrazione e ad una maggiore assunzione di eroina nei Lewis rispetto ai Fischer344.

Il pre-trattamento con THC incrementa il comportamento di assunzione di eroina solo nei Lewis, cioè del lavoro richiesto per ottenere l'infusione del farmaco.

Gli esperimenti comportamentali non hanno evidenziato deficit cognitivi in età adulta indotti dall'esposizione al THC durante l'adolescenza in entrambi i genotipi. Tuttavia, la pre-esposizione al THC durante l'adolescenza, induce una riduzione dello stato d'ansia nei ratti Lewis.

Conclusioni

Nei due ceppi inbred da noi utilizzati, la vulnerabilità alle sostanze d'abuso è correlata alla proprietà del THC di liberare dopamina nel NAc shell. Inoltre, la pre-esposizione al THC in età adolescenziale è in grado di indurre modificazioni a lungo termine della trasmissione dopaminergica nella shell del NAc e tale effetto è associato, nei Lewis, ma non nei Fisher344, ad una facilitazione dell'acquisizione di un comportamento di auto somministrazione di eroina, compatibile con un potenziamento delle sue proprietà di rinforzo. Sebbene nei Fischer344 il pre-trattamento con THC non modifichi il comportamento di auto somministrazione di eroina durante l'acquisizione ed il mantenimento, la ricerca (seeking) dell'eroina, provocata dalla indisponibilità del farmaco in fase di estinzione, è aumentata. I ratti Lewis pre-esposti al THC mostrano da adulti una maggiore tendenza ad esplorare i bracci aperti del labirinto sopraelevato che potrebbe essere interpretata come un'incrementata impulsività, in accordo con l'aumentata responsività della trasmissione dopaminergica nella shell del NAc.

Progetto VULCAN: Valutazione della condizione di vulnerabilità all'uso di Cannabis ed allo sviluppo della dipendenza: correlati neuroendocrini e aspetti quali-quantitativi

Titolo progetto

Maria Augusta Raggi

Autore/i

Laboratorio di Analisi Farmaco-Tossicologica, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Facoltà di Farmacia, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

Ente Affidatario
Centro collaborativo

Obiettivi

Sviluppo, convalida e applicazione di nuovi metodi analitici per la determinazione di sostanze d'abuso, in particolare cannabinoidi, e loro metaboliti in tessuti biologici. Queste metodiche analitiche possono essere utilizzate per supportare ricerche nel campo della vulnerabilità all'uso dei cannabinoidi. Un approccio integrato allo studio del problema si propone di ottenere, e di diffondere al pubblico più ampio possibile, dati sui pattern di utilizzo delle sostanze, sulle modificazioni neuroendocrine da esse generate, sull'esistenza di fattori genetici ed epigenetici che influenzino la vulnerabilità e su specifici fenotipi neuroendocrini che possano essere eventualmente individuati come marker di predisposizione.

Metodi

Il progetto si basa sullo sviluppo di metodiche analitiche ad alta affidabilità. La procedura prevede due componenti principali: il metodo analitico vero e proprio, e la procedura di campionamento. Per la prima si utilizzano tecniche strumentali di ultima generazione, in particolare la cromatografia liquida (HPLC) accoppiata a rivelatori ad alta selettività e sensibilità, (spettrometria di massa MS/MS), spettrofluorimetrici ed elettrochimici. Per il secondo aspetto, si considera un ampio ventaglio di possibilità: dalle matrici più comuni, come sangue e urine, a quelle più innovative, come saliva, capelli e sudore, ma soprattutto le macchie di sangue essiccato (DBS). Quest'ultima matrice è estremamente promettente per la potenziale applicazione a controlli "on street", grazie all'elevata significatività, associata alla praticità, maneggevolezza e velocità di campionamento.

Risultati

Sono stati messi a punto diversi metodi analitici riguardanti i cannabinoidi e metaboliti, ma anche altre sostanze d'abuso (cocaina, amfetamine e oppioidi).

Conclusioni

Si può affermare che il progetto "VulCan" ha ottenuto risultati molto importanti nel corso dell'anno 2010. Lo sviluppo e la convalida di metodiche analitiche innovative ed affidabili rappresentano infatti uno step fondamentale per gli studi scientifici applicati a soggetti tossicodipendenti o con comportamenti "a rischio". I risultati ottenuti con le nuove metodiche sono inoltre applicabili, in prospettiva, alle analisi "su strada" per l'identificazione dell'uso di sostanze psicotrope da parte dei guidatori. Le intense attività formative ed informative effettuate permettono di trasferire e rendere noti i risultati del progetto ad un pubblico molto più ampio di quello professionalmente interessato alla ricerca scientifica.

Si ringraziano i responsabili scientifici dei progetti di ricerca per i contributi inviati.

