



MARITTIMO - IT FR - MARITIME
TOSCANA - LIGURIA - SARDEGNA - CORSE

*La Cooperazione al cuore
del Mediterraneo*



*La Coopération au coeur
de la Méditerranée*

Progetto PYRGI

Strategia d'impresa in settori di nicchia per l'economia agroindustriale del Mediterraneo

COMPONENTE 4

SVILUPPO DEI PRODOTTI ESTRATTIVI

Prodotto 20. Utilizzo degli estratti vegetali



REGIONE AUTONOMA DE SARDIGNA
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA



REGIONE LIGURIA



REGIONE
TOSCANA





*La Cooperazione al cuore
del Mediterraneo*

*La Coopération au coeur
de la Méditerranée*

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

All'interno della componente 4, azione 4.1, il partner Dipartimento di Farmacia - Sezione di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche ed Alimentari dell'Università degli Studi di Genova (DiCTFa, UNIGE) ha proceduto alla valutazione dei potenziali usi nutraceutici e stilato un elenco dei potenziali usi in ambito farmaceutico degli estratti vegetali.

Alcuni composti isolati da *Salvia x jamensis* hanno mostrato una significativa attività fitotossica, una significativa attività inibitoria sulla germinazione sia di *Papaver* che di *Avena*, ma bassi effetti sulla successiva crescita di queste specie, mentre uno dei composti isolati, l'acido 14- α -idrossi-isopimarico, è risultato essere inattivo.

Anche i composti isolati da *Salvia adenophora* hanno mostrato attività fitotossica.

Sono stati inoltre isolati due diterpeni da *Salvia somalensis*, che hanno rivelato attività fungicida su comuni infestanti delle colture: *Colletotricum coccodes*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cynerea*, *Rhizoctonia* sp..

I risultati sono riportati nelle pagine seguenti (prodotto 20a).

Sempre all'interno della stessa componente 4, azione 4.1, il partner Università degli Studi di Genova, Dipartimento di Medicina Sperimentale (DiMeS, UNIGE), ha valutato il profilo farmacologico di terpeni neocloreidani estratti dalle parti aeree di piante del genere *Salvia*.

Si è dapprima valutata l'interazione di Salvinorina A, uno dei componenti principali estratti dalle foglie di *Salvia divinorum*, con recettori oppioidi presinaptici in grado di modulare il rilascio di catecolamine da terminazioni nervose ippocampali e striatali. Tale composto modula in maniera opposta la liberazione di noradrenalina e dopamina attraverso l'attivazione di differenti sottotipi recettoriali.

Quindi si è valutato il profilo farmacologico di terpeni neocloreidani estratti da *Salvia wagneriana*, *Salvia jamensis*, ovvero i composti SW8, SW22 e SJ217. I composti SW22 e SJ217 non sono in grado di modificare, nelle aree studiate, la liberazione di catecolamine. Il composto SW8 (acido Hardwickiico), simile dal punto di vista strutturale a Salvinorina A, incrementa il rilascio di noradrenalina a livello ippocampale, mentre non è in grado di modificare la liberazione di dopamina da terminazioni nervose striatali. Esso risulta quindi capace di discriminare tra i differenti sottotipi recettoriali coinvolti nel controllo presinaptico del rilascio di catecolamine. In base ai risultati ottenuti è possibile concludere che l'acido Hardwickiico (SW8) potrebbe rappresentare un prototipo di una nuova classe di farmaci ansiolitici e antidepressivi non peptidergici (prodotto 20b).

DESCRIPTION DU PRODUIT

Dans la section 4, action 4.1, les partenaires du Département de Pharmacie – Unité de Chimie et Technologies Pharmaceutiques et Alimentaires de l'Université de Gênes (DiCTFa, UNIGE) ont évalué le potentiel nutraceutique des extraits végétaux et énuméré leurs applications potentielles dans le secteur pharmaceutique.



*La Cooperazione al cuore
del Mediterraneo*

*La Coopération au coeur
de la Méditerranée*

Certains composés isolés ont montré une activité phytotoxique significative, une activité inhibitrice de la germination de *Papaver* et d'*Avena* également significative, alors que leurs effets sur la croissance ultérieure de cette espèce se sont avérés négligeables; en revanche, l'un de ces composés isolés, l'acide 14- α -hydroxy-isopimarique, est résulté inactif.

Les composés isolés de l'espèce *Salvia adenphora* ont montré aussi une activité phytotoxique.

En outre, deux diterpènes de l'espèce *Salvia somalensis* ont été isolés et ont montré une activité fongicide sur des adventices communes des cultures: *Colletotricum coccodes*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cynerea*, *Rhizoctonia* sp.

Les résultats sont indiqués dans les pages suivantes (produit 20a).

Toujours dans la section 4, action 4.1, le partenaire du Département de Médecine Expérimentale de l'Université de Gênes (DiMeS, UNIGE), a évalué le profil pharmacologique des terpènes néoclérodanés extraits des parties aériennes des plantes du genre *Salvia*.

L'interaction de Salvinorine A, l'un des principaux composants extraits des feuilles de *Salvia divinorum*, a d'abord fait l'objet d'une analyse conduite au moyen de récepteurs opioïdes présynaptiques capables de moduler la libération de catécholamines par les terminaisons nerveuses de l'hippocampe et du striatum.

Ce composé module de façon opposée la libération de noradrénaline et de dopamine à travers l'activation de différents sous-types de récepteurs.

Le partenaire a ensuite évalué le profil pharmacologique des terpènes néoclérodanés extraits de *Salvia wagneriana*, *Salvia jamensis*, à savoir les composés SW8, SW22 et SJ217. Les données obtenues ont montré que les composés SW22 et SJ217 ne produisent aucune modification dans la libération de catécholamines. Au contraire, le composé SW8 (acide Hardwickiico), dont la structure est similaire à celle de la Salvinorine A, cause une augmentation de la libération de noradrénaline au niveau de l'hippocampe, mais ne modifie aucunement la libération de dopamine par les terminaisons nerveuses du striatum; ce composé s'avère donc à même de distinguer entre les différents sous-types de récepteurs impliqués dans le contrôle de la libération présynaptique des catecholamines. D'après les résultats obtenus, on peut conclure que l'acide Hardwickiico (SW8) pourrait constituer un prototype pour une nouvelle classe d'antidépresseurs et anxiolytiques non peptidergiques (produit 20b).



MARITTIMO - IT FR - MARITIME
TOSCANA - LIGURIA - SARDEGNA - CORSE

*La Cooperazione al cuore
del Mediterraneo*

*La Coopération au coeur
de la Méditerranée*

PRODOTTO 20a

ATTIVITA' FITOTOSSICA E ANTIFUNGINA DI ESTRATTI DI SALVIA spp.



Programma cofinanziato con il Fondo Europeo
per lo Sviluppo Regionale



REGIONE LIGURIA



REGIONE
TOSCANA



Programme cofinancé par le Fonds Européen
de Développement Régional





MARITTIMO - IT FR - MARITIME
TOSCANA - LIGURIA - SARDEGNA - CORSE

La Cooperazione al cuore
del Mediterraneo

La Coopération au coeur
de la Méditerranée

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Valutazione attività fitotossica di estratti grezzi da specie di salvia con elaborazioni statistiche classiche ed avanzate.

Gli effetti allelochimici degli essudati saggianti sulla germinazione sono stati descritti mediante indici di germinazione riportati in letteratura (**Figura 1**) inoltre sono state impiegate semplici formule matematiche (**Figura 2**), per descrivere l'attività fitotossica senza l'impiego di metodi di regressione non lineari. Le formule proposte dal nostro gruppo tengono conto del contributo dato dalla concentrazione, in modo tale che nello stesso tempo venga enfatizzata l'azione fitotossica precoce dei trattamenti impiegati, e venga ridotto il peso sui risultati dell'azione tardiva alle concentrazioni più elevate.

Germination index	Formula
Total germination (G_T) (Hoffman et al. 1996)	$G_T = \left[\frac{N_T \times 100}{N} \right]$
Speed of germination (S) (Wardle et al. 1991)	$S = (N_1 \times 1) + (N_2 - N_1) \times \frac{1}{2} + (N_3 - N_2) \times \frac{1}{3} + \dots + (N_n - N_{n-1}) \times \frac{1}{n}$
Speed of accumulated germination (AS) (Wardle et al. 1991)	$AS = \left[\frac{N_1}{1} + \frac{N_2}{2} + \frac{N_3}{3} + \dots + \frac{N_n}{n} \right]$
Coefficient of the rate of germination (CRG) (Bewley and Black 1985)	$CRG = \frac{[N_1 + N_2 + N_3 + \dots + N_n]}{(N_1 \times T_1) + (N_2 \times T_2) + (N_3 \times T_3) + \dots + (N_n \times T_n)} \times 100$

Figura 1

$$WAD_{s_TARGET} = \frac{\sum_{R=1}^3 \left(\sum_{t=1}^{N_t} \frac{G_{Tcontrol} - G_{Tt}}{c_t} \right)_{TARGET}}{3}$$

$$GWAV_{t_TARGET} = \frac{\sum_{R=1}^3 \left(\sum_{t=1}^{N_t} \left(\frac{\sum_{d=1}^{N_d} \frac{G_{Tcontrol,d} - G_{Ttd}}{d} \right)_{TARGET}}{c_t} \right)}{3}$$

$$DWAD_s = \frac{\sum_{R=1}^3 \left(\sum_{t=1}^{N_t} \frac{G_{Tcontrol} - G_{Tt}}{c_t} \right)_p - \sum_{t=1}^{N_t} \frac{G_{Tcontrol} - G_{Tt}}{c_t} \Big|_a}{3}$$

Figura 2

Gli studi sono stati condotti sia sulla germinabilità dei semi sia sul successivo sviluppo delle plantulae di *Papaver rhoeas* e *Avena sativa*, scelte come esempi di comuni infestanti delle colture. Sono stati studiati estratti di radici di *Salvia x jamensis* (rif.to prodotto 26) (**Figure 3, 4 e 5**) ed estratti di parti aeree di *Salvia adenophora* (rif.to prodotto 26) (**Figura 6**) di cui vengono di seguito riportati sinteticamente i risultati.

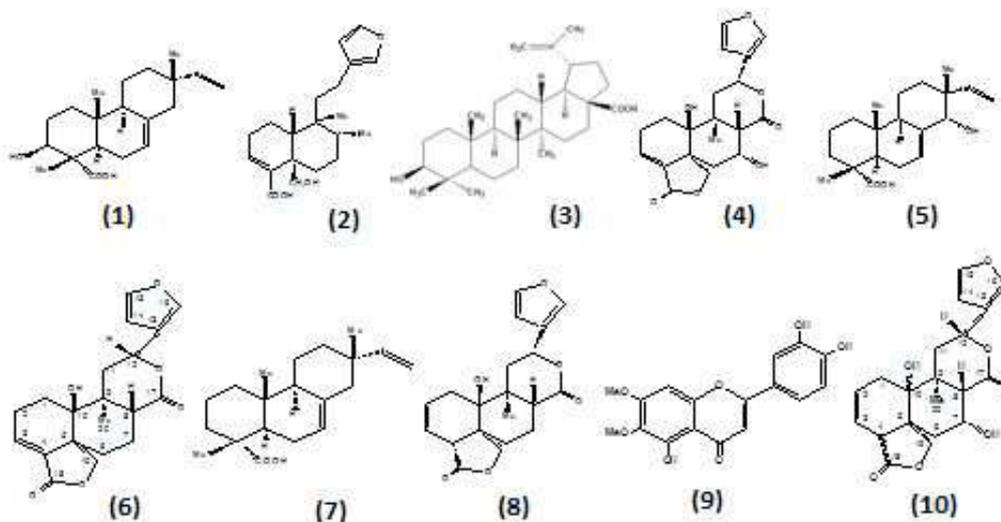
Salvia x jamensis

Per l'identificazione dei composti bioattivi, una parte dell'estratto metanolico è stato sottoposto a cromatografia ottenendo sei frazioni. Una di esse è stata successivamente purificata ottenendo 5 frazioni. Tre di queste ultime sono state controllate mediante cromatografia liquida in fase inversa ad elevata prestazione in associazione alla spettrometria di massa ad elevata risoluzione (HPLC-MS).

L'attività delle frazioni testate (2.6, 3.4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5) sulla germinazione di *Papaver rhoeas* L. e *Avena sativa* L. è descritta dai dati riportati in **Figura 3**. La capacità di germinazione, calcolata mediante la media dell'indice di germinazione totale (G_T) dei semi di *Papaver* e *Avena* è stata misurata e non è significativamente inferiore al controllo (**Figura 3**).

La successiva crescita delle *plantulae* di entrambe le specie è stata misurata rispetto al controllo a varie concentrazioni delle diverse frazioni dell'estratto di radice di *Salvia x jamensis* (**Figure 4 e 5**) in particolar modo, le frazioni 2.6, 3.4, 4.3, 4.5 stimolano l'allungamento delle radici mentre le frazioni 4.1, 4.2, 4.4 inibiscono l'allungamento delle radici delle *plantulae* di *Papaver*; le frazioni 4.1, 4.2, 4.4 inibiscono l'allungamento delle radici e le frazioni 2.6, 3.4, 4.3, 4.5 stimolano l'allungamento delle radici delle *plantulae* di *Avena*. Inoltre, le frazioni 2.6, 3.4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 inibiscono l'allungamento del cotiledone delle *plantulae* di *Avena*.

Le frazioni 3.2, 3.3, 3.4 ottenute dall'estrazione delle radici sono state utilizzate per l'identificazione dei composti bioattivi. Mediante HPLC-HRMS sono stati determinati diterpeni e triterpeni, precedentemente isolati dall'essudato delle parti aeree fresche della pianta: Nell'estratto metanolico delle radici sono stati determinati l'acido 3- β -idrossi-isopimarico (**1**), l'acido hautriwaico (**2**), l'acido betulnico (**3**), l'acido isopimarico (**5**) e l'acido 14 α -idrossi-isopimarico (**7**).



3- β -hydroxyisopimaric acid (**1**); Hautriwaic acid (**2**); Betulinic acid (**3**); 7,8-dihydrosalviacoccin (**4**); Isopimaric acid (**5**); 15,16-epoxy-cleroda-3,13(16),14-trien-10 β -hydroxy-12,17,19,18-diolide (**6**); 14- α -hydroxy-isopimaric acid (**7**); 15,16-epoxy-cleroda-2,13(16),14-trien-7 α ,10 β -dihydroxy-12,17,19,18-diolide (**8**); cirsiolol (**9**); 15,16-epoxy-cleroda-2,13(16),14-trien-7 α ,10-dihydroxy-12,17,19,18-diolide (**10**).

I composti (1), (2) e (3) hanno mostrato una significativa attività fitotossica, (5) ha mostrato una significativa attività inibitoria sulla germinazione sia di *Papaver* che di *Avena*, ma bassi effetti sulla successiva crescita di queste specie, (7) è risultato essere inattivo.



MARITTIMO - IT FR - MARITIME
 TOSCANA - LIGURIA - SARDEGNA - CORSE

*La Cooperazione al cuore
 del Mediterraneo*

*La Coopération au coeur
 de la Méditerranée*

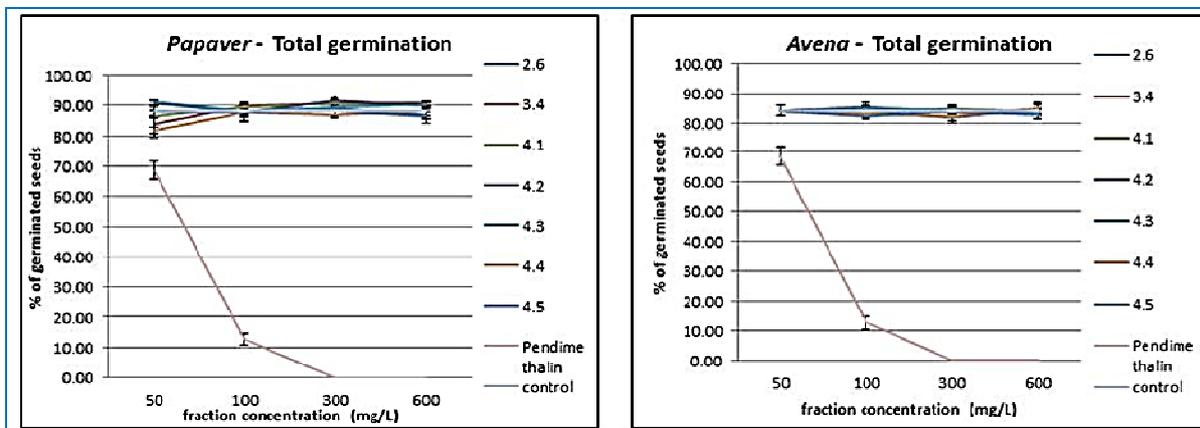


Figura 3

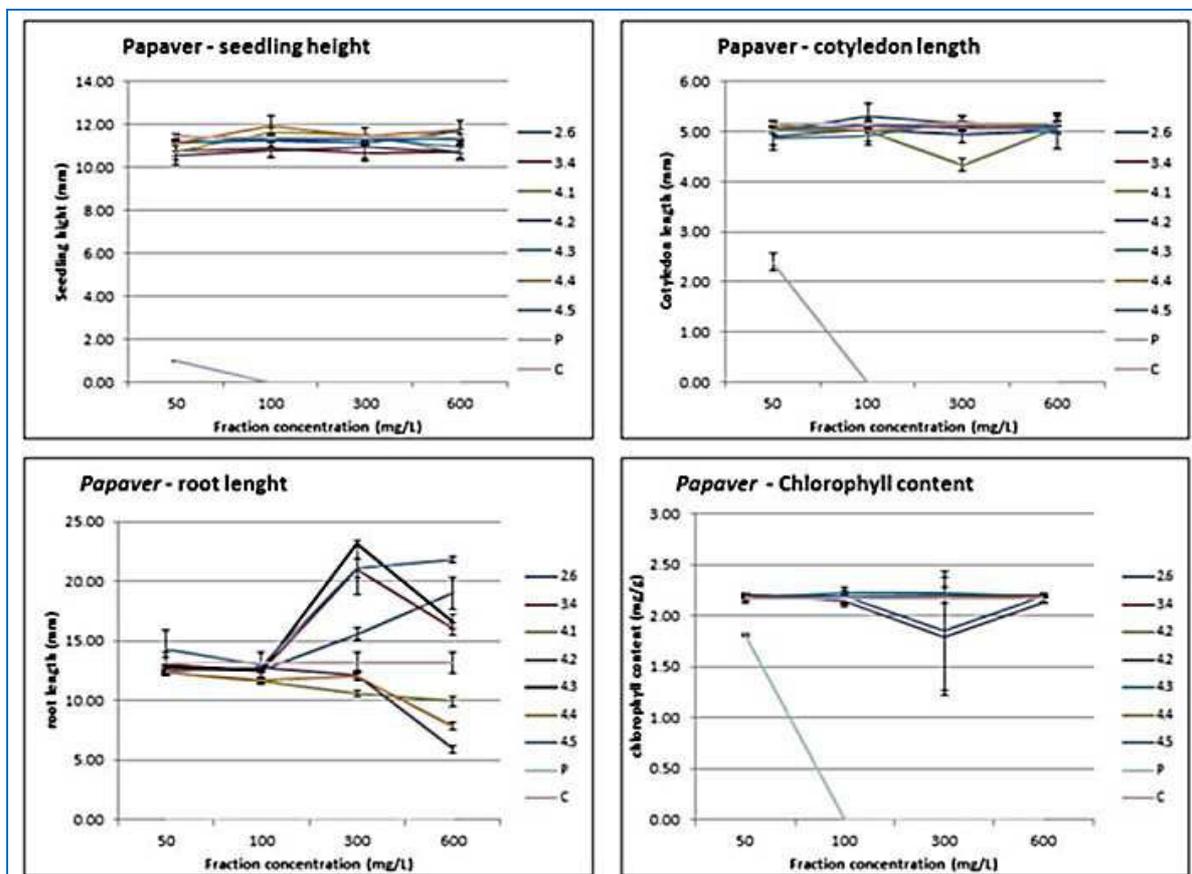


Figura 4





MARITTIMO - IT FR - MARITIME
TOSCANA - LIGURIA - SARDEGNA - CORSE

La Cooperazione al cuore
del Mediterraneo

La Coopération au coeur
de la Méditerranée

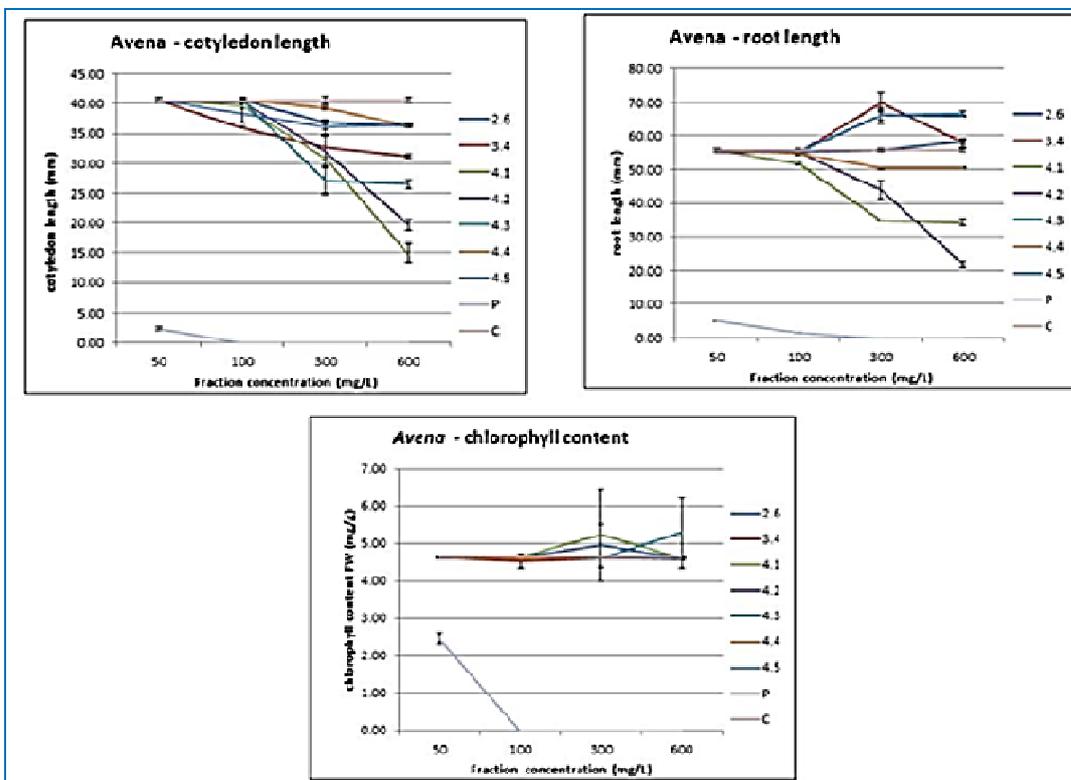


Figura 5

Per *Salvia adenophora* sono stati valutati i seguenti composti (1) e (2) (Figura 6):

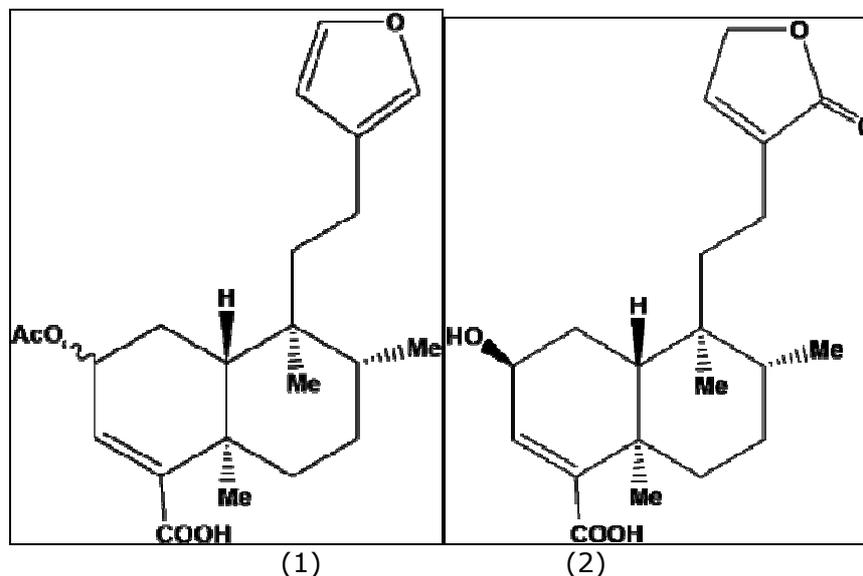


Figura 6

che hanno dato i risultati riportati in Figura 7 (rapportati al Pendimethalin (P) ed al controllo (C)).



MARITTIMO - IT FR - MARITIME
 TOSCANA - LIGURIA - SARDEGNA - CORSE

*La Cooperazione al cuore
 del Mediterraneo*

*La Coopération au coeur
 de la Méditerranée*

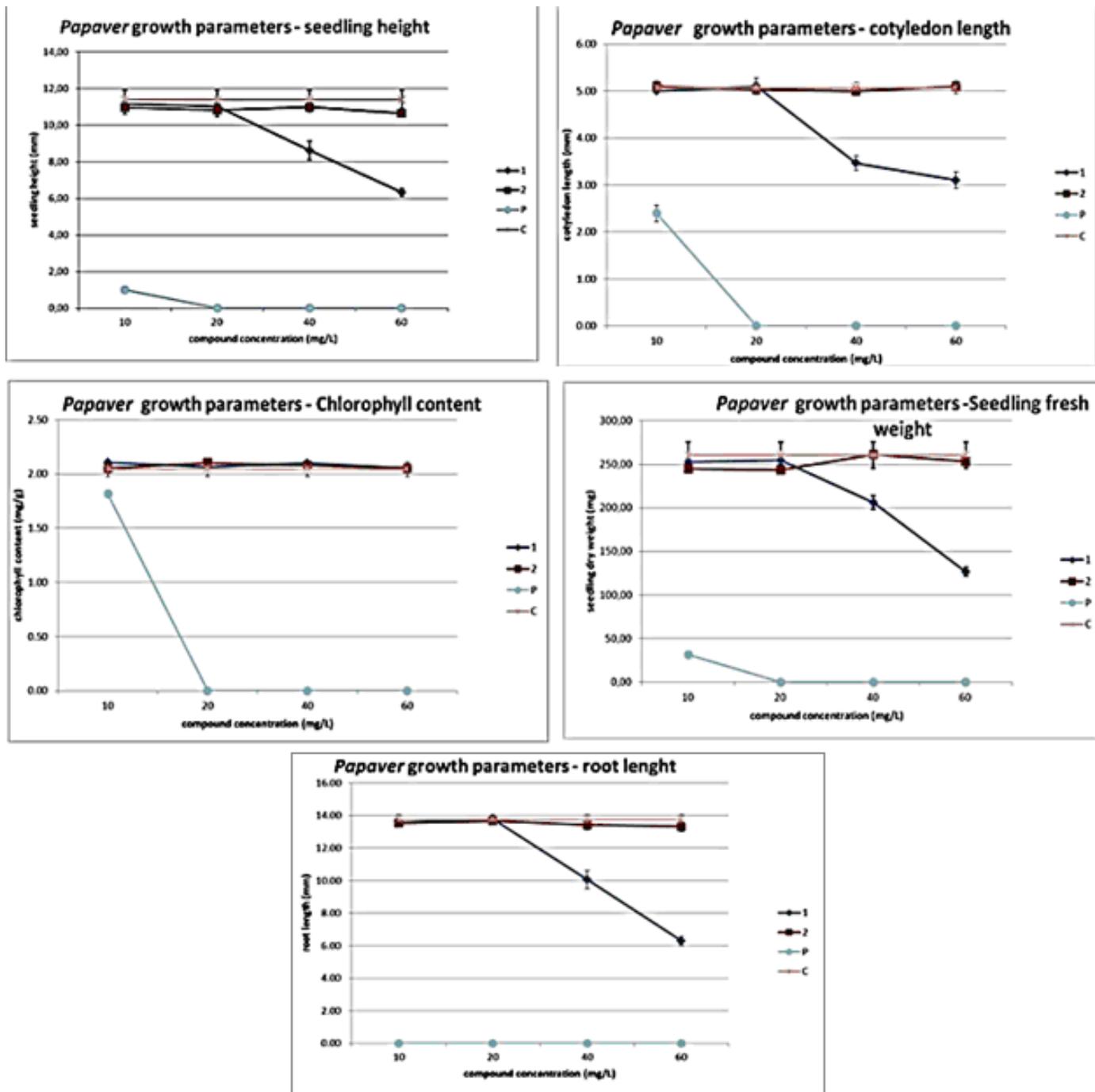


Figura 7



REGIONE AUTONOMA DE SARDEGNA
 REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA



REGIONE LIGURIA



REGIONE
 TOSCANA





MARITTIMO - IT FR - MARITIME
TOSCANA - LIGURIA - SARDEGNA - CORSE

La Cooperazione al cuore
del Mediterraneo

La Coopération au coeur
de la Méditerranée

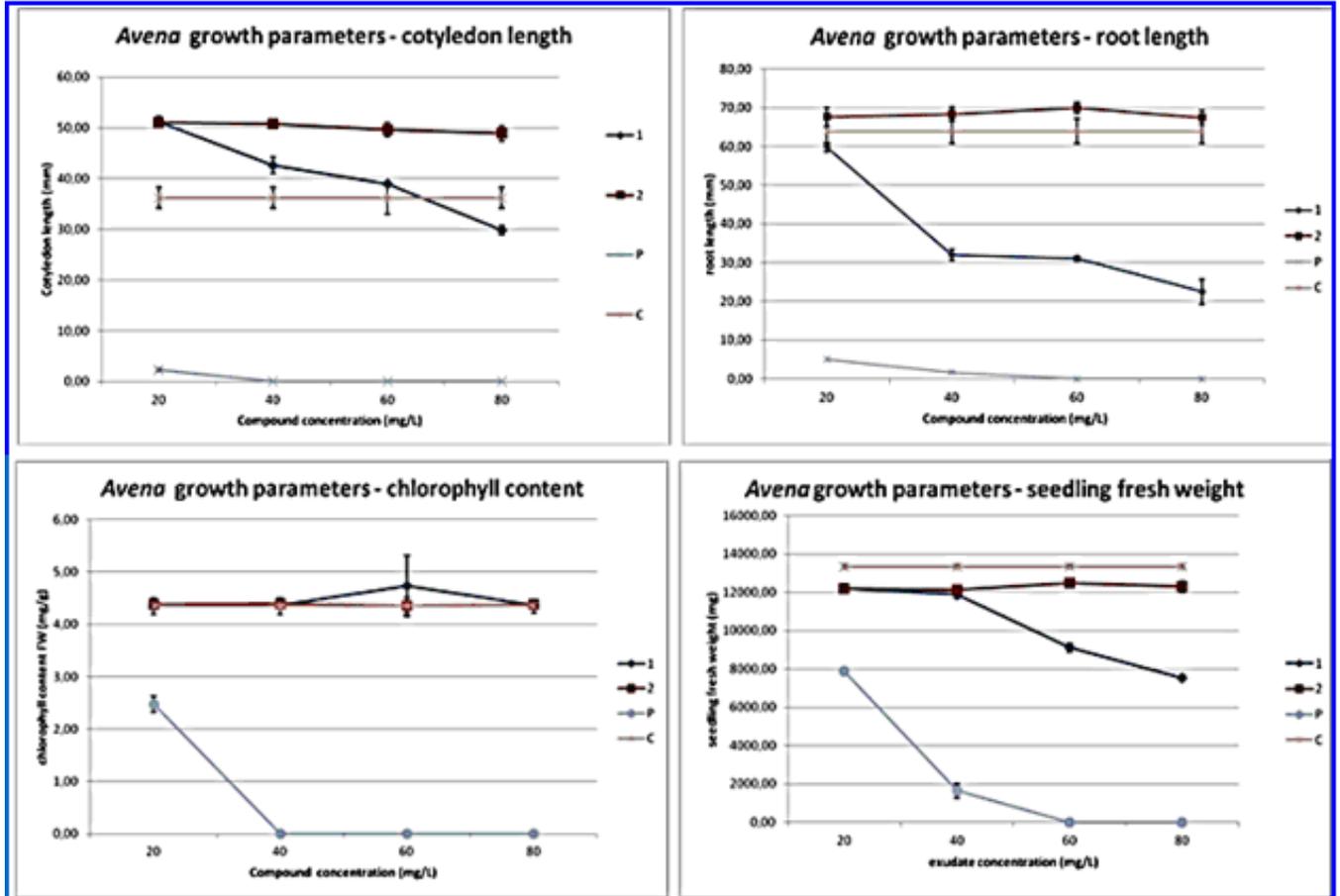


Figura 7

Valutazione attività antifungina da diterpeni isolati da *Salvia somalensis*.

Due diterpeni isolati da *Salvia somalensis* hanno rivelato attività fungicida su comuni infestanti delle colture: *Colletotricum coccodes*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cynerea*, *Rhizoctonia* sp.

(Prodotto divulgato al convegno: Minuto G. Minuto A., Bruzzone C., Lanteri A.P., Bisio A., Romussi G. 2011. Antifungal activity of carnosic acid and carnosol against phytopathogenic fungi. XX Congresso Italo-Latino Americano de Etnomedicina "Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos. Fortaleza - Ceará, Brasil, 19-22 Settembre 2011.)



MARITTIMO - IT FR - MARITIME
TOSCANA - LIGURIA - SARDEGNA - CORSE

*La Cooperazione al cuore
del Mediterraneo*

*La Coopération au coeur
de la Méditerranée*

PRODOTTO 20b PROFILO FARMACEUTICO DI ESTRATTI DI PARTI AEREE DI SALVIA spp.



Programma cofinanziato con il Fondo Europeo
per lo Sviluppo Regionale



Programme cofinancé par le Fonds Européen
de Développement Régional



*La Cooperazione al cuore
del Mediterraneo*

*La Coopération au coeur
de la Méditerranée*

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

All'interno della componente 4, azione 4.1, attività 4.1.1, il partner Dipartimento di Medicina Sperimentale (DIMES, sezione di Farmacologia e Tossicologia) dell'Università degli Studi di Genova ha proceduto alla valutazione del profilo farmaceutico di terpeni neocloreidani estratti dalle parti aeree di piante del genere *Salvia*.

È noto che Salvinorina A, uno dei componenti principali estratti dalle foglie di *Salvia divinorum*, agisce a livello dei recettori oppioidi, la cui farmacologia non è ad oggi completamente chiarita, anche a causa della mancanza di ligandi selettivi in grado di discriminare tra i diversi sottotipi recettoriali. Quindi, la necessità di individuare nuove molecole a struttura non alcaloide, in grado di legare con elevata affinità e selettività i diversi sottotipi recettoriali oppioidi, rappresenta una priorità in campo farmaceutico. Infatti, tali molecole hanno potenziali applicazioni in diversi disturbi del sistema nervoso centrale (SNC) come ansia, abuso di farmaci, ipossia, dolore e disturbi dell'umore (Carlezon et al., 2009; Wu et al., 2012). Tale studio costituisce, di conseguenza, un valore aggiunto nell'ambito del progetto Pyrgi, in quanto potrebbe evidenziare una potenzialità farmacoterapeutica di alcuni principi attivi ottenuti nell'ambito del progetto.

Risultati e discussione

Come primo approccio abbiamo valutato il profilo farmacologico di Salvinorina A, che sulla base dei dati disponibili in letteratura agisce come agonista selettivo per i recettori κ oppioidi (KOR). I nostri dati hanno evidenziato come il composto sia in grado di riconoscere oligomeri recettoriali nella cui composizione è effettivamente coinvolto il recettore κ. In virtù delle sue caratteristiche strutturali e biologiche, Salvinorina A costituisce un potenziale modello per l'ottenimento di nuove molecole semi-sintetiche utilizzabili a scopi terapeutici.

Abbiamo valutato l'interazione di Salvinorina A e KOR presinaptici in grado di modulare il rilascio di catecolamine da terminazioni nervose ippocampali e striatali (Grilli et al., 2009). I risultati ottenuti hanno evidenziato, in accordo con i dati presenti in letteratura (Roth et al., 2002; Butelman et al., 2009), che questo composto si lega con alta affinità ed efficacia a KOR localizzati a livello presinaptico su terminazioni nervose dopaminergiche striatali. L'attivazione di tali recettori induce la diminuzione del rilascio di dopamina causata da un debole stimolo depolarizzante (12 mM KCl; Sandor et al., 1992; Svingos et al., 1999; Grilli et al., 2009).

Andando a studiare l'effetto di Salvinorina A sulle terminazioni nervose noradrenergiche ippocampali, abbiamo invece osservato un aumento della liberazione di noradrenalina. Il fatto che tale composto agisca in maniera differente a livello striatale e ippocampale potrebbe essere riconducibile all'attivazione di differenti sottotipi recettoriali (Grilli et al., 2009).

Abbiamo quindi valutato il profilo farmacologico di terpeni neocloreidani estratti da altri tipi di *Salvia*, come *Salvia wagneriana*, *Salvia jamensis*, ovvero i composti SW8, SW22 e SJ217, forniti dalla Dr.ssa Angela Bisio (DICTFA, UNIGE). Tale studio ci ha permesso di



Programma cofinanziato con il Fondo Europeo
per lo Sviluppo Regionale



REGIONE LIGURIA



Programme cofinancé par le Fonds Européen
de Développement Régional



Collectivité
Territoriale de
CORSE
Collectivité
Territoriale di
CORSICA



individuare nel composto SW8, l'acido Hardwickiico, una molecola di notevole interesse dal punto di vista farmacologico (Pittaluga et al., 2013). Tale composto diterpenico è stato isolato dall'essudato superficiale della parte aerea di *Salvia wagneriana* e presenta struttura simile a quella di Salvinorina A, sebbene siano evidenziabili alcune differenze (Fig. 1). In virtù di tale analogia, abbiamo ipotizzato che l'acido Hardwickiico fosse in grado di mimare l'azione di Salvinorina A. Abbiamo quindi effettuato degli esperimenti al fine di determinare il suo effetto su recettori presinaptici oppioidi in grado di modulare il rilascio di dopamina e noradrenalina nel SNC, confrontando tali risultati con quelli precedentemente ottenuti.

Figura 1.

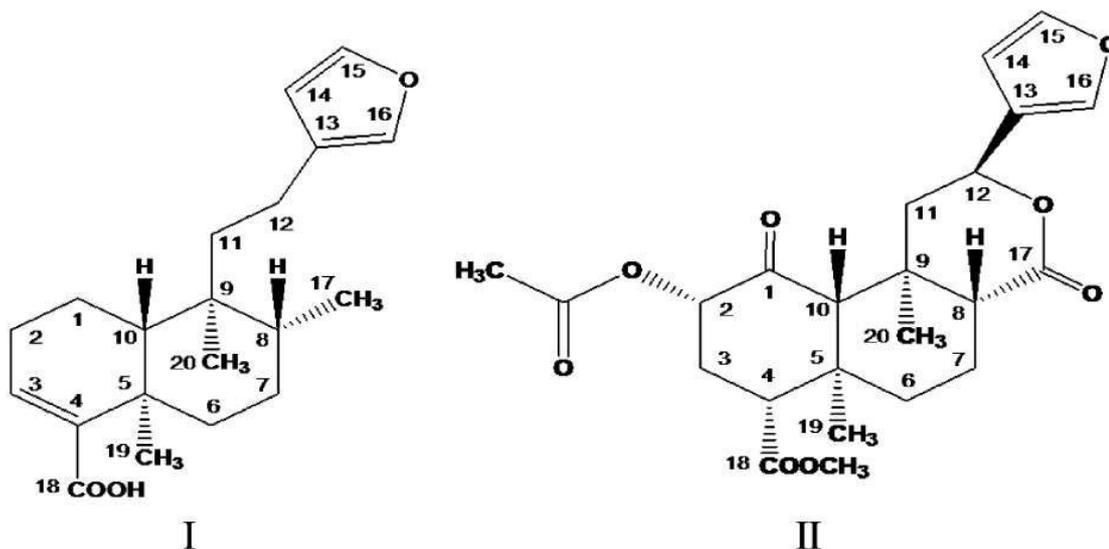


Fig. 1. Chemical formulas. I: Hardwickiic acid; II: Salvinorin A.

L'acido Hardwickiico incrementa il rilascio di noradrenalina in condizioni depolarizzanti a livello ippocampale con potenza equiparabile a quella di Salvinorina A, benché la loro azione non risulti additiva (Fig. 2A).

L'acido Hardwickiico non è però in grado di modificare la liberazione di dopamina da terminazioni nervose striatali, al contrario di Salvinorina A (Fig. 2B). Esso risulta quindi capace di discriminare tra i differenti sottotipi recettoriali coinvolti nel controllo presinaptico del rilascio di catecolamine (Grilli et al., 2009). Per confermare tale ipotesi abbiamo utilizzato antagonisti specifici per i diversi sottotipi recettoriali, ossia KOR, MOR (recettore oppioide μ) e DOR (recettore oppioide δ). Gli esperimenti effettuati hanno dimostrato come l'effetto di acido Hardwickiico sia riconducibile all'interazione con eterodimeri presinaptici κ - δ (Sandor et al., 1992; Grilli et al., 2009) e in particolare con la componente DOR, escludendo il coinvolgimento del sottotipo μ (Fig. 2C).



MARITTIMO - IT FR - MARITIME
 TOSCANA - LIGURIA - SARDEGNA - CORSE

*La Cooperazione al cuore
 del Mediterraneo*

*La Coopération au coeur
 de la Méditerranée*

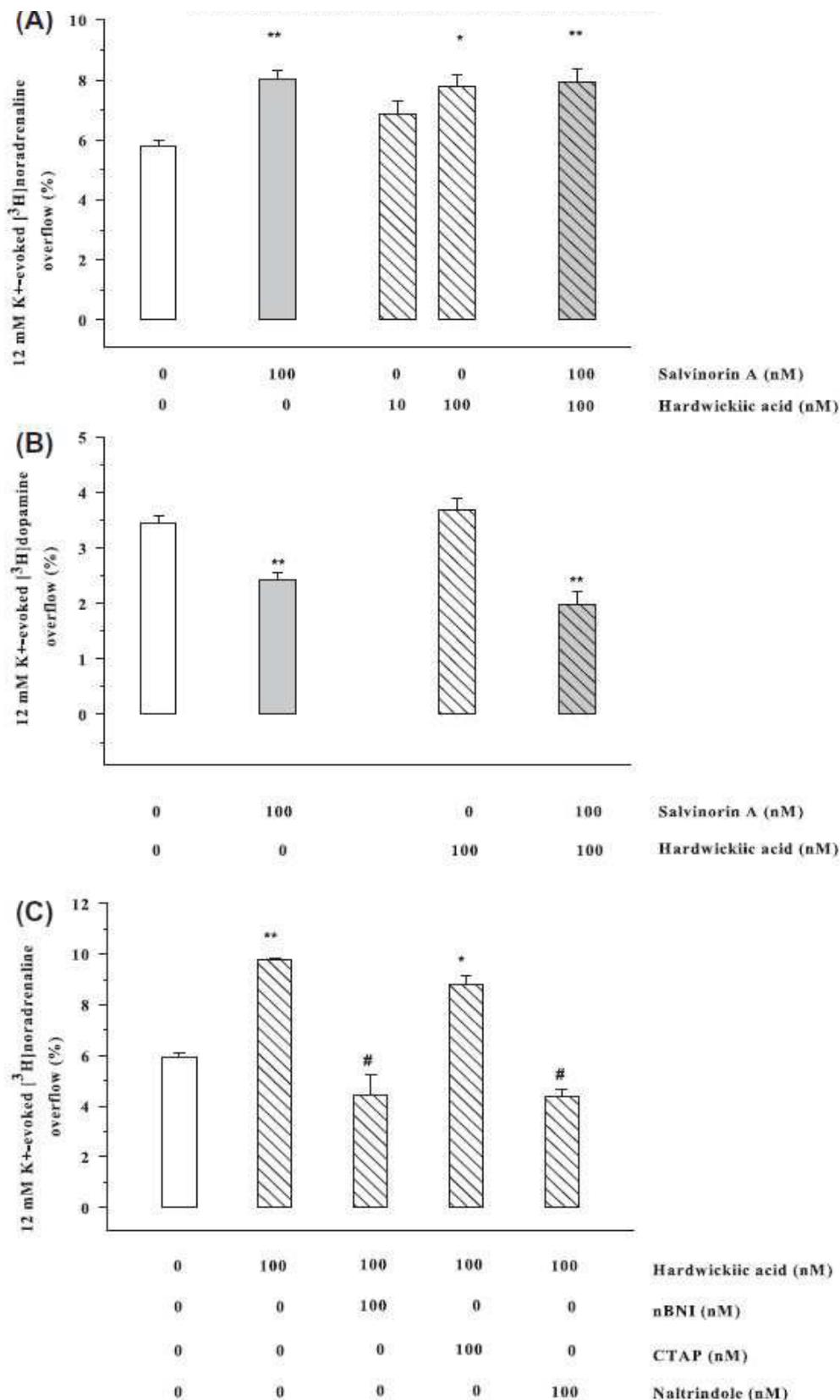


Figura 2.



Il partner ha infine valutato se gli altri due composti, ossia SW-22 e SJ217, fossero in grado di modificare la liberazione spontanea o indotta da stimolo depolarizzante di dopamina e di noradrenalina. In questo caso non abbiamo riscontrato un effetto modulatorio né a livello ippocampale né striatale (Figura 3).

Figura 3.

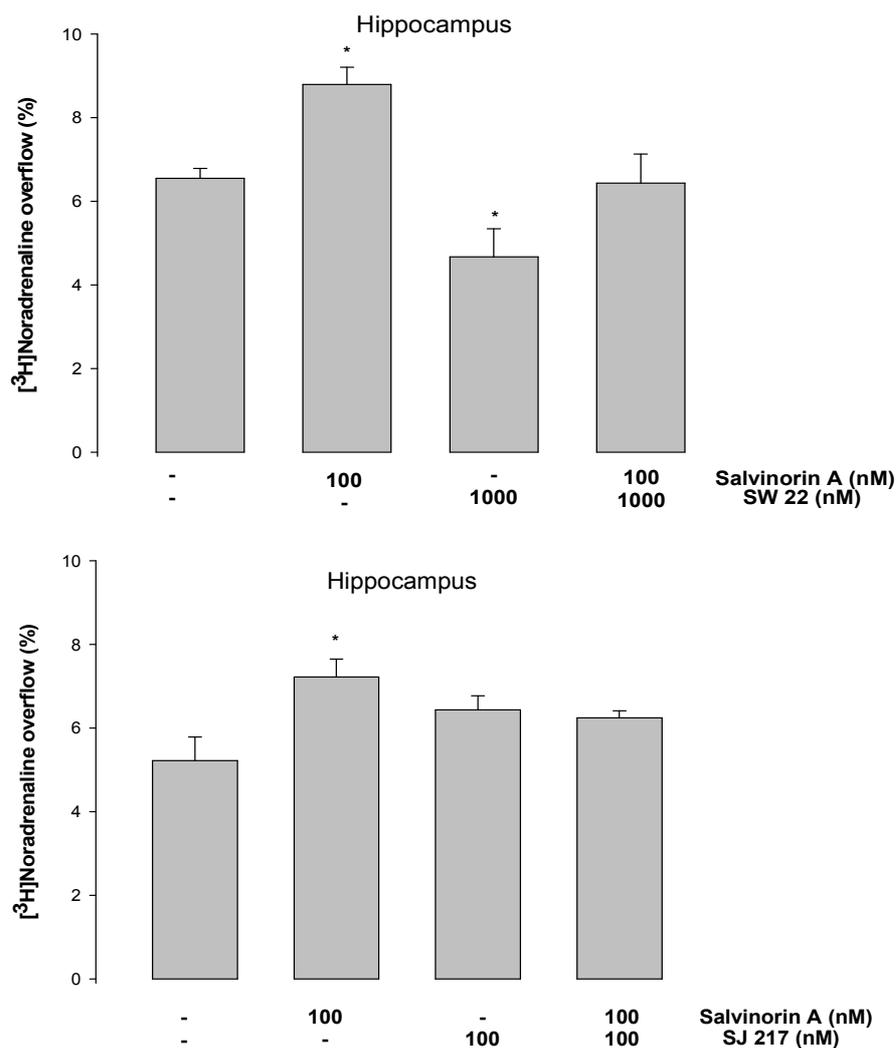
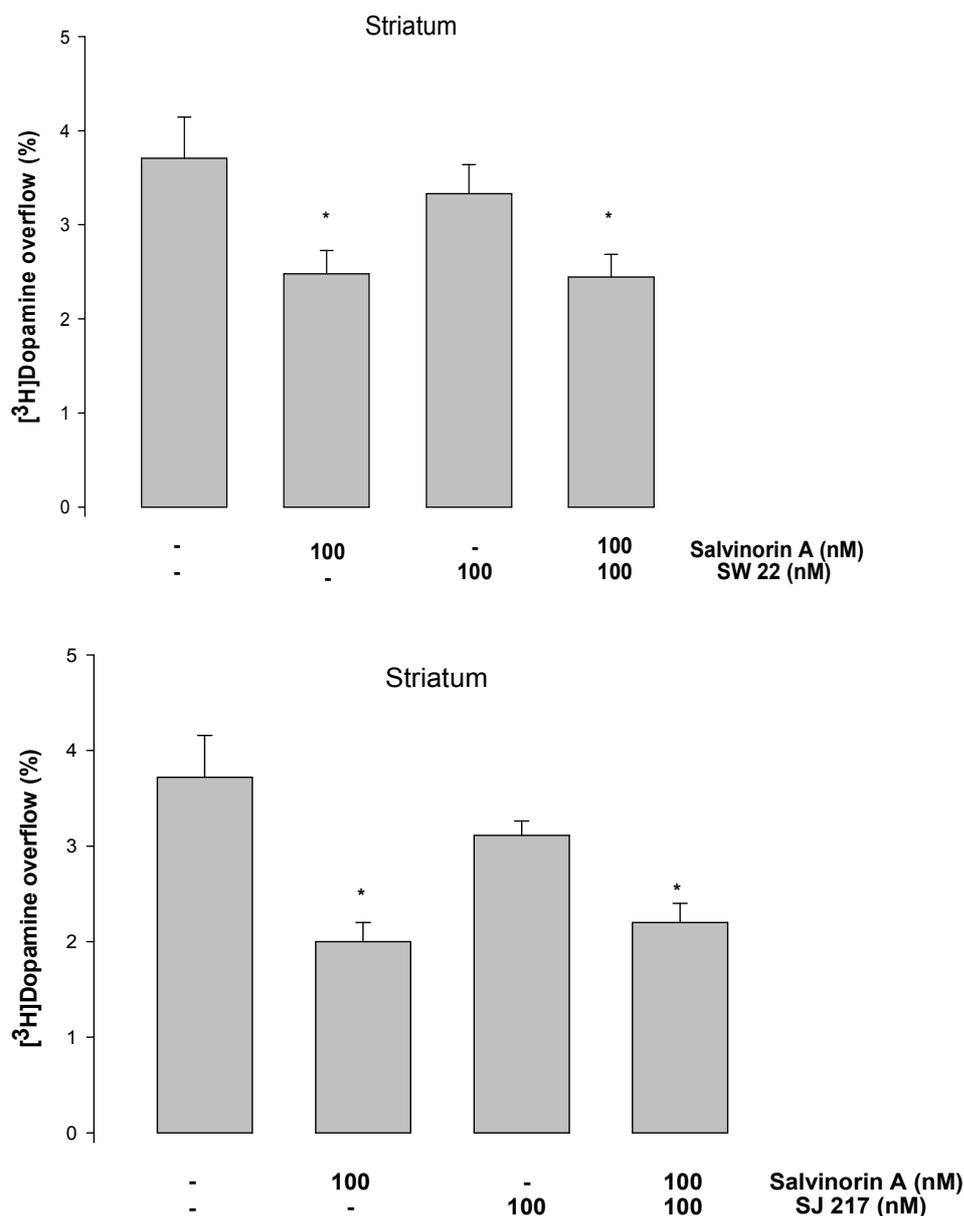


Figura 3.



Conclusioni

In base ai risultati ottenuti possiamo concludere che l'acido Hardwickiico (SW8), ma non SJ217 e SW22, potrebbe rappresentare un prototipo di una nuova classe di farmaci ansiolitici e antidepressivi non peptidergici selettivi per il sottotipo DOR (Pittaluga et al. 2013).



*La Cooperazione al cuore
del Mediterraneo*

*La Coopération au coeur
de la Méditerranée*

Bibliografia

- Butelman, E.R., Prisinzano, T.E., Deng, H., Rus, S., Kreek, M.J., 2009. Unconditioned behavioral effects of the powerful kappa-opioid hallucinogen salvinorin A in nonhuman primates: fast onset and entry into cerebrospinal fluid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 328, 588–597
- Carlezon, W.A., Béguin, C., Knoll, A.T., Cohen, B.M., 2009. Kappa-opioid ligands in the study and treatment of mood disorders. *Pharmacol. Ther.* 123, 334–343.
- Grilli, M., Neri, E., Zappettini, S., Massa, F., Bisio, A., Romussi, G., Marchi, M., Pittaluga, A., 2009. Salvinorin A exerts opposite presynaptic controls on neurotransmitter exocytosis from mouse brain nerve terminals. *Neuropharmacology* 57, 523–530.
- Pittaluga, A., Olivero, G., Di Prisco, S., Meregá, E., Bisio, A., Romussi, G., Grilli, M., Marchi, M., 2013. Effects of the neoclerodane Hardwickiic acid on the presynaptic opioid receptors which modulate noradrenaline and dopamine release in mouse central nervous system. *Neurochem Int.* 2, 354–359
- Roth, B.L., Baner, K., Westkaemper, R., Siebert, D., Rice, K.C., Steinberg, S., Ernsberger, P., Rothman, R.B., 2002. Salvinorin A: a potent naturally occurring nonnitrogenous kappa opioid selective agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 11934–11939.
- Sandor, N.T., Lendvai, B., Vizi, E.S., 1992. Effect of selective opiate antagonists on striatal acetylcholine and dopamine release. *Brain Res. Bull.* 29, 369–373.
- Svingos, A.L., Colago, E.E., Pickel, V.M., 1999. Cellular sites for dynorphin activation of kappa-opioid receptors in the rat nucleus accumbens shell. *J. Neurosci.* 19, 1804–1813.
- Wu, H., Wacker, D., Mileni, M., Katritch, V., Han, G.W., Vardy, E., Liu, W., Thompson, A.A., Huang, X.P., Carroll, F.I., Mascarella, S.W., Westkaemper, R.B., Mosier, P.D., Roth, B.L., Cherezov, V., Stevens, R.C., 2012. Structure of the human κ -opioid receptor in complex with JDTic. *Nature* 485, 327–332.