



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**Μελέτη έκφρασης των υποδοχέων CB1 και CB2 στην Πειραματική**  
**Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα**

Νουσιοπούλου Ευαγγελία

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Χατζηγεωργίου Γεώργιος, Καθηγητής Νευρολογίας του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Επιβλέπων
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Γρηγοριάδης Νικόλαος, Καθηγητής Νευρολογίας του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρους των  
απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης  
« ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ »

Λάρισα, Οκτώβριος, 2018



**UNIVERSITY OF THESSALY**  
**SCHOOL OF HEALTH SCIENCE**  
**FACULTY OF MEDICINE**



**MASTER PROGRAM IN**  
**“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

**MASTER THESIS**  
**Study of the expression of CB1 and CB2 receptors in Experimental**  
**Autoimmune Encephalomyelitis**

**By**  
**Nousiopoulou Evangelia**

A three-member committee of inquiry

- Hadjigeorgiou Georgios Prof. of Neurology, Medical School, University of Thessaly, Supervisor
- Germanis Anastasios Prof. of Laboratory Immunology, Medical School, University of Thessaly
- Grigoriadis Nikolaos Prof. of Neurology, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in  
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

Larisa, October, 2018

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ –ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	6-7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	8-9
ABSTRACT .....	10
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	11
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:</b> ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	11
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.2 ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ.....	11-12
1.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΟΥΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....	13
1.3.1 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ CB1.....	13
1.3.2 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ CB2.....	13-14
1.3.3 Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ CB1 ΚΑΙ CB.....	14-15
1.4 ΕΝΖΥΜΑ ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΟΥΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ .....	15
1.5 ΤΟ ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΤΟ ΚΝΣ.....	15
1.6 ΤΟ ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	16
1.7 ΤΟ ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑ ΣΤΗ ΣκΠ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΕ.....	16
1.8 ΤΟ ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑ ΩΣ ΠΙΘΑΝΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΛΥΣΗ.....	17
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2:</b> ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ (ΣΚΠ).....	19
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	19
2.2 ΑΙΤΙΑ.....	19-20
2.3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	20-21
2.4 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ-ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ.....	21
2.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	21-22
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:</b> ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΕΓΚΕΦΑΛΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ (ΠΑΕ).....	23

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	23
3.2 ΕΝΕΡΓΗΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΑΘΗΤΙΚΗ ΠΑΕ .....	23-24
3.3 ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΑΕ ΚΑΙ ΣκΠ.....	24
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>25</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>25</b>
4.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ.....	25
4.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΚΑΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΟΜΑΔΩΝ.....	25-26
4.3 ΕΠΑΓΩΓΗ ΠΑΕ.....	26
4.3.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ.....	27
4.3.2 ΘΥΣΙΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ.....	28-29
4.4 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΔΟΕΙΔΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ.....	29
4.4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA.....	29
4.4.2. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA (cDNA) .....	30
4.4.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (RT-PCR).....	30-31
4.5 ΑΝΟΣΟΣΤΥΠΩΜΑ ΚΑΤΑ WESTERN.....	31-32
4.5.1 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ (SDS-PAGE).....	32
4.5.2 ΗΛΕΚΤΡΟΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ MEMBRANE PVDF.....	33
4.5.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ / ΕΙΔΙΚΩΝ ΖΩΝΩΝ.....	33
4.6 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ.....	34
4.6.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΙΣΤΩΝ: ΣΚΗΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΤΟΜΗΣΗ.....	34
4.6.2 ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΧΡΩΣΕΙΣ.....	34
4.6.2.1 ΑΙΜΑΤΟΕΥΛΙΝΗ-ΕΩΣΙΝΗ .....	34
4.6.2.2 LUXOL FAST BLUE (LFB).....	34-35

4.6.3 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΟΠΤΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ.....	35-36
4.6.4 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ.....	36
4.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	36
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>37</b>
5.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΕ.....	37
5.2 mRNA ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ.....	37
5.3 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΝΟΣΟΣΤΥΠΩΜΑ ΚΑΤΑ WESTERN.....	40-42
5.4 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΟ ΚΝΣ .....	43-45
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>46-48</b>
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	49-57

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ –ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το Ενδοκανναβινοειδές Σύστημα (ΕΚΣ) αποτελείται από δύο βασικούς υποδοχείς, τον υποδοχέα κανναβινοειδούς τύπου 1 (CB1) και τον υποδοχέα τύπου 2 (CB2). Το σύστημα αυτό παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές λειτουργίες σε νευροεκφυλιστικές παθήσεις, όπως η Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣΚΠ). Ο σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των παραπάνω υποδοχέων στο πειραματικό μοντέλο που προσομοιάζει τη ΣΚΠ, την Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ) σε τρεις χρονικές στιγμές, στην προσυμπτωματική φάση, στην οξεία φάση και στη χρόνια φάση σε σύγκριση με την ομάδα φυσιολογικών μαρτύρων. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time-PCR), το ανοσοστύπωμα κατά Western (WB) και η ανοσοϊστοχημεία για οπτικό μικροσκόπιο σε θηλυκούς μύες της φυλής C57BL/6 στον εγκέφαλο και στον νωτιαίο μυελό των πειραματόζωων.

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ» του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής και είναι αποτέλεσμα συνεργασίας με το Εργαστήριο Πειραματικής Νευρολογίας και Νευροανοσολογίας της Β΄ Νευρολογικής Κλινικής του Α.Π.Θ., όπου πραγματοποιήθηκε το πειραματικό μέρος της εργασίας.

Με την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τον Καθηγητή Νευρολογίας κ. Χατζηγεωργίου Γεώργιο για την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη του, καθώς και τον Καθηγητή Ανοσολογίας κ. Γερμενή Αναστάσιο για τις συμβουλές του για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Νευρολογίας Α.Π.Θ και διευθυντή της Β΄ Νευρολογικής Κλινικής του νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ, κ. Γρηγοριάδη Νικόλαο, για την άριστη συνεργασία, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος όλα τα μέλη του εργαστηρίου Πειραματικής Νευρολογίας και Νευροανοσολογίας, του νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ. Συγκεκριμένα, την τεχνολόγο Ιατρικών Εργαστηρίων Τουλούμη Όλγα (MSc, ΕΤΕΠ) για τις συμβουλές της και την καθοδήγηση της για την ολοκλήρωση της εργασίας, τη βιολόγο Λαγουδάκη Ρόζα (MSc, PhD, ΕΔΙΠ) για την εκπαίδευση μου στην τεχνική της Real Time-PCR και τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις της, τη βιολόγο Κεσίδου Εύη (MSc, PhD) για την εκπαίδευση μου στην τεχνική του ανοσοστυπώματος κατά Western, την κτηνίατρο Κωφίδου Εύη, τη νευρολόγο Μποζίκη Μαρίνα (MSc, PhD), τον βιοχημικό Θεοτόκη Πασχάλη (MSc, PhD), την υποψήφια διδάκτορα Δελιβάνογλου Νικολέτα και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ζωίδου Σοφία για την ηθική και

επιστημονική στήριξη τους.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, και κυρίως στον σύζυγό μου Ιωάννη για την κατανόηση, την αγάπη και την αμέριστη συμπαράστασή του.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Εισαγωγή:** Το Ενδοκανναβινοειδές Σύστημα (ΕΚΣ) εμπλέκεται στη ρύθμιση πολλών φυσιολογικών διεργασιών όπως της διάθεσης και της μνήμης, καθώς και σε πολλές άλλες λειτουργίες. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι παίζει κύριο ρόλο στις νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως η Σκλήρυνση κατά Πλάκας, γιατί παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση. Ο υποδοχέας CB1 είναι υπεύθυνος για την διαμεσολάβηση των επιδράσεων της σύνδεσης κανναβινοειδών, της ανανδαμίδης και της 2-AG στον εγκέφαλο ενώ ο υποδοχέας CB2 εμπλέκεται στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.

**Σκοπός:** Η μελέτη της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των υποδοχέων CB1 και CB2 στο ΚΝΣ στην Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ).

**Υλικά και Μέθοδοι:** C57BL/6 μύες συγκρίθηκαν στο μοντέλο ΠΑΕ σε τρία στάδια της νόσου (προσυμπτωματική, οξεία και χρόνια φάση) σε συσχέτιση με την ομάδα μαρτύρων. Η έκφραση του mRNA μελετήθηκε χρησιμοποιώντας Real Time-PCR μέθοδο και η έκφραση της πρωτεΐνης των δύο υποδοχέων μελετήθηκε με το ανοσοστύπωμα κατά Western και με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας κάτω από οπτικό μικροσκόπιο.

**Αποτελέσματα:** Υπήρχε αυξημένη έκφραση mRNA του CB1 στην προσυμπτωματική φάση της ΠΑΕ στον εγκέφαλο και στην οξεία φάση στον νωτιαίο μυελό. Ο CB2 έχει αύξηση στην οξεία φάση στον νωτιαίο μυελό ενώ δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά στον εγκέφαλο. Στο ανοσοστύπωμα κατά Western, ο CB1 αυξάνεται στην οξεία και τη χρόνια φάση σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων στον νωτιαίο μυελό ενώ δεν σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στον εγκέφαλο. Ο CB2 μειώνεται στην προσυμπτωματική και τη χρόνια φάση συγκρινόμενη με την ομάδα μαρτύρων στον εγκέφαλο ενώ στον νωτιαίο μυελό δεν παρατηρήθηκαν διαφορές. Υπό μικροσκοπία παρατηρήθηκε αύξηση του CB1 στην προσυμπτωματική φάση σε σύγκριση με τη χρόνια φάση στον εγκέφαλο. Αντίστοιχα, ο CB2 αυξήθηκε στην οξεία φάση σε σύγκριση με την προσυμπτωματική και τη χρόνια φάση. Τέλος, στον νωτιαίο μυελό, ο CB1 και ο CB2 αυξάνονται στην οξεία και τη χρόνια φάση.

**Συμπεράσματα:** Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν περαιτέρω τη συσχέτιση μεταξύ του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος και της ανοσομεσολαβούμενης απομυελίνωσης. Επιβεβαιώθηκε επίσης ότι η έκφρασή του μπορεί να σχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου. Οι μεταβολές στην έκφραση των υποδοχέων στην προσυμπτωματική φάση μπορεί να υποδεικνύουν μια ενεργή συμμετοχή του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος ήδη στο προκλινικό στάδιο, αλλά άγνωστου ρόλου.



ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Υποδοχέας CB1, Υποδοχέας CB2, Ενδοκανναβινοειδές Σύστημα (ΕΚΣ),  
Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ), Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣκΠ)

## ABSTRACT

**Introduction:** The Endocannabinoid System (ECS) is involved in the regulation of many physiological processes such as mood and memory, as well as many other functions. It has also been shown to play a major role in neurodegenerative diseases, such as Multiple Sclerosis, because it has anti-inflammatory and antioxidant effects. The CB1 receptor is responsible for mediating the cannabinoid effects, anandamide and 2-AG binding in the brain and the CB2 receptor is involved in the immune system.

**Purpose:** The study of the gene and protein expression of CB1 and CB2 receptors in the CNS in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE).

**Materials and Methods:** C57BL/6 mice were compared in the three-stage disease model (pre-symptomatic, acute and chronic phase) in association with the control group. mRNA expression was studied using a Real Time-PCR method and the protein expression of the receptors was studied by Western immunoblotting and using immunohistochemistry under an optical microscope.

**Results:** There was increased CB1 mRNA expression in the pre-symptomatic phase of EAE in the brain and in the acute phase in the spinal cord. CB2 has an increase in the acute phase in the spinal cord while there was no statistically significant difference in the brain. In the Western immunoblotting, CB1 increases in the acute and chronic phases compared to the control group in the spinal cord while there are no statistically significant differences in the brain. CB2 decreases in the pre-symptomatic and the chronic phase compared to the control group in the brain while no differences were observed in the spinal cord. Under microscopy, CB1 increased in the pre-symptomatic phase compared to the chronic phase in the brain. Respectively, CB2 increased in the acute phase compared to the pre-symptomatic and chronic phase. Finally, in the spinal cord, CB1 and CB2 increase in the acute and chronic phases.

**Conclusions:** Our results support the correlation between the endocannabinoid system and the immune-mediated demyelination. It was also confirmed that its expression may be related to the progression of the disease. Changes in receptor expression in the pre-symptomatic phase may indicate an active involvement of the endocannabinoid system already in the preclinical stage but of unknown role.

## KEYWORDS

CB1 Receptor, CB2 Receptor, Endocannabinoid System (ECS), Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), Multiple Sclerosis (MS)

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

#### **ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑ (ΕΚΣ)**

##### **1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Το Ενδοκανναβινοειδές Σύστημα (ΕΚΣ) είναι ένα βιολογικό σύστημα που αποτελείται από τα ενδοκανναβινοειδή, τα οποία είναι ενδογενείς νευροδιαβιβαστές, όπως η ανανδαμίδη (N -αραχιδονοϋλαιθανολαμίδιο, AEA) και η 2-αραχιδονυλογλυκερόλη (2-AG), τους υποδοχείς κανναβινοειδών που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων (CB1 και CB2) και τα ένζυμα που μεταφέρουν τα ενδοκανναβινοειδή αφού χρησιμοποιηθούν, όπως υδρολάση αμιδίου λιπαρού οξέος (FAAH) ή λιπάση μονοακυλγλυκερόλης (MAGL) [1].

Οι ψυχοδιεγερτικές ιδιότητες του φυτού *Cannabis sativa* και η προσπάθεια των ερευνητών να κατανοήσουν τις επιδράσεις της ήταν η αίτια της ονομασίας του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος. Η ταυτοποίηση της Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινόλης (THC) ως κύριο συστατικό της κάνναβης έγινε το 1964, ενώ αργότερα ανακαλυφθήκαν οι υποδοχείς CB1 και CB2 [2].

Το ΕΚΣ είναι ζωτικής σημασίας γιατί είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της ομοιόστασης δηλαδή την ικανότητα του οργανισμού να διατηρεί σταθερή την ισορροπία του. Επίσης, ρυθμίζει βασικές διεργασίες, όπως τη γονιμότητα, την εγκυμοσύνη, την όρεξη, τη διάθεση και τη μνήμη. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι το ΕΚΣ παίζει κύριο ρόλο στις νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως η Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣΚΠ), γιατί παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση [3,4].

##### **1.2 ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ**

Τα κανναβινοειδή είναι σημαντικοί ρυθμιστές της συναπτικής μετάδοσης στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), δεσμεύουν και ενεργοποιούν τους υποδοχείς CB1 και CB2 αλλά διαφέρουν στον τρόπο για τον κάθε υποδοχέα. Χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τα ενδογενή, τα εξωγενή και τα συνθετικά [5].

Η ανανδαμίδη (AEA) και η 2-αραχιδονυλογλυκερόλη (2-AG) είναι τα κυρίαρχα ενδοκανναβινοειδή σε θηλαστικά. Η ανανδαμίδη ήταν το πρώτο ενδοκανναβινοειδές που εντοπίστηκε από τους επιστήμονες το 1992. Είναι ένας νευροδιαβιβαστής λιπαρών οξέων που προέρχεται από το μη οξειδωτικό μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος. Συντίθεται από την N-αραχιδονουλ-φωσφατιδυλαιθανολαμίνη με ποικίλους τρόπους και αποδομείται από το ένζυμο

υδρολάση αμιδίου λιπαρών οξέων (FAAH), το οποίο μετατρέπει την ανανδαμίδα σε αιθανολαμίνη και αραχιδονικό οξύ. Οι επιδράσεις της ανανδαμίδης εμφανίζονται στο ΚΝΣ και στο Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ) και προκαλούνται από τους υποδοχείς CB1 και CB2. Βρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στον οργανισμό και για περιορισμένο χρόνο εξαιτίας του FAAH [6].

Η 2-AG ανακαλύφθηκε το 1995. Η 2-AG είναι ο ενδογενής συνδέτης του CB2 υποδοχέα. Σχηματίζεται από το αραχιδονικό οξύ και τη γλυκερόλη. Σε αντίθεση με την ανανδαμίδα, η 2-AG βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στο ΚΝΣ και εξαρτάται από το ασβέστιο. Υδρολύεται με τη λιπάση μονοακυλγλυκερόλης (MAGL) και το FAAH. Τέλος, δρα ως αγωνιστής του υποδοχέα CB1 [7].

Εξωγενή είναι τα κανναβινοειδή που βρίσκονται στην κάνναβη δηλαδή η  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλη (THC) και η κανναβιδιόλη (CBD). Οι συγκεκριμένες ουσίες όταν καταναλωθούν, αλληλοεπιδρούν με τους υποδοχείς του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος παράγοντας διαφορετικές φυσικές και ψυχολογικές επιδράσεις. Η THC είναι το κύριο ψυχοδραστικό συστατικό της κάνναβης. Οι ψυχοδραστικές της δράσεις προκαλούνται κυρίως από την ενεργοποίηση των υποδοχέων CB1 και CB2. Η επαρκής αντιοξειδωτική δράση της THC προστατεύει τους νευρώνες από το οξειδωτικό στρες και δρα ικανοποιητικά στην καταστολή των υποδοχέων συγκρινόμενη με τα ενδοκανναβινοειδή. Ανιχνεύεται στο αίμα, στα ούρα, στα μαλλιά, στο σίελο και στον ιδρώτα με τη χρήση ανοσοτεχνικών. Η κανναβιδιόλη (CBD) είναι και αυτό συστατικό της κάνναβης. Βρέθηκε ότι αλληλοεπιδρά με τους υποδοχείς του ΕΚΣ, αλλά δεν έχει αντιοξειδωτικές δράσεις όπως η THC. Χρησιμοποιείται στην ιατρική για τους πόνους σε ασθενείς με Σκλήρυνση κατά Πλάκας και στην παιδική επιληψία [7,8].

Τα συνθετικά κανναβινοειδή έχουν παρασκευαστεί εργαστηριακά και είναι μόρια που δεσμεύουν τους ενδοκανναβινοειδείς υποδοχείς στο σώμα, όπως κάνουν τα ενδογενή και εξωγενή κανναβινοειδή. Έχουν σχεδιαστεί με βάση την THC και έχουν μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης με τους CB1 υποδοχείς. Ταξινομούνται βάσει της δομής τους και η ονομασία τους προήλθε από τον ερευνητή ή το ίδρυμα που τα ανακάλυψε (CP-, WIN-, JWH-, UR- και PB). Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν για την πλήρη κατανόηση της δράσης της  $\Delta^9$ -THC. Στη συνέχεια βοήθησαν στην ανακάλυψη των υποδοχέων του ΕΚΣ. Το πιο γνωστό συνθετικό ανάλογο της THC είναι η ναβιλόνη (Nabilone), που έχει χορηγηθεί άδεια για ιατρική χρήση. Τα υπόλοιπα συνθετικά κανναβινοειδή που κατά καιρούς βρέθηκαν να χρησιμοποιούνται για ψυχαγωγική χρήση δεν έχουν τεκμηριωμένα θεραπευτικά αποτελέσματα [7,8,9].

### 1.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΟΥΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Οι πρώτοι υποδοχείς του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος που ανακαλυφθήκαν ήταν ο CB1 και ο CB2, οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια διαφορετικών τύπων κυττάρων, σε ολόκληρο το σώμα. Οι CB1 υποδοχείς βρίσκονται κυρίως στο ΚΝΣ ενώ οι CB2 υποδοχείς στο ανοσοποιητικό σύστημα. Οι υποδοχείς CB1 εκφράζονται στους νευρώνες του ΚΝΣ και ΠΝΣ αλλά και σε ορισμένα μη νευρωνικά κύτταρα. Οι υποδοχείς CB2 εκφράζονται κυρίως σε ανοσιακά κύτταρα και έχουν ανοσορυθμιστικό ρόλο. Και οι δύο υποδοχείς έχουν την ικανότητα να διαμορφώσουν την απελευθέρωση των χημικών αγγελιοφόρων [5,10].

(Εικόνα 1)

#### 1.3.1 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ CB1

Ο CB1 είναι ένας υποδοχέας κανναβινοειδούς, συζευγμένος με πρωτεΐνη G που βρίσκεται στο ΚΝΣ και στο ΠΝΣ και ταυτοποιήθηκε το 1990 από τον Devane σε εγκέφαλο ποντικού [11]. Διαθέτει επτά διαμεμβρανικά πεδία συνδεδεμένα και ενεργοποιείται από τα ενδοκανναβινοειδή ή μέσω της κάνναβης ή σχετικής συνθετικής ένωσης. Αντιδρώντας στους υποδοχείς CB1, τα κανναβινοειδή αλληλεπιδρούν με πολλούς νευροδιαβιβαστές στο ΚΝΣ και μπορούν να διαμορφώσουν την απελευθέρωσή τους [11,12].

Ο CB1 εκφράζεται κυρίως στο ΚΝΣ και είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνος για τη μεσολάβηση των επιδράσεων της σύνδεσης κανναβινοειδών στον εγκέφαλο. Μερικοί υποδοχείς CB1 ρυθμίζουν την απελευθέρωση διεγερτικών και ανασταλτικών νευροδιαβιβαστών όταν ενεργοποιούνται. Διαφορετικά επίπεδα έκφρασης CB1 μπορούν να ανιχνευθούν στον οσφρητικό βολβό, στο φλοιό, στον υπόκαμπο, στην παρεγκεφαλίδα, στα βασικά γάγγλια, τον υποθάλαμο και στο στέλεχος [12,13].

Σε σύγκριση με τους εγκεφάλους των αρουραίων, οι άνθρωποι εκφράζουν περισσότερους υποδοχείς CB1 στο φλοιό και στην αμυγδαλή και λιγότερο στην παρεγκεφαλίδα, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει γιατί η κινητική λειτουργία φαίνεται να είναι πιο περιορισμένη στους αρουραίους από ό,τι στους ανθρώπους κατά την εφαρμογή κανναβινοειδών [13,14,15].

#### 1.3.2 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ CB2

Ο CB2 υποδοχέας είναι ένας συζευγμένος με πρωτεΐνη G υποδοχέας με επτά διαμεμβρανικά πεδία και ο κύριος ενδογενής συνδέτης του είναι η 2-AG. Ο CB2 υποδοχέας ταυτοποιήθηκε το 1993 από ερευνητική ομάδα από το Cambridge. Έχει βρεθεί ότι εκφράζεται επίσης

στον εγκέφαλο, σε μερικούς νευρώνες στο ΚΝΣ, αλλά η έκφραση είναι πολύ χαμηλή. Οι υποδοχείς CB2 βρίσκονται κυρίως στη μικρογλοία, στα μονοκύτταρα, στα φυσικά κυτταροκτόνα (NK), στα μακροφάγα, στα Β-κύτταρα και στα CD8 και CD4-λεμφοκύτταρα. Ο CB2 ελέγχει την απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτοκινών, που ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Συγκεκριμένα, αυτός ο υποδοχέας εμπλέκεται στην καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος, στην επαγωγή της απόπτωσης και της κυτταρικής μετανάστευσης [11,16,17,18].

### 1.3.3 Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ CB1 ΚΑΙ CB2

Οι υποδοχείς CB1 και CB2 δρουν μέσω των ετεροτριμερικών πρωτεϊνών Gi/o, οι οποίοι είναι συζευγμένοι με αυτές. Μόλις ενεργοποιηθεί ο υποδοχέας CB1, οδηγεί σε αναστολή της παραγωγής του ενζύμου της αδενυλικής κυκλάσης. Συνεπώς, η σύνδεση μεταξύ του CB1 και των συνδετών του μειώνουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα cAMP και αυξάνουν την ενεργοποίηση της μιτογονικής πρωτεϊνικής κινάσης (MAP κινάση). Σε μερικές περιπτώσεις, η ενεργοποίηση του υποδοχέα CB1 μπορεί να συζευχθεί με τις πρωτεΐνες Gs, οι οποίες διεγείρουν την αδενυλική κυκλάση cAMP [19,20].

Οι υποδοχείς CB1 και CB2 συζεύγνυνται, επίσης, σε μια ποικιλία διαύλων ιόντων στην κυτταρική μεμβράνη, τα οποία επηρεάζονται θετικά από τα κανάλια καλίου και ασβεστίου. Αυτά τα κανάλια ενεργοποιούνται όταν υπάρχει εξαρτώμενη αλληλεπίδραση από την cAMP μεταξύ του υποδοχέα και των μορίων όπως η πρωτεϊνική κινάση A (PKA), C (PKC) και άλλες [21]. Στην περίπτωση του CB1, η ενεργοποίηση μπορεί να προκαλέσει μετέπειτα μείωση της  $Ca^{2+}$  εισόδου στο κύτταρο, χωρίς εμπλοκή της cAMP, η οποία είναι απαραίτητη για την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση στην απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή. Συνεπώς, ο CB1 είναι προσυναπτικός υποδοχέας που ρυθμίζει την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή όταν ενεργοποιείται με δόσοεξαρτώμενο τρόπο [22].

Οι υποδοχείς κανναβινοειδών CB1 και CB2 δρουν επίσης για τη ρύθμιση της φωσφορύλιωσης και την ενεργοποίηση διαφόρων μελών της ενεργοποιημένης από μιτογόνο πρωτεϊνικής κινάσης (MAPKs). Η MAPK ελέγχει την έκφραση γονιδίων που σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, της κινητικότητας, της προσκόλλησης της απόπτωσης, καθώς και του μεταβολισμού της γλυκόζης [22].

Οι υποδοχείς CB1 και CB2 παράγουν τα αποτελέσματά τους μέσω της διέγερσης από τους αγωνιστές τους, δηλαδή από τα ενδογενή, εξωγενή ή συνθετικά κανναβινοειδή. Μετά την απελευθέρωση, τα κανναβινοειδή απενεργοποιούνται ταχέως στα κύτταρα και μεταβολίζονται. Ο μεταβολισμός της ανανδαμίδης και του 2-AG συμβαίνει είτε ενζυμικά με τη βοήθεια της υδρολάσης αμιδίου λιπαρού οξέος (FAAH) [23,24] είτε με άλλες μεταβολικές διεργασίες,

συμπεριλαμβανομένης της υδρόλυσης του 2-AG από τη λιπάση μονοακυλγλυκερόλης (MAGL) [25].

#### **1.4 ENZYMA ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΟΥΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**

Τα ένζυμα του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος είναι η υδρολάση αμιδίου λιπαρού οξέος (FAAH) και η λιπάση μονοακυλγλυκερόλης (MAGL). Η κύρια λειτουργία τους είναι να εξασφαλίσουν την απαραίτητη χρήση των ενδοκανναβινοειδών [9].

Η υδρολάση αμιδίου του λιπαρού οξέος ανήκει στην οικογένεια των ενζύμων υδρολάσης σερίνης. Είναι το κύριο ένζυμο που καταλύει τη δράση της ανανδαμίδης. Μελέτες δείχνουν ότι η αναστολή του FAAH μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία διαταραχών του άγχους.

Η MAGL ανήκει και αυτή στην οικογένεια της υδρολάσης σερίνης. Είναι το βασικό ένζυμο που υδρολύει το 2-AG. Παίρνει μέρος στην υδρόλυση των τριγλυκεριδίων σε λιποκύτταρα με τη βοήθεια της λιπάσης. Μελέτες σε τρωκτικά έχουν δείξει ότι η εκτεταμένη αδρανοποίηση της MAGL προκαλεί αύξηση του 2-AG [25,26].

#### **1.5 ΤΟ ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΤΟ ΚΝΣ**

Τα κανναβινοειδή αλληλεπιδρούν με διαφορετικούς νευροδιαβιβαστές, μεταξύ των οποίων η ακετυλοχολίνη, η ντοπαμίνη, η ισταμίνη, η σεροτονίνη, η γλουταμίνη και η νορεπινεφρίνη [27,28,29,30]. Μερικές επιπτώσεις της THC στο σώμα μπορούν να εξηγηθούν από αυτές τις αλληλεπιδράσεις. Για παράδειγμα, η ταχυκαρδία και ο υποσιτισμός με ξηροστομία μεσολαβούν από τις επιδράσεις της THC στην απελευθέρωση και μετατροπή της ακετυλοχολίνης [31,32]. Οι αντιεμετικές ιδιότητες του κανναβινοειδούς εξηγούνται από το αλληλεπιδράσεις με τη σεροτονίνη [33]. Θεραπευτικά αποτελέσματα στην κίνηση και οι σπαστικές διαταραχές θα μπορούσαν να αποδοθούν εν μέρει στις αλληλεπιδράσεις με την γλουταμίνη και την ντοπαμίνη [34,35]. Τα αποτελέσματα νευροπροστατευτικών κανναβινοειδών που παρατηρήθηκαν σε μελέτες σε ζώα βασίζονται στην αναστολή της υπερβολικής παραγωγής γλουταμίνης, στην αναστολή της εισροής του ασβεστίου στα κύτταρα και στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του αγγειακού συστήματος [36,37,38].

## 1.6 ΤΟ ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Τα ανοσοκύτταρα εκφράζουν τους υποδοχείς CB1 και CB2 και μπορούν να συνθέσουν, να εκκρίνουν, να μεταφέρουν και να καταβολίσουν τα κανναβινοειδή. Η έκφραση των υποδοχέων κανναβινοειδών είναι διαφορετική σε κάθε ανοσοκύτταρο. Συγκεκριμένα εκφράζονται στα Β-κύτταρα, στα μονοκύτταρα, στα ουδετερόφιλα, στα CD8 και CD4 λευκοκύτταρα [39,40,41,42,43]. Το επίπεδο έκφρασης επίσης εξαρτάται από την ανοσοδιέγερση και την κατάσταση ενεργοποίησης του κυττάρου [44]. Σε ποντικούς, με ανεπάρκεια της υδρολάσης αμιδίου λιπαρού οξέος (FAAH), ένζυμο καταβολισμού ανανδαμίδης, αυξάνονται τα επίπεδα της ανανδαμίδης στο ΚΝΣ και στο ΠΝΣ, τα οποία εξασθενούν τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, υποδηλώνοντας ότι τα ενδοκανναβινοειδή εμπλέκονται στο ανοσοποιητικό σύστημα [45,46,47]. Τα στοιχεία ότι το ΕΚΣ έχει πιθανώς ανοσοδιαμορφωτική δράση οδήγησαν στη θεωρία ότι τα εξωγενή κανναβινοειδή μπορεί επίσης να έχουν ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα σε αυτοάνοσες νόσους [48,49]. Τα κανναβινοειδή έδειξαν, *in vivo* και *in vitro*, τις ανοσοκατασταλτικές τους ιδιότητες μέσω τεσσάρων κύριων οδών: της επαγωγής της απόπτωσης, της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της αναστολής των κυτοκινών και της επαγωγής ρυθμιστικών T- λεμφοκυττάρων [50].

## 1.7 ΤΟ ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑ ΣΤΗ ΣκΠ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΕ

Η ΣκΠ έχει αναγνωριστεί ως νευροεκφυλιστική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από φλεγμονώδη επίθεση στο ΚΝΣ. Οι υποδοχείς CB1 και CB2 εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της ΣκΠ. Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα έχει βρεθεί ότι είναι νευροπροστατευτικό στην ΠΑΕ και στη ΣκΠ [51,52]. Οι υποδοχείς είναι σε θέση να μειώσουν τη σπαστικότητα και τον τρόπο σε ποντικούς υπό συνθήκες ΠΑΕ [53,54]. Επιπροσθέτως, αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι τα κανναβινοειδή μπορεί να έχουν βασικό ρόλο στην παθογένεση και τη θεραπεία της ΣκΠ [55,56,57,58], όπως και η εξωγενής χορήγηση της 2-AG επηρεάζει τα κλινικά συμπτώματα της οξείας και της χρόνιας φάσης της ΠΑΕ και της έκφρασης των υποδοχέων των CB1 και CB2 [59]. Τόσο στην ΠΑΕ όσο στη ΣκΠ λαμβάνει χώρα η απομυελίνωση τουλάχιστον ταυτόχρονα με τη φλεγμονή, όπου παράγονται πολλά δυνητικά επιβλαβή στοιχεία όπως οι κυτοκίνες και το οξειδωτικό στρες [60,61]. Πρόσφατα, η επίδραση της ανανδαμίδης σε δενδριτικά κύτταρα από ασθενείς με ΣκΠ έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να ανοίξει το δρόμο για το σχεδιασμό νέων ενδοκανναβινοειδών ανοσοθεραπευτικών παραγόντων [62].

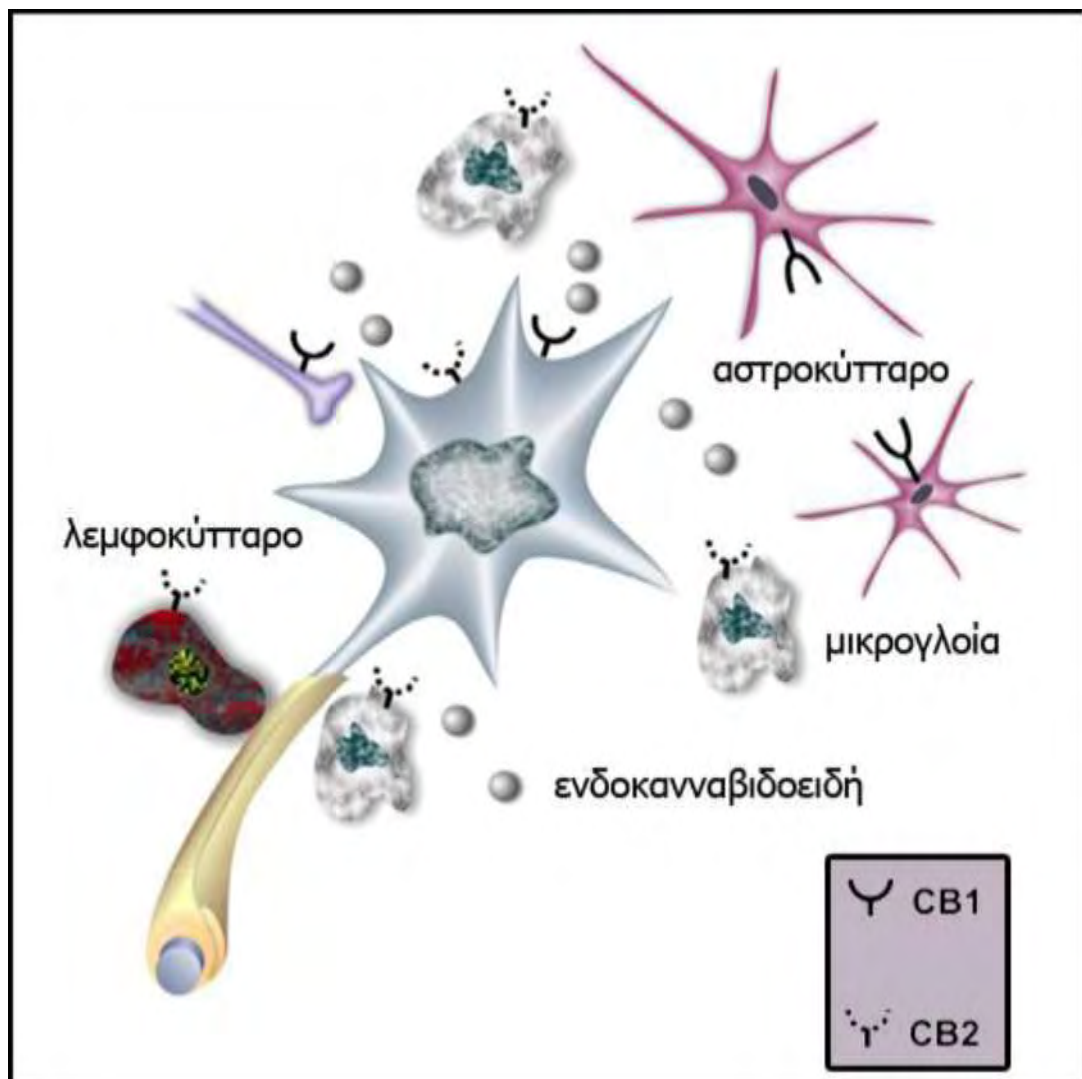


## 1.8 ΤΟ ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑ ΩΣ ΠΙΘΑΝΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΛΥΣΗ

Η κάνναβη χρησιμοποιείται ως ψυχαγωγικό και φαρμακευτικό φάρμακο. Η διαχείριση του πόνου είναι η πιο σημαντική μεταξύ των ιατρικών σκοπών και έχει προσελκύσει έντονη προσοχή μετά την ανακάλυψη των υποδοχέων κανναβινοειδών και των ενδογενών τους προσδέτων, των ενδοκανναβινοειδών. Η THC και η κανναβιδιόλη, τα κρίσιμα συστατικά του φυτού κάνναβης και τα συνθετικά κανναβινοειδή και τα ανάλογα τους έχουν αποδειχθεί ότι ασκούν ισχυρή αναλγητική δράση τόσο σε προκλινικές όσο και σε κλινικές μελέτες.

Συγκεκριμένα, η THC έχει αντίκτυπο σε πολλές παθοφυσιολογικές διεργασίες μέσω της ενεργοποίησης υποδοχέων CB1 και CB2. Ωστόσο, η κλινική χρησιμότητά της είναι περιορισμένη εξαιτίας των ανεπιθύμητων αποτελεσμάτων του ΚΝΣ, τα οποία διαμεσολαβούνται μέσω υποδοχέων CB1 του εγκεφάλου. Η κανναβιδιόλη, ένα άλλο σημαντικό φυτοκανναβινοειδές, έχει πολύ χαμηλή συγγένεια στους υποδοχείς CB1 και CB2. Σε αντίθεση με την THC, δεν προκαλεί ψυχοδραστικότητα, αλλά ασκεί πολλές θετικές φαρμακολογικές επιδράσεις, όπως κατά του άγχους, αντιεπιληπτικές, αντιβακτηριακές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές και αντιδιαβητικές ιδιότητες. Το Nabiximols (Sativex), ένα φυτικό εκχύλισμα κάνναβης που περιέχει THC και κανναβιδιόλη σε αναλογία 1:1, έχει εγκριθεί για τη θεραπεία του νευροπαθητικού πόνου και της σπαστικότητας που σχετίζεται με τη Σκλήρυνση κατά Πλάκας και τον καρκίνο, αλλά και ως αντισπασμωδικά για παιδιατρικές επιληψίες.

Όσο αφορά την ψύχωση, τα υψηλά επίπεδα της ανανδαμίδης στον ορό μειώνουν τα συμπτώματα και έχουν προστατευτικό ρόλο στη σχιζοφρένεια. Επίσης, τα κανναβινοειδή έχουν προστατευτικό ρόλο στον αμφιβληστροειδή, μειώνοντας την σηματοδότηση οξειδωτικού στρες και εμποδίζοντας τον νευροεκφυλισμό των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς σε σχέση με την ηλικία του εκφυλισμού της ωχράς κηλίδας και της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας [63].



**Εικόνα 1:** Σχηματική απεικόνιση της τοπολογίας των υποδοχέων CB1 και CB2 σε ενδεικτικά κύτταρα του ΚΝΣ και του ανοσοποιητικού συστήματος. (η εικόνα είναι προσαρμοσμένη ανατύπωση από [64])

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ (ΣΚΠ)**

#### **2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η Πολλαπλή Σκλήρυνση ή Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣκΠ) είναι μια αυτοάνοση φλεγμονώδης και απομυελινωτική νόσος του ΚΝΣ. Το ανοσοποιητικό σύστημα επιτίθεται στη μυελίνη που καλύπτει τις νευρικές ίνες και προκαλεί απώλεια μετάδοσης σήματος του εγκεφάλου και του υπόλοιπου σώματος.

Τα συμπτώματα της ΣκΠ μπορεί να διαφέρουν σημαντικά από άτομο σε άτομο και κατά τη διάρκεια της νόσου, ανάλογα με τη θέση των επηρεαζόμενων νευρικών ινών. Μπορούν να περιλαμβάνουν: μούδιασμα ή αδυναμία σε ένα ή περισσότερα άκρα, μερική ή πλήρης απώλεια της όρασης, τρόμος, έλλειψη συντονισμού ή ασταθές βάδισμα, προβλήματα στην ομιλία, κούραση, ίλιγγος, προβλήματα με τη λειτουργία του εντέρου και της ουροδόχου κύστης [65,66].

#### **2.2 ΑΙΤΙΑ**

Η ακριβής αιτία της ΣκΠ είναι άγνωστη. Παρόλα αυτά έχει συσχετιστεί τόσο με περιβαλλοντικούς όσο και με γενετικούς παράγοντες. Το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού επιτίθεται στους ιστούς του. Στην περίπτωση της ΣκΠ, αυτή η δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος καταστρέφει τη μυελίνη δηλαδή τη λιπώδη ουσία που καλύπτει και προστατεύει τις νευρικές ίνες στον εγκέφαλο και στον νωτιαίο μυελό. Όταν η μυελίνη καταστραφεί και οι νευρικές ίνες εκτίθενται, τα μηνύματα που ταξιδεύουν κατά μήκος αυτού του νεύρου μπορεί να επιβραδυνθούν ή να μπλοκαριστούν. Το νεύρο μπορεί επίσης να καταστραφεί [67].

Οι παράγοντες που μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου είναι: (1) η ηλικία, συνήθως επηρεάζει άτομα ηλικίας 15 έως 60 ετών, (2) το φύλο, οι γυναίκες έχουν περίπου διπλάσιες πιθανότητες ανάπτυξης της νόσου από τους άνδρες, (3) το οικογενειακό ιστορικό, αν ένας από τους γονείς ή τα αδέρφια ασθενούν, υπάρχει υψηλότερος κίνδυνος ανάπτυξης της νόσου, (4) ορισμένες λοιμώξεις, μια ποικιλία ιών συνδέθηκε με τη ΣκΠ, συμπεριλαμβανομένου του Epstein-Barr ιού που προκαλεί μολυσματική μονοπυρήνωση, (5) το κλίμα, χώρες με εύκρατα κλίματα, όπως ο Καναδάς, οι Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, η Νέα

Ζηλανδία, η νοτιοανατολική Αυστραλία και η Ευρώπη, (6) το κάπνισμα, (7) η έλλειψη της βιταμίνης D και (8) το στρες είναι παράγοντες που σχετίζονται με την αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης της νόσου [67,68].

## 2.3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Τα τρία βασικά χαρακτηριστικά της ΣκΠ είναι η απώλεια της μυελίνης και ο σχηματισμός εστιών ή πλακών στο ΚΝΣ, η παρουσία φλεγμονής και η καταστροφή των αξόνων. Ο σχηματισμός των πλακών επηρεάζουν συνήθως τη λευκή ουσία στο οπτικό νεύρο, το στέλεχος του εγκεφάλου, τα βασικά γάγγλια και τον νωτιαίο μυελό [69].

Συγκεκριμένα, η ΣκΠ περιλαμβάνει την απώλεια μυελίνης των ολιγοδενδροκυττάρων, η οποία βοηθάει τη μεταφορά ηλεκτρικών σημάτων από και προς τους νευρώνες. Όταν η μυελίνη χαθεί, ο νευρώνας δεν μπορεί να διεξάγει τη μεταφορά ηλεκτρικού σήματος. Μια διαδικασία επιδιόρθωσης, που ονομάζεται επαναμυελίνωση, πραγματοποιείται στις πρώτες φάσεις της νόσου, αλλά τα ολιγοδενδροκύτταρα δεν είναι σε θέση να ανακατασκευάσουν πλήρως το έλυτρο της μυελίνης. Οι επανειλημμένες επιθέσεις των Τ-λεμφοκυττάρων οδηγούν σε διαδοχικά λιγότερο αποτελεσματικά ηλεκτρικά σήματα, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πλάκας γύρω από τους κατεστραμμένους άξονες. Μια άλλη διαδικασία που σχετίζεται με τη δημιουργία εστιών είναι η ανομοιογενής αύξηση του αριθμού των αστροκυττάρων λόγω της καταστροφής των κοντινών νευρώνων [69].

Ένα άλλο σημείο της νόσου είναι η παρουσία φλεγμονής. Τα Τ-λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται από άγνωστα αντιγόνα και μετατρέπονται σε αυτοαντιδρώντα Τ-λεμφοκύτταρα (CD4+ ή CD8+) [69,71]. Τα αυτοαντιδρώντα Τ-λεμφοκύτταρα μαζί με μονοκύτταρα διαπερνούν τον ΑΕΦ εξαιτίας διαταραχής αυτού και διέρχονται μέσω ενδοθηλίου και δρουν στο παρέγχυμα του ΚΝΣ. Εκεί, με την έκκριση της IL-12, διαφοροποιούνται τα Τ-λεμφοκύτταρα προς Th1, τα οποία εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-15, IL-17 και IL-23) [72], και η παρουσία της IL-4 διαφοροποιεί τα Τ-λεμφοκύτταρα προς Th2, τα οποία εκκρίνουν αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (TGF-β, IL-4, IL-10). Τα Th17 κύτταρα παράγουν την IL-17, η οποία προάγει τη φλεγμονή μέσω διαταραχής του ΑΕΦ και ενισχύει τη μετανάστευση CD4+ Τ-λεμφοκυττάρων μέσω του ενδοθηλίου [73,74]. Ο στόχος των κυττάρων αυτών είναι η μυελίνη, και συνεπώς οι πρωτεΐνες της (η γλυκοπρωτεΐνη της μυελίνης των ολιγοδενδροκυττάρων-MOG, η βασική πρωτεΐνη της μυελίνης-MBP, η πρωτεολιπιδική πρωτεΐνη της μυελίνης-PLP). Αναγνωρίζουν τη μυελίνη ως ξένη και της επιτίθενται με αποτέλεσμα τη δημιουργία φλεγμονής, η παρουσία της οποίας εμποδίζει τη μετάδοση πληροφοριών μεταξύ των νευρώνων [69,75].

Ο ΑΕΦ είναι μέρος του τριχοειδούς συστήματος που παρεμποδίζει την είσοδο των Τ-λεμφοκυττάρων στο ΚΝΣ σε φυσιολογικές συνθήκες. Μπορεί να γίνει διαπερατός από τα Th17 κύτταρα, τα μακροφάγα του ΚΝΣ (μικρογλοία), τα δένδριτικά κύτταρα, τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK) και τα Β-λεμφοκύτταρα. Παρατηρείται αυξημένη σύνθεση ολιγοκλωνικών ανοσοσφαιρινών IgM και IgG στο ΕΝΥ, απόδειξη ύπαρξης κλώνων Β-λεμφοκυττάρων [70,76].

## **2.4 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ – ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΗΣ ΣκΠ**

Βάσει της κλινικής εικόνας της νόσου, η ΣκΠ κατατάσσεται στις εξής κατηγορίες:

- Διαλείπουσα Υποτροπιάζουσα ΣκΠ-ΔΥΠΣ (Relapsing-remitting MS-RRMS): Αυτή είναι η πιο συνηθισμένη μορφή, που επηρεάζει περίπου το 85% των ατόμων με ΣΚΠ και περιλαμβάνει υποτροπές και υφέσεις.
- Δευτεροπαθής Προϊούσα ΣκΠ-ΔΠΠΣ (Secondary progressive MS-SPMS): Μετά από εξάρσεις και υφέσεις, η ασθένεια εξελίσσεται σταθερά.
- Πρωτοπαθής Προϊούσα ΣκΠ-ΠΠΠΣ (Primary progressive MS-PPMS): Τα συμπτώματα επιδεινώνονται σταδιακά, χωρίς πρόωρες υποτροπές. Περίπου το 10% των ασθενών αφορά PPMS.
- Προϊούσα Υποτροπιάζουσα ΣκΠ-ΠΥΠΣ (Progressive-relapsing MS-PRMS): η νόσος είναι προοδευτική με υποτροπές και υφέσεις, αλλά με κύριο χαρακτηριστικό την πρόοδο της νόσου στα μεσοδιαστήματα. Αποτελεί συχνά το ενδιάμεσο στάδιο κατά τη μετάβαση από ΔΥΠΣ σε ΔΠΠΣ [77].

## **2.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ**

Η διάγνωση της ΣκΠ γίνεται βάσει των συμπτωμάτων που παρουσιάζονται σε συνδυασμό με την νευροαπεικόνιση και τις εργαστηριακές εξετάσεις. Τα κριτήρια McDonald, τα οποία επικεντρώνονται σε κλινικές, εργαστηριακές και ακτινολογικές ενδείξεις βλαβών σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και σε διαφορετικές περιοχές, είναι η πλέον διαδεδομένη μέθοδος διάγνωσης [78,79].

Τα πλέον διαδεδομένα διαγνωστικά εργαλεία είναι η Μαγνητική Τομογραφία (MRI), η ανάλυση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ΕΝΥ) και τα προκλητά δυναμικά. Η απεικόνιση με MRI του εγκεφάλου και της σπονδυλικής στήλης μπορεί να εμφανίσει αιτίες απομυελίνωσης. Η εξέταση του ΕΝΥ, το οποίο λαμβάνεται έπειτα από οσφυνοτιαία παρακέντηση, μπορεί να

αποδείξει την ύπαρξη χρόνιας φλεγμονής στο ΚΝΣ. Το ENY ελέγχεται για ολιγοκλωνικές ζώνες IgG μέσω ηλεκτροφόρησης, οι οποίες είναι δείκτες φλεγμονής που βρίσκονται σε ανθρώπους με ΣκΠ. Το Νευρικό Σύστημα των ασθενών με ΣκΠ δεν ανταποκρίνεται τόσο ενεργά όσο σε υγιή άτομα στη διέγερση των αισθητήριων νεύρων εξαιτίας της απομυελίνωσης. Αυτές οι αλλαγές του εγκεφάλου μπορούν να εξεταστούν χρησιμοποιώντας τα προκλητά δυναμικά [79,80,81].

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

### **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΕΓΚΕΦΑΛΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ (ΠΑΕ)**

#### **3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ) είναι το πιο συχνό χρησιμοποιούμενο πειραματικό μοντέλο για τη ΣκΠ. Τα βασικά παθολογικά χαρακτηριστικά της ΠΑΕ προσεγγίζουν αρκετά τα χαρακτηριστικά της ΣκΠ, δηλαδή της φλεγμονής, της απομυελίνωσης, της απώλειας νευραξόνων και της γλοίωσης [68,82].

Η ΠΑΕ διαχωρίζεται σε δύο κλινικούς τύπους, την οξεία και τη χρόνια ΠΑΕ, οι οποίοι διαφέρουν στον τρόπο επαγωγής, στην κλινική πορεία και στην νευροπαθολογία. Η οξεία ΠΑΕ προσομοιάζει την οξεία διάσπαρτη εγκεφαλομυελίτιδα στον άνθρωπο. Η χρόνια ΠΑΕ εκδηλώνεται είτε με χρόνια σταθερή πορεία είτε ως υποτροπιάζουσα νόσος με εξάρσεις και υφέσεις και προσομοιάζει τη ΣκΠ στον άνθρωπο. Τέλος, ο τρόπος επαγωγής της ΠΑΕ γίνεται είτε ενεργητικά είτε παθητικά [67,68,82].

#### **3.2 ΕΝΕΡΓΗΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΑΘΗΤΙΚΗ ΠΑΕ**

Η ενεργητική ΠΑΕ προκαλείται με εμβολιασμό των πειραματόζων με ομογενοποιημένο νωτιαίου μυελού ή πρωτεϊνών του ΚΝΣ, γαλακτωματοποιημένων σε πλήρες συμπλήρωμα του Freund (CFA, ενισχυμένο με μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης). Αυτό έχει ως στόχο να παράγουν τα τρωκτικά τα δικά τους ενεργά Τ-λεμφοκύτταρα που είναι ειδικά στη μυελινική πρωτεΐνη. Οι βασικές πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται για την επαγωγή της ΠΑΕ είναι πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν μυελίνη, όπως η MBP, η PLP και η MOG. Την ίδια μέρα με τον εμβολιασμό πρωτεΐνης στο ζώο, ακολουθεί έγχυση της τοξίνης pertussis, η οποία αυξάνει τη διαπερατότητα του ΑΕΦ, ώστε να μπορέσουν τα Τ-λεμφοκύτταρα να περάσουν στον εγκέφαλο και να δημιουργήσουν τη φλεγμονή [82,83].

Η παθητική ΠΑΕ επάγεται με χορήγηση αντιδρώντων Τ-λεμφοκυττάρων ειδικών στη μυελίνη σε υγιή πειραματόζωα. Τα κύτταρα που κατά κύριο λόγο διαμεσολαβούν την ΠΑΕ είναι αυτοαντιδρώντα CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> Τ-λεμφοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται συνήθως από κυτταρικά εναιωρήματα διηθημένων λεμφαδένων πειραματόζων, στα οποία έχει προκληθεί ενεργητική ΠΑΕ και περιέχουν Τ-λεμφοκύτταρα ειδικά στην πρωτεΐνη της μυελίνης [82,83,84].

Τα κλινικά συμπτώματα των πειραματόζων που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια εξέλιξης της ΠΑΕ, είναι απώλεια βάρους, αταξία και παράλυση άκρων. Η ένταση των συμπτωμάτων, ποικίλει ανάλογα με το είδος του πειραματόζου που χρησιμοποιήθηκε, το είδος της πρωτεΐνης που εγχύθηκε (ενεργητική ΠΑΕ) ή ανάλογα με το είδος των κυττάρων που χορηγήθηκαν στο κάθε ζώο (παθητική ΠΑΕ). Η κλινική εικόνα σε όλα τα μοντέλα τρωκτικών εκτιμάται και ποσοτικοποιείται με βάση κλίμακα βαθμολόγησης της κινητικότητας του πειραματόζου από το 0 έως 6. Το σημείο 0 αντιστοιχεί σε φυσιολογικό πειραματόζωο και το 6 σε θάνατο του πειραματόζου [82,83,84,85].

### **3.3 ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΑΕ ΚΑΙ ΣκΠ**

Η ΠΑΕ, παρόλο που προσομοιάζει αρκετά τη ΣκΠ, δημιουργώντας τα βασικά χαρακτηριστικά της νόσου όπως τη φλεγμονή στη λευκή ουσία του ΚΝΣ που συνδέονται με τη διήθηση Τ-λεμφοκυττάρων, την απομυελίνωση και την απώλεια των αξόνων, εμφανίζει και κάποιες διαφορές. Αυτές οι διαφορές είναι:

- στη ΣκΠ έχουμε αυτόματη έναρξη της νόσου, ενώ στην ΠΑΕ έχουμε επαγόμενη με χρήση γνωστών ανοσοδιεγερτικών ουσιών
- η ύπαρξη θεραπειών μπορεί είναι αποτελεσματικές στην ΠΑΕ αλλά όχι στη ΣκΠ
- τα κύτταρα που διαμεσολαβούν την κυτταρική ανοσία είναι κυρίως τα CD8+ στη ΣκΠ ενώ τα CD4+ στην ΠΑΕ
- η ΠΑΕ είναι νόσος που επηρεάζει περισσότερο τον νωτιαίο μυελό ενώ η ΣκΠ τον εγκέφαλο [86,87,88].



## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

#### **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

##### **4.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ**

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 48 θηλυκοί μύες, της φυλής C57BL/6, ηλικίας 6-8 εβδομάδων. Τα πειραματόζωα προήλθαν από το Ινστιτούτο Παστέρ της Αθήνας και διατηρήθηκαν σε ειδικό χώρο με προδιαγραφές ασφάλειας επιπέδου 3 (P3, animal facility, αρ. Άδειας Εγκατάστασης EL54BIO29) στο εργαστήριο Πειραματικής Νευρολογίας και Νευροανοσολογίας της Β' Νευρολογικής Κλινικής Π.Γ.Ν. Α.Χ.Ε.Π.Α. Θεσσαλονίκης (αρ. Άδειας 25951/143, από την Κτηνιατρική Υπηρεσία Θεσσαλονίκης). Ο χώρος είναι ελεύθερος παθογόνων μικροοργανισμών, έχει ελεγχόμενο φωτισμό κάθε δώδεκα ώρες, ελεγχόμενη θερμοκρασία και πίεση και εξαερισμό μέσω φίλτρων hepa. Τα πειραματόζωα έχουν πρόσβαση σε τροφή και νερό ελεύθερου αντιβιοτικών. Η είσοδος πραγματοποιείται με στολές μιας χρήσης, ποδονάρια και γάντια ώστε να διατηρούνται οι συνθήκες και να αποφεύγεται η μεταφορά παθογόνων από τους χειριστές.

##### **4.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΚΑΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΟΜΑΔΩΝ**

Προκλήθηκε ΠΑΕ σε 36 θηλυκούς C57BL/6 μύες οι οποίοι διαχωρίστηκαν βάσει της κλινικής φάσης κατά την οποία θυσιάστηκαν (προσυμπτωματική, οξεία, χρόνια φάση) και ανάλογα της τεχνικής για την οποία προορίζονταν (RT-PCR, ανοσοστύψωμα κατά Western-Western Blot, Ανοσοϊστοχημεία-IHC), σε σύγκριση με την ομάδα φυσιολογικών μαρτύρων. (**Πίνακας 1**)

Τεχνική	Ομάδα πειραματόζων			
	Μάρτυρες	Προσυμπτωματική φάση	Οξεία φάση	Χρόνια φάση
RT-PCR	4	4	4	4
Western Blot	4	4	4	4
IHC	4	4	4	4

**Πίνακας 1 :** Ομάδες πειραματόζων και τεχνική που ακολουθήθηκε.

Αναλυτικά, τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν σε τρεις χρονικές στιγμές από την επαγωγή της ΠΑΕ:

- την 10<sup>η</sup> μέρα (Προσυμπτωματική φάση) όπου τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκυττάρια είναι ακόμα στην περιφέρεια και δεν έχουν διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό για την μετανάστευση τους στο ΚΝΣ
- στην 21<sup>η</sup> μέρα (οξεία φάση) όπου συναντάται το μεγαλύτερο κλινικό σκορ των πειραματόζωων
- στην 50<sup>η</sup> μέρα (χρόνια φάση) όπου η κλινική εικόνα εμφανίζει ελαφριά βελτίωση και παρατηρείται σταθεροποίηση των κλινικών συμπτωμάτων.

Η ομάδα μαρτύρων θυσιάστηκε χωρίς να γίνει επαγωγή της ΠΑΕ. Σε κάθε μοριακή τεχνική χρησιμοποιήθηκαν 16 πειραματόζωα, τέσσερα (4) σε κάθε ομάδα και οι ιστοί που μελετήθηκαν ήταν ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός.

#### 4.3 ΕΠΑΓΩΓΗ ΠΑΕ

Σε 36 θηλυκούς C57BL/6 μύες, ηλικίας 8-12 εβδομάδων προκλήθηκε η ΠΑΕ (ημέρα 0) με τη χρήση γαλακτώματος που περιείχε 0,15mg του γραμμικού πεπτιδίου της γλυκοπρωτεΐνης της μυελίνης των ολιγοδενδροκυττάρων (MOG<sub>33-35</sub>) και 100μl PBS1x (υδατική φάση) και 100μl ατελούς συμπληρώματος Freund (Incomplete Freund's adjuvant, IFA) ανα πειραματόζωο, υποδορίως στο αριστερό πόδι. Στο IFA προστέθηκε 4mg/ml μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης (HR37a) το οποίο προάγει κυτταρική ανοσία μέσω της ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων. Με την προσθήκη του HR37a, προκύπτει το πλήρες συμπλήρωμα Freund (complete Freund's adjuvant, CFA), δηλαδή η ελαιώδης φάση. Οι εγχύσεις αυτές προκάλεσαν στα πειραματόζωα κυτταρική ανοσιακή απάντηση έναντι της MOG που υπάρχει στο έλυτρο της μυελίνης των νευρώνων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία φλεγμονής στο ΚΝΣ και εστιών απομυελίνωσης, κύρια παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά της ΣκΠ. Επιπλέον, την ίδια μέρα χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 400ng/ζώο της τοξίνης Pertussis διαλυμένη σε 500μl PBS1x για την διάνοιξη του ΑΕΦ. Τη δεύτερη μέρα χορηγήθηκε η μισή ποσότητα της τοξίνης Pertussis, δηλαδή 200ng/ζώο σε 500μl PBS1x. Την εβδόμη μέρα χορηγήθηκε η ίδια ποσότητα του γραμμικού πεπτιδίου της MOG ενισχυτικά, στο δεξί πόδι.

#### 4.3.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ

Στα πειραματόζωα διεξήχθη κλινική εξέταση καθημερινά βάσει της πορείας της ΠΑΕ μέσω μιας καθιερωμένης κλίμακας αναπηρίας από το μηδέν μέχρι το 6. **(Εικόνα 3)**

0: Κανένα κλινικό σημείο. Η ουρά ανέρχεται κάθετα ως προς τον οριζόντιο άξονα του πειραματόζωου και παραμένει σε αυτή τη θέση έπειτα από άσκηση πίεσης στον αυχένα.

1: Κατά τη συγκράτηση του πειραματόζωου από τη ράχη, η ουρά βρίσκεται στο οριζόντιο επίπεδο έπειτα από άσκηση πίεσης στον αυχένα.

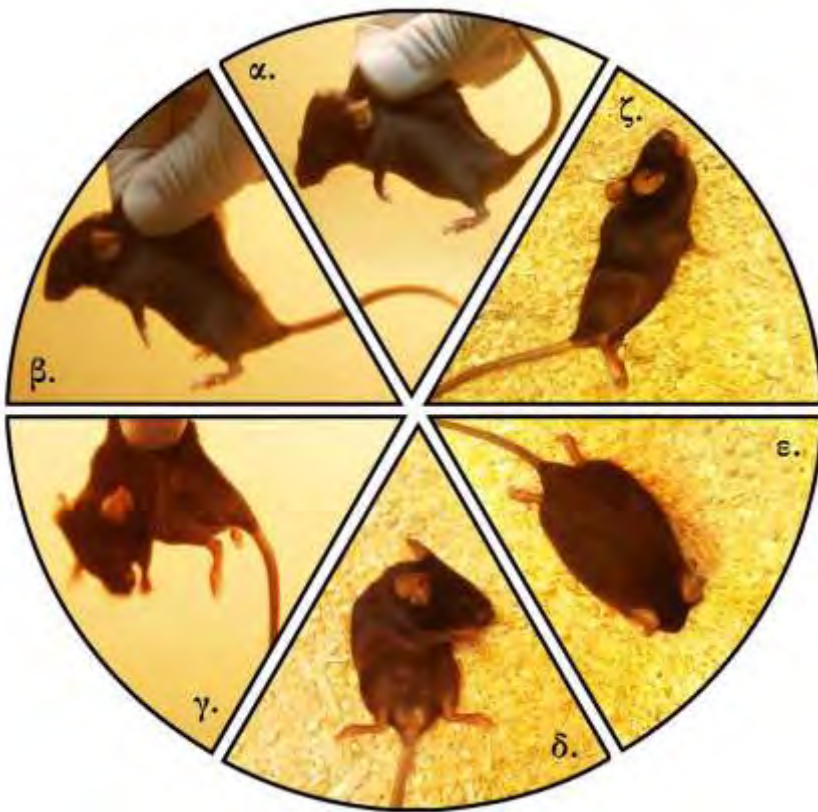
2: Πλήρης παράλυση της ουράς και έλλειψη κινητικότητας.

3: Πλήρης παράλυση της ουράς, έλλειψη κινητικότητας και αδυναμία του πειραματόζωου να επανέλθει στα τέσσερα άκρα, όταν αυτό τοποθετείται στη ράχη.

4: Το πειραματόζωο κινείται κατά κύριο λόγο με τα πρόσθια άκρα, σέρνοντας τα δύο οπίσθια, είναι όμως δυνατό να παρατηρηθούν κινήσεις των άκρων αυτών που δεν είναι συνεχείς αλλά διαλείπουσες και δεν συμβάλλουν σε ομοιόμορφη κίνηση του ζώου.

5: Τα δύο οπίσθια άκρα χάνουν την κινητικότητα τους και επιπλέον εμφανίζεται έντονη μυϊκή ατροφία στα άκρα αυτά και στους οπίσθιους μύες της ράχης με παράλληλη απώλεια βάρους. Παράλυση ενός ή και των δύο πρόσθιων άκρων. Το πειραματόζωο εμφανίζει αδυναμία μετακίνησης από την θέση του ενώ σπάνια αποκαθιστά τη φυσιολογική κλινική του κατάσταση.

6: Θάνατος του πειραματόζωου από τη βαρύτητα της νόσου.



**Εικόνα 3:** Κλίμακα κλινικής εξέτασης πειραματόζωων στην ΠΑΕ. α. κλινικό σκορ 0, β. κλινικό σκορ 1, γ. κλινικό σκορ 2, δ. κλινικό σκορ 3, ε. κλινικό σκορ 4, ζ. κλινικό σκορ 5. (Theotokis et al. 2012)

#### 4.3.2 ΘΥΣΙΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ

Οι θυσίες των πειραματόζωων έγιναν βάσει της τεχνικής που χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω στον πειραματισμό. Αναλυτικά, για τις τεχνικές RT-PCR και ανοσοστύπωμα κατά Western, η θυσία έγινε με την αναισθητοποίηση του ζώου με αιθέρα, την αφαίρεση του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού με άμεση διατομή, ταχεία ψύξη σε υγρό άζωτο και τέλος, τοποθέτηση των ιστών σε καταψύκτη  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν για την παθολογοανατομική ανάλυση θυσιάστηκαν με διακαρδιακή έγχυση. Συγκεκριμένα, τα ζώα με τη χρήση αιθέρα αναισθητοποιήθηκαν και τοποθετήθηκαν σε ύπτια θέση σε συμπαγή φελλό, όπου διανοίχτηκε το θωρακικό τοίχωμα και αποκαλύφθηκε η καρδιά. Στη συνέχεια, με τη χρήση βελόνας, διηθήθηκαν 5ml PBS1x στην αριστερή κοιλία της καρδιάς ενώ παράλληλα στο δεξιό κόλπο πραγματοποιήθηκε τομή. Έπειτα, διηθήθηκαν 50 ml διαλύματος παραφορμαλδεΐδης (4%PFA σε PBS1x) τα οποία μονιμοποίησαν τους ιστούς του πειραματόζωου.

Τέλος, αφαιρέθηκαν ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός προσεχτικά και τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 4% PFA σε PBS1x για ολονύκτια επώαση στους 4°C.

#### **4.4 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΔΟΕΙΔΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ**

Για την μοριακή ανάλυση των mRNA μεταγραφών πραγματοποιήθηκαν οι εξής τεχνικές:

- απομόνωση ολικού RNA από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό
- κατασκευή συμπληρωματικού DNA (cDNA)
- ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων των υποδοχέων CB1 και CB2 στην αλυσιδωτή αντίδραση πραγματικού χρόνου (RT-PCR) με τη χρήση ειδικών εκκινήτων.

##### **4.4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA**

Η απομόνωση RNA από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό των πειραματόζων που μελετήθηκαν, έγινε με το πρωτόκολλο RNA extraction με τη χρήση TRIzol. Αναλυτικά, η διαδικασία περιλάμβανε την ομογενοποίηση 10mg εγκέφαλου και νωτιαίου μυελού, η οποία πραγματοποιήθηκε με αποστειρωμένη σύριγγα και προσθήκη 800μl TRI Reagent Solution (Gibco) με επαναλαμβανόμενες αναρροφήσεις εγχύσεις. Στη συνέχεια έγινε επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, προστέθηκαν 200μl χλωροφορμίου (Merck) ανα σωληνάριο και ακολούθησε επώαση 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Έγινε φυγοκέντρηση στα 12000 x g στους 4°C για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό σωληνάριο και προστέθηκαν επιπλέον 400μl ισοπροπανόλης, έγινε ανάδευση και τα δείγματα επώαστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 12000 x g στους 4°C για 8 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Μετά από ανασύσταση του ιζήματος σε 1ml 70% αλκοόλης, έγινε φυγοκέντρηση στα 7500 x g στους 4°C για 5 λεπτά. Το ίζημα στέγνωσε σε θερμοκρασία δωματίου ενώ το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Τέλος, το RNA διαλυτοποιήθηκε με τη χρήση 60μl νερού ελεύθερου νουκλεασών και διατηρήθηκε στην κατάψυξη -80°C. Η ποσότητα και η καθαρότητα του RNA υπολογίστηκε και φωτομετρικά.

#### 4.4.2 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA (cDNA)

Η δημιουργία συμπληρωματικού DNA από το ολικό RNA με αντίστροφη μεταγραφάση έγινε με το iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκαν 4μl 5x cDNA Synthesis Kit buffer, 1μl iScript enzyme mixture (αντίστροφη μεταγραφάση), 5μl RNA κάθε δείγματος και 10μl H<sub>2</sub>O ελεύθερο νουκλεασών. Τα παραπάνω υλικά τοποθετήθηκαν σε πηγαδάκια της πλάκας Bio-Rad, η οποία σφραγίστηκε από την άνω πλευρά με ειδικό διαφανές κάλυμμα της εταιρίας και τοποθετήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή iCycler iQ (Bio-Rad) με το εξής πρωτόκολλο: στους 25°C για 5 λεπτά (προετοιμασία των dNTPs για να δράσουν), στους 42°C για 60 λεπτά (έναρξη και δράση αντίστροφης μεταγραφάσης) και στους 85°C για 5 λεπτά (απομάκρυνση μη ειδικών προϊόντων και αναστολής της δράσης του ενζύμου). Το προϊόν αποθηκεύτηκε στους -20°C.

#### 4.4.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (RT-PCR)

Η RT-PCR πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το σύστημα θερμοκυκλοποιητή iCycler IQ5 (Bio-rad). Οι αντιδράσεις διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας 2x Master Mix SYBR kit (Biorad). Για τα γονίδια των CB1 και CB2 υποδοχέων χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς η β-ακτίνη. Η αντίδραση περιλάμβανε 10μl του κύριου μίγματος, 0,4μl εκκινητή (10pmol), 1μl cDNA και νερό ελεύθερο νουκλεασών έως τα 20μl. Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή ορίστηκε στους 95°C για 10 λεπτά για την αρχική αποδιάταξη δίκλωνου cDNA- RNA, 40 κύκλους των 94°C για 30 δευτερόλεπτα για αποδιάταξη δίκλωνων μορίων, 60°C για 30 δευτερόλεπτα για την υβριδοποίηση των εκκινητών και 72°C για 30 δευτερόλεπτα για επέκταση, και για τελικό στάδιο επέκτασης στους 72°C για 5 λεπτά. Με την ανάλυση της καμπύλης τήξης του κάθε ενισχυμένου προϊόντος PCR ελέγχθηκε η ειδικότητα της ενίσχυσης. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση με αгарόζη 3% και διάλυμα TBE1x για να πιστοποιηθεί η καθαρότητα των προϊόντων. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας την ΔΔCt μέθοδο.

Γονίδιο	Πρόσθιος (Forward) εκκινητής	Ανάστροφος (Reverse) εκκινητής	Μέγεθος προϊόντος
CB1 υποδοχέας	5' -CTCCACTTCTTTTCCGCCTC-3'	5'-AGGGAACCCCTTCGCATC- 3'	206 bp
CB2 υποδοχέας	5' - GCTGACAAATGA CACCCAGT-3'	5- TGAACA GGTACG AGGGCT T -3'	277 bp
β-actin	5'-TGTAACCAACTGGGACGATATGC- 3'	5'GATCTTGATCTTCATGATGCTAGG 3'	139 bp

**Πίνακας 2:** Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της έκφρασης των υποδοχέων CB1 και CB2.

#### 4.5 ΑΝΟΣΟΣΤΥΠΩΜΑ ΚΑΤΑ WESTERN

Το πρωτόκολλο για το ανοσοστύπωμα κατά Western είναι το εξής: οι ιστοί ζυγίστηκαν και ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα λύσης (10mM Hepes pH 7,8, 10mM KCL, 0,1mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 0,1mM EGTA (minopolycarboxylic acid), 0,5mM PMSF, 1mM DTT, 2μg/ml λευπεπτίνη και 2μg/ml απροτινίνη διαλυμένα σε Water For Injection) με αναλογία 1ml ανά 100mg βάρος ιστού, με ειδικό μηχανήμα ομογενοποίησης ιστών. Στη συνέχεια προστέθηκε 10% Igepal (ή Nonidet-P40) και αναδεύτηκαν με τη χρήση vortex για 45 δευτερόλεπτα και παρέμειναν σε πάγο για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο το οποίο είναι το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα του ιστού αποθηκεύτηκε στους 80°C.

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford χρησιμοποιώντας χρωστική Roti®-Quand (ROTH). Αναλυτικά, 2mg/ml πρωτεΐνης BSA διαλύθηκαν σε WFI για την παρασκευή δειγμάτων συγκέντρωσης (0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,5 mg/ml) και στη συνέχεια, ετοιμάστηκε το διάλυμα χρωστικής Roti®-Quand 1x σε WFI, το οποίο περιείχε και λυτικό διάλυμα. Προστέθηκε διάλυμα χρωστικής μαζί με τα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης και των

υπό διερεύνηση δειγμάτων σε κελιά μικροπλάκας 96 θέσεων (3596, Corning, USA) με τελικό όγκο 200μL και επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Έπειτα, ακολούθησε μέτρηση απορρόφησης στα 595nm σε σπεκτροφωτόμετρο (Molecular Devices). Δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη βάσει των τιμών απορρόφησης των διαλυμάτων και υπολογίστηκε η συγκέντρωση των αγνώστων δειγμάτων μέσω της εξίσωσης που προέκυψε από την πρότυπη καμπύλη.

#### **4.5.1 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ (SDS-PAGE)**

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης-SDS (SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis). Η απορρυπαντική δράση των ηλεκτροαρνητικών μορίων του SDS διαλυτοποιούν τις πρωτεΐνες, φορτίζουν τις πρωτεΐνες αρνητικά και έτσι μεταναστεύουν διαμέσου της πηκτής πολυακρυλαμίδης. Υπό αυτές τις συνθήκες, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται με ταχύτητα που αντανάκλα το μοριακό βάρος τους.

Παρασκευάστηκε πηκτή διαχωρισμού 10% πολυακρυλαμίδιο η οποία αποτελείται από: 30% μείγμα πολυακρυλαμιδίου, Tris 1,5M pH8,8, SDS 0,1%, υπερθεϊκό αμμώνιο (ammonium persulphate) 0,1%, TEMED (tetramethylethylenediamine) 0,04% σε αποσταγμένο νερό. Προστέθηκαν 5ml από την πηκτή διαχωρισμού ανάμεσα σε δύο γυάλινες πλάκες με ενδιάμεσο πάχος 1mm και εφόσον το μείγμα έπηξε, προστέθηκαν από πάνω 2ml 4% πηκτή επιστοίβασης (μείγμα πολυακρυλαμιδίου 30% , Tris 1,5M pH 6,8, SDS 0,1%, υπερθεϊκό αμμώνιο 0,1%, TEMED 0,04% σε αποσταγμένο νερό) και η ειδική χτένα για το σχηματισμό των κελιών. Στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετήθηκαν οι πηκτές και το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer, Tris- HCl 250mM, Glycine 25mM και SDS 0,1%).

Τα υποστρώματα (δείγματα) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα (20μg πρωτεΐνης) από εγκέφαλο και νωτιαίο μυελό από τις αντίστοιχες ομάδες των φάσεων της ΠΑΕ και από φυσιολογικούς μύες, τα οποία αραιώθηκαν σε αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό και διάλυμα φόρτωσης (loading buffer), το οποίο περιείχε Tris-HCl 250mM, 5% SDS, 0,25% μπλε βρωμοφαινόλης, 25% γλυκερόλη και 5% 2-μερκαπτοαιθανόλη. Με χρήση της 2-μερκαπτοαιθανόλης διασπώνται οι δισουλφιδικοί δεσμοί των πρωτεϊνών. Τα δείγματα και ο δείκτης γνωστού μοριακού βάρους (protein marker, NE Biolabs) θερμάνθηκαν στους 70°C για 10 λεπτά, ώστε να γίνει αποδιάταξη της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, τα δείγματα και ο δείκτης προστέθηκαν στα κελιά της πηκτής πολυακρυλαμίδου και ηλεκτροφορήθηκαν στα 150V, 26mA για 70 λεπτά, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



#### 4.5.2 ΗΛΕΚΤΡΟΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ MEMBRANE PVDF

Στη συνέχεια ακολουθεί η ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη από διφθοριούχο πολυβινυλιδένιο (polyvinylidene difluoride, PVDF). Η μεμβράνη εμποτίστηκε με μεθανόλη για ένα λεπτό, ομοίως με αποσταγμένο νερό για ένα λεπτό και τέλος με διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer buffer, Tris-HCl 480mM, Glycine 390mM, μεθανόλη 33% κα SDS 0,033%) για 5 λεπτά. Έπειτα σε ειδική κασέτα τοποθετήθηκαν από κάτω προς τα πάνω: ένας πορώδης σπόγγος, τρία χαρτιά χρωματογραφίας Whatman, η πηκτή, η μεμβράνη, τρία χαρτιά Whatman και πάλι ένας πορώδης σπόγγος. Η κασέτα τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς και προστέθηκε διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς. Η ηλεκτρομεταφορά έγινε στα 100V, 200mA για 120 λεπτά στους 4°C.

#### 4.5.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ / ΕΙΔΙΚΩΝ ΖΩΝΩΝ

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτρομεταφοράς, αφαιρέθηκε προσεκτικά η μεμβράνη και με τη χρωστική Ponceau stain ελέγχθηκε αν έγινε σωστά η μεταφορά των πρωτεϊνών. Έπειτα η μεμβράνη επώαστηκε με διάλυμα κορεσμού (blocking buffer, το οποίο περιέχει 5% σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος διαλυμένο σε PBS1x με Tween 20 0,1% (PBS-T1x), για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε ολονύκτια επώαση της μεμβράνης με τα πρώτα αντισώματα για τους υποδοχείς CB1 (κονίκλου, 1:500, Abcam) και CB2 (κονίκλου, 1:200, Abcam), στους 4°C. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

Την επόμενη μέρα, η μεμβράνη ξεπλύθηκε με PBST1x με 2 πεντάλεπτες πλύσεις και 2 δεκάλεπτες. Ακολούθησε επώαση του δεύτερου αντισώματος αίγας αντι-κονίκλου (goat anti-rabbit IgG- HRP) (Sigma-Aldrich, 1:8000) που ήταν συζευγμένο με HRP (horseradish peroxidase), ένζυμο που βοηθάει στην ανίχνευση της πρωτεΐνης κατά την εμφάνισή της στο φιλμ για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, η μεμβράνη ξεπλύθηκε με PBST1x με 2 πεντάλεπτες πλύσεις και 2 δεκάλεπτες.

Η ανίχνευση γίνεται μέσω εφαρμογής αντιδραστηρίου ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Lumisensor Genscript, USA), με το οποίο επώαστηκε η μεμβράνη για 3 λεπτά. Με τη χρήση φωτογραφικού φιλμ, το οποίο τοποθετήθηκε πάνω στη μεμβράνη, προκλήθηκε έκθεση του φιλμ σε φως στη θέση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, αποτυπώνοντας την ακριβή θέση των αντισωμάτων πάνω στη μεμβράνη. Στη συνέχεια, σε σκοτεινό θάλαμο, το αποτύπωμα εμφανίζεται με εμπότιση του φιλμ σε ένα διάλυμα εμφάνισης (developer) και σταθεροποίησης (fixative) του φιλμ ώστε να μπορεί να εκτεθεί στο φως.

## **4.6 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ**

### **4.6.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΙΣΤΩΝ: ΣΚΗΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΤΟΜΗΣΗ**

Το πρωτόκολλο του εγκλεισμού σε μπλοκ παραφίνης αποτελείται από τα εξής βήματα: τα δείγματα τοποθετήθηκαν κάτω από τρεχούμενο νερό βρύσης για 90 λεπτά. Ακολουθεί αφυδάτωση με σταδιακή επώαση σε αιθανόλη 50%, 70%, 96% και 100% αιθανόλη. Τα δείγματα τοποθετούνται σε 100% αιθανόλη ολονύκτια.

Τη δεύτερη μέρα ακολουθεί επώαση σε δύο διαδοχικά διαλύματα ξυλόλης κάθε μία ώρα και στη συνέχεια ακολουθεί επώαση των δειγμάτων σε δύο διαλύματα παραφίνης στους 58°C ανα μία ώρα, και τέλος, γίνεται εγκλεισμός σε παραφίνη σε ειδικές κασέτες παραφίνης (μπλοκ παραφίνης). Ακολούθησε μικροτόμηση ιστών σε πάχος 6μm με μικροτόμο παραφίνης. Οι τομές τοποθετούνται σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες.

### **4.6.2 ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΧΡΩΣΕΙΣ**

#### **4.6.2.1 ΑΙΜΑΤΟΞΥΛΙΝΗ-ΕΩΣΙΝΗ**

Η χρώση της Αιματοξυλίνης-Εωσίνης (H-E) έγινε σε τομές 6μm. Οι τομές τοποθετήθηκαν σε διάλυμα ξυλόλης για 10 λεπτά, σε κατιούσα σειρά αλκοολών (96% -80%-70%-50%) για 5 λεπτά, σε αποσταγμένο νερό για 5 λεπτά και στη συνέχεια σε διάλυμα αιματοξυλίνης (Hematoxylin Harris, Merck) για 10 λεπτά. Ακολούθως τοποθετήθηκαν σε τρεχούμενο νερό βρύσης και παρέμειναν σε αυτό για άλλα 10 λεπτά. Η διαφοροποίηση έγινε σε διάλυμα αραιωμένου υδροχλωρικού οξέος (3ml HCl σε 200ml αποσταγμένου νερού) για 3 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια ξέπλυμα σε τρεχούμενο νερό βρύσης για περίπου 5 λεπτά. Στη συνέχεια, οι τομές επώαστηκαν για 1 λεπτό σε διάλυμα εωσίνης (Panreac), ξεπλύθηκαν σε νερό βρύσης για 2 λεπτά και τελικά αφυδατώθηκαν με ανιούσα σειρά διαλυμάτων αλκοόλης (50%-70%-80%-96% 3 εμβαπτίσεις) και ξυλόλης για 2 λεπτά και καλύφθηκαν με σταγόνα Entellan (Applichem) και καλυπτρίδα.

Οι πυρήνες εμφανίζονται με χρώμα μπλε ενώ το κυτταρόπλασμα με χρώμα ροζ.

#### **4.6.2.2 LUXOL FAST BLUE (LFB)**

Η χρώση της LFB έγινε σε τομές παραφίνης 6μm ακολουθώντας το εξής πρωτόκολλο: έγινε αποπαραφίνωση των τομών σε διάλυμα ξυλόλης για 10 λεπτά και πεντάλεπτες επώσεις σε 3 διαδοχικά διαλύματα 96% αιθανόλης. Στη συνέχεια οι τομές τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 0,1%

LFB (0,1gr LFB, Sigma, σε 100ml 95% αιθανόλη και 0,5ml οξικού οξέος, Panreac) ολονύκτια στους 56°C.

Την επόμενη μέρα έγινε εμβάπτιση των τομών σε 96% αιθανόλη για 1 λεπτό, σε αποσταγμένο νερό για 1 λεπτό και διαφοροποιήθηκαν για 10 δευτερόλεπτα σε διάλυμα 0,025%  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  (stock 0,05gr Lithium carbonate σε 100ml αποσταγμένο νερό). Ακολούθησε εμβάπτιση σε 70% αιθανόλη για 30 δευτερόλεπτα και σε αποσταγμένο νερό για ένα λεπτό. Έπειτα οι τομές τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 0,1% Nuclear Fast Red (0,1gr Nuclear Fast Red, Sigma με 5gr Aluminum sulfate, Sigma σε 100ml αποσταγμένο νερό) για 40 λεπτά. Οι τομές πλύθηκαν με αποσταγμένο νερό, πραγματοποιήθηκε αφυδάτωση των τομών σε 70% και 100% αιθανόλη 30 δευτερόλεπτα έκαστη και στη συνέχεια διαύγαση σε διάλυμα ξυλόλης 10 λεπτά. Τέλος, οι τομές καλύφθηκαν με καλυπτρίδα και Entellan (Applichem).

Το αποτέλεσμα της χρώσης ήταν η μυελίνη να εμφανιστεί με μπλέ/γαλάζιο χρώμα και οι πυρήνες των κυττάρων με κόκκινο.

#### 4.6.3 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΟΠΤΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ

Οι τομές επώστηκαν σε ξυλόλη για 10 λεπτά, σε κατιούσα σειρά αλκοολών (96% -80%-70%-50%) για 5 λεπτά, σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , Panreac) με μεθανόλη (Chem-Lab) για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, σε αποσταγμένο νερό για 1 λεπτό. Πραγματοποιήθηκε η αποκάλυψη αντιγόνου σε κυτταρικό ρυθμιστικό διάλυμα για τα αντισώματα των υποδοχέων και σε ρυθμιστικό διάλυμα EDTA για το αντίσωμα για τα T-κύτταρα για 60 λεπτά. Στη συνέχεια, ακολουθεί σταδιακή ψύξη των τομών με αποσταγμένο νερό και μια πλύση με TBS1X. Έπειτα, οι τομές τοποθετούνται σε σκοτεινό θάλαμο υγραποίησης (chamber) ώστε να γίνει επώαση με τον αναστολέα των μη ειδικών επιτόπων για 30 λεπτά σε 10% FBS σε PBS1X και 2% NGS. Προστέθηκε το πρώτο αντίσωμα: για CB1 1:100 (κόνικλος, Abcam), για CB2 1:100 (κόνικλος, Abcam), για CD3 1:400 (κόνικλος, Thermo scientific) ολονυκτία σε 10% FBS σε PBS1X στους 4°C.

Την δεύτερη μέρα πραγματοποιήθηκαν πλύσεις με TBS1x τρεις φορές για 5 λεπτά. Προσθέτουμε το δεύτερο αντίσωμα αίγας αντι-κονίκλου (goat-anti-rabbit) 1:200 (Vector) σε 10% FBS σε PBS1X για 60 λεπτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πλύσεις με TBS1x τρεις φορές για 5 λεπτά και προσθήκη της αβιδίνης 1:100 (Sigma) σε Cytomation Buffer 1x (Dako) για 60 λεπτά. Έγινε πλύση με TBS1x τρεις φορές από πέντε λεπτών και προσθήκη 3,3'-διαμινοβενζιδίνης (DAB, Sigma) η οποία είναι αδιάλυτο χρωμογόνο σε αλκοόλη. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πλύση με αποσταγμένο νερό και προσθήκη αιματοξυλίνης Harris (Merck) ώστε οι πυρήνες να χρωματίσουν μπλε. Απομακρύνθηκε η περίσσεια της

αιματοξυλίνης με νερό βρύσης και οι τομές τοποθετήθηκαν σε αποσταγμένο νερό. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αφυδάτωση των τομών με ανιούσα σειρά αλκοολών (50%,70%,80%,96%) για 5 λεπτά, διαύγαση με την χρήση N-Butyl-Acetate (Appllichem) και κλείσιμο των αντικειμενοφόρων πλακών με καλυπτρίδα και Entellan (Appllichem).

Τα Τ-κύτταρα και οι υποδοχείς CB1 και CB2 εμφανίζονται με καφέ χρώμα και οι πυρήνες των κυττάρων με χρώμα μπλε.

#### 4.6.4 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ

Οι τομές παρατηρήθηκαν για όλες τις περιοχές του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού σε οπτικό μικροσκόπιο Zeiss AxioPlan II εξοπλισμένο με κάμερα CCD (Nikon DS-5Mc). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν κατά μήκος του εγκεφάλου καλύπτοντας πολλές διαφορετικές περιοχές (φλοιός, κοιλίες, ιππόκαμπος, θάλαμος, υποθάλαμος, μεσολόβιο, παρεγκεφαλίδα, γέφυρα και προμήκη μυελό) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά για ολόκληρο τον εγκέφαλο. Ενώ οι μετρήσεις για τον νωτιαίο μυελό πραγματοποιήθηκαν μόνο στη λευκή ουσία, περιοχή η οποία επηρεάζεται κυρίως από την παρουσία φλεγμονής. Οι παραπάνω μετρήσεις έγιναν με τη χρήση του προγράμματος Image J 1.43u. Κατά μέσω όρο χρησιμοποιήθηκαν 15 οπτικά πεδία από κάθε ζώο και για κάθε ομάδα της ΠΑΕ. Η μεγέθυνση που χρησιμοποιήθηκε στο μικροσκόπιο ήταν 20X και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως θετικά κύτταρα ανά τετραγωνικό χιλιοστό ( $\text{cells/mm}^2$ ).

#### 4.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism 7.0. Ο έλεγχος για την κανονικότητα των κατανομών έγινε με τα τεστ Shapiro-Wilk και Kolmogorov-Smirnov. Η ανάλυση των παραμετρικών τιμών πραγματοποιήθηκε με το ANOVA (one way analysis of variance) και ακολουθήσε τεστ πολλαπλής σύγκρισης Bonferroni post-hoc. Ενώ η ανάλυση των μη παραμετρικών τιμών έγινε με Kruskal-Wallis και ακολούθησε τεστ πολλαπλής σύγκρισης Dunn's post-hoc. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσες τιμές  $\pm$  τυπική απόκλιση (Standard Error of the Mean, SEM). Οι εκτιμήσεις έγιναν με διάστημα εμπιστοσύνης 95% και θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**

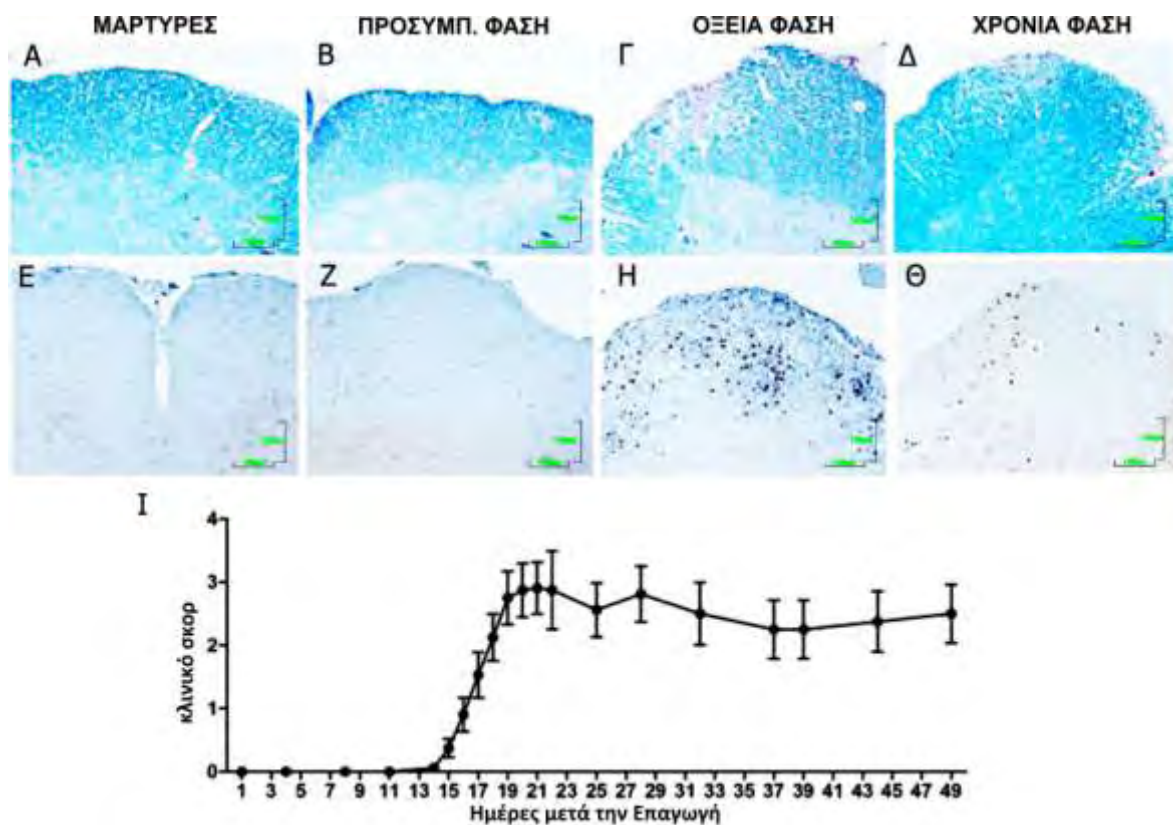
### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### **5.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΕ**

Τα πειραματόζωα ανέπτυξαν κλινικά χαρακτηριστικά της χρόνιας ΠΑΕ, τα οποία από την προσυμπτωματική φάση και μετά άρχισαν να γίνονται ορατά με κλινικό σκορ  $\geq 1$ , απώλεια βάρους και πάρεση της ουράς. Το μεγαλύτερο κλινικό σκορ ( $\geq 4$ ) παρατηρήθηκε στην οξεία φάση της νόσου (19<sup>ης</sup> -21<sup>ης</sup> ημέρας) που χαρακτηρίζεται από έντονη απώλεια βάρους και παράλυση του ενός ή και των δύο οπίσθιων άκρων. Υπολογίστηκαν οι μέσες μέγιστες βαθμολογίες (Mean Maximal Scores-MMS), που αποτελεί μέτρο ένδειξης της νόσου, με σκορ  $3,95 \pm 0,67$ . Υπολογίστηκε και η περιοχή κάτω από την καμπύλη (Area under the Curve, AUC), με τιμή  $89,09 \pm 9,49$ . Η AUC αναφέρεται σε μια γραφική παράσταση των κλινικών σκορ κατά τη διάρκεια της ανάλυσης και δίνει πληροφορίες για την έκταση της νόσου και υπολογίζεται με έναν ειδικό μαθηματικό τύπο [89]. Για να ταυτοποιηθεί η παθολογία της ΠΑΕ έγινε ιστοχημική ανάλυση με την χρώση LFB σε τομές εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού όπου ήταν εμφανής η απομυελίνωση ως λευκές περιοχές και η ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων μέσω ανοσοιστοχημείας με τον δείκτη CD3. ( **Εικόνα 4, Διάγραμμα 1**)

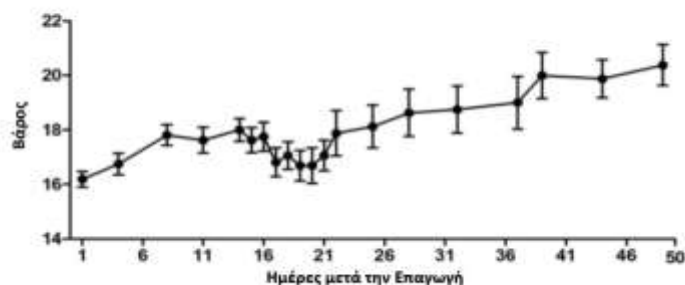
#### **5.2 mRNA ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ**

Η σχετική έκφραση του υποδοχέα CB1 στον εγκέφαλο αυξήθηκε στην προσυμπτωματική φάση συγκρινόμενη με την ομάδα των μαρτύρων ( $p < 0.01$ ) και μειώθηκε στην οξεία και τη χρόνια φάση σε σύγκριση με την ομάδα της προσυμπτωματικής φάσης ( $p < 0.05$ ). Ενώ στον νωτιαίο μυελό, η έκφραση του CB1 είναι αυξημένη στην οξεία φάση συγκρινόμενη με την ομάδα των μαρτύρων ( $p < 0.01$ ) και με την ομάδα της προσυμπτωματικής φάσης ( $p < 0.05$ ). Η σχετική έκφραση του υποδοχέα CB2 στον εγκέφαλο δεν παρουσίασε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες. Ενώ στον νωτιαίο μυελό η έκφραση του CB2 είναι αυξημένη στην οξεία φάση συγκρινόμενη με την ομάδα των μαρτύρων ( $p < 0.01$ ) και με την ομάδα της προσυμπτωματικής φάσης ( $p < 0.001$ ). (**Εικόνα 5**)

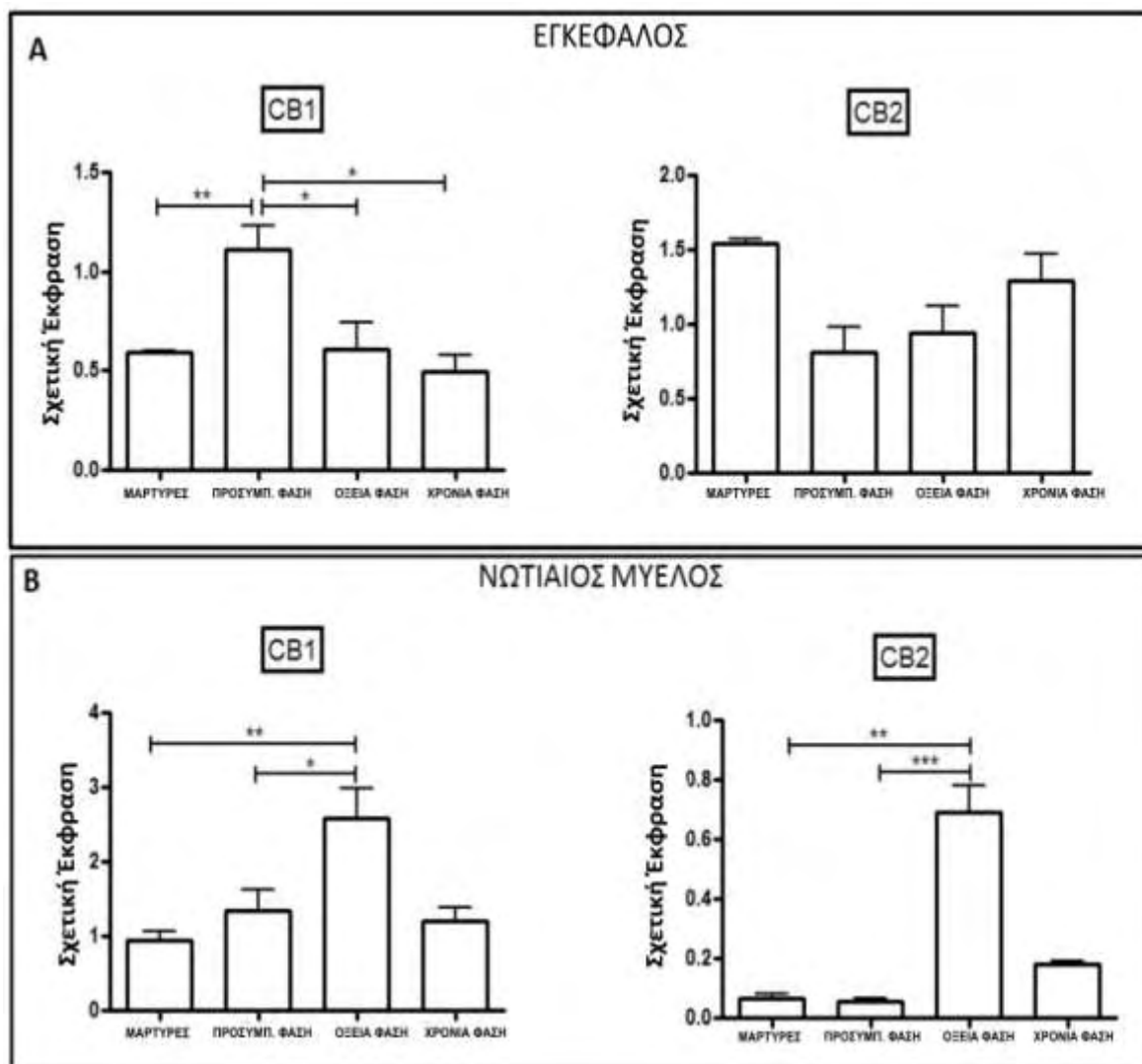


**Εικόνα 4:** Απεικονίσεις χρώσεων LFB και CD3 στην ομάδα μαρτύρων (Α,Ε), στην προσυμπτωματική φάση (Β,Ζ), στην οξεία φάση (Γ,Η) και στη χρόνια φάση (Δ,Θ) στην ΠΑΕ στον νωτιαίο μυελό. LFB: εμφανώς περιοχές με φλεγμονή στην οξεία φάση και παρουσία CD3+ T-λεμφοκυττάρων.

**Διάγραμμα 1:** Το διάγραμμα περιγράφει τις διακυμάνσεις της κλινικής εικόνας των πειραματόζωων από την ημέρα της θυσίας ως τη χρόνια φάση της ΠΑΕ (Ι). Το κάθε σημείο απεικονίζει το μέσο όρο και το στατιστικό σφάλμα .



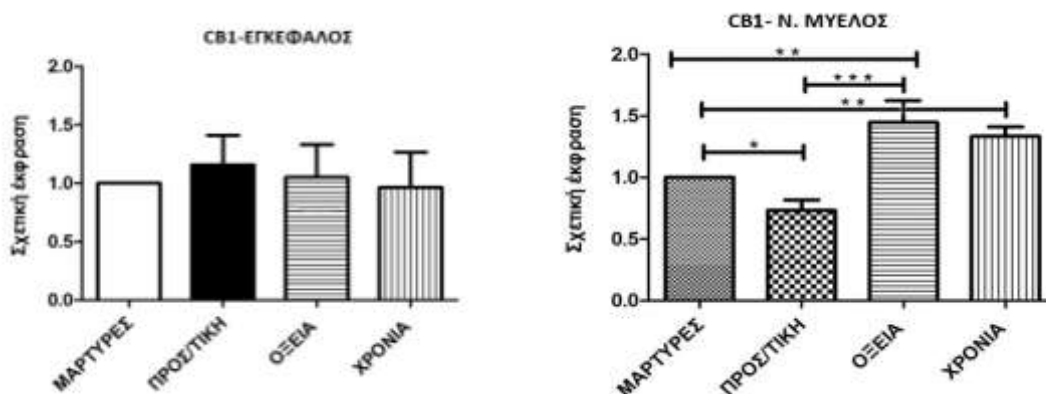
**Διάγραμμα 2:** Το διάγραμμα περιγράφει τις διακυμάνσεις του βάρους των πειραματόζωων από την ημέρα της θυσίας ως τη χρόνια φάση της ΠΑΕ. Το κάθε σημείο απεικονίζει το μέσο όρο και το στατιστικό σφάλμα.



**Εικόνα 5:** Αποτελέσματα της RT-PCR, σχετική έκφραση mRNA των γονιδίων των υποδοχέων CB1 και CB2 στον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό (λευκή και φαιά ουσία ) στην ΠΑΕ. (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )

### 5.3 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΝΟΣΟΣΤΥΠΩΜΑ ΚΑΤΑ WESTERN

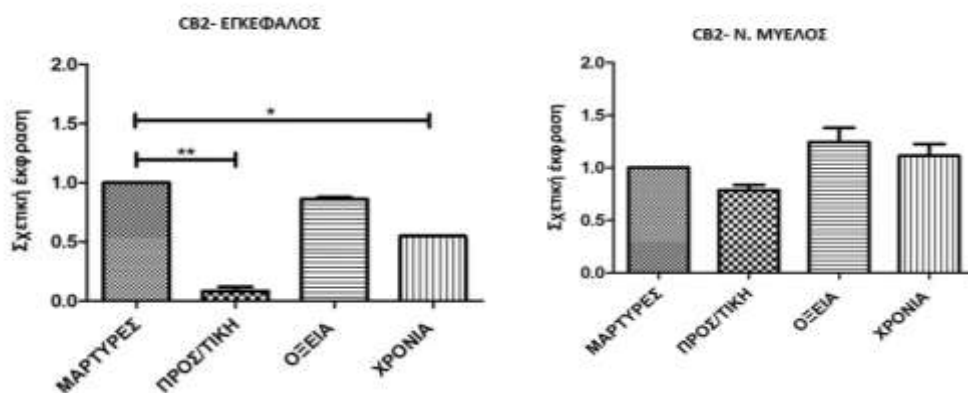
Η πρωτεϊνική έκφραση του υποδοχέα CB1 στον εγκέφαλο δεν παρουσίασε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες. Ενώ στον νωτιαίο μυελό, ο CB1 υποδοχέας είναι ελαττωμένος στην προσυμπτωματική ( $0,413 \pm 0,09$ ) ( $p < 0,05$ ) και αυξημένος στην οξεία ( $1,41 \pm 0,10$ ) ( $p < 0,01$ ) και τη χρόνια φάση ( $1,34 \pm 0,08$ ) ( $p < 0,01$ ) συγκρινόμενες με την ομάδα των μαρτύρων (Εικόνα 6). Η πρωτεϊνική έκφραση του υποδοχέα CB2 στον εγκέφαλο είναι μειωμένη στην ομάδα της προσυμπτωματικής φάσης ( $0,08 \pm 0,04$ ) ( $p < 0,01$ ) και της χρόνιας φάσης ( $0,12 \pm 0,0$ ) ( $p < 0,05$ ) συγκρινόμενες με την ομάδα μαρτύρων. Ενώ στον νωτιαίο μυελό ο CB2 υποδοχέας δεν παρουσίασε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες (Εικόνα 7).



**Εικόνα 6:** Αποτελέσματα ανοσοστυπώματος κατά Western, ο υποδοχέας CB1 στον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό (λευκή και φαιά ουσία) στην ΠΑΕ.

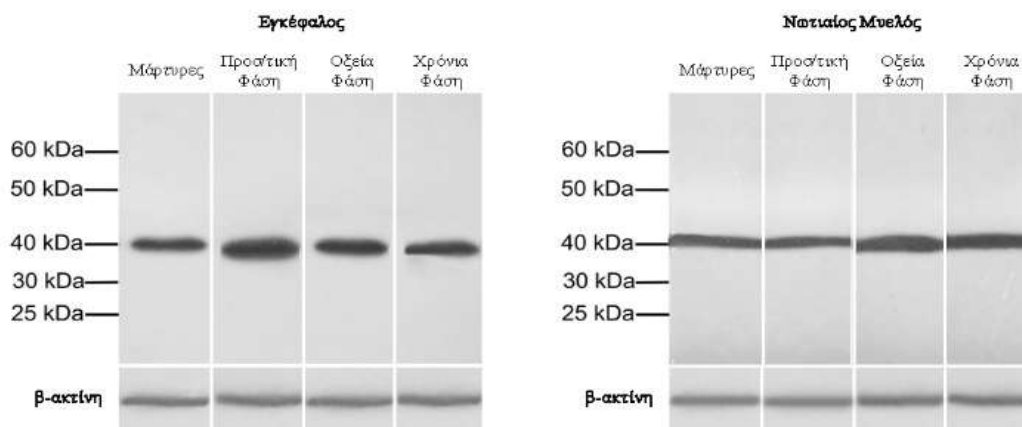
(\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )



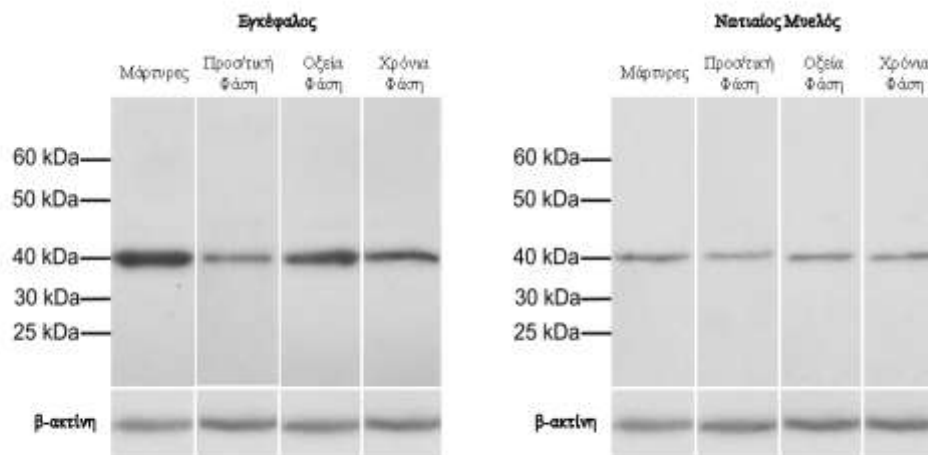


**Εικόνα 7:** Αποτελέσματα ανοσοστυπώματος κατά Western, ο υποδοχέας CB2 στον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό (λευκή και φαιά ουσία ) στην ΠΑΕ.

(\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )



**Εικόνα 8:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανίχνευσης πρωτεϊνικών ζωνών σε όλες τις φάσεις της ΠΑΕ για τον υποδοχέα CB1  $\approx 40$  kDa από ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού. Χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη ως μάρτυρας ελέγχου πρωτεϊνικής ποσότητας με 45 kDa.

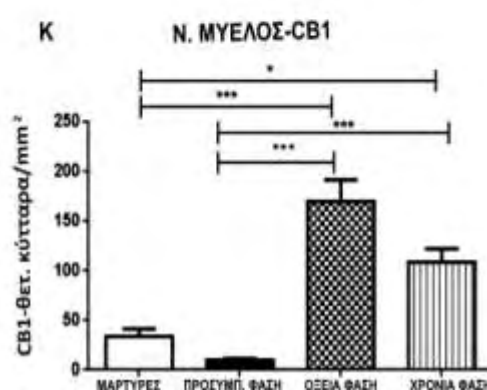
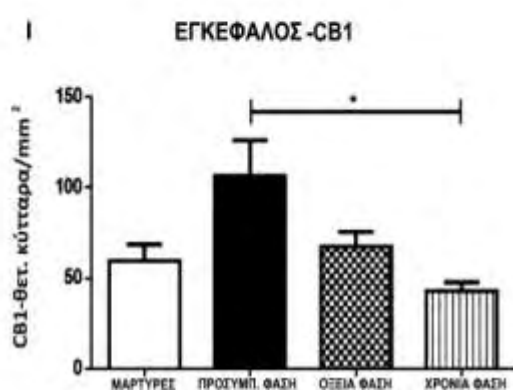
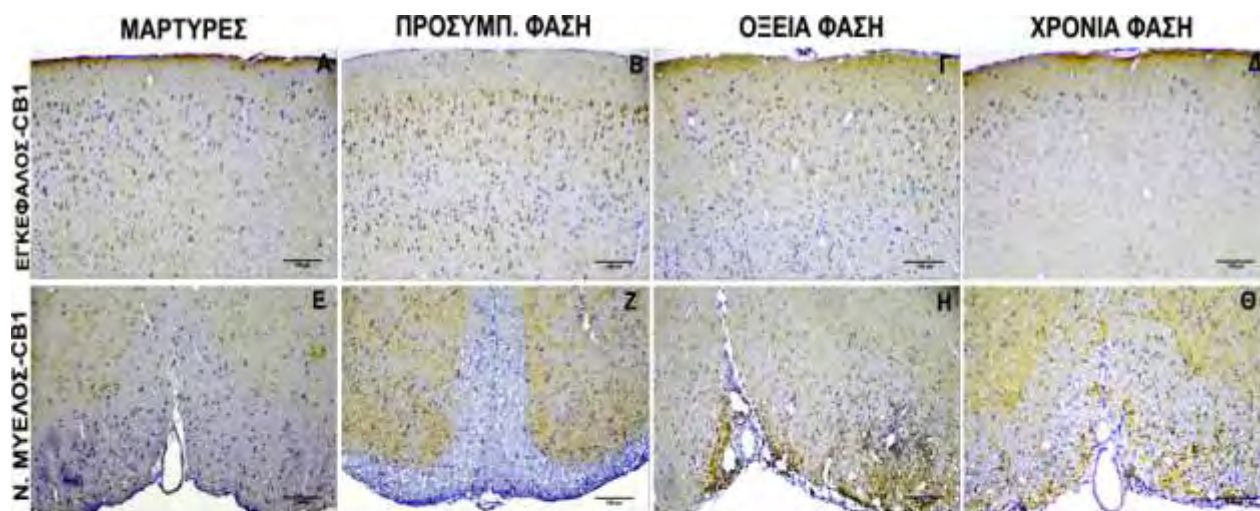


**Εικόνα 9:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανίχνευσης πρωτεϊνικών ζωνών σε όλες τις φάσεις της ΠΑΕ για τον υποδοχέα CB2  $\approx 40$  kDa από ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού. Χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη ως μάρτυρας ελέγχου πρωτεϊνικής ποσότητας με 45 kDa.

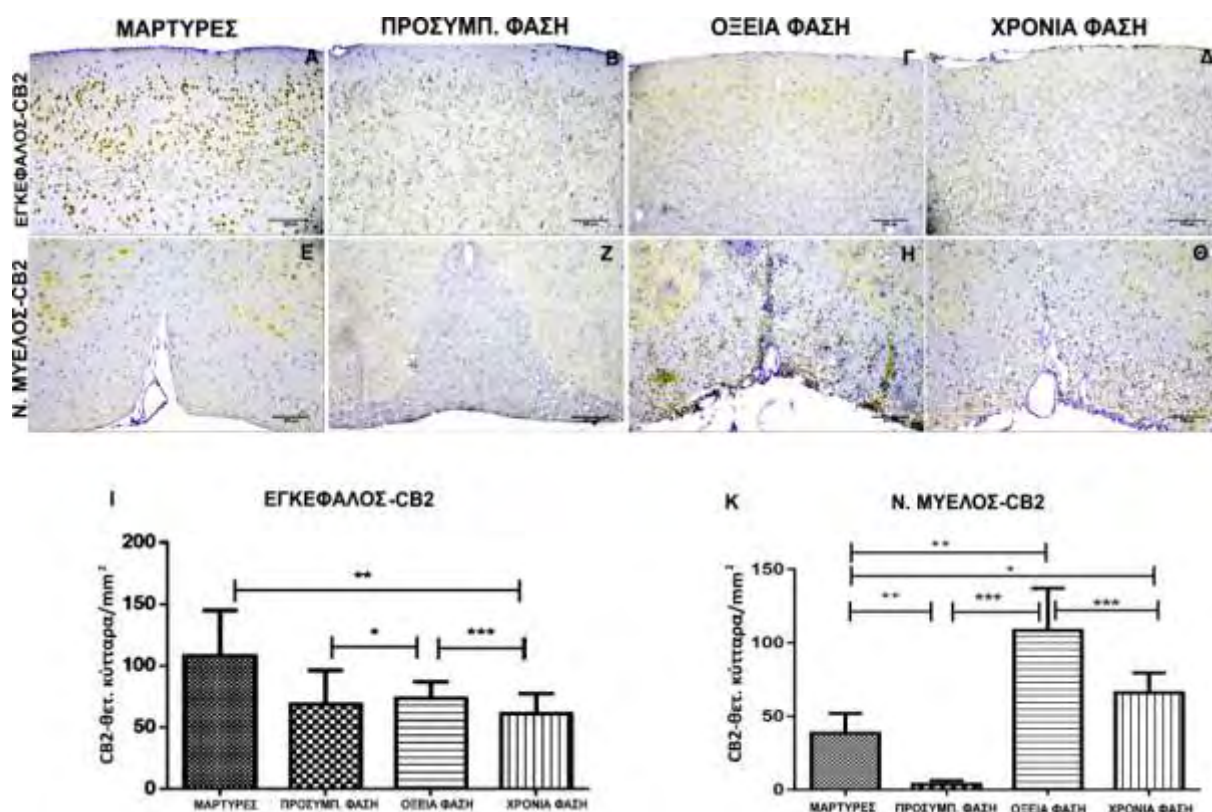
#### 5.4 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΟ ΚΝΣ

Η πρωτεϊνική έκφραση του CB1 στον εγκέφαλο είναι αυξημένη στην ομάδα της προσυμπτωματικής φάσης ( $106,1 \pm 20,02$ ) ( $p < 0.05$ ) συγκρινόμενη με την ομάδα της χρόνιας φάσης ( $42,88 \pm 4,99$ ) ενώ δεν παρουσιάστηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις υπόλοιπες ομάδες. Στον νωτιαίο μυελό ο CB1 υποδοχέας είναι αυξημένος στην ομάδα της οξείας φάσης ( $169,8 \pm 21,62$ ) συγκρινόμενη με την ομάδα των μαρτύρων ( $33,49 \pm 8,17$ ) ( $p < 0.001$ ). Επίσης, η χρόνια φάση ( $108,2 \pm 13,79$ ) ( $p < 0.05$ ) είναι αυξημένη σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων (**Εικόνα 10**).

Η πρωτεϊνική έκφραση του υποδοχέα CB2 στον εγκέφαλο είναι μειωμένη στη χρόνια φάση ( $60,97 \pm 8,41$ ) ( $p < 0.01$ ) σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων. Ενώ, είναι αυξημένη στην οξεία φάση ( $73,47 \pm 6,92$ ) συγκρινόμενη με την ομάδα της προσυμπτωματικής φάσης ( $68,67 \pm 13,98$ ) ( $p < 0.05$ ) και με τη χρόνια φάση ( $60,97 \pm 8,41$ ) ( $p < 0.001$ ). Ενώ στον νωτιαίο μυελό ο CB2 υποδοχέας είναι αυξημένος στην οξεία φάση ( $108,6 \pm 14,32$ ) ( $p < 0.01$ ) σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων και με την προσυμπτωματική φάση ( $3,60 \pm 1,25$ ) ( $p < 0.001$ ). Επίσης, η χρόνια φάση είναι αυξημένη ( $65,92 \pm 6,84$ ) ( $p < 0.01$ ) συγκρινόμενη με τους μάρτυρες (**Εικόνα 11**).



**Εικόνα 10:** Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες τομών από οπτικό μικροσκόπιο, ανοσοϊστοχημείας CB1 για την περιοχή του εγκεφάλου: Ομάδα μαρτύρων (Α), προσυμπτωματική φάση (Β), οξεία φάση (Γ), χρόνια φάση (Δ). Και για τον νωτιαίο μυελό: Ομάδα μαρτύρων (Ε), προσυμπτωματική φάση (Ζ), οξεία φάση (Η), χρόνια φάση (Θ). Μεγέθυνση 20X. Κλίμακα 100μm. Και τα γραφήματα που απεικονίζουν τις στατιστικές διαφορές του CB1 υποδοχέα στον εγκεφαλο (Ι) και στον νωτιαίο μυελό (Κ). (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )



**Εικόνα 11:** Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες τομών από οπτικό μικροσκόπιο, ανοσοϊστοχημείας CB2 για την περιοχή του εγκεφάλου: Ομάδα μαρτύρων (Α), προσυμπτωματική φάση (Β), οξεία φάση (Γ), χρόνια φάση (Δ). Και για τον νωτιαίο μυελό: Ομάδα μαρτύρων (Ε), προσυμπτωματική φάση (Ζ), οξεία φάση (Η), χρόνια φάση (Θ). Και τα γραφήματα που απεικονίζουν τις στατιστικές διαφορές του CB2 υποδοχέα στον εγκεφαλο (Ι) και στον νωτιαίο μυελό(Κ). (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6**

### **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Η παρούσα εργασία είχε ως σκοπό τη μελέτη της έκφρασης των υποδοχέων CB1 και CB2 στο ΚΝΣ σε θηλυκούς μύες της φυλής C57BL/6 κατά τη διάρκεια της ΠΑΕ. Οι τρεις κομβικές χρονικές φάσεις της ΠΑΕ είναι (1) η προσυμπτωματική φάση όπου τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκυττάρια είναι ακόμα στην περιφέρεια και δεν έχουν διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό για την μετανάστευση τους στο ΚΝΣ, (2) η οξεία φάση όπου συναντάται το μεγαλύτερο κλινικό σκορ των πειραματόζων με φλεγμονώδεις εστίες και (3) η χρόνια φάση όπου η κλινική εικόνα εμφανίζει ελαφριά βελτίωση και παρατηρείται σταθεροποίηση των κλινικών συμπτωμάτων σε σύγκριση με την ομάδα των φυσιολογικών μαρτύρων.

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης δείχνουν ότι η έκφραση των δύο υποδοχέων μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια εξέλιξης της ΠΑΕ, αλλά με διαφορετικό τρόπο για κάθε υποδοχέα. Ο υποδοχέας CB1 εκφράζεται περισσότερο σε κύτταρα του ΚΝΣ ενώ ο υποδοχέας CB2 στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος [90]. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση της μελέτης ήταν η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, το ανοσοστύπωμα κατά Western και η ιστοπαθολογική εκτίμηση μέσω οπτικού μικροσκοπίου.

Αναλυτικά, συγκρίνοντας την γονιδιακή έκφραση των δύο υποδοχέων στον εγκέφαλο των πειραματόζων βρέθηκε ότι ο CB1 αυξάνεται αρκετά στην προσυμπτωματική φάση και υπάρχει μια μικρή ελάττωση της έκφρασης τόσο στην οξεία όσο και στη χρόνια φάση σε σύγκριση με την προσυμπτωματική φάση. Τα αποτελέσματα για τον υποδοχέα CB2, στον εγκέφαλο, δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Και οι δυο υποδοχείς αυξάνονται αισθητά στην οξεία φάση στον νωτιαίο μυελό. Μελέτες σε ασθενείς με ΣκΠ έδειξαν ότι μπορεί να υπάρχουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, οι οποίες επηρεάζουν την αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων, ενεργοποιώντας τους παράγοντες μεταγραφής (NP-kB, NP-AT, AP-1), οι οποίοι έχουν δεσμευτική θέση στους υποκινητές αμφοτέρων των γονιδίων των υποδοχέων [91].

Στην τεχνική του ανοσοστυπώματος κατά Western, σημαντικές διαφορές στα αποτελέσματα της πρωτεϊνικής έκφρασης παρουσιάστηκαν στον νωτιαίο μυελό για τον υποδοχέα CB1 όπου έχει αυξηθεί στην οξεία και στη χρόνια φάση σε σύγκριση με την ομάδα των φυσιολογικών μαρτύρων. Όσο αφορά τον υποδοχέα CB2, έχει ελαττωθεί η έκφραση του στην προσυμπτωματική και στη χρόνια φάση συγκρινόμενες με την ομάδα μαρτύρων. Η έκφραση του υποδοχέα CB1 στον εγκέφαλο και του υποδοχέα CB2 στον νωτιαίο μυελό δεν έχουν

στατιστική διαφορά μεταξύ των ομάδων της ΠΑΕ.

Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας έδειξαν ότι η πρωτεϊνική έκφραση του υποδοχέα CB1 στον εγκέφαλο έχει αυξηθεί στην προσυμπτωματική φάση συγκρινόμενη με τη χρόνια φάση, ενώ ο CB2 ελαττώνεται σημαντικά στη χρόνια φάση τόσο σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων όσο και με την οξεία φάση και λιγότερο στην προσυμπτωματική φάση σε σύγκριση με την οξεία. Τέλος, και οι δυο υποδοχείς στον νωτιαίο μυελό, στην οξεία φάση, αυξάνονται αρκετά συγκρινόμενοι με τις υπόλοιπες ομάδες της ΠΑΕ.

Η ΠΑΕ είναι μια νόσος που επηρεάζει περισσότερο τον νωτιαίο μυελό, και συγκεκριμένα τη λευκή ουσία [86,87,88]. Οι μεταβολές της πρωτεϊνικής κινητικής των υποδοχέων, που περιεγράφηκαν στα αποτελέσματα στον νωτιαίο μυελό, θεωρήθηκαν ότι οφείλονται στην παρουσία φλεγμονής, η οποία προκαλεί μια αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων στα κύτταρα του νωτιαίου μυελού, με μέγιστη αύξηση στην οξεία φάση [92,93]. Μελέτες σε τρωκτικά υποδεικνύουν ότι τα κανναβινοειδή είναι ισχυροί διαμορφωτές της φλεγμονής σε αυτοάνοσες διαταραχές [94] και ότι η βελτίωση της ΠΑΕ με κανναβινοειδή υποδηλώνει ότι η έκφραση του υποδοχέα CB1 είναι απαραίτητη για το θεραπευτικό αποτέλεσμα [95].

Σε ασθενείς με ΣΚΠ, στον νωτιαίο μυελό, βρέθηκε αυξημένη η έκφραση του CB2 υποδοχέα, ο οποίος ταυτοποιήθηκε ως ανοσοκατασταλτική μικρογλοία/μακροφάγα, σε σύγκριση με υγιή άτομα, και έχει αναφερθεί συνολική διαταραχή του ΕΣΚ. Ομοίως και στην ΠΑΕ, η έκφρασή του εντοπίζεται και σε περιγγειακά κύτταρα της μικρογλοίας, που κατά την διάρκεια της ΠΑΕ μεταναστεύουν από το ΠΝΣ στο ΚΝΣ, τονίζοντας τον σημαντικό ρόλο του υποδοχέα CB2 ως πιθανό θεραπευτικό στόχο για νευροεκφυλιστικές ασθένειες [96,97,98,99].

Τα κανναβινοειδή έχουν προταθεί ως πολλά υποσχόμενοι θεραπευτικοί παράγοντες, δεδομένης της ικανότητάς τους να μειώνουν την απόπτωση των ολιγοδενδροκυττάρων και την αξονική βλάβη σε ασθενείς με ΣΚΠ, ανοίγοντας ευκαιρίες για ανάπτυξη νέων θεραπειών. Επίσης, η τοπική υπερέκφραση του CB1 υποδοχέα στο νωτιαίο μυελό προκαλεί την παραγωγή ενδογενών νευροτροφικών παραγόντων που συμβάλλουν στην προστασία και την επιδιόρθωση των νευρώνων και των νευραξόνων στο ΚΝΣ των ποντικών με ΠΑΕ σε σύγκριση με ποντικούς άνευ CB1 υποδοχέα (knock out), τα οποία ανέπτυξαν πιο σοβαρή νευρολογική βλάβη [100]. Τέλος, πρόσφατες εργασίες έχουν επισημάνει ότι υπάρχει μια συνεργασία μεταξύ της ανοσολογικής απόκρισης του ΚΝΣ και του ΕΚΣ για να προωθηθεί η λειτουργική αποκατάσταση, δεδομένου ότι τα ανοσοκύτταρα βοηθούν στη διατήρηση της νευρογένεσης στα βλαστικά κέντρα του ενήλικου ΚΝΣ ακόμη και κάτω από μη παθολογικές καταστάσεις. Έτσι, το ΕΚΣ, το οποίο έχει νευροπροστατευτικές και ανοσοδιαμορφωτικές δράσεις που μεσολαβούν από διαφορετικούς καταρράκτες σηματοδότησης στον εγκέφαλο, θα μπορούσε να βοηθήσει στη διαδικασία πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης εμβρυϊκών ή ενήλικων νευρικών βλαστοκυττάρων που

επάγουν κυτταρικές αποκρίσεις μέσω διαμόρφωσης της έκφρασης ενός αριθμού διαφορετικών γονιδίων [101].

Στη μελέτη αυτή αναλύθηκε η γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση των υποδοχέων CB1 και CB2 του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος και η συσχέτιση τους σε διαφορετικές χρονικές στιγμές στην ΠΑΕ, παρουσιάζοντας έντονη κινητικότητα. Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν ότι η φλεγμονώδης απομυελίνωση στο ΚΝΣ σηματοδοτεί μεταβολές στην γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση των υποδοχέων, κυρίως στον νωτιαίο μυελό. Επίσης, η έκφραση των υποδοχέων μπορεί να σχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου. Είναι αρκετά ενδιαφέρον ότι οι μεταβολές στην έκφραση των υποδοχέων στην προσυμπτωματική φάση μπορεί να υποδεικνύουν μια ενεργή συμμετοχή του ΕΣΚ ήδη στο προκλινικό στάδιο, το οποίο χρήζει περαιτέρω διερεύνηση. Γενικά, τα κανναβιδοειδή δρουν ρυθμιστικά στην νευροεκφύλιση του ΚΝΣ στην ΠΑΕ κυρίως μέσω της ρύθμισης της φλεγμονής διαμέσου του υποδοχέα CB2 και της διαμεσολαβούμενης από το CB1 νευροπροστασίας [92,102].



## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Zurier RB, Burstein SH. Cannabinoids, inflammation, and fibrosis. *FASEB J*. 2016;30:3682–9.
2. Andre CM, Hausman J-F, Guerriero G. Cannabis sativa: the plant of the thousand and one molecules. *Front Plant Sci*. 2016;7:19.
3. Jung UJ, Choi M-S. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2014;15:6184–223.
4. Berk M, Williams LJ, Jacka FN, O’Neil A, Pasco JA, Moylan S, et al. So depression is an inflammatory disease, but where does the inflammation come from? *BMC Med*. 2013;11:200.
5. Howlett C, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 2002;54:161–202.
6. Zuardi AW. History of cannabis as a medicine: a review. *Rev Bras Psiquiatr*. 2006;28:153–7.
7. Mechoulam R. The pharmacohistory of Cannabis sativa. In: Mechoulam R, editor. *Cannabinoids as therapeutic agents*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1986. p. 1–19.
8. Russo E, Guy GW. A tale of two cannabinoids: the therapeutic rational for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Med Hypotheses*. 2006;66:234–46.
9. Matias I, Di Marzo V. Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab*. 2007;18:27–37.
10. Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*. 2002;96:678-682.
11. Mackie K. Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *J Neuroendocrinol*. 2008;20:10–4
12. Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molec Pharmacol*. 1988;34:605-613.
13. Akerman S, Holland PR, Lasalandra MP, Goadsby PJ. Endocannabinoids in the brainstem modulate dural trigeminovascular nociceptive traffic via CB1 and “Triptan” receptors: implications in migraine. *J Neurosci*. 2013;33:14869–77.

14. Guo J, Ikeda SR. Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons. *Mol Pharmacol*. 2004;65:665–74.
15. Stella N. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia*. 2010;58:1017–30.
16. Demuth DG, Molleman A. Cannabinoid signaling. *Life Sci*. 2006;78:549-563.
17. Nunez E, Benito C, Pazos MR, et al. Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse*. Sep 15 2004;53(4):208-213.
18. Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, et al. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci*. Aug 2006;1074:514-536.
19. Pertwee RG. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol* 2006;147(S1):S163–71.
20. Di Marzo V. CB1 receptor antagonism: biological basis for metabolic effects. *Drug Discov Today* 2008;1–16.
21. Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* Feb 2006;27(1):73–100.
22. Howlett AC. Cannabinoid receptor signaling. *Handb Exp Pharmacol* 2005:53–79.
23. Di Marzo V. ‘Endocannabinoids’ and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochim Biophys Acta* 1998;1392:153–75.
24. Giuffrida A, Beltramo M, Piomelli D. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298:7–14.
25. Dinh TP, Freund TF, Piomelli D. A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids* 2002;121:149–58.
26. Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2 arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002;66:173–92.
27. Grotenhermen F. Pharmacology of cannabinoids. *Neuroendocrinol Lett* 2004;25(1/2):14–23 Nos.1/2, Feb-Apr.
28. Dewey WL. Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol Rev* 1986;38:151–78.

29. Pertwee R. In vivo interactions between psychotropic cannabinoids and other drugs involving central and peripheral neurochemical mediators. Marijuana/cannabinoids: neurobiology and neurophysiology. CRC Press; 1992. p. 165–218.
30. Baker D, Pryce G, Giovannoni G, Thompson AJ. The therapeutic potential of cannabis. Lancet Neurol 2003;2:291–8.
31. Marsicano G, Moosmann B, Hermann H, Lutz B, Behl C. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. J Neurochem 2002;80:448–56.
32. Domino EF. Cannabinoids and the cholinergic system. Marijuana and medicine. Humana Press; 1999 223–6.
33. Mattes RD, Shaw LM, Engelman K. Effects of cannabinoids (marijuana) on taste intensity and hedonic ratings and salivary flow of adults. Chem Senses 1994;19: 125–40.
34. Fan P. Cannabinoid agonists inhibit the activation of 5-HT<sub>3</sub> receptors in rat nodose ganglion neurons. J Neurophysiol 1995;73:907–10.
35. Müller-Vahl KR, Kolbe H, Schneider U, Emrich HM. Movement disorders. Cannabis and cannabinoids. Pharmacology, toxicology, and therapeutic potential. Haworth Press; 2002. p. 205–14.
36. Musty RE, Paul Consroe P. Spastic disorders. Cannabis and cannabinoids. Pharmacology, toxicology, and therapeutic potential. Haworth Press; 2002. p. 195–204.
37. Grundy RI. The therapeutic potential of the cannabinoids in neuroprotection. Expert Opin Investig Drugs 2002;11:1365–74.
38. A. Hampson. Cannabinoids as neuroprotectants against ischemia. Cannabis and cannabinoids. Pharmacology, toxicology, and therapeutic potential. Haworth Press; 2002. p. 101–10.
39. Marsicano G, Moosmann B, Hermann H, Lutz B, Behl C. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. J Neurochem 2002;80:448–56.
40. Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, et al. The cannabinoid system and immune modulation. J Leukoc Biol 2003;74:486–96.
41. Berdyshev EV. Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. Chem Phys Lipids 2000;108:169–90.

42. Cabral GA, Staab A. Effects on the immune system. *Handb Exp Pharmacol* 2005;385–423.
43. Pestonjamasp VK, Burstein SH. Anandamide synthesis is induced by arachidonate mobilizing agonists in cells of the immune system. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1394:249–60.
44. Bisogno T, Maurelli S, Melck D, De Petrocellis L, Di Marzo V. Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *J Biol Chem* 1997;272:3315–23.
45. Lee SF, Newton C, Widen R, Friedman H, Klein TW. Differential expression of cannabinoid cb(2) receptormrna in mouse immune cell subpopulations and following b cell stimulation. *Eur J Pharmacol* 2001;423(2–3):235–41.
46. Massa F, Monory K. Endocannabinoids and the gastrointestinal tract. *J Endocrinol Invest* 2006;29:47–57.
47. Karsak M, Gaffal E, Date R, Wang-Eckhardt L, Rehnelt J, Petrosino S, et al. Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system. *Science* 2007;316:1494–7.
48. Massa F, Storr M, Lutz B. The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the gastrointestinal tract. *J Mol Med* 2005;83:944–54.
49. Kumar RN, Chambers WA, Pertwee RG. Pharmacological actions and therapeutic uses of cannabis and cannabinoids. *Anaesthesia* 2001;56:1059–68.
50. Berdyshev EV. Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. *Chem Phys Lipids* 2000;108:169–90.
51. Marsicano G, Moosmann B, Hermann H, Lutz B, Behl C. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *J Neurochem* 2002;80:448–56.
52. Mechoulam R, Shohami E., Endocannabinoids and traumatic brain injury, *Molecular neurobiology* 2007
53. Pryce G, Ahmed Z, Hankey DJ, Jackson SJ, Croxford JL, et al. (2003) Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis. *Brain* 126: 2191-2202.
54. Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, et al. (2000) Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature* 404: 84-87.
55. Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, et al. (2001) Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *FASEB J* 15: 300-302.

56. Velayudhan L, Van Diepen E, Marudkar M, Hands O, Suribhatla S, et al. (2014) Therapeutic potential of cannabinoids in neurodegenerative disorders: a selective review. *Curr Pharm Des* 20: 2218-2230.
57. Di Iorio G, Lupi M, Sarchione F, Matarazzo I, Santacroce R, et al. (2013) The endocannabinoid system: a putative role in neurodegenerative diseases. *Int J High Risk Behav Addict* 2: 100-106.
58. Pryce G, Cabranes A, Fernández-Ruiz J, Bisogno T, Di Marzo V, et al. (2013) Control of experimental spasticity by targeting the degradation of endocannabinoids using selective fatty acid amide hydrolase inhibitors. *Mult Scler* 19: 1896-1904
59. Cabranes A, Venderova K, de Lago E, Fezza F, Sánchez A, Mestre L, Valenti M, García Merino A, Ramos JA, Di Marzo V, Fernández-Ruiz J., Decreased endocannabinoid levels in the brain and beneficial effects of agents activating cannabinoid and/or vanilloid receptors in a rat model of multiple sclerosis, *Neurobiology of disease* 2005
60. Athanasios Lourbopoulos, Nikolaos Grigoriadis, Roza Lagoudaki, Olga Touloumi, Eleni Polyzoidou, Ioannis Mavromatis, Nikolaos Tascos, Aviva Breuer, Haim Ovadia, Dimitris Karussis, Ester Shohami, Raphael Mechoulam and Constantina Simeonidou,, Administration of 2-arachidonoylglycerol ameliorates both acute and chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, *Brain research* 2011
61. Erguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH (1997) Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120: 393-399
62. Killestein J, Uitdehaag BM, Polman CH (2004) Cannabinoids in multiple sclerosis: do they have a therapeutic role? *Drugs* 64: 1-11.
63. Aizpurua-Olaizola, O. et al. Targeting the endocannabinoid system: future therapeutic strategies, *Drug Discov Today* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2016.08.005>
64. Silvia Rossi, Giorgio Bernardi, Diego Centonze The endocannabinoid system in the inflammatory and neurodegenerative processes of multiple sclerosis and of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology* 224 (2010) 92–102
65. Adelman G, et al. (2013). The cost burden of multiple sclerosis in the United States: A systematic review of the literature. [doi.org/10.3111/13696998.2013.778268](https://doi.org/10.3111/13696998.2013.778268)
66. Marrie RA, Horwit *Lancet Neurol.* 2010 Aug;9(8):820-8. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70135-6.

67. J.F. Kurtzke. Epidemiology and etiology of multiple sclerosis. *Phys Med Rehabil Clin North Am*, 16 pp. 327–349. (2005)
68. Compston A, Coles A «Multiple sclerosis». *Lancet* 372(9648): 1502–17. (October 2008).
69. Compston A, Coles A (October 2008). "Multiple sclerosis". *Lancet*. 372 (9648): 1502–17. doi:10.1016/S0140-6736(08)61620-7. PMID 18970977.
70. Compston A, Coles A (April 2002). "Multiple sclerosis". *Lancet*. 359 (9313): 1221–31. doi:10.1016/S0140-6736(02)08220-X. PMID 11955556
71. Chari DM (2007). "Remyelination in multiple sclerosis". *International Review of Neurobiology*. 79: 589–620. doi:10.1016/S0074-7742(07)79026-8. PMID 17531860
72. Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM: T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2002, 3:549-557.
73. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA: Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 2008,223:87-113.
74. Kebir H, Kreyenborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, Giuliani F, Arbour N, Becher B, Prat A: Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 2007, 13:1173-1175.
75. Pittock SJ, Lucchinetti CF (March 2007). "The pathology of MS: new insights and potential clinical applications". *The Neurologist*. 13 (2): 45–56. doi:10.1097/01.nrl.0000253065.31662.37. PMID 17351524.
76. Ferré JC, Shiroishi MS, Law M (November 2012). "Advanced techniques using contrast media in neuroimaging". *Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America*. 20 (4):699-713. doi:10.1016/j.mric.2012.07.007. PMC 3479680 . PMID 23088946.
77. Hurwitz BJ: The diagnosis of multiple sclerosis and the clinical subtypes. *Annals of Indian*
78. Poser CM, Brinar VV (June 2004). "Diagnostic criteria for multiple sclerosis: an historical review". *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 106 (3): 147–58
79. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS (July 2001). "Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the

- International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis". Annals of Neurology. 50 (1): 121–7. doi:10.1002/ana.1032. PMID 11456302**
- 80. Link H, Huang YM (November 2006). "Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness". Journal of Neuroimmunology. 180 (12):1728. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.07.006. PMID 1694 5427**
  - 81. Gronseth GS, Ashman EJ (May 2000). "Practice parameter: the usefulness of evoked potentials in identifying clinically silent lesions in patients with suspected multiple sclerosis (an evidence-based review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology". Neurology. 54 (9): 1720–5. doi:10.1212/WNL.54.9.1720. PMID 10802774.**
  - 82. Swanborg RH: Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. Clin Immunol Immunopathol 1995, 77:4-13**
  - 83. Slavin A, Ewing C, Liu J, Ichikawa M, Slavin J, Bernard CC: Induction of a multiple sclerosislike disease in mice with an immunodominant epitope of myelin oligodendrocyte glycoprotein. Autoimmunity 1998, 28:109-120.**
  - 84. Gijbels K, Engelborghs S, De Deyn PP. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: an animal model for multiple sclerosis. Neurosci Res Com, 2000; 26(3):193-206**
  - 85. Vaughan, K., et al., A molecular view of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalitis: what can we learn from the epitope data? J Neuroimmunol, 2014. 267(1-2): p. 73-85.**
  - 86. Lassmann H, Raine CS, Antel J, Prineas JW, Immunopathology of multiple sclerosis: report on an international meeting held at the Institute of Neurology of the University of Vienna Journal of Neuroimmunology 1998**
  - 87. Lassmann H, Wisniewski HM, Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: clinicopathological comparison with multiple sclerosis, Archives of Neurology 1979**
  - 88. Lassmann H, Comparative neuropathology of chronic experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis, Schriftenreihe neurologie 1983**
  - 89. Kandace K. Fleminga, James A. Bovairda, Michael C. Mosierb, Mitchell R. Emersonb, Steven M. LeVineb, Janet G. Marquis. Statistical analysis of data from studies on experimental autoimmune encephalomyelitis, Journal of Neuroimmunology, Pages 71–84(December 2005)**

90. Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*. 2002;96:678-682.
91. J. Sánchez López, L. Román-Vega, E. Ramil Tojeiro, A. Giuffrida and A. García-Merino Regulation of cannabinoid receptor gene expression and endocannabinoid levels in lymphocyte subsets by interferon- $\beta$ : a longitudinal study in multiple sclerosis patients 2014 British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology, 179: 119–127
92. Ming Zhang, et al. Modulation of Cannabinoid Receptor Activation as a Neuroprotective Strategy for EAE and Stroke. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2009 Jun; 4(2): 249–259.
93. Á Arévalo-Martín, et al. CB2 cannabinoid receptors as an emerging target for demyelinating diseases: from neuroimmune interactions to cell replacement strategies *Br J Pharmacol*. 2008 an; 153(2): 216–225.
94. Katchan V, et al, Cannabinoids and autoimmune diseases: A systematic review, *Autoimmun Rev* (2016) doi.org/10.1016/j.autrev.2016.02.008
95. Angel Arevalo-Martin Eduardo Molina-Holgado Carmen Guaza A CB1/CB2 receptor agonist, WIN 55,212-2, exerts its therapeutic effect in a viral autoimmune model of multiple sclerosis by restoring self-tolerance to myelin doi:10.1016/j.neuropharm.2012.04.012
96. Malan TP Jr, Ibrahim MM, Lai J, Vanderah TW, Makriyannis A, Porreca F (2003) CB2 cannabinoid receptor agonists: pain relief without psychoactive effects? *Curr Opin Pharmacol* 3(1):62–67
97. Andrea Mastinu, Marika Premoli, Giulia Ferrari-Toninelli, Simone Tambaro, Giuseppina Maccarinelli, Maurizio Memo, Sara Anna Bonini Cannabinoids in health and disease: pharmacological potential in metabolic syndrome and neuroinflammation *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 2018; 20180013 DOI: 10.1515
98. Vandrey R, Haney M (2009) Pharmacotherapy for cannabis dependence: how close are we? *CNS Drugs* 23(7):543–553
99. Servettaz A, Kavian N, Nicco C, Deveaux V, Chereau C, Wang A et al Targeting the cannabinoid pathway limits the development of fibrosis and autoimmunity in a mouse model of systemic sclerosis. *Am J Pathol* 177(1):187–196 (2010)



- 100. Zhi-Yin Lou, Wen-Bo Yu, Jie Chen, Lin Li, Li-Sheng Jiang, Bao-Guo Xiao, Zhen-Guo Liu Neuroprotective Effect Is Driven Through the Upregulation of CB1 Receptor in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis**  
**J Mol Neurosci (2016) 58:193–200 DOI 10.1007/s12031-015-0656-9**
- 101. Moises Garcia-Arencibia, Eduardo Molina-Holgado, Francisco Molina-Holgado**  
**Effect of endocannabinoid signaling of cell fate: life, death, differentiation and proliferation of brain cells. doi: 10.1111/bph.14369**
- 102. Maresz K, Pryce G, Ponomarev ED, Marsicano G, Croxford JL, Shriver LP, Ledent C, Cheng X, Carrier EJ, Mann MK, Giovannoni G, Pertwee RG, Yamamura T, Buckley NE, Hillard CJ, Lutz B, Baker D, Dittel BN., Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB1R on neurons and CB2R on autoreactive T cells, Nature Medicine 2007**