



**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**  
**Σχολή επιστημών υγείας**  
**Τμήμα βιοχημείας και βιοτεχνολογίας**

**Διπλωματική Εργασία**

**Θέμα: Ανοσοτροποποιητικός ρόλος της κανναβιδιόλης σε ασθενείς με χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα : μια μελέτη in vitro**

**Κωνσταντίνα Αποστολοπούλου**

**Λάρισα, Σεπτέμβριος 2022**



**University of Thessaly**

**School of Health Science**

**Faculty of Biochemistry and Biotechnology**

**Immunomodulatory effect of cannabidiol in patients  
with chronic inflammatory disorders: an in vitro study**

By

Konstantina Apostolopoulou

Larisa, September 2022

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ,ΣΕΥ.
- Μαμούρης Ζήσης, Πρύτανης Π.Θ.-Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, ΠΘ, ΣΕΥ
- Δαρδιώτης Ευθύμιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ, ΣΕΥ

Three partite committee:

- Bogdanos Dimitrios, Professor of Pathology and Autoimmune Disease
- Mamouris Zisis, Rector of University of Thessaly-Professor of Animal Population Genetics
- Dardiotis Efthimios, Associate Professor of Neurology

Κωνσταντίνα Αποστολοπούλου

του Κωνσταντίνου

Λάρισα 2022

## Περίληψη

Η ψωρίαση είναι μια χρόνια αυτοάνοση φλεγμονώδης νόσος του δέρματος που εμφανίζεται στο 2-3% του πληθυσμού σε παγκόσμιο επίπεδο. Τα κλινικά χαρακτηριστικά της είναι οι δερματικές βλάβες, λόγω του υπερπολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων και της ανεξέλεγκτης ενεργοποίησης και διήθησης των κυττάρων του ανοσοποιητικού στο σημείο της βλάβης. Οι κύριοι πληθυσμοί κυττάρων που έχουν απορρυθμιστεί και συμβάλλουν στην παθογένεια της νόσου είναι τα δενδριτικά κύτταρα, τα T λεμφοκύτταρα και τα NK κύτταρα. Οι σημαντικότερες προφλεγμονώδης κυτταροκίνες που πυροδοτούν την φλεγμονή της νόσου είναι οι IL-17, IL-22, L-23, IFN- $\gamma$  και TNF- $\alpha$ . Έτσι στην παρούσα μελέτη στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας, μελετήθηκε η επίδραση της κανναβιδιόλης *in vitro* σε PBMCs ασθενών με ψωρίαση και υγιών ατόμων ως προς την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-17A και IFN- $\gamma$ . Η κανναβιδιόλη είναι ένα φυτοκανναβινοειδές μόριο χωρίς ψυχοτρόπο δράση, που προέρχεται από το φυτό *Cannabis sativa* L. και χρησιμοποιείται ευρέως σε διάφορες παθήσεις λόγω των ποικίλων ιδιοτήτων του, όπως οι νευροπροστατευτικές, αντικαρκινικές, αγχολυτικές, αντισπασμωδικές, αντιοξειδωτικές και ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες. Για την διεκπεραίωση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν PBMCs από 29 ασθενής με ψωρίαση και 9 υγιών ατόμων, τα οποία επώαστηκαν με κανναβιδιόλη. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά για την βιολογική δράση που ασκεί η ουσία αυτή, καθώς φάνηκε να μειώνει την παραγωγή της IL-17A από τα T κύτταρα των ασθενών με ψωρίαση, ωστόσο δεν προκάλεσε εξίσου μείωση στα επίπεδα παραγωγής της IFN- $\gamma$  από τους κυτταρικούς πληθυσμούς που μελετήθηκαν

## **Abstract**

Psoriasis is a chronic autoimmunity and inflammatory skin disease which affects about 2 to 3 % of the population worldwide. The clinical features are skin damages due to proliferation of keratinocytes and uncontrollable activation and infiltration of immunity cells on the damaged spot. The main cell populations which have been decomposed and contribute to the pathogenesis of the disease are dendritic cells T Lymphocytes and NK cells. The main proinflammatory cytokines which activate the inflammation of the disease are IL-17, IL-22, L-23, IFN- $\gamma$  and TNF-a. So, in the present study of the bachelor's thesis the effect of cannabidiol in vitro was studied among PBMCs patients versus healthy humans as to the production of proinflammatory cytokines IL-17A and IFN- $\gamma$ . Cannabidiol is a phytocannabinoid molecule without psychotropic action which originates from the cannabis sativa L. plant and is widely used in various diseases due to its multiple uses as neuroprotective, anticancer, anti-anxiety, anticonvulsant, antioxidant, and immunomodulatory. For the experiment arrangement PBMCs of 29 Psoriasis patients and 9 healthy people were used and were incubated with cannabidiol. The research results were encouraging for the biological action of this substance as it seems to decrease the production of IL-17a of Psoriasis sufferers' cells. It also didn't provoke reduction in the production levels of IFN- $\gamma$  from the studied cell population.

## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	
1.1. Γενικά στοιχεία και κλινικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης.....	7
1.2. Επιδημιολογικά δεδομένα.....	9
1.3. Παθογένεια.....	11
1.4. Κυτταρικοί πληθυσμοί.....	12
1.4.1. Th1.....	13
1.4.2. Th17.....	14
1.4.3. Κυτταρικοί τύποι που παράγουν IFN-γ.....	14
1.4.4. Κυτταρικοί τύποι που παράγουν IL-17.....	15
1.4.5. NK και NKT κύτταρα.....	16
1.4.6. Άλλοι συμμετέχοντες κυτταρικοί πληθυσμοί.....	17
1.5. Γενετικοί παράγοντες.....	19
1.6. Άλλοι παράγοντες.....	20
1.7. Συννοσηρότητα.....	22
1.8. Διάγνωση και Θεραπεία.....	23
1.9. Κανναβιδιόλη (CBD).....	25
1.9.1. Ενδοκανναβινοειδές σύστημα.....	27
1.9.2. Μηχανισμοί δράσης- ιδιότητες.....	29
1.9.3. Ανοσορυθμιστική δράση.....	32
1.9.4. CBD και Ψωρίαση.....	33
2. Σκοπός.....	34
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	35
3.1. Απομόνωση PBMCs.....	35
3.2. Κυτταροκαλλιέργειες PBMCs.....	37
3.3. Επώαση των κυττάρων με μονοκλωνικά αντισώματα για την κυτταρομετρία ροής.....	39
4. Αποτελέσματα.....	42
5. Συζήτηση.....	50
6. Βιβλιογραφία.....	52

## Συντομογραφίες

CBD → κανναβιδιόλη

IL → ιντερλευκίνη

PBMCs → μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cell)

IFN- $\gamma$  → ιντερλευκίνη  $\gamma$

NK → natural killer cells

NKT → natural killer T cells

Th → T helper cells

ECS → endocannabinoid system

ECs → endocannabinoids

Treg → T regulatory cells

NF- $\kappa$ B → Nuclear factor- $\kappa$ B

TNF- $\alpha$  → tumor necrosis factor alpha

Tc → Cytotoxic T cells

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Γενικά στοιχεία και κλινικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης

Η ψωρίαση αποτελεί μια χρόνια φλεγμονώδη νόσο του δέρματος προσβάλλει το 2-3% του γενικού πληθυσμού σε παγκόσμιο επίπεδο. Θεωρείται αυτοάνοσο νόσημα, καθώς χαρακτηρίζεται από μια σειρά δυσρυθμιζόμενων ανοσολογικών απαντήσεων, ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, άρα και μικρό κύκλο ζωής αυτών, καθώς και διήθηση κυττάρων του ανοσοποιητικού οδηγώντας σε φλεγμονή της δερμίδας και της επιδερμίδας. Χαρακτηριστικό της κλινικής εικόνας της νόσου είναι ο σχηματισμός ερυθρηματωδών πλακών που ανάλογα τον τύπο ψωρίασης μπορεί να είναι πιο λεπτές ή πιο παχιές στιβάδες, λείες ή αδρές επιφάνειες. Η εμφάνιση αυτών των πλακών μπορεί να βρίσκεται σε οποιοδήποτε μέρος του σώματος και συνήθως ο εντοπισμός τους είναι χαρακτηριστικός για κάθε διαφορετικό υπότυπο. Η συχνότητα εμφάνισης δεν διαφέρει μεταξύ ανδρών και γυναικών. Βάση της ηλικίας εμφάνισης χωρίζεται σε δύο κατηγορίες, τον τύπο I που αφορά έναρξη της παθογένειας πριν την ηλικία των 40 ετών με υψηλότερη συχνότητα στις ηλικίες 16-22 και τον τύπου II με εμφάνιση της παθογένειας μετά την ηλικία των 40 ετών με την μέγιστη συχνότητα σε 57-60 ετών. Η νόσος παρουσιάζει έντονη γενετική προδιάθεση και η έναρξη των συμπτωμάτων μπορεί να πυροδοτηθεί από μια σειρά εξωγενών και ενδογενών παραγόντων (Queiro et al., 2014). Τέλος η ψωρίαση δύναται να εμφανίσει συννοσηρότητα επιδεινώνοντας την υγεία του ασθενή. Όπως προαναφέρθηκε η ψωρίαση χωρίζεται σε ορισμένους τύπους σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά των δερματικών βλαβών και αυτοί είναι οι εξής:

### **Ψωρίαση κατά πλάκας ή ψωρίαση vulgaris**

Είναι ο πιο συνηθισμένος τύπος ψωρίασης και εμφανίζεται στο 80-90% των ατόμων που πάσχουν από ψωρίαση. Οι δερματικές βλάβες που προκαλεί είναι ο σχηματισμός ωοειδών-κυκλικών πλακών με ερυθρηματώδη βάση και πάνω από αυτή σχηματίζονται φολίδες (θραύσματα νεκρού δέρματος), λόγω του υπερπολλαπλασιασμού των επιδερμικών κυττάρων. Οι πλάκες αυτές εντοπίζονται συνήθως στο κορμό, τους αγκώνες, τα γόνατα και το τριχωτό της κεφαλής, καλύπτοντας μεγάλες περιοχές και προκαλώντας έντονο αίσθημα κνησμού. Οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν οξείες εξάρσεις και υποτροπές



της νόσου, οι οποίες μπορεί να γίνουν σοβαρές και να εξελιχθούν στον φλυκταινώδη υπότυπο (Badri et al., 2022).

### **Φλυκταινώδης ψωρίαση**

Αποτελεί σπάνιο τύπο ψωρίασης, θεωρείται παραλλαγή της ψωρίασης vulgaris και χαρακτηρίζεται από φλύκταινες, κάτω από τις οποίες το δέρμα έχει ερυθματώδη μορφή. Εμφανίζει ποικίλες κλινικές παρουσιάσεις και πρότυπα κατανομής βάση των οποίων χωρίζεται σε δύο κατηγορίες. Η μια κατηγορία είναι η φλυκταινώδης γενικευμένη ψωρίαση όπου οι φλύκταινες δεν εντοπίζονται σε συγκεκριμένο σημείο στο σώμα και μαζί με αυτές άλλοτε εμφανίζονται συστηματικά συμπτώματα και άλλες φορές όχι. Η άλλη κατηγορία είναι η τοπική φλυκταινώδης ψωρίαση και τις φλύκταινες να εμφανίζονται στις άκρες των δακτύλων και τα νύχια ή στις παλάμες και τα πέλματα (Shah et al., 2022).

### **Σταγονοειδής ψωρίαση**

Είναι η δεύτερη πιο συχνή μορφή ψωρίασης, προσβάλλοντας πιο συχνά παιδιά και νεαρούς ενήλικες. Μπορεί να εμφανιστεί από μόνη της ως οξεία σταγονοειδής ψωρίαση ή σε συνδυασμό με μια περιορισμένη χρόνια ψωρίαση κατά πλάκας. Οι δερματικές βλάβες που προκαλεί η σταγονοειδής ψωρίαση είναι μικρά σε μέγεθος σημάδια σαν κηλίδες-σταγόνες ερυθρού χρώματος και φολιδωτής μορφής που εκτείνονται στα χέρια, πόδια, κορμό και δέρμα της κεφαλής. Η έξαρση των συμπτωμάτων συνδέεται στενά με προηγούμενη ή ταυτόχρονη λοίμωξη από στρεπτόκοκκο. Χωρίς λήψη θεραπείας μπορεί τα συμπτώματα να υποχωρήσουν από μόνα τους ή να εξελιχθεί σε χρόνια ψωρίαση κατά πλάκας (Chalmers et al., 2019).

### **Ανάστροφη ψωρίαση ή ψωρίαση των πτυχώσεων**

Αποτελεί επίσης σπάνιο τύπο ψωρίασης, δύσκολο να διαγνωστεί καθώς μοιάζει με άλλες δερματολογικές διαταραχές όπως μυκητιάσεις, βακτηριακές λοιμώξεις. Χαρακτηρίζεται από ερυθματώδη «πλάκες» που εντοπίζονται κυρίως στην βουβωνική περιοχή, στις μασχάλες, κάτω από το στήθος και οι επιφάνειες με τις βλάβες είναι λείες, χωρίς να φέρουν φολίδες (Micali et al., 2019).

Ένας ακόμα πιο σπάνιος υπότυπος της νόσου είναι η **ερυθροδερμική ψωρίαση** με ποσοστό εμφάνισης 1-2% των ασθενών με ψωρίαση και μπορεί να εμφανιστεί από οποιοδήποτε τύπο ψωρίασης. Πρόκειται για μια οξεία κατάσταση όπου πάνω από το 90% του σώματος έχει ερυθματώδη μορφή, παρουσιάζοντας φλεγμονή και χρήζει άμεσης αντιμετώπισης με κατάλληλη θεραπεία. Είναι πιθανό να συνοδεύεται και με άλλα συστημικά συμπτώματα όπως πυρετός έντονη εφίδρωση, αφυδάτωση, ταχυκαρδία, κόπωση και μυαλγία (Singh et al., 2016).



**Εικόνα 1** Μορφές δερματικών βλαβών στους διαφορετικούς τύπους ψωρίασης. Πηγή: <https://www.pixtastock.com/illustration/56919362>.

## 1.2. Επιδημιολογικά δεδομένα

Τα επιδημιολογικά δεδομένα για τον επιπολασμό της ψωρίασης στο παγκόσμιο πληθυσμό είναι 2-3%, ενώ σε χώρες της βόρειας Ευρώπης φτάνει το 8-11%. Τα ποσοστά επιπολασμού στους ενήλικες να κυμαίνονται από 0,91-8,5% και στα παιδιά από 0-2,1%. Ο επιπολασμός της νόσου φαίνεται να είναι αντίστοιχος μεταξύ ανδρών και γυναικών. Η ηλικία εμφάνισης της νόσου φαίνεται να διαφέρει μεταξύ χωρών, ενώ αν και βασίζεται στην αναπτυξιακή

κατάστασής τους, ένας γενικός μέσος όρος ηλικίας αναφέρονται τα 58 έτη. Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου σε παιδιά φάνηκε να αυξάνεται με την ηλικία, αφού η εμφάνιση της σε παιδιά ηλικίας 0-3 ετών είναι περίπου στο ποσοστό 13,5 ανά 100.000 άτομα ανά έτος ενώ στις ηλικίες 14-18 ετών το ποσοστό φτάνει τα 53,1 ανά 100.00 άτομα ανά έτος. Όσο αφορά τον επιπολασμό γενικότερα είναι μικρός με τα ποσοστά να κυμαίνονται 0% στην Κίνα και Σουηδία έως 0,55% στο Ηνωμένο Βασίλειο. Από την συγκέντρωση των αποτελεσμάτων ερευνών που αφορούσαν δεδομένα από το Ηνωμένο Βασίλειο και τις ΗΠΑ, προκύπτει πως παρατηρείται αύξηση συχνότητας εμφάνισης της ψωρίασης όσο αυξάνεται η ηλικία μέχρι τα 39 έτη. Στα 40-49 έτη παύει να παρατηρείται αυτό, ενώ αυτή η διακύμανση ξανά εμφανίζεται στις ηλικίες των 50-59 έτη (Ηνωμένο Βασίλειο) ή 60-69 έτη (ΗΠΑ). Σε πολύ μεγαλύτερες ηλικίες υπάρχει μείωση της συχνότητας εμφάνισης της νόσου. Όσο αφορά την συσχέτιση έναρξης της νόσου με την ηλικία και το φύλο, στις γυναίκες ήταν η ηλικίες έναρξης 18-29 και 50-59, ενώ στους άνδρες τα 30-39 και 60-69 ή 70-79 (Iskandar et al., 2021). Λαμβάνοντας υπόψιν τον συνολικό πληθυσμό η εμφάνιση της νόσου παρουσίασε διακύμανση από 0,11% στην ανατολική Ασία έως 1,58% στην Αυστραλία και 1,52% στην δυτική Ευρώπη. Εστιάζοντας πιο ειδικά σε χώρες, αυτές που παρουσίασαν τον υψηλότερο επιπολασμό είναι η Αυστραλία με ποσοστό 1,88%, η Σουηδία με 1,86%, το Ισραήλ με 1,81% και η Δανία με 1,79%, ενώ η χώρα με το χαμηλότερο ποσοστό επιπολασμού σε παγκόσμιο επίπεδο να είναι η Ταϊβάν με ποσοστό 0,05%. Για την διακύμανση του επιπολασμού της ψωρίασης με την πάροδο του χρόνου, το διάστημα 1970-1999 σε δεδομένα από τις ΗΠΑ το ποσοστό αυξήθηκε από 78.9 σε 100.5 ανά 100.000 άτομα ανά έτος (Parisi et al., 2020). Από το 2000 και μέχρι το 2015 έρευνες που έγιναν με πληθυσμούς από τον Καναδά, την Ιταλία και το Ταϊβάν έδειξαν μείωση στον επιπολασμό. Σε παγκόσμιο επίπεδο από το 1999-2019 εκτιμάται μια μείωση του επιπολασμού κατά 20%. Για το ίδιο χρονικό διάστημα η μείωση του επιπολασμού στην Ελλάδα είναι κατά 7%. Συσχετίζοντας τον επιπολασμό με το οικονομικό εισόδημα, χώρες με υψηλότερο οικονομικό εισόδημα που ανήκουν στις γεωγραφικές περιοχές: Βόρεια Αμερική, Δυτική Ευρώπη, Αυστραλία και Νότια Λατινική Αμερική παρουσίασαν υψηλότερο επιπολασμό σε σύγκριση με αυτές που έχουν χαμηλότερο οικονομικό εισόδημα (Icen et al., 2009) (Damiani et al., 2021) (Parisi et al., 2013).

Τα επιδημιολογικά αποτελέσματα είναι περιορισμένα, διότι έχουν προκύψει κυρίως από μελέτες που έχουν γίνει στην Βόρεια Αμερική και Ευρώπη. Επομένως χρειάζονται να γίνουν περαιτέρω μελέτες σε περισσότερες γεωγραφικές περιοχές για την καλύτερη εκτίμηση του επιπολασμού σε παγκόσμιο επίπεδο.

### 1.3. Παθogenεία

Η ψωρίαση ενώ αρχικά θεωρήθηκε μια δερματική νόσος που προκαλείται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και δυσλειτουργική διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, πλέον έχει αποδειχτεί πως για τις διαταραχές που την χαρακτηρίζουν, κύριο ρόλο παίζει η συμμετοχή του ανοσοποιητικού. Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια (AMPs), τα δενδριτικά κύτταρα (DCs), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), οι ιντερλευκίνες 17, 22 και 23 (IL-17, IL-22, IL-23), τα T βοηθητικά λεμφοκύτταρα 17 (Th-17), ο μεταγραφικός παράγοντας STAT-3, τα T κύτταρα μνήμης των ιστών (TRMs) αποτελούν στοιχεία του ανοσοποιητικού και συμβάλλουν στην παθogenεία της νόσου. Τα στάδια που εξελίσσεται η παθogenεία είναι τα εξής, αρχικά γίνεται ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων (DCs), που είναι αντιγονοπαραουσιαστικά κύτταρα και άλλων κυττάρων φυσικής ανοσίας, η οποία έχει πυροδοτηθεί από κάποιο αντιγονικό ερέθισμα στο δέρμα, όπως για παράδειγμα ένα τραύμα, μια ιογενής λοίμωξη. Οι υποπληθυσμοί των δενδριτικών που συμμετέχουν στην παθogenεία της νόσου είναι τρεις τα Langerhans (LCs), τα πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά (pDCs) και τα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα (mDCs). Η ενεργοποίηση των LCs στην επιδερμίδα και η παραγωγή κυτοκινών από αυτά, οδηγεί σε ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων σε T βοηθητικά-17 και -22 (Th-17, Th-22) κυττάρων. Τα pDCs μόλις ενεργοποιηθούν παράγουν και αυτά κυτταροκίνες με την πιο σημαντική για την έναρξη της φλεγμονής στην ψωρίαση να είναι η ιντερφερόνη  $\alpha$  (INF- $\alpha$ ), η οποία οδηγεί σε στρατολόγηση και ενεργοποίηση μυελοειδών δενδριτικών κυττάρων (mDCs) στο δέρμα. Επίσης τα pDCs χαρακτηρίζονται και από υψηλή έκφραση υποδοχέων Toll-like 7 και 9 (TLR-7, TLR-9), οι οποίοι μόλις αναγνωρίσουν μικροβιακό RNA (π.χ. LL-37), μη μεθυλιωμένο CpG- DNA, DNA και RNA που απελευθερώνονται από τους ψωριασικούς ιστούς επάγουν μονοπάτια σηματοδότησης για παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών. Τα pDCs παίζουν κυρίως ρόλο στην έναρξη της ψωρίασης σε αντίθεση με τα mDCs που κύριος ρόλος τους είναι η διατήρηση της ανάπτυξης της ψωρίασης. Η φλεγμονή που προκαλείται από την ψωρίαση προσελκύει mDCs στο σημείο της βλάβης όπου θα παράγουν κυτταροκίνες, όπως τις ιντερλευκίνες-6,-12,-20,-23 (IL-6, IL-12, IL-20, IL-23), τον TNF- $\alpha$ , την INF- $\gamma$ , οι οποίες ευθύνονται για την προσέλκυση, διαφοροποίηση και ενεργοποίηση των Th λεμφοκυττάρων στους διάφορους υποπληθυσμούς όπως Th-1 (παράγει κυρίως INF- $\gamma$ ), Th-22 και Th-17. Με την σειρά τους τα Th-17 παράγουν κυτταροκίνες με σημαντικότερη την ιντερλευκίνη 17A (IL-17A) με αποτέλεσμα την διέγερση του

πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων και την παραγωγή προφλεγμονωδών AMPs και χημειοκινών, οι οποίες θα ενεργοποιήσουν τα δενδριτικά κύτταρα δημιουργώντας βρόχο θετικής ανάδρασης διατηρώντας έτσι την φλεγμονή σε εξέλιξη (Hu et al., 2021). Την φλεγμονή, επιπλέον την ενισχύουν τα μακροφάγα, πιο συγκεκριμένα η επιστράτευση και διήθηση των μακροφάγων που βρίσκονται στην κυκλοφορία στο δέρμα και η πόλωση τους στην μορφή M1, που προωθείται από την INF- $\gamma$  και την αλληλεπίδραση των TLR-7 και TLR-9 με self-RNA και self-DNA που απελευθερώνονται στα σημεία που έχουν προκληθεί βλάβες από την ψωρίαση. Αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των M1 είναι η παραγωγή και έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12 και INFs τύπου I (Branisteanu et al., 2022; Cai et al., 2012; Tseng et al., 2021; Zhou et al., 2022).

Τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην φλεγμονή της ψωρίασης είναι οι ενεργοποιημένοι μεταγραφικοί παράγοντες NF- $\kappa$ B και STAT-3 και οι ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK κινασών. Η ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών επάγει την έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων και άλλων που επάγουν κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Xu et al., 2019).

#### **1.4. Κυτταρικοί πληθυσμοί**

Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1970 η ψωρίαση θεωρούνταν μια ασθένεια που οφείλεται κυρίως στην δυσλειτουργία των επιδερμικών κερατινοκυττάρων. Ωστόσο μελέτες των τελευταίων δεκαετιών έχουν αποδείξει πως στην ανάπτυξη της ψωρίασης συμβάλλει τόσο η φυσική όσο και η επίκτητη ανοσία. Όπως προαναφέρθηκε σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ψωρίασης παίζουν τα T βοηθητικά κύτταρα, τα οποία διεγείρονται όταν ένα ερέθισμα ενεργοποιήσει τα αντιγονοπαρουσιαστικά και παράξουν προφλεγμονώδη κυτταροκίνες και αυτές θα καθορίσουν την πορεία διαφοροποίησης των αδιαφοροποίητων T βοηθητικών προς τους διαφορετικούς υποπληθυσμούς. Αρχικά σε δείγματα από περιοχές επιδερμικών βλαβών και περιφερικού αίματος από ασθενείς με ψωρίαση εντοπίστηκαν κυτοκίνες τύπου I (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2), και γι' αυτό θεωρήθηκε Th1 μεσολαβούμενη νόσος. Ωστόσο, η χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των IFN- $\gamma$  και TNF- $\alpha$  φάνηκε να μην βελτιώνει τα συμπτώματα της ψωρίασης γεγονός που ανέτρεψε αυτή την υπόθεση. Μετέπειτα μελέτες έδειξαν πως σημαντικότερο ρόλο στην παθογένεια της

ψωρίασης έχει ο υποπληθυσμός Th17 και η κυτταροκίνες που παράγονται από αυτόν. Τα υψηλά επίπεδα της IL-23, που παράγονται από ενεργοποιημένα μακροφάγα και DCs, στους ψωριασικούς ασθενείς σχετίζονται με την υπερενεργοποίηση του Th17 πληθυσμού (Cai et al., 2012; Hu et al., 2021).

### 1.4.1. Th1

Αφού παρουσιαστεί το αντιγόνο στα αδιαφοροποίητα CD4 T κύτταρα (T naïve) μέσω αλληλεπίδρασης του TCR, του CD4 και του συμπλόκου αντιγόνου-MHC II των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APCs) θα ενεργοποιηθούν και ανάλογα το μικροπεριβάλλον κυτοκινών στο οποίο είναι εκτεθειμένα θα διαφοροποιηθούν στους διαφορετικούς υποπληθυσμούς, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από διαφορετικούς επιφανειακούς δείκτες, μεταγραφικούς παράγοντες, επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες και εκκρίνουν διαφορετικές κυτταροκίνες. Αυτοί είναι οι Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Treg ( T ρυθμιστικά) και Tfh (T follicular helper) και μια ακόμα κατηγορία τα NKT. Αντίστοιχα με τα T βοηθητικά υπάρχουν και οι διάφοροι υποπληθυσμοί T κυτταροτοξικών κύτταρων, που είναι τα Tc1, Tc2, Tc9 και Tc17. Η διαδικασία διαφοροποίησης είναι αντίστοιχη με αυτή των T βοηθητικών, το μόνο που αλλάζει είναι πως το αντιγόνο που παρουσιάζεται βρίσκεται σε σύμπλοκο με το MHC I στο αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο (Hu et al., 2021).

Για την διαφοροποίηση των CD4 στον Th1 υποπληθυσμό κρίσιμο ρόλο παίζουν οι κυτταροκίνες ιντερλευκίνη 12 (IL-12) και IFN- $\gamma$ . Η IL-12 εκκρίνεται κυρίως από τα ενεργοποιημένα APCs και αυτή με την σειρά της θα διεγείρει τα NK (natural killer cells) να παράξουν και να εκκρίνουν IFN- $\gamma$ . Ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας που ευθύνεται για την έκφραση γονιδίων χαρακτηριστικών και απαραίτητων για την διαφοροποίηση σε Th1 υποπληθυσμό, αλλά και την καταστολή γονιδίων που θα έδιναν χαρακτήρα Th2 και Th17, είναι ο T-bet. Επίσης, αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας ενισχύει την παραγωγή της IFN- $\gamma$ . Οι κυτταροκίνες που παράγουν τα Th1 κυρίως είναι οι IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  και IL-2. Στην ψωρίαση έχει εντοπιστεί αυτός ο υποπληθυσμός στις περιοχές των δερματικών βλαβών και στο περιφερικό αίμα των ασθενών. Επιπλέον η IFN- $\gamma$  σε *in vitro* δοκιμές φαίνεται να ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων. Από την άλλη ένας από τους ρόλους του TNF- $\alpha$  είναι η ενίσχυση της παραγωγής της IL-23 από τα cDCs, άρα και τον πολλαπλασιασμό των Th17, ενός ακόμα σημαντικού πληθυσμού T

βοηθητικών κυττάρων που θα αναφερθεί στην συνέχεια (Cai et al., 2012; Kagami et al., 2010; Luckheeram et al., 2012; Nussbaum et al., 2021).

### **1.4.2. Th17**

Οι βασικές κυτοκίνες που σχετίζονται με την διαφοροποίηση του Th17 πληθυσμού είναι κυρίως οι IL-6, IL-21, IL-23 και TGF-β και βασικός ρυθμιστής της διαδικασίας ο μεταγραφικός παράγοντας RORγt (retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma). Αρχικά η διαφοροποίηση ξεκινά με την δράση των TGF-β και της IL-6 που θα οδηγήσουν στην παραγωγή της IL-21 και του RORγt, ο οποίος με τη σειρά του επάγει την παραγωγή των IL-17A και IL-17F. Σαφώς στην διαδικασία διαφοροποίησης των Th17 συμμετέχουν και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο STAT3 που ενεργοποιείται μέσω της σηματοδότησης από της IL-6, IL-21 και IL-23. Η IL-23, που παράγεται κυρίως από τα APCs, δεν παίζει τόσο ρόλο στην διαφοροποίηση, αλλά ευθύνεται για τον πολλαπλασιασμό και την διατήρηση του Th17 πληθυσμού. Οι κυτταροκίνες που παράγονται και απελευθερώνονται από αυτόν τον υποπληθυσμό είναι οι IL-17A, IL-17F, IL-21 και IL-22.

Η συμμετοχή της IL-23 έχει σημειωθεί για την επαγωγή και διατήρηση χρόνιων φλεγμονωδών νόσων, καθώς σε δερματικά δείγματα ασθενών με ψωρίαση σε σύγκριση με υγιείς έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφρασή της. Όπως προαναφέρθηκε αυτή η κυτταροκίνη είναι βασική στην διαφοροποίηση των Th17. Έτσι έπειτα του εντοπισμού και άλλων χαρακτηριστικών κυτοκινών αυτού του πληθυσμού και κυρίως της IL-17 σε δείγματα δερματικών βλαβών όσο και περαιτέρω μελετών που έγιναν, φάνηκε τα Th17 να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ψωρίασης. Η IL-17 που παράγεται δρα στα κερατινοκύτταρα προωθώντας τον υπερπολλαπλασιασμό τους, την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών, χημειοκινών, αντιμικροβιακών πεπτιδίων από αυτά, διατηρώντας έτσι τη φλεγμονή στην περιοχή της βλάβης, δημιουργώντας λούπα θετικής ανατροφοδότησης της φλεγμονής και περαιτέρω ψωριασικές αλλοιώσεις. Επομένως, δεδομένου του ρόλου των Th17 στην φλεγμονή και των μελετών που εντόπισαν αυτόν τον πληθυσμό σε ψωριασικούς ασθενείς, αποδεικνύεται πως στην παθογένεια της ψωρίασης δεν συμμετέχουν μόνο τα Th1, όπως γίνονταν οι αρχικές υποθέσεις, αλλά εξίσου σημαντική είναι η συμμετοχή των Th17 (Cai et al., 2012; Kagami et al., 2010; Luckheeram et al., 2012; Nussbaum et al., 2021).

### **1.4.3. Κυτταρικοί τύποι που παράγουν IFN-γ**

Η IFN- $\gamma$  είναι μια κυτταροκίνη που παράγεται όχι μόνο από τα Th1 κύτταρα, αλλά και από άλλους πληθυσμούς κυττάρων του ανοσοποιητικού που συμμετέχουν και στην παθολογία της ψωρίασης. Αυτοί είναι τα NK, τα NKT (natural killer T) τα οποία θα αναφερθούν στην συνέχεια, τα Tc1 που αποτελούν υποπληθυσμό των CD8, τα APCs και τα B λεμφοκύτταρα. Είναι μια κυτοκίνη που ανήκει στην οικογένεια των ιντερφερονών τύπου II και σηματοδοτεί μέσω δέσμησης στον υποδοχέα της IFN- $\gamma$ R, ο οποίος εκφράζεται στους περισσότερους τύπους κυττάρων. Η IFN- $\gamma$  εκτός από το γεγονός ότι προωθεί τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων, έχει την ικανότητα να επάγει την πόλωση των μακροφάγων στην εργοποιημένη M1 μορφή με αυξημένη ικανότητα φαγοκυττάρωσης και οδηγώντας στην ισχυρή παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών. Στην ψωρίαση η διήθηση των μακροφάγων είναι χαρακτηριστική στην περιοχή των δερματικών βλαβών. Επιπλέον η IFN- $\gamma$  μπορεί να διεγείρει τα APCs να παράγουν CCL20 μια χημειοκίνη υπεύθυνη για την μετανάστευση των IL-17+ T κύτταρα (Ivashkin, 2018; Mittrücker et al., 2014).

#### **1.4.4. Κυτταρικοί τύποι που παράγουν IL-17**

Η IL-17 αποτελεί μια σημαντική κυτταροκίνη για την παθολογία της ψωρίασης, κι όπως ήδη έχει ειπωθεί παράγεται από την κυρίαρχη οδό παθολογίας της ψωρίασης IL-23/Th17. Η οικογένεια των κυτοκινών IL-17 περιλαμβάνει τις IL-17A έως IL-17F, με κεντρικό τους ρόλο στη αντιμυκητιασική άμυνα και βασικό ρόλο στην παθολογία φλεγμονωδών νόσων, συμπεριλαμβανόμενης της ψωρίασης. Οι υπομονάδες των υποδοχέων τους είναι οι IL-17R A-E. Όταν η IL-17 συνδεθεί στον υποδοχέα της ενεργοποιεί την Akt κινάση ενεργοποιώντας το σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποίησης του NF- $\kappa$ B και του μονοπατιού ERK. Σε απόκριση στην σηματοδότηση της IL-17, τα κερατινοκύτταρα παράγουν αντιμικροβιακά πεπτίδια και χημειοκίνες, τα οποία μαζί προκαλούν τοπική φλεγμονή και εισροή ουδετερόφιλων, προκαλώντας τις δερματικές βλάβες. Τα σηματοδοτικά μόρια που παράγονται από τα ενεργοποιημένα κερατινοκύτταρα προάγουν θετικό βρόχο ανάδρασης πυροδοτώντας περαιτέρω την φλεγμονή. Τον κυριότερο ρόλο στην αυτοανοσία τον έχει η IL-17A, η οποία έχει αποδειχτεί πως συμβάλλει στον υπερπολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων. Η IL-17A εμφανίζεται σε δυο μορφές, με τι μια να είναι ως ομοδιμερές IL-17A και έχει την πιο ισχυρή βιολογική δράση και ως ετεροδιμερές IL-17A/IL-17F. Ωστόσο στην ψωρίαση εξίσου σημαντικό ρόλο παίζει και η IL-17F. Εκτός από τα Th17, παράγουν IL-17 επίσης τα Tc17 που



είναι CD8 κύτταρα, τα γδ T κύτταρα, τα NKT, τα NK, τα ουδετερόφιλα και τα μαστοκύτταρα (Mittrücker et al., 2014; Mosca et al., 2021; Prinz et al., 2020).

#### **1.4.5. NK και NKT κύτταρα**

Τα natural killer (NK) είναι κύτταρα της φυσική ανοσίας που ελέγχουν διάφορους τύπους όγκων και μικροβιακών λοιμώξεων περιορίζοντας την εξάπλωσή τους και την επακόλουθη βλάβη των ιστών. Αποτελούν ξεχωριστή γενεαλογία λεμφοκυττάρων (μεγάλα κοκκιώδη) έχοντας κυτταροτοξική δράση και ικανότητα έκκρισης κυτταροκινών. Στην επιφάνεια τους έχουν υποδοχείς που αναγνωρίζουν μοτίβα, τα οποία δηλώνουν μόλυνση από ιό και βλάβη από στρες, επιτρέποντάς τους να ασκήσουν την κυτταροτοξική τους δράση. Παράδειγμα τέτοιων υποδοχέων που εκφράζουν είναι οι TLR. Στον άνθρωπο τα NK χωρίζονται σε δυο υποσύνολα, τα οποία είναι τα CD56<sup>dim</sup> και τα CD56<sup>bright</sup>. Περίπου το 90% των NK στο αίμα και τον σπλήνα είναι το υποσύνολο CD56<sup>dim</sup>, ενώ στους λεμφαδένες η πλειοψηφία είναι CD56<sup>bright</sup>. Τα NK επίσης φέρουν τους ανασταλτικούς υποδοχείς KIRs (killer cell immunoglobulin-like receptors) και αλληλεπιδρώντας με μόρια MHC I που εκφράζονται σε σχεδόν όλα τα υγιή κύτταρα, οι οποίοι μπορεί να χαθούν σε καταστάσεις στρες, εξασφαλίζει την αναγνώριση των εαυτών κυττάρων και παράλληλα επιτρέπεται η λύση μέσω της κυτταροτοξικής δράσης των NK στα καταπονημένα κύτταρα. Η ένταση των κυτταροτοξικών αποκρίσεων και των κυτοκινών που θα παράξουν τα NK εξαρτάται από το μικροπεριβάλλον κυτταροκινών στο οποίο βρίσκονται και τις αλληλεπιδράσεις με άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Κάποιες από τις κυτταροκίνες που συμβάλλουν στην ενεργοποίησή τους είναι οι IFN, IL-12, IL-18 και IL-15. Τα NK αποτελούν έναν από τους πληθυσμούς κυττάρων που διηθούνται στις φλεγμονώδεις ψωριασικές δερματικές αλλοιώσεις και μάλιστα φαίνεται να συμμετέχουν και οι δύο υποπληθυσμοί. Τα κερατινοκύτταρα στις περιοχές με ψωριασικές βλάβες εκκρίνουν χημειοκίνες CXCL10, CCL5 και CCL20, των οποίων οι υποδοχείς είναι CXCR3, CCR5 και CCR6 αντίστοιχα. Αυτοί οι υποδοχείς έχουν ταυτοποιηθεί σε NK στις περιοχές των βλαβών, καθιστώντας έτσι αυτές τις χημειοκίνες μέσο στρατολόγησης των NK. Η συμβολή των ενεργοποιημένων NK στην ψωρίαση έγκειται στην παραγωγή κυτοκινών, όπως IFN-γ, TNF-α, IL-17, IL-22 που ενεργοποιούν άλλα κύτταρα ανοσοποιητικού και κερατινοκύτταρα τροφοδοτώντας περαιτέρω την φλεγμονή (Dunphy & Gardiner, 2011; Polese et al., 2020; Vivier et al., 2008).

Τα natural killer T (NKT) αποτελούν έναν υποπληθυσμό των T λεμφοκυττάρων που εμφανίζουν επιφανειακούς δείκτες και λειτουργικά χαρακτηριστικά

όμοια τόσο με τα T λεμφοκύτταρα όσο και με τα NK. Εκφράζουν στην επιφάνεια τους τον TCR και άλλους δείκτες (π.χ. CD25, CD44, CD69), ενώ συνήθως δεν εκφράζουν CD4 και CD8 που χαρακτηρίζουν τα T κύτταρα. Παράλληλα εκφράζουν και τον CD161 που είναι χαρακτηριστικός δείκτης των NK. Όταν ενεργοποιηθούν τα NKT μέσω του TCR ακολουθεί η ταχεία απόκριση που περιλαμβάνει έκκριση κυτοκινών και δράση κυτταροτοξικότητας. Τα αντιγόνα που αναγνωρίζουν είναι γλυκολιπίδια και τους παρουσιάζονται μέσω του CD1d που σχετίζεται με το σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας MHC I. Τα κυκλοφορόντα NKT κύτταρα στο αίμα και στους λεμφαδένες είναι λίγα, τα περισσότερα βρίσκονται στον θύμο, στο σπλήνα, τον μυελό των οστών και το ήπαρ. Επιπλέον το πλήθος των NKT παρουσιάζει μεταβλητότητα μεταξύ διαφορετικών ατόμων. Αναπτύσσονται στον θύμο και υπόκεινται σε θετική ή αρνητική επιλογή και έπειτα σε ωρίμανση. Τα ανώριμα NKT παράγουν περισσότερο IL-4 και λιγότερο IFN- $\gamma$ , ενώ όταν ωριμάσουν αυτό αντιστρέφεται. Παράλληλα νέα δεδομένα έδειξαν πως εκκρίνουν επίσης IL-17A, IL-17F και IL-22. Μελέτη έχει αποδείξει μια υπερέκφραση του CD1d σε κερατινοκύτταρα σε ψωριασικούς ασθενείς, ενισχύοντας έτσι την ανταγωνοπαρουσίαση και ενεργοποίηση των NKT. Τα NKT μπορεί να εμφανίζονται όχι πολύ συχνά σε ψωριασικές βλάβες, ωστόσο φαίνεται να συμβάλλουν στην φλεγμονή εκκρίνοντας προφλεγμονώδης και φλεγμονώδης κυτταροκίνες (Dunphy & Gardiner, 2011; Polese et al., 2020; Wu & Van Kaer, 2011).

#### **1.4.6. Άλλοι συμμετέχοντες κυτταρικοί πληθυσμοί**

Ένας υποπληθυσμός Th κυττάρων που έχει βρεθεί να είναι αυξημένος σε ασθενείς με ψωρίαση είναι τα Th22. Αποτελεί υποπληθυσμό που έχει ταυτοποιηθεί πρόσφατα και χαρακτηρίζεται από υψηλή παραγωγή IL-22, της κύριας κυτταροκίνης τελεστή του. Εκκρίνουν επίσης IL-13, IL-26 και TNF- $\alpha$ , όχι όμως IL-17, IL-4 ή IFN- $\gamma$  και εκφράζουν τους υποδοχείς χημειοκινών CCR4, CCR6 και CCR10. Τα Th22 υπό κατάλληλες συνθήκες μπορεί να μετατραπούν σε Th1 ή Th2 υποπληθυσμό. Φυσιολογικά βρίσκονται άφθονα στο δέρμα και συμβάλλουν στην επούλωση πληγών. Τόσο η IL-6 όσο και ο TNF- $\alpha$  συμβάλλουν στην διαφοροποίηση του πληθυσμού, ενώ υψηλή συγκέντρωση TGF- $\beta$  αναστέλλει την διαφοροποίηση αυτή. Τα Th22/IL-22 συμμετέχουν σε αρκετές αυτοάνοσες φλεγμονώδης νόσους, όπως και στη ψωρίαση και υψηλά επίπεδά τους στο πλάσμα ασθενών με ψωρίαση έχουν συσχετιστεί θετικά με την σοβαρότητα της νόσου. Η IL-22 προκαλεί υπερπολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και τα υψηλά επίπεδά της έχουν συσχετιστεί με την

παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων και χημειοκινών που προσελκύουν ουδετερόφιλα αυξάνοντας την διήθησή τους στην επιδερμίδα. Τέλος, τα κύτταρα Th22 εξακολουθούν να παράγουν IL-22 στην επουλωμένη επιδερμίδα του δέρματος μετά από χρόνια ύφεσης, επομένως τα κύτταρα Th22 παίζουν σημαντικό ρόλο στη μνήμη της ψωριασικής υποτροπής (Jiang et al., 2021; Kagami et al., 2010).

Τα γδΤ κύτταρα είναι ένας πληθυσμός Τ κυττάρων που βρίσκονται στο επιθήλιο που εκφράζουν τις υπομονάδες γ και δ του TCR. Τα γδ Τ κύτταρα που υπάρχουν στο δέρμα μπορεί να γίνουν η πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στην εισβολή ξένων παθογόνων ή τα σήματα κινδύνου που απελευθερώνονται κατά τη μόλυνση. Στον θύμο αδένά γίνεται ο καθορισμός ορισμένων μορίων που θα δώσουν τον χαρακτήρα του διαφορετικού υποπληθυσμού γδΤ που θα προκύψει, με τους δυο βασικότερους υποπληθυσμούς να είναι αυτά που παράγουν IFN-γ (γδ1 Τ) και αυτά που παράγουν IL-17 (γδ17 Τ). Εκφράζουν τον υποδοχέα της IL-23, τον CCR6 και τον μεταγραφικό παράγοντα RORγt. Έπειτα από διέγερση μέσω της IL-23 και IL-1β εκκρίνουν IL-17. Δεδομένο των κυτοκινών που παράγουν, οι οποίες είναι κρίσιμες και στην ψωρίαση, καθώς και τον εντοπισμό τους στις ψωριασικές δερματικές βλάβες, συμπεραίνεται η συμβολή στην φλεγμονής της νόσο (Polese et al., 2020).

Ένας άλλος υποπληθυσμός Τ κυττάρων που φαίνεται να είναι απορυθμισμένος στην ψωρίαση, είναι τα Τ ρυθμιστικά (Treg). Βασικός του ρόλος είναι έπειτα από μια ανοσοαπόκριση να επαναφέρουν το ανοσοποιητικό σύστημα σε καταστολή. Χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση του επιφανειακού δείκτη CD25 και για τον έλεγχο της ανάπτυξης και της λειτουργίας τους βασικό ρόλο έχει ο μεταγραφικός παράγοντας Foxp3. Την ανοσοκατασταλτική τους δράση την ασκούν στα άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού μέσω της έκκριση των κυτοκινών IL-10 και TGF-β. Σε ψωριασικούς ασθενής η ικανότητα των κυκλοφορούντων Treg να αναστείλουν CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> είναι αρκετά μειωμένη. Στα TH17 και Treg η διαφοροποίηση τους ρυθμίζεται αμοιβαία με κοινές και διαφορετικές κυτοκίνες, άρα αναμενόμενο, σε ασθενής με ψωρίαση που το περιβάλλον κυτοκινών είναι διαταραγμένο, να παρουσιάζεται ανισορροπία μεταξύ αυτών των πληθυσμών. Επομένως δυσλειτουργικά Treg σημαίνει πως δεν είναι δυνατός ο έλεγχος της φλεγμονής στους ασθενής με ψωρίαση (Luckheeram et al., 2012; Nussbaum et al., 2021).

## 1.5. Γενετικοί παράγοντες

Η ψωρίαση θεωρείται μια πολυπαραγοντική νόσος που προκαλείται από την αλληλεπίδραση μεταξύ κληρονομικών αλληλομόρφων ευαισθησίας και περιβαλλοντικών παραγόντων. Έπειτα από μελέτες GWAS που διεξήχθησαν την τελευταία δεκαετία σε πολλούς πληθυσμούς, αύξησαν αρκετά τους γενετικούς τόπους που σχετίζονται με ευαισθησία εμφάνισης ψωρίασης. Φαίνεται να παρουσιάζει κληρονομικό υπόβαθρο, καθώς σε παγκόσμιο επίπεδο έχει παρατηρηθεί να εμφανίζεται σε οικογένειες, και μάλιστα η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου είναι 2-3 φορές υψηλότερη σε μονοζυγωτικά απ' ό τι σε διζυγωτικά δίδυμα. Σύμφωνα με μελέτες που έγιναν σε οικογένειες, οι απόγονοι των οποίων και οι δύο γονείς έπασχαν από ψωρίαση είχαν 50% πιθανότητα να πάσχουν κι αυτοί, ενώ αν είχε μόνο ο ένας γονέας η πιθανότητα ήταν στο 16%. Αν κανένας από τους δύο γονείς δεν έπασχε, ωστόσο το ένα παιδί έπασχε, η πιθανότητα να εμφανίσει ψωρίαση ο/η αδερφός/ή του ήταν 8%. Από μελέτες διδύμων προκύπτει πως η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου είναι πολύ μεγαλύτερη μεταξύ διζυγωτικών διδύμων με τα ποσοστά να κυμαίνονται από 35% έως 72%, ενώ στους μονοζυγωτικούς διδύμους κυμαίνονται στο 15% έως 23%. Το γεγονός ότι το ποσοστό δεν φτάνει στο 100% υποδηλώνει πως στην εμφάνιση της νόσου συμβάλλουν και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες (Gurta et al., 2014).

Πλέον έχουν εντοπιστεί πάνω από 80 γονίδια και 15 γενετικές περιοχές PSORS1-15 (περιοχές ευαισθησίας στην ψωρίαση) συσχετιζόμενα με ευαισθησία εμφάνισης ψωρίασης, με την PSORS1 να είναι η σημαντικότερη και να εξηγεί περίπου το 35-50% της κληρονομικότητας της ψωρίασης. Ο γενετικός τόπος PSORS1 αντιστοιχεί στο μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC) και χαρτογραφείται στην θέση του χρωμοσώματος 6p21. Κάποια από τα γονίδια που βρίσκονται σε αυτή την περιοχή και οι παραλλαγές στην κωδικοποίηση αυτών φαίνεται να σχετίζονται με την εμφάνιση ψωρίασης είναι τα HLA-C, CCHCR1 και CDSN. Το HLA-C κωδικοποιεί MHC I μόριο που παίζει ρόλο στην αντιγονοπαρουσίαση στα CD8<sup>+</sup> T κύτταρα, και πιο συγκεκριμένα το αλληλόμορφο HLA-Cw6 έχει συσχετιστεί με εμφάνιση της νόσου. Το αλληλόμορφο αυτό είναι πιθανό να έχει με πολλά αυτοαντιγόνα υψηλή συγγένεια σύνδεσης, συμβάλλοντας έτσι στην παθογένεια της νόσου. Το CCHCR1 είναι ένα γονίδιο που εκφράζεται στα κερατινοκύτταρα, χωρίς όμως να είναι απόλυτα γνωστός ο ρόλος του, και θεωρείται πως συμμετέχει στην στεροειδογένεση και ίσως στον μεταβολισμό της βιταμίνης D (Tiala et al., 2007). Τα στεροειδή παίζουν ρόλο στον πολλαπλασιασμό και στην ανοσολογική απόκριση των κερατινοκυττάρων, με ένα παράδειγμα να είναι τα οιστρογόνα που μειώνουν τα συμπτώματα της ψωρίασης μέσω της

μείωσης της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτοκινών από τα κερατινοκύτταρα. Η έκφραση του αλληλομόρφου που εντοπίζεται σε ψωριασικούς ασθενείς είναι διαταραγμένη σε σύγκριση με υγιείς γεγονός που εν μέρη υποδηλώνει την δυσλειτουργία των κερατινοκυττάρων. Το CDSN κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη κερατινοκυττάρων (την corneodesmosin) που εμπλέκεται στην απολέπιση του δέρματος, μια διαδικασία που είναι γνωστό ότι μεταβάλλεται στην ψωρίαση. Η PSORS2 περιοχή χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 17q25.3 και η μετάλλαξη στο γονίδιο CARD14 (Caspase Recruitment Domain Family Member 14) την καθιστά ως περιοχή ευαισθησίας για εμφάνιση της ψωρίασης. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που ελέγχει την ενεργοποίηση του NF-κΒ. Οι μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί φαίνεται να την καθιστούν υπερενεργοποιημένη με αποτέλεσμα την αυξημένη δραστηριότητα του NF-κΒ και την υπερέκφραση μέσω αυτού της χημειοκίνης CCL20 και της IL-8 που επάγουν φλεγμονή (Jordan et al., 2012). Γενικότερα άλλα γονίδια που συσχετίστηκαν με την νόσο εμπλέκονταν κυρίως στον έλεγχο της σηματοδότησης NF-κΒ (TNFAIP3, TNIP1, TRAF3IP2, REL) και του μονοπατιού IL-23/Th17, τις μεταλλάξεις στα γονίδια IL12B και IL-23R να είναι από τις πρώτες που βρέθηκαν σε μελέτες GWAS για την ψωρίαση (Ogawa & Okada, 2020; Ran et al., 2019; Rendon & Schäkel, 2019).

## 1.6. Άλλοι παράγοντες

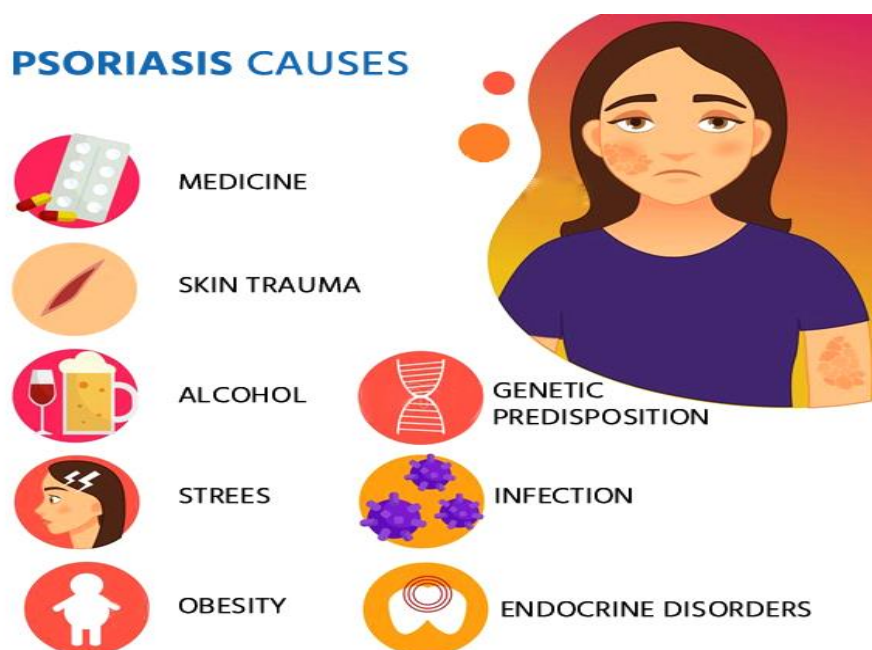
Εκτός από την γενετική προδιάθεση που πιθανόν έχει ένα άτομο, σημαντικό ρόλο στη πυροδότηση και επιβάρυνση της νόσου μπορεί να είναι κάποιος εξωγενείς παράγοντας, δηλαδή το περιβάλλον που είναι εκτεθειμένο το άτομο και ο τρόπος ζωής του. Οι περιβαλλοντικοί ρύποι και η έκθεση στην ακτινοβολία του ηλιακού φωτός φαίνεται να επηρεάζουν την εξέλιξη της σοβαρότητας της νόσου. Για παράδειγμα το κάδμιο είναι ένας ατμοσφαιρικός ρύπος ο οποίος έχει βρεθεί αρκετά αυξημένος στο αίμα ασθενών με σοβαρή ψωρίαση σε σχέση με μη νοσούντες. Επίσης παρά το γεγονός πως η ακτινοβολίες UVB και UVA χρησιμοποιούνται ως πρώτης γραμμής θεραπεία, σε ορισμένους ασθενείς επιβαρύνει τις δερματικές βλάβες. Οι λοιμώξεις από παθογόνους, όπως ο στρεπτόκοκκος, και η διαφοροποίηση του μικροβιώματος δύναται να συμβάλλουν στην νόσο. Κάποια είδη Candida, ενώ είναι μέρος της φυσιολογικής μικροχλωρίδας, βρέθηκαν πιο αυξημένα στο δέρμα ασθενών σε σύγκριση με υγιείς. Επιπλέον, τα φύλα Firmicutes και Actinobacteria βρέθηκαν να είναι αυξημένα σε ψωριασικές βλάβες, ενώ τα πρωτεοβακτήρια μειωμένα. Τέλος λοιμώξεις από HIV, ιό ανθρώπινων

θηλωμάτων και κάποιοι ρετροϊοί έχουν συσχετιστεί με την ψωρίαση (Kamiya et al., 2019).

Στην επιδείνωση των βλαβών που οφείλονται στην νόσο συμβάλλουν επίσης άλλα τραύματα, γνωστή αυτή η κατάσταση και ως φαινόμενο Koebner. Ανάλογα την θέση, τον τύπο και το βάθος του τραύματος διαφέρει και ο βαθμός εκδήλωσης του φαινομένου. Τους χειμερινούς μήνες με το κρύο, έπειτα από κάποιο εμβόλιο, μια αλλεργική αντίδραση, ηλιακό έγκαυμα, κόψιμο στο δέρμα, τσίμπημα είναι κάποια από τα παραδείγματα εκδήλωσής του. Τα αίτια δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρα, με μια εξήγηση να είναι ο NGF και άλλες κυτταροκίνες που απελευθερώνονται από τα σημεία των νέων βλαβών είναι πιθανό να μη ρυθμίζουν φυσιολογικά την σηματοδότηση των κερατινοκυττάρων λόγω ότι είναι ήδη πολύ αυξημένα. Τα φάρμακα αποτελούν έναν ακόμα παράγοντα έναρξης και επιδείνωσης της ψωρίασης, και μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις η έξαρση που προκαλούν να μην υποχωρεί κατόπιν της διακοπής της χρήσης τους. Ορισμένες από τις κατηγορίες αυτών είναι οι εξής: οι β-αναστολείς, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη, λίθιο, τετρακυκλίνη, φάρμακα κατά της ελονοσίας, αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης. Η κατανάλωση αλκοόλ, το κάπνισμα και η μη ισορροπημένη διατροφή, άρα και διαταραχή του εντερικού μικροβιώματος και κατά συνέπεια ανισορροπία των εκκρινόμενων κυτοκινών αποτελούν επιπρόσθετους παράγοντες κινδύνου (Tseng et al., 2021).

Τέλος οι επιγενετικές τροποποιήσεις σε συγκριμένα γονίδια είναι ένας ακόμα παράγοντας κινδύνου εμφάνισης της ψωρίασης. Το DNA που αντιστοιχεί σε γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν ρυθμιστές του πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων έχει φανεί πως παρουσιάζει αρκετές μεθυλιώσεις CpG κυτοσινών σε δείγματα ασθενών, που σημαίνει υπερσυσπείρωση της χρωματίνης, άρα μεταγραφική σίγηση στο σημείο αυτό. Το ίδιο ισχύει και για περιοχές που κωδικοποιούν HLA-C και τον FOXP3 των Treg (Shao & Gudjonsson, 2020). Επίσης, απορυθμισμένη είναι η έκφραση κάποιων microRNAs, μορίων που προκαλούν μεταγραφική σίγηση γονιδίων, τα οποία ρυθμίζουν γονίδια που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου. Κάποια παραδείγματα είναι το miRNA-146a που εκφράζεται στα PBMCs και στα κερατινοκύτταρα. Με downregulation του miRNA-146a επηρεάζεται ο πολλαπλασιασμός και η φλεγμονή προκαλούμενη από IL-17 στα κερατινοκύτταρα. Το miRNA-210 είναι upregulated σε ασθενείς με ψωρίαση και αναστέλλει την έκφραση του FOXP3 των Tregs. Επίσης upregulation του miRNA-21 οδηγεί σε αύξηση της σηματοδότηση IL-6/STAT3 που συμβάλλει στην έναρξη της ψωρίασης. Τέλος έχουν βρεθεί και περίπου 971 lncRNAs που

εκφράζονται διαφορετικά σε επιδερμικές ψωριασικές βλάβες σε σύγκριση με το φυσιολογικό-υγιή δέρμα, χωρίς να είναι ακόμα απόλυτα γνωστός ο ρόλος του (Kamiya et al., 2019; Rendon & Schäkel, 2019).



Εικόνα 2 Παράγοντες που συμβάλλουν στην εκδήλωση της ψωρίασης.

## 1.7. Συννοσηρότητα

Η ψωρίαση θεωρείται μια συστημακή φλεγμονώδης νόσος με αποτέλεσμα να επηρεάζει κι αλλά συστήματα εκτός του δέρματος και οι ασθενείς να εμφανίζουν συννοσηρότητα με άλλες παθήσεις, με τις πιο διαδεδομένες να είναι η ψωριασική αρθρίτιδα, η χρόνια φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, ψυχολογικές διαταραχές, παχυσαρκία, σακχαρώδη διαβήτη, υπέρταση, δυσλιπιδαιμία.

Η ψωριασική αρθρίτιδα είναι μια νόσος που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή, πόνο και δυσκαμψία των αρθρώσεων, των συνδέσμων και των τενόντων. Ο επιπολασμός της ψωριασικής αρθρίτιδας (PsA) σε ασθενής που ήδη πάσχουν από ψωρίαση κυμαίνεται 6-42% περίπου, με το 70% αυτών να εμφανίζουν PsA κάποια χρόνια έπειτα την εμφάνιση της ψωρίασης και το 10% να εμφανίσουν συμπτώματα και των δυο νόσων παράλληλα. Η εμφάνιση PsA σχετίζεται περισσότερο με ασθενής που έχουν εκτεταμένες δερματικές βλάβες και οι μηχανισμοί που προκαλούν την φλεγμονή στην ψωριασική αρθρίτιδα να είναι παρόμοιοι με αυτούς στην ψωρίαση. Στις φλεγμονώδης

νόσους του εντέρου που εμφανίζουν συννοσηρότητα με την ψωρίαση είναι η νόσος του Crohn και η ελκώδης κολίτιδα. Ασθενής με νόσο του Crohn να έχουν 7 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν ψωρίαση και ασθενείς με ψωρίαση 2,9 φορές να αναπτύξουν νόσο του Crohn σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό. Επίσης πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως ορισμένοι γενετικοί τόποι ευαισθησίας εμφάνισης των νόσων είναι κοινοί.

Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει συσχέτιση της ψωρίασης με καρδιομεταβολικές νόσους και να μοιράζονται κοινά παθοφυσιολογικά μονοπάτια, όπως την χρόνια φλεγμονή από τα Th1 και Th17, το οξειδωτικό στρες, την δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων, την επιστράτευση των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων. Στην παχυσαρκία για παράδειγμα χαρακτηριστικό είναι η ήπια φλεγμονή, απόρροια των προφλεγμονωδών κυτοκινών που εκκρίνονται από τον λευκό λιπώδη ιστό, οι οποίες παράλληλα συμβάλλουν στην παθογένεση της ψωρίασης (π.χ. TNF-α, IL-6). Τόσο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II όσο και η δυσλιπιδαιμία είναι νόσοι που είναι στενά συνδεδεμένοι με την παχυσαρκία, ωστόσο μελέτες έχουν δείξει επιπολασμό και με την ψωρίαση, χωρίς να είναι απόλυτα ξεκάθαρο ποια πάθηση εμφανίζεται πρώτη. Στην εμφάνιση της δυσλιπιδαιμίας φάνηκε όμως πως συμβάλλουν τα ρετινοειδή και η κυκλοσπορίνη που είναι φάρμακα για θεραπεία της ψωρίασης.

Το ψυχικό στρες είναι μια τελευταία παράμετρος που μπορεί να λειτουργεί είτε ως αίτιο είτε ως αποτέλεσμα στην ψωρίαση. Μελέτες υποστηρίζουν πως σε ορισμένες περιπτώσεις το στρες έχει αποτελέσει έναυσμα έναρξης της ψωρίασης ή σε ήδη ασθενείς έχει επιδεινώσει τα συμπτώματά τους. Από την άλλη η ψωρίαση έχει συσχετιστεί με χαμηλή αυτοεκτίμηση και επικράτηση άγχους και καταθλιπτικών διαταραχών των ασθενών (Oliveira Mde et al., 2015; Takeshita et al., 2017).

## **1.8. Διάγνωση και θεραπεία**

Η διάγνωση της ψωρίασης γίνεται κυρίως κλινικά με προσεκτική εξέταση της μορφολογίας των δερματικών βλαβών, ωστόσο επειδή η ψωρίαση καλύπτει ένα ευρύ φάσμα φαινοτύπων, τα κριτήρια διάγνωσης δεν είναι απόλυτα. Οι κλινικοί φαινότυποι της ψωρίασης έχουν ταξινομηθεί βάση χαρακτηριστικών που παρουσιάζονται σε αυτή όπως είναι η μορφολογία των βλαβών, η περιοχή του σώματος που εμφανίζεται, το στάδιο της ανάπτυξης, η ηλικία έναρξης της νόσου. Η σοβαρότητα της νόσου μπορεί να προσδιοριστεί από



την έκταση της βλάβης στην επιφάνεια του σώματος ( ήπια ψωρίαση < 5% BSA, σοβαρή ψωρίαση > 10% BSA) και με τον καθορισμό της τιμής PASI (Psoriasis Area Severity Index ), το οποίο είναι ένα σκορ που προκύπτει από την αξιολόγηση της σοβαρότητας και της σωματικής έκτασης της βλάβης. Το PASI μπορεί να έχει τιμές 0 έως 72 και η περιπτώσεις ασθενών με PASI πάνω από 40 να θεωρούνται σπάνιες. Στα πλαίσια της διάγνωσης σε κάποιες περιπτώσεις που δεν υπάρχει βεβαιότητα της διάγνωσης από την κλινική εικόνα δύναται να γίνει βιοψία συλλέγοντας δείγμα από τον ιστό που έχει υποστεί βλάβη. Μια σχετικά νεότερη και μελλοντική προσέγγιση στην διάγνωση της νόσου είναι η ποσοτικοποίηση κάποιων χαρακτηριστικών βιοδεικτών που αφορούν μόρια που εντοπίζονται στις δερματικές βλάβες και συμμετέχουν στον υπερπολλαπλασιασμό και την δυσλειτουργία των κερατινοκυττάρων. Ο εντοπισμός και η διαφορική έκφραση αυτών θα μπορούσε να συμβάλλει όχι μόνο στην διάγνωση, αλλά και στην πρόβλεψη της προόδου της νόσου και στην εφαρμογή της κατάλληλης θεραπείας για κάθε ασθενή. Ωστόσο, οι υποψήφιοι βιοδείκτες βρίσκονται υπό διερεύνηση (Raychaudhuri et al., 2014; Yadav et al., 2018).

Όσο αφορά την θεραπεία της ψωρίασης οι στρατηγικές που χρησιμοποιούνται είναι τρεις, με την πρώτη να είναι η τοπική χρήση αλοιφών στο δέρμα, δεύτερη η φωτοθεραπεία με έκθεση σε κάποιους τύπους υπεριώδους ακτινοβολίας και τρίτον η συστημική θεραπεία που είναι η χορήγηση φαρμάκων (ενέσιμα ή από του στόματος χορηγούμενα). Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται στις κρέμες είναι κορτικοστεροειδή, ρετινοϊκό, ανθραλίνη, κάποια άλλα μη στεροειδή μόρια όπως συνθετική βιταμίνη D3 και ανάλογα της βιταμίνης D, βιταμίνη A, σαλικυλικό οξύ. Κάποια από τα είδη φωτοθεραπείας είναι η υπεριώδης ακτινοβολία B στενής ζώνης (NB-UVB) και ευρείας ζώνης (BB-UVB), excimer UVB laser (308nm). Το υπεριώδες φως ασκεί την δράση του στα κύτταρα Langerhans αναστέλλοντάς τους την ικανότητα να παρουσιάζουν αντιγόνα στα T κύτταρα, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο την ανοσολογική απόκριση. Επίσης σε αυτού του είδους θεραπεία συμπεριλαμβάνεται και η χρήση UVA ακτινοβολίας με συγχορήγηση 8-μεθοξυψωραλενίου (φωτοχημειοθεραπεία), προκαλώντας στο crosslinking στο DNA και κατά συνέπεια οδηγώντας τα κύτταρα στο σημείο της δερματικής βλάβης σε απόπτωση (Brandon et al., 2019). Η τρίτη στρατηγική θεραπευτικής προσέγγισης περιλαμβάνει δυο ειδών φαρμακευτικών αγωγών που είναι τα μόρια μικρού μοριακού βάρους και οι βιολογικοί παράγοντες, τα οποία χρησιμοποιούνται όταν οι προηγούμενες στρατηγικές δεν επαρκούν στην υποχώρηση των συμπτωμάτων. Τα μικρά μόρια αποτελούν μόρια < 700 Da , προσφέρουν στόχευση αρκετών σηματοδοτικών μονοπατιών, με χαμηλό κόστος παραγωγής, ωστόσο έχουν χαμηλή ειδικότητα στόχευσης σε σχέση με

τους βιολογικούς παράγοντες. Τα πιο γνωστά και ευρέως χρησιμοποιούμενα είναι η μεθοτρεξάτη, η κυκλοσπορίνη A, απρεμιλάστη, εστέρες φουμαρικού οξέος και ακιτρετίνη. Η μεθοτρεξάτη είναι ένα μόριο ανάλογο του φολικού οξέος που παρεμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αναστέλλοντας έμμεσα μονοπάτια σύνθεσης δομικών μορίων, όπως νουκλεοτιδίων και έχει την ικανότητα να αυξάνει την συγκέντρωση της αδενοσίνης, ενός μορίου με σηματοδοτικό αντιφλεγμονώδη ρόλο στα λεμφοκυττάρων. Η κυκλοσπορίνη A είναι αναστολέας της καλσινευρίνης, μιας φωσφατάσης που αποφωσφωριλιώνει και ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα NFATc οδηγώντας σε έκφραση κυτοκινών από τα T κύτταρα. Η απρεμιλάστη είναι αναστολέας της PDE4 (φωσφοδιεστεράσης), ενζύμου που βρίσκεται σε ανοσοκύτταρα και κερατινοκύτταρα υπεύθυνο για την υδρόλυση του cAMP (κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη). Το cAMP αποτελεί δευτερεύον σηματοδοτικό μόριο που θα ενεργοποιήσει άλλα μόρια και μεταγραφικούς παράγοντες υπεύθυνα για την έκφραση αντιφλεγμονωδών κυτοκινών και αναστολή του NF-κB (Rodríguez-Pomar et al., 2017). Για τους εστέρες φουμαρικού οξέος ο μηχανισμός δράσης δεν είναι απόλυτα κατανοητός, ωστόσο φαίνεται να ενεργοποιούν το NrF2 ένα μόριο που μπαίνει στον πυρήνα και προκαλεί καταστολή της έκφρασης προφλεγμονωδών κυτοκινών. Αυτά τα μόρια επίσης συμβάλλουν στην καταστολή του NF-κB. Η ακιτρετίνη ανήκει στα ρετινοειδή που είναι φυσικά ή συνθετικά μόρια που σχετίζονται με τη βιταμίνη A και βελτιώνει τα συμπτώματα της ψωρίασης εξισορροπώντας τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και μειώνοντας την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών. Τέλος οι βιολογικοί παράγοντες είναι μόρια που στοχεύουν πιο ειδικά μόρια και σηματοδοτικές οδούς, είναι συνήθως μονοκλωνικά αντισώματα, χορηγούνται υποδόρια και στοχεύουν δυο οδού συνήθως, τον άξονα IL-23/Th17 και την σηματοδότηση TNF-α. Οι διαθέσιμοι αναστολείς TNF-α για την ψωρίαση που έχουν εγκριθεί για την χρήση τους είναι τέσσερις, τα infliximab, adalimumab, etanercept, certolizumab. Αυτοί αναγνωρίζουν και συνδέονται με τον TNF-α αποτρέποντας την σύνδεση στον υποδοχέα του. Άλλοι αναστολείς είναι το ustekinumab που στοχεύει την IL-23 και IL-12, τα guselkumab, tildrakizumab και risankizumab που είναι ειδικά για την IL-23, τα secukinumab και ixekizumab δεσμεύουν την IL-17A και τέλος το brodalumab που στοχεύει τον υποδοχέα IL-17AR (Ben Abdallah et al., 2021; Rendon & Schäkel, 2019).

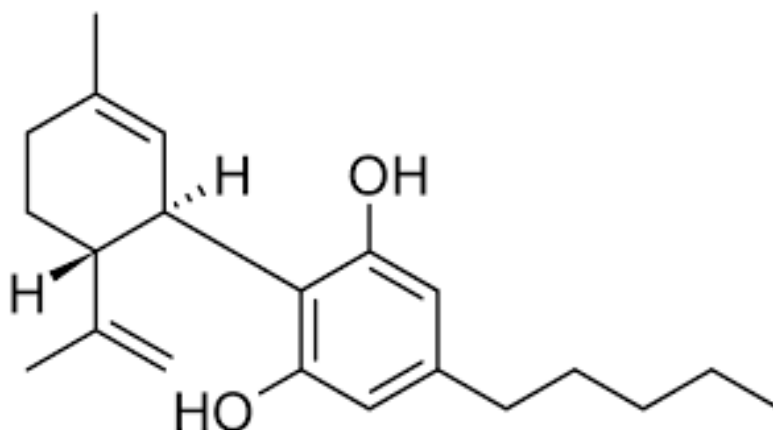
## 1.9. Κανναβιδιόλη (CBD)

Η κανναβιδιόλη είναι μια ουσία που ανήκει στα φυτοκανναβινοειδή του φυτού *Cannabis sativa* L. Το CBD είναι μη ψυχοδραστικό, ενώ παράλληλα έχει

ευεργετικά φαρμακευτικά αποτελέσματα, όπως είναι οι αντιφλεγμονώδης και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Το *Cannabis sativa* L. είναι ένα ετήσιο, επικονιασμένο, συνήθως ανθοφόρο φυτό της οικογένειας Cannabaceae. Το φυτό φαίνεται να προέρχεται από την κεντρική Ασία και να έχει πρώτη φορά εντοπιστεί 12.000 χρόνια πριν. Παρείχε μια ποικιλία χρήσεων όπως ίνες για σχοινιά και δίχτυα, σπόρους για λάδι, φαρμακευτικές ιδιότητες. Στις φαρμακευτικές ιδιότητες ανήκαν η μείωση του πόνου, της ναυτίας και του άγχους, η βελτίωση της όρεξης και του ύπνου, η χαλάρωση των μυών και η παραγωγή αισθήματος ευφορίας. Η χρήση της κάνναβης ως φάρμακό εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τον αυτοκράτορα της Κίνας Chen Nung ως θεραπεία για την κόπωση, τους ρευματισμούς και την ελονοσία. Μετέπειτα και σε άλλα γεωγραφικά εδάφη, όπως στην Αίγυπτος που εφαρμοζόταν για τοπική χρήση στην αντιμετώπιση της φλεγμονής όπως αναφέρεται σε πάπυρο που είχε γραφτεί περίπου το 1.500π.Χ. , στην Ελλάδα και στην Ρωμαϊκή Αυτοκρατορία. Ωστόσο το φυτό αρχικά ήταν ευρέως γνωστό για την ψυχοτρόπο δράση του, λόγω μια άλλης ουσίας που περιείχε εκτός του CBD, της τρανς-Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινόλης (THC) (Crocq, 2020). Ανάλογα με την περιεκτικότητα σε κανναβινοειδή το είδος *C. sativa* έχει χωριστεί σε πέντε υποτύπους, τον υπότυπο I που χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε THC, τους υποτύπους III και IV που χαρακτηρίζονται από υψηλές συγκεντρώσεις μη ψυχοδραστικών κανναβινοειδών και χαμηλές συγκεντρώσεις ψυχοδραστικών κανναβινοειδών, τον υπότυπο II που εμφανίζει ενδιάμεσο φαινότυπο των προηγούμενων υποτύπων και τέλος ο υπότυπος V που δεν περιέχει σχεδόν καθόλου κανναβινοειδή. Το *Cannabis sativa* χαρακτηρίζεται από μια ποικιλία ενώσεων που παράγει συμπεριλαμβανομένων των τερπενίων, των υδατανθράκων, των λιπαρών οξέων και των εστέρων τους, των αμιδίων, των αμινών, των φυτοστερολών, των φαινολικών ενώσεων και των ειδικών ενώσεων του, των κανναβινοειδών. Μάλιστα έχει προταθεί πως λόγω ότι τα τερπένια, τα οποία είναι πολύ κοντινές χημικές ενώσεις με τα τερπενοειδή που παρουσιάζουν φαρμακευτικές ιδιότητες, ίσως παρουσιάζουν συνεργατική δράση με τα κανναβινοειδή .

Τα κανναβινοειδή είναι μεροτερπενοειδή που προκύπτουν από την αλκυλίωση μιας αλκυλο-ρεσορκινόλης με ένα μονοτερπενοειδές και είναι ενώσεις με 21 ή 22 άτομα άνθρακα. Έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί περισσότερα από 100 κανναβινοειδή, τα οποία έχουν χωριστεί σε 11 κατηγορίες. Η κανναβιδιόλη (CBD) απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1940 από τον Roger Adams και η δομή της χαρακτηρίστηκε το 1963 από τον χημικό Raphael Mechoulam. Παράγεται κυρίως από αδενικά τοιχώματα θηλυκών φυτών στο κάτω μέρος των φύλλων και σε μίσχους νεαρών φυτών. Είναι τερπενοφαινόλη με μοριακό τύπο C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub> και έχει ένα δακτύλιο κυκλοξενίου, ένα φαινολικό δακτύλιο και μια πλευρική αλυσίδα 5 ανθράκων. Πρόδρομα μόρια είναι το κανναβιγερολικό οξύ (cannabigerolic

acid, CBGA), το οποίο έπειτα μετατρέπεται σε κανναβιδιολικό οξύ (cannabidiolic acid, CBDA) που τελικά μετατρέπεται με αποκαρβοξυλίωση στην κανναβιδιόλη (CBD). Πλέον είναι γνωστό πως η κανναβιδιόλη μπορεί να ασκήσει την δράση της μέσω του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος. Τέλος λόγω της βιολογική της δράσης ως αντιφλεγμονώδης ένωσης έχει χρήση ως θεραπεία για τον διαβήτη, καρδιαγγειακές παθήσεις, καρκίνο, αρθρίτιδα, άγχος, ψύχωση, επιληψία, νευροεκφυλιστικές νόσους και δερματοπάθειες (Atalay et al., 2019; Pellati et al., 2018).

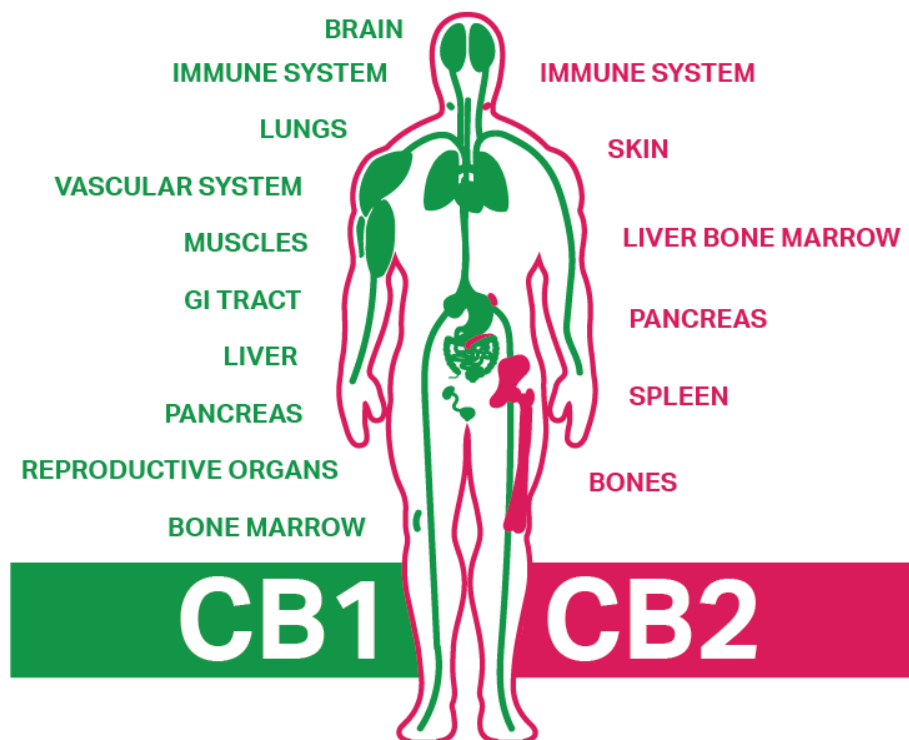


Εικόνα 3 Μοριακή δομή της κανναβιδιόλης Πηγή: <https://en.wikipedia.org/wiki/Cannabidiol>

### 1.9.1. Ενδοκανναβινοειδές σύστημα

Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα (ECS) αποτελεί ένα νευροτροποποιητικό σύστημα και είναι καίριας σημασίας για την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος και τον απαντήσεων σε ενδογενή και εξωγενή ερεθίσματα. Μάλιστα διαταραχές του σχετίζονται με ψυχιατρικές ασθένειες όπως η σχιζοφρένια. Αποτελείται από τους υποδοχείς κανναβινοειδών, τα ενδογενή κανναβινοειδή (ενδοκανναβινοειδή, ECs) και τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση και την αποικοδόμηση των ενδοκανναβινοειδών. Πρόδρομες ενώσεις των ενδοκανναβινοειδών είναι τα λιπίδια και τα πρώτα που ανακαλύφθηκαν και τα πιο καλά χαρακτηρισμένα είναι η ανανδαμίδη (αραχιδονοϋλοαιθαναμίδιο, AEA) και η 2-αραχιδονυλογλυκερόλη (2-AG). Έπειτα από σήμα ενεργοποίησης της έκκρισης τους, τα ενδοκανναβινοειδή είναι έτοιμα να απελευθερωθούν μετά από ένα ή δυο βήματα ενζυμικών αντιδράσεων. Την δράση τους την ασκούν όταν συνδεθούν στους κανναβινοειδικούς υποδοχείς τους, CB1 και CB2, που είναι GPCR υποδοχείς. Ο CB1 βρίσκεται περισσότερο στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και κυρίως στον φλοιό, στα βασικά γάγγλια, τον ιππόκαμπο και την παρεγκεφαλίδα, ενώ ο CB2 δεν εκφράζεται τόσο στο ΚΝΣ, αλλά βρίσκεται περισσότερο στους περιφερικούς ιστούς και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων απενεργοποιεί την

αδενυλική κυκλάση και κάποιους τασεοεξαρτώμενους διαύλους ασβεστίου και ενεργοποιεί κάποιες MAPK κινάσες. Εκτός από τους CB υποδοχείς το ενδοκανναβινοειδή μπορούν και συνδέονται επίσης στους υποδοχείς TRPV (transient receptor potential cation channels), PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) και τον ορφανό υποδοχέα GPR55 (είναι GPCR). Κάποιες από τις φυσιολογικές λειτουργίες που εμπλέκεται το ECS, εκτός από την ανάπτυξη και ωρίμανση του νευρικού συστήματος, είναι η απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών που προκαλούνται από το στρες επηρεάζοντας έτσι τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων και κατ' επέκταση ότι ρυθμίζει αυτός, τη ρύθμιση πρόσληψης τροφής, αφού έπειτα από διάστημα πείνας τα AEA και 2-AG αυξάνονται, ενεργοποιώντας τον CB1R που οδηγεί σε αύξηση πρόσληψης τροφής. Επίσης η ενεργοποίηση του CB1R βοηθά στην αγγειοδιαστολή και την καρδιακή συσταλτικότητα, ρυθμίζοντας την αρτηριακή πίεση και βελτιώνοντας την αριστερή καρδιακή λειτουργία. Αναστολείς των CB1 και CB2 υποδοχέων έχουν προταθεί ως αναλγητικά, υποδηλώνοντας την συσχέτιση του ECS και με τον πόνο. Επιπλέον, σε ορισμένους καρκίνους, τα ECs είναι πολλαπλασιαστικά και αντιαποπτωτικά, αλλά στην πλειοψηφία τους παρουσιάζουν διακοπή του κυτταρικού κύκλου, αυτοφαγία, απόπτωση και αναστολή του όγκου. Το γεγονός ότι εντοπίζονται ένζυμα βιοσύνθεσης και αποικοδόμησης ενδοκανναβινοειδών σε λευκοκύτταρα υποδηλώνει την ρύθμιση σε τοπικό επίπεδο της φλεγμονής. Τα ECs ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των Β και Τ λεμφοκυττάρων, την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών και τη κυτταρική μετανάστευση λόγω φλεγμονής. Όσο αφορά τα Τ κύτταρα φαίνεται πως τα ECs καταστέλλουν την παραγωγή κυτοκινών από Th1 και αυξάνουν την παραγωγή κυτοκινών των Th2 (IL-4, IL-10) (Chanda et al., 2019; Filipiuc et al., 2021; Lu & Mackie, 2016; Pandey et al., 2009). Μάλιστα, είναι γνωστό πως η ανανδαμίδα καταστέλλει άμεσα την απελευθέρωση κυτοκινών (TNF-α, IFNγ, IL-2, IL-17) από τα CD4+ και CD8+ Τ κύτταρα μέσω CB2 (Cencioni et al., 2010), ενώ παράλληλα σε πρόσφατα δεδομένα από μελέτη ενεργοποίησής του CB2 σε PBMCs με χρήση του αγωνιστή HU308, παρατηρήθηκε αύξηση των IL-6 και IL-10 μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού Gas και ενεργοποίησης την AC (αδενυλικής κυκλάσης)/cAMP/PKA και φωσφοριλίωσης του CREB (Saroj et al., 2019). Τέλος το ενδοκανναβινοειδές σύστημα εμπλέκεται και στην λειτουργία της φλεγμονής επαγόμενης από τα κερατινοκύτταρα. Σε μία μελέτη που έγινε έδειξε, πως η συνκαλλιέργεια σε επαγόμενη από IFNγ HaCaT κυτταρική σειρά (κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται για μελέτη κερατινοκυττάρων), στα οποία είχε χορηγηθεί AEA, με Τ naïve κύτταρα απέτρεψε την μετατροπή τους σε Th1 ή Th17. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω της ενεργοποίησης του CB1R των κερατινοκυττάρων μέσω AEA, οδηγώντας σε μείωση των IL-12 και IL-23, πιθανότατα λόγω καταστολής του mTOR (Chiurchiù et al., 2016).



**Εικόνα 4** Εντοπισμός σημείων δράσης του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος. Πηγή: <https://wholisticmatters.com/the-endocannabinoid-system/>.

### 1.9.2. Μηχανισμοί δράσης- ιδιότητες

Όπως προαναφέρθηκε το CBD χρησιμοποιείται για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες σε διάφορες παθήσεις, οι οποίες θα αναφερθούν στην συνέχεια.

#### Αντιοξειδωτικές ιδιότητες (άρθρο CBD)

Το CBD, όπως και κάθε αντιοξειδωτικό έχει την ικανότητα να σταματά τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών, δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες ή μετατρέποντας αυτές σε λιγότερο δραστικές μορφές. Το CBD φάνηκε να παρεμποδίζει το σχηματισμό ριζών υπεροξειδίου, οι οποίες παράγονται κυρίως από την οξειδάση της ξανθίνης (XO) και την οξειδάση NADPH (NOX1 και NOX4). Σε μελέτη ποντικού μοντέλου νεφροπάθειας που λάμβανε cisplatin (παράγοντας χημειοθεραπείας), ενός μορίου που αυξάνει την έκφραση των NOX ενζύμων άρα και το οξειδωτικό στρες, η χορήγηση CBD μετρίασε αυτή την υπερέκφραση του ενζύμου (Pan et al., 2009). Εκτός από το να επηρεάζει τα οξειδωτικά, ασκεί αντίστοιχα την δράση του και στα αντιοξειδωτικά και κυρίως σε επίπεδο μεταγραφής αυτών. Αρχικά προκαλεί

ενεργοποίηση του Nrf2 (nuclear erythroid 2-related factor), που είναι μεταγραφικός παράγοντας υπεύθυνος για την έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων. Αυτό το επιτυγχάνει μέσω της δέσμευσης του αναστολέα του Nrf2, τον Keap1 (Jastrzab et al., 2019). Το CBD αυξάνει, επίσης, την έκφραση δισμουτάσης υπεροξειδίου (SOD) και την ενζυμική δραστηριότητα των Cu-, Zn- και Mn-SOD, τα οποία είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό των ριζών υπεροξειδίου. Αυτό αποδείχτηκε από μελέτη που έγινε σε ποντίκια με διαβήτη όπου τα υψηλά επίπεδα υπεροξειδίων των λιπιδίων, οι ROS και η χαμηλή έκφραση SOD μετριάστηκαν έπειτα την χορήγηση CBD για έντεκα εβδομάδες. Το CBD μπορεί να ασκήσει την βιολογική του δράση και με έμμεσο τρόπο ενισχύοντας το ενδοκανναβινοειδές σύστημα, το οποίο παρουσιάζει κι αυτό αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Για παράδειγμα η αύξηση της ανανδαμίδης προκαλούμενη από CBD ενισχύει την σηματοδότηση του PPAR με τον οποίο συνδέεται και ενεργοποιεί. Ο ενεργοποιημένος PPAR μπορεί να μπει στον πυρήνα και σχηματίζοντας ετεροδιμερές με τον RXR (retinoid X receptor) να δράσουν ως μεταγραφικοί παράγοντες και να εκφραστούν αντιοξειδωτικά γονίδια (Kim & Yang, 2013) (Atalay et al., 2019).

### Νευροπροστατευτικές ιδιότητες

Οι αίτια των νευροεκφυλιστικών παθήσεων σε γενικότερα πλαίσια είναι η φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες στα νευρικά κύτταρα, με το CBD λόγω των ιδιοτήτων του να προτείνεται ως θεραπεία για κάποιες από αυτές. Στην νόσο Alzheimer η σηματοδότηση Wnt, που είναι σημαντική για την έκφραση νευροπροστατευτικών γονιδίων, είναι μειωμένη λόγω υπερφωσφορλίωσης κινάσης GSK-3β που οδηγεί την β-κατενίνη σε αποικοδόμηση (Li et al., 2020). Το CBD ρυθμίζει θετικά αυτή την σηματοδότηση αναστέλλοντας την φωσφορλίωση της GSK-3β. Σε μελέτη που έγινε με σκοπό να αποδειχτεί η αντιοξειδωτική δράση του CBD σε νευρικά κύτταρα, σε καλλιέργειες νευρώνων ιππόκαμπου εκτεθειμένες σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> το CBD βελτίωσε σημαντικά την βιωσιμότητά τους. Επίσης το CBD ασκεί νευροπροστατευτική δράση ενισχύοντας την σηματοδότηση από το ενδοκανναβινοειδές σύστημα (Kim et al., 2021). Το FAAH (Fatty Acid Amide Hydrolase) είναι το ένζυμο που αποικοδομεί τον ενδοκανναβινοειδές AEA, που η αναστολή του από το CBD επιτρέπει την αύξηση του AEA, το οποίο συνδέεται στον υποδοχέα CB1 ενεργοποιώντας μονοπάτια που οδηγούν σε νευροπροστασία (αντιαποπτωτικά) (Patricio et al., 2020).

### Αντικαρκινικές ιδιότητες

Ως αντικαρκινικές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν την κανναβιδιόλη, είναι η ικανότητα να επάγει αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, να σταματά τον

κυτταρικό πολλαπλασιασμό, να εξασθενεί την αγγειογένεση στους όγκους και να αναστέλλει την διαδικασία της μετάστασης. Σε πείραμα που χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές οι σειρές καρκίνου του μαστού T-47D και MDA-MB-231 και τους χορηγήθηκε CBD, τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση της έκφρασης του mTOR και της κυκλίνης D1, δύο σημαντικών πρωτεϊνών που προάγουν την κυτταρικά επιβίωση και αναστέλλουν την απόπτωση (η κυκλίνη ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bax) (Sultan et al., 2018). Το CBD ενεργοποιώντας το TRPV1 κανάλι προκαλεί ενδοκυττάρια αύξηση  $Ca^{2+}$  επάγοντας την παραγωγή ROS. Ωστόσο η υπερβολική παραγωγή ROS ευθύνεται για την δημιουργία της κατάστασης ενδοπλασματικού στρες που θα επάγει κυτταρικό θάνατο λόγω ανεπανόρθωτων κυτταρικών βλαβών, αποτελώντας έτσι έναν επιπλέον μηχανισμό απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων. Ο HIF-1a είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιείται σε καταστάσεις υποξίας και ευθύνεται για την έκφραση γονιδίων, στα οποία ανήκουν και τα γονίδια της αγγειογένεσης. Σε καρκινικές σειρές καρκίνου του μαστού, το CBD μπλοκάρει μια πρωτεΐνη που ευθύνεται για τη αποσταθεροποίηση της VHL μιας λιγάσης E3 ουβικουιτίνης, ενζύμου που ουβικουιτινιλιώνει τον HIF-1a. Κατά συνέπεια μειώνεται ο HIF-1a αναστέλλοντας έτσι την αγγειογένεση (Jo et al., 2021).

### Αγχολυτικές και αντιψυχωσικές ιδιότητες

Το CBD μπορεί να δράσει ως αντιψυχωτικό και αγχολυτικό τόσο έμμεσα ενισχύοντας την δράση του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος με αναστολή του FAAH ενζύμου όσο και άμεσα αλληλεπιδρώντας με τον 5-HT<sub>1A</sub> σεροτονινεργικό υποδοχέα. Πείραμα που έγινε σε ποντίκια με μιμούμενα συμπτώματα σχιζοφρένειας, χορηγώντας τον MK-801 που είναι ανταγωνιστής των NMDA νευρώνων, έδειξε πως η χορήγηση CBD ελάττωνε αυτά τα συμπτώματα. Παράλληλα στο ίδιο πείραμα η συγχορήγηση του WAY100635 (ανταγωνιστής του 5-HT<sub>1A</sub>) ανέστειλε τα αντιψυχωτικά αποτελέσματα του CBD, αποδεικνύοντας την δράση του μέσω του 5-HT<sub>1A</sub>. Σε καταστάσεις στρες η έκφραση του 5-HT<sub>1a</sub> είναι αρνητικά ρυθμισμένη, ωστόσο το CBD ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί και δρα ως αγωνιστής του αντισταθμίζοντας τα αποτελέσματα που προκύπτουν λόγω του downregulation, κι έτσι λειτουργεί ως αγχολυτικός παράγοντας (Henson et al., 2021).

### Αντισπασμωδικές ιδιότητες

Σε μια σειρά πειραμάτων που προκαλούνταν σε ποντίκια επιληπτικές κρίσεις με μεθόδους όπως η MES (Maximal Electroshock) ή χρήση πεντυλενοτετραζόλης, το CBD μείωνε αποτελεσματικά την σοβαρότητα αυτών των κρίσεων. Ο μηχανισμός, που εν μέρει εξηγεί την αντισπασμωδική



δράση του CBD, είναι η ανταγωνιστική του δράση με τον υποδοχέα GPR55, ο οποίος συμβάλλει στη νευρωνική διέγερση συμβάλλοντας στην παθοφυσιολογία των κρίσεων. Επίσης η αδενοσίνη ( $A_1$ ,  $A_{2\alpha}$ ) αποτελεί ενδογενές αντισπασμωδικό και η δράση της μπορεί να ενισχυθεί μέσω του CBD, το οποίο αναστέλλει την απομάκρυνση της από την συναπτική σχισμή είτε με πρόσληψη της από τα μακροφάγα είτε την επαναπρόσληψή της από τα μικρογλοία (Lazarini-Lopes et al., 2020).

### 1.9.3. Ανοσορυθμιστική δράση

Το CBD ασκεί την βιολογική του δράση επάγοντας όλες τις προηγούμενες ιδιότητές του μέσω διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών. Ορισμένα από τα μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται και τα αναστέλλει, είναι υπεύθυνα για την επαγωγή φλεγμονωδών καταστάσεων, μέσω της έκφρασης προφλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών. Κάποιοι από τους υποδοχείς που αλληλεπιδρά και μέσω αυτών ασκεί την ανοσοτροποποιητική δράση είναι ο PPAR $\gamma$  που είναι μια λιγάση ουβικιτίνης που αλληλεπιδρά με τον NF- $\kappa$ B τους προσθέτει ουβικιτίνες οδηγώντας στην αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα p65, αποτρέποντας έτσι την έκφραση φλεγμονωδών κυτοκινών όπως TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ . Επίσης το CBD αποτελεί ανταγωνιστή του GPR55, ενός GPCR υποδοχέα του οποίου η ενεργοποίηση προκαλεί αύξηση του ενδοκυτταρικού  $Ca^{2+}$  και ενεργοποίηση των ERK1/2. Σε GPR55 knockout ποντίκια παρουσιάστηκε αυξημένη έκφραση αντιφλεγμονωδών κυτοκινών όπως IL-4 και IL-10, επομένως η απενεργοποίησή του μέσω του CBD δύναται έχει αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα. Ένας πιο έμμεσος τρόπος που ασκεί αντιφλεγμονώδη δράση το CBD είναι μέσω της αναστολής της πρωτεΐνης επαναπρόσληψης της αδενοσίνης. Η αδενοσίνη είναι ένα μόριο που με την ενεργοποίηση της μεσολαβούμενης από cAMP σηματοδότησης αναστέλλει την διαφοροποίηση των T κυττάρων και την έκφραση φλεγμονωδών κυτοκινών όπως τον TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , και του VCAM-1 ενός μορίου κυτταρικής προσκόλλησης που συμβάλλει στην μετανάστευση των κυττάρων. Η μείωση των προφλεγμονωδών αποκρίσεων που προκαλεί καθορίζουν την χρήση ως θεραπεία σε διάφορες φλεγμονώδεις νόσους. Ενδεικτικά ορισμένες από τις ασθένειες για τις οποίες αποτελεί ελπιδοφόρο θεραπευτικό παράγοντα είναι ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I (DM1), η ρευματοειδής αρθρίτιδα (RA), η φλεγμονώδης νόσος των πνευμόνων (ILD, Inflammatory Lung Disease), η σκλήρυνση κατά πλάκας (MS).

Η χορήγηση CBD σε ποντίκια με αυτοάνοσο διαβήτη NOD (nonobese diabetic) (δόση 5 mg/ml την ημέρα) έδειξε μείωση των φλεγμονωδών κυτοκινών TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$  των Th1 κυττάρων και παράλληλα αύξηση κυτοκινών IL-4 και IL-10 που εκκρίνονται από τα Th2 κύτταρα, υποδηλώνοντας έτσι μια ανοσοτροποποιητική δράση με αλλαγή των ανοσολογικών αποκρίσεων από

Th1 σε Th2. Σε μοντέλο ποντικών προκαλούμενης από LPS (λιποπολυσακχαρίτη) οξείας πνευμονικής βλάβης έπειτα από χορήγηση κανναβιδιόλης τα αποτελέσματα έδειξαν μειωμένη μετανάστευση των λευκοκυττάρων στον πνεύμονα και μείωση του TNF- $\alpha$ , IL-6 και των χημειοκινών CCL2 και CXCL2 από μετρήσεις στο βρογχοκυψελιδικό υγρό, με την αντιφλεγμονώδη της δράση να ασκείται μέσω της ενίσχυσης της σηματοδότησης αδενοσίνης-A<sub>2A</sub> υποδοχέα (Ribeiro et al., 2012).

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μια αυτοάνοση νόσος που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή στην περιοχή των αρθρώσεων, με τις κύριες κυτταροκίνες που μεσολαβούν στην φλεγμονή να είναι ο TNF- $\alpha$ , οι IL-1 $\beta$ , IL-6 και IL-17. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε πως το CBD μειώνει την βιωσιμότητα, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την παραγωγή IL-6, IL-8 και MMP-3 αρθρικών ινοβλαστών της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (RASf), τα οποία συμβάλλουν στην φλεγμονή και την καταστροφή των αρθρώσεων. Ο κυτταρικός θάνατος προκαλείται από υπερφόρτωση των μιτοχονδρίων από Ca<sup>2+</sup> μέσω αλληλεπίδρασης του CBD με το TRPA1 (απελευθέρωση Ca<sup>2+</sup> από ER και πρόσληψή του από τα μιτοχόνδρια) και μπλοκάροντας διαύλους Ca<sup>2+</sup> των μιτοχονδρίων (Lowin et al., 2020).

Η σκλήρυνση κατά πλάκας (MS) αποτελεί μια αυτοάνοση φλεγμονώδης νευροεκφυλιστική νόσος με τα T ειδικά λεμφοκύτταρα του εγκεφάλου που αναγνωρίζουν στοιχεία της μυελίνης να παίζουν σημαντικό στην παθογένεια. Στην μεσολάβηση της φλεγμονής στην MS σημαντικό ρόλο παίζουν οι κυτταρικοί πληθυσμοί Th1 και Th17 και οι κυτταροκίνες IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 και IL-17 να είναι ιδιαίτερα αυξημένες στο φλεγμονώδες περιβάλλον, όπως και στην ψωρίαση (Haase & Linker, 2021). Σε in vitro πείραμα που έγινε σε κυτταρική σειρά MOG 35-55-specific encephalitogenic T κυττάρων ή T<sub>MOG</sub> (κύτταρα που όταν χορηγηθούν με ένεση σε ποντίκια προκαλούν αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα) η χορήγηση CBD έδωσε ως αποτελέσματα σημαντική μείωση των IL-6, IL-17 και αύξηση της IL-10, ενώ δεν επηρέασε τα επίπεδα των TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$  (Kozela et al., 2013). Σε μια άλλη in vitro μελέτη ο συνδυασμός THC:CBD 1:1 σε PBMCs ασθενών με MS έδειξε μείωση των κυτοκινών IFN- $\gamma$  και CXCL10 επαγόμενων από TLR3 σηματοδότηση και μείωση TNF- $\alpha$  από TLR4 επαγόμενη σηματοδότηση (Fitzpatrick et al., 2022). Επίσης σε μοντέλο ποντικών MS προκαλούμενο από μόλυνση με τον Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus (TMEV) (επαγάγει φλεγμονώδεις αντιδράσεις όπως η εγκεφαλομυελίτιδα) η χορήγηση CBD προκάλεσε μείωση του VCAM1, μορίου λεμφοκυτταρικής προσκόλλησης και διήθηση λευκοκυττάρων και μείωση των CCL2, CCL5, TNF- $\alpha$  και IL-1 $\beta$  (Peyravian et al., 2020).

#### 1.9.4. CBD και Ψωρίαση

Η χρήση CBD έχει προταθεί και αποδειχτεί ως ελπιδοφόρα θεραπεία για αρκετές δερματοπάθειες όπως η ατοπική δερματίτιδα, η ακμή, τον κνησμό και δερματικές λοιμώξεις. Ωστόσο η θεραπευτική δράση προτείνεται και για τις ψωριασικές πλάκες που χαρακτηρίζονται από υπερπολλαπλασιασμό κερατινοκυττάρων και επαγόμενης NF-κβ φλεγμονής. Μια *in vitro* μελέτη που έγινε στην κυτταρική σειρά HaCaT (μετασχηματισμένη αθάνατη κυτταρική σειρά κερατινοκυττάρων) για δοκιμή της αντιφλεγμονώδους δράσης του CBD έπειτα από διέγερση τους με TNF-α, έδειξε μια δόσοεξαρτώμενη μείωση της έκφρασης του NF-κβ και της MMP-9 (μεταλοπρωτεΐνάση) (Sangionanni et al., 2019). Επιπρόσθετα στις ψωριασικές βλάβες λόγω του υπερπολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων και της φλεγμονής παράγονται αυξημένα ποσά ROS, ευνοώντας τα ουδετερόφιλα που στρατολογούνται στο σημείο να σχηματίσουν NETs, μια διαδικασία που λέγεται NETosis. Πρόκειται για μια «παγίδα ουδετερόφιλων» που προκύπτει από το DNA, που απελευθερώνεται από τον κυτταρικό θάνατο κοκκιοκυττάρων λόγω αυξημένων ROS, και αντιμικροβιακών πρωτεϊνών σχηματίζοντας «δίχτυ» παγιδεύοντας κι άλλα ουδετερόφιλα. Η NETosis επιδεινώνει την ψωρίαση μέσω του βρόγχου θετικής ανάδρασης που σχηματίζει με τα Th17. Το CBD λόγω των αντιοξειδωτικών του ιδιοτήτων εξασθενεί αυτή της διαδικασία (Wójcik et al., 2020).

Η θεραπευτική αξία του CBD έχει παρατηρηθεί και σε κλινικό επίπεδο με τοπική χορήγηση. Πιο συγκεκριμένα σε 20 ασθενής με ψωρίαση τους χορηγήθηκε μια αλοιφή που είχε έλαιο CBD και άλλα φυτικά συστατικά, για τοπική χρήση στο σημείο των δερματικών βλαβών 2 φορές την ημέρα για τρεις μήνες, με τα αποτελέσματα έδειξαν να δείχνουν μείωση του PASI (Palmieri et al., 2019). Επιπλέον η τοπική χρήση ελαίου CBD/CBG σε δυο ασθενείς με ψωρίαση για το χρονικό διάστημα των έξι εβδομάδων για δύο φορές την ημέρα, έδειξε βελτίωση των δερματικών βλαβών στο ποσοστό 16-33% (Martins et al., 2022). Για να υπάρξει, ωστόσο, μια καλύτερη κατανόηση της αποτελεσματικότητας του CBD ως θεραπευτικό παράγοντα της ψωρίασης αναμένονται να γίνουν περαιτέρω κλινικές δοκιμές.

## 2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση *in vitro* της ανοσορυθμιστικής δράσης της κανναβιδιόλης σε PBMCs απομονωμένων από ασθενείς με ψωρίαση. Η πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε είναι η καλλιέργεια και επώαση των PBMCs με διάλυμα κανναβιδιόλης, με ακόλουθη μέτρηση παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών μέσω της τεχνικής κυτταρομετρίας ροής.

### 3. Υλικά και Μέθοδοι

Αρχικό βήμα για να ξεκινήσει το πείραμα είναι η προετοιμασία των PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) που θα χρησιμοποιηθούν στις κυτταροκαλλιέργειες που θα δημιουργηθούν. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν διασφαλίστηκαν είτε με απομόνωσή τους έπειτα από συλλογή αίματος από ασθενείς με ψωρίαση είτε από δείγματα τα οποία είχαν ήδη απομονωθεί και διατηρηθεί σε υγρό άζωτο.

#### 3.1. Απομόνωση PBMCs

##### Υλικά και Αντιδραστήρια

- Δείγμα αίματος
- Ηπαρινισμένη σύριγγα συλλογής αίματος των 20ml
- Tubes των 15ml και 50ml
- Tubes τύπου Eppendorf 1,5ml
- Αποστειρωμένες πιέτες Pasteur
- Διάλυμα φικόλης
- Εμβρυϊκός βόειος ορός (FBS, Fetal Bovine Serum)
- RPMI 1640
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)
- Cryovials

##### Μέθοδος

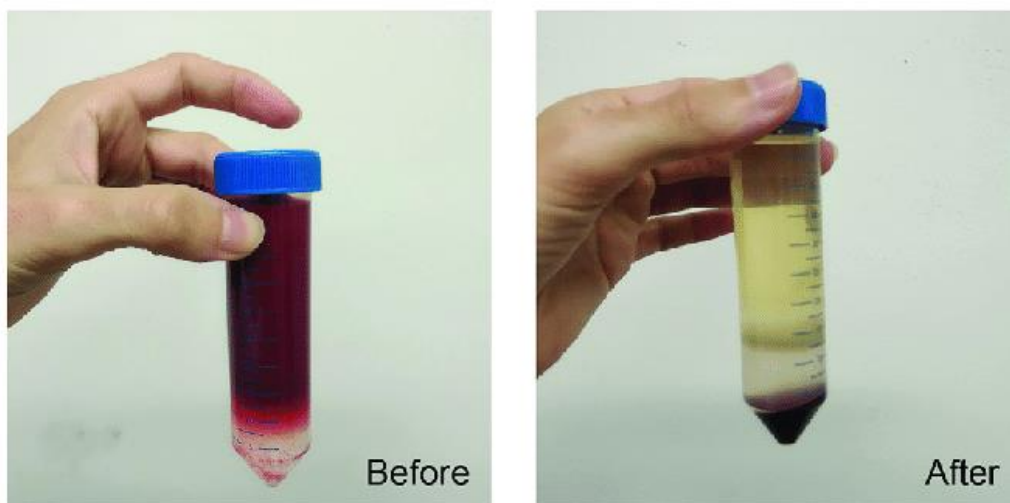
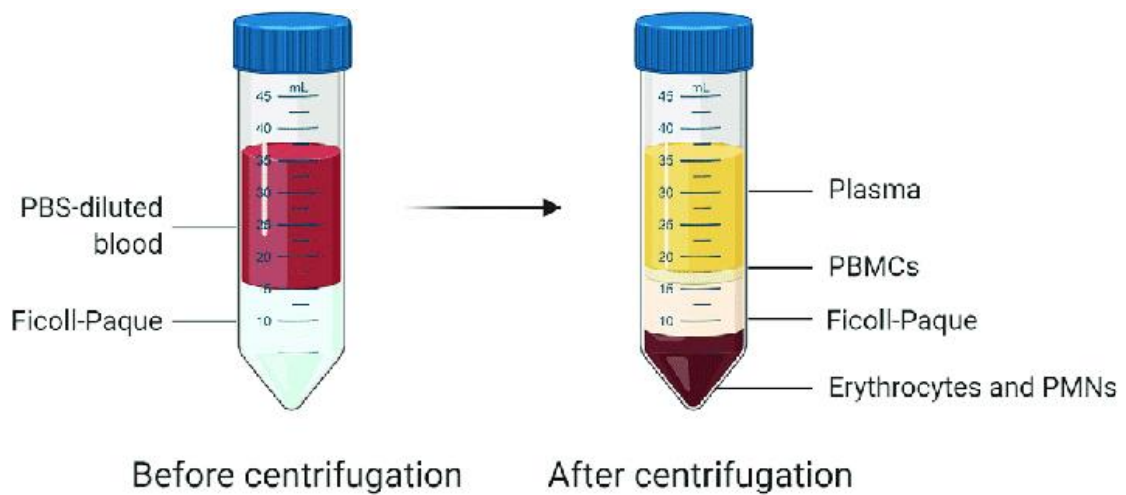
1. Συλλογή δείγματος αίματος από τον ασθενή στην ηπαρινισμένη σύριγγα.
2. Ήπια ανάδευση του αίματος στην σύριγγα
3. Σε tube των 50ml προστίθενται 10ml του διαλύματος φικόλης και επίστρωση των 20ml αίματος (προσθήκη του δείγματος ανά σταγόνα στα τοιχώματα του tube).
4. Φυγοκέντρηση του δείγματος σε 1.800rpm για 20 λεπτά με φρένα στην φυγόκεντρο.
5. Από τις 4 στιβάδες που έχουν προκύψει από την φυγοκέντρηση συλλέγεται η θολερή στιβάδα που βρίσκεται ανάμεσα από αυτή του πλάσματος και αυτή της φικόλης
6. Η στιβάδα που συλλέχθηκε με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur τοποθετείται σε tube των 15ml, στο οποίο προστίθεται RPMI 1640 μέχρι να γεμίσει όλος ο όγκος του, για πλήση των κυττάρων.

7. Φυγοκέντρηση του δείγματος σε 2.200rpm για 5 λεπτά χωρίς να έχει φρένα η φυγόκεντρος.
8. Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναιώρηση του pellet των κυττάρων.

Σε περίπτωση που τα κύτταρα χρησιμοποιηθούν αμέσως μετά για το πείραμα η επαναιώρηση γίνεται σε RPMI 1640. Αν δεν χρησιμοποιηθούν άμεσα τα κύτταρα θα χρειαστεί να διατηρηθούν στο υγρό άζωτο. Τότε η επαναιώρηση του pellet θα γίνει σε διάλυμα περιεκτικότητας 60% FBS, 10% DMSO, 30% RPMI 1640 και τοποθέτηση σε cryovials. Πριν τα δείγματα μπουν στο υγρό άζωτο, τοποθετούνται ένα εικοσιτετράωρο στους -80 °C σε cryobox με ισοπροπανόλη για την ομαλή και σταδιακή ψύξη τους.

Αν το δείγμα κυττάρων που χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί βρισκόταν ήδη στο υγρό άζωτο η διαδικασία προετοιμασίας των κυττάρων είναι η εξής:

- a) Σε tube των 15ml προστίθενται 5ml RPMI 1640.
- b) Μέρος αυτής της ποσότητας ( περίπου 1,5ml) τοποθετείται στο cryovial με τα κύτταρα και γίνεται ήπια ανάδευση αυτών.
- c) Συλλέγεται όλο το περιεχόμενο του cryovial και προστίθεται το tube με το RPMI σταδιακά ανά σταγόνα χωρίς να ακουμπά τα τοιχώματα του tube καθώς πέφτει.
- d) Φυγοκέντρηση σε 2.200rpm για 5 λεπτά χωρίς φρένα στην φυγόκεντρο.
- e) Απόρριψη υπερκείμενου.
- f) Επαναιώρηση του pellet σε διάλυμα PBS με FBS 2%.



**Εικόνα 5** Απομόνωση PBMCs από ηπαρινισμένο δείγμα αίματος. Αριστερά φαίνεται η επίστρωση του αίματος στην φικόλη και δεξιά φαίνεται το δείγμα μετά την φυγοκέντρηση με της θολερή στιβάδα που βρίσκονται τα PBMCs (ανάμεσα στην φικόλη και το πλάσμα) που συλλέγουμε. Πηγή: Lan, K., et al., Isolation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). *Curr Protoc Microbiol*, 2007.

### 3.2. Κυτταροκαλλιέργεια PBMCs

#### Υλικά και αντιδραστήρια

- RPMI 1640
- FBS
- PMA
- Ιονομικίνη
- Μπρεφελδίνη A

- Διάλυμα κανναβιδιόλης (3:1 PBS:DMSO)
- Πλάκα κυτταρικής καλλιέργειας 12 πηγαδιών

### Μέθοδος

Αρχικά αν το δείγμα των κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν για την κυτταροκαλλιέργεια βρισκόταν στο υγρό άζωτο, αφού ξεπαγώσει επαναιωρείται σε RPMI 1640, για να ξεπλυθούν τα κύτταρα από το κυτταροτοξικό DMSO που είχε το ειδικό διάλυμα για το πάγωμά τους και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε 2.200rpm χωρίς φρένα στην φυγόκεντρο. Αν το δείγμα απομονώθηκε την ίδια μέρα προστίθεται RPMI 1640 και φυγοκεντρείται όπως στην προηγούμενη περίπτωση.

1. Προετοιμασία καλλιεργητικού υλικού, το οποίο είναι RPMI 1640 με 10% FBS.
2. Επαναιώρηση των pellet με το καλλιεργητικό υλικό. Στο pellet προστίθεται 1ml του προηγούμενο διαλύματος ανάλογα σε πόσα πηγαδάκια θα τοποθετήσω το δείγμα (π.χ. αν θέλω να σπάσω το δείγμα σε 3 πηγαδάκια, προσθέτω 3ml διαλύματος)
3. Μοίρασμα του επαναιωρημένου δείγματος στις θέσεις-πηγαδάκια της πλάκας καλλιέργειας.
4. Προσθήκη του CBD (20μg/ml) και επώαση για 30 λεπτά στους 37 °C και 5% CO<sub>2</sub>.
5. Μετά το πέρας του χρόνου προστίθενται τα αντιδραστήρια PMA 10μl συγκέντρωσης 50 ng/ml, 1μl ιονομικίνης συγκέντρωσης 1μg/ml και 1 μl Μπρεφελδίνης Α.
6. Επώαση 5 ώρες στους 37 °C και 5% CO<sub>2</sub>.
7. Μετά το πέρας των 5 ωρών τα κύτταρα της καλλιέργειας μαζεύονται σε σωληνάκια τύπου Eppendorf των 1,5ml.

### Διεγερτικά μέσα

**PMA και ιονομικίνη:** Το PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) είναι ένα μόριο που δρα ως ειδικός ενεργοποιητής της πρωτεϊνικής κινάσης PKC. Δρα συνεργατικά με ένα άλλο μόρια την ιονομικίνη, που είναι ιονοφόρο μόρια και διευκολύνει την μεταφορά Ca<sup>2+</sup> εντός του κυττάρου. Η συνεργατική τους δράση έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των T κυττάρων, καθώς και την ενίσχυση και ενεργοποίηση μονοπατιών που οδηγούν σε έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κβ και NFAT με επακόλουθη έκφραση κυτταροκινών (Ai et al., 2013).

**Μπρεφελδίνη Α (Brefeldin A):** Η Brefeldin A είναι ένας μεταβολίτης που προέρχεται από το *Penicillium brefeldianum*. Είναι μια αντι-ιική λακτόνη που έχει ως στόχο την πρωτεΐνη GBF1, ενός GEF παράγοντα υπεύθυνου για την ενεργοποίηση της GTPάσης Arf1 που αλληλεπιδρά με ένα σύμπλοκο το COP-I σημαντικό για την μεταφορά των κυστιδίων μεταφοράς πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύμπλεγμα Golgi. Η brefeldin A είναι αναστρέψιμος αναστολέας του GBF1, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η μεταφορά πρωτεϊνών (εδώ στο πείραμα κυτταροκινών) στο Golgi και έπειτα η εξωκυττάρωσή τους. Έτσι εξασφαλίζεται πως οι κυτταροκίνες θα παραμείνουν εντός των κυττάρων για την μέτρηση τους με την κυτταρομετρία ροής.

### **3.3. Επώαση των κυττάρων με μονοκλωνικά αντισώματα για την κυτταρομετρία ροής**

Για να μπορέσουν τα κύτταρα να διαχωριστούν και να είναι «ορατά» όταν περαστούν από το κυτταρόμετρο θα πρέπει να έχουν μπει «ταμπέλες» σε αυτά. Η χρήση αντισωμάτων με διαφορετικού μήκους κύματος φθορίζον μορίου για κάθε μόριο προσδέτη αποσκοπεί σε αυτή την διαδικασία. Για τον εντοπισμό των διαφορετικών κυτταρικών υποπληθυσμών στοχεύονται για σήμανση επιφανειακά μόρια (ή και ενδοκυττάρια) που είναι χαρακτηριστικά για τον κάθε υποπληθυσμό.

#### Διαδικασία επώασης μονοκλωνικών αντισωμάτων

##### Υλικά

- Staining Buffer (PBS με 2% FBS)
- Μονιμοποιητικό μέσο PFA 2% (παραφορμαλδεΰδη)
- Διάλυμα διαπερατότητας (Permeabilization buffer/ Wash buffer)
- Μονοκλωνικά αντισώματα σημασμένα με φθορίζοντα μόρια

##### Μέθοδος

1. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων που έχουν τοποθετηθεί από την κυτταροκαλλιέργεια, σε σωληνάκια τύπου Eppendorf στις 3.500 στροφές για 3 λεπτά.
2. Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναιώρηση του pellet των κυττάρων με 500μl staining buffer για την πλύση των κυττάρων.
3. Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά σε 3.500 στροφές και απόρριψη υπερκείμενου.
4. Επαναιώρηση του pellet σε 100μl staining buffer



5. Προσθήκη μονοκλωνικών αντισωμάτων ειδικών για εξωκυττάριους-επιφανειακούς μοριακούς δείκτες των κυττάρων και ήπια ανάδευση.
6. Επώαση για 30 λεπτά στους 4 °C.
7. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης ακολουθεί προσθήκη 400μl staining buffer.
8. Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά σε 3.500 στροφές και απόρριψη υπερκείμενου.
9. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 200μl διαλύματος PFA 2%.
10. Επώαση για 10 λεπτά στους 4 °C.
11. Προσθήκη 500μl staining buffer και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά
12. Απόρριψη υπερκείμενου, επαναιώρηση σε 200μl PBS και overnight διατήρηση στους 4 °C (καθώς το πείραμα συνεχιζόταν την επόμενη ημέρα).
13. Προσθήκη 400μl staining buffer και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά σε 3.500 στροφές.
14. Απόρριψη υπερκείμενου
15. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 400μl Permeabilization buffer και επώαση για 15 λεπτά στους 4 °C.
16. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά.
17. Απόρριψη υπερκείμενου και επαναιώρηση των κυττάρων σε 100μl Permeabilization buffer.
18. Προσθήκη μονοκλωνικών αντισωμάτων ειδικών για στόχευση ενδοκυττάριων μορίων (εδώ κυτταροκινών) και ήπια ανάδευση.
19. Επώαση στους 4 °C για 45 λεπτά.
20. Προσθήκη 400μl Permeabilization buffer και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά.
21. Απόρριψη υπερκείμενου και επαναιώρηση κυττάρων σε 500μl PBS.
22. Πέρασμα των κυττάρων από το κυτταρόμετρο και λήψη αποτελεσμάτων.

### Panel αντισωμάτων

Κυτταρικός πληθυσμός	Μονοκλωνικά αντισώματα
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> παράγωγα IL-17 T κύτταρα	CD3 <sup>+</sup> Anti-human FITC CD4 <sup>+</sup> Anti-human PeCy7 IL-17A Anti-human PerCP
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> παράγωγα IFN-γ T κύτταρα	CD3 <sup>+</sup> Anti-human FITC CD4 <sup>+</sup> Anti-human PeCy7 IFN-γ Anti-human APC-Cy7

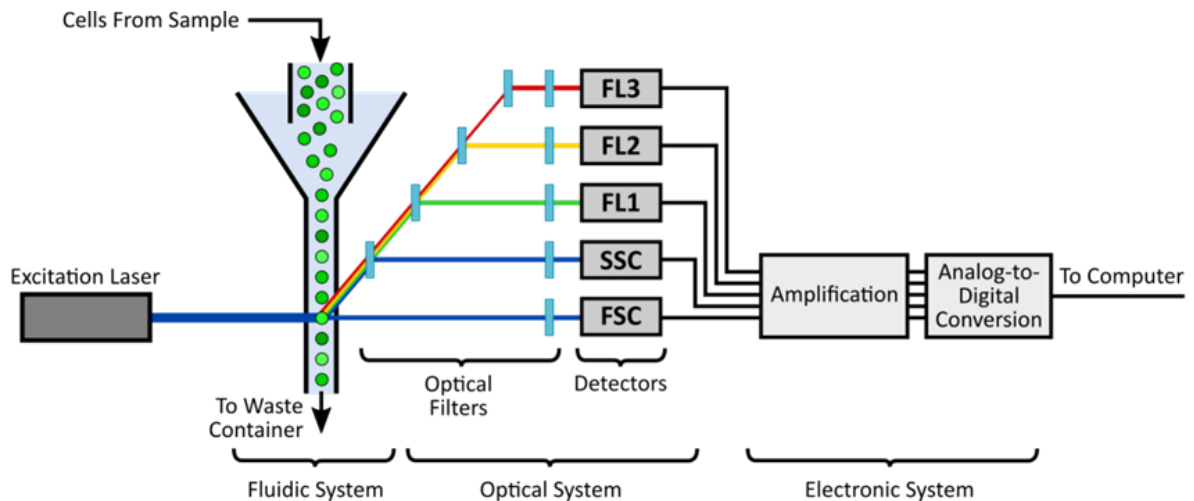
NK κύτταρα που παράγουν IFN-γ	CD56 <sup>+</sup> Anti-human PE IFN-γ Anti-human APC-Cy7
NKT κύτταρα που παράγουν IFN-γ	CD3 <sup>+</sup> Anti-human FITC CD56 <sup>+</sup> Anti-human PE IFN-γ Anti-human APC-Cy7

### Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία αποτελεί μια ποσοτική και αυτοματοποιημένη μέθοδο ανίχνευσης και μέτρησης πολλαπλών φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών ορισμένων σωματιδίων, όπως κυττάρων, επιτρέποντας την ανάλυση χιλιάδων μορίων ανά δευτερόλεπτο. Η τεχνική αυτή βρίσκει εφαρμογή στους τομείς της έρευνας και της κλινικής πράξης. Κάποιες από τις εφαρμογές της είναι ο διαχωρισμός κυτταρικών πληθυσμών του ανοσοποιητικού, καθορισμός φάσεων του κυτταρικού κύκλου, καθορισμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού, εύρεση μικροοργανισμών, διάγνωση καρκίνων (π.χ. λεμφοϋπερπλασίες).

Το κυτταρόμετρο περιλαμβάνει τρία συστήματα που είναι τα εξής, το σύστημα ροής υγρών, το οπτικό σύστημα (περιλαμβάνει πηγή φωτός-λέιζερ, φίλτρα, ανιχνευτές φωτός) και το ηλεκτρονικό-υπολογιστικό. Αρχικά μόλις το δείγμα εισέλθει στο κυτταρόμετρο, μέσω συστήματος ροής το δείγμα μεταφέρεται στο θάλαμο ροής, όπου «εξαναγκάζει» τα κύτταρα να περνά ένα ένα από την πηγή φωτός που είναι το λέιζερ. Όταν το κύτταρο περάσει από την πηγή φωτός και προσπίπτει σε αυτό το φως, τότε θα προκύψει σκεδασμός φωτός και παράλληλα εκπομπή φθορίζοντος φωτός (λόγω του των φθορίζοντων μορίων των αντισωμάτων). Στο μηχανήμα υπάρχουν ειδικοί ανιχνευτές που ανιχνεύουν τις διαφορετικού μήκους κύματος φθορίζουσες χρωστικές των αντισωμάτων. Από το σκεδασμό του ορατού φωτός υπάρχουν ανιχνευτές αντιλαμβάνονται πρόσθιο (Forward scatter, FS) και τον πλάγιο (Sideward scatter, SS) σκεδασμό. Το FS που προκύπτει έχει να κάνει με τον όγκο του κυττάρου, ενώ το SS έχει να κάνει με την εσωτερική πολυπλοκότητα του κυττάρου. Το ηλεκτρονικό σύστημα θα τροποποιήσει το αναλογικό σήμα σε ψηφιακό, δηλαδή μετατρέπει τα σήματα από το FS, SS και τα σήματα φθορισμού σε ηλεκτρικά σήματα που θα μπου και θα επεξεργαστούν από τον υπολογιστή (McKinnon, 2018).

Στην παρούσα μελέτη ο κυτταρομετρητής ροής που χρησιμοποιήθηκε είναι ο Guava easyCyte™ της Millipore-Merck και η επιμέρους ανάλυση δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα FlowJo.



**Εικόνα 6** Κυτταρομετρία ροής, η πορεία ανάλυσης του δείγματος στο κυτταρόμετρο. Πηγή: <https://www.aatbio.com/resources/assaywise/2019-8-1/fundamentals-of-flow-cytometry>

## ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

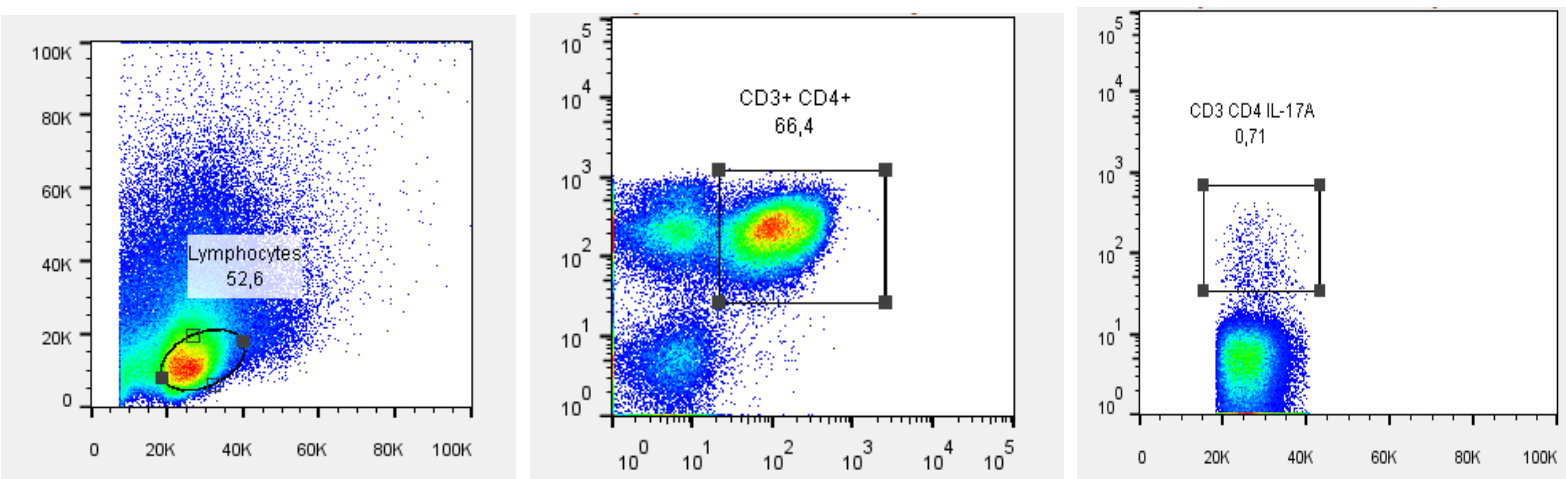
Ως προς την ανάλυση των δεδομένων, το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζει δείκτες κυτταρικής επιφάνειας και μέσες εντάσεις φθορισμού (MFI) τους αποδόθηκε ως ο μέσος όρος των ατόμων σε κάθε ομάδα. Η διακύμανση σε κάθε ομάδα ασθενών ορίστηκε μέσω σταθερής απόκλισης (Standard Deviation, SD). Διαφορές μεταξύ υγιών (κοντρόλς) και ασθενών δοκιμάστηκαν με two-tailed test, με μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και το μη παραμετρικό τεστ Mann-Whitney. Τιμές με  $P \leq 0,05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με την χρήση του προγράμματος GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## **4. Αποτελέσματα**

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από PBMCs 29 ασθενών με ψωρίαση ανεξάρτητου ηλικιακού περιορισμού εκ των οποίων ήταν 6 γυναίκες και 23 άνδρες. Ως κοντρόλ χρησιμοποιήθηκαν δείγματα 9 υγιών ατόμων ανεξάρτητου ηλικιακού περιορισμού εκ των οποίων ήταν 5 γυναίκες και 4 άνδρες.

## Προσδιορισμός λεμφοκυτταρικού πληθυσμού και ανάλυση υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων

Αρχικά από την ανάλυση η πρώτη διαδικασία που γίνεται είναι ο προσδιορισμός και διαχωρισμός του πληθυσμού των λεμφοκυττάρων από τα υπόλοιπα κύτταρα, μια διαδικασία που ονομάζεται «gating». Από την περαιτέρω ανάλυση εντός του συγκεκριμένου υποπληθυσμού θα γίνει το gating και για τους υπόλοιπους υποπληθυσμούς βάση τους επιφανειακούς δείκτες. Για το gating των βιώσιμων λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκαν στον γ άξονα ο Sideward Scatter και στο x άξονα ο Forward Scatter. Αντίστοιχα, το gating των υπόλοιπων υποπληθυσμών προκύπτει βάση την επιλογή των επιφανειακών δεικτών που τα χαρακτηρίζουν, δηλαδή χρησιμοποιώντας τους δείκτες CD56/CD3 γίνεται η επιλογή των NK κυττάρων CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> και των NKT κυττάρων CD56<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>, ενώ χρησιμοποιώντας τους δείκτες CD3/CD4 γίνεται η επιλογή των CD4<sup>+</sup> T κυττάρων CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>.

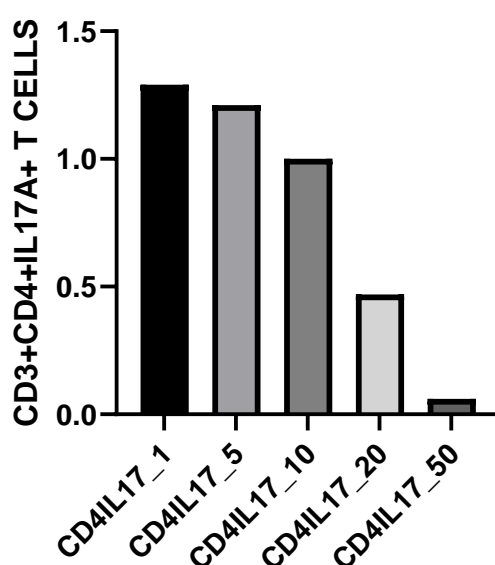


**Εικόνα 7** Gating του λεμφοκυτταρικού πληθυσμού (αριστερά), των CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων (κέντρο) και των CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> θετικών στην IL-17A T κυττάρων (δεξιά) στο πρόγραμμα ανάλυσης.

## Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων κανναβιδιόλης στην παραγωγή IL17A από T κύτταρα διεγερμένα με PMA/ ιονομικίνη

Βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν πως τα όρια χρήσης της κανναβιδιόλης που χρησιμοποιούνται συνήθως κυμαίνονται μεταξύ των συγκεντρώσεων 1μg/ml-20μg/ml χωρίς να επηρεάζεται η κυτταρική βιωσιμότητα, ενώ σε συγκέντρωση από 50μg/ml και πάνω τα κύτταρα δεν επιβιώνουν λόγω κυτταροτοξικότητας που παρουσιάζει το CBD σε αυτές τις συγκεντρώσεις.

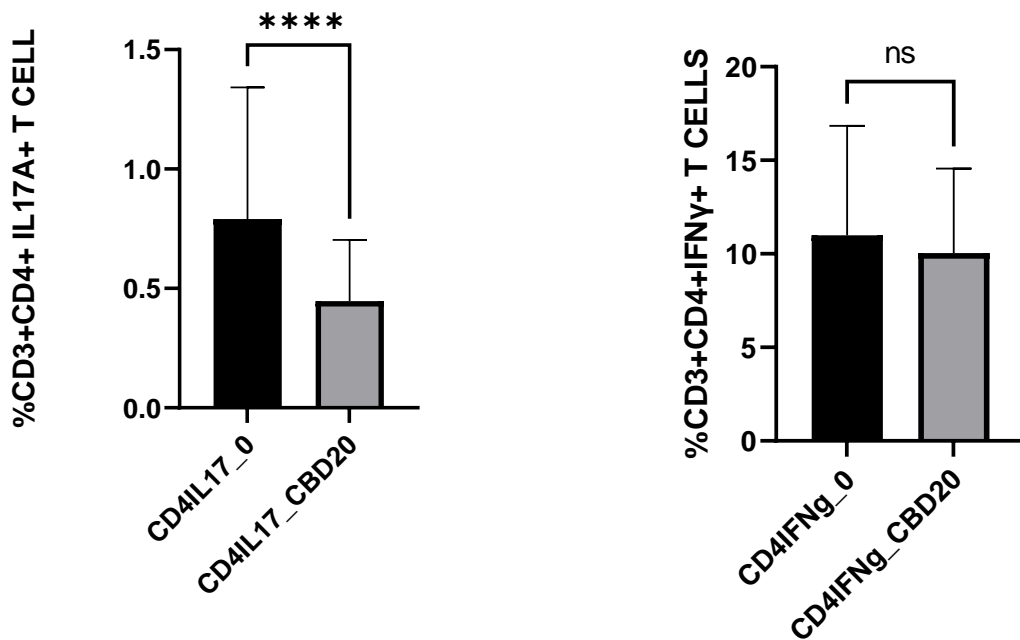
Επομένως για να επαληθευτούν τα βιβλιογραφικά δεδομένα και για να βρεθεί το εύρος των συγκεντρώσεων που θα επηρεάσει η κανναβιδιόλη την παραγωγή IL-17A, έγινε επώαση των κυττάρων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1, 5, 10, 20 και 50μg/ml). Παρατηρήθηκε πως η παραγωγής IL-17A άρχισε να μειώνεται από την συγκέντρωση κανναβιδιόλης 10μg/ml και πάνω, με την συγκέντρωση που εμφάνισε την μέγιστη δράση χωρίς όμως να επηρεάσει την βιωσιμότητα των κυττάρων να είναι τα 20μg/ml. Στην συγκέντρωση 50μg/ml η IL-17A έχει σχεδόν μηδενιστεί, εφόσον τα κύτταρα σε αυτή την συγκέντρωση δεν έχουν επιβιώσει.



**Εικόνα 8** Δοσοεξαρτώμενη μείωση της παραγωγής της IL17-A σε CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T κύτταρα.

#### Επίδραση της κανναβιδιόλης στην παραγωγή των IL-17A και IFN-γ σε CD4<sup>+</sup> T κυττάρων από PBMCs ασθενών με ψωρίαση.

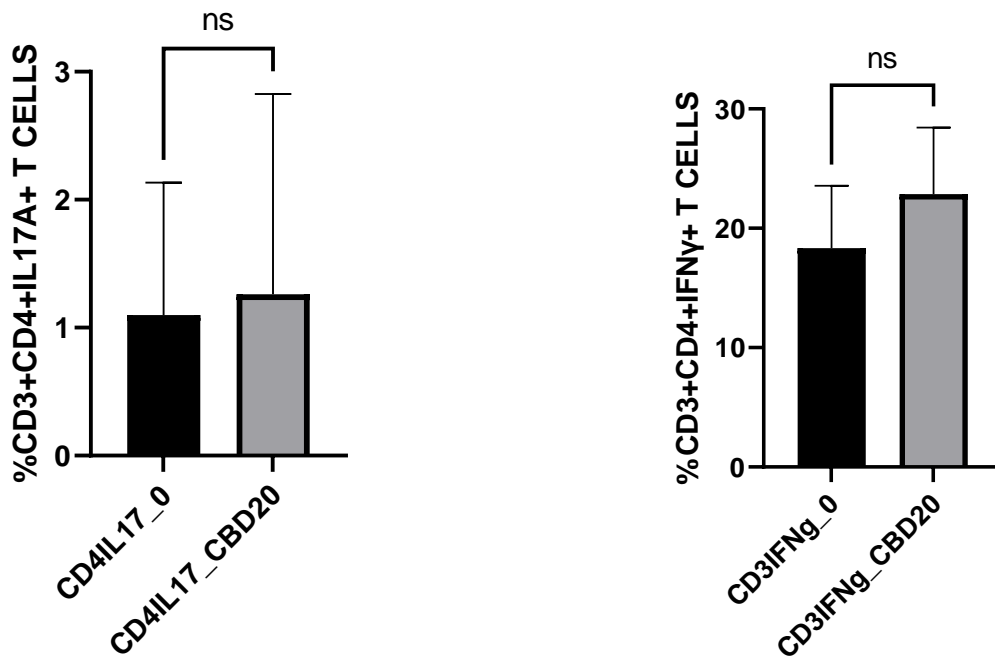
Έπειτα την επώαση των PBMCs ασθενών με ψωρίαση σε καλλιέργειες με συγκέντρωση κανναβιδιόλης 20μg/ml, δηλαδή της συγκέντρωσης που βρέθηκε να ασκεί την μέγιστη βιολογική δράση, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις αναλύσεις των δεδομένων της κυτταρομετρίας ροής έδωσαν τα ακόλουθα συμπεράσματα. Όσο αφορά την παραγωγή της IL-17A τα αποτελέσματα έδειξαν πολύ σημαντική μείωση της παραγωγής, με αυτή να φτάνει σχεδόν στο μισό της αρχικής ποσότητας. Αντίθετα, η κανναβιδιόλη φαίνεται να μην επηρεάζει ιδιαίτερα την παραγωγή της IFN-γ στα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα.



**Εικόνα 9** Επίδραση των συγκεντρώσεων της IL-17A και IFN-γ έπειτα της χορήγησης 20μg/ml CBD σε CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T κύτταρα ασθενών με ψωρίαση.

Επίδραση της κανναβιδιόλης στην παραγωγή των IL-17A και IFN-γ σε CD4<sup>+</sup> T κυττάρων από PBMCs υγιών ατόμων.

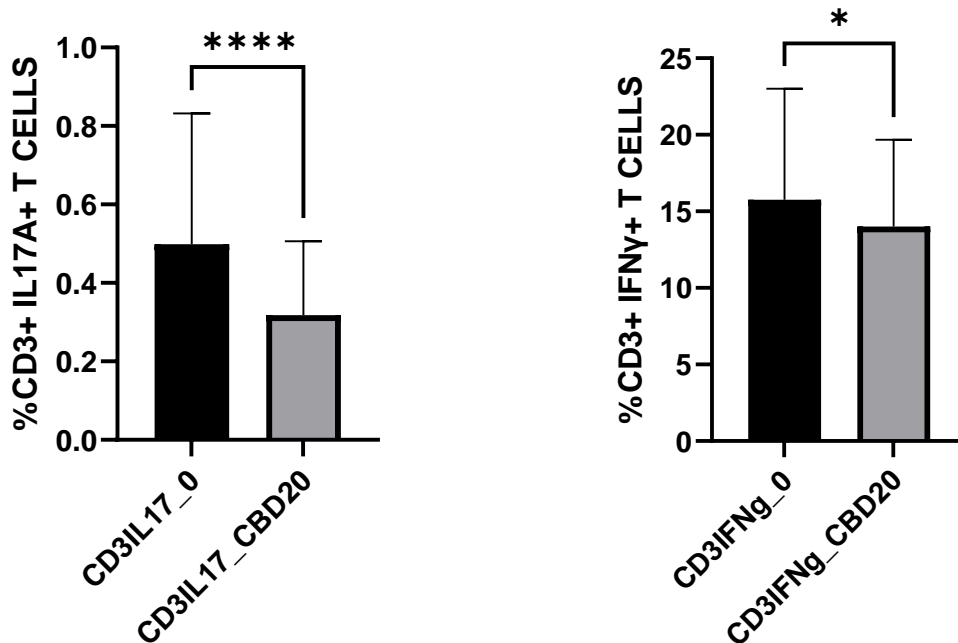
Για να υπάρξει σύγκριση των ανοσορυθμιστικών επιδράσεων που έχει η κανναβιδιόλη και να αποδειχτεί το κατά πόσο επηρεάζει ειδικά την παραγωγή κυτταροκινών στα PBMCs ασθενών με ψωρίαση, ακολούθησαν πειράματα όπου κύτταρα υγιών ατόμων καλλιεργήθηκαν με 20μg/ml CBD. Τα αποτελέσματα έπειτα από στατιστική ανάλυση του συνόλου των υγιών ατόμων έδειξαν να μην επηρεάζουν στατιστικά σημαντικά την παραγωγή της IL-17A, ωστόσο στην περίπτωση της IFN-γ παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση στην παραγωγή της, η οποία όμως δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική.



**Εικόνα 10** Επίδραση των συγκεντρώσεων της IL-17A και IFN-γ έπειτα της χορήγησης 20μg/ml CBD σε CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T κύτταρα υγιών ατόμων.

Επίδραση της κανναβιδιόλης στην παραγωγή των IL-17A και IFN-γ σε CD3<sup>+</sup> T κυττάρων από PBMCs ασθενών με ψωρίαση.

Έπειτα την επώαση των PBMCs ασθενών με ψωρίαση σε καλλιέργειες με συγκέντρωση κανναβιδιόλης 20μg/ml, μετρήθηκαν και οι αλλαγές των επιπέδων των συγκεντρώσεων των κυτοκινών IL-17A και IFN-γ σε ολόκληρο τον πληθυσμό των CD3<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με αυτά που παρουσιάστηκαν στον CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T κυττάρων, με την IL-17A να μειώνεται στατιστικά σημαντικά έπειτα την χορήγηση 20μg/ml CBD, ενώ η συγκέντρωση της IFN-γ να μειώνεται σε ένα πολύ μικρό ποσοστό από το CBD στα κύτταρα ασθενών με ψωρίαση.

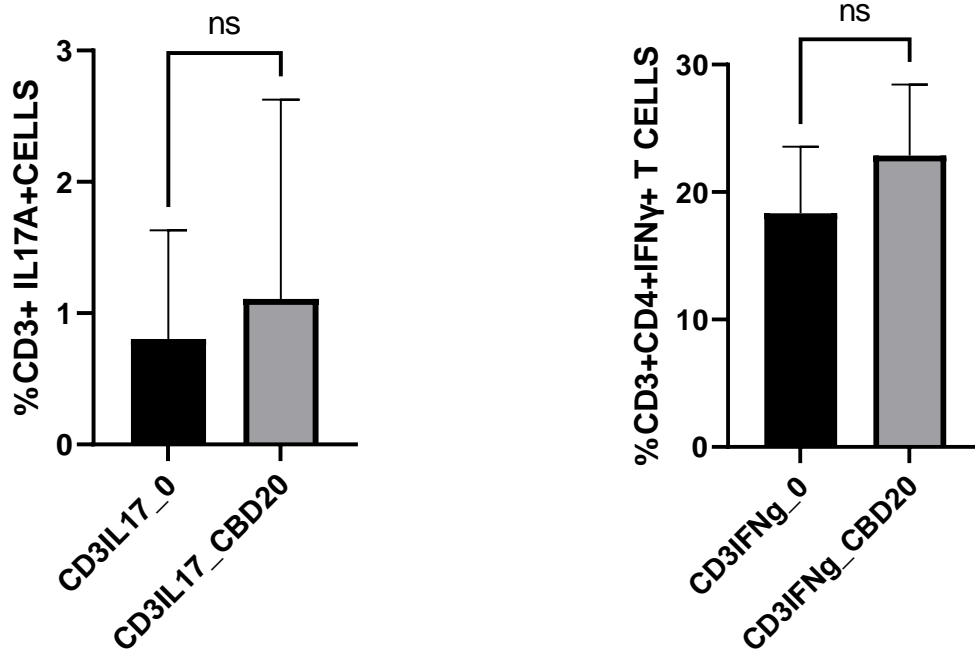


**Εικόνα 11** Επίδραση των συγκεντρώσεων της IL-17A και IFN-γ έπειτα της χορήγησης 20μg/ml CBD σε CD3<sup>+</sup> T κύτταρα ασθενών με ψωρίαση.

Επίδραση της κανναβιδιόλης στην παραγωγή των IL-17A και IFN-γ σε CD3<sup>+</sup> T κυττάρων από PBMCs υγιών ατόμων.

Αντίστοιχα για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα των ανοσοτροποποιητικών επιδράσεων που ασκεί η κανναβιδιόλη στην παραγωγή IFN-γ και IL-17A στο σύνολο του πληθυσμού CD3<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων στους ασθενείς με ψωρίαση, έπειτα της χορήγησης 20μg/ml CBD σε κύτταρα υγιών ατόμων έγινε μέτρηση των συγκεντρώσεων αυτών των δύο κυτοκινών. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια μικρή αύξηση στην συγκέντρωσή τους, η οποία με την στατιστικά ανάλυση που έγινε να θεωρείται μη σημαντική.

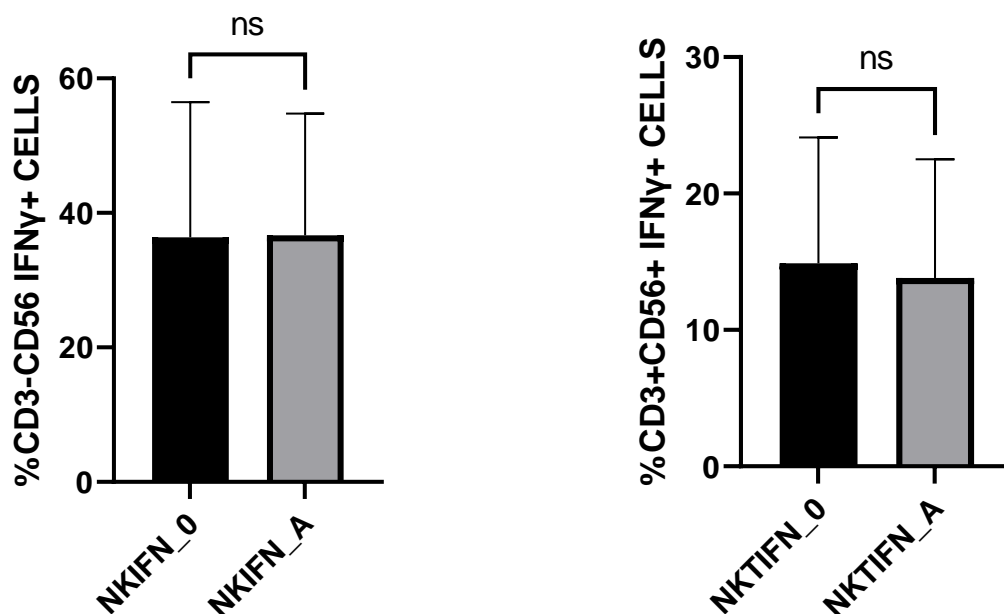




**Εικόνα 12** Επίδραση των συγκεντρώσεων της IL-17A και IFN- $\gamma$  έπειτα της χορήγησης 20 $\mu$ g/ml CBD σε CD3<sup>+</sup> T κύτταρα υγιών ατόμων.

Επίδραση της κανναβιδιόλης ως προς την παραγωγή IFN- $\gamma$  στους κυτταρικούς πληθυσμούς CD56<sup>+</sup> κύτταρα (NK cells) και CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> κύτταρα (NKT cells) σε PBMCs ασθενών με ψωρίαση.

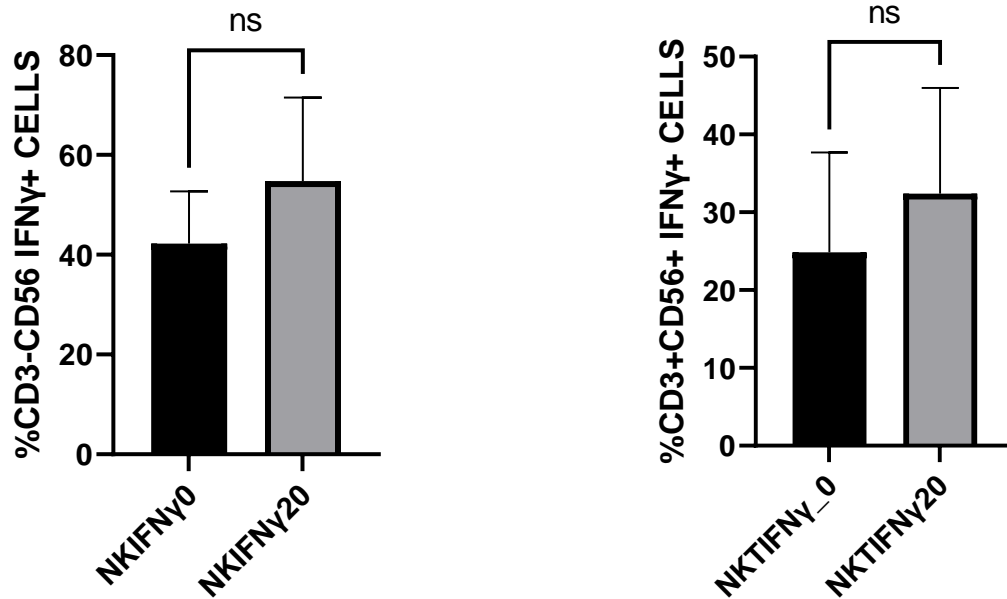
Δύο επιπλέον κυτταρικοί πληθυσμοί που μελετήθηκαν σε PBMCs 20 ασθενών ως προς την επίδραση της κανναβιδιόλης στην παραγωγή της IFN- $\gamma$  από αυτούς, είναι τα NK και NKT κύτταρα. Και γι' αυτούς τους πληθυσμούς η συγκέντρωση κανναβιδιόλης που επώαστηκαν σε κυτταροκαλλιέργεια ήταν 20 $\mu$ g/ml. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν ίδια και για τους δύο πληθυσμούς, με την κανναβιδιόλη να μην επηρεάζει σε κανέναν την παραγωγή της IFN- $\gamma$ .



**Εικόνα 13** Επίδραση στις συγκεντρώσεις της IFN-γ έπειτα της χορήγησης 20μg/ml CBD σε NK (αριστερά) και NKT (δεξιά) κύτταρα ασθενών με ψωρίαση.

Επίδραση της κανναβιδιόλης ως προς την παραγωγή IFN-γ στους κυτταρικούς πληθυσμούς CD56<sup>+</sup> κύτταρα (NK cells) και CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> κύτταρα (NKT cells) σε PBMCs υγιών ατόμων.

Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων και σε αυτή την περίπτωση των NK και NKT πληθυσμών έγινε επώαση με κανναβιδιόλη 20μg/ml και έπειτα μέτρηση των επιπέδων της IFN-γ σε κύτταρα 8 υγιών ατόμων. Ωστόσο, τα αποτελέσματα δεν διέφεραν ιδιαίτερα από αυτά των ασθενών, καθώς παρόλο που φάνηκε μια μικρή αύξηση, από την στατιστική ανάλυση θεωρήθηκε μη στατιστικά σημαντική.



**Εικόνα 14** Επίδραση στις συγκεντρώσεις της IFN-γ έπειτα της χορήγησης 20μg/ml CBD σε NK (αριστερά) και NKT (δεξιά) κύτταρα υγιών ατόμων.

## 5. Συζήτηση

Η ψωρίαση αποτελεί μια χρόνια αυτοάνοση φλεγμονώδη νόσο που πλήττει το 2-3% του παγκόσμιου πληθυσμού. Χαρακτηριστικό της αποτελεί η δυσλειτουργία και απορύθμιση των κυττάρων του ανοσοποιητικού και ο υπερπολλαπλασιασμός των κερατινοκυττάρων με αποτέλεσμα τον σχηματισμό εκτεταμένων δερματικών βλαβών. Βασικές προφλεγμονώσεις κυτταροκίνες που συμβάλλουν στην παθογένεια είναι οι IL-17, IL-22, L-23, IFN-γ και TNF-α. Αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό νόσημα που η εκδήλωσή του σχετίζεται τόσο από την ύπαρξη μεταλλάξεων σε γονίδια ευαισθησίας για εμφάνιση ψωρίασης όσο και με το περιβάλλον στο οποίο εκτίθεται το άτομο-ασθενής, ενώ παράλληλα είναι πιθανόν να εμφανίσει ο ασθενής συννοσηρότητες με άλλες διαταραχές. Οι πληθυσμοί CD4 T κύτταρα, CD3 T κύτταρα παράγουν IL-17 και IFN-γ, ενώ οι NK και NKT παράγουν IFN-γ, οι οποίες αποτελούν κυτταροκίνες που συμβάλλουν στην παθογένεια της νόσου όπως προαναφέρθηκε.

Δεδομένο της ανοσοτροποποιητικής δράσης της κανναβιδιόλης σε διάφορες φλεγμονώδης νόσους, όπως σε μελέτες που έγιναν για την MS, με παράδειγμα την *in vitro* μελέτη σε κυτταρικές σειρές MOG 35-55-specific encephalitogenic T κυττάρων ή T<sub>MOG</sub>, όπου η χορήγηση CBD έδωσε ως αποτελέσματα σημαντική μείωση τις IL-17 και ενώ δεν επηρέασε τα επίπεδα της IFN- $\gamma$  (Kozela et al., 2013), σκοπός της παρούσας μελέτης στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας ήταν να μελετηθεί η επίδραση της κανναβιδιόλης ως προς την έκφραση των κυτοκινών IL-17A και IFN- $\gamma$  σε ορισμένους από τους πληθυσμούς των PBMCs σε δείγματα ασθενών με ψωρίαση. Οι πληθυμοί που μελετήθηκαν ήταν CD3<sup>+</sup> T, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T, NK και NKT. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού η πειραματική διαδικασία που πραγματοποιήθηκε περιλάμβανε ένα *in vitro* πείραμα με προετοιμασία κυτταροκαλλιεργιών των PBMCs ασθενών και υγιών ατόμων, την επώαση τους με κανναβιδιόλη και διέγερση με τα χημικά PMA/ιονομικίνη. Για τον προσδιορισμό της παραγωγής των κυτταροκινών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν αρκετά ενθαρυντικά, καθώς παρά το γεγονός ότι η κανναβιδιόλη δεν τροποποιούσai την παραγωγή της IFN- $\gamma$ , μείωνε σε σημαντικό βαθμό (περίπου 50% μείωση) την παραγωγή της IL-17A στους CD3<sup>+</sup> T και CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T πληθυσμούς στα PBMCs των ασθενών, ενώ η παραγωγή της IL-17A σε PBMCs υγιών ατόμων φάνηκε να μην επηρεάστηκε. Αυτό ίσως υποδηλώνει πως η κανναβιδιόλη έχει μια επιλεκτική δράση τροποποίησης στα κύτταρα των πάσχοντων ατόμων. Η IL-17 αποτελεί όπως έχει προαναφερθεί μια κυτταροκίνη με καίριο ρόλο στην παθογένεια της νόσου καθώς επάγει τον υπερπολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων, ενώ από τις βασικότερες θεραπείες που εφαρμόζονται στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της ψωρίασης είναι παράγοντες που μπλοκάρουν τόσο την παραγωγή όσο και την δράση αυτής της κυτταροκίνης. Τέτοιου είδους θεραπευτικούς παράγοντες αποτελούν τα secukinumab και ixekizumab που είναι αντισώματα, τα οποία δεσμεύουν την IL-17A και το brodalumab που στοχεύει τον υποδοχέα IL-17AR. Στην παρούσα μελέτη δεν εξετάστηκε ο φωσφορυλιωμένος STAT3 που είναι ο μεταγραφικός παράγοντας για την έκφραση της IL-17, ώστε να δούμε αν επηρεάζεται από το CBD. Ωστόσο από βιβλιογραφικά δεδομένα και πιο συγκεκριμένα σε μια μελέτη που έγινε χρησιμοποιώντας T<sub>MOG</sub> κυτταρική σειρά φάνηκε να μειώνει τον φωσφορυλιωμένο STAT3. Παράλληλα σε συνκαλλιέργεια με CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T κύτταρα παρουσία CBD φάνηκε να αυξάνει σε αυτά την έκφραση των επιφανειακών υποδοχέων LAG3 και CD69 (άρα CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAG3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T κύτταρα που αποτελούν υποπληθυσμό ρυθμιστικών T). Η έκφραση CD69 αποτρέπει τα CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T κύτταρα να γίνουν Th17, ενώ ο LAG3 είναι ένα

σημαντικό μόρια την ανεργεία των Th17 (Kozela et al., 2015). Επίσης γνωρίζοντας πως το CBD συμβάλλει στην ενίσχυση του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος μέσω αναστολής ενζύμων αποικοδόμησης των ενδοκανναβινοειδών και δεδομένου ότι το ενδοκανναβινοειδές σύστημα συμβάλλει στην μείωση της IL-17, ίσως με αυτό τον τρόπο να λειτουργεί και στην περίπτωση της ψωρίασης.

Για την επαλήθευση αυτών των *in vitro* αποτελεσμάτων, θα ήταν χρήσιμες μετέπειτα έρευνες και σε *in vivo* πειράματα. Ωστόσο η κανναβιδιόλη λόγω της λιποδιαλυτής της φύσης και της χαμηλής της υδροδιαλυτότητας, άρα χαμηλή και ακανόνιστη διαλυτότητα σε υδάτινα περιβάλλοντα όπως ο γαστρεντερικός σωλήνας, παρουσιάζει βιοδιαθεσιμότητα σε ποσοστό 6% επί το στόματος χορήγηση ενώ φτάνει το 31% όταν λαμβάνεται μέσω της εισπνοής. Επίσης παρουσιάζει υψηλό μεταβολισμό πρώτου περάσματος (από το ήπαρ), με το 70-75% της ποσότητας που έχει χορηγηθεί επί του στόματος να έχει μεταβολιστεί πριν φτάσει στην συστηματική κυκλοφορία στον άνθρωπο (Pagano et al., 2020). Επομένως, σε μετέπειτα *in vivo* μελέτες θα μπορούσαν να στοχεύσουν στην κατασκευή κάποιου σκευάσματος με το οποίο θα μπορούσε να χορηγηθεί η κανναβιδιόλη, ώστε η βιοδιαθεσιμότητά της να φτάσει την συγκέντρωση στην οποία παρουσιάζει την μέγιστη δραστηριότητά της στα κύτταρα. Τέλος, μελλοντικές κλινικές μελέτες θα πλαισίοναν την έρευνα όσο αφορά την ανοσοτροποποιητική δράση της στους ασθενείς με ψωρίαση.

## 6. Βιβλιογραφία

- Ai, W., Li, H., Song, N., Li, L., & Chen, H. (2013). Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. *Int J Environ Res Public Health*, *10*(9), 3834-3842. <https://doi.org/10.3390/ijerph10093834>
- Atalay, S., Jarocka-Karpowicz, I., & Skrzydlewska, E. (2019). Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. *Antioxidants (Basel)*, *9*(1). <https://doi.org/10.3390/antiox9010021>
- Badri, T., Kumar, P., & Oakley, A. M. (2022). Plaque Psoriasis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing
- Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.
- Ben Abdallah, H., Johansen, C., & Iversen, L. (2021). Key Signaling Pathways in Psoriasis: Recent Insights from Antipsoriatic Therapeutics. *Psoriasis (Auckl)*, *11*, 83-97. <https://doi.org/10.2147/ptt.S294173>

- Brandon, A., Mufti, A., & Gary Sibbald, R. (2019). Diagnosis and Management of Cutaneous Psoriasis: A Review. *Adv Skin Wound Care*, 32(2), 58-69. <https://doi.org/10.1097/01.Asw.0000550592.08674.43>
- Branisteanu, D. E., Cojocaru, C., Diaconu, R., Porumb, E. A., Alexa, A. I., Nicolescu, A. C., Brihan, I., Bogdanici, C. M., Branisteanu, G., Dimitriu, A., Zemba, M., Anton, N., Toader, M. P., Grechin, A., & Branisteanu, D. C. (2022). Update on the etiopathogenesis of psoriasis (Review). *Exp Ther Med*, 23(3), 201. <https://doi.org/10.3892/etm.2022.11124>
- Cai, Y., Fleming, C., & Yan, J. (2012). New insights of T cells in the pathogenesis of psoriasis. *Cell Mol Immunol*, 9(4), 302-309. <https://doi.org/10.1038/cmi.2012.15>
- Cencioni, M. T., Chiurchiù, V., Catanzaro, G., Borsellino, G., Bernardi, G., Battistini, L., & Maccarrone, M. (2010). Anandamide suppresses proliferation and cytokine release from primary human T-lymphocytes mainly via CB2 receptors. *PLoS One*, 5(1), e8688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008688>
- Chalmers, R., O'Sullivan, T., Owen, C. M., & Griffiths, C. E. (2019). WITHDRAWN: Interventions for guttate psoriasis. *Cochrane Database Syst Rev*, 4(4), Cd001213. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001213.pub2>
- Chanda, D., Neumann, D., & Glatz, J. F. C. (2019). The endocannabinoid system: Overview of an emerging multi-faceted therapeutic target. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 140, 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.11.016>
- Chiurchiù, V., Rapino, C., Talamonti, E., Leuti, A., Lanuti, M., Gueniche, A., Jourdain, R., Breton, L., & Maccarrone, M. (2016). Anandamide Suppresses Proinflammatory T Cell Responses In Vitro through Type-1 Cannabinoid Receptor-Mediated mTOR Inhibition in Human Keratinocytes. *J Immunol*, 197(9), 3545-3553. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500546>
- Crocq, M. A. (2020). History of cannabis and the endocannabinoid system *Dialogues Clin Neurosci*, 22(3), 223-228. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2020.22.3/mcrocc>
- Damiani, G., Bragazzi, N. L., Karimkhani Aksut, C., Wu, D., Alicandro, G., McGonagle, D., Guo, C., Dellavalle, R., Grada, A., Wong, P., La Vecchia, C., Tam, L. S., Cooper, K. D., & Naghavi, M. (2021). The Global, Regional, and National Burden of Psoriasis: Results and Insights From the Global Burden of Disease 2019 Study. *Front Med (Lausanne)*, 8, 743180. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.743180>
- Dunphy, S., & Gardiner, C. M. (2011). NK cells and psoriasis. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 248317. <https://doi.org/10.1155/2011/248317>
- Filipiuc, L. E., Ababei, D. C., Alexa-Stratulat, T., Pricope, C. V., Bild, V., Stefanescu, R., Stanciu, G. D., & Tamba, B. I. (2021). Major Phytocannabinoids and Their Related Compounds: Should We Only Search for Drugs That Act on Cannabinoid Receptors? *Pharmaceutics*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111823>
- Fitzpatrick, J. M., Hackett, B., Costelloe, L., Hind, W., & Downer, E. J. (2022). Botanically-Derived  $\Delta(9)$ -Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol, and Their 1:1 Combination, Modulate Toll-like Receptor 3 and 4 Signalling in Immune Cells from People with Multiple Sclerosis. *Molecules*, 27(6). <https://doi.org/10.3390/molecules27061763>
- Gupta, R., Debbaneh, M. G., & Liao, W. (2014). Genetic Epidemiology of Psoriasis. *Curr Dermatol Rep*, 3(1), 61-78. <https://doi.org/10.1007/s13671-013-0066-6>
- Haase, S., & Linker, R. A. (2021). Inflammation in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord*, 14, 17562864211007687. <https://doi.org/10.1177/17562864211007687>
- Henson, J. D., Vitetta, L., Quezada, M., & Hall, S. (2021). Enhancing Endocannabinoid Control of Stress with Cannabidiol. *J Clin Med*, 10(24). <https://doi.org/10.3390/jcm10245852>
- Hu, P., Wang, M., Gao, H., Zheng, A., Li, J., Mu, D., & Tong, J. (2021). The Role of Helper T Cells in Psoriasis. *Front Immunol*, 12, 788940. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.788940>

- Icen, M., Crowson, C. S., McEvoy, M. T., Dann, F. J., Gabriel, S. E., & Maradit Kremers, H. (2009). Trends in incidence of adult-onset psoriasis over three decades: a population-based study. *J Am Acad Dermatol*, *60*(3), 394-401. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2008.10.062>
- Iskandar, I. Y. K., Parisi, R., Griffiths, C. E. M., & Ashcroft, D. M. (2021). Systematic review examining changes over time and variation in the incidence and prevalence of psoriasis by age and gender. *Br J Dermatol*, *184*(2), 243-258. <https://doi.org/10.1111/bjd.19169>
- Ivashkiv, L. B. (2018). IFN $\gamma$ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, *18*(9), 545-558. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0029-z>
- Jastrzab, A., Gegotek, A., & Skrzydlewska, E. (2019). Cannabidiol Regulates the Expression of Keratinocyte Proteins Involved in the Inflammation Process through Transcriptional Regulation. *Cells*, *8*(8). <https://doi.org/10.3390/cells8080827>
- Jiang, Q., Yang, G., Xiao, F., Xie, J., Wang, S., Lu, L., & Cui, D. (2021). Role of Th22 Cells in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Front Immunol*, *12*, 688066. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.688066>
- Jo, M. J., Kim, B. G., Kim, W. Y., Lee, D. H., Yun, H. K., Jeong, S., Park, S. H., Kim, B. R., Kim, J. L., Kim, D. Y., Lee, S. I., & Oh, S. C. (2021). Cannabidiol Suppresses Angiogenesis and Stemness of Breast Cancer Cells by Downregulation of Hypoxia-Inducible Factors-1 $\alpha$ . *Cancers (Basel)*, *13*(22). <https://doi.org/10.3390/cancers13225667>
- Jordan, C. T., Cao, L., Roberson, E. D., Pierson, K. C., Yang, C. F., Joyce, C. E., Ryan, C., Duan, S., Helms, C. A., Liu, Y., Chen, Y., McBride, A. A., Hwu, W. L., Wu, J. Y., Chen, Y. T., Menter, A., Goldbach-Mansky, R., Lowes, M. A., & Bowcock, A. M. (2012). PSORS2 is due to mutations in CARD14. *Am J Hum Genet*, *90*(5), 784-795. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.03.012>
- Kagami, S., Rizzo, H. L., Lee, J. J., Koguchi, Y., & Blauvelt, A. (2010). Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol*, *130*(5), 1373-1383. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.399>
- Kamiya, K., Kishimoto, M., Sugai, J., Komine, M., & Ohtsuki, M. (2019). Risk Factors for the Development of Psoriasis. *Int J Mol Sci*, *20*(18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184347>
- Kim, J., Choi, J. Y., Seo, J., & Choi, I. S. (2021). Neuroprotective Effect of Cannabidiol Against Hydrogen Peroxide in Hippocampal Neuron Culture. *Cannabis Cannabinoid Res*, *6*(1), 40-47. <https://doi.org/10.1089/can.2019.0102>
- Kim, T., & Yang, Q. (2013). Peroxisome-proliferator-activated receptors regulate redox signaling in the cardiovascular system. *World J Cardiol*, *5*(6), 164-174. <https://doi.org/10.4330/wjc.v5.i6.164>
- Kozela, E., Juknat, A., Kaushansky, N., Ben-Nun, A., Coppola, G., & Vogel, Z. (2015). Cannabidiol, a non-psychoactive cannabinoid, leads to EGR2-dependent energy in activated encephalitogenic T cells. *J Neuroinflammation*, *12*, 52. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0273-0>
- Kozela, E., Juknat, A., Kaushansky, N., Rimmerman, N., Ben-Nun, A., & Vogel, Z. (2013). Cannabinoids decrease the th17 inflammatory autoimmune phenotype. *J Neuroimmune Pharmacol*, *8*(5), 1265-1276. <https://doi.org/10.1007/s11481-013-9493-1>
- Lazarini-Lopes, W., Do Val-da Silva, R. A., da Silva-Júnior, R. M. P., Leite, J. P., & Garcia-Cairasco, N. (2020). The anticonvulsant effects of cannabidiol in experimental models of epileptic seizures: From behavior and mechanisms to clinical insights. *Neurosci Biobehav Rev*, *111*, 166-182. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.01.014>



- Li, H., Liu, Y., Tian, D., Tian, L., Ju, X., Qi, L., Wang, Y., & Liang, C. (2020). Overview of cannabidiol (CBD) and its analogues: Structures, biological activities, and neuroprotective mechanisms in epilepsy and Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*, *192*, 112163. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112163>
- Lowin, T., Tingting, R., Zurmahr, J., Classen, T., Schneider, M., & Pongratz, G. (2020). Cannabidiol (CBD): a killer for inflammatory rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Cell Death Dis*, *11*(8), 714. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02892-1>
- Lu, H. C., & Mackie, K. (2016). An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biol Psychiatry*, *79*(7), 516-525. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.028>
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4<sup>+</sup>T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*, *2012*, 925135. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>
- Martins, A. M., Gomes, A. L., Vilas Boas, I., Marto, J., & Ribeiro, H. M. (2022). Cannabis-Based Products for the Treatment of Skin Inflammatory Diseases: A Timely Review. *Pharmaceuticals (Basel)*, *15*(2). <https://doi.org/10.3390/ph15020210>
- McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*, *120*, 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- Micali, G., Verzì, A. E., Giuffrida, G., Panebianco, E., Musumeci, M. L., & Lacarrubba, F. (2019). Inverse Psoriasis: From Diagnosis to Current Treatment Options. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, *12*, 953-959. <https://doi.org/10.2147/ccid.S189000>
- Mittrücker, H. W., Visekruna, A., & Huber, M. (2014). Heterogeneity in the differentiation and function of CD8<sup>+</sup> T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, *62*(6), 449-458. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0293-y>
- Mosca, M., Hong, J., Haderler, E., Hakimi, M., Liao, W., & Bhutani, T. (2021). The Role of IL-17 Cytokines in Psoriasis. *Immunotargets Ther*, *10*, 409-418. <https://doi.org/10.2147/itt.S240891>
- Nussbaum, L., Chen, Y. L., & Ogg, G. S. (2021). Role of regulatory T cells in psoriasis pathogenesis and treatment. *Br J Dermatol*, *184*(1), 14-24. <https://doi.org/10.1111/bjd.19380>
- Ogawa, K., & Okada, Y. (2020). The current landscape of psoriasis genetics in 2020. *J Dermatol Sci*, *99*(1), 2-8. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2020.05.008>
- Oliveira Mde, F., Rocha Bde, O., & Duarte, G. V. (2015). Psoriasis: classical and emerging comorbidities. *An Bras Dermatol*, *90*(1), 9-20. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20153038>
- Pagano, S., Coniglio, M., Valenti, C., Federici, M. I., Lombardo, G., Cianetti, S., & Marinucci, L. (2020). Biological effects of Cannabidiol on normal human healthy cell populations: Systematic review of the literature. *Biomed Pharmacother*, *132*, 110728. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110728>
- Palmieri, B., Laurino, C., & Vadalà, M. (2019). A therapeutic effect of cbd-enriched ointment in inflammatory skin diseases and cutaneous scars. *Clin Ter*, *170*(2), e93-e99. <https://doi.org/10.7417/ct.2019.2116>
- Pan, H., Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Patel, V., Mukhopadhyay, B., Gao, B., Haskó, G., & Pacher, P. (2009). Cannabidiol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing oxidative/nitrosative stress, inflammation, and cell death. *J Pharmacol Exp Ther*, *328*(3), 708-714. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.147181>
- Pandey, R., Mousawy, K., Nagarkatti, M., & Nagarkatti, P. (2009). Endocannabinoids and immune regulation. *Pharmacol Res*, *60*(2), 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.03.019>
- Parisi, R., Iskandar, I. Y. K., Kontopantelis, E., Augustin, M., Griffiths, C. E. M., & Ashcroft, D. M. (2020). National, regional, and worldwide epidemiology of psoriasis: systematic analysis and modelling study. *Bmj*, *369*, m1590. <https://doi.org/10.1136/bmj.m1590>



- Parisi, R., Symmons, D. P., Griffiths, C. E., & Ashcroft, D. M. (2013). Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *J Invest Dermatol*, *133*(2), 377-385. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.339>
- Patricio, F., Morales-Andrade, A. A., Patricio-Martínez, A., & Limón, I. D. (2020). Cannabidiol as a Therapeutic Target: Evidence of its Neuroprotective and Neuromodulatory Function in Parkinson's Disease. *Front Pharmacol*, *11*, 595635. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.595635>
- Pellati, F., Borgonetti, V., Brighenti, V., Biagi, M., Benvenuti, S., & Corsi, L. (2018). Cannabis sativa L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and Role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer. *Biomed Res Int*, *2018*, 1691428. <https://doi.org/10.1155/2018/1691428>
- Peyravian, N., Deo, S., Daunert, S., & Jimenez, J. J. (2020). Cannabidiol as a Novel Therapeutic for Immune Modulation. *Immunotargets Ther*, *9*, 131-140. <https://doi.org/10.2147/itt.S263690>
- Polese, B., Zhang, H., Thurairajah, B., & King, I. L. (2020). Innate Lymphocytes in Psoriasis. *Front Immunol*, *11*, 242. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00242>
- Prinz, I., Sandrock, I., & Mrowietz, U. (2020). Interleukin-17 cytokines: Effectors and targets in psoriasis-A breakthrough in understanding and treatment. *J Exp Med*, *217*(1). <https://doi.org/10.1084/jem.20191397>
- Queiro, R., Tejón, P., Alonso, S., & Coto, P. (2014). Age at disease onset: a key factor for understanding psoriatic disease. *Rheumatology (Oxford)*, *53*(7), 1178-1185. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ket363>
- Ran, D., Cai, M., & Zhang, X. (2019). Genetics of psoriasis: a basis for precision medicine. *Precis Clin Med*, *2*(2), 120-130. <https://doi.org/10.1093/pcmedi/pbz011>
- Raychaudhuri, S. K., Mavarakis, E., & Raychaudhuri, S. P. (2014). Diagnosis and classification of psoriasis. *Autoimmun Rev*, *13*(4-5), 490-495. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.008>
- Rendon, A., & Schäkel, K. (2019). Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *Int J Mol Sci*, *20*(6). <https://doi.org/10.3390/ijms20061475>
- Ribeiro, A., Ferraz-de-Paula, V., Pinheiro, M. L., Vitoretti, L. B., Mariano-Souza, D. P., Quinteiro-Filho, W. M., Akamine, A. T., Almeida, V. I., Quevedo, J., Dal-Pizzol, F., Hallak, J. E., Zuardi, A. W., Crippa, J. A., & Palermo-Neto, J. (2012). Cannabidiol, a non-psychotropic plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: role for the adenosine A(2A) receptor. *Eur J Pharmacol*, *678*(1-3), 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.12.043>
- Rodríguez-Pomar, C., Pintor, J., Colligris, B., & Carracedo, G. (2017). Therapeutic inhibitors for the treatment of dry eye syndrome. *Expert Opin Pharmacother*, *18*(17), 1855-1865. <https://doi.org/10.1080/14656566.2017.1403584>
- Sangiovanni, E., Fumagalli, M., Pacchetti, B., Piazza, S., Magnavacca, A., Khalilpour, S., Melzi, G., Martinelli, G., & Dell'Agli, M. (2019). Cannabis sativa L. extract and cannabidiol inhibit in vitro mediators of skin inflammation and wound injury. *Phytother Res*, *33*(8), 2083-2093. <https://doi.org/10.1002/ptr.6400>
- Saroz, Y., Kho, D. T., Glass, M., Graham, E. S., & Grimsey, N. L. (2019). Cannabinoid Receptor 2 (CB(2)) Signals via G-alpha-s and Induces IL-6 and IL-10 Cytokine Secretion in Human Primary Leukocytes. *ACS Pharmacol Transl Sci*, *2*(6), 414-428. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.9b00049>
- Shah, M., Al Aboud, D. M., Crane, J. S., & Kumar, S. (2022). Pustular Psoriasis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing

Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.

Shao, S., & Gudjonsson, J. E. (2020). Epigenetics of Psoriasis. *Adv Exp Med Biol*, *1253*, 209-221. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-3449-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-15-3449-2_8)

- Singh, R. K., Lee, K. M., Ucmak, D., Brodsky, M., Atanelov, Z., Farahnik, B., Abrouk, M., Nakamura, M., Zhu, T. H., & Liao, W. (2016). Erythrodermic psoriasis: pathophysiology and current treatment perspectives. *Psoriasis (Auckl)*, 6, 93-104. <https://doi.org/10.2147/ptt.S101232>
- Sultan, A. S., Marie, M. A., & Sheweita, S. A. (2018). Novel mechanism of cannabidiol-induced apoptosis in breast cancer cell lines. *Breast*, 41, 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2018.06.009>
- Takeshita, J., Grewal, S., Langan, S. M., Mehta, N. N., Ogdie, A., Van Voorhees, A. S., & Gelfand, J. M. (2017). Psoriasis and comorbid diseases: Epidemiology. *J Am Acad Dermatol*, 76(3), 377-390. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.07.064>
- Tiala, I., Suomela, S., Huuhtanen, J., Wakkinen, J., Hölttä-Vuori, M., Kainu, K., Ranta, S., Turpeinen, U., Hämäläinen, E., Jiao, H., Karvonen, S. L., Ikonen, E., Kere, J., Saarialho-Kere, U., & Elomaa, O. (2007). The CCHCR1 (HCR) gene is relevant for skin steroidogenesis and downregulated in cultured psoriatic keratinocytes. *J Mol Med (Berl)*, 85(6), 589-601. <https://doi.org/10.1007/s00109-006-0155-0>
- Tseng, J. C., Chang, Y. C., Huang, C. M., Hsu, L. C., & Chuang, T. H. (2021). Therapeutic Development Based on the Immunopathogenic Mechanisms of Psoriasis. *Pharmaceutics*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071064>
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*, 9(5), 503-510. <https://doi.org/10.1038/ni1582>
- Wójcik, P., Garley, M., Wroński, A., Jabłońska, E., & Skrzydlewska, E. (2020). Cannabidiol Modifies the Formation of NETs in Neutrophils of Psoriatic Patients. *Int J Mol Sci*, 21(18). <https://doi.org/10.3390/ijms21186795>
- Wu, L., & Van Kaer, L. (2011). Natural killer T cells in health and disease. *Front Biosci (Schol Ed)*, 3(1), 236-251. <https://doi.org/10.2741/s148>
- Xu, F., Xu, J., Xiong, X., & Deng, Y. (2019). Salidroside inhibits MAPK, NF-κB, and STAT3 pathways in psoriasis-associated oxidative stress via SIRT1 activation. *Redox Rep*, 24(1), 70-74. <https://doi.org/10.1080/13510002.2019.1658377>
- Yadav, K., Singh, D., & Singh, M. R. (2018). Protein biomarker for psoriasis: A systematic review on their role in the pathomechanism, diagnosis, potential targets and treatment of psoriasis. *Int J Biol Macromol*, 118(Pt B), 1796-1810. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.021>
- Zhou, X., Chen, Y., Cui, L., Shi, Y., & Guo, C. (2022). Advances in the pathogenesis of psoriasis: from keratinocyte perspective. *Cell Death Dis*, 13(1), 81. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04523-3>