

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMONA KLOBUČAR
MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMONA KLOBUČAR

VPLIVI KANABINOIDOV NA ASTROCITE NOVOROJENIH
PODGAN

INFLUENCES OF CANNABINOIDS ON NEONATAL RAT
ASTROCYTES

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Mojce Kržan, dr. med., in somentorstvom znan. sod. dr. Damijane Mojce Jurič, univ. dipl. kem.

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. Mojci Kržan, dr. med. za ponujeno priložnost opravljanja magistrske naloge in znan. sod. dr. Damijani Mojci Jurič, univ. dipl. kem. za vso prijaznost, pomoč in potrpežljivost pri izdelavi naloge. Zahvaljujem se tudi moji družini, ki mi je v času študija stala ob strani, ter Nejcu za vso oblikovno pomoč in ker mi vedno stoji ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Mojce Kržan, dr. med., in somentorice znan. sod. dr. Damijane Mojce Jurič, univ. dipl. kem.

Kazalo

Kazalo slik	viii
Povzetek	ix
Abstract	x
Ključne besede	xi
Key words	xi
Seznam okrajšav	xii
1. Uvod.....	1
1.1. Kanabinoidni sistem v možganih	1
1.2. Kanabinoidi.....	3
1.2.1. Endokanabinoidi	3
1.2.2. Fitokanabinoidi	5
1.2.3. Sintezni kanabinoidi	7
1.2.4. Zdravila, ki vsebujejo konopljo, in uporaba v rekreativne namene.....	8
1.2.5. Nekaj potencialnih terapevtskih možnosti uporabe kanabinoidov v prihodnosti	9
1.3. Astrociti	10
1.4. Nevrotrofini.....	13
2. Namen dela	15
3. Materiali in metode	17
3.1. Materiali	17
3.2. Metode	19
3.2.1. Priprava primarnih celičnih kultur astrocitov	19
3.2.2. Tretiranje astrocitov s THC, CBD in SGT-24	20
3.2.3. Določanje celotnih proteinov v vzorcih.....	22
3.2.4. Določanje vpliva kanabinoidov na celični metabolizem astrocitov	22
3.2.4.1. Določanje vsebnosti ATP	22
3.2.4.2. Določanje sposobnosti preživetja	23
3.2.5. Določanje citotoksičnega vpliva kanabinoidov na astrocite.....	23
3.2.5.1. Določanje aktivnosti kaspaz 3/7, 8 in 9	23
3.2.5.2. Določanje aktivnosti laktat-dehidrogenaze.....	24

3.2.6. Določanje vpliva kanabinoidov na nevrotrofično aktivnost.....	25
3.2.6.1. Priprava vzorcev za encimsko-immunske poskuse.....	25
3.2.6.2. Kvantitativna določitev nevrotrofinov z encimsko-immunsko metodo.....	25
3.2.7. Statistična obdelava podatkov	27
4. Rezultati	28
4.1. Vpliv kanabinoidov na celični metabolizem astrocitov.....	28
4.1.1. Merjenje znotrajcelične koncentracije ATP	28
4.1.2. Sposobnost preživetja	29
4.2. Citotoksični vpliv kanabinoidov na astrocite.....	31
4.2.1. Merjenje kaspazne aktivnosti.....	31
4.2.2. Merjenje aktivnosti laktat-dehidrogenaze.....	34
4.3. Vpliv kanabinoidov na nevrotrofično aktivnost astrocitov	35
4.3.1. Vsebnost in sproščanje BDNF.....	35
4.3.2. Vsebnost in sproščanje NGF	37
4.3.3. Vsebnost in sproščanje NT-3.....	39
5. Razprava	42
5.1. Vpliv kanabinoidov na celični metabolizem astrocitov.....	42
5.2. Citotoksični vpliv kanabinoidov na astrocite.....	44
5.3. Vpliv kanabinoidov na nevrotrofično aktivnost astrocitov	46
6. Sklep	51
7. Literatura.....	53

Kazalo slik

Slika 1. Znotrajcelični mehanizmi, ki jih proži aktivacija kanabinoidnega receptorja CB ₁	1
Slika 2. Strukturna formula Δ^9 -tetrahidrokanabinola (THC)	3
Slika 3. Strukturna formula anandamida (a) in 2- arahidonilglicerola (b)	4
Slika 4. Strukturna formula kanabidiola (a) in kanabinola (b).....	5
Slika 5. Strukturna formula kumil-PINACE (1-pentil- <i>N</i> -(2-fenilpropan-2-il)-1 <i>H</i> -indazol-3-karboksamid)	8
Slika 6. Protoplazemski (levo) in vlaknasti (desno) astrocit.	11
Slika 7. Nadzor krvnega pretoka.	12
Slika 8. Modeli delovanja nevrotrofinskih molekul.	13
Slika 9. Primer rezultatov preliminarnega poskusa koncentracijsko odvisnega vpliva THC, CBD (a) in SGT-24 (b) na presnovno aktivnost astrocitov po 12-urni inkubaciji.	21
Slika 10. Vpliv kanabinoidov na koncentracijo ATP v astrocitih novorojenih podgan.	29
Slika 11. Vpliv kanabinoidov na presnovno aktivnost astrocitov novorojenih podgan.	30
Slika 12. Vpliv kanabinoidov na kaspazno aktivnost v astrocitih novorojenih podgan.	33
Slika 13. Vpliv kanabinoidov na aktivnost LDH v mediju astrocitov novorojenih podgan.	34
Slika 14. Vpliv kanabinoidov na celično vsebnost (a) in sproščanje (b) BDNF v astrocitih novorojenih podgan.	36
Slika 15. Vpliv kanabinoidov na celično vsebnost (a) in sproščanje (b) NGF v astrocitih novorojenih podgan.	38
Slika 16. Vpliv kanabinoidov na celično vsebnost (a) in sproščanje (b) NT-3 v astrocitih novorojenih podgan.	40

Povzetek

Konopljo in njene pripravke v različne medicinske in rekreativne namene uporabljamo tisočletja. Med kanabinoidi sta najbolj znana psihoaktivni Δ^9 -tetrahidrokanabinol (THC) in kanabidiol (CBD). Poleg endokanabinoidov, telesu lastnih mediatorjev kanabinoidnega sistema, poznamo vedno več sinteznih kanabinoidov, katerih uporaba narašča, neželeni učinki pa so pogosto neznan in škodljivi. V okviru magistrske naloge smo zato preverili vpliv THC, CBD in sintezne spojine kumil-PINACA-e (SGT-24) na astrocite, pomembne glijalne celice osrednjega živčevja, ki s sposobnostjo sinteze nevrotrofičnih dejavnikov aktivno podpirajo preživetje in funkcijo živčnih celic.

Primarne kulture astrocitov možganske skorje podgane smo od 2 do 24 ur izpostavili 5 μ M THC, 1 μ M CBD ali 1 μ M SGT-24 ter nato izmerili znotrajcelično vsebnost adenozin-5'-trifosfata (ATP) in presnovno aktivnost celic. Določili smo aktivnost kaspaz 8, 9 in 3/7 ter aktivnost laktat-dehidrogenaze (LDH), da bi ugotovili morebiten pojav apoptoze ali nekroze. Znotrajcelično vsebnost in sproščanje nevrotrofičnega dejavnika možganskega izvora (BDNF), živčnega rastnega dejavnika (NGF) in nevrotrofina-3 (NT-3) smo določili s specifičnimi encimsko-immunskimi metodami.

S postopnim zaviranjem vsebnosti ATP in presnovne aktivnosti preiskovani kanabinoidi vplivajo na celični metabolizem in sposobnost preživetja astrocitov, pri čemer je značilen vpliv SGT-24 opazen že po dveh urah inkubacije, THC in CBD pa sta najbolj učinkovita po 24 urah. S sposobnostjo učinkovitega proženja ekstrinzične poti apoptoze, ki se kaže z aktivacijo kaspaze 8, intrinzične poti apoptoze, ki jo proži aktivacija kaspaze 9, ter aktivacije izvršilne kaspaze 3/7, so vsi trije preiskovani kanabinoidi v različnih časovnih okvirih udeleženi pri apoptoznih procesih. Vpliva na sproščanje LDH nismo zaznali. Izpostavljenost astrocitov THC, CBD ali SGT-24 povzroča tudi postopno zavoro nevrotrofičnega delovanja astrocitov, pri čemer največji učinek na sintezo in sproščanje opazimo pri NT-3.

Citotoksični učinki preiskovanih kanabinoidov, ki so časovno odvisni, se na astrocitih kažejo kot zavora celičnega metabolizma in sposobnosti preživetja, proženje apoptoze in zmanjšana nevrotrofična sinteza. Zloraba kanabinoidov lahko zaradi poškodbe astrocitov in s tem okrnjenega delovanja osrednjega živčevja predstavlja resen zdravstveni problem, kar je zaradi možnega vpliva na razvijajoče se možgane še posebej zaskrbljujoče pri mladih.

Abstract

Cannabis and its preparations have been used for various medical and recreational purposes for thousands of years. The best known cannabinoids are psychoactive Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). Apart from endocannabinoids, body's own mediators of cannabinoid system, many synthetic cannabinoids are known. Their usage is rising and their adverse effects are often unknown and harmful. In our work, we studied the influence of THC, CBD and synthetic cumyl-PINACA (SGT-24) on astrocytes. Astrocytes are important glial cells in the central nervous system, capable of neurotrophic factor synthesis, actively supporting survival and function of neurons.

Primary cell cultures of rat cortical astrocytes were exposed to 5 μM THC, 1 μM CBD or 1 μM SGT-24 from 2 to 24 hours and intracellular concentration of adenosine-5'triphosphate (ATP) and metabolic activity of cells was measured afterwards. The activity of caspases 8, 9 and 3/7, and the activity of lactate dehydrogenase were determined to examine the possible occurrence of apoptosis or necrosis. Intracellular concentration and secretion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF) and neurotrophin-3 (NT-3) were determined using specific enzyme-immune assays.

The examined cannabinoids are affecting cell metabolism and viability by gradual suppression of ATP concentration and metabolic activity. Significant influence of SGT-24 was already seen after 2 hours of incubation, whereas THC and CBD were most effective after 24 hours. All three examined cannabinoids are involved in apoptotic processes in different time frames and are capable to efficaciously trigger the extrinsic pathway of apoptosis, which results in the activation of caspase 8, intrinsic pathway of apoptosis, triggered by activation of caspase 9, and activation of executive caspase 3/7. The influence on secretion of lactate dehydrogenase was not detected. Exposure of astrocytes to THC, CBD or SGT-24 caused gradual suppression of neurotrophic activity of astrocytes, where the largest effect on synthesis and secretion was seen at NT-3.

Cytotoxic effects of examined cannabinoids on astrocytes, which are time dependent and expressed as suppression of cell metabolism and viability, triggering of apoptosis and reduction neurotrophic synthesis. Because of astrocytes damage and related reduced function of central nervous system, the abuse of cannabinoids represents a serious issue especially among young people due to possible influence on developing brain.

Ključne besede

Kanabinoidi, nevrotrofini, astrociti

Key words

Cannabinoids, neurotrophins, astrocytes

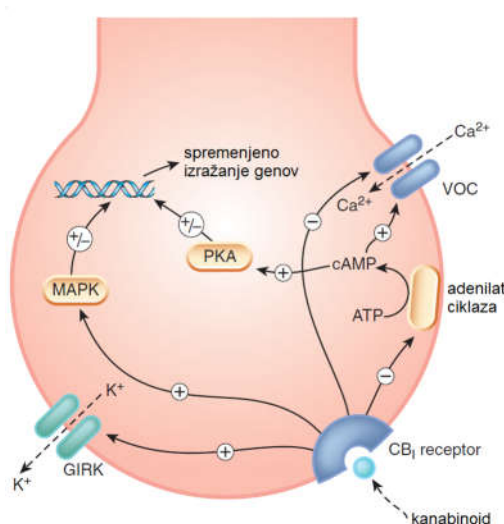
Seznam okrajšav

AEA: *N*-arahidonoiletanolamin
ATP: adenzin-5'-trifosfat
BDNF: nevrotrofični dejavnik možganskega izvora (angl. brain-derived neurotrophic factor)
cAMP: 3',5'-ciklični adenzin monofosfat
CB₁: kanabinoidni receptor tipa 1
CB₂: kanabinoidni receptor tipa 2
CBD: kanabidiol (angl. cannabidiol)
CBN: kanabinol (angl. cannabinol)
CYP-450: citokrom P450
GABA: γ -aminomaslena kislina
GFAP: glialna fibrilarna kislina beljakovina (angl. glial fibrillary acidic protein)
GIRK: kalijev kanal, katerega prepustnost uravnava protein G (angl. G-protein sensitive inward-rectifying potassium channel)
GPCR: receptor, sklopljen s proteinom G
GPR55: s proteinom G sklopljen receptor 55
GTP: gvanozin-5'-trifosfat
LDH: laktat-dehidrogenaza
MAPK: z mitogenom aktivirana protein kinaza
NGF: živčni rastni dejavnik (angl. nerve growth factor)
NO: dušikov oksid
PKA: protein kinaza A
PTX: pertuzijski toksin (angl. pertussis toxin)
p75^{NTR}: nizkoafinitetni receptor za nevrotrofine
ROS: reaktivne kisikove zvrsti
SGT-24: kumil-PINACA ali 1-pentil-*N*-(2-fenilpropan-2-il)-1*H*-indazol-3-karboksamid
THC: Δ^9 -tetrahidrokanabinol
Trk: tropomiozinu sorodna kinaza (angl. tropomyosin-related kinase)
TRPV₁: vaniloidni receptor tipa 1
VOC: napetostno odvisen kalcijev kanal (angl. voltage-operated calcium channel)
2-AG: 2-arahidonilglicerol

1. Uvod

1.1. Kanabinoidni sistem v možganih

Endokanabinoidni sistem predstavlja obsežen nevromodulatorni sistem, ki ima pomembno vlogo pri razvoju osrednjega živčevja, sinaptični plastičnosti in odzivu celic na endogene vplive ter vplive iz okolja. Sistem vključuje kanabinoidne receptorje, endogene kanabinoide ter encime, odgovorne za sintezo in razgradnjo le-teh. Kanabinoidni receptorji tipa 1 (CB₁) in tipa 2 (CB₂) spadajo v družino receptorjev, sklopljenih s proteinom G (GPCR, angl. G protein-coupled receptor) s 7 transmembranskimi domenami. Vezava kanabinoidne substance na receptorje povzroči hiter padec 3',5'-cikličnega adenozin monofosfata (cAMP), kar je posledica inhibicije aktivnosti encima adenilat-ciklaze, ter aktivacijo z mitogenom aktiviranih protein-kinaz (MAPK, angl. mitogen activated protein kinase) (1). Znano je, da cAMP uravnava delovanje več tipov ionskih kanalov (vključno z napetostno odvisnimi K⁺ in Ca²⁺ kanali). V živčnih celicah aktivacija CB₁ zavira napetostno odvisne Ca²⁺ kanale, kar pomembno vpliva na usodo celice in njeno funkcijo, še posebej na nevronske električne aktivnosti in sproščanje živčnih prenašalcev (2) (slika 1).



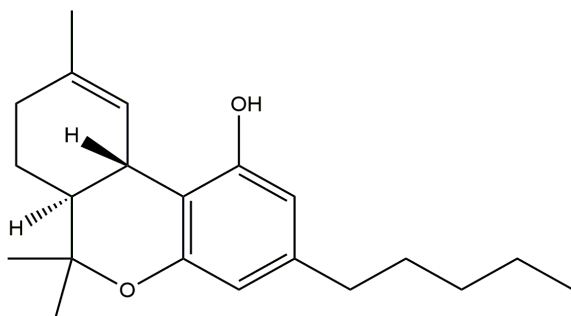
Slika 1. Znotrajcelični mehanizmi, ki jih proži aktivacija kanabinoidnega receptorja CB₁. Aktivacija receptorja zavira sproščanje živčnega prenašalca preko inhibicije vstopa Ca²⁺ ionov in hiperpolarizacije membrane zaradi aktivacije K⁺ kanalov. Prikazan je tudi vpliv na gensko izražanje. GIRK: kalijev kanal, katerega prepustnost uravnava protein G; PKA: protein kinaza A; VOC: napetostno odvisen kalcijev kanal. Prirejeno po (3).

Na celičnem nivoju so receptorji tipa CB₁ prisotni presinaptično in zavirajo sproščanje živčnih prenašalcev. Podobno kot opiodi so tudi kanabinoidi sposobni povečanja aktivnosti nekaterih nevronskih poti preko zavore inhibitornih povezav, kot so npr. γ -aminomasleno kislinski (GABA) internevroni v hipokampusu (3). Večina receptorjev CB₁ je razporejena v osrednjem živčevju z največjo gostoto v neokorteksu, hipokampusu, bazalnih ganglijih, malih možganih in možganskem deblu (4). CB₁ je prisoten tudi v neživčnih celicah osrednjega živčevja, kot so astrociti (2), kjer aktivacija receptorja spodbuja sproščanje glijotransmitorjev, kot so glutamat, ATP in D-serin (5). Prisotni so še v testisih, očesu, žilnem endoteliju in vranici (4).

Pri receptorjih tipa CB₂ je prisotna približno 45-odstotna identičnost v zaporedju aminokislin v primerjavi s CB₁ (3). Večinoma jih najdemo v limfatičnem tkivu, in sicer v vranici ter timusu, prisotni pa so tudi v limfocitih, monocitih in tkivnih bazofilcih (3). V osrednjem živčevju so prisotni v celicah mikroglije. Vloge teh receptorjev še niso dokončno pojasnili. Zadnje raziskave kažejo, da receptorji CB₂, ki so izraženi na živčnih celicah, sodelujejo pri mehanizmih zlorabe drog in sinaptične plastičnosti ter nadzirajo sinaptično funkcijo (3, 4). S proteinom G sklopljen receptor 55 (GPR55, angl. G protein-coupled receptor 55), pri katerem so opazili vezavo kanabinoidov v študijah na miših z izbitima genoma za CB₁ in CB₂, predstavlja nov, zanimiv kanabinoidni receptor. Kljub nizki homologiji s CB₁ in CB₂ (13,5 in 14,4 %), se nanj veže veliko kanabinoidnih ligandov. Izražen je v osrednjem živčevju, perifernih tkivih, limfocitih in vranici (6). V povezavi s kanabinoidi omenjajo tudi vaniloidni receptor tipa 1 (TRPV₁, angl. transient receptor potential cation channel subfamily V member 1). Aktivira ga endogeni kanabinoid anandamid, povezan pa je z vnetnimi procesi (7). Tudi jedrni receptor PPAR γ (angl. peroxisome proliferator activated receptor), ki uravnava izražanje genov, metabolizem glukoze in lipidov ter vnetni odziv, se je v študijah izkazal za glavnega mediatorja protivnetnega odziva kanabinoidov (7).

1.2. Kanabinoidi

Pripravke iz konoplje v medicinske namene uporabljajo že tisočletja. V zahodnem svetu je rastlina dobila večji pomen po letu 1851, ko so jo vključili v takratno ameriško farmakopejo. Za zdravljenje astme, kašlja, nespečnosti, anoreksije in mnogih drugih stanj so uporabljali različne rastlinske pripravke, kot so tinkture, cigarete in obkladki. Zaupanje stroke je nato skopnelo v prvi polovici 20. stoletja z odstranitvijo iz farmakopeje predvsem zaradi spremenljivih učinkov konoplje, kar je bila posledica variabilnosti rastlinskega materiala (8). Izraelski znanstvenik Raphael Mechoulam je leta 1964 določil strukturo glavne psihoaktivne komponente Δ^9 -tetrahidrokanabinola (THC), ki je prikazana na sliki 2, in ga tudi sintetiziral (9). Sledilo je odkritje kanabinoidnih receptorjev in endokanabinoidnega liganda anandamida (10), kar je pripomoglo k razumevanju farmakoloških učinkov konoplje.



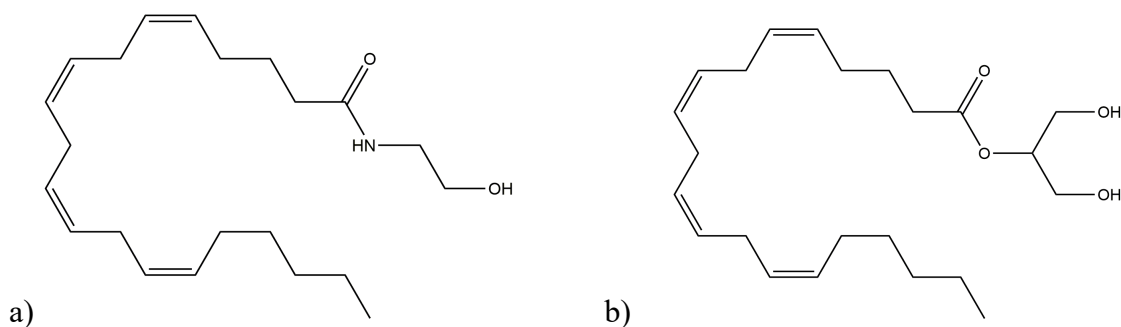
Slika 2. Strukturna formula Δ^9 -tetrahidrokanabinola (THC)

Konoplja vsebuje preko 400 različnih snovi, od katerih je več kot 80 kanabinoidov in preko 200 nekanabinoidnih komponent (11). Kanabinoide glede na izvor delimo na **endokanabinoide**, ki se tvorijo v človeškem telesu, **fitokanabinoide**, ki so terpenofenolne spojine, izolirane iz konoplje, ter **sintezne kanabinoide** (12).

1.2.1. Endokanabinoidi

Najbolj raziskana predstavnika endokanabinoidov sta derivata arahidonske kisline, *N*-arahidonoiletanolamin, ki ga pogosteje poimenujejo kot anandamid (AEA, *N*-arahidonoiletanolamin) in 2-arahidonilglicerol (2-AG) (slika 3). Oba liganda sta agonista kanabinoidnih receptorjev, z večjo afiniteto pa se vežeta na receptorje tipa CB₁. V telesu se

ne shranjujeta, temveč njuna sinteza poteče ob različnih sprožitvenih dejavnikih, kot je npr. povišan nivo znotrajceličnega kalcija (1). Biosinteza anandamida poteka po več sinteznih poteh. Vsem je skupen prekurzor *N*-acilfosfatidiletanolamin, ki je membranski fosfolipid. Tudi sinteznih poti 2-AG je veliko, vse pa potekajo preko nastanka 1,2-diacilglicerola (13). Njuna deaktivacija v sinaptični špranji se zgodi ob ponovnem privzemu in razgradnji z encimi znotraj celice (1).



Slika 3. Strukturna formula anandamida (a) in 2-arahidonilglicerola (b)

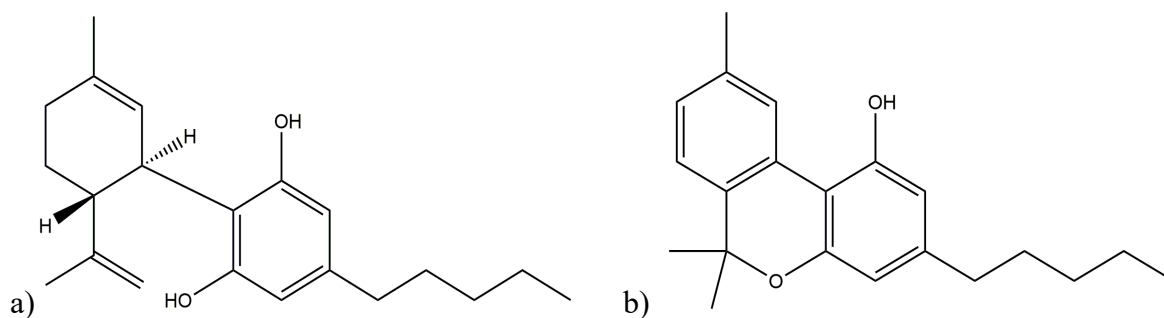
Poleg vloge endogenega liganda kanabinoidnih receptorjev, je 2-AG pomemben vmesni produkt pri sintezi lipidov in ključen vir arahidonske kisline pri sintezi prostaglandinov (1).

Endokanabinoidi se sproščajo iz posinaptične živčne celice, retrogradno difundirajo preko sinaptične špranje in aktivirajo receptorje na presinaptični celici. Aktivacija receptorjev nato začasno zmanjša sproščanje živčnih prenašalcev. Ta način retrogradne inhibicije sinaptičnega prenosa je značilen za GABA-ergične in glutamatne sinapse preko celotnih možganov in predstavlja razširjen mehanizem sinaptične regulacije, ki bi lahko bil pomemben fiziološki zaščitni mehanizem pri pretirani stimulaciji glutamatnih receptorjev. To zaščitno vlogo lahko motijo eksogeni sintezni kanabinoidi in THC, saj so pri kroničnem vnosu ugotovili pojavnost izgube vezavnih mest in desenzitizacije receptorjev CB₁ (14).

Endogeni kanabinoidi sodelujejo pri nastanku bolečine, motorični aktivnosti, nadzoru apetita, kognitivnih procesih, slabosti in bruhanju ter pri uravnavanju imunosti (12).

1.2.2. Fitokanabinoidi

Izvlečki konoplje vsebujejo veliko različnih spojin, ki so večinoma netopne v vodi. Najbolj znani predstavniki fitokanabinoidov so psihoaktivni **THC**, njegov prekurzor **kanabidiol (CBD)** ter **kanabinol (CBN)**, ki nastaja spontano ob razgradnji THC. Slednja dva, ki sta prikazana na sliki 4, ne izražata psihoaktivnih lastnosti (3).



Slika 4. Strukturna formula kanabidiola (a) in kanabinola (b)

Delovanje glavne psihoaktivne sestavine konoplje je večinoma omejeno na osrednje živčevje, kjer proži psihomimetične in zaviralne učinke, poleg tega pa še različne centralno posredovane periferne avtonomne učinke. Centralni učinki vključujejo okvaro kratkoročnega spomina in motorične koordinacije, katalepsijo, hipotermijo, analgezijo, antiemetične učinke in povečan apetit. Kot glavne periferne učinke lahko omenimo tahikardijo, vazodilatacijo, zmanjšanje intraokularnega pritiska in bronhodilatacijo. Pri subjektivnih učinkih pri ljudeh prevladujeta predvsem občutek sproščenosti in izboljšanega počutja ter izrazito izostrena vid in sluh (3).

THC je odgovoren za večino učinkov konoplje na psihološko funkcijo. Najbolj izraziti negativni učinki uporabe konoplje so anksioznost, depresija, poslabšanje kognitivnih funkcij ter pojav psihoz tako pri zdravih uporabnikih kot pri tistih s predispozicijami za to bolezen (15). Drugi najbolj raziskan fitokanabinoid, CBD, naj bi preko svojega antipsihotičnega delovanja zmanjševal verjetnost za pojav psihoz, povzročenih s THC. Mehanizma antagonističnega delovanja CBD na učinke THC še niso dokončno razjasnili. CBD se šibko veže na receptorje CB₁, vendar kljub temu prepreči delovanje THC. Ustavi razgradnjo anandamida, s čimer mu podaljša čas delovanja in onemogoči vezavo in učinek

THC (15). Poleg že omenjenih neželenih učinkov se ob uporabi THC pojavlja več kardiovaskularnih zapletov. Wolff s sodelavci je s študijo na podganjem modelnem sistemu dokazal vpliv THC na pojav kapi, kar je posledica vpliva fitokanabinoida na mitohondrijsko dihalno verigo, povečano sintezo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) ter drugih radikalov v možganih (16).

Ko je Mechoulam s sodelavci leta 1963 določil kemijsko strukturo CBD (17), je kmalu postalo jasno, da ta ni psihoaktivna snov. Določitev strukture je sprožila val raziskav o farmakološkem delovanju omenjene substance. Že v letu 1973 so na modelnih živalskih sistemih odkrili sposobnost CBD, da prepreči epileptične napade (18). Potekajo tudi raziskave o anksiolitičnem in antipsihotičnem delovanju CBD ter ugodnem vplivu pri boleznih z motnjami gibanja (Huntingtonova, Parkinsonova bolezen). Pomembno je omeniti še antioksidativno in nevroprotektivno delovanje CBD. Raziskovalci so dokazali, da lahko CBD zavira oksidativni stres in deluje zaščitno pri nevrotoksičnosti, ki jo povzroča glutamat (19). V zadnjem času poteka veliko študij, ki se osredotočajo na protitumorno delovanje kanabinoidov. Fisher s sodelavci je v razmerah *in vitro* ter *in vivo* pokazal, da CBD zmanjšuje invazivnost, sposobnost preživetja ter proliferacijo nevroblastomskih celic (20).

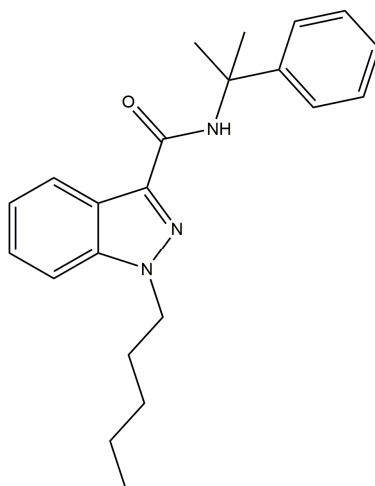
Stopnja absorpcije kanabinoidov je odvisna od načina vnosa in oblike zdravila. Kajenje, ki je glavni način aplikacije, omogoča hiter in učinkovit prehod učinkovine iz pljuč preko krvnega sistema do možganov. Biološka uporabnost je pri tem načinu aplikacije raznolika zaradi razlik v načinu kajenja in znaša med 2 in 56 %. Največji učinek je dosežen že po nekaj minutah, izzveni pa v 2 do 3 urah. Pri peroralni aplikaciji je absorpcija počasnejša in tudi učinek nastopi kasneje (30 minut do 2 uri). Zaradi metabolizma prvega prehoda je biološka uporabnost le 10- do 20-odstotna, čemur se lahko izognemo z uporabo oralnega pršila. Zaradi izrazite lipofilnosti se po absorpciji kanabinoidi razporedijo v maščobnih tkivih, od koder se počasi sproščajo nazaj v krvni obtok. Posledično je razpolovni čas približno 7 dni, eliminacija pa lahko traja tudi do 30 dni. THC in ostale komponente konoplje se večinoma presnavljajo v jetrih, kjer nastaja več kot 100 različnih metabolitov. Pomemben je predvsem 11-hidroksi-THC, ki nastaja s hidroksilacijo pod vplivom encimov iz družine citokrom oksidaz (CYP) P450 in prav tako kot THC izraža psihoaktivne lastnosti. Metaboliti se v večini izločajo z blatom, deloma pa tudi z urinom (21, 22).

1.2.3. Sintezni kanabinoidi

Veliko sinteznih kanabinoidov se je znašlo na seznamu prepovedanih drog, zato proizvajalci težijo k sintezi vedno novih modificiranih substanc. Študije različnih sinteznih kanabinoidov so pokazale, da se z veliko večjo afiniteto kot THC vežejo na kanabinoidne receptorje, njihov učinek pa je 2- do 100-krat močnejši kot pri glavni psihoaktivni komponenti konoplje. Akutna izpostavljenost sinteznim kanabinoidom povzroča zmerne do hude učinke na živčevje, kardiovaskularni sistem, ledvice in mnoge druge. V letih med 2010 in 2015 so v ZDA toksikologi obravnavali 456 primerov zastrupitve z rekreativnimi drogami, ki vsebujejo sintezne kanabinoide, od tega tudi 3 smrtne primere kot posledica srčnega zastoja, odpovedi ledvic in depresije dihanja (23).

Na trgu narašča pojavnost različnih sinteznih kanabinoidov kot posledica novih kemijskih modifikacij, ki onemogočajo detekcijo na rutinskem urinskem testu za preverjanje uživanja prepovedanih substanc. Uporabniki v večini primerov ne vedo, kakšno drogo uživajo, neznana je vsebnost učinkovine, snovi pa niso testirane na človeških ali živalskih modelnih sistemih, ki bi omogočili razumevanje delovanja teh slabo poznanih substanc. Učinki, ki se pojavijo ob uživanju sinteznih kanabinoidov, variirajo v odvisnosti od stopnje zastrupitve – od bruhanja, slabosti, hipertenzije, eforije pa vse do srčnih zastojev, zastojev dihanja, rabdomiolize, kome in celo smrti (24).

V porastu je nov trend uporabe sinteznih kanabinoidov, in sicer v obliki elektronskih cigaret kot zamenjava za nikotin (25). Ena od pogosto uporabljenih substanc je kumil-PINACA (SGT-24) (slika 5), ki je v Sloveniji uvrščena na seznam prepovedanih drog 1. skupine (26). Snov deluje kot polni agonist receptorjev CB₁ (27), vendar pa mehanizmov delovanja in učinkov na celicah osrednjega živčevja ne poznamo. V Sloveniji smo leta 2014 zabeležili primer transdermalne zastrupitve z omenjenim sinteznim kanabinoidom. Zaradi lipofilnih lastnosti substance ta lahko prodre skozi kožo in povzroči bruhanje, slabost, midriazo, zmedenost, palpitacije in druge klinične znake izpostavljenosti SGT-24, ki so najverjetneje posledica aktivacije kanabinoidnih receptorjev (27).



Slika 5. Strukturna formula kumil-PINACE (1-pentil-*N*-(2-fenilpropan-2-il)-1*H*-indazol-3-karboksamid)

1.2.4. Zdravila, ki vsebujejo konopljo, in uporaba v rekreativne namene

Kljub dejstvu, da kanabinoidi kažejo širok spekter potencialnih terapevtskih učinkov, sta trenutno v Evropi registrirani dve zdravili, ki vsebujeta sintezna analoga, in eno, ki je v obliki ekstrakta konoplje (22). Dronabinol in nabilon sta sintezna analoga THC in sta indicirana za zdravljenje slabosti in bruhanja pri bolnikih, ki prejemajo kemoterapijo in pri katerih se ostali antiemetiki niso izkazali za dovolj učinkovite (28). Dronabinol se uporablja tudi za zdravljenje anoreksije, ki je povezana z izgubo telesne mase pri bolnikih z AIDS-om (28).

Tretje registrirano zdravilo je nabixsimols, ki je na trgu v obliki oralnega pršila in vsebuje točno določeno razmerje med THC in CBD. Uporablja se za lajšanje nevropatske bolečine, spastičnosti in drugih simptomov pri multipli sklerozi (29).

V Sloveniji je z *Uredbo o razvrstitvi prepovedanih drog* omogočena dostopnost sinteznega in izoliranega THC, kar vključuje tudi pripravo magistralnih zdravil iz učinkovine. Za medicinsko uporabo so dostopna zdravila z nabilonom in zdravila z ekstrakti konoplje, ki morajo ustrezati določbam *Zakona o zdravilih* (30). V Sloveniji ne poznamo pravilnika, ki bi opredelil, kdo od zdravnikov lahko predpiše kanabinoidne učinkovine, prav tako ni

strokovnih priporočil glede indikacij, kontraindikacij in neželenih učinkov teh zdravil. Zdravniki se tako redko odločajo za njihovo predpisovanje, beležimo pa porast bolnikov, ki pridobijo izdelke od zdravilcev, na spletu ali jih pridobivajo sami. Zaradi nihanja vsebnosti učinkovin in nestrokovne uporabe beležimo porast zastrupitev s konopljo v Sloveniji. V letu 2010 so tako v ljubljanskem Centru za zastrupitve obravnavali 6 primerov, v letu 2014 pa že 53 (31).

Po svetu narašča število držav, ki se odločajo za legalizacijo uporabe konoplje v medicinske namene. V ZDA so štiri države dovolile tudi rekreativno uporabo konoplje, kar je opazno povečalo število urgentnih primerov in primerov hospitalizacij zaradi akutne zastrupitve s konopljo (32). V Evropi je država z najdaljšo zgodovino uporabe tako v medicinske kot rekreativne namene Nizozemska. Podjetje Bedrocan je odgovorno za dobavo in proizvodnjo izdelkov s točno določeno vsebnostjo kanabinoidnih komponent v različnih razmerjih v skladu z dobro proizvodno prakso. Sicer pa je uporaba v medicinske namene dovoljena v večini Evropskih držav, nazadnje so jo odobrili v Franciji, Romuniji in na Češkem (33).

1.2.5. Nekaj potencialnih terapevtskih možnosti uporabe kanabinoidov v prihodnosti

V podatkovni bazi ClinicalTrials (34) marca 2017 najdemo 479 študij, ki se ukvarjajo z učinki kanabinoidnih spojin. Veliko študij najdemo v povezavi z neželenimi učinki THC in zdravili, ki so prisotna na trgu. S potencialnim učinkom pri zdravljenju raka se ukvarja 27 študij, 71 jih proučuje vpliv na različne tipe bolečin. Z antiepileptičnim učinkom CBD se ukvarjajo v petih študijah, od tega v dveh za zdravljenje otroške epilepsije. Nekaj študij proučuje možno vlogo kanabinoidov pri zdravljenju anksioznosti, shizofrenije ter Parkinsonove bolezni.

Zaradi svoje zaščitne vloge se zdita endokanabinoidni sistem in njegova modulacija ena od možnih terapevtskih poti zdravljenja nevrodegenerativnih obolenj, pri katerih prihaja do spremembe v endokanabinoidnih signalnih mehanizmih. Kanabinoide bi morda lahko uporabili pri zdravljenju kroničnega vnetja, ki je glavni mediator teh bolezni. Raziskave so pokazale, da sintezni JWH015, ki je selektivni agonist CB₂, zmanjšuje sintezo provnetnih

citokinov in spodbuja fagocitozo amiloida β , ki je udeležen pri nastanku Alzheimerjeve bolezni. Receptor, odgovoren za protivnetno delovanje kanabinoidov, je jedrni hormonski receptor PPAR γ . Poleg zmanjšanja kroničnega vnetnega odziva kanabinoidi sodelujejo tudi pri uravnavanju homeostaze Ca^{2+} , zmanjšujejo oksidativni stres in okvaro mitohondrijev (7).

Različne oblike medicinske konoplje so se v študijah izkazale za učinkovite tudi pri lajšanju nevropatske, kronične in postoperativne bolečine ter bolečine, povezane s fibromialgijo, revmatoidnim artritisom, multiplo sklerozo in rakom (28). V eni od študij so ugotovili, da je pri kajenju konoplje analgetični učinek odvisen od vsebnosti THC. Pri bolnikih, ki so kadili konopljo z večjo vsebnostjo THC (do 9,4 %), je bila analgezija močnejša, hkrati pa jo je spremljala večja pojavnost neželenih učinkov (28).

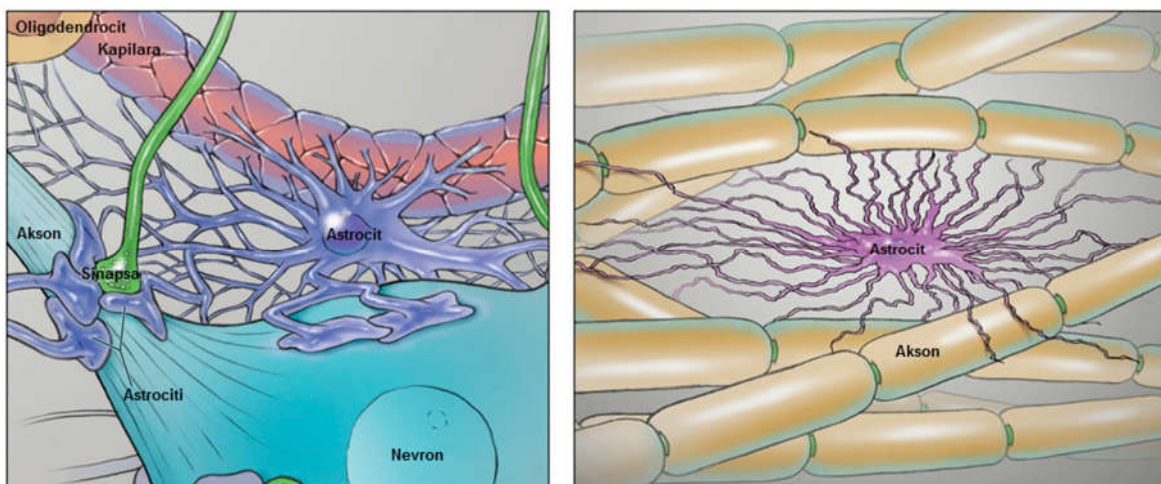
Uporaba kanabinoidov pri bolnikih z rakom je večinoma omejena na preprečevanje bruhanja in slabosti, povzročene s kemoterapijo, lajšanje bolečin ter stimulacijo apetita (20). Zadnje raziskave nakazujejo tudi protitumorno delovanje THC, CBD, sinteznih analogov in anandamida pri različnih tipih rakov (20). Morda bi kombinacija CBD in kemoterapevtikov v prihodnosti prinesla boljše rezultate zdravljenja nevroblastoma, hkrati pa z zmanjšanjem odmerka kemoterapevtikov omogočila manjšo toksičnost in manj dolgotrajnih posledic za bolnike (20).

1.3. Astrociti

Astrociti so v preteklosti veljali za homogeno populacijo celic s pasivno vlogo v živčevju, saj so verjeli, da je njihova edina naloga podpora živčnim celicam (35). Danes vemo, da gre za specializirane glijalne celice, ki tesno prekrivajo celotno osrednje živčevje in v zdravih možganih opravljajo esencialne in kompleksne funkcije (36).

Ločimo dve vrsti astrocitov, in sicer vlaknaste ter protoplazemske astrocite (slika 6). Vlaknasti astrociti, ki jih najdemo v beli substanci, imajo značilno razvejene izrastke ter tipično zvezdasto obliko. Njihov označevalec je glijalna fibrilarna kislina beljakovina (GFAP, angl. glial fibrillary acidic protein). V sivi substanci so prisotni protoplazemski astrociti, ki

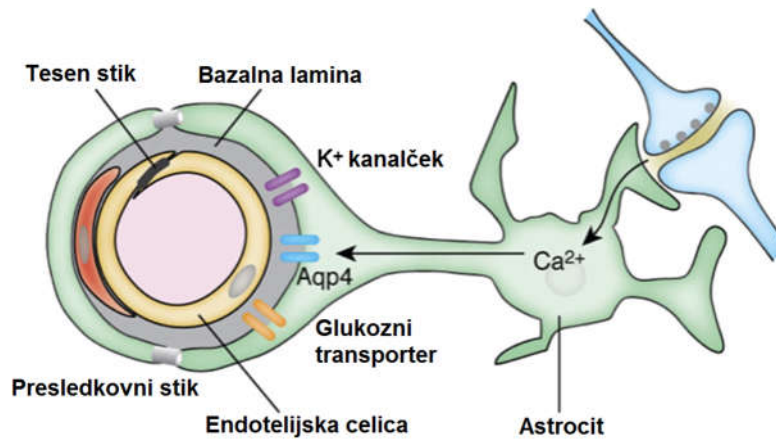
se s številnimi tankimi izrastki povezujejo s sinapsami na eni in krvnimi žilami na drugi strani ter tvorijo nevrovaskularno enoto. V osrednjem živčevju poznamo še dva tipa specializiranih celic: Bergmannova glija, ki jo najdemo v malih možganih, ter Mullerjeve celice, ki so prisotne na mrežnici (35). Človeški astrociti so večji, strukturno bolj kompleksni in raznoliki kot astrociti glodavcev. S sosodnjimi astrociti se povezujejo preko presledkovnih stikov (36).



Slika 6. Protoplazemski (levo) in vlaknasti (desno) astrocit. Prirejeno po (35).

Glede na dogajanje v okolju prilagajajo svojo obliko in funkcijo ter igrajo dinamično vlogo, ki je različna v različnih življenjskih obdobjih. Izločajo številne dejavnike in aktivne molekule, ki vplivajo na razvoj sinaps, aktivnost živčnih celic in plastičnost med obdobjem razvoja živčevja. V razvojnem obdobju sintetizirajo in izločajo molekule, ki gradijo zunajcelični matriks, s katerim omogočajo anatomsko podporo živčnim celicam ter sinapsam. Astrociti izločajo tudi nevrotrofične dejavnike, ki v živčnih celicah spodbujajo preživetje, diferenciacijo in zorenje ter usmerjajo rast aksonov (37, 38).

V odraslem obdobju vzdržujejo okolje za normalno delovanje živčevja. Sintetizirajo in izločajo molekulske mediatorje – dušikov oksid (NO), prostaglandine in arahidonsko kislino, ki vplivajo na uravnavanje krvnega pretoka v možganih (slika 7), kjer vplivajo tudi na permeabilnost krvno-možganske pregrade. Pomembno vlogo imajo pri vzdrževanju ionskega in pH ravnovesja ter ravnovesja zunajceličnih tekočin. Izražajo visoke nivoje transporterjev za živčne prenašalce (glutamat, GABA in glicin), ki pripomorejo k odstranjevanju teh iz sinaptične špranje (36).



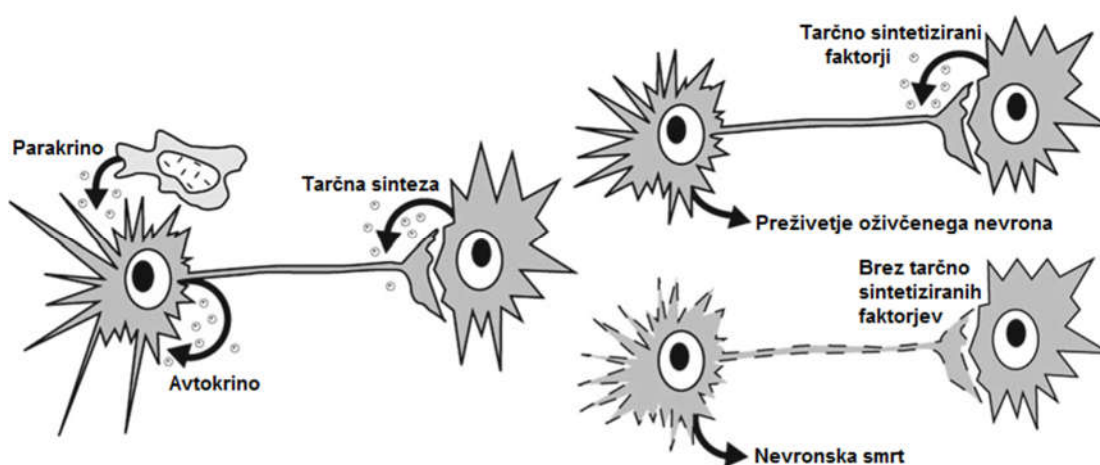
Slika 7. Nadzor krvnega pretoka. Povečana količina Ca^{2+} v astrocitih sproži aktivacijo fosfolipaze 2, kar povzroči sproščanje arahidonske kisline. Ciklooksigenaza-1 metabolizira arahidonsko kislino do prostaglandina E2, ki povzroči vazodilatacijo. Aqp4: akvaporin 4. Prirejeno po (39).

Astroцитi tudi direktno vplivajo na sinaptično aktivnost preko reguliranega izločanja sinaptično aktivnih molekul, kot so glutamat, ATP, GABA in D-serin. Sproščanje glijotransmiterjev poteka kot odziv na spremembo v nevronske sinaptične aktivnosti. Astroцитi so tako del tripartitne sinapse in imajo esencialno vlogo pri prenosu informacij (36). So edine celice v osrednjem živčevju, ki shranjujejo glikogen, kar živčne celice izkoristijo kot vir energije za zadostitev metabolnih potreb v stanju hipoglikemije (40).

V normalnem okolju so astroцитi mirujoče celice. Aktivirajo se ob prisotnosti poškodb ali bolezni osrednjega živčevja, ki sprožijo proces reaktivne astroglioze. Ta predstavlja skupek molekularnih, funkcijskih in morfoloških sprememb v celicah kot odziv na škodljivo delovanje (rastnih dejavnikov, citokinov, ROS) iz okolja. V odvisnosti od stopnje škodljivega vpliva potekata hipertrofija ter proliferacija celic, poveča pa se tudi izražanje GFAP. Astroцитi nato reagirajo z drugimi tipi celic in tvorijo trden kolagenski zunajcelični matriks – brazgotino, ki predstavlja nevroprotektivno pregrado in zaščito pred vplivom vnetnih in infektivnih snovi, hkrati pa zavira migracijo celic in aksonov. Reaktivni astroцитi ščitijo osrednje živčevje pred škodljivim vplivom ROS, glutamata, NH_4^+ ionov, pomagajo pri obnovi krvno-možganske pregrade ter predvsem preprečijo razširitev delovanja vnetnih mediatorjev na zdrave dele osrednjega živčevja (36).

1.4. Nevrotrofini

Nevrotrofini so ob odkritju veljali za tarčno sintetizirane molekule, ki spodbujajo rast in preživetje živčnih celic, danes pa vemo, da so udeleženi pri uravnavanju nevrogeneze, nevronske diferenciacije, nevronske plastičnosti ter ohranjanju fenotipa živčnih celic (41). Na sliki 8 so prikazani načini delovanja nevrotrofinov na živčne celice. Zaradi nevrozaščitne vloge in sposobnosti zaščite živčnih celic ob poškodbah in vplivih toksinov kažejo v zadnjih letih odličen potencial za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni (42).



Slika 8. Modeli delovanja nevrotrofinov. Na živčne celice lahko delujejo parakrino, avtokrino ali anterogradno. V telesih živčnih celic pospešujejo preživetje in diferenciacijo. Količina sintetiziranih nevrotrofinov je omejena, zato ne zadostuje za preživetje vseh nevronov. Prirejeno po (42).

Družino nevrotrofinov pri sesalcih sestavljajo štiri polipeptidi, ki so si med seboj strukturno in funkcijsko podobni (41): živčni rastni dejavnik (NGF, angl. nerve growth factor) (43), nevrotrofični dejavnik možganskega izvora (BDNF, angl. brain-derived neurotrophic factor) (44), nevrotrofin-3 (NT-3) (45) in nevrotrofin-4 (NT-4) (46). NGF je izražen in prisoten v tarčnih področjih manjših simpatičnih in senzoričnih nevronov. BDNF nastaja v skeletnih mišicah, ki so oživčene z motoričnimi nevroni. BDNF, NT-3 in NT-4 spodbujajo preživetje množice perifernih senzoričnih nevronov (47). Medtem ko v osrednjem živčevju NGF precej specifično nudi trofično podporo holinergičnim živčnim celicam sprednjega dela možganske baze (48), BDNF in NT-3 učinkujeta na različne populacije živčnih celic. Znano je, da skrbita za preživetje, diferenciacijo, migracijo in procese sinaptične plastičnosti noradrenergičnih, GABA-ergičnih, dopaminskih,

glutamatnih, holinergičnih ter serotoninskih živčnih celic (48,49). Pomanjkanje nevrotrofične podpore lahko zato prizadene katerekoli živčne poti v možganih in sproži/pospeši neurodegenerativne procese.

Vir nevrotrofinov v osrednjem živčevju predstavljajo tako živčne kot tudi neživčne celice (50). V živčnih celicah je sinteza nevrotrofinov odvisna od nevronske aktivnosti, saj v veliki meri na izražanje posameznih nevrotrofinov vplivajo živčni prenašalci. Tudi v astrocitih imajo pomemben vpliv na sintezo številni živčni prenašalci, kot so noradrenalin, serotonin, dopamin (51) in acetilholin (52). Vpliv na sintezo imajo številne farmakološko aktivne snovi, rastni dejavniki, citokini, različni mediatorji vnetja, hormoni (trijodtironin), različna zdravila (antiepileptiki, antidepresivi), nikotin, alkohol, pa tudi prehrana in telesna aktivnost (49). Vpliv vsake od omenjenih snovi je specifičen in odvisen od vrste nevrotrofina. V množici farmakološko aktivnih snovi kanabinoidov še niso testirali, zato njihovega vpliva na sintezo nevrotrofinov v astrocitih ne poznamo.

Nevrotrofini sprožijo celične učinke preko dveh tipov receptorjev. Najprej so izolirali nizkoafinitetni receptor za nevrotrofine p75 ($p75^{NTR}$), na katerega se vežejo vse nezrele, pro-oblike nevrotrofinov, z manjšo afiniteto pa tudi zreli nevrotrofini. Ob aktivaciji receptorja poteče prenos signalov, ki sodelujejo pri regulaciji preživetja živčnih celic, diferenciaciji in sinaptični plastičnosti. Z visoko afiniteto in specifičnostjo se nevrotrofini vežejo na receptorje Trk, ki spadajo v družino receptorjev z lastno tirozin-kinazno aktivnostjo. NGF aktivira TrkA, BDNF in NT-4 se vežeta na TrkB, NT-3, ki je sposoben tudi vezave na oba omenjena receptorja, pa na TrkC (42).

Sinteza vseh nevrotrofinov se začne s pre-proobliko. Ko se z N-terminalnega dela pre-pronevrotrofina odstrani hidrofobna regija signalnega peptida, nastane pronevrotrofin. Odcepitev in pretvorba do odrasle oblike poteka v endoplazmatskem retikulumu ali pa se pronevrotrofin transportira preko plazemske membrane in sprosti v nespremenjeni obliki, nato pa ga plazmin ali druge zunajcelične proteaze spremenijo v odrasel nevrotrofin v postopku proteolitične odcepitev (53). Končni produkt so 13 do 15 kDa veliki polipeptidi. Odrasle oblike BDNF, NT-3 in NT-4 se približno 50-odstotno ujemajo v aminokislinskem zaporedju z nevrotrofinom NGF (41).

2. Namen dela

Astroцити so glijalne celice, ki skrbijo za normalno delovanje sinaps, ščitijo živčevje pred škodljivimi vplivi s procesom reaktivne astroglioze ter skozi celotno življenjsko obdobje sproščajo nevrotrofične dejavnike, ki spodbujajo preživetje in ohranjajo fenotip živčnih celic. Okrnjeno delovanje astroцитов lahko sproži različne nevrodegenerativne procese. Po svetu narašča uporaba kanabinoidnih substanc tako v medicinske kot tudi rekreativne namene, pri čemer so njihovi učinki pogosto neraziskani in škodljivi. Vplivov fitokannabinoidov THC in CBD ter sintezne substance SGT-24 na funkcijo astroцитов ne poznamo.

V sklopu magistrske naloge bomo preverili naslednje delovne hipoteze:

1. Kanabinoidi pri akutni izpostavljenosti znižajo celični metabolizem astroцитов.

Molekula ATP je v celicah vir energije za večino celičnih procesov, zato je prisotna pri vseh metabolno aktivnih celicah (54). V nalogi bomo proučili vpliv fitokannabinoidov THC in CBD ter sintezne substance SGT-24 na znotrajcelični nivo ATP in sposobnost preživetja astroцитов novorojenih podgan.

2. Kanabinoidi imajo pri akutni izpostavljenosti citotoksičen vpliv na astroците.

Ko so celice izpostavljene citotoksičnim dejavnikom, to lahko povzroči nekrozo in/ali programirano celično smrt – apoptozo (55). Pri slednji imajo pomembno vlogo encimi kaspaze, pri procesu nekroze pa pride do sprostitve laktat-dehidrogenaze (LDH), kar je znak poškodovanosti celice. V magistrski nalogi bomo preverili vpliv izbranih kanabinoidov na kaspazno aktivnost ter nivo LDH v astroцитih novorojenih podgan.

3. Kanabinoidi pri akutni izpostavljenosti zavirajo nevrotrofično aktivnost astroцитов.

Astroцити v normalnih razmerah sintetizirajo in sproščajo nevrotrofine. Te majhne peptidne molekule spodbujajo preživetje in razvoj živčnih celic, zato lahko zavrta nevrotrofična aktivnost v astroцитih povzroči pojav nevrodegenerativnih sprememb v

živčnem sistemu (42). V magistrski nalogi bomo proučili vpliv THC, CBD in SGT-24 na sintezo in sproščanje BDNF, NGF in NT-3 v astrocitih novorojenih podgan.

3. Materiali in metode

3.1. Materiali

Za pripravo celičnih kultur:

- Leibowitzev medij L-15
- Dulbeccov modificiran Eaglov medij s Hamovo hranilno mešanico F-12 (1:1) (DMEM/F12)
- fetalni goveji serum (FBS)
- penicilin-streptomycin (10.000 IU/mL – 10.000 UG/mL) (P/S)
- fosfatni pufer z NaCl, pH = 7.4 (PBS)
- Dulbeccov fosfatni pufer z NaCl (DPBS)
- Tripsin, 2,5 %
(vse Gibco, Life Technologies, Carlsbad, ZDA)
- natrijev hidrogenkarbonat za celične kulture (NaHCO₃) *(Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA)*
- steklenice, petrijevke in plošče za gojenje celičnih kultur *(NUNC, Roskilde, Danska)*

Kanabinoidi:

- Δ9-tetrahidrokanabinol – Dronabinol *(THC Pharm, Frankfurt am Main, Nemčija)*
- kanabidiol
- kumil-PINACA

Vse kanabinoidne substance smo dobili od doc. dr. Mirana Brvarja s Centra za klinično toksikologijo in farmakologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

Kompleti reagentov:

- BIO-RAD *(Bio-Rad Laboratories, München, Nemčija)*
- ATPlite 1step *(Perking Elmer, Boston, USA)*
- AlamarBlue Cell Viability Reagent *(Invitrogen, Molecular Probes Inc., Eugen, ZDA)*
- Caspase-Glo® 3/7 Assay *(Promega Corporation, Madison, ZDA)*
- Caspase-Glo® 8 Assay *(Promega Corporation, Madison, ZDA)*
- Caspase-Glo® 9 Assay *(Promega Corporation, Madison, ZDA)*

- CytoTox-ONE Homogenous Membrane Integrity test (*Promega Corporation, Madison, ZDA*)

Za encimsko-immunske metode:

- monoklonsko mišje protitelo proti človeškemu NT-3
- z biotinom označeno kozje protitelo proti človeškemu NT-3
- monoklonsko mišje protitelo proti človeškemu NGF
- z biotinom označeno kozje protitelo proti človeškemu NGF
- monoklonsko mišje protitelo proti človeškemu BDNF
- z biotinom označeno kozje protitelo proti človeškemu BDNF
- rekombinantni človeški NT-3 (rh NT-3)
- rekombinantni človeški BDNF (rh BDNF)
- rekombinantni podganji beta-NGF (rr NGF)
- streptavidin, konjugiran s hrenovo peroksidazo
- stabiliziran vodikov peroksid (barvni reagent A)
- stabiliziran tetra-metilbenzidin (barvni reagent B)

(vse R&D Systems, Minneapolis, ZDA)

- H₂SO₄, 96 % (*Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija*)
- goveji serumski albumin (BSA), saharoza, natrijev azid (NaN₃), Triton X-100, Trizma baza, natrijev klorid (NaCl), fenilmetil-sulfonil florid (PMSF), N-etilmaleimid (NEM), kalcijev klorid (CaCl₂), EDTA (*vse Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA*)
- Tween 20 (*Promega Corporation, ZDA*)
- plošče za encimsko-immunske poskuse (*NUNC, Roskilde, Danska*)
- BIO-RAD komplet za določevanje proteinov (*Bio-Rad Laboratories, München, Nemčija*)

Poskusne živali

Za pripravo celičnih kultur smo uporabili novorojene Wistar podgane, stare 1 do 3 dni, vzgojene v Medicinskem eksperimentalnem centru Inštituta za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Usmrtitev živali smo priglasili na Veterinarsko upravo Republike Slovenije (*potrdilo št. 34401-87/2008/3*).

3.2. Metode

3.2.1. Priprava primarnih celičnih kultur astrocitov

Reagenti:

Za 500 mL medija DMEM:	
6 g	DMEM/F-12
1,219 g	NaHCO ₃
500 mL	ddH ₂ O

Za 120 mL inkubacijskega medija:	
106,8 mL	DMEM medija
12 mL	FBS
1,2 mL	P/S

Za 100 mL EDTA (10 mM):	
0,372 g	EDTA
100 mL	DPBS

Za 40 mL 0,25-odstotne raztopine tripsina:	
4 mL	2,5 % tripsina
36 mL	DPBS/EDTA

Za 160 mL DPBS/EDTA:	
16 mL	EDTA
144 mL	DPBS

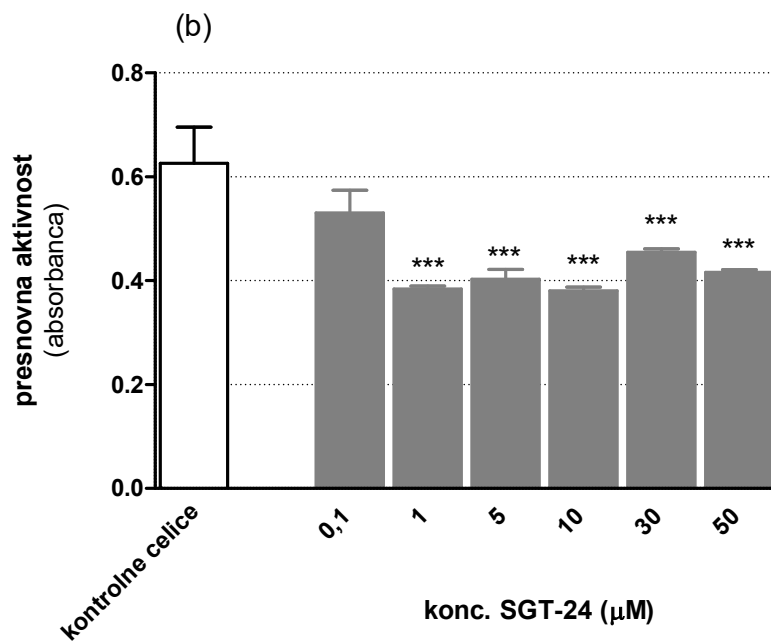
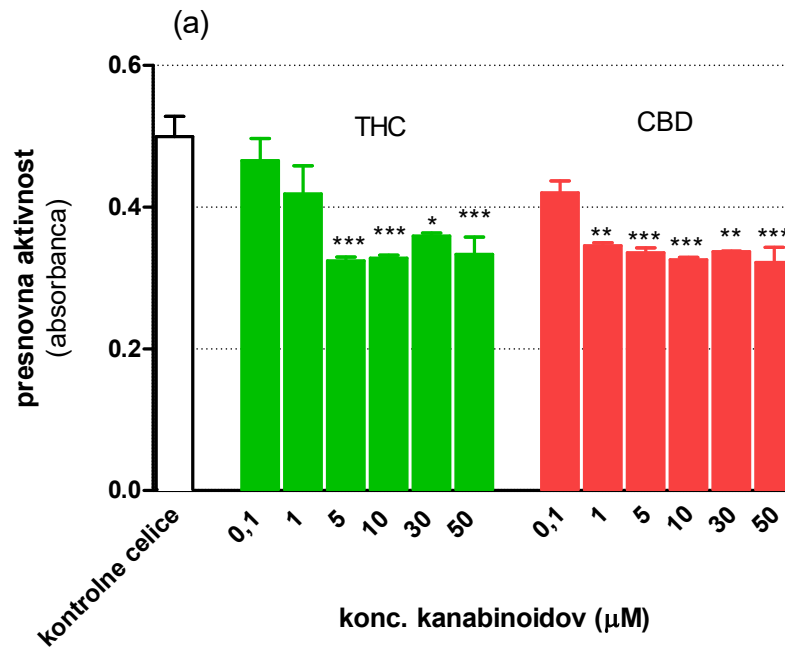
Postopek:

Primarne kulture astrocitov možganske skorje podgane smo pripravili po metodi, ki je opisana v Mele in Jurič (2013) (56). Novorojene podgane, stare 1 do 3 dni, smo žrtvovali z dekapitacijo in jim aseptično odvzeli možgane. Po odstranitvi možganskih ovojnica smo skorjo ločili od preostalih možganov in skozi sterilno najlonsko mrežico s premerom por 75 µm tkivo mehansko razdružili v inkubacijski medij. Celice smo nato v steklenicah za gojenje celičnih kultur gojili do 70- do 80-odstotne konfluentnosti v vlažni atmosferi s 5 % CO₂ in 90 % zraka pri konstantni temperaturi 37 °C. Medij smo redno menjavali in mikroskopsko spremljali rast celičnih kultur. Celice smo trikrat stresali čez noč pri temperaturi 37 °C na 200 obratih/min in jih nato s pomočjo 0,25-odstotne raztopine tripsina presadili v nove steklenice za gojenje celičnih kultur, zatem pa smo jih v istih razmerah gojili do dosežene konfluentnosti (10 do 14 dni). Za izvedbo poskusov smo celice presadili na petrijevke s premerom 35 ali 100 mm ali mikrotitrne plošče ter jih izpostavili različnim koncentracijam THC, CBD in SGT-24 v različnih časovnih intervalih.

3.2.2. Tretiranje astrocitov s THC, CBD in SGT-24

Celične kulture astrocitov možganske skorje podgane smo izpostavili THC, CBD in SGT-24 v koncentracijskem območju od 0,1 do 50 μM ter izvedli inkubacijo v časovnih intervalih od 2 do 24 ur. Po zaključenem tretiranju celic smo odstranili medij ter celice sprali z ledeno mrzlim PBS. Nato smo celice postrgali ter jih centrifugirali 7 minut pri 12.000 obratih/min in temperaturi 4 °C. Po končanem postopku smo odstranili supernatant. Celice smo shranili pri -70 °C do naslednjega poskusa.

S preliminarnimi poskusi smo najprej za vsak kanabinoid določili koncentracijo, pri kateri smo opazili največji učinek na preiskovani parameter. Z izbrano koncentracijo smo nato izvedli vse nadaljnje poskuse, ki smo jih uporabili za potrebe magistrske naloge. Celice smo tako izpostavili THC v koncentraciji 5 μM , CBD in SGT-24 pa v koncentraciji 1 μM . Izbrane koncentracije se skladajo s koncentracijami kanabinoidov v drugih raziskavah (16, 57, 58). Primer rezultatov preliminarne poskusa koncentracijsko odvisnega vpliva kanabinoidov na presnovno aktivnost astrocitov po 12-urni inkubaciji je prikazan na sliki 9. Preliminarne poskuse koncentracijske odvisnosti učinkov v študiji uporabljenih kanabinoidov smo sicer izvedli za vse preiskovane parametre (rezultati niso prikazani).



Slika 9. Primer rezultatov preliminarnega poskusa koncentracijsko odvisnega vpliva THC, CBD (a) in SGT-24 (b) na presnovno aktivnost astrocitov po 12-urni inkubaciji. Presnovno aktivnost v celicah smo določili s testom Alamar Blue. Stolpci predstavljajo srednjo vrednost \pm SEM neodvisnega poskusa s THC in CBD (a) ali s SGT-24 (b). Statistično značilnost smo preverili z enosmerno analizo variance (one-way ANOVA) z Bonferronijevim post hoc testom in je označena kot *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ in * $p < 0,05$.

3.2.3. Določanje celotnih proteinov v vzorcih

Ker smo vsebnost nevrotrofinov, nivo ATP in aktivnost kaspaz določevali v količini na mg proteina, smo morali najprej določiti količino celokupnih proteinov v vzorcih, kar smo storili z metodo po Bradfordu. Gre za spektrofotometrično metodo, ki temelji na reakciji barvila s proteini iz vzorca. Določitev proteinov smo izvedli na mikrotitrskih ploščah s kompletom BIO-RAD. Za vsako ploščo posebej smo pripravili umeritveno krivuljo, za katero smo uporabili goveji serumski albumin v koncentracijah od 0 do 50 $\mu\text{g/mL}$. Vzorce v volumnu 5 μL , ki smo jim dodali 155 μL bidestilirane vode in 40 μL reagenta Bio-Rad protein Assay, smo na ploščo nanašali v dveh ponovitvah. Absorbanco standardov in vzorcev smo nato po 30 minutah izmerili pri valovni dolžini 595 nm s čitalcem za mikrotitrsko ploščo (*SynergyHT*, *Bio Tek*, *Winooski*, *ZDA*). Iz umeritvene krivulje smo izračunali količino celotnih proteinov v vzorcih.

3.2.4. Določanje vpliva kanabinoidov na celični metabolizem astrocitov

3.2.4.1. Določanje vsebnosti ATP

Vsebnost ATP v vzorcih smo določevali s pomočjo kompleta ATPlite 1 step (*PerkinElmer*). ATP je prisoten v vseh metabolno aktivnih celicah in je odličen pokazatelj viabilnosti celic. Občuten padec njegove koncentracije pomeni pojav nekroze ali apoptoze. Metoda temelji na principu merjenja svetlobnega signala, ki nastane pri reakciji med ATP in dodanima luciferinom ter D-luciferazo. Signal je sorazmeren koncentraciji ATP v vzorcu (54).

Vzorce smo razredčili do koncentracije 1 mg/mL in jih v dveh ponovitvah po 20 μL odpipetirali na bele mikrotitrsko ploščo. Tudi standarne raztopine, ki smo jih pripravili v koncentracijskem območju od 1 pM do 1 μM , smo v dveh ponovitvah nanesti po 20 μL v vsako luknjico. Za slepi vzorec smo uporabili 20 μL liznega pufra. Nato smo v vsako luknjico dodali 20 μL reagenta ATPlite. Po 2-minutnem stresanju na orbitalnem mešalniku pri 700 obratih/min, smo s čitalcem za mikrotitrsko ploščo (*SynergyHT*, *BioTek*, *Winooski ZDA*) izmerili luminiscenčni signal.

3.2.4.2. Določanje sposobnosti preživetja

Sposobnost preživetja – viabilnost celic smo določali s testom Alamar Blue®. Presnovno aktivne celice so sposobne pretvoriti resazurin, ki je aktivna sestavina reagenta, v resorufin. Resazurin je modro obarvan reagent z absorpcijskim maksimumom pri 605 nm, ki šibko fluorescira. V citosolu celic poteka redukcija resazurina do rožnato obarvanega resorufina, ki močno fluorescira. Količina fluorescence oz. absorbance je premo sorazmerna številu živih celic v kulturi in ustreza metabolni aktivnosti celic (59).

Celice na mikrotitrskih ploščah smo izpostavili 5 μ M THC, 1 μ M CBD ali 1 μ M SGT-24 v različnih časovnih intervalih (2 do 24 ur). Po končanem poskusu smo odstranili medij ter nato vsakemu vzorcu dodali 100 μ L medija s testom Alamar Blue. Reagent smo pripravili tako, da smo zmešali 0,4 mL testa Alamar Blue in 9,6 mL celičnega medija. Ploščo smo inkubirali pri 37 °C. Po štirih urah smo izmerili absorbanco pri 570 nm s čitalcem za mikrotitrsko ploščo (*SynergyHT*, *BioTek*, *Winooski ZDA*).

3.2.5. Določanje citotoksičnega vpliva kanabinoidov na astrocite

3.2.5.1. Določanje aktivnosti kaspaz 3/7, 8 in 9

Test temelji na luminogenem substratu za luciferazo, povezanim s tetrapeptidom LETD. Kaspaze 3/7, 8 in 9 cepijo vez med tetrapeptidom ter substratom za luciferazo (aminoluciferinom). Sprosti se aminoluciferin, ki reagira z luciferazo. Nastali luminiscenčni signal je premo sorazmeren količini kaspazne aktivnosti v danem vzorcu (60, 61, 62).

Postopek:

1. Usedlini celic smo dodali 150 μ L liznega pufra in mešali na vibracijskem mešalniku, dokler usedlina ni bila več vidna.
2. Določili smo vsebnost celotnih proteinov in nato lizat celic razredčili tako, da je bilo v 1 mL celičnega lizata 1 mg proteinov.
3. Na mikrotitrsko ploščo za merjenje luminiscence smo v dveh ponovitvah odpipetirali po 20 μ L vzorca in liznega pufra, ki je služil kot slepi vzorec.

4. K vzorcu oz. pufru na mikrotitrski plošči smo dodali 20 μL substrata Caspase-Glo® 3/7, 8 ali 9, ki smo ga predhodno rekonstituirali v pufru Caspase-Glo® 3/7, 8 ali 9 in ogreli na sobno temperaturo.
5. Mikrotitrsko ploščo smo 2 min stresali na orbitalnem mešalniku pri 700 obratih/min.
6. Ploščo smo 20 minut inkubirali pri sobni temperaturi.
7. Luminiscenco smo izmerili s čitalcem za mikrotitrsko ploščo (*SynergyHT, BioTek, Winooski ZDA*).

3.2.5.2. Določanje aktivnosti laktat-dehidrogenaze

Nivo sproščenega LDH iz poškodovanih celic smo določevali s pomočjo testa CytoTox-ONE Homogenous Membrane Integrity (*Promega Corporation, Madison, ZDA*). Pred začetkom poskusa smo vse reagente ogreli na sobno temperaturo. Postopek smo izvajali v zatemnjenem laminariju.

Celice smo nasadili na prozorne mikrotitrsko ploščo in jih izpostavili 5 μM THC, 1 μM CBD ali 1 μM SGT-24 v različnih časovnih intervalih. Kontrolne celice smo inkubirali v standardnih razmerah. Nato smo na črno mikrotitrsko ploščo v treh ponovitvah odpipetirali po 20 μL medija brez celic, ki je služil kot negativna kontrola, 20 μL medija, v katerem smo gojili celice, izpostavljene kanabinoidom in 20 μL pozitivne kontrole. Ta predstavlja medij, v katerem smo gojili celice, ki smo jih lizirali z dodatkom 2 μL liznega pufru. Nato smo na mikrotitrsko ploščo v vsako luknjico dodali 20 μL reagenta, prekrili s folijo ter stresali 30 sekund pri 700 obratih/min. Po 20-minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo dodali v vsako luknjico 10 μL raztopine za zaustavitev reakcije. Fluorescenco smo nato izmerili s čitalcem za mikrotitrsko ploščo (*SynergyHT, BioTek, Winooski ZDA*) pri valovni dolžini ekscitacije 560nm in emisije 590 nm.

3.2.6. Določanje vpliva kanabinoidov na nevrotrofično aktivnost

3.2.6.1. Priprava vzorcev za encimsko-immunske poskuse

Reagenti

Pufrna raztopina X:
50 mM Tris-HCl (pH = 7,0)
200 mM NaCl
10 mM CaCl ₂
0,1 % Triton X-100
0,5 % NaN ₃ v ddH ₂ O

Pufrna raztopina Y:
50 mM Tris-HCl (pH = 7,0)
200 mM NaCl
10 mM CaCl ₂
0,1 % Triton X-100
0,5 % NaN ₃
10 % BSA v ddH ₂ O
Inhibitorji proteaz, dodani tik pred uporabo: 1 mM EDTA, 1 mM NEM in 1 mM PMSF

Postopek

Celične usedline vzorcev smo odtalili in jim dodali 1 mL pufrne raztopine X. Nato smo celice za 10 sekund izpostavili ultrazvoku pri moči približno 1,5 W. Na mikrotitrsko ploščo, kjer smo kasneje določevali vsebnost proteinov, smo odpipetirali po 5 µL vsakega vzorca v dveh ponovitvah. Vzorcem razbitih celic smo dodali 109,3 µL pufrne raztopine Y ter jih nato centrifugirali 30 minut pri 22.400 obratih/min. Supernatant smo shranili v plastične epruvete za nadaljnje encimsko-immunske poskuse ter vzorce zamrznili pri -70 °C.

3.2.6.2. Kvantitativna določitev nevrotrofinov z encimsko-immunsko metodo

Vsebnost nevrotrofinov v astrocitih in nivoje njihovega sproščanja smo določili s pomočjo encimsko-immunske metode (ELISA), ki so jo razvili in optimizirali v našem laboratoriju (48, 63). Za določitev smo uporabili standarde proizvajalca *R&D Systems, ZDA* in parne sisteme protiteles, ki so omogočili kvantitativno in specifično določitev NT-3, BDNF in NGF v naših vzorcih.

Reagenti:

Pufrna raztopina A:
50 mM Tris HCl (pH = 7,0)
200 mM NaCl
10 mM CaCl ₂
0,1 % Triton X-100
0,5 % NaN ₃
1 % BSA v ddH ₂ O

Pufrna raztopina D:
0,1 % BSA
0,02 % NaN ₃
0,05 % Tween 20 v PBS

Pufrna raztopina B:
0,05 % Tween 20 v PBS

Pufrna raztopina C:
1 % BSA
5 % saharoze
0,05 % NaN ₃ v PBS

Pufrna raztopina E:
1 % BSA v PBS

Priprava standardov za umeritvene krivulje:

Za vsak test ELISA smo na vsaki plošči posebej izdelali umeritveno krivuljo. Kot standard smo uporabili rrNGF, rhBDNF ali rhNT-3, ki smo jih ustrezno razredčili v koncentracijskem območju od 0 do 375 pg/mL. Za redčenje smo uporabili pufarno raztopino A. Standarde smo na mikrotitrne plošče nanašali v dveh ponovitvah hkrati z vzorci.

Protokol BDNF, NGF in NT-3 ELISA:

1. Na mikrotitrsko ploščo smo v vsako od 96 luknjic nanesti 100 μ L raztopine primarnega monoklonskega protitelesa proti nevrotrofinom v PBS. Ploščo smo čez noč inkubirali pri 4 °C.
2. Ploščo smo trikrat sprali s pufarno raztopino B in nanesti v vsako luknjico 300 μ L pufrne raztopine B, da bi preprečili nespecifično vezavo.
3. Ploščo smo trikrat sprali s pufarno raztopino B. Nato smo v luknjice nanesti 100 μ L standardnih raztopin oz. vzorcev v dveh ponovitvah. Plošče smo inkubirali 1,5 ure pri 37 °C.
4. Po trikratnem spiranju s pufarno raztopino B smo v vsako luknjico odpipetirali po 100 μ L raztopine z biotinom označenih sekundarnih protiteles proti nevrotrofinom v puforni raztopini D. Plošče smo inkubirali 1,5 ure pri 37 °C.

5. Po spiranju s pufrno raztopino B smo dodali v vsako luknjico po 100 μL streptavidina, konjugiranega s hrenovo peroksidazo (1,25 mg/mL v pufrni raztopini E) in počakali 20 minut.
6. Ponovno smo sprali ploščo s pufrno raztopino B ter dodali po 100 μL mešanice stabiliziranega peroksida in kromogena v razmerju 1 : 1 (substrat).
7. Encimsko reakcijo smo po 20 do 30 minutah ustavili z dodatkom 50 μL H_2SO_4 .
8. V roku 15 min smo absorbanco obarvanega produkta izmerili spektrofotometrično s pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč (*SynergyHT*, *BioTek*, *Winooski ZDA*). Meritev smo izvedli pri 450 nm s korekcijo pri 540 nm.

Koncentracijo nevrotrufina, ki smo jo izračunali iz umeritvene krivulje, smo podali v koncentraciji na mg celotnih celičnih proteinov.

3.2.7. Statistična obdelava podatkov

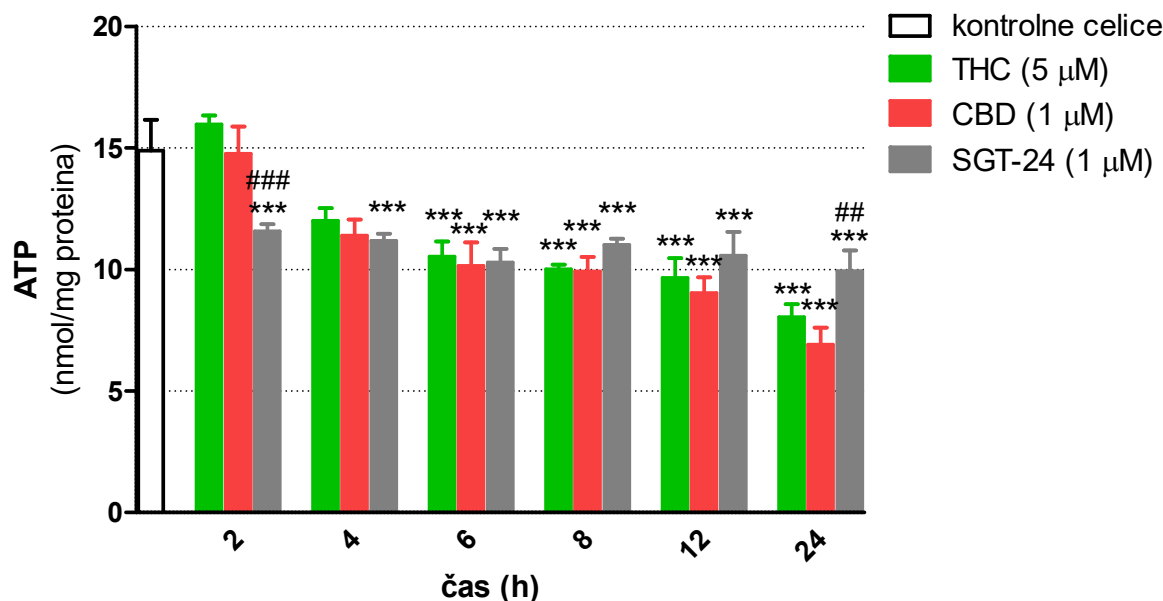
Obdelavo podatkov smo opravili s pomočjo računalniškega programa GraphPad Prism za okolje Windows (*GraphPad Software, San Diego, ZDA*). Predstavili smo jih s srednjo vrednostjo in standardno napako ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Statistično značilnost smo preverili z analizo variance (ANOVA) z Bonfferonijevim post hoc testom, za njeno mejo pa smo uporabili vrednost $p < 0,05$.

4. Rezultati

4.1. Vpliv kanabinoidov na celični metabolizem astrocitov

4.1.1. Merjenje znotrajcelične koncentracije ATP

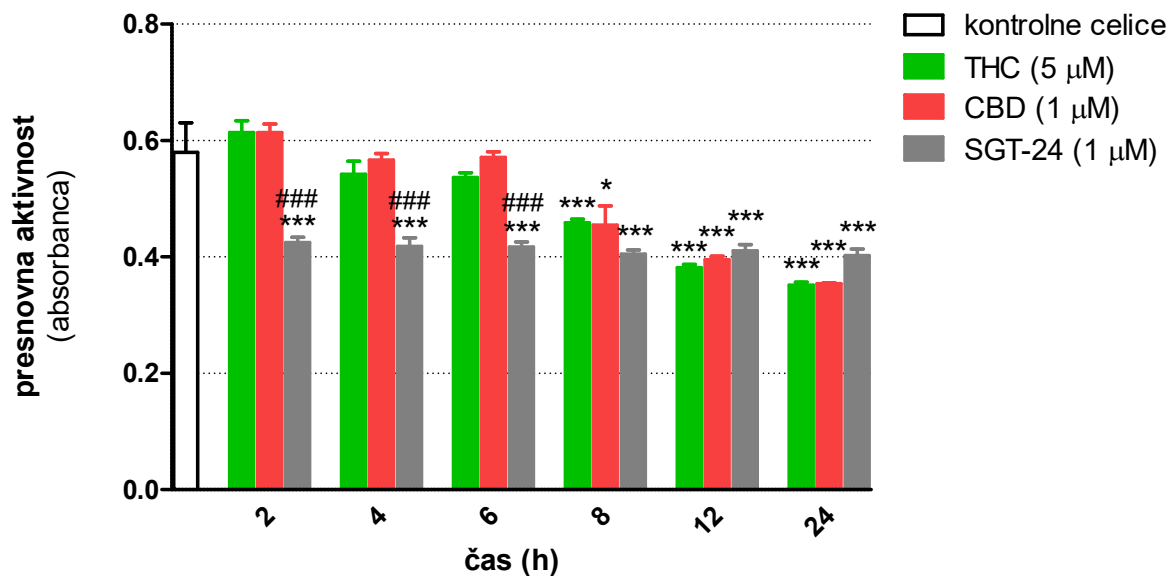
Adenozin-5'-trifosfat (ATP) je poglavitni prenašalec energije v celicah in pomemben glijalni prenašalec. V naši raziskavi smo ugotovili, da je vpliv kanabinoidov na znotrajcelično koncentracijo ATP v astrocitih odvisen od časa inkubacije celic z izbranimi snovmi (slika 10). Astroците novorojenih podgan smo izpostavili trem različnim kanabinoidom in vsebnost ATP določili v časovnem obdobju od 2 do 24 ur. Bazalni nivo ATP ($14,9 \pm 1,3$ nmol/mg proteina) se po inkubaciji celic v prisotnosti $5 \mu\text{M}$ THC značilno zniža po 6 urah (za 28,3 %) in se postopoma znižuje do 24-urne izpostavljenosti, ko opazimo največji, 46,0-odstotni upad znotrajcelične koncentracije ATP glede na kontrolne celice. $1 \mu\text{M}$ CBD prav tako povzroči značilno 31,8-odstotno znižanje ATP po 6-urnem tretiranju, po 24 urah pa za 53,7 % manjšo vsebnost ATP v primerjavi z netretiranimi celicami. SGT-24 učinkuje hitreje kot proučevana fitokanabinoida, saj smo 22,3-odstotni padec ATP zaznali že po 2 urah, po 24-urni izpostavljenosti pa je njegov učinek (33,3-odstotni padec vsebnosti ATP v primerjavi z bazalno vrednostjo) manj izrazit od učinkov THC in CBD.



Slika 10. Vpliv kanabinoidov na koncentracijo ATP v astrocitih novorojenih podgan. Celice smo 2 do 24 ur inkubirali s 5 μM THC, 1 μM CBD ali 1 μM SGT-24. Nivoje ATP v celicah smo določili s testom ATP lite 1step. Stolpci predstavljajo srednjo vrednost \pm SEM treh do petih neodvisnih poskusov. Statistično značilnost smo preverili z enosmerno analizo variance (one-way ANOVA) z Bonferronijevim post hoc testom in je označena kot *** $p < 0,001$ v primerjavi s kontrolnimi celicami ali kot # $p < 0,01$ in ### $p < 0,001$ v primerjavi s celicami, izpostavljenimi THC in CBD.

4.1.2. Sposobnost preživetja

Vpliv kanabinoidov na presnovno aktivnost astrocitov je odvisen od časa inkubacije celic z izbranimi snovmi (slika 11). Astroците novorojenih podgan smo inkubirali v prisotnosti proučevanih kanabinoidov od 2 do 24 ur in preverili njihov vpliv na presnovno aktivnost, ki je pokazatelj sposobnosti preživetja celic. Ugotovili smo, da je pri obeh fitokanabinoidih vpliv na presnovno aktivnost podoben in se s časom inkubacije povečuje. 5 μM THC značilno zniža presnovno aktivnost celic po 8-urni inkubaciji, največje znižanje pa povzroči po 24 urah, ko presnovna aktivnost pade za 39,4 % glede na kontrolne celice. Tudi izpostavljenost 1 μM CBD značilno zniža presnovno aktivnost po 8 urah, največji, 38,9-odstotni, padec glede na kontrolo pa prav tako opazimo po 24-urnem tretiranju. Vpliv SGT-24 je ponovno značilno hitrejši od vplivov THC in CBD, saj že po 2 urah povzroči 26,7-odstotno znižanje presnovne aktivnosti, ki nato počasi pada s časom in doseže 30,6-odstotno znižanje po 24-urni inkubaciji.



Slika 11. Vpliv kanabinoidov na presnovno aktivnost astrocitov novorojenih podgan. Celice smo 2 do 24 ur inkubirali s 5 μM THC, 1 μM CBD ali 1 μM SGT-24. Presnovno aktivnost v celicah smo določili s testom Alamar Blue. Stolpci predstavljajo srednjo vrednost ± SEM treh do petih neodvisnih poskusov. Statistično značilnost smo preverili z enosmerno analizo variance (one-way ANOVA) z Bonferronijevim post hoc testom in je označena kot *** p < 0,001 in * p < 0,05 v primerjavi s kontrolnimi celicami ali kot ### p < 0,001 v primerjavi s celicami, izpostavljenimi THC in CBD.

Rezultati prvega dela naloge so pokazali, da izbrani kanabinoidi s postopnim zaviranjem znotrajcelične koncentracije energetskega ATP in zmanjševanjem presnovne aktivnosti značilno vplivajo na celični metabolizem in s tem na sposobnost preživetja astrocitov v osrednjem živčevju.

4.2. Citotoksični vpliv kanabinoidov na astrocite

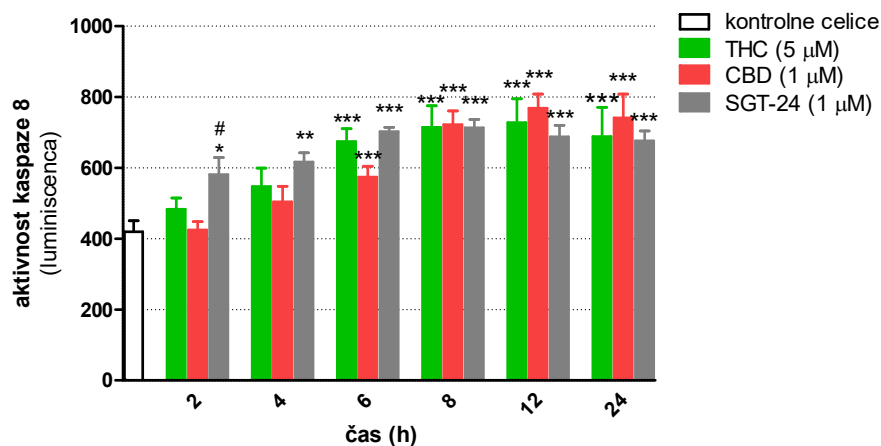
4.2.1. Merjenje kaspazne aktivnosti

Izpostavljenost astrocitov različnim kanabinoidom po določenem času privede do pojava programirane celične smrti. Pri procesu apoptoze sodelujejo različne prožilne kaspaze, kot sta kaspaza 8, ki je poglavitna prožilna kaspaza ekstrinzične poti, in kaspaza 9, ki je poglavitna prožilna kaspaza intrinzične ali mitohondrijske poti apoptoze. Obe poti apoptoze konvergirata v aktivaciji izvršilne kaspaze 3/7, kar vodi v celično smrt. Astrocite novorojenih podgan smo od 2 do 24 ur inkubirali v prisotnosti 5 μM THC, 1 μM CBD ali 1 μM SGT-24 ter nato izmerili aktivnost vseh treh kaspaz.

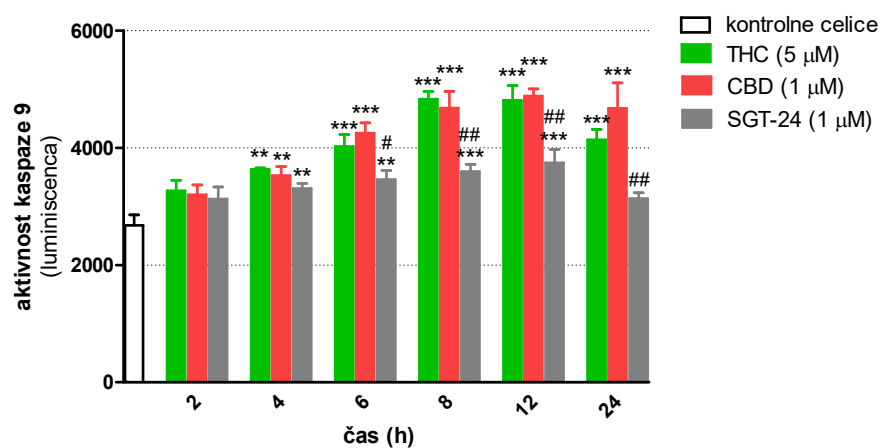
Kaspazo 8 (slika 12a) najhitreje aktivira 1 μM SGT-24, ki že po 2 urah inkubacije povzroči statistično značilno 1,4-kratno povišanje njene aktivnosti, oba fitokanabinoida pa dosežeta statistično značilen učinek po 6-urni izpostavljenosti. Največji učinek 5 μM THC smo izmerili po 12-urni izpostavljenosti, ko aktivnost kaspaze 8 doseže 173,5 % kontrolne vrednosti. 1 μM CBD prav tako povzroči največje povišanje po 12 urah, ko aktivnost kaspaze 8 preseže 183,2 % vrednosti kontrole. Največji učinek 1 μM SGT-24 smo opazili po 8-urni inkubaciji, ko aktivnost kaspaze 8 naraste na 170,1 % kontrolne vrednosti. S podaljšanjem časa izpostavljenosti kanabinoidom se nivo aktivacije kaspaze 8 ne spreminja več. Aktivnost kaspaze 9 (slika 12b) prav tako narašča s časom izpostavljenosti celic kanabinoidom. Najučinkoviteje jo aktivira 8-urna izpostavljenost 5 μM THC, ki povzroči 180,6-odstotno povišanje in 12-urna izpostavljenosti 1 μM CBD, ki povzroči 183,2-odstotno povišanje aktivnosti glede na kontrolne celice. Učinek 1 μM SGT-24 na aktivnost kaspaze 9 je manj izrazit, vrh doseže po 12-urni inkubaciji, ko smo določili 140,0-odstoten dvig v primerjavi z netretiranimi celicami v kontroli.

Največji učinek vseh preiskovanih kanabinoidov smo zaznali pri aktivaciji izvršilne kaspaze 3/7 (slika 12c). 5 μM THC je povzročil 2,1-kratno povečanje aktivnosti po 8 urah inkubacije, 1 μM CBD pa 2-kratno povečanje aktivnosti po 12-urni inkubaciji. Sintezni SGT-24 tako kot CBD povzroči največji dvig aktivnosti kaspaze 3/7 po 12 urah, ko smo izmerili 1,9-kratno aktivnost glede na kontrolne vrednosti. Aktivacija izvršilne kaspaze je obsežna tudi po 24-urni izpostavljenosti vsem trem kanabinoidom.

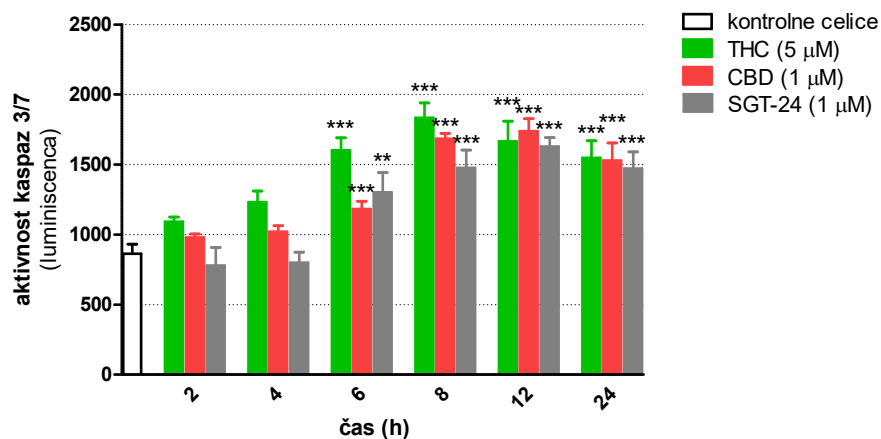
Opazili smo, da aktivnost vseh treh kaspaz po 24 urah nekoliko pade. Predvidevamo, da je to morda posledica prilagoditvenih/varovalnih mehanizmov, ki astroцитom po odzivu na dražljaje, ki jih prejemajo od kanabinoidov, omogočajo ohranjanje svoje funkcije.



(a)



(b)

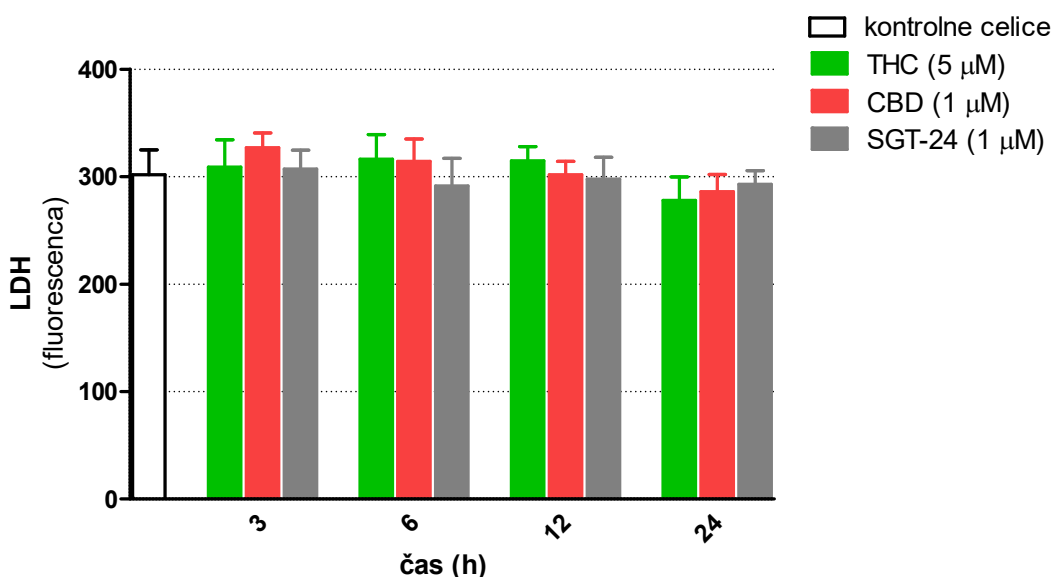


(c)

Slika 12. Vpliv kanabinoidov na kaspazno aktivnost v astrocitih novorojenih podgan. Celice smo 2 do 24 ur inkubirali s 5 μM THC, 1 μM CBD ali 1 μM SGT-24. Aktivnost kaspaze 8 (a), kaspaze 9 (b) in kaspaze 3/7 (c) smo določili s pomočjo testov Caspase-Glo® 8, 9 in 3/7 Assay. Stolpci predstavljajo srednjo vrednost ± SEM treh do petih neodvisnih poskusov. Statistično značilnost smo preverili z enosmerno analizo variance (one-way ANOVA) z Bonferronijevim post hoc testom in je označena kot *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ v primerjavi s kontrolnimi celicami ali kot ## $p < 0,01$ in # $p < 0,05$ v primerjavi s celicami, izpostavljenimi THC in CBD.

4.2.2. Merjenje aktivnosti laktat-dehidrogenaze

Celice z okvarjeno celično membrano v okolico sproščajo encim laktat-dehidrogenazo (LDH), ki je indikator proženja nekroze. Astrocite novorojenih podgan smo inkubirali v prisotnosti 5 μM THC, 1 μM CBD in 1 μM SGT-24 od 3 do 24 ur ter nato izmerili aktivnost LDH v celičnem mediju (slika 13). Ugotovili smo, da se aktivnost LDH po izpostavitvi vsem proučevanim kanabinoidom ne razlikuje značilno od vrednosti LDH v celičnem mediju kontrolnih celic, kar dokazuje, da kanabinoidi v časovnem okviru do 24 ur ne prožijo nekroznih procesov v astrocitih možganske skorje podgane.



Slika 13. Vpliv kanabinoidov na aktivnost LDH v mediju astrocitov novorojenih podgan. Celice smo 2 do 24 ur inkubirali s 5 μM THC, 1 μM CBD ali 1 μM SGT-24. Aktivnost LDH smo izmerili fluorimetrično s CytoTox-ONE Homogenous Membrane Integrity testom. Stolpci predstavljajo srednjo vrednost \pm SEM treh do petih neodvisnih poskusov. Statistično značilnost smo preverili z enosmerno analizo variance (one-way ANOVA) z Bonferronijevim post hoc testom.

Omenjeni rezultati so pokazali škodljive posledice delovanja izbranih kanabinoidov na astrocite, saj smo opazili pojav apoptoze, ki lahko močno okrne delovanje astroglialnih celic v možganih. Pojava nekroze nismo zaznali.

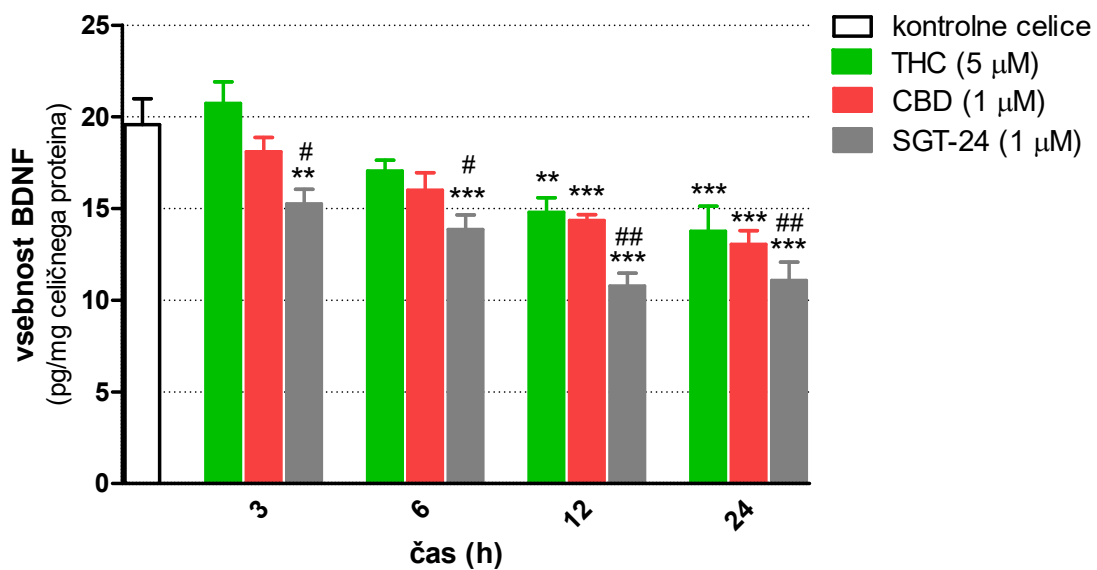
4.3. Vpliv kanabinoidov na nevrotrofično aktivnost astrocitov

Astroцити so pomemben vir nevrotrofičnih dejavnikov v osrednjem živčevju. Znano je, da sinteza in sproščanje nevrotrofinov iz astrocitov spodbujata preživetje in rast živčnih celic ter ohranjata njihov fenotip, zato lahko okrnjeno delovanje astrocitov pospeši nevrodegenerativne procese v možganih. Celične kulture astrocitov novorojenih podgan smo inkubirali v prisotnosti 5 μM THC, 1 μM CBD ali 1 μM SGT-24 od 3 do 24 ur, nato pa smo določili njihov vpliv na vsebnost in sproščanje nevrotrofinov BDNF, NGF in NT-3.

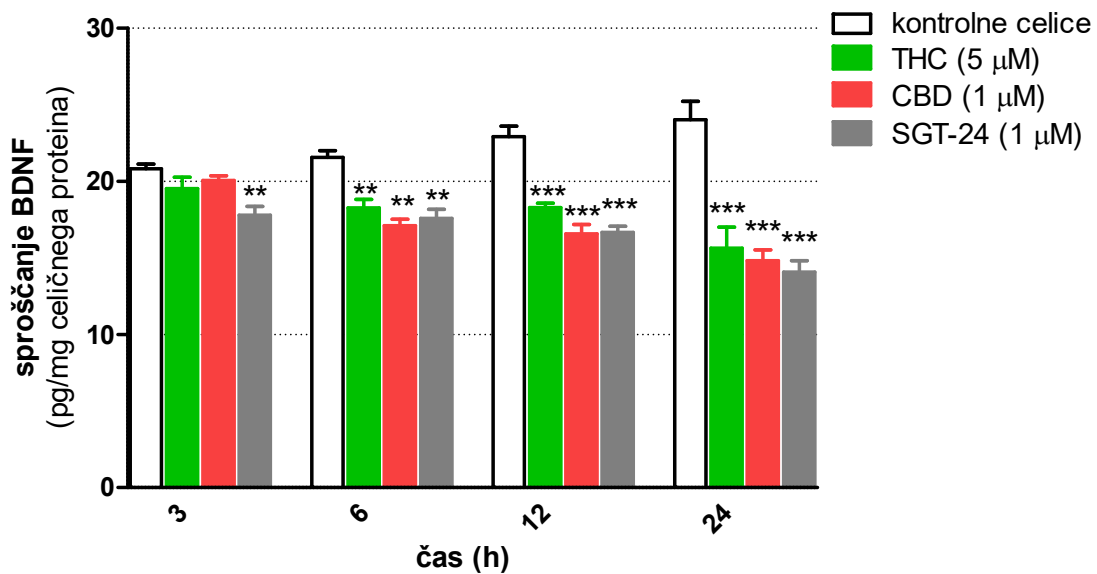
4.3.1. Vsebnost in sproščanje BDNF

Največji vpliv na sintezo in posledično na vsebnost BDNF smo opazili pri sinteznem kanabinoidu SGT-24, ki je povzročil značilen 22,1-odstoten padec bazalnega nivoja ($19,6 \pm 1,4$ pg BDNF/mg celičnega proteina) že po 3-urni inkubaciji (slika 14a), po 12 urah pa se je znotrajcelična koncentracija BDNF zmanjšala za 44,9 % glede na kontrolno vrednost. Pri inkubaciji celic v prisotnosti 1 μM THC smo opazili postopno zniževanje sinteze BDNF do 24 ur, ko je bila vsebnost nevrotrofina za 29,8 % manjša od vrednosti v kontrolnih celicah. Tudi prisotnost 1 μM CBD je zavrla sintezo BDNF, kar je najbolj opazno po 24 urah, ko so tretirane celice vsebovale 33,5 % manj BDNF kot kontrolne celice.

Sproščanje BDNF je pri netretiranih celicah naraščalo z naraščajočim časom merjenja (slika 14b). Pri tretiranih celicah pa smo opazili zaviralni vpliv vseh treh kanabinoidov na sposobnost sproščanja proteina BDNF iz astrocitov. 1 μM SGT-24 je značilno zavrl sproščanje BDNF že po 3-urni izpostavljenosti, ko je bila količina sproščenega proteina za 12,2 % manjša od kontrolne vrednosti. Pri vseh treh kanabinoidih količina sproščenega BDNF pada s časom inkubacije. Največji padec sproščanja smo izmerili po 24 urah, ko se je izločanje BDNF pod vplivom 5 μM THC znižalo za 34,9 %, pod vplivom 1 μM CBD za 38,4 % in pod vplivom 1 μM SGT-24 za 41,4 % glede na vrednosti, izmerjene pri kontrolnih celicah.



(a)



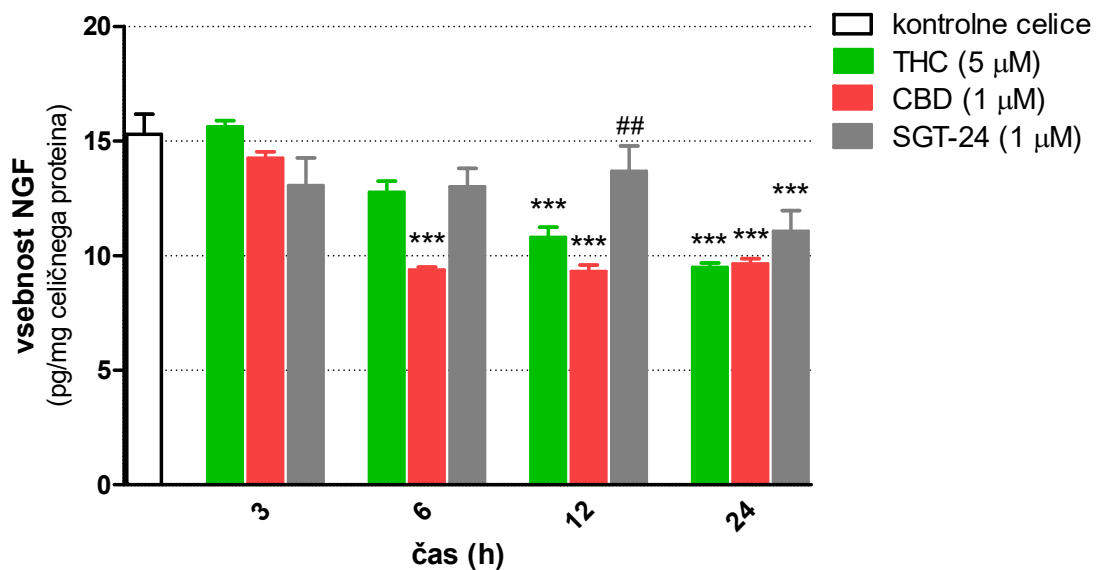
(b)

Slika 14. Vpliv kanabinoidov na celično vsebnost (a) in sproščanje (b) BDNF v astrocih novorojenih podgan. Celice smo 3 do 24 ur inkubirali s 5 μM THC, 1 μM CBD ali 1 μM SGT-24. Vsebnost in sproščanje proteina smo določili z BDNF ELISO. Stolpci predstavljajo srednjo vrednost ± SEM treh do petih neodvisnih poskusov. Statistično značilnost smo preverili z enosmerno analizo variance (one-way ANOVA) z Bonferronijevim post hoc testom in je označena kot *** $p < 0,001$ in ** $p < 0,01$ v primerjavi s kontrolnimi celicami ali kot ## $p < 0,01$ in # $p < 0,05$ v primerjavi s celicami, izpostavljenimi THC in CBD.

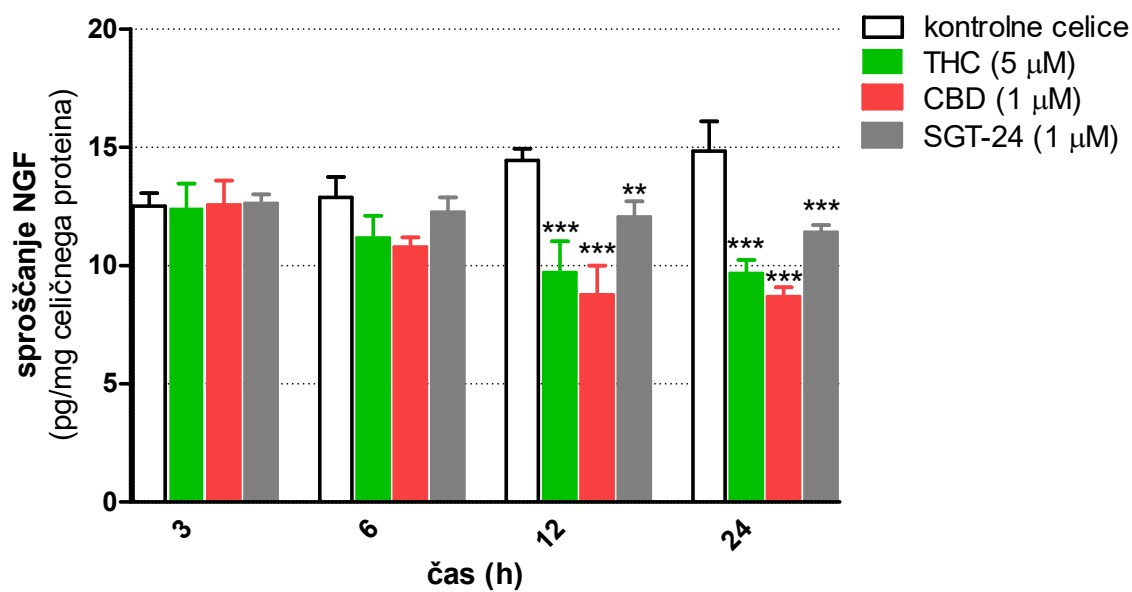
4.3.2. Vsebnost in sproščanje NGF

Pri izpostavljenosti astrocitov 5 μ M THC se vsebnost nevrotrofina NGF postopoma zmanjšuje s časom izpostavljenosti celic (slika 15a). Najmanjšo vrednost doseže po 24 urah, ko je sinteza nevrotrofina za 38,0 % nižja kot v celicah, ki niso bile izpostavljene kanabinoidom. Zelo podobno, 38,6-odstotno zmanjšanje vsebnosti proteina NGF glede na kontrolo opazimo pri 1 μ M CBD, vendar se to pojavi že po 6 urah, nato pa vrednosti ne padajo več tako izrazito kot pri THC. Vsebnost NGF je pri 1 μ M SGT-24 najmanjša po 24-urni inkubaciji astrocitov novorojenih podgan, ko se vrednost značilno zmanjša za 27,7 % glede na kontrolne celice, ki vsebujejo $15,3 \pm 0,9$ pg/mg celičnega proteina.

Proučevani kanabinoidi postopoma zavirajo tudi sproščanje NGF (slika 15b). Pri vseh treh kanabinoidih smo največji zaviralni učinek opazili po 24-urni inkubaciji, ko se je sproščanje NGF pod vplivom 5 μ M THC znižalo za 34,8 %, pod vplivom 1 μ M CBD za 41,3 %, pod vplivom 1 μ M SGT-24 pa za 21,3 % glede na vrednosti, izmerjene pri kontrolnih celicah.



(a)



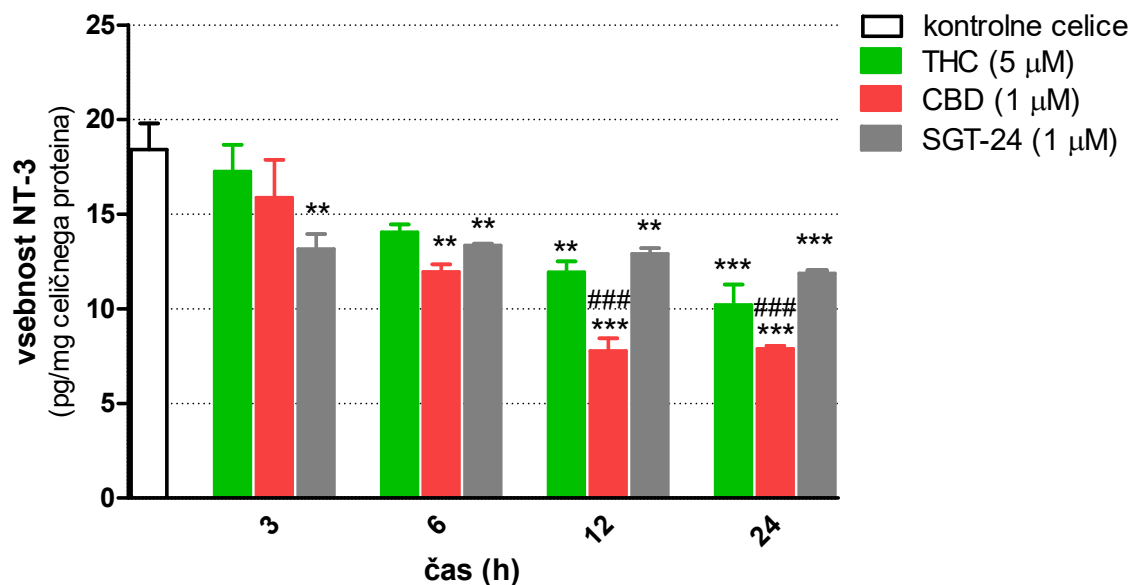
(b)

Slika 15. Vpliv kanabinoidov na celično vsebnost (a) in sproščanje (b) NGF v astrocitih novorojenih podgan. Celice smo 3 do 24 ur inkubirali s 5 μM THC, 1 μM CBD ali 1 μM SGT-24. Vsebnost in sproščanje proteina smo določili z NGF ELISO. Stolpci predstavljajo srednjo vrednost ± SEM treh do petih neodvisnih poskusov. Statistično značilnost smo preverili z enosmerno analizo variance (one-way ANOVA) z Bonferronijevim post hoc testom in je označena kot *** $p < 0,001$ in ** $p < 0,01$ v primerjavi s kontrolnimi celicami ali kot ## $p < 0,001$ v primerjavi s celicami, izpostavljenimi THC in CBD.

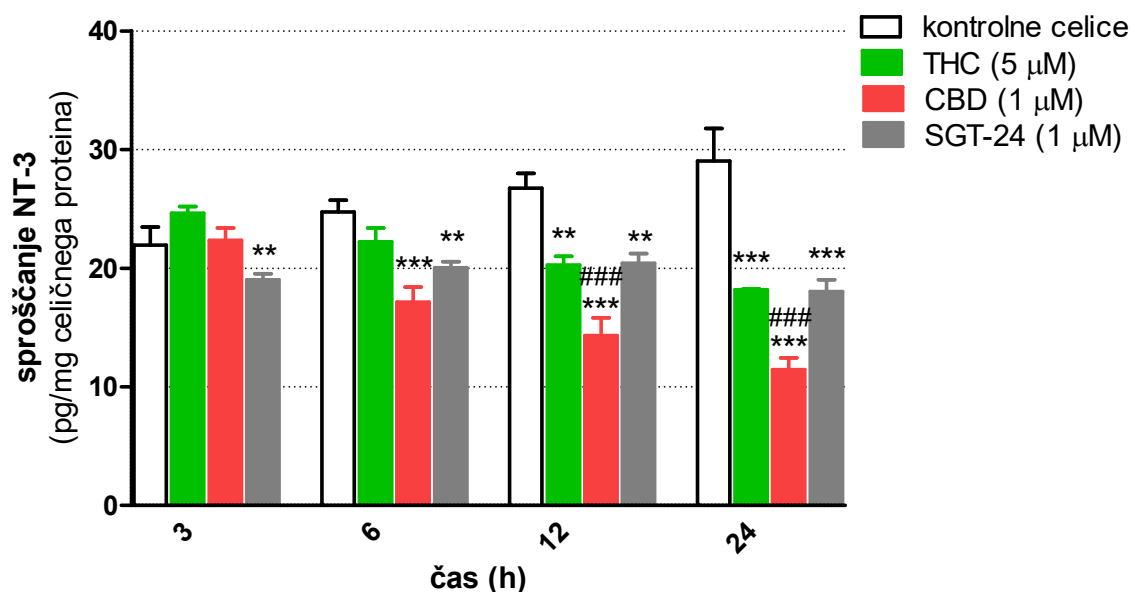
4.3.3. Vsebnost in sproščanje NT-3

Največji vpliv kanabinoidnih substanc na nevrotrofično aktivnost astrocitov je opazen pri NT-3. Vsebnost v prisotnosti 5 μ M THC enakomerno pada s časovnim podaljsevanjem izpostavljenosti (slika 16a). Največjo razliko v primerjavi s kontrolnimi celicami opazimo po 24 urah, ko je znotrajcelična koncentracija NT-3 za 43,6 % manjša od bazalne vrednosti, ki znaša $18,1 \pm 1,4$ pg/mg celičnega proteina. Količina proteina NT-3, ki ga vsebujejo celice, izpostavljene 1 μ M CBD, prav tako pada s časom in je najmanjša po 12 urah, ko celice vsebujejo 57,1 % manj nevrotrofina kot astrociti, ki niso bili izpostavljeni kanabinoidom. Pri 1 μ M SGT-24 opazimo statistično pomemben padec vsebnosti NT-3 že po 3 urah, a se ta nato ne niža tako opazno kot pri obeh fitokanabinoidih. Najmanjšo vrednost, ki je za 35,5 % manjša od vrednosti kontrole, doseže po 24-urni izpostavljenosti.

Poleg vpliva na sintezo smo pri NT-3 zaznali tudi največji zaviralni vpliv kanabinoidov na njegovo sproščanje. Največji učinek 5 μ M THC smo opazili po 24-urni inkubaciji (slika 16b), ko je sproščanje NT-3 za 37,4 % nižje kot pri kontrolnih celicah. Podoben učinek ima po 24 urah 1 μ M SGT-24 (37,9-odstotno znižanje glede na kontrolo), a smo značilno, 18,4-odstotno zmanjšanje sproščanja opazili že po 3 urah. Tudi 1 μ M CBD zavira sproščanje NT-3, pri čemer smo zaznali tudi največji učinek v primerjavi s kontrolnimi celicami, saj je vrednost sproščanja kar za 60,7 % manjša od bazalnega sproščanja NT-3 iz netretiranih astrocitov.



(a)



(b)

Slika 16. Vpliv kanabinoidov na celično vsebnost (a) in sproščanje (b) NT-3 v astrociilih novorojenih podgan. Celice smo 3 do 24 ur inkubirali s 5 μM THC, 1 μM CBD ali 1 μM SGT-24. Vsebnost in sproščanje proteina smo določili z NT-3 ELISO. Stolpci predstavljajo srednjo vrednost ± SEM treh do petih neodvisnih poskusov. Statistično značilnost smo preverili z enosmerno analizo variance (one-way ANOVA) z Bonferronijevim post hoc testom in je označena kot *** $p < 0,001$ in ** $p < 0,01$ v primerjavi s kontrolnimi celicami ali kot ### $p < 0,001$ v primerjavi s celicami, izpostavljenimi THC in SGT-24.

Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da izpostavljenost astrocitov novorojenih podgan THC, CBD ali SGT-24 poleg postopnega zmanjševanja celičnega metabolizma in proženja apoptoze povzroča postopno zavoro sposobnosti sinteze in sproščanja vseh treh proučevanih nevrotrofinov. Največji učinek škodljivega delovanja kanabinoidov je odvisen od časa izpostavljenosti in se med nevrotrofini razlikuje.

5. Razprava

Astrociti imajo dinamično vlogo v vseh življenjskih obdobjih, posebej pa so, predvsem pri uravnavanju sinaptične aktivnosti, pomembni v obdobju razvoja živčevja. Njihova okrnjena funkcija lahko pospeši nevrodegenerativne procese v osrednjem živčevju. Konoplja je po podatkih *Evropskega centra za spremljanje drog in zasvojenosti z drogami* (64) najbolj zlorabljana med prepovedanimi drogami. Vsaj enkrat v življenju jo je poskusilo 78,9 milijona Evropejcev, kar predstavlja 23,3 % prebivalcev Evropske unije. Približno 1 % odraslih uporabnikov kanabinoide uporablja dnevno, od tega je tri četrtine uporabnikov v starostni skupini od 15 do 34 let (64). Vse večji problem postaja tudi zloraba sinteznih kanabinoidov, ki predstavljajo resno grožnjo za zdravje uporabnikov. V pričujoči magistrski nalogi smo ugotovili, da fitokanabinoide THC in CBD ter sintezni SGT-24 zaviralno vplivajo na celični metabolizem (sliki 10 in 11), prožijo citotoksične procese (sliki 12 in 13) in zavirajo nevrotrofično aktivnost neživčnih celic v možganih (slike 14 do 16). Naše delo je predstavljalo precejšen izziv, saj v podatkovnih bazah nismo našli nobene raziskave, ki bi proučevala vplive teh substanc na astrocite.

5.1. Vpliv kanabinoidov na celični metabolizem astrocitov

Adenozin-5'-trifosfat (ATP) je glavni vir energije v celicah, hkrati pa je tudi pomemben glijalni prenašalec. Ključna je njegova vloga v metabolizmu, sintezi makromolekul (vključno z DNA in RNA), vzdrževanju celične strukture in gibanja ter pri celičnem sporazumevanju (3). Padec vsebnosti ATP v celicah torej pomeni okrnjeno delovanje celic in omejeno opravljanje celičnih funkcij. V magistrski nalogi smo ugotovili časovno odvisen vpliv kanabinoidov na znotrajcelično vsebnost ATP, ki je bil pri sinteznem kanabinoidu nekoliko drugačen kot pri obeh fitokanabinoidih (slika 10). Pri sinteznem SGT-24 v koncentraciji 1 μM smo opazili hiter padec znotrajceličnega ATP, saj je bila vrednost po 2 urah za približno 22 % manjša od bazalnega nivoja v astrocitih, medtem ko je bila vsebnost pri 5 μM THC ter 1 μM CBD statistično značilno manjša po 6 urah (28 %

in 32 %). Po 24-urni inkubaciji je količina ATP pri fitokanabinoidih dosegla najmanjšo vrednost (46 % pri THC in 54 % pri CBD), pri SGT-24 pa smo opazili manj izrazit padec količine ATP kljub hitrejšemu začetku delovanja. Omenjena ugotovitev nakazuje možnost drugačnega mehanizma delovanja sinteznih kanabinoidov, česar pa v sklopu magistrske naloge nismo preverili.

Sinteza molekul ATP večinoma poteka v mitohondrijih pri procesu celičnega dihanja. Vzrok za manjše vrednosti ATP z daljšanjem časovne izpostavljenosti bi lahko pripisali učinku kanabinoidnih snovi na sintezo ATP v mitohondrijih. Wolff s sodelavci je v študiji (16) prišel do podobnih rezultatov, saj je ugotovil, da THC v odvisnosti od koncentracije deluje toksično na možganske mitohondrije. Prisoten je zaviralni učinek kanabinoidov na komplekse I, II in III v mitohondrijski dihalni verigi. Hkrati so raziskovalci zaznali še povečano nastajanje ROS v možganih, ki lahko povzroči nastanek oksidativnega stresa in posledično poškodbe bioloških makromolekul, kar še pripomore k povečanju toksičnega učinka na celice. Kanabinoidi povzročijo okrnjeno delovanje mitohondrijev, kar vodi v padec sinteze ATP in posledično manjšo znotrajcelično vsebnost.

Drugi dejavnik, ki smo ga raziskovali, da bi ugotovili vpliv kanabinoidov na celični metabolizem, je sposobnost preživetja celic – viabilnost. Eden od načinov določanja deleža presnovno aktivnih, živih celic v kulturi je merjenje njihove sposobnosti redukcije indikatorskega barvila resazurina, ki prehaja v celico, v fluorescirajoči produkt resorufin. Pri obeh fitokanabinoidih smo opazili primerljiv učinek na viabilnost astrocitov (slika 11), ki se zmanjšuje s časovno izpostavljenostjo celic in doseže najmanjšo vrednost po 24 urah. Pod vplivom 5 μM THC ali 1 μM CBD celice izkazujejo za približno 39 % nižjo presnovno aktivnost kot pri kontrolnih celicah. Nekoliko drugačen vpliv ima na celice SGT-24, kjer že po 2 urah opazimo statistično značilen padec sposobnosti preživetja, nato pa se ta ne znižuje tako izrazito kot pri obeh fitokanabinoidih ter po 24 urah doseže 30,6-odstotno znižanje. Podobno študijo viabilnosti sinteznega kanabinoida CP-55,940 sta opravila Tomiyama in Funada (57) na primarnih živčnih celicah miši, ki sta jih izpostavila omenjenemu kanabinoidu v koncentracijah od 1 do 30 μM in zaznala 30-odstotni padec sposobnosti preživetja pri 30 μM koncentraciji v primerjavi s kontrolo že po 2 urni izpostavljenosti, medtem ko pri 1 in 10 μM CP-55,940 statistično značilnega znižanja viabilnosti ni opaziti.

Omenjeni rezultati so nam pokazali, da sta postopen padec znotrajcelične koncentracije energetskega ATP in zavora presnovne aktivnosti posledica škodljivega delovanja izbranih kanabinoidov na celično funkcijo astrocitov. Njihov vpliv je odvisen od časa izpostavljenosti in se med posameznimi kanabinoidi razlikuje.

5.2. Citotoksični vpliv kanabinoidov na astrocite

Izpostavljenost astrocitov preiskovanim kanabinoidom ne zmanjšuje le metabolne aktivnosti in energetske podpore, pač pa vodi tudi do proženja apoptoznih procesov v celicah. Apoptoza je programirana celična smrt in predstavlja fiziološki proces, ki je pomemben za uravnavanje homeostaze, sprožijo pa jo tudi različni patološki dejavniki. Glavno vlogo pri poteku in izvršitvi apoptoze imajo kaspaze, ki so cisteinske proteaze (3). Pri kanabinoidih, ki smo jih preiskovali, smo zaznali časovno odvisen vpliv na aktivacijo kaspaz 8,9 in 3/7 (slika 12).

Kaspaza 8 je prožilna kaspaza, ki se aktivira pri ekstrinzični poti apoptoze. Najhitrejši učinek na njeno aktivacijo smo opazili pri SGT-24, in sicer že po 2 urah, ko je bilo povišanje aktivnosti 1,4-kratno. Največje vrednosti smo opazili po 8 urah, ko je aktivnost kaspaze 1,7-krat višja kot pri kontroli. THC in CBD po 12 urah povzročita najvišjo aktivnost kaspaze 8, ki je 1,7- oziroma 1,8-krat višja od bazalne. Ko aktivnost kaspaze 8 doseže najvišjo vrednost, se ne povečuje več s časom izpostavljenosti kanabinoidu. Pri merjenju aktivnosti kaspaze 9, ki je udeležena v mitohondrijski poti apoptoze in je prav tako ena od prožilnih kaspaz, smo opazili podoben učinek. Ko so vrednosti dosegle vrh, s časom podaljšanja izpostavljenosti niso več naraščale. Močnejši učinek smo opazili pri obeh fitokanabinoidih. Po 8 urah inkubacije v prisotnosti 5 μ M THC in 12 urah v prisotnosti 1 μ M CBD je bilo zvečanje vrednosti 1,8-kratno. Največji učinek na aktivnost smo ugotovili pri izvršilni kaspazi 3/7. Največji vpliv je pri 5 μ M THC opazen po 8-urni, pri 1 μ M CBD in SGT-24 pa po 12-urni izpostavljenosti, ko vrednosti dosežejo 2-kratno povečanje glede na kontrolne celice.

Naše ugotovitve se skladajo z rezultati študije na neonatalnih živčnih celicah, ki je pokazala, da THC povzroči morfološke nevrodegenerativne spremembe (65), ki so

posledica pojava apoptoznih teles in posledičnega sproženja apoptoze. Pri tem naj bi bili udeleženi receptorji CB₁ in s proteinom G posredovani znotrajcelični mehanizmi, saj je prisotnost AM251, ki je antagonist receptorja CB₁ in pertuzijskega toksina (PTX, angl. pertussis toxin), zavrla sposobnost sproženja apoptoze. Študija prikazuje protein G kot posrednika apoptoze, povzročene s THC, s potencialnimi efektorji – proteini iz družine Bcl, saj je THC povzročil sproščanje citokroma c iz mitohondrijev v odvisnosti od prisotnosti PTX. Sproščanje citokroma c iz mitohondrijev uravnavajo proteini iz družine proteinov Bcl in Bax, ki zavirajo oziroma prožijo apoptozne procese. Ker THC zavira izražanje proteina Bcl-2 z zaščitnim delovanjem, lahko sklepamo, da prihaja do spodbujanja sproščanja citokroma c. Njegova akumulacija v citosolu celice je pomembna za aktivacijo kaspaze 3, ki je poglavitna izvršilna kaspaza pri procesu apoptoze. Na PTX občutljivi proteini G se povezujejo z monomernim proteinom Ras, ki veže GTP in ima sposobnost uravnavanja izražanja proteinov iz družine Bcl-2. Interakcija med Ras in Bcl-2 je torej osnova za sproščanje citokroma c in posledične aktivacije kaspaze 3, to pa stimulira na PTX občutljiv protein G zaradi izpostavljenosti celic THC. Receptor CB₁ je povezan tudi z indukcijo c-jun N-terminalne kinaze in aktivacijo z mitogenom aktivirane protein-kinaze p38 v odvisnosti od prisotnosti PTX. Ker so te kinaze povezane z apoptozo v živčnih celicah preko povišanja izražanja proteina Bax in spodbujanja aktivacije kaspaz, je tudi to možen mehanizem apoptoze, povzročene s THC v živčnih celicah. Študijo so izvedli na neonatalnih živčnih celicah, zato sklepamo, da sposobnost THC, da inducira apoptozo, lahko vodi v napake v razvoju osrednjega živčevja pri otrocih, ki so bili v maternici izpostavljeni kanabinoidu. Do podobnih ugotovitev so prišli Downer in sodelavci (58), ko so po 2-urni inkubaciji celic možganske skorje s THC v mikromolarnih koncentracijah opazili aktivacijo kaspaze 3 pri neonatalnih celicah, pri celicah odrasle podgane pa podobnega učinka ni bilo. Glede na 2-urno inkubacijo ni možno izključiti pojava zakasnele apoptoze. Ob rezultatih omenjenih raziskav, ki so jih opravili na neonatalnih celicah, se poraja vprašanje teratogenega potenciala kanabinoidov.

Opazili smo, da sintezni kanabinoid SGT-24 pri aktivaciji kaspaze 8 deluje hitreje od obeh fitokanabinoidov. Podobno so potrdili tudi Funada in sodelavci, ki so po izpostavljanju živčnih celic sinteznemu CP55,940 opazili pojav apoptoze po 2-urni inkubaciji (57). Pokazali so tudi, da omenjeni kanabinoid deluje preko receptorja CB₁ in ne preko CB₂. Zaenkrat ni znano, zakaj se učinek pri sinteznih kanabinoidih pojavi hitreje kot pri THC ali

CBD. Razjasnitev razlik v mehanizmih njihovega delovanja tako ostaja odprta za nadaljnje raziskave.

V magistrski nalogi smo, da bi ugotovili morebitno citotoksičnost kanabinoidov, preverili tudi, ali inkubacija celic s kanabinoidi lahko proži nekrozne procese. Nekroza je nekontroliran propad celice, ki sproži vnetni odziv. Ob proženju nekroze tako pride do spremembe membranske integritete in sprostitve LDH. Rezultati niso potrdili spremembe zunajcelične koncentracije LDH po izpostavljenosti astrocitov kanabinoidom, zato sklepamo, da celice v danem časovnem okviru (do 24 ur) niso podvržene nekroznim procesom (slika 13).

5.3. Vpliv kanabinoidov na nevrotrofično aktivnost astrocitov

Astroцитi predstavljajo pomemben lokalni vir nevrotrofičnih dejavnikov, kjer se njihova sinteza in sproščanje nenehno odzivata na dražljaje iz okolja. Znano je, da so živčni prenašalci, hormoni, vnetni dejavniki in druge endogene ter številne eksogene snovi pomembni regulatorji sinteze. V naši raziskavi smo prvič ugotovili, da tudi kanabinoidi močno vplivajo na sposobnost nujenja nevrotrofične podpore astrocitov. Vpliv kanabinoidov na vsebnost in izločanje nevrotrofinov je časovno odvisen in se razlikuje med preiskovanimi nevrotrofini (slike 14 do 16).

Najhitrejši vpliv na sintezo BDNF smo opazili pri SGT-24, ki že po 3 urah značilno zmanjša vsebnost nevrotrofina za približno 22 % glede na kontrolne celice, nato pa doseže za 45 % manjše vrednosti ob 12-urni izpostavljenosti. Tudi fitokanabinoida vplivata na sintezo BDNF v odvisnosti od časa izpostavljenosti in po 24 urah dosežeta najmanjše vrednosti, ki so pri THC za 29,8 %, pri CBD pa za 33,5 % manjše od bazalnih nivojev. Preiskovane substance značilno zavirajo tudi sproščanje astrocitnega BDNF, ki doseže najmanjšo vrednost po 24-urni izpostavljenosti. THC tako zniža nivo sproščenega BDNF za 35 %, CBD za 38 % in SGT-24 za 41 % glede na sproščanje iz kontrolnih celic. Pri SGT-24 smo opazili hitro delovanje na vsebnost nevrotrofina, ne pa tudi na izločanje, kar je verjetno posledica zakasnelega učinka.

Preko vpliva na sintezo in sproščanje BDNF, ki je odgovoren za razvoj sinaptične plastičnosti, preživetje in diferenciacijo različnih populacij živčnih celic, lahko kanabinoidi posredno vplivajo na razvoj živčevja in prispevajo k etiologiji nekaterih nevropsihiatričnih bolezni, kot je shizofrenija, pri kateri so nevrotrofični dejavniki vpleteni v patofiziologijo bolezni (66). Pomanjkanje BDNF pripomore tudi k razvoju motenj razpoloženja, še posebej depresije (67).

Kanabinoidi zavirajo tudi sintezo in sproščanje NGF. Oba fitokanabinoida sta povzročila približno 38-odstotno znižanje sinteze glede na kontrolo, pri čemer je CBD značilno zmanjšal znotrajcelično vsebnost NGF že po 6 urah, THC pa po 24-urni inkubaciji. Vpliv SGT-24 na sintezo NGF je med proučevanimi nevrotrofini najmanjši, saj je opazen šele po 24-urni izpostavljenosti, ko povzroči 28-odstotni padec glede na bazalno vrednost. Podobno kot pri BDNF smo tudi pri NGF opazili postopno zavoro sproščanja, ki je bila največja po 24-urni inkubaciji. THC je povzročil 35-odstotni padec, CBD 41-odstotni padec in SGT-24 21-odstotni padec koncentracije zunajceličnega NGF glede na netretirane celice. Omenjeni učinki kanabinoidov na NGF so lahko razlog za kognitivni upad, ki spremlja uživalce konoplje. NGF je znan nevrotrofični podpornik holinergičnih živčnih celic sprednjega predela možganske baze, ki so ključne za uravnavanje procesov učenja, spomina in pozornosti. Okrnjeno delovanje holinergičnega sistema pod vplivom kanabinoidov tako lahko vodi v poškodbo spominskih procesov – delovnega spomina in učenja. Mladi kronični uporabniki konoplje lahko na dolgi rok tvegajo tudi trajne poškodbe holinergičnih živčnih celic in progresivno poslabšanje kognitivnih funkcij, ki vodi v različne neurodegenerativne bolezni.

Največji vpliv kanabinoidov na sintezo in sproščanje nevrotrofinov smo opazili pri NT-3. 24-urna izpostavljenost celic THC povzroči 44-odstotno znižanje sinteze NT-3, CBD pa že po 12-urnem tretiranju zmanjša znotrajcelično vsebnost za 57 %. Po 24-urni izpostavljenosti SGT-24 je znotrajcelična koncentracija NT-3 v astrocitih za 36 % manjša kot pri kontroli. Pri sproščanju nevrotrofina iz celic smo opazili podoben vpliv THC in SGT-24, ki sta znižala sproščanje za 37 % glede na vrednost v kontrolnih celicah. Največji učinek smo zaznali pri CBD, ki je povzročil kar 61-odstotni padec sproščanja NT-3 v astrocitih možganske skorje podgane. V osrednjem živčevju ima NT-3 pomemben vpliv na preživetje številnih populacij živčnih celic, proliferacijo in diferenciacijo nevronske

prekurzorskih celic v živčne celice ter na uravnavanje procesov učenja in spomina. Ob pomanjkanju nevrotrifina so odkrili zmanjšano število živčnih celic v perifernih senzoričnih in simpatičnih ganglijih in tudi zmanjšano kratkoročno plastičnost sinaps. Pri številnih patoloških stanjih (depresija, shizofrenija, Parkinsonova bolezen, Downov sindrom, multipla skleroza) so opazili spremenjene nivoje NT-3 (49).

Zavora sinteze in sproščanja nevrotrifinov je pričakovana posledica delovanja kanabinoidov, saj je zaradi vpliva na celični metabolizem in proženja citotoksičnih procesov celična funkcija astrocitov močno okrnjena. Preko zaenkrat neznanih receptorskih poti (najverjetneje preko aktivacije receptorjev CB₁, ki so prisotni na astrocitih) kanabinoidi lahko vplivajo na intrinzične mehanizme uravnavanja sinteze nevrotrifinov. Gensko izražanje BDNF, NGF in NT-3 je zapleten proces, kjer nastopa več promotorskih regij in različnih transkripcijskih dejavnikov za posamezen nevrotrifin (42, 50). Kanabinoidi lahko na sintezo posameznega nevrotrifina vplivajo preko zaviranja specifičnih transkripcijskih dejavnikov, prav tako pa lahko vplivajo na procese, ki uravnavajo sproščanje teh snovi. Izločanje nevrotrifinov poteka po dveh poteh, in sicer po konstitutivni, kjer izločanje poteka brez sprožilca, ter po regulirani, kjer izločanje poteče preko vpliva zunanjega dražljaja (nevronska aktivnost, nevrotrifini preko pozitivnih povratnih zank, farmakološko aktivne snovi ipd.), ki povzroči zvišanje nivoja znotrajceličnega kalcija, kar sproži sproščanje posameznega nevrotrifina (42, 50). Vloga kanabinoidov pri teh procesih zaenkrat še ni razjasnjena.

Zaradi vloge v razvoju živčevja je pomanjkanje nevrotrifične podpore največji problem v obdobju odraščanja, ko se možgani razvijajo v največji meri. V obdobju pubertete potekajo intenzivna mielinizacija in razvoj sinaps ter razvoj sistemov živčnih prenašalcev, med njimi tudi kanabinoidnega (68). Aktivnost endogenega kanabinoidnega sistema, vključujoč receptorje in endogene ligande, je največja prav v obdobju začetka pubertete, kar nakazuje na dejstvo, da je to obdobje visoke ranljivosti in da so posledice vnosa endogenih kanabinoidnih substanc večje kot pri odraslih uporabnikih. Mladi uporabniki kanabinoidnih substanc naj bi bili bolj dovzetni za kognitivne motnje in imajo večjo verjetnost za pojav nevropsihiatričnih bolezni, sploh če so ob kanabinoidni izpostavljenosti prisotne še genetske predispozicije. Bolj ranljivi naj bi bili tudi za težnjo k nadaljnji uporabi drog in pojavu odvisnosti (68). Nedavno so znanstveniki dokazali, da lahko tudi

prenatalna izpostavljenost agonistu kanabinoidnih receptorjev WIN 55,212-2 povzroči dolgotrajno okvaro v sintezi nevrotrofina BDNF (66). Pomanjkanje nevrotrofina lahko povzroči zmanjšano nevronske plastičnosti in povečano ranljivost za psihiatrične bolezni, kar je povezano z zmanjšano podporo nevrotrofičnih molekul v določenih področjih možganov (66). Prenatalna izpostavljenost kanabinoidom je povezana z okvaro glutamatnega prenosa v hipokampusu in cerebralnem korteksu, ki sta pomembna za učenje in spomin in bi lahko bila eden od mehanizmov vpliva na zmanjšano nevronske plastičnosti tudi v odrasli dobi (66).

Uporaba kanabinoidnih substanc v rekreativne in medicinske namene je v zadnjih letih v porastu. Še posebej zaskrbljujoče je dejstvo, da so med največjimi porabniki konoplje mladi, ki so glede na rezultate pričujoče naloge zaradi vpliva kanabinoidov na razvijajoče živčevje najbolj ranljiva skupina. Med laično javnostjo se hkrati pojavljajo vedno večje težnje po prosti uporabi in gojenju konoplje. Glede na rezultate naloge, ki kažejo na toksičnost substanc za astrocite, se poraja vprašanje smiselnosti in varnosti proste dostopnosti konoplje in kanabinoidov. Na spletnih straneh najdemo številne pripravke, ki vsebujejo CBD. Ta ni na seznamu prepovedanih drog, saj ne povzroča psihoaktivnih učinkov, zato je njegova prodaja dovoljena in se ga ljudje pogosto poslužujejo kot dodatek h klasični terapiji. Velikokrat ljudi ob omembi konoplje zavede dejstvo, da gre za naravno drogo. Ne zavedajo se, da tudi te rastline vsebujejo spojine, ki niso vedno nedolžne in da dejstvo, da je snov naravna, ni zagotovilo za varno uporabo. Problem predstavljajo tudi interakcije z zdravili, saj se kanabinoidi presnavljajo preko izoencimov CYP P450, kar lahko privede do interakcij z zdravili, ki se presnavljajo po isti poti. Uživanje kanabinoidov lahko zmanjša plazemske koncentracije nekaterih antipsihotikov (klozapin, olanzapin) (22).

Potrebno je omeniti, da je raziskava v okviru magistrske naloge narejena na zdravih astrocitih novorojenih podgan in da nimamo podatka, kako substance vplivajo na drugačne, spremenjene astrocite. Dokazana toksičnost kanabinoidov pa ne pomeni, da to niso terapevtsko učinkovite snovi. Za dokaz o terapevtski učinkovitosti bi bilo potrebno narediti poskuse še na bolezenskih modelih. Predvsem pa bi bilo smiselno in nujno opraviti več kliničnih raziskav, ki bi dokazale varnost, učinkovitost in kakovost teh snovi, hkrati pa pokazale, da je razmerje med učinkovitostjo substanc in tveganjem za resne neželene

učinke v prid prvega. Do takrat pa ostaja (ne)uporaba kanabinoidov v različne namene problematična, predvsem zaradi odsotnosti jasnih indikacij ter neželenih učinkov in njihovih neznanih mehanizmov.

6. Sklep

Rezultate magistrske naloge lahko povzamemo z naslednjimi ugotovitvami:

1. Kanabinoidi pri akutni izpostavljenosti znižajo celični metabolizem astrocitov.

Vpliv kanabinoidov na znotrajcelično koncentracijo ATP narašča s časom izpostavljenosti preiskovanim kanabinoidom. Največji učinek 5 μM THC in 1 μM CBD je opazen po 24 urah, ko nivo ATP doseže 46-odstotni padeč pri THC oziroma 54-odstotni padeč pri CBD glede na kontrolne celice. Inkubacija z 1 μM SGT-24 povzroči hitrejši učinek na ATP, saj je že po 2 urah vrednost za 22 % manjša kot pri netretiranih celicah. Vpliv na presnovno aktivnost celic je prav tako odvisen od časa njihove inkubacije v prisotnosti kanabinoidov. Največji učinek smo ponovno opazili po 24 urah, ko so astrocitne kulture, tretirane s THC ali CBD, vsebovale 39 % manj, tretirane s SGT-24 pa 31 % manj metabolno aktivnih celic kot kontrolne kulture. Kanabinoidi s postopnim zaviranjem vsebnosti ATP in presnovne aktivnosti vplivajo na celični metabolizem in sposobnost preživetja astrocitov.

2. Kanabinoidi imajo pri akutni izpostavljenosti citotoksičen vpliv na astrocite.

Kanabinoidi v astrocitih prožijo apoptozne procese. Prožilno kaspazo 8, ki se aktivira pri ekstrinzični poti apoptoze, najhitreje, že po 2 urah, aktivira 1 μM SGT-24, po 12 urah pa tudi 5 μM THC in 1 μM CBD. Pri prožilni kaspazi 9, ki spremlja intrinzično pot programirane celične smrti, smo izrazit učinek THC opazili po 8 urah inkubacije, CBD pa enak učinek doseže po 12 urah, ko je tudi učinek SGT-24 največji. Aktivacija prožilnih kaspaz konvergira v aktivaciji izvršilne kaspaze 3/7, pri kateri je največji vpliv 5 μM THC opazen po 8-urni, vpliv 1 μM CBD in 1 μM SGT-24 pa po 12-urni izpostavljenosti, ko vrednosti dosežejo 2-kratno povečanje glede na kontrolne celice.

V danem časovnem okviru v astrocitih nismo zaznali povečanega sproščanja laktat-dehidrogenaze, kar kaže, da kanabinoidi prožijo apoptozne, ne pa tudi nekroznih procesov.

3. Kanabinoidi pri akutni izpostavljenosti zavirajo nevrotrofično aktivnost astrocitov

Kanabinoidi zavirajo sintezo in sproščanje nevrotrofinov v astrocitih. Največji vpliv na vsebnost BDNF smo opazili po 12-urni izpostavljenosti 1 μ M SGT-24, ko celice vsebujejo 45 % manj BDNF kot netretirane celice. 5 μ M THC in 1 μ M CBD največji učinek dosežeta po 24 urah, ko je sinteza BDNF za 30 % oz. 34 % nižja kot pri kontrolnih celicah. Zaviralni vpliv na sproščanje BDNF se pri preiskovanih kanabinoidih povečuje z daljšanjem časa izpostavljenosti. Fitokanabinoida močno zavreta tudi znotrajcelično vsebnost NGF, ki je za 38 % manjša od kontrole po 6-urni inkubaciji s CBD in 24-urni inkubaciji s THC. SGT-24 ima na sintezo NGF manjši vpliv, po 24-urni izpostavljenosti je vrednost za 28 % nižja od bazalnih vrednosti. Na izločanje NGF imajo vsi tri kanabinoidi podoben vpliv, ki je najvišji po 24-urni izpostavljenosti. Največji vpliv kanabinoidov smo opazili pri sintezi in izločanju NT-3. 12-urna inkubacija astrocitov s SGT-24 povzroči 36-odstotni padec, 24-urna inkubacija s THC pa 44-odstotni padec znotrajceličnih nivojev NT-3. Največji vpliv na NT-3 ima izpostavljenost celic CBD, ki za 57 % zmanjša koncentracijo NT-3 v celicah. Tudi pri sproščanju NT-3 je učinek CBD največji, saj se vrednosti sproščenega NT-3 po 24 urah zmanjšajo kar za 61 % glede na netretirane astroците.

V magistrski nalogi smo dokazali škodljive vplive THC, CBD in SGT-24 na metabolizem, citotoksičnost in nevrotrofično aktivnost astrocitov. V prihodnosti bi bilo zanimivo preveriti receptorske mehanizme, ki posredujejo omenjene učinke, raziskati mehanizme vplivov na sintezo in izločanje posameznih nevrotrofinov ter ugotoviti, kaj je vzrok za razlike v učinku sinteznih in fitokanabinoidov.

7. Literatura

1. Lu H-C, Mackie K: An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biological Psychiatry* 2016; 79: 516–525.
2. Lanotti FA, Di Marzo V, Petrosino S: Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism, and role in neurological disorders. *Prog Lipid Res* 2016; 62: 107-128.
3. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G: Rang and Dale's *Pharmacology*, 7th edition, Elsevier Churchill livingstone, London, 2012: 221-227.
4. Kendall DA, Yudowski GA: Cannabinoid Receptors in the Central Nervous System: Their Signaling and Roles in Disease. *Front Cell. Neurosci.* 2017; 10: 294.
5. Harada K, Kamiya T, Tsuboi T: Gliotransmitter_Release_from_Astrocytes: Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain. *Front Neurosci.* 2016; 9: 499.
6. Yang H, Zhou J, Lehmann C: GPR55 – a putative »type 3« cannabinoid receptor in inflammation. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2016; 27(3): 297–302.
7. Fagan SG, Campbell VA: The influence of cannabinoids on generic traits of neurodegeneration. *Br J Pharmacol* 2014; 171(6): 1347-60.
8. Kočevar Glavač N: Zgodovina uporabe konoplje in kanabinoidov. *Farm Vestn* 2016; 67: 63-68.
9. Gaoni Y, Mechoulam R: Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Amer Chem Soc.* 1964; 86: 1646-7.
10. Fride E, Mechoulam R: Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent. *Eur J Pharmacol* 1993; 231(2): 313-4.
11. Maida V, Daeninck PJ: A user's guide to cannabinoid therapies in oncology. *Curr Oncol* 2016; 23(6): 398-406.
12. Ferjan I, Kržan M, Lipnik- Štangelj M, Žiberna L, Stanovnik L, Černe K: Farmakologija kanabinoidov. *Zdrav Vestn* 2015; 84: 456-71.
13. Turcotte C, Chouinard F, S. Lefebvre J, Flamand N: Regulation of inflammation by cannabinoids, the endocannabinoids 2-arachidonoylglycerol and arachidonoyl-ethanolamide, and their metabolites. *J. Leukoc. Biol.* 2015; 97: 1049–1070.

14. G. Bossong M, J.M. Niesink R: Adolescent brain maturation, the endogenous cannabinoid system and the neurobiology of cannabis-induced schizophrenia. *Progress in Neurobiology* 2010; 92: 370–385.
15. J. M. Niesink R, W. van Laar M: Does cannabidiol protect against adverse psychological effects of THC. *Front Psychiatry* 2013; 4: 130.
16. Wolff V, Schlagowski AI, Rouyer O, Charles AL, Singh F, Auger C, Schini-Kerth V, Marescaux C, Raul JS, Zoll J, Geny B: Tetrahydrocannabinol Induces Brain Mitochondrial Respiratory Chain Dysfunction and Increases Oxidative Stress: A Potential Mechanism Involved in Cannabis-Related Stroke. *Biomed Res Int.* 2015; 1-7.
17. Mechoulam R, Shvo Y: Hashish. I. Structure of Cannabidiol. *Tetrahedron* 1963; 12: 2073-8.
18. Carlini EA, Leite JR, Tanhauser M, Berardi AC: Cannabidiol and cannabis sativa extract protect mice and rats against convulsive agents. *J Pharm Pharmacol* 1973; 25(8): 664-5.
19. Zuardi AW: Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. *Rev Bras Psiquiatr* 2008; 30(3): 271-80.
20. Fisher T, Golan H, Schiby G, PriChen S, Smoum R, Moshe I, Peshes-Yaloz N, Castiel A, Waldman D, Gallily R, Mechoulam R, Toren A: In vitro and in vivo efficacy of non-psychoactive cannabidiol in neuroblastoma. *Curr Oncol* 2016; 23(2): S15-22.
21. Marilyn AH: Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chem Biodivers* 2007; 4(8): 1770–1805.
22. Mele T, Drevenšek G: Nove indikacije in razvoj zdravil na osnovi konoplje. *Med Razgl* 2015; 54 (2): 191-209.
23. Riederer AM, Campleman SL, Carlson RG, Boyer EW, Manini AF, Wax PM, Brent JA: Acute Poisonings from Synthetic Cannabinoids - 50 U.S. Toxicology Investigators Consortium Registry Sites, 2010-2015. *Morb Mortal Wkly Rep* 2016; 65(27): 692-5.
24. Kemp AM, Clark MS, Dobbs T, Galli R, Sherman J, Cox R: Top 10 Facts You Need to Know About Synthetic Cannabinoids: Not So Nice Spice. *Am J Med.* 2016; 129(3): 240-4.

25. https://www.uniklinik-freiburg.de/fileadmin/mediapool/08_institute/rechtsmedizin/pdf/Poster_2015/Angerer_V_-_5F-cumyl-PINACA_in_e-liquids_for_electronic_cigarettes_-_2015.pdf
26. Uredba o spremembi in dopolnitvah Uredbe o razvrstitvi prepovedanih drog, Uradni list RS, št. 22/2016.
27. Dobaja M, Grenc D, Kozelj G, Brvar M: Occupational transdermal poisoning with synthetic cannabinoid cumyl-PINACA. *Clin Toxicol (Phila)* 2017; 55(3): 193-195.
28. Borgelt LM, Franson KL, Nussbaum AM, Wang GS: The pharmacologic and clinical effects of medical cannabis. *Pharmacotherapy* 2013; 33(2): 195-209.
29. Russo M, Calabrò RS, Naro A, Sessa E, Rifici C, D'Aleo G, Leo A, De Luca R, Quartarone A, Bramanti P: Sativex in the management of multiple sclerosis-related spasticity: role of the corticospinal modulation. *Neural Plast.* 2015; 2015: 1-6.
30. Čufar A: Regulatorni vidik predpisovanja kanabinoidov. *Farm vestn* 2016; 67: 91-95.
31. Červek JA: Uporaba kanabinoidov v onkologiji. *Farm vestn* 2016; 67: 80-86.
32. Schuermeyer J, Salomonsen-Sautel S, Price RK, Balan S, Thurstone C, Min SJ, Sakai JT: Temporal trends in marijuana attitudes, availability and use in Colorado compared to non-medical marijuana states: 2003-11. *Drug Alcohol Depend* 2014; 140: 145-55.
33. Bifulco M, Pisanti S: Medicinal use of cannabis in Europe: the fact that more countries legalize the medicinal use of cannabis should not become an argument for unfettered and uncontrolled use. *EMBO Rep* 2015; 16(2): 130-2.
34. <https://clinicaltrials.gov/>
35. Molofsky AV, Krencik R, Ullian EM, Tsai HH, Deneen B, Richardson WD, Barres BA, Rowitch DH: Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev* 2012; 26(9): 891-907.
36. Sofroniew MV, Vinters HV: Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; 119(1): 7-35.
37. Jones EV, Bouvier DS: Astrocyte-Secreted Extracellular Matrix Proteins in CNS Remodeling during Development and Disease. *Neural Plast.* 2014; 2014: 1-12.
38. Wiese S, Karus M, Faissner A: Astrocytes as a source for extracellular matrix molecules and cytokines. *Front Pharmacol.* 2012; 3: 1-13.

39. Kimelberg HK, Nedergaard M: Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics* 2010; 7(4): 338-53.
40. Lundgaard I, Osório MJ, Kress BT, Sanggaard S, Nedergaard M: White matter astrocytes in health and disease. *Neuroscience*. 2014; 276: 161-73.
41. Prakash Y, Thompson MA, Meuchel L, Pabelick CM, Mantilla CB, Zaidi S, Martin RJ: Neurotrophins in lung health and disease. *Expert Rev Respir Med* 2010; 4(3): 395-411.
42. Skaper S: Neurotrophic Factors: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*, vol. 846, Springer Science+Business Media, London, 2012: 1-12.
43. Levi-Montalcini R, Hamburger V: Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo 1. *J Exp Zool* 1951; 116: 321-361.
44. Barde YA, Edgar D, Thoenen H: Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1982; 1: 549-553.
45. Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA: Identification and characterisation of a novel member of the nerve growth factor/brain derived neurotrophic factor family. *Nature* 1990; 344: 339-341.
46. Korsching S: The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci* 1993; 13: 2739-48.
47. Nestler E, Hyman S, Malenka R: *Molecular Neuropharmacology: A foundation for Clinical Neuroscience*. The McGraw-Hill Companies, Inc., London, 2001, 238-242.
48. Miklič Š, Jurič DM, Čarman-Kržan M: Differences in the regulation of BDNF and NGF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. *Int J Dev Neurosci* 2004; 22: 119-130.
49. Mele T, Vpliv monoaminskih živčnih prenašalcev na sintezo nevrotrofina-3 v celičnih kulturah astrocitov novorojenih podgan, doktorska disertacija, Ljubljana, 2012: 11-16.
50. Reichardt LF: Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006; 361(1473): 1545-64.
51. Jurič DM, Miklič S, Čarman-Kržan M: Monoaminergic neuronal activity up-regulates BDNF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. *Brain Res*. 2006; 1108(1): 54-62.

52. Mele T, Jurič DM: Metrifonate, like acetylcholine, up-regulates neurotrophic activity of cultured rat astrocytes. *Pharmacol Rep.* 2014; 66(4): 618-23.
53. Bartkowska K, Turlejski K, Djavadian RL: Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2010; 70(4): 454-67.
54. <https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/MAN-ATPlite.pdf>
55. <http://info.gbiosciences.com/blog/why-is-lactate-dehydrogenase-ldh-release-a-good-measure-for-cytotoxicity>
56. Mele T, Jurič DM: Identification and pharmacological characterization of the histamine H3 receptor in cultured rat astrocytes. *Eur J Pharmacol* 2013; 720: 198-204.
57. Tomiyama K, Funada M: Cytotoxicity of synthetic cannabinoids on primary neuronal cells of the forebrain: the involvement of cannabinoid CB1 receptors and apoptotic cell death. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014; 274(1):17-23.
58. Downer EJ, Gowran A, Campbell VA: A comparison of the apoptotic effect of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in the neonatal and adult rat cerebral cortex. *Brain Res.* 2007; 1175:39-47.
59. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/alarblue-rapid-and-accurate-cell-health-indicator.html>
60. <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-3-7-assay-protocol.pdf>
61. <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-8-assay-protocol.pdf>
62. <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-9-assay-protocol.pdf>
63. Mele T, Čarman-Kržan M, Jurič DM: Regulatory role of monoamine neurotransmitters in astrocytic NT-3 synthesis. *Int J Dev Neurosci* 2010; 28: 13-19.
64. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Abuse: European drug report. Lisbon: EMCDDA; 2015.p. 1-86.
65. Campbell VA: Tetrahydrocannabinol-induced apoptosis of cultured cortical neurones is associated with cytochrome c release and caspase-3 activation. *Neuropharmacology* 2001; 40(5): 702-9.

66. Maj PF, Collu M, Fadda P, Cattaneo A, Racagni G, Riva MA: Long-term reduction of brain-derived neurotrophic factor levels and signaling impairment following prenatal treatment with the cannabinoid receptor 1 receptor agonist (R)-(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinyl-methyl) pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone. *Eur J Neurosci.* 2007; 25(11): 3305-11.
67. Friedrich J, Khatib D, Parsa K, Santopietro A, Gallicano GI: The grass isn't always greener: The effects of cannabis on embryological development. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2016; 17(1): 45.
68. Schneider M: Puberty as a highly vulnerable developmental period for the consequences of cannabis exposure. *Addict Biol.* 2008; 13(2): 253-63.

