

TDK DOLGOZAT

Alföldi Regina Mária

2019

Állatorvostudományi Egyetem

Élettani és Biokémiai Tanszék

Élettani Osztály



**Kannabinoid vegyületek asztro- és mikroglia- kifejtett hatása
neuroinflammációs és neurodegeneratív kórképekben**

*Effects of cannabinoid compounds on microglia- and astrocyte-mediated
neuroinflammation and neurodegeneration*

Készítette: Alföldi Regina Mária

Témavezetők: Dr. Tóth István, egyetemi adjunktus

Dr. Jócsák Gergely, tudományos munkatárs

Budapest

2019

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
BEVEZETÉS	5
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
A KANNABINOIDOK.....	7
<i>A tetrahidrokannabinol és kannabidiol.....</i>	<i>7</i>
AZ ENDOKANNABINOID RENDSZER	8
<i>A kannabinoid receptorok</i>	<i>8</i>
<i>Az endokannabinoidok</i>	<i>9</i>
<i>Az endokannabinoidok szerepe a retrográd szinaptikus jelátvitelben</i>	<i>10</i>
<i>Az endokannabinoid rendszer az asztrogliaokban.....</i>	<i>12</i>
AZ ASZTROGLIÁK NEUROINFLAMMÁCIÓS ÉS NEURODEGENERÁCIÓS KÓRKÉPEKBEN BETÖLTÖTT SZEREPE	12
CÉLKITŰZÉSEK	14
ANYAG ÉS MÓDSZER	15
KÍSÉRLETI ÁLLATOK	15
VEGYSZEREK	15
ELŐKÉSZÜLETEK, MŰTÉT	15
SEJT TENYÉSZTÉS, KO-KULTÚRA LÉTREHOZÁSA ÉS A SEJTEK PASSZÁLÁSA	15
KEZELÉSEK, CSOPORTOK	16
ÉLETKÉPESSÉG ÉS GYULLADÁSOS FOLYAMATOK VIZSGÁLATA	17
EREDMÉNYEK	19
AZ ÉLETKÉPESSÉG MEGHATÁROZÁSA LAKTÁT-DEHIDROGENÁZ KIBOCSÁTÁSI TESZT SEGÍTSÉGÉVEL	19
ÉLETKÉPESSÉG VIZSGÁLATA NEUTRAL RED TESZTTTEL	21
ASZTROGLIA-MIKROGLIA TENYÉSZET INTERLEUKIN-6 TERMELÉSÉNEK MEGHATÁROZÁSA	23
MEGBESZÉLÉS	25
AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE.....	25
KONKLÚZIÓ	29
ÖSSZEFOGLALÁS	31
SUMMARY	32
IRODALOMJEGYZÉK	33
ÁBRA -ÉS KÉPJEGYZÉK	37
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	38

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2-AG	2-arachydonoil-glicerol
A β	béta-amiloid fehérje
ATP	adenozin-trifoszfát
CB1	1-es típusú kannabinoid receptor
CB2	2-es típusú kannabinoid receptor
CBD	kannabidiol
CNS	központi idegrendszer (Central Nervous System)
COX-2	ciklooxygenáz-2
DAGL	diacyl-glicerol-lipáz
ECS	endokannabinoid rendszer (Endocannabinoid system)
FCS	fetal calf serum
FAAH	zsírsavamid-hidroláz (Fatty acid amide hydrolase)
IL-1 β	interleukin-1 β
IL-6	interleukin-6
INF- γ	interferon- γ
MAGL	monoacyl-glicerol-lipáz
MAP	mitogén aktivált protein
MTT	dimetil-tiazol-difenil-tetrazolium-bromid
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NMDA	N-metil-D-aszparaginsav
LDH	laktát-dehidrogenáz
LPS	lipopoliszacharid
OD	optikai denzitás
PBS	foszfát puffer (phosphate-buffered saline)
PSD	posztzinaptikus denzitás

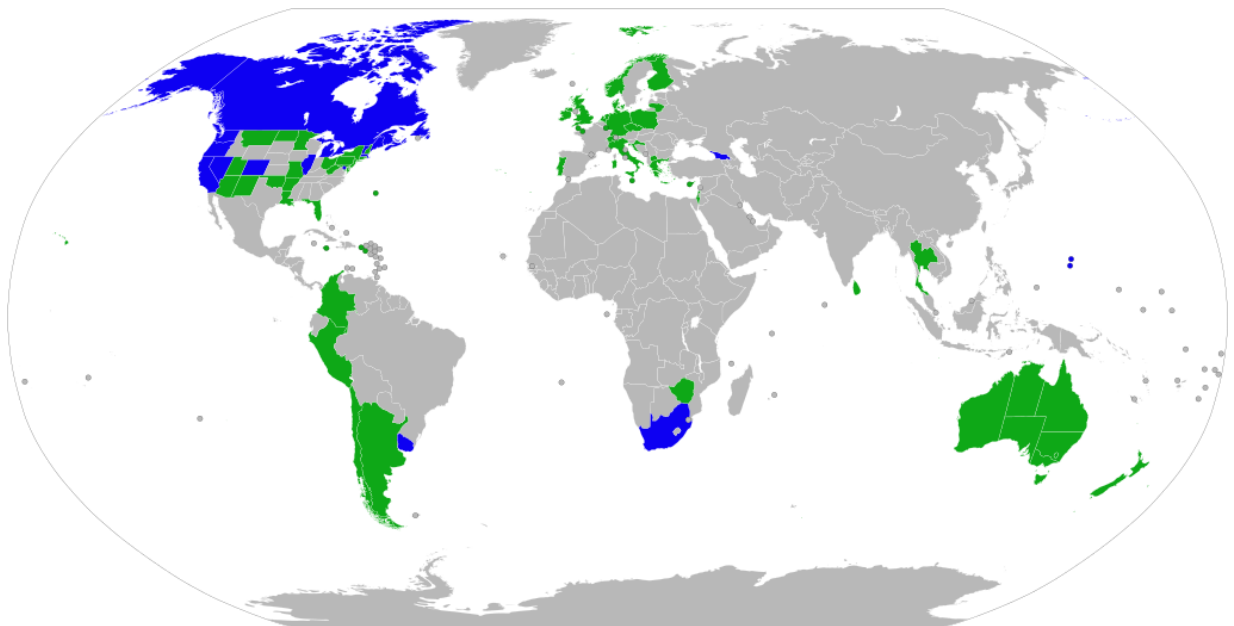
PPAR	peroxiszóma proliferátor aktivált receptor (peroxisome proliferator activated receptors)
ROS	reaktív oxigén gyökök (reactive oxygen species)
THC	delta-9-tetrahidrokannabinol
TMEV	Theiler-féle egér encephalomyelitis vírus
TNF- α	tumor nekrosis faktor- α
TRP	transziens receptor potenciál (transient receptor potencial)

BEVEZETÉS

A gyógyítás történelmében a *Cannabis sativa* egyike a legrégebben használt növényeknek. Leírásokat már az I. századból találhatunk mind a növényről, mind annak gyógyszeres hatásairól, ezek közé tartozik az eufória érzete, az ellazultság, tachycardiás tünetek, hypothermia és a fájdalomcsillapító hatás is, melyek fő okozója a leginkább ismert delta-9-tetrahidrocannabinol (THC) (Gaoni et Mechoulam, 1964). Ezen tulajdonságain alapulva számos terápiás céllal alkalmazták a növényt a fájdalom enyhítésétől kezdve az epilepsziás tünetek kezeléséig, pszichotrópikus mellékhatásai miatt azonban orvosi használata egy hosszabb időszakra jelentősen visszaszorult. A téma iránt közelmúltban fellángolt lelkesedés alapjául a kannabinoid szerű vegyületek által szabályozott endogén jelátviteli rendszer, az endokannabinoid rendszer (ECS: Endocannabinoid system) felfedezése szolgált (Matsuda et al., 1990).

Ezen belső rendszer ismerete révén a kender két fő hatóanyaga, a kannabidiol (CBD) és a tetrahidrokannabinol (THC) a farmakoterápia kiemelt szereplői lettek. Az új ismeretekkel egyidőben megkezdődött az orvosi kannabisz legalizációjának hulláma, melynek következményeként napjainkban számos amerikai, európai, afrikai államban orvosi vény ellenében hozzáférhető a betegek számára kannabinoid hatóanyagú készítmény (Pacula et Smart, 2017). Ezeket gyakran választják különböző neurodegeneratív betegségek terápiájának részeként, mint például a Huntington-kór, Alzheimer-kór vagy a sclerosis multiplex. Rákos betegek palliatív kezelésében a kannabinoidok csillapítják az émelygést és hányásingert, fokozzák az étvágyat és enyhítik a fájdalmat. Glaukóma kezelésében topicalisan alkalmazva a vasodilatatio és a kapilláris vérnyomás szabályozásával csökkenti az ocularis nyomást (Pacher et al., 2006). Immunmoduláló hatásuk miatt krónikus gyulladásal járó, immunrendszer patológiás működéséből adódó kórképek terápiájában is gyakran szerepelnek kannabinoid készítmények. Reumatoid arthritisben gátolja a synoviális sejtek tumor nekrosis faktor termelését, és csökkenti a kollagén-specifikus CD4+ T-sejt proliferációt (Malfait et al., 2000). Allergiás asztma kezelésében a THC és CBD is gátolta a szérum IgE szintjének emelkedését és a nyálka túltermelődést a tüdőben, valamint bronchodilatátor hatásuk is ismert (Jan et al., 2003). Görcsoldó tulajdonságait kihasználva epilepsziás betegek körében is elterjedt használatuk, humán esetek mellett újabban kutyák kezelésével is próbálkoznak (McGrath et al., 2019).

A legalizáció terjedésével egyetemben azonban nemcsak az orvosi területeken, hanem különféle élelmiszerek és élvezeti cikkek széles körében megjelent a kannabisz származékok –elsősorban a nem pszichotropikus CBD- felhasználása hatóanyagként, illetve ízesítőanyagként. A kannabiszt ölelő divathullám további következménye, hogy napjainkban már számos weboldal foglalkozik kannabinoid tartalmú készítmények árusításával, általában terápiás célra. Ezeken az online felületeken keresztül bárki számára könnyedén elérhető a különböző oldatok, tinktúrák, kapszulák választéka, olyan országokban is, ahol teljes mértékben illegális a kannabisz bármilyen célú felhasználása. Ezen szerek kontrolálatlan hozzáférhetősége egészségbiztonsági kérdéseket is felvet, hiszen sokszor teljesen ismeretlen helyről származnak, a pontos összetevők feltüntetése nélkül, melyet a laikus felhasználó gyakran orvosi felügyelet nélkül alkalmaz. A téma aktualitása miatt még az orvosi vényhez kötött terápiás célra gyártott kannabisz készítmények esetében is kevés tudományos adat áll rendelkezésre rendszeres, hosszú távú alkalmazásuk lehetséges mellékhatásairól és szövődményeiről a biztonságos használathoz.



1.kép: Kannabisz legalizációja 2018. december 31.-i adatok alapján (URL₁)

kék: bármely felhasználásra legális(vény nélkül)

zöld: orvosi felhasználásra legális(vényköteles)

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A kannabinoidok

Eredetileg, a kannabinoid elnevezés a *Cannabis sativa* leveléből származó, jellegzetes 21 szénatomos struktúrával rendelkező fitokannabinoidokat és átalakult származékait jelölte. Napjainkban azonban a terminus minden kannabinoid receptorhoz kötődni képes ligand, beleértve az endogén eredetűek és a nagy számú szintetikus analógok gyűjtőneve.

A növényben található, összesen 66 azonosított fitokannabinoid eltérő alosztályba, altípusba sorolható. Ezek közül legjelentősebb számban a cannabigerol, cannabidiol, cannabikromén és a delta-9-THC csoportba tartozók és acidjaik (természetben is megtalálható metabolitok) fordulnak elő. A fitokannabinoidok számozása kétféle módon történhet: monoterpenoid és dibenzopirán szisztéma alapján, melyek közül utóbbi használatos a gyakorlatban. (Grotenhermen, 2003)

A kannabinoidok erősen lipofil és lényegében vízzoldhatatlan vegyületek. Szerves vegyületekben azonban jól oldódnak; a gyakorlatban elsősorban etanolt és közepes szénláncú trigliceridet használnak oldószerként. (Garrett et Hunt, 1974)

A tetrahidrokannabinol és cannabidiol

Az orvosi felhasználásra szánt kannabisz készítmények hatóanyaga döntő többségben CBD, illetve CBD és THC keveréke. Jelentős különbség, hogy a THC-val ellentétben a CBD nem pszichoaktív vegyület.

A kannabinoidok kinetikája nem mutat eltérést nők és férfiak, valamint rendszeres és alkalmi fogyasztók közt. (Wall et al., 1983) A különböző termékek döntő többsége inhalálva, illetve perorális felvétel útján kerül a szervezetbe. A rectalis, transdermalis, sublingualis vagy szemcseppként való alkalmazás gyakorlati jelentősége csekély.

Pulmonáris asszimiláció következtében a maximális plazma koncentrációt percek (3-10 perc) belül eléri, a pszichotrópikus hatások (THC esetében) néhány másodperc elteltével észlelhetők, a maximális hatás 15-30 percen belül kialakul, majd 2-3 órán át fokozatosan enyhülnek. Orális alkalmazás során az abszorpció lassabb és egyenetlenebb/kiszámíthatatlanabb; a maximális plazma koncentráció 1-2 órán belül, míg a maximális pszichotrópikus hatás 2-3 órán belül alakul ki (Grotenhermen, 2003).

Szövetek közti megoszlásuk csupán a fizikokémiai tulajdonságaiktól függ; nem szabályozza semmilyen specifikus szállító-, vagy barrierrendszer. A vérpályán belül mintegy 90% a plazmában, a maradék 10% a vörösvértestekben oszlik meg. A plazmában

döntő hányaduk szérumfehérjékhez, főleg lipoproteinekhez és albuminhoz kötődve szállítódik (Hunt et Jones, 1980). A THC nagyon gyorsan penetrál a gazdagon vascularizált szövetekbe, mint amilyen a máj, tüdő, vese, így az agyban a pszichoaktív csúcspont idejében mintegy csak 1%-a detektálható. Átjut a placentán, továbbá kiválasztódik az anyatejbe. Hosszabb távú alkalmazás következtében akkumulálódik, így 8.4x-es plazmakoncentrációban képes ürülni, amely egy anyatejjel táplált csecsemő esetében akár 0.01-0.1 mg napi THC bevitelt jelent (Perez-Reyes et Wall, 1982).

A kannabinoidok metabolizációs folyamatait főként a májban található, CYP2C alcsalád enzimjei katalizálják. Kis mértékben egyéb szövetekben, a szívben és a tüdőben is zajlik THC és CBD metabolizáció (Watanabe et al., 1995). A keletkezett savas metabolitok 20-35%-a vizelettel, 65-80%-a bélsárral ürül, per os felvétel esetén pedig a drog 5%-a változatlan formában távozik a bélsárral (Wall et al., 1983).

A THC és CBD a kannabinoid receptorokhoz való affinitása eltérő. A THC megközelítőleg egyformán magas affinitást mutat az endokannabinoid rendszer két ismert receptora iránt (CB1 és CB2 receptorok), azonban a kettes típusú receptorokon kisebb hatékonyságú (Pertwee, 1999). A CBD elhanyagolható affinitást mutat mindkét receptor irányába; hatásmechanizmusa az anandamid bontásának gátlásán és antioxidáns tulajdonságain alapszik (Mechoulam et Hanuš, 2002).

Az endokannabinoid rendszer

Az endokannabinoid rendszer (ECS) széleskörű neuromodulátor rendszer, mely fontos szerepet játszik a központi idegrendszer működésében, a szinaptikus plaszticitásban, valamint az endogén és környezeti hatásokra adott válaszok kialakításában. Felépítésében a kannabinoid receptorok, az endogén kannabinoidok, valamint ezen anyagok szintéziséért és lebontásáért felelős enzimek vesznek részt (Lu et MacKie, 2016).

A kannabinoid receptorok

A kannabinoid hatás közvetítéséért elsősorban az egyes (CB1)-, és kettes-típusú (CB2) kannabinoid receptorok a felelősek, azonban TRP (transient receptor potential) csatornákhöz és PPAR (peroxisome proliferator activated receptors) receptorokhoz is képes némely kannabinoid kötődni. Mind a CB1, mind a CB2 receptor $G_{i/o}$ -protein kapcsolt receptor, azonban a két típus mindössze 44%-os szekvencia-azonosságot mutat. Aktivációjuk során az adenilát-cikláz és bizonyos feszültségfüggő Ca^{+} -csatornák

gátlódnak, számos MAP-kináz és befelé rektifikáló K^+ -csatornák pedig aktiválódnak, kisebb eltérésekkel függően az adott sejtípustól. Ennek köszönhetően aktivációjuk eltérő hatást eredményezhet a sejtek élettanában, többek közt a szinaptikus működésben, géntranszkripcióban és a sejtmozgásban (Howlett et al., 2002).

A **CB1** receptorok legnagyobb számban a központi idegrendszerben (CNS), főként a cortex, ganglia basalis, hippocampus és cerebellum területén fordulnak elő. Elsőroban az axon terminális végében, illetve a pre-axonális szegmentekben találhatók meg, míg az aktív zónában igen csekély számban jelennek meg. A CB1 receptorok a neuronok mellett funkcionálisan releváns számban expresszálódnak az idegszövet gliasejtjein is. Ezen receptorok jelenlétét, bár jóval kisebb számban, perifériás területeken is leírták, mint például a vascularis endothelium, perifériás szinapszisok, vékonybél, here és immunrendszer sejtjeinek felszínén. (Mackie, 2005).

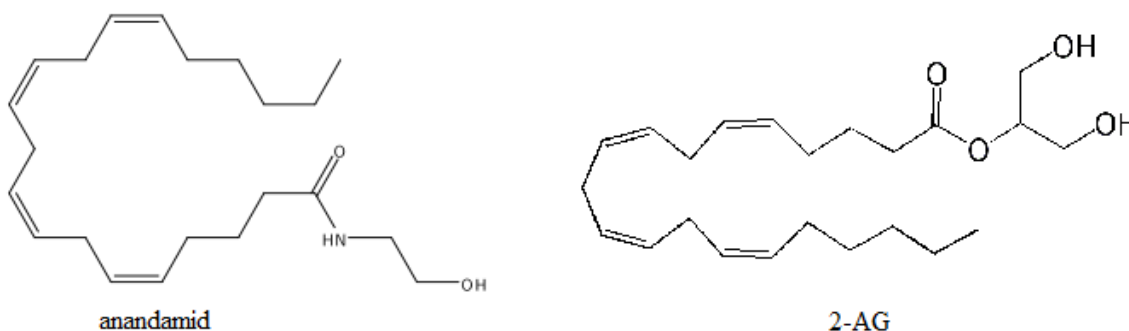
A **CB2**, gyakran „perifériás” jelzővel illetett kannabinoid receptor, elsősorban az immunrendszer, valamint a hematopoietikus rendszer sejtjein expresszálódik nagy számban (Munro et al., 1993). A CNS területén kisebb mértékben, főleg a microgliák és vasculáris elemek felszínén találhatók meg. Bizonyos patológiás folyamatok során (pl.: idegsérülés) azonban megjelenhetnek a neuronokon is. Különösképp érdekes tulajdonsága a CB2 receptoroknak, hogy nagymértékű indukálhatóságot mutatnak; expresszálódásuk mértéke akár százszorosára is nőhet szöveti sérülés, vagy gyulladás során (Maresz et al., 2005). Másrészt a CB1 receptoroktól eltérően a CB2 receptorok nem közvetítenek pszichoaktív hatásokat, így e két tulajdonság az új terápiás módszerek fejlesztésének vonzó célpontjává teszik (Anday et Mercier, 2005).

Az endokannabinoidok

Az endokannabinoidok olyan endogén lipidek, melyek a kannabinoid receptorokhoz kötődve, bár kisebb mértékben, de képesek legalább részben a növény pszichoaktív komponensei által produkált hatásokat kiváltani. Az elsőként felfedezett és legismertebb vegyületek az anandamid (arachidonol-etanolamid) és a 2-arachidonol-glicerol (2-AG) (Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1995). Az endogén kannabinoidok közös, fontos tulajdonsága, hogy prekursoraik a lipid membránokban megtalálhatók. Igény esetén (általában valamely G-protein kapcsolt receptor aktiválódása vagy depolarizáció révén) egy vagy két gyors enzimatis lépés során a membránból felszabadulnak és az extracelluláris térbe jutnak. Ez jelentős eltérés a klasszikus neurotranszmitterekhez képest,

melyek már szintetizált alakban a szinaptikus hólyagokban tárolódnak. A CNS területén a sejtek hamar felveszik a kibocsátott endokannabinoidokat, ahol lebontásuk történhet hidrolizációval és/ vagy oxidációval. Az anandamidot az FAAH (fatty acid amide hydrolase) hidrolizálja szabad arachidonsavvá és etanolaminná, míg a 2-AG lebontását arachidonsavvá és glicerollá a MAGL (monoacil-glicerol-lipáz) katalizálja; az oxidációt mindkét anyag esetében a COX-2 (ciklooxygenáz-2) végzi (Urquhart et al., 2015).

Az endokannabinoidok intrinsic hatékonysága eltérő: a 2-AG magas hatékonyságú agonista, mind a CB1, mind a CB2 receptorokon, míg az anandamid alacsony hatékonyságú agonista a CB1 és nagyon alacsony hatékonyságú a CB2 receptorokon (Gonsiorek et al., 2000; Luk et al., 2004). A későbbiekben felfedezett és ezáltal kevésbé megismert endokannabinoidok a virodhamin, 2-arachidonoil-glicerol-éter, palmitol-etanolamid, N-arachidonoil-dopamin (Fezza et al., 2002; Porter et al., 2002).

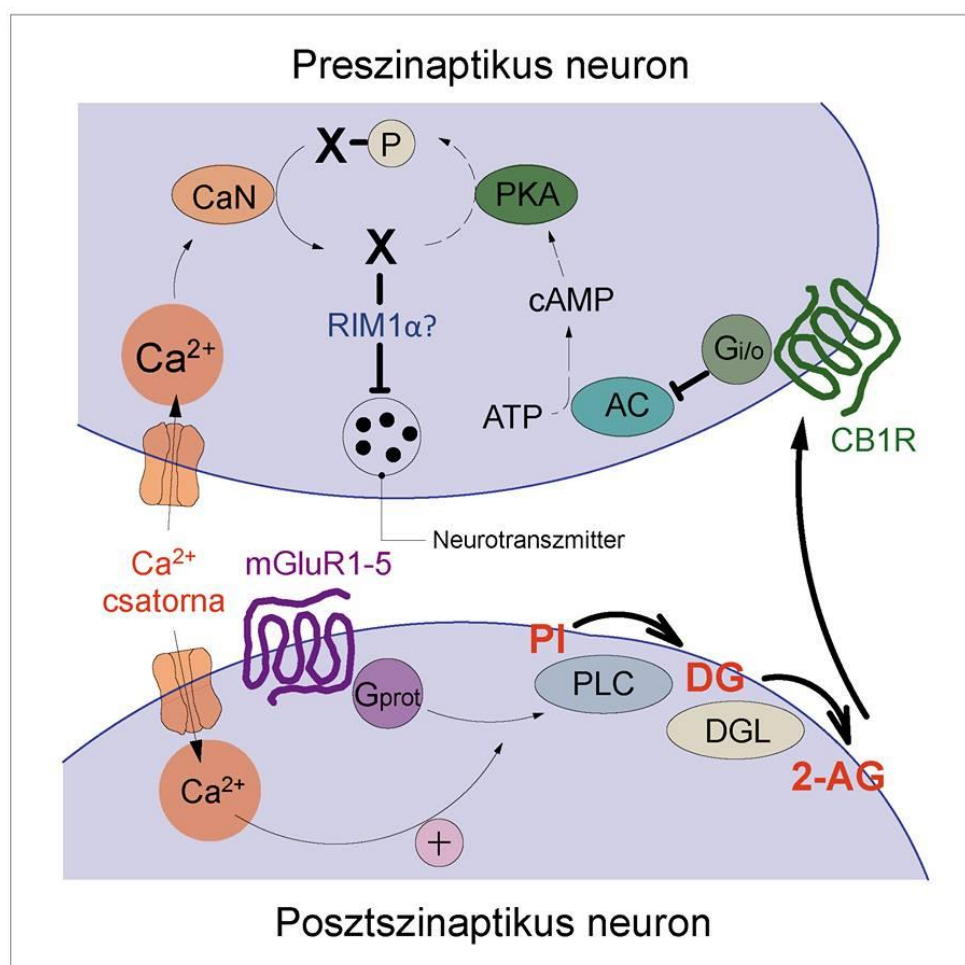


1.ábra: A két legismertebb endokannabinoid szerkezeti képlete (URL₂, URL₃)

Az endokannabinoidok szerepe a retrográd szinaptikus jelátvitelben

A kannabinoid receptorok a CNS területén preszinaptikusan helyeződnek el. A CB1 receptorok nem csak a gátló, de a serkentő idegsejtek nyúlványain is megtalálhatóak (Katona et al., 1999). A receptorok száma összefüggésben van a serkentő glutamát és a gátló GABA receptorok számával. A CB1 receptorok feladata fékező hatásukon alapszik, ugyanis a jelátvivő anyagok felszabadulása egy szinapszisban olyan mértékű is lehet, amely már károsító hatással bír. A preszinaptikus oldalon felszabaduló neurotranszmitterek a posztinaptikus denzitás (PSD) több receptorához is kötődnek. Erőteljes inger hatására azonban olyan mértékű lehet a jelátvivő anyagok felszabadulása (úgymond túlcsordul), hogy a fogadó sejt periferiájára is eljutnak. Az itt membránba foglalt különböző G-protein kapcsolt (pl.: mGluR5) receptorokhoz kapcsoltan egy DAGL- α (diacil-glicerol-lipáz- α)

enzim található. Ez az enzim alakítja át a receptorkapcsolódás során beindított reakciósorozatok végtermékét, a diacil-glicerolt 2-AG-vé. A felszabaduló endokannabinoid retrográd módon eljut a preszinaptikus CB1 receptorokhoz. A kötődés után az inhibitorikus G-protein gátolja a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornákat, ezzel megakadályozva a további neurotranszmitter felszabadulást (Katona et al., 2006). Ezen védőrendszer sérülése jelentős idegrendszeri károkat okozhat a szervezetben, illetve az endocannabinoidok reguláló szerepe a szinaptikus neurotranszmisszió során óriási lehetőséget rejt magában olyan kórképek mind tüneti, mind oktani kezelésében, melynek kóroktana a jelátvitel helytelen működésével áll kapcsolatban.



2.ábra- Az endokannabinoid retrográd szinaptikus jelátvitel sematikus ábrája (saját ábra)

Az endokannabinoid rendszer az asztrogliaokban

A CB1 receptorok detektálhatósága az asztrogliaon sokáig látszólagosan ellentétes eredményeket mutatott a kismértékű expresszáció miatt. Az elmúlt időben azonban számos tanulmány bizonyította, hogy az asztroglia mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények közt képesek CB1 receptorokat expresszálni (Navarrete et Araque, 2008; Bosier et al., 2013). Az asztroglialis receptorok a neuronokon lévőktől eltérően G_q kapcsolt receptorok, így a foszfolipáz C aktivitás az endoplazmatikus retikulumból Ca^{2+} szabadít fel és nő az intracelluláris Ca^{2+} mennyiség. Ez a megnövekedett mennyiség glutamát termelést stimulál az asztroglia sejtekben, amely a neuronokhoz visszajutva NMDA (N-metil-D-aszparaginsav) receptorokhoz kapcsolódva alakít ki lassan terjedő jelet, ezzel segítve az asztroglia-neuron közti kommunikációt (Navarrete et Araque, 2008). Az asztroglia emellett képesek az endokannabinoidokat is szintetizálni Ca^{2+} és ATP-függő utakon keresztül (Stella, 2010). Az asztroglialis CB1 receptorok részt vesznek az endokannabinoidok forgalmában az agyban, befolyásolva ezzel a retrográd szignálrendszert (Belluomo et al., 2015).

Az asztroglia neuroinflammációs és neurodegenerációs kórképekben betöltött szerepe

Az asztroglia az agy homeosztázisának fenntartásáért felelős fő sejtípus. Magasan szervezett anatómiai egységbe rendeződve kiterjedt hálózatot alkotnak a központi idegrendszer területén. Az asztroglia számos módon segítik a neuronok működését: támasztó hálózatot képeznek az idegsejtek számára, képesek felvenni és újrahasznosítani a neurotranszmittereket (főleg glutamátot), glikogént tárolnak és megvédik őket az oxidatív stressztől. Térbeli K^+ pufferek során felveszik a felesleges K^+ -ionokat az extracelluláris térből és eloszlatják az asztroglia szintitiumok hálózatában, megakadályozva ezzel a hiperexcitabilitás kialakulását (Bélanger et Magistretti, 2009).

Ennek a sokrétű kooperativitásnak köszönhetően a neurológiai diszfunkciók során a patológiás stimulusok az asztroglia szervezett működésében is változásokat indukálnak. Számos különböző kórképet azonos patogén folyamatok jellemezhetnek, mint amilyen az oxidatív stressz, excitotoxicitás, metabolikus zavarok vagy a gyulladás – köztük több olyan, melyek kialakulását a normál agyi működés során az asztroglia feladata megakadályozni. Az agyban többféle inzultus képes immunválaszt kialakítani, lehet az

sérülés, fertőzés, sejtörmelék vagy abnormális fehérjeaggregátumok felhalmozódása. A legtöbb esetben ez előnyös válaszreakció annak érdekében, hogy megvédje az idegrendszert a káros veszélyektől. A krónikus neuroinflammáció azonban már negatív hatással bírhat az idegműködésre és életképességre. A neuroinflammáció valójában számos neuropatológiás elváltozás kísérő jelenségeként fordul elő, mint az Alzheimer-kór, Huntington-kór, sclerosis multiplex, amiotrófiás lateralsclerosis vagy a stroke (Allan et Rothwell, 2003). A mikroglia mellett, az asztroglia is immunkompetens sejtek, melyek fontos szabályozószereppel rendelkeznek az agy gyulladásos folyamataiban. Aktiválódásuk, az ún. asztroglialis során megváltozott génexpresszió, proliferáció és hipertrófia jellemző. Az aktiválódott sejtek citokinek, kemokinek, növekedési faktorok széles sorát képesek termelni, melyeknek neuroprotektív, de neurotoxikus hatásuk is lehet (Farina et al., 2007). Ezzel a kettős szereppel bíró citokinek potenciálisan fenntarthatják vagy szupresszálhatják is a neuroinflammációt. Fontos továbbá, hogy az eltérő stimulusok hatására termelődött pro- és antiinflammatorikus citokinek széles választéka (pl.: IL-1 β , IL-6, IL-10, INF β , TNF α) egymással is kölcsönhatásba lép, erősítik, vagy elnyomják a másik hatását (John et al., 2003). Az asztroglia negatív feedback révén szupresszálhatják a mikrogliaaktivációt, amely azonban nagy mennyiségű proinflammatorikus citokin és toxikus ROS termeléssel jár, csökkentve a neuronok túlélési esélyét (Block et al., 2007). Emellett az aktivált asztroglia sejtek ártalmas reaktív oxigénradikálokat (ROS) bocsátanak ki és gliahegeket képeznek, ami megakadályozhatja az axonregenerációt és neuritnövekedést (Sofroniew, 2005).

Ezek alapján nem mondható ki egyértelműen, hogy az asztroglia aktiváció előnyös vagy káros a szomszédos neuronok számára. A gyulladásban aktiválódott asztroglia mindenképp befolyással bír a neuronok működésére és életképességére, az összhatás azonban nagymértékben függ a számos faktor végső egyensúlyától; a kiváltó ok típusától, súlyosságától, időtartamától, a komplex citokin kölcsönhatástól, illetve a szomszédos sejtek által expresszált citokin és növekedési faktor receptoroktól.

CÉLKITŰZÉSEK

A különböző *in vitro* modelleken rendkívül pontosan, a szervezeten belüli interakciók kizárásával, ellenőrzött körülmények közt tanulmányozható egy-egy kísérleti változó hatása. Az élő szervezetekben, szövetekben azonban érdemes figyelembe venni a sejtek sokféleségét, a működésben betöltött szerepük változatosságát és egymásra hatását.

Munkánk során abból indultunk ki, hogy az orvosi kannabiszt számos neurodegeneratív kórkép kezelésében is alkalmazzák, melyek gyakori kísérő jelensége a neuroinflammáció. Kísérleteinkhez asztroglia-mikroglia 8:1 arányú ko-kultúra vizsgálatát választottuk annak céljából, hogy élethűbben modellezzük a szerveken belüli viszonyokat, mint az egy-egy sejtípust tartalmazó primer sejttenyészetek. Vizsgálataink egyik része a sejt-kultúra -elsősorban az asztroglia sejtek- gyulladásos jelenségre adott válaszána tanulmányozása kannabinoid vegyületekkel való kezelés mellett, melyek ismertén gyulladáscsökkentő hatással bírnak. (Klein et al., 2000). A létrejött sejttenyészetet lipopoliszachariddal (LPS) való gyulladás indukálása után különböző koncentrációjú CBD és THC kezelésnek terveztük alávetni, és az ennek hatására bekövetkező IL-6 termelés változását ELISA-módszerrel meghatározni. Célunk volt továbbá a kannabinoid kezelésnek kitett sejtípusok károsodásának fokát többféle eljárással detektálni, így az életképességet Neutral red és LDH-teszt segítségével is kívántuk mérni.

A sejttenyészeteken alkalmazott kezelések vizsgálatától azt is vártuk, hogy a CBD és THC dóziszfüggő alkalmazása során a sejtprotektív és citotoxikus tulajdonságába, illetve ezek mértékébe nagyobb betekintést nyerjünk. Másrészt célkitűzésünk volt, hogy egy neuroinflammációs modellen megfigyeljük az asztroglia viselkedését eltérő koncentrációjú, a terápia részeként is használt kannabinoidokkal szemben.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez 4db 1-2 napos Sprague-Dawley típusú patkányt használtunk, melyet az Élettani és Biokémiai Tanszék állatháza biztosított számunkra. Tartásuk standard körülmények között, 12 óra sötét és 12 óra világos periódust biztosító mesterséges megvilágítás mellett történt. Az állatokkal való munka a hatályos jogszabályoknak megfelelően zajlott.

Vegyszerek

A kísérletben felhasznált THC-törzsoldatot (1 mg/ml) Lipomed AG (THC-135-ILE, Svájc), (THC engedélyszám: OGYÉI/20952-2/2019), a CBD-törzsoldatot (10 mg/ml) és az LPS-t a Sigma-Aldrich Kft. (CBD: 90899; LPS: L4391) biztosította számunkra.

Előkészületek, műtét

Az **előkészületek során** először a sejtizoláláshoz használt puffer és tápoldatokat állítottuk össze a tanszéken végzett korábbi kísérletek tapasztalatai alapján (Fetter, 2017), illetve a kész oldatok megfelelő tárolási feltételeit a felhasználásig biztosítottuk. A műtethez szükséges berendezéseket, steril fémeszközöket és egyéb kellékeket előkészítettük.

A **boncolás** első lépéseként a gyors dekapitálást követően a bőr és koponya felvágása után eltávolítottuk az agyat. A kipreparált agyat kalciummentes, amphotericin B-t tartalmazó foszfát pufferoldatba (PBS) helyeztük, úgy, hogy az ellepje a szervet. Az agyhártyát sztereomikroszkóp alatt, jégen, csipesz segítségével távolítottuk el; a két féltekét az agyhártyától és a plexus choroideustól igen gondosan megtisztítottuk, hogy a tenyésztés során a vérsejtekkel való kontaminációt elkerüljük.

Végül a megtisztított agyakat, agydarabokat egy Petri-csészébe gyűjtöttük össze, amibe előzőleg kalciummentes PBS-t mértünk. A további lépéseket steril fülke alatt végeztük.

Sejttenyésztés, ko-kultúra létrehozása és a sejtek passzálása

Az agydarabokat tartalmazó Petri-csészéről leszívtuk a pufferoldatot, majd az agyszövetet Gillette-pengével alaposan felaprítottuk. Az emésztéshez 2 ml 0,05%, EDTA-mentes DNÁzt tartalmazó tripszint (0,5 ml/állat) mértünk és pipettával alaposan

szuszpendáltuk. A 10 perces inkubációs idő alatt előkészítettük a már előzetesen lizinnel kezelt Petri-csészéket (1 csésze/állat), és mindegyikbe 5 ml tápoldatot pipettáztunk. Az emésztés leállításához a tripszines homogenizátumhoz inkubátorban előmelegített tápoldatot adtunk (5 ml/állat). Ezután ismét alaposan felszuszpendáltuk a Petri-csésze tartalmát, majd a négy, kezelt csészébe egyenlő mennyiségekre osztottuk szét. A sejteket lefedve, termosztátban, 37°C és 5% CO₂ paraméterek mellett tároltuk.

24 óra elteltével, közepes erősséggel, tápfolyadékkal átmostuk a sejt kultúrát, így a maradék sejt törmelék eltávolításra került, ugyanis az elhalt sejtekből felszabaduló anyagcseretermékek gátolják az asztrogliák osztódását és fejlődését. A sejteken heti kétszer cseréltünk tápfolyadékot, míg a tenyészet két hét alatt konfluenssé vált.

A létrejött tenyészeteket a tápfolyadék leszívása után PBS oldattal átmostuk, hogy a maradék médiumot semlegesítsük. Ezt követően 0,05%-os tripszin oldattal kezeltük a sejteket, és 5-10 percen át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A tripszin elhasítja a sejtek kitapadását okozó fibrinszálakat, ezáltal felváltnak a sejtek a csésze aljáról. Ezt a folyamatot mikroszkópban ellenőriztünk. 10% főtális borjú savó (FCS) tartalmú tápoldatot mértünk a sejtekhez, így leállítottuk az emésztést, majd a még letapadt sejteket is finoman felmostuk a csésze aljáról. A csésze tartalmát átpipettáztuk steril centrifugacsőbe, majd ezt az oldatot 10 percen át, szobahőmérsékleten 1000 rpm-en lecentrifugáltuk. A felülúszót leszívtuk, a sejtsuszpenziót Bürker-kamra segítségével meghatároztuk a sejtszámot. A sejtszámlálás után kiültettük a sejteket Poli-L-Lizinnel kezelt lemezekre (96-os plate esetén 20- 75 000 sejt/lyuk). A plate lyukaiba juttatott sejteket és tápoldatot kiegészítettük az adott mennyiségű médiummal.

Kezelések, csoportok

A különböző vizsgálatokhoz hat fő kezelési csoportot alakítottunk ki. Mindenekelőtt szükséges volt két kontrollcsoport létrehozása; ehhez az első kontrollon semmilyen kezelést nem végeztünk, illetve a második, gyulladásos kontrollcsoportba 100 ng LPS-t adtunk. A további csoportosítás során növekvő koncentrációjú (1 µM, 5 µM 10 µM, 15 µM, 25 µM) THC, valamint növekvő koncentrációjú (1 µM, 5 µM 10 µM, 15 µM, 25 µM) CBD oldatokat mértünk a sejtekhez, illetve ugyanezen koncentrációjú kannabinoid kezeléseket 100 ng LPS-sel történő, 30 perces előkezelés mellett is megismételtük. A különböző vizsgálatok eredményeit a kannabinoid kezelést követő 24 óra elteltével olvastuk le.

Életképesség és gyulladásos folyamatok vizsgálata

A laktát-dehidrogenáz (LDH) egy stabil citoplazmatikus enzim, mely minden sejtben megtalálható. Amikor a sejtek toxikus hatásnak vannak kitéve, a plazmamembrán integritása megszakad, így az LDH hamar megjelenik a sejt kultúra felülszójában (Kumar et al., 2018). A teszt működési elve, hogy a sejtekre mért medium laktátot, NAD^+ -t és tetrazóliumsót tartalmaz. Az LDH NAD^+ felhasználásával katalizálja a laktát-piruvát átalakulást, majd az így keletkezett $\text{NADH} + \text{H}^+$ a sárga tetrazóliumsót egy vízzoldható, piros formázán festékké redukálja, melyet spektrofotométerrel mérhetünk. A mérés kivitelezéséhez a sejteket piruvátmentes tápoldatba passzáltuk és 100 μl sejtszuszpenziót mértünk minden wellbe (kivétel háttérkontroll, mely csak tápoldatot tartalmazott). 24 órás inkubáció után 100 μl /lyuk mediumot adtunk a sejtekhez (kivétel magaskontroll, ehhez 100 μl TritonX-100 reagenst adtunk). Ezután a kísérlet szerinti növekvő koncentrációjú kannabinoid anyagokkal való kezelést újabb 24 órás inkubáció követte. Ennek leteltével 10 perc 250g centrifugálás után 100 μl tápoldatot átmértünk egy üres plate-re. Ebben frissen készített reagenst (ún. reakcióelegy, 100 μl /lyuk) pipettáztunk az oldathoz, majd 30 perces inkubációt követően 492 nm hullámhosszúságon mértük az abszorbanciát.

A Neutral red tesztet gyakran alkalmazzák *in vitro* vizsgálatok során a citotoxicitás kvantitatív mértékének megállapítására. A Neutral red egy gyengén kationos festék, mely nemionos passzív diffúzióval penetrál a sejtmembránon és koncentráldódik a lizoszómákban, ahol elektrosztatikus hidrofób kötással kapcsolódik a mátrix anionos és/vagy foszfát-csoportjaihoz. A sejtek felvevőképességének mértéke a pH gradiens fenntartásának függvénye, mely ATP igényes folyamat (Repetto et al., 2008). A sejteket 96 lyukú plate-re kiültetve 2 órán át inkubáltuk 50 Pg/ml Neutral red tartalmú mediummal (100 Pl/lyuk). A felülszó leszívása után úgynevezett Destain solution oldat (50% etanol (96%-os), 49% ioncserélt víz, 1% jégcet) hozzáadása mellett (50 ml/lyuk) 10 percig ráztuk a microplate-et, ennek hatására a sejtekből kivontuk a festékanyagot. A Neutral red abszorbanciáját 540 nm hullámhosszúságon spektrofotométer segítségével mértük.

Az asztroglia citokin termelése lipopoliszcharidok (LPS) hatására igazolt számos tanulmány által (Molina-Holgado et al., 2002; Hutchison et al., 2013). Kísérletünk befejező szakaszában abba kívántunk betekintést nyerni, hogy az asztroglia egyes kannabinoid anyagok hatására milyen mértékben termelnek citokineket, illetve ez hogyan változik LPS indukálta gyulladás során, vagyis mennyiben befolyásolják a neuroinflammációs folyamatokat.

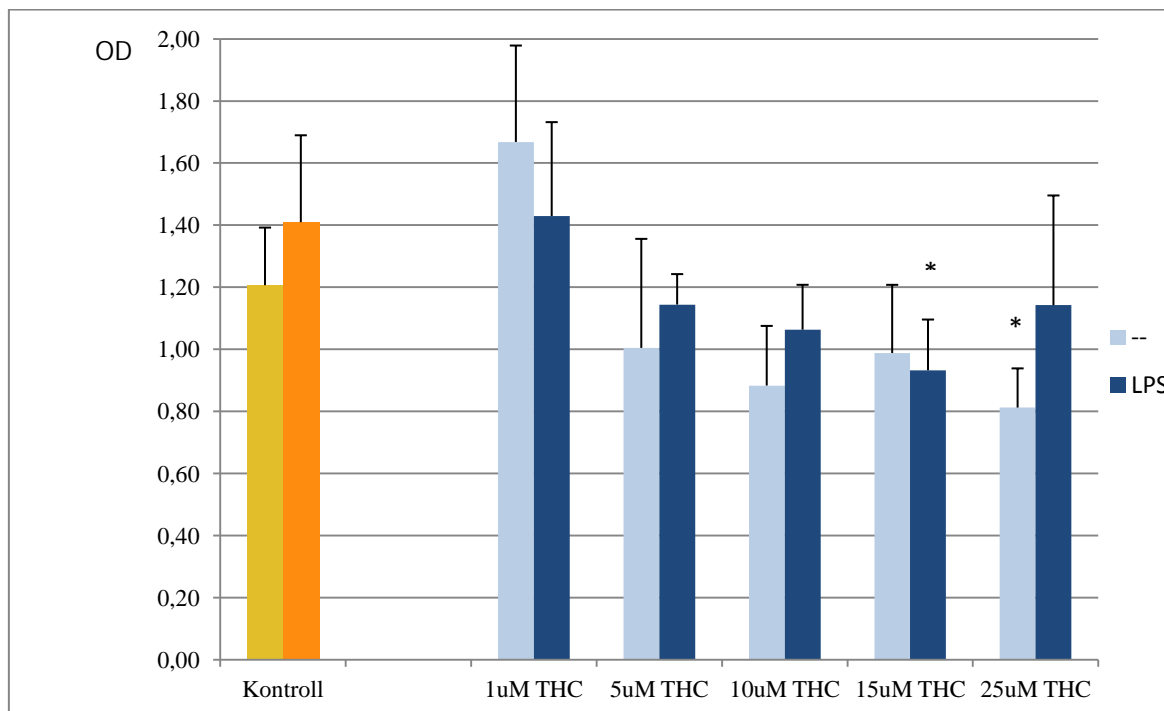
A kezelések elvégzése után az IL-6 termelődését vizsgáltuk IL-6 ELISA kit segítségével (Sigma-Aldrich), ELISA reader (Multiscan GO W/O Cuvette incl dDROP Plate) alkalmazásával. A mérés kivitelezése után az eredményt azonnal le kell olvasni 450 nm hullámhosszúságú fényben. Az IL-mérés eredményét optikai denzitásban (OD) kaptuk meg, ezt az adott interleukin ismert koncentrációjú hígítási sorának segítségével tudtuk koncentrációba átszámolni. (Isd. Eredmények).

Az eredmények kiértékelése Microsoft Excel, a szignifikancia vizsgálatok pedig a GraphPad Prism statisztikai program segítségével, egy utas ANOVA Bonferroni post-testtel történtek.

EREDMÉNYEK

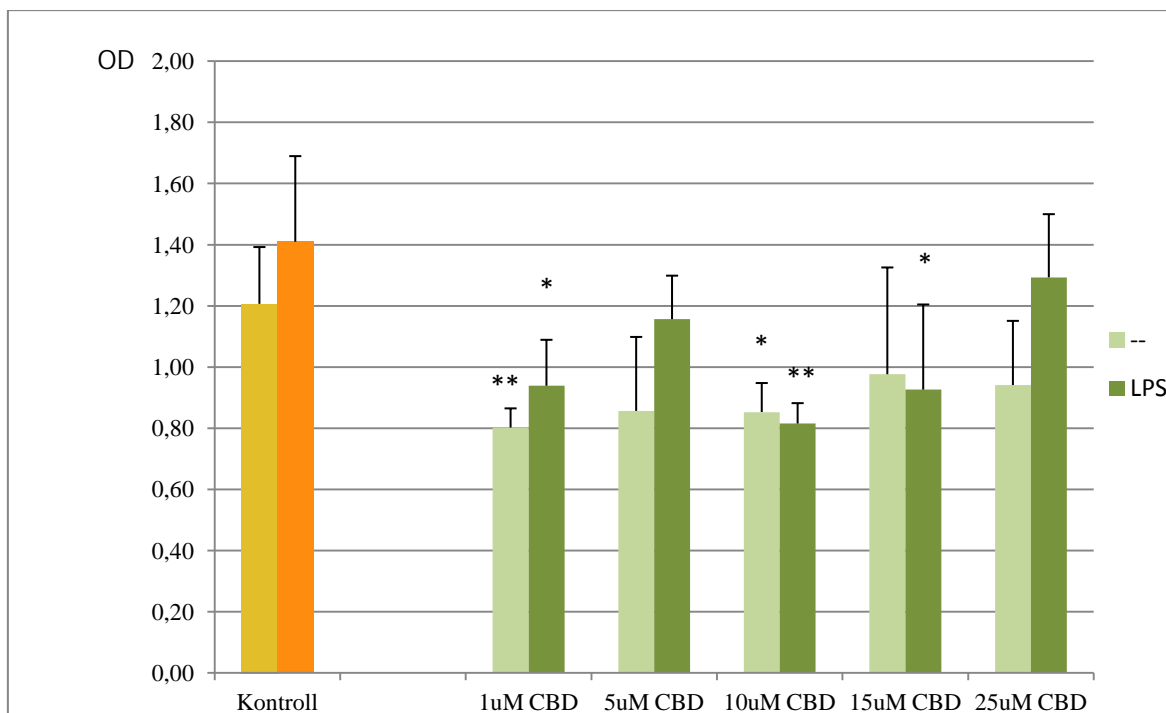
Az életképesség meghatározása laktát-dehidrogenáz kibocsátási teszt segítségével

A sejtelhalás mértékét először LDH koncentráció mérésével vizsgáltuk, mely a károsodott sejtmembrán következtében a citoplazmából kiszabadulva a felülszóban jelenik meg. Az LDH mennyiséget spektrofotométer segítségével 492 nm hullámhosszúságon határoztuk meg.



3.ábra: Asztroglia-mikroglia tenyészet életképességének vizsgálata LDH-teszt módszerrel növekvő koncentrációjú THC és 100 ng koncentrációjú LPS hatására. Az x-tengelyen a kezelések, az y-tengelyen pedig a mért abszorbancia-értékek kerültek ábrázolásra szórással. (* $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva)

Kontrollvizsgálataink alapján láthatjuk, hogy 100 ng koncentrációjú LPS növelte a sejtelhalás mértékét. Az LDH vizsgálatok során elmondható, hogy a THC kezelések a legtöbb vizsgált koncentráció esetében növelték a sejtek életképességét, 1 μ M THC kezelés hatására azonban a citotoxicitás mértéke emelkedett. A THC az LPS kezeléssel szemben a kontroll csoporthoz képest szintén fokozta a sejtek vitalitását, 15 μ M-os koncentráció szignifikáns változást eredményezett. Érdekes megjegyezni, hogy 25 μ M kizárólagos THC kezelés a sejtek életképességét szignifikánsan növelte a kontrollhoz képest, azonban LPS hatására az előző koncentrációkhoz képest csökkent a sejtprotektív szerepe.

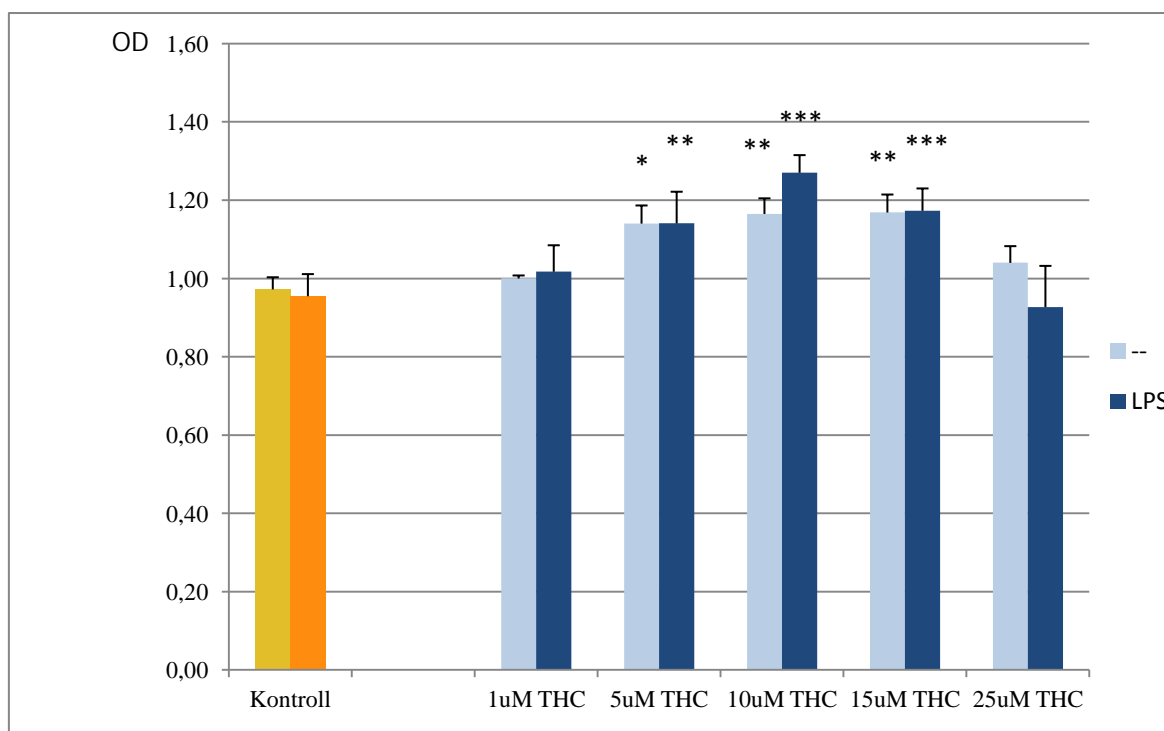


4.ábra Asztroglia-mikroglia tenyészet életképességének vizsgálata LDH-teszt módszerrel növekvő koncentrációjú CBD és 100 ng koncentrációjú LPS hatására. Az x-tengelyen a kezelések, az y-tengelyen pedig a mért abszorbancia-értékek kerültek ábrázolásra szórással. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a kontroll, valamint kontroll+LPS csoporthoz viszonyítva)

Kannabidiol kezelés eredményeként minden koncentráció csökkentette a sejtelhalás mértékét, 1 μM és 10 μM CBD kezelés szignifikáns változást eredményezett a kontrollcsoporthoz képest. LPS hatására a kannabidiol mindegyik esetben ugyancsak növelte az életképességet; 1, 10 és 15 μM hatására szignifikáns mértékben. 10 μM és 15 μM koncentráció esetében ugyan kismértékben, de megfigyelhető, hogy LPS indukció hatására a kannabidiol nagyobb sejtvédő hatást eredményezett, mint CBD kizárólagos alkalmazása esetén. A THC-hoz hasonlóan 25 μM CBD kezelés csökkent sejtvédő aktivitást eredményezett LPS hatására.

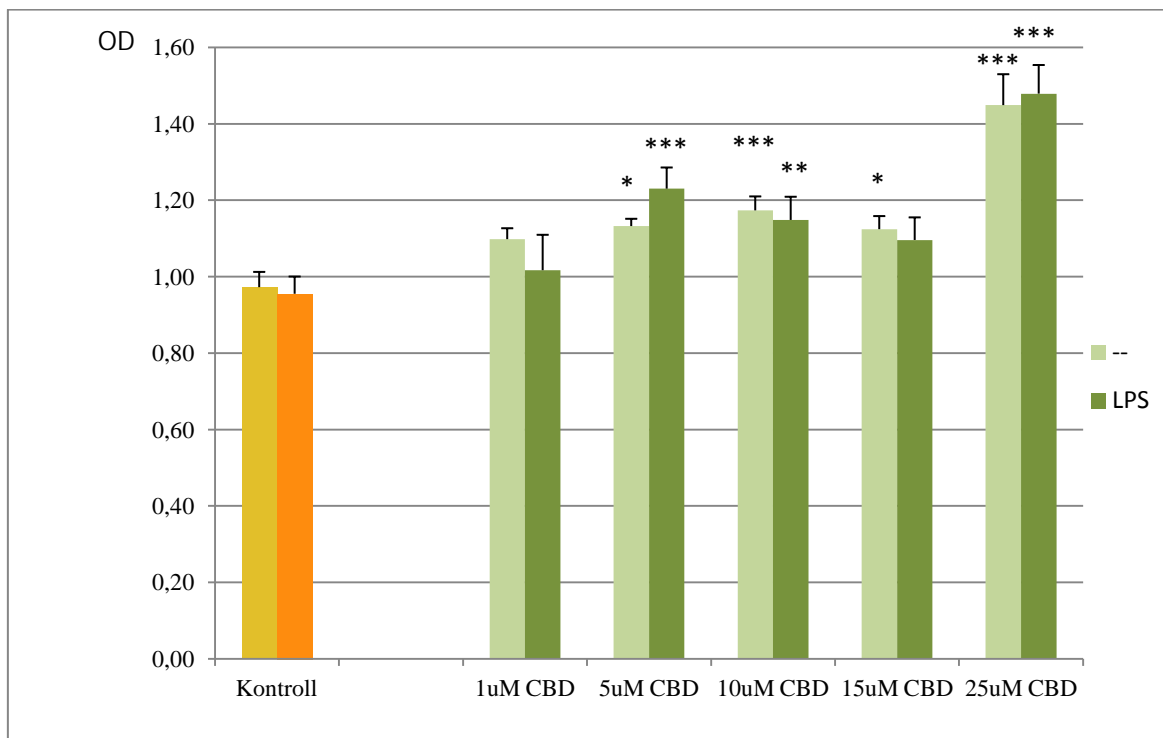
Életképesség vizsgálata Neutral red tesztel

A sejtek életképességét Neutral red festék felvételével is mértük, mely az élő sejtek lizoszómájában koncentrálódik. A felvett festékmennyiség abszorbanciáját 540 nm-en olvastuk le; a mért abszorbancia értékek és élő sejtek mennyisége lineáris összefüggésben állnak.



5.ábra: Asztroglia-mikroglia tenyészet életképességének vizsgálata Neutral red-teszt módszerrel növekvő koncentrációjú THC és 100 ng koncentrációjú LPS hatására. Az x-tengelyen a kezelések, az y-tengelyen pedig a mért abszorbancia-értékek kerültek ábrázolásra szórással. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ a kontroll, valamint kontroll+LPS csoporthoz viszonyítva)

A Neutral Red vizsgálatok kontroll mérései során 100 ng koncentrációjú LPS csupán igen kis mértékben fokozta a sejtelhalást. Továbbá azt tapasztaltuk, hogy a THC mindegyik alkalmazott koncentráció esetében növelte a sejtek életképességét, melyek közül 5, 10 és 15 μM koncentráció statisztikailag szignifikáns mértékben fokozta a vitalitást a kontrollcsoporthoz képest. Ugyanezen koncentrációk lipopoliszacharid indukció hatására is szignifikánsan növelték a sejtek életképességét, 10 μM esetében a THC javította a sejtek életképességét a kannabinoid önmagában kifejtett hatásához képest. 25 μM koncentrációjú THC azonban már nem mutatott sejtprotektív hatást LPS kezeléssel szemben.

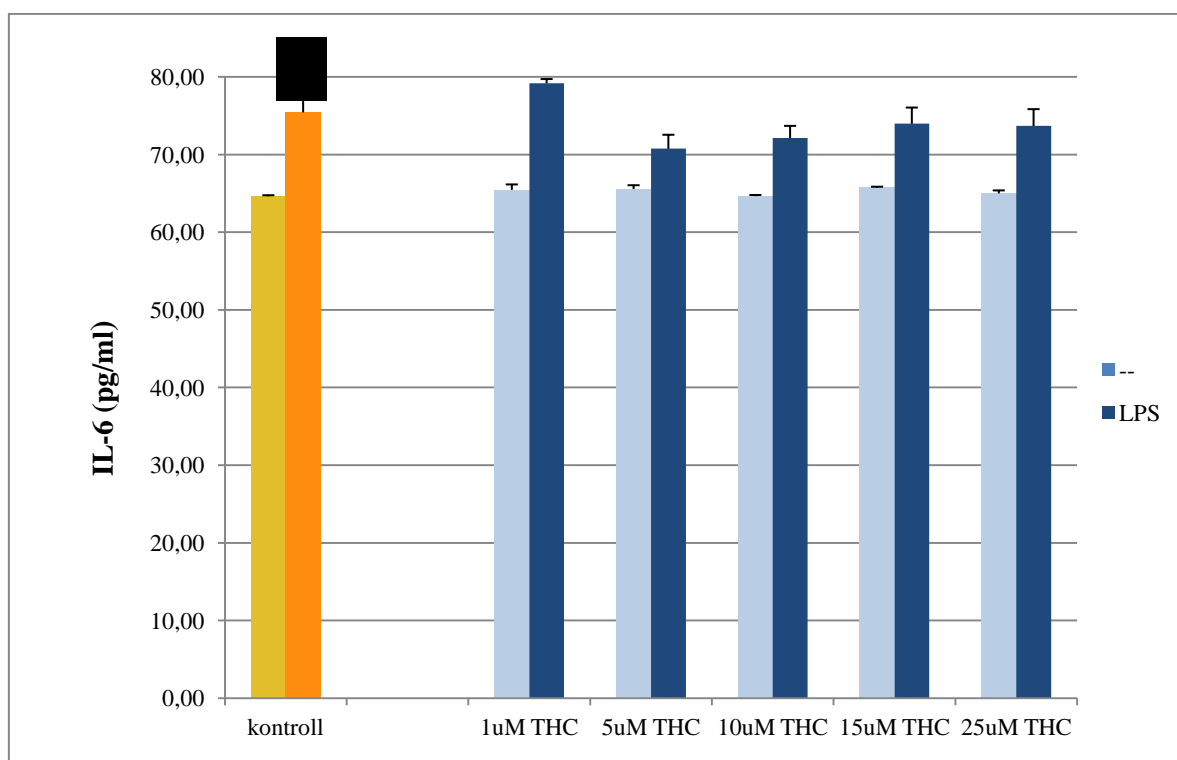


6.ábra: Asztroglia-mikroglia tenyészet életképességének vizsgálata Neutral red -teszt módszerrel növekvő koncentrációjú CBD és 100 ng koncentrációjú LPS hatására. Az x-tengelyen a kezelések, az y-tengelyen pedig a mért abszorbancia-értékek kerültek ábrázolásra szórással. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ a kontroll, valamint kontroll+LPS csoporthoz viszonyítva)

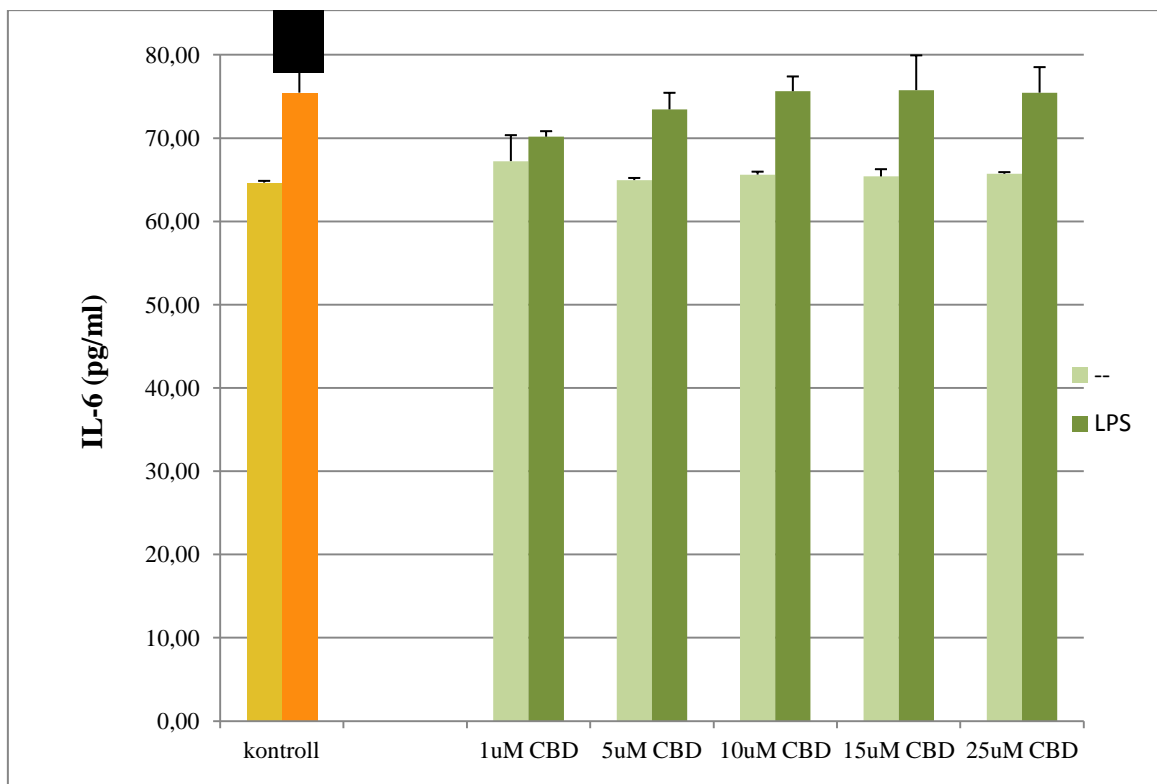
A kannabidiol a THC-hoz hasonlóan növelte a gliasejtek vitalitását. CBD esetében 5, 10, 15 és 25 μM koncentráció is szignifikáns eredményt mutatott a kontrollcsoporthoz képest. Az LPS kezelés egyik vizsgált koncentráció esetében sem fokozta a sejtelhalás mértékét számottevően; 5, 10 és 25 μM CBD a toxikus ágenssel való indukció mellett is szignifikánsan emelte a sejtek életképességét.

Asztroglia-mikroglia tenyészet interleukin-6 termelésének meghatározása

Az interleukin-méréseket ELISA reader segítségével, 450 nm-en végeztük el. Ennek során ismert koncentrációjú interleukinból egy standard hígítási sort készítettünk, majd lemértük ezeknek az oldatoknak az optikai denzitását (OD). Az ebből nyert pontdiagramra egy exponenciális görbét illesztettünk, majd az így kapott függvény egyenletének segítségével meghatároztuk, hogy az egyes minták lemért, átlagos abszorbanancia-értékei pontosan mekkora koncentráció-értékeknek felelnek meg. Az asztroglia által termelt IL-6 koncentrációkat THC, valamint THC és LPS együttes kezelés hatására a **7.ábra**, CBD, valamint CBD és LPS együttes kezelés hatására a **8.ábra** szemlélteti.



7.ábra: Asztroglia-mikroglia tenyészet IL-6 termelése növekvő koncentrációjú THC és 100ng koncentrációjú LPS hatására. Az x-tengelyen a kezelések, az y-tengelyen pedig a mért koncentráció-értékek (pg/ml) kerültek ábrázolásra szórással. (* $p < 0,05$)



8.ábra Asztroglia-mikroglia tenyészet IL-6 termelése növekvő koncentrációjú CBD és 100 ng LPS hatására. Az x-tengelyen a kezelések, az y-tengelyen pedig a mért koncentráció-értékek (pg/ml) kerültek ábrázolásra szórással.

Kísérleteink eredményeként elmondható, hogy sem a THC, sem a CBD kezelések nem befolyásolták sejtek IL-6 termelését a kontroll vizsgálatokhoz képest. A kontroll vizsgálatok során LPS hatására szignifikánsan nőtt a gliasejtek proinflammatorikus IL-6 termelése. A kannabinoid anyagok gyulladásoz körülmények közt sem eredményeztek számottevő eltérést az interleukin mennyiségben. Kismértékű változást LPS mellett mindkét esetben az 1 μ M koncentrációjú kezelés okozott, a THC fokozta, a CBD azonban csökkentette az IL-6 termelés mértékét.

MEGBESZÉLÉS

Az eredmények értékelése

Az élő szervezetekben, szövetekben érdemes figyelembe venni a sejtek sokféleségét, a működésben betöltött szerepük változatosságát és egymásra hatását. Kísérletünkben elsősorban az asztrogliák szerepét a gliasejtek jelenlétében kívántuk vizsgálni, ezért a tenyészetünket nem mentesítettük a mikrogliá „szennyezettségtől”, ezáltal a korábban megállapított, 8:1-hez arányú kokultúrát hoztunk létre (Balajthy, 2018). Ezzel a modellel közelebbi képet kaphatunk az *in vivo* kialakuló neurológiai kórképek jellemzőiről, mint a primer sejtenyészetek által.

Az idegrendszer területén fellépő különböző degeneratív betegségek patogenezisében a reaktív gliasejtek is szerepet játszanak (Rodríguez et Verkhatsky, 2011). Az aktiválódott asztrogliák befolyással bírnak a neuronok működésére és életképességére, az összhatás azonban nagymértékben függ a számos faktor végső egyensúlyától. A manapság alkalmazott alacsony dózisú kannabinoid terápiák ezen faktorok összhatását kívánják pozitív irányba befolyásolni, mely gyakran tüneti kezelést jelent, de egyes tanulmányok a neurogenesisre kifejtett jótékony hatásról is beszámoltak (Marchalant et al., 2009; Esposito et al., 2011; Suliman et al., 2018).

Kísérletünkben az életképesség-vizsgálatok során a kétféle alkalmazott módszer eredményei nem kizárólagosan egybehangzóak, bár a tendenciát és szignifikanciát tekintve is találhatunk egyezést, ezért együttes elemzésük sok használható információt szolgáltat. Növekvő koncentrációjú THC kezelés eredményeként azt tapasztaltuk, hogy LDH teszt végzésével 1 μM kivételével mindegyik koncentráció növelte a sejtek életképességét, ebből 25 μM THC szignifikáns mértékben. Ezzel szemben azonos körülmények közt a Neutral Red felvétel alapján a THC mindegyik alkalmazott koncentráció esetében fokozta a sejtek vitalitását, melyek közül 5, 10 és 15 μM koncentráció okozott szignifikáns különbséget. Az LDH teszt során 1 μM THC esetében mért kiugró adat feltehetőleg mérési hiba következménye lehet, mivel az eltérő eredményt a Neutral Red teszt sem támasztotta alá. Abban az esetben, ha a THC kezelést 30 perces LPS-sel való inkubáció előzte meg, az LDH teszt eredményeként egyedül 15 μM koncentráció, míg Neutral Red teszt esetében 5, 10 és 15 μM koncentrációban is szignifikánsan nőtt a sejtek életképessége. Ezzel ellentétben mindkét próba alapján 25 μM THC már nem képes a toxikus ágenssel szemben jelentős mértékű sejtprotektív hatást kifejteni, így ebben a koncentrációban a THC kísérleti

eredményeink alapján nem alkalmas terápiás felhasználásra, amit alátámaszt Chang és munkatársai kutatása is, miszerint 30 μM THC kezelés nagymértékű sejtkárosodást okoz (Chang et al., 2001). Az eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a THC alacsonyabb terápiás dózisban (5-15 μM végkoncentráció) képes a leghatékonyabban segíteni a gliasejtek működését, ami összhangban áll a szakirodalmi adatokkal is (Chang et al., 2001; Janefjord et al., 2014).

A kizárólagos kannabidiol kezelések során mindkét teszt eredményeként valamennyi koncentráció növelte a gliasejtek vitalitását. LDH teszt esetében 1 és 10 μM , Neutral Red vizsgálat alapján pedig az 5, 10, 15 és 25 μM koncentrációjú CBD okozott szignifikáns változást. Lipopoliszacharid hatására ezek az eredmények az alábbiak szerint alakultak: LDH teszt alapján 1, 10 és 15 μM CBD, Neutral Red teszttel pedig az 5, 10, és 25 μM CBD eredményezett szignifikáns növekedést a gliasejtek életképességében. Eredményeink összegzéséül, mely mindkét életképesség-vizsgálati módszer során szignifikánsan fokozta a sejt vitalitást: 15 μM THC kezelés gyulladás esetében, 10 μM CBD kezelés pedig natív és toxikus körülmények közt is statisztikailag jelentősen csökkentette a sejt elhalás mértékét.

Az eredményeinkben bekövetkező különbségeket okozhatja, hogy az *in vitro* tenyészetek életképességének mérésére használatos vizsgálatok más és más működési mechanizmuson alapulnak, mely befolyásolhatja a tesztek szenzitivitását. A laktát-dehidrogenáz a sejtmembrán sérülésekor a citoplazmából kijutva detektálható a felülúszóban, mely irreverzibilis sejtkárosodásra utal; míg a neutral red festék felvétele aktív lizoszóma funkcióhoz köthető. Fotakis és munkatársai patkány hepatoma-kultúrán végzett sejt vitalitás mérésére alkalmas módszerek összehasonlító vizsgálata során a Neutral Red teszt kisebb koncentrációjú toxikus ágens és rövidebb inkubációs idő hatására is jelezte a citotoxicitást, mint az LDH kibocsátási teszt (Fotakis et al., 2006). Egy másik tanulmány patkány és humán primer hepatocita tenyészet vitalitásának vizsgálatai szintén a Neutral Red teszt fokozottabb szenzitivitását igazolta az LDH teszttel szemben (Zhang et al., 1990). Saját vizsgálatainkban hasonlóképp Neutral Red méréssel több koncentráció esetében kaptunk szignifikáns eredményt kisebb szórás mellett, mely a módszer nagyobb érzékenységéből adódhat. A kannabidiol 10^{-6} M-os koncentrációtartományban egy másik, életképesség mérésére alkalmas vizsgálat, MTT (dimetil-tiazol-difenil-tetrazolium-bromid) teszt alapján ugyancsak szignifikánsan növelte patkány pheocromocytoma (PC12) sejt vonal vitalitását béta-amiloid ($\text{A}\beta$) indukcióval szemben (Iuvone et al., 2004). Janefjord és munkatársai humán neuroblastoma sejt vonalon végzett kísérleteiben hasonlóképpen mind 10 μM THC, mind 10 μM CBD szignifikánsan

növelte az életképességet az általunknál magasabb koncentrációban használt LPS kezeléssel szemben (Janefjord et al., 2014).

A két életképességi teszt eltérő működési mechanizmusának köszönhetően, jól kiegészíti egymást. A szakirodalomban egyre ritkábban fogadják el, ha csak az egyik vagy a másik tesztet alkalmazzák önállóan. Minden esetben megbízhatóbb eredményeket kapunk -amiből biztosabb következtetéseket lehet levonni-, ha ezeket a tesztek egymással vagy más életképességi tesztekkel kombináljuk (pl: MTT esszé, propidium-jodid teszt, tripánkék teszt) (Weyermann et al., 2005).

A neurodegeneratív kórképek gyakori kísérő jelensége a neuroinflammáció, ezért kísérleteink kiterjedtek a gyulladásos faktorok vizsgálatára is. Bár az agyban kialakuló gyulladásos folyamatokért elsősorban a mikroglia sejteket teszik felelőssé, az asztroglia is immunkompetens sejtek, melyek fontos szabályozószereppel rendelkeznek. Szakirodalmi adatok alapján ismert, hogy az asztroglia különböző stimulusok, úgymint A β (Esposito et al., 2011), LPS (van Neerven et al., 2010; Hutchison et al., 2013), H₂O₂ (Souza et al., 2013), IL-1 β (Sharma et al., 2007) hatására képesek citokinek és kemokinek termelésére. Bár a tanszéken korábban végzett kísérletek során 100 ng és 1000 ng-os koncentrációjú LPS stimulus sem okozott szignifikáns IL-6 termelést primer asztroglia tenyészetben (Fetter, 2017), asztroglia-mikroglia kokultúrákon 100 ng-os koncentrációjú LPS stimulus szignifikáns változást eredményezett kontroll vizsgálataink során. Kísérleteink további eredményeként elmondható, hogy sem a THC, sem a CBD kezelések nem befolyásolták sejtek IL-6 termelését a kontroll csoporthoz képest, valamint a kannabinoid anyagok gyulladásos körülmények közt sem eredményeztek számottevő eltérést az interleukin mennyiségben. Ezzel ellentétben, Chang és munkatársai, bár nagyobb koncentrációjú LPS hatására, 1 és 10 μ M THC esetében is szignifikáns IL-6 csökkenést tapasztaltak egér makrofág sejtenyészetben (Chang et al., 2001). Theiler-féle egér encephalomyelitis vírussal (TMEV) fertőzött asztroglia kultúra esetében, mely a patológiás demielinizáció miatt sclerosis multiplex modellezésére szolgál, az endogén anandamid 10 és 25 μ M koncentrációban alkalmazva szignifikánsan növelte a gliasejtek proinflammatorikus IL-6 termelését (Molina-Holgado et al., 1998). A WIN55,212, amely egy szintetikus kannabinoid agonista, 10⁻⁶ M-os koncentrációtartományban *in vitro* és profilaxisként alkalmazva *in vivo* körülmények közt is szignifikánsan csökkentette az IL-6 termelődést akut pancreatitis modelljében (Petrella et al., 2010).

A szakirodalomban található adatok sem mutatnak konzekvens, egységes képet, amit a mi eredményeink tovább árnyalnak. Az általunk használt modellen az egyik alkalmazott

kannabinoid koncentráció esetében sem tapasztaltunk jelentős változást az interleukin termelésben, melynek több oka is lehet. A kannabinoid molekulák inflammációban betöltött szerepének pontosabb megértésére további vizsgálatok elvégzésére lesz szükség. Célszerű lehet asztroglia és mikroglia sejtek primer tenyészeinek vizsgálata is hasonló körülmények közt, valamint hosszabb inkubációs idejű, illetve nagyobb koncentrációjú lipopoliszacharid indukció hatásának vizsgálata és az eredmények összevetése. Kísérleteink jelen állása szerint egyetlen interleukin vizsgálatára nyílt lehetőség, azonban az eltérő stimulusok hatására termelődött pro- és antiinflammatorikus citokinek, kemokinek széles választéka (pl.: IL-1 β , IL-2, IL-10, INF β , TNF α) további vizsgálatokat tervezését és elvégzését vetítik elő, így távlati céljaink közé tartozik egyéb interleukinok tanulmányozása.

Alzheimer-kór, valamint Parkinson-kór *in vivo* modelljében a kannabinoidok ezen anyagok termelődésére is jelentős hatással bírtak, továbbá antioxidánsként csökkentették a kórképekben fellépő oxidatív stressz mértékét (Javed et al., 2016; López et al., 2018). Ezen adatok alapján, illetve ismert az aktivált asztroglia sejtek ártalmas reaktív oxigéngyökök kibocsátása is (Block et al., 2007; Cassina et al., 2008), indokolt lehet az általunk használt modell ROS, illetve tumor nekrosis faktor termelődésének vizsgálata növekvő koncentrációjú kannabinoid kezelés hatására.

A fent említett neurodegeneratív kórképek kialakulásában, csakúgy, mint a fízioiogiás agyműködés során, a gliasejtek összetett szerepet játszanak. Parkinson-kór kezdeti szakaszán, mikor még klinikai tünetek semmilyen formában nem jelentkeznek, az asztroglia felveszik a dopaminerg neuronokból kiszabadult, kóros szerkezetű α -synuclein fehérjét, melyek intracellularisan aggregátumokat képeznek (Lee et al., 2010). Ezek az aggregátumok diszfunkciót okoznak a sejt működésben, felborítva az agy homeosztázisát, valamint a proinflammatorikus citokinek és egyéb gyulladásos mediátorok (pl.: INF- γ , TNF- α) termelését fokozzák, aktiválva ezzel a többi asztro-, és mikroglia sejtet (Barcia et al., 2012). Az aggregátumok indukálta gliális reakció a neuronok nem sejt-autonóm pusztulásához vezet, mely gyors, progresszív paralízisben nyilvánul meg (Gu et al., 2010). Az Alzheimer-kór patogenezisében az előbbihez hasonlóan, különböző anyagok kóros felhalmozódása játszik szerepet; intracellularisan neurofibrilláris tau fehérjék, az extracellularis térben béta-amiloid fehérjék szaporodnak fel (Gauthier et al., 2010), melynek modellezésére szolgál a különböző A β indukált gyulladásos vizsgálatok. *In vitro* és *ex vivo* tanulmányok is igazolták, hogy az asztroglia képesek felvenni ezeket az amiloidokat, és intracellularisan aggregátumként felhalmozzák azokat (Wyss-Coray et al.,

2003; Koistinaho et al., 2004). Ezek az aggregátumok felborítják a normál asztroglia funkciót; zavart szenved a kalcium homeosztázis, az asztroglia közötti gap junction-k szerkezete és ezáltal az egymás közti kommunikáció (Nagy et al., 1996; Mei et al., 2010). A megnövekedett immunoreaktivitás a connexin fehérjékkel szemben a szerkezeti eltéréseken túl ATP és glutamát túlzott kibocsátását eredményezi, mely toxikus a neuronok számára és csökkenti az életképességet (Orellana et al., 2011). Összességében neurodegeneratív betegségek patológiájában a gliasejtek elvesztik a normál homeosztatikus funkciójukat és ezzel egyidejűleg toxikus folyamatok sorát indítják meg, neuronális sejtelhalást okozva.

Kutatásunk eredményeire alapozva a kannabinoidok gyulladáshoz való szerepéről döntő következtetést nem tudunk levonni, azonban a neuroprotektív és vitalitást növelő tulajdonságai alapján kedvező hatást jelenthet a fent említett neurodegeneratív betegségek kezelésében. Kísérletünkben más tanulmányokkal összevetve hasonló koncentrációjú kannabinoid kezelések esetében kaptunk szignifikáns eredményeket (ld. 26. oldal). Ezek alapján 10 μ M CBD alkalmas lehet terápiás célú felhasználásra, melynek további előnye, hogy a szintén hasonló dózisban hatásosnak bizonyuló THC-val szemben nem okoz pszichotrópikus mellékhatásokat. A neuronok és gliasejtek életképességének növelése ezen gyógyíthatatlan kórképek kezelésében kulcsfontosságú része a terápiának, hiszen az idegrendszer ellenállóképessége javulhat a toxikus hatásokkal szemben, ezzel lassítva a betegség progresszióját.

Konklúzió

Kísérleteink eredményei arra engednek következtetni, hogy a vizsgált kannabinoid vegyületek neuroprotektív hatásához a gliasejtek is hozzájárulnak. Ennek alapján, alacsony dózisban történő alkalmazásuk során megfelelően hatékonyak lehetnek egyes neuroinflammációs, illetve neurodegeneratív kórképek terápiájának részeként sejt vitalitást fokozó tulajdonságuk révén. Fontos megemlíteni azonban, hogy az ilyen, orvosi terápiás célra gyártott kannabisz készítmények rendszeres, hosszú távú alkalmazásának lehetséges mellékhatásairól és szövődményeiről kevés tudományos adat áll rendelkezésre biztonságos használatukhoz.

Az idegrendszert érintő megbetegedésekben sejt vitalitás növelése mellett a gyulladáshoz való folyamatok terápiás vonatkozása is aktualitás az orvosi kannabinoidok használatában.

Eredményeink alapján a kannabidiol és tetrahidrokannabinol egyik vizsgált koncentrációban sem befolyásolja a gliasejtek proinflammatorikus IL-6 termelését. Kísérletünkben egyetlen citokin vizsgálatára nyílt lehetőség, ezért a kannabinoidok neuroinflammációban betöltött szerepének pontosabb megismeréséhez további gyulladásos markerek (pl: egyéb interleukinok, interferon, tumor nekrosis faktor) vizsgálata indokolt.

ÖSSZEFOGLALÁS

A gyógyítás történelmében a *Cannabis sativa* egyike a legrégebben használt növényeknek. Napjainkban ismét kiemelt szerephez jutottak a különböző kannabinoid hatóanyagú orvosi készítmények, melyek használata egyre több országban engedélyezett. A terápiás célok közt olyan gyógyíthatatlan neurodegeneratív betegségek is szerepelnek, mint az Alzheimer-kór, Huntington-kór vagy a sclerosis multiplex. A neurodegeneratív kórképek gyakori kísérő jelensége a neuroinflammáció, valamint az idegrendszer sejtjeinek csökkent életképessége. Az agy homeosztázisának fenntartásáért főként a gliasejtek felelősek, melyek a gyulladásos folyamatokban is fontos szerepet játszanak.

Munkánk során asztroglia-mikroglia (8:1 arányban) kokultúrán vizsgáltuk különböző koncentrációjú kannabinoidok önállóan, valamint lipopoliszacharid (LPS) indukálta gyulladás mellett a sejtek életképességére és IL-6 termelésére kifejtett hatásait.

Kísérleteinkhez szükséges volt egy megfelelően alkalmazható *in vitro* modell létrehozása, ehhez 1-2 napos korú Sprague-Dawley patkányok agyszövetét használtuk föl. A patkány asztroglia-mikroglia konfluens tenyészet létrehozását követően, kannabidiol (CBD) és tetrahidrokannabinol (THC), irodalmi adatok alapján beállított növekvő dózisaival kezeltük a sejt kultúrákat, illetve ugyanezen koncentrációk hatásainak változását vizsgáltuk LPS hozzáadása mellett. Mindegyik kezelési csoport esetében a sejtek életképességét Neutral Red felvétel és laktát-dehidrogenáz kibocsátási teszt, a bekövetkező IL-6 termelést pedig ELISA módszer segítségével mértük.

Eredményeink azt mutatták, hogy a THC és CBD vizsgált koncentrációi növelték a gliasejtek életképességét mind természetes, mind gyulladásos körülmények közt. A koncentrációk közül 15 μ M THC kezelés gyulladás során, 10 μ M CBD kezelés pedig mindkét esetben szignifikáns változást eredményezett a sejtek vitalitásában. Gyulladásos vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy LPS hatására szignifikánsan nőtt az asztroglia IL-6 termelése, azonban a kannabinoidok nem befolyásolták jelentősen a sejtek citokin termelő képességét.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a vizsgált kannabinoid vegyületek neuroprotektív hatásához a gliasejtek is hozzájárulnak, így megfelelően hatékonyak lehetnek egyes neurodegeneratív kórképekben. A kannabinoidok neuroinflammációban betöltött szerepének pontosabb megismeréséhez további gyulladásos markerek (pl: egyéb interleukinok, interferon, tumor nekrosis faktor) vizsgálata indokolt.

SUMMARY

In the history of medicine, *Cannabis sativa* was one of the oldest herbs used by mankind. Nowadays, the medicinal products containing Cannabis are becoming more and more popular, and it can be legally purchased in many countries with (or without) a prescription. The target illnesses for this medical treatment are incurable neurodegenerative diseases such as Alzheimer's Disease, Huntington's disease and Multiple Sclerosis. Neurodegenerative diseases are usually followed by neuroinflammation and also by the decreased vitality of the neurons. The glial cells are responsible for maintaining the homeostasis of the brain and they also play a key role in many inflammatory reactions.

In our research, we studied the effect of cannabinoid compounds in different concentrations on astrocyte-microglia co-cultures (8:1 ratio) prepared from a 1-2 days old Sprague-Dawley rat brain tissue. We tested the cell viability and IL-6 production of the culture with and without inducing inflammation using lipopolysaccharide (LPS).

In our *in vitro* model, we treated the cell cultures with different concentrations of cannabidiol (CBD) and tetrahydrocannabinol (THC). We also studied the different effects of the same concentrations after inducing inflammation with LPS. The cell viability was tested by Neutral Red and lactate-dehydrogenase assays, while IL-6 production was measured by a commercially available ELISA kit.

The results showed that the different concentrations of the THC and CBD increased the vitality of glial cells both with and without inducing inflammation with LPS. Out of all tested concentrations the 15 μ M THC (in presence of LPS), and the 10 μ M CBD (both in presence and absence of LPS) significantly increased the cell vitality. The LPS treated cultures showed a significant growth in the IL-6 production, however the neither of the cannabinoid compounds could influence the production of this cytokin.

The final results showed that neuroprotective effects of cannabionid compounds are (at least partially) mediated by glial cells, therefore they might be effective in some neurodegenerative diseases. To gain more information on the effect of cannabinoids in neuroinflammation, further experiments are required with different kind of inflammatory markers, such as other interleukins, interferon and tumor necrosis factor.

IRODALOMJEGYZÉK

- Allan SM, Rothwell NJ (2003) Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 358:1669-77.
- Anday JK, Mercier RW (2005) Gene ancestry of the cannabinoid receptor family. *Pharmacol Res.* 52:463-6
- Balajthy, B. (2018). Az asztroglia tumor nekrosis faktor (TNF)- α termelésének vizsgálata hepaticus encephalopathia (HE) in vitro körülményei között. Szakdolgozat. Budapest, Állatorvostudományi Egyetem Élettani és Biokémiai Tanszék.
- Barcia C, Ros CM, Annese V, Gomez A, Ros-Bernal F, Aguado-Llera D, Martínez-Pagan ME, De Pablos V, Fernandez-Villalba E, Herrero MT (2012) Erratum: IFN- γ signaling, with the synergistic contribution of TNF- α , mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of Parkinson's disease (Cell Death and Disease (2011) 2 (e142) 10.1038/cddis.2011.17). *Cell Death Dis.*
- Bélanger M, Magistretti P (2009) The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin Neurosci* 11:281–296.
- Belluomo I, Matias I, Pernègre C, Marsicano G, Chaouloff F (2015) Opposite control of frontocortical 2-arachidonoylglycerol turnover rate by cannabinoid type-1 receptors located on glutamatergic neurons and on astrocytes. *J Neurochem.* 133:26-37
- Block ML, Zecca L, Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 8:57-69
- Bosier B, Bellocchio L, Metna-Laurent M, Soria-Gomez E, Matias I, Hebert-Chatelain E, Cannich A, Maitre M, Leste-Lasserre T, Cardinal P, Mendizabal-Zubiaga J, Canduela MJ, Reguero L, Hermans E, Grandes P, Cota D, Marsicano G (2013) Astroglial CB 1 cannabinoid receptors regulate leptin signaling in mouse brain astrocytes. *Mol Metab.* 2:393-404
- Cassina P, Cassina A, Pehar M, Castellanos R, Gandelman M, De León A, Robinson KM, Mason RP, Beckman JS, Barbeito L, Radi R (2008) Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: Prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *J Neurosci.* 28:4115-22
- Chang YH, Lee ST, Lin WW (2001) Effects of cannabinoids on LPS-stimulated inflammatory mediator release from macrophages: Involvement of eicosanoids. *J Cell Biochem.* 81:715-23
- Devane WA, Hanuš L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 258:1946-9 .
- Esposito G, Scuderi C, Valenza M, Togni GI, Latina V, de Filippis D, Cipriano M, Carratù MR, Iuvone T, Steardo L (2011) Cannabidiol reduces A β -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR γ involvement. *PLoS One* 6. 6:e28668
- Farina C, Aloisi F, Meinl E (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 28:138-45
- Fetter, V. (2017). Az asztroglia sejtek neuroinflammációs szerepének vizsgálata hepaticus encephalopathia során. Szakdolgozat. Budapest, Állatorvostudományi Egyetem Élettani és Biokémiai Tanszék.
- Fezza F, Bisogno T, Minassi A, Appendino G, Mechoulam R, Di Marzo V (2002) Nolethanolamide, a putative novel endocannabinoid: Inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues. *FEBS Lett.* 513: 294-298
- Fotakis G, Timbrell JA (2006) In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *160:171–177.*

- Gaoni Y, Mechoulam R (1964) Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc.* 86:1646-1647
- Garrett ER, Hunt CA (1974) Physicochemical properties, solubility, and protein binding of Δ^9 tetrahydrocannabinol. *J Pharm Sci* 63:1056–1064.
- Gauthier S, Cummings J, Ballard C, Brodaty H, Grossberg G, Robert P, Lyketsos C (2010) Management of behavioral problems in Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatrics.* 22:346-72
- Gonsiorek W, Lunn C, Fan X, Narula S, Lundell D, Hipkin RW (2000) Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: Antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol.* 57:1045-50
- Grotenhermen F (2003) Grotenhermen F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokinet* 42: 327-360. *Clin Pharmacokinet* 42:327–360.
- Gu XL, Long CX, Sun L, Xie C, Lin X, Cai H (2010) Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T α -synuclein causes neurodegeneration in mice. *Mol Brain.* 3: 12.
- Howlett a C, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane W a, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002) Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54:161–202.
- Hunt CA, Jones RT (1980) Tolerance and disposition of of tetrahydrocannabinol in man. *J Pharmacol Exp Ther.* 215:35-44
- Hutchison ER, Kawamoto EM, Taub DD, Lal A, Abdelmohsen K, Zhang Y, Wood WH, Lehrmann E, Camandola S, Becker KG, Gorospe M, Mattson MP (2013) Evidence for miR-181 involvement in neuroinflammatory responses of astrocytes. *Glia.* 61:1018-28
- Iuvone T, Esposito G, Esposito R, Santamaria R, Di Rosa M, Izzo AA (2004) Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on β -amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem.* 89:134-41
- Jan TR, Farraj AK, Harkema JR, Kaminski NE (2003) Attenuation of the ovalbumin-induced allergic airway response by cannabinoid treatment in A/J mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 188:24–35
- Janeřfjord E, Mååg JL V, Harvey BS, Smid SD (2014) Cannabinoid effects on β amyloid fibril and aggregate formation, neuronal and microglial-activated neurotoxicity in vitro. *Cell Mol Neurobiol.* 34:31-42
- Javed H, Azimullah S, Haque ME, Ojha SK (2016) Cannabinoid type 2 (CB2) receptors activation protects against oxidative stress and neuroinflammation associated dopaminergic neurodegeneration in rotenone model of parkinson's disease. *Front Neurosci* 10:1–14.
- John GR, Lee SC, Brosnan CF (2003) Cytokines: Powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist.* 9:10-22
- Katona I, Sperl gh B, S k A, K falvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF (1999) Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci.* 19:4544-58
- Katona I, Urb n GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF (2006) Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci.* 26:5628-37
- Klein TW, Lane B, Newton CA, Friedman H (2000) The cannabinoid system and cytokine network (44546). *Exp Biol Med.* 225:1-8
- Koistinaho M, Lin S, Wu X, Esterman M, Koger D, Hanson J, Higgs R, Liu F, Malkani S, Bales KR, Paul SM (2004) Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid- β peptides. *Nat Med.* 10:719-26

- Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD (2018) Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2018. 465-68
- Lee HJ, Suk JE, Patrick C, Bae EJ, Cho JH, Rho S, Hwang D, Masliah E, Lee SJ (2010) Direct transfer of α -synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *J Biol Chem*. 285:9262-72
- López A, Aparicio N, Pazos MR, Grande MT, Barreda-Manso MA, Benito-Cuesta I, Vázquez C, Amores M, Ruiz-Pérez G, García-García E, Beatka M, Tolón RM, Dittel BN, Hillard CJ, Romero J (2018) Cannabinoid CB 2 receptors in the mouse brain: Relevance for Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 15:1–11.
- Lu HC, MacKie K (2016) An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biol Psychiatry* 79:516–525.
- Luk T, Jin W, Zvonok A, Lu D, Lin XZ, Chavkin C, Makriyannis A, Mackie K (2004) Identification of a potent and highly efficacious, yet slowly desensitizing CB1 cannabinoid receptor agonist. *Br J Pharmacol*. 142:495-500
- Mackie K (2005) Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol*. 168:299-325
- Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, Malik AS, Andreanos E, Mechoulam R, Feldmann M (2000) The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritis therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:9561-6
- Marchalant Y, Brothers HM, Wenk GL (2009) Cannabinoid agonist WIN-55,212-2 partially restores neurogenesis in the aged rat brain. *Mol Psychiatry*. 14:1068-9
- Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN (2005) Modulation of the cannabinoid CB 2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem*. 95:437-45
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 346:561-4
- McGrath S, Bartner LR, Rao S, Packer RA, Gustafson DL (2019) Randomized blinded controlled clinical trial to assess the effect of oral cannabidiol administration in addition to conventional antiepileptic treatment on seizure frequency in dogs with intractable idiopathic epilepsy. *J Am Vet Med Assoc*. 254:1301-1308
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 50:83-9
- Mechoulam R, Hanuš L (2002) Cannabidiol: An overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: Chemical aspects. In: *Chemistry and Physics of Lipids*. 121:35-43
- Mei X, Ezan P, Giaume C, Koulakoff A (2010) Astroglial connexin immunoreactivity is specifically altered at β -amyloid plaques in β -amyloid precursor protein/presenilin1 mice. *Neuroscience*. 171:92-105
- Molina-Holgado F, Molina-Holgado E, Guaza C (1998) The endogenous cannabinoid anandamide potentiates interleukin-6 production by astrocytes infected with Theiler's murine encephalomyelitis virus by a receptor-mediated pathway. *FEBS Lett*. 433:139-42
- Molina-Holgado F, Molina-Holgado E, Guaza C, Rothwell NJ (2002) Role of CB1 and CB2 receptors in the inhibitory effects of cannabinoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release in astrocyte cultures. *J Neurosci Res*. 67:829-36
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 365:61-5

- Nagy JI, Li W, Hertzberg EL, Marotta CA (1996) Elevated connexin43 immunoreactivity at sites of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 717:173-8
- Navarrete M, Araque A (2008) Endocannabinoids Mediate Neuron-Astrocyte Communication. *Neuron.* 57:883-93
- Orellana JA, Froger N, Ezan P, Jiang JX, Bennett MVL, Naus CC, Giaume C, Sáez JC (2011) ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *J Neurochem.* 118:826-40
- Pacher P, Bátkai S, Kunos G (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 58:389-462
- Pacula RL, Smart R (2017) Medical Marijuana and Marijuana Legalization. *Annu Rev Clin Psychol* 13:397–419.
- Perez-Reyes M, Wall ME (1982) Presence of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Human Milk. *N Engl J Med.* 307:819-20
- Pertwee RG (1999) Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem.* 6:635-64
- Petrella C, Agostini S, Alema' GS, Casolini P, Carpino F, Giuli C, Improta G, Linari G, Petrozza V, Broccardo M (2010) Cannabinoid agonist WIN55,212 in vitro inhibits interleukin-6 (IL-6) and monocyte chemo-attractant protein-1 (MCP-1) release by rat pancreatic acini and in vivo induces dual effects on the course of acute pancreatitis. *Neurogastroenterol Motil.* 22:1248-56
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 301:1020-4
- Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. *Nat Protoc* 3:1125–1131.
- Rodríguez JJ, Verkhratsky A (2011) Neuroglial roots of neurodegenerative diseases? *Mol Neurobiol.* 43:87-96
- Sharma V, Mishra M, Ghosh S, Tewari R, Basu A, Seth P, Sen E (2007) Modulation of interleukin-1 β mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: Implications in neuroprotection. *Brain Res Bull.* 73:55-63
- Sofroniew M V. (2005) Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist.* 11:400-7
- Souza DG, Bellaver B, Souza DO, Quincozes-Santos A (2013) Characterization of Adult Rat Astrocyte Cultures. *PLoS One.* 8:e60282.
- Stella N (2010) Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia.* 8:1017-30
- Suliman NA, Taib CNM, Moklas MAM, Basir R (2018) Delta-9-Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) Induce Neurogenesis and Improve Cognitive Performances of Male Sprague Dawley Rats. *Neurotox Res.* 33:402-411
- Urquhart P, Nicolaou A, Woodward DF (2015) Endocannabinoids and their oxygenation by cyclo-oxygenases, lipoxygenases and other oxygenases. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 1851:366-76
- van Neerven S, Nemes A, Imholz P, Regen T, Denecke B, Johann S, Beyer C, Hanisch UK, Mey J (2010) Inflammatory cytokine release of astrocytes in vitro is reduced by all-trans retinoic acid. *J Neuroimmunol.* 229:169-79
- Wall ME, Sadler BM, Brine D, Taylor H, Perez-Reyes M (1983) Metabolism, disposition, and kinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in men and women. *Clin Pharmacol Ther.* 34:352-63.
- Watanabe K, Matsunaga T, Yamamoto I, Funae Y, Yoshimura H (1995) Involvement of CYP2C in

the Metabolism of Cannabinoids by Human Hepatic Microsomes from an Old Woman. Biol Pharm Bull. 18:1138-41

Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A (2005) A practical note on the use of cytotoxicity assays. Int J Pharm. 288:369-76

Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J (2003) Adult mouse astrocytes degrade amyloid- β in vitro and in situ. Nat Med. 9:453-7

Zhang SZ, Lipsky MM, Trump BF, Hsu IC (1990) Neutral red (NR) assay for cell viability and xenobiotic-induced cytotoxicity in primary cultures of human and rat hepatocytes. Cell Biol Toxicol. 6:219-34

ÁBRA -ÉS KÉPJEGYZÉK

URL₁: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Map-of-world-medical-cannabis-laws.svg>

URL₂: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2-AG.png>

URL₃: <https://hu.wikipedia.org/wiki/F%C3%A1jl:Anandamide.svg>

2.ábra: Ohno Shosaku és mtsai : Induction et expression of eCB-LTD című ábráját feldolgozva, saját ábra

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek: **Dr. Tóth Istvánnak** a rengeteg közös munkáért és a statisztikai értékelésért, továbbá, hogy mindig kész volt segíteni nekem, ha elakadtam dolgozatom készítése során; és **Dr. Jócsák Gergelynek** a kérdéseimre adott készséges válaszáért.

Köszönöm Dr. Kiss Dávid Sándornak, hogy tudásával és tapasztalataival hozzájárult TDK munkám elkészítéséhez, valamint Dr. Bárány Zoltánnak, az asztrogliakultúra létrehozásához és fenntartásához kapcsolódó protokollokban nyújtott segítségével. Szintén köszönetet szeretnék mondani Kinálné Szikora Zsuzsannának és Ósz Zsófiának, hogy idejüket nem sajnálva hozzáértő munkájukkal gördülékennyé tették a laboratóriumi munkák előkészületeit és elvégzését.

Végül hálával tartozom családomnak és barátomnak, hogy türelmesen mellettem álltak és támogattak a dolgozat elkészítésének ideje alatt.

A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap (ESZA) társfinanszírozásával valósult meg (a támogatási szerződés száma: AZ EFOP-3.6.2-16-2017-00008, címe: „A neuroinflammáció vizsgálata a neurodegeneratív folyamatokban: a molekulától a betegéig”).

4. melléklet

Alulírott DR. TÓTH ISTVÁN..... Igazolom, hogy
ALFÖLDI REGINA MÁRIA..... (a hallgató neve)

KANNABINOID VESZÜLETEK ASZTRO-ÉS MIKROGLIÁRA KIFEJTETT HATÁVA NEURONINFLAMMÁCIÓS ÉS
NEURODEGENERATÍV KÖRKÉPEKBEN
című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2019. 11. 22.

DR. TÓTH ISTVÁN Tóth IT.....

a témavezető neve és aláírása

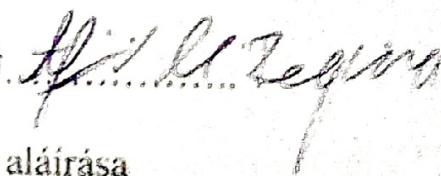
ÉLETTANI ÉS BIOKÉMIAI TANSZÉK.....

.....
tanszék

NYILATKOZAT

Alulírott ALFÖLDI REGINA MÁRIA..... nyilatkozom, hogy szakdolgozatom,
melynek címe KAMNARINOID VEGYÜLETEK ASZTMO- ÉS MIKROBICIDRA KIFEJTETT HATÁSA
NEUROINFLAMMÁCIÓS ÉS NEURODEGENERATÍV KÖRKÉPEKBEN.....
tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2012.
évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 201. 9. 11. 22......

ALFÖLDI REGINA MÁRIA 
a hallgató neve és aláírása

HuVetA
ELJÁRÁSZÁSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT

Név: Alföldi Regina Maria

Elérhetőség (e-mail cím): reginaalfoldi@gmail.com

A feltöltendő mű címe: Kamalimond végül meggyőző és mikroszkóp képeken
neuroinflammáció és neurodegeneratív kórképekben

A mű megjelenési adatai: 2019. évi Tudományos Diákközi Konferencia

Az átadott fájlok száma: 1

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerző jogát képviselő személy kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolatban PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyeztesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyag rész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (együttlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel):



engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón.



az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózata (IP címekre) korlátozza a fentől
dokumentum(ok) elérését,



a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a fentől
dokumentum(ok) elérését,



csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának felhívásához van
hozzá (korlátlan hozzáféréssel).

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvadását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörő módon visszaélne.

Budapest, 2019. október 22.

aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archivum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Huthra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*