

Cannabis sativa

EFFETTI DI UN ESTRATTO STANDARDIZZATO DI CANNABIS SATIVA L. SULLA RISPOSTA INFIAMMATORIA CENTRALE E PERIFERICA

Cannabis sativa è una pianta che suscita un grande interesse per le sue proprietà farmacologiche, sempre più oggetto di studi scientifici, ma anche molte polemiche per la recente “liberalizzazione” della coltivazione di piante prive di THC, il principio attivo psicoattivo, e la conseguente vendita dei prodotti ottenuti da esse. Nel lavoro che presentiamo sono evidenziate le proprietà antinfiammatorie del fitocomplesso di un estratto di infiorescenze femminili di questo tipo di Cannabis.

* **Vittoria Borgonetti**

Recentemente l'interesse verso il sistema endocannabinoidale e il suo coinvolgimento nella regolazione di svariate funzioni fisiologiche è in netta crescita nel mondo scientifico [1]. Infatti, la modulazione dei recettori dei cannabinoidi

(CB_r) comporta l'attivazione di numerose *pathways* intracellulari, coinvolte nell'innescare di stati fisiopatologici, tra i quali emergono sicuramente infiammazione, neurodegenerazione e stress ossidativo [2].

I CB_r sono recettori accoppiati a proteine G α e si classificano in due sottoclassi: i CB₁, presenti prevalentemente a livello neuronale [3], e i CB₂, abbondantemente espressi nelle cellule del sistema immunitario sia a livel-

lo centrale che periferico. I CB₁ sono responsabili del mantenimento della normale funzionalità neuronale e prevengono fenomeni di eccitotossicità, mentre i CB₂ sono considerati modulatori della risposta immunitaria e vengono sovra-espressi in caso di infiammazione [4].

L'interesse verso il fitocomplesso di *Cannabis sativa* L. e i suoi principali componenti è sicuramente cresciuto nel campo farmacologico e delle piante medi-

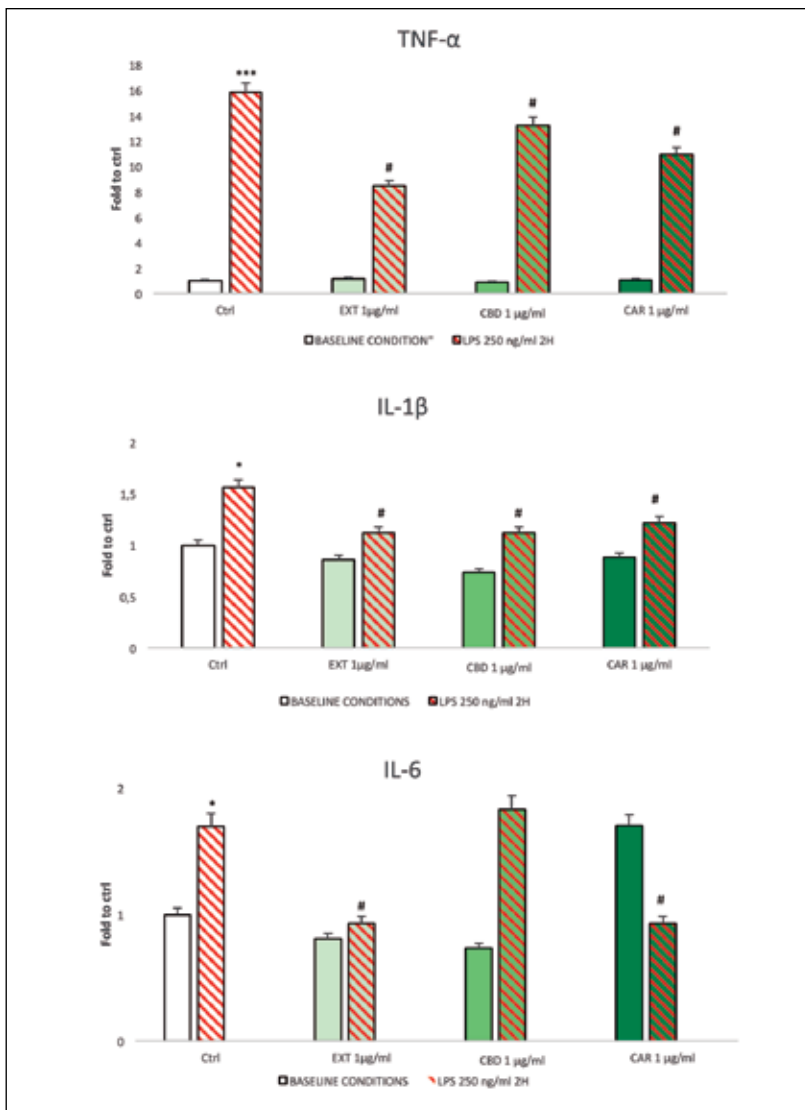


Fig.1. Valutazione dell'effetto antinfiammatorio su BV2 (***) $p < 0.001$ vs control ; (*) $p < 0.05$ vs control; (#) $p < 0.05$ vs LPS)

cinali, specialmente per quanto riguarda il ruolo biologico dei componenti non psicoattivi [5,6]. Il cannabidiolo (CBD), principale cannabinoide non psicoattivo e agonista inverso dei CBr, è sicuramente tra i costituenti della cannabis che sta destando maggiore interesse da parte della comunità scientifica, in particolare per il suo ruolo nel modulare la risposta immunitaria sia a livello periferico che centrale [7,8]. Allo stesso modo, altri costituenti del fitocomplesso sembrano in grado di modulare la risposta immunitaria con meccanismi CBr-mediati. Tra questi, il β -cariofillene (CAR), principale componente della fra-

zione terpenica e agonista totale dei CBr rappresenta una delle molecole ancora poco conosciute per quanto riguarda la sua attività biologica nella modulazione del processo infiammatorio [9]. Questi motivi hanno spinto il nostro gruppo di ricerca a investigare il ruolo di un estratto standardizzato di infiorescenze di *Cannabis sativa* L., privo di THC, nel processo infiammatorio sia a livello centrale che a livello periferico, in modo da poter confrontare il sinergismo tra i costituenti dell'intero fitocomplesso e i suoi costituenti principali, CBD e CAR, presi singolarmente. Due linee cellulari sono state uti-

GreenVet®
fitoterapia veterinaria



BUILDING I

Coadiuvante alimentare con effetto nutrizionale indicato per favorire il mantenimento delle normali funzioni fisiologiche, a supporto del benessere complessivo dell'animale, contestualmente agli interventi volti alla gestione di protocolli di prevenzione e trattamento durante periodi di **carenze vitaminiche**. I suoi principi coadiuvano la **funzione digestiva** favorendo la naturale attività della **flora microbica intestinale** e il fisiologico **assorbimento dei nutrienti**. Un coadiuvante ottimale per lo **sviluppo completo dell'apparato muscoloscheletrico** dell'animale, per la **crescita dei cuccioli**, per una maggiore **resistenza alle malattie**, negli **stati di convalescenza, gravidanza e allattamento**.



APA-CT Srl

Tel. +39 0543 705152

Fax +39 0543 707315

info@apabio.it

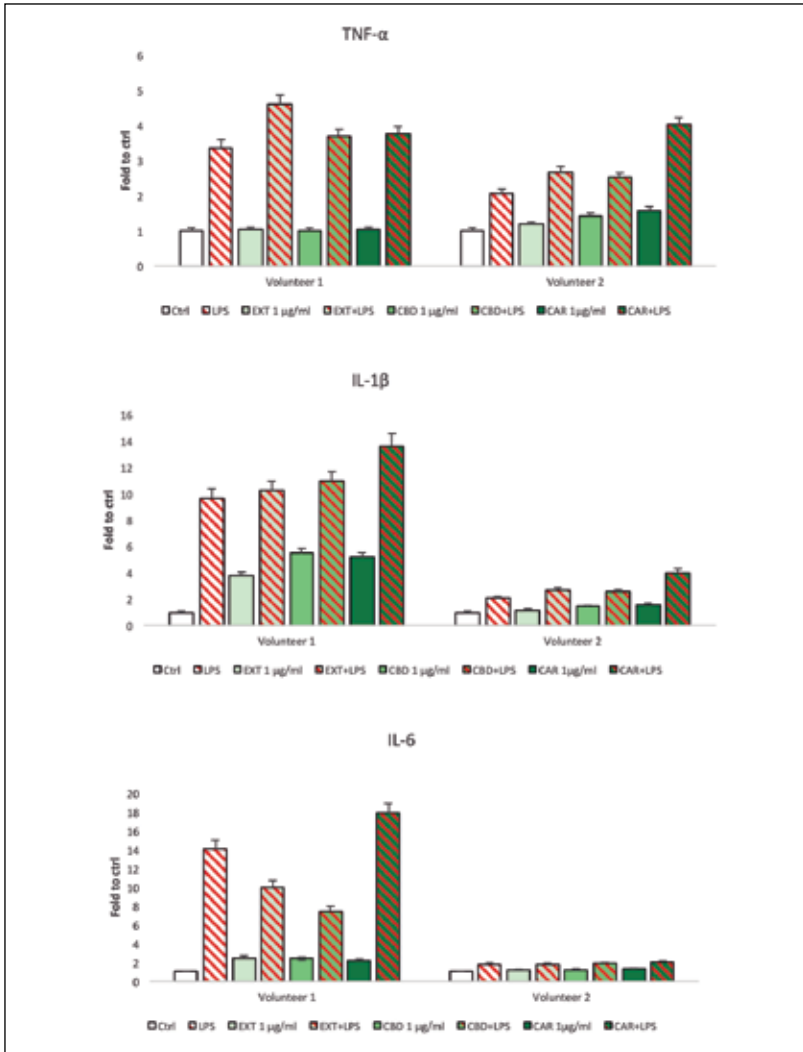


Fig. 2. Valutazione dell'effetto antinfiammatorio su PBMC

lizzate per riprodurre il modello infiammatorio a livello centrale (BV-2) e periferico (PBMC) e su entrambe sono stati testati l'estratto (EXT), CBD e CAR. Il lavoro sperimentale si è diviso in due parti:

1. Ottimizzazione di un modello infiammatorio acuto centrale e periferico

- Dosaggio della produzione di citochine pro-infiammatorie in seguito a diverse tempistiche di stimolo con lipopolisaccaride batterico (LPS) da Gram-, su BV2 e PBMC.
- Modulazione dell'espressione genica dei CBr (CB1 e CB2) in

condizioni di stimolo infiammatorio.

- Valutazione del cambiamento morfologico e della variazione di vitalità cellulare sotto stimolo infiammatorio.

2. Valutazione dell'attività antinfiammatoria dell'estratto e dei suoi costituenti principali in entrambe le linee utilizzate

- Valutazione degli effetti dei trattamenti sulla vitalità cellulare di BV2 e PBMC in condizioni basali.
- Analisi dell'effetto di EXT, CBD e CAR sul rilascio di citochine pro-infiammatorie indotto da LPS.
- Modulazione dell'espressione genica dei CBr da parte dell'estratto e dei suoi costituenti principali, in condizioni basali e di stimolo infiammatorio.

Materiali e metodi

L'estratto che abbiamo utilizzato per la sperimentazione è un estratto standardizzato di *Cannabis sativa* L. non psicotropa, ottenuto dalle infiorescenze essiccate della pianta attraverso un estrattore automatico a CO₂ supercritica. L'estratto è titolato al 21% in CBD, 7,06% in sesquiterpeni totali (di cui circa il 34% è rappresen-

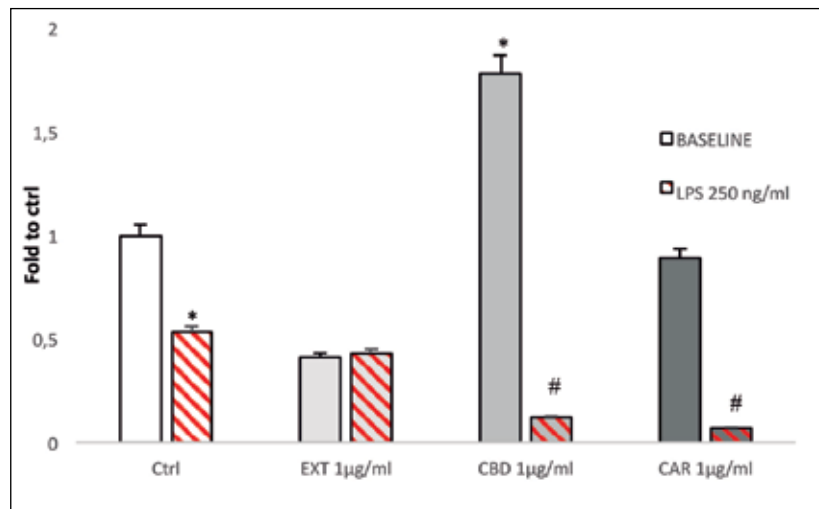


Fig. 3. modulazione dell'espressione genica CB2 su BV2 da parte di EXT, CBD e CAR in condizioni basali e infiammatorie. (*p<0.05 vs control ; #p<0.05 vs LPS)

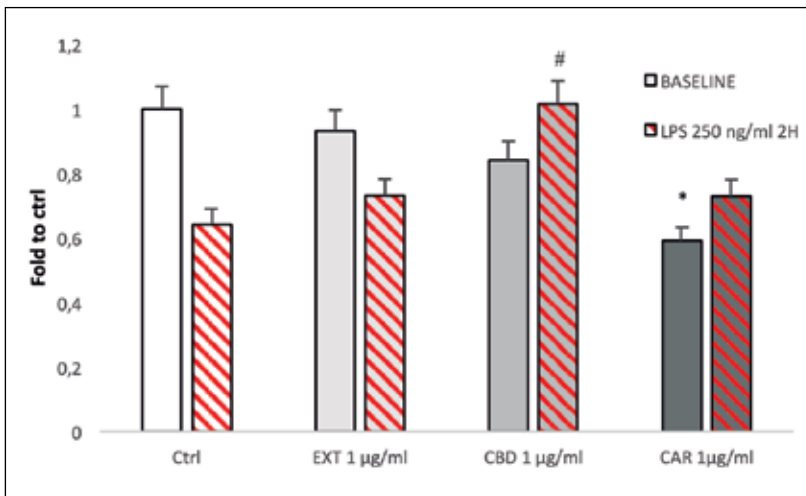


Fig. 4: modulazione dell'espressione genica CB2 su PBMC da parte di EXT, CBD e CAR in condizioni basali e infiammatorie. (* $p < 0.05$ vs control ; # $p < 0.05$ vs LPS)

tato da CAR) e 0,1% di flavonoidi. Il contenuto di THC, principale componente psicoattivo, è al di sotto dei limiti di legge (<0,6%). EXT, CBD e CAR sono stati testati alla concentrazione di 1 µg/mL.

Per il modello di neuroinfiammazione abbiamo utilizzato una linea cellulare murina microgliale (BV2), mentre per l'infiammazione a livello periferico abbiamo utilizzato cellule primarie mononucleate isolate *ex vivo* da sangue periferico di volontari sani (PBMC).

Per l'ottimizzazione del modello infiammatorio è stato utilizzato come stimolo su entrambe le linee cellulari lipolisaccaride batterico (LPS da *Salmonella enteridis*, Sigma-Aldrich, Milan) alla concentrazione di 250 ng/mL e lo stimolo è stato protratto per 2, 6 e 24 ore. I test di vitalità cellulare per escludere l'eventuale citotossicità dell'estratto sono stati eseguiti mediante Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Sigma-Aldrich, Milan). Per valutare il ruolo dell'estratto nel processo infiammatorio, BV2 e PBMC sono state pretrattate per 4 ore con l'estratto e i suoi principali costituenti e successivamente stimulate con LPS 250 ng/mL per due ore.

La produzione delle principali citochine proinfiammatorie (TNF- α , IL-6, IL-1 β) è stata valutata attraverso ELISA non competitivo a sandwich (Biologend e-Bioscience DX Diagnostic, Monza);

L'espressione genica dei CBr in condizioni basali e infiammatorie è stata valutata tramite Real-Time PCR.

Risultati e discussione

Nella linea microgliale, già dopo due ore di stimolo infiammatorio, si è osservato un significativo aumento del rilascio di TNF- α e IL-6 e la massima modulazione dell'espressione genica dei CBr, con una riduzione netta rispetto allo stato di controllo di entrambe le isoforme. Inoltre dopo due ore di stimolo si è osservato un marcato cambiamento morfologico della linea microgliale, indice della sua attivazione [10], che diventa nel tempo sempre più marcata. Anche su PBMC, già dopo 2 ore di stimolo, si osserva un netto rilascio citochinico e massima modulazione dell'espressione genica dei CBr. A differenza della linea microgliale, coerentemente con quanto riportato in letteratura, su PBMC non si è verificata alcuna variazione morfologica. Lo stimolo infiammatorio non ha influenzato la vitalità cellulare in nessuno dei modelli utilizzati.

Alla luce dei risultati ottenuti in questa prima parte di lavoro, il modello d'infiammazione che abbiamo utilizzato per valutare l'attività antinfiammatoria dei campioni è caratterizzato dallo stimolo con LPS 250 ng/mL per 2 ore, in quanto è la tempistica alla quale si osserva massimo rilascio

D300 D1000

Il tuo raggio di sole quotidiano...



70 capsule - da 300 UI
Cod. Prodotto 931095323

70 capsule - da 1000 UI
Cod. Prodotto 927040889

la Vitamina D contribuisce a:

- **Sostenere il sistema immunitario**
- **Mantenere ossa e denti normali**
- **Assorbire e utilizzare calcio e fosforo**
- **Mantenere le funzioni muscolari**

Reperibile in erboristeria, farmacia, parafarmacia e negozi di alimentazione naturale

www.naturalpoint.it

citochinico e massima modulazione dell'espressione genica recettoriale.

Una volta esclusa la citotossicità di EXT, CBD e CAR su entrambe le linee cellulari, ci siamo focalizzati sulla loro possibile attività antinfiammatoria. Su BV2, EXT riduce il rilascio citochinico (TNF- α , IL-6, IL-1 β) indotto da LPS, con un effetto migliorativo rispetto a CAR e CBD presi singolarmente (fig.1). Contrariamente a quanto osservato sulle BV2, EXT non ha effetto per quanto riguarda il rilascio citochinico su PBMC, analogamente agli altri due composti (fig.2).

L'espressione genica totale dei CBr è molto diversa sulle due linee cellulari. Infatti, la quantità totale di recettori dei cannabinoidi presenti su PBMC è maggiore rispetto a BV2. Coerentemente con quanto riportato in letteratura, l'espressione genica dei CB2 è superiore a quella dei CB1, essendo entrambe cellule del sistema immunitario.

Su BV2, EXT non è in grado di invertire l'effetto indotto da LPS sulla espressione genica dei CB2, così come i suoi costituenti principali CBD e CAR (fig.3).

Al contrario, su PBMC, EXT, CBD e CAR inducono una reversione dell'effetto indotto da LPS sull'espressione genica dei CB2 (fig.4).

Alla luce dei risultati ottenuti, il comportamento di EXT sulla linea microgliale BV2 risulta completamente opposto rispetto a quello che si osserva su PBMC:

- Su BV2, EXT si comporta in maniera speculare a LPS nel modulare l'espressione genica di CB1 e CB2, ma allo stesso tempo è in grado di inibire il rilascio di TNF- α , IL-1 β e IL-6

- Su PBMC, EXT inibisce l'azione indotta da LPS sull'espressione genica di CB1 e CB2, ma non ha effetto sul rilascio citochinico indotto dallo stimolo infiammatorio. L'effetto di modulazione dell'espressione genica dei CBr osservato su PBMC potrebbe es-

sere riconducibile a una non completa saturazione recettoriale, in virtù della maggiore presenza di recettori CBr in queste cellule. D'altra parte, molto più interessante risulta essere l'effetto antinfiammatorio a valle sul rilascio citochinico nelle BV-2, che sembra non essere dipendente dall'espressione genica dei CB2. Questo fa pensare che altre *pathways* intracellulari possano essere coinvolte, come per esempio la traslocazione nucleare di NF- κ B e la modulazione delle MAPK.

Conclusioni

L'interesse scientifico per i CBr nasce dalla scoperta del potenziale terapeutico di THC e CBD, cannabinoidi estratti dalle infiorescenze femminili di *Cannabis sativa* L., nel trattamento di numerosi stati patologici [11]. Nonostante la sua attività psicotropa, il THC, in associazione con il CBD è usato nel trattamento della spasticità e del dolore neuropatico in soggetti malati di sclerosi multipla[12].

Sebbene ulteriori studi siano necessari per confermare i dati ottenuti da questo lavoro, possiamo affermare che l'attività antinfiammatoria di *Cannabis sativa* sembra coinvolgere *pathways* intracellulari classiche del processo infiammatorio, piuttosto che la modulazione della risposta dei CBr, e che il fitocomplesso risulta essere sempre migliorativo rispetto ai costituenti presi singolarmente, avvalorando l'ipotesi di un potente sinergismo tra le varie frazioni che lo compongono.

Sicuramente, l'unione tra l'attività antinfiammatoria e l'attività antiossidante di *Cannabis sativa* può rappresentare un interessante approccio terapeutico per il controllo degli stati neurodegenerativi, connessi alla neuroinfiammazione.

* **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SIENA, Dipartimento di Scienze Fisiche, della Terra e dell'Ambiente**

Bibliografia

- [1] Ligresti, A.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V. From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. *Physiol. Rev.*, 2016, 96, 1593–1659.
- [2] Arturo, F.; Di, V.; Petrosino, S. Progress in Lipid Research Endocannabinoids and Endocannabinoid-Related Mediators: Targets, Metabolism and Role in Neurological Disorders. *JPLR*, 2016, 62, 107–128.
- [3] Khaspekov, L.G.; Verca, M.S.B.; Frumkina, L.E.; Hermann, H.; Marsicano, G.; Lutz, B. Involvement of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Cannabinoid Receptor-Dependent Protection against Excitotoxicity. *Eur. J. Neurosci.*, 2004, 19, 1691–1698.
- [4] Kendall, D.A.; Yudowski, G.A. Cannabinoid Receptors in the Central Nervous System: Their Signaling and Roles in Disease. *Front. Cell. Neurosci.*, 2017, 10, 1–10.
- [5] Russo, E.B. Taming THC: Potential Cannabis Synergy and Entourage Effects. *Br. J. Pharmacol.*, 2011, 163, 1344–1364.
- [6] Walter, L.; Stella, N. Cannabinoids and Neuroinflammation. *Br. J. Pharmacol.*, 2004, 141, 775–785.
- [7] Pertwee, R.G. The Diverse CB1 and CB2 Receptor Pharmacology of Three Plant Cannabinoids: Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, Cannabidiol and Δ^9 -Tetrahydrocannabivarin. *Br. J. Pharmacol.*, 2008, 153, 199–215.
- [8] Borgonetti, V.; Governa, P.; Montopoli, M.; Biagi, M. *Cannabis sativa* L. constituents and their role in neuroinflammation. *Curr. Bioact. Compnd.*, 2018, ahead of print, DOI: 10.2174/1573407214666180703130525
- [9] Bahi, A.; Al Mansouri, S.; Al Memari, E.; Al Ameri, M.; Nurulain, S.M.; Ojha, S. β -Caryophyllene, a CB2 Receptor Agonist Produces Multiple Behavioral Changes Relevant to Anxiety and Depression in Mice. *Physiol. Behav.*, 2014, 135, 119–124.
- [10] Mecha, M.; Feliú, A.; Mestre, L.; Guaza, C. Microglia Activation States and Cannabinoid System: Therapeutic Implications. *Pharmacol. Ther.*, 2016, 166, 40–55.
- [11] Gaston, T.E.; Friedman, D. Pharmacology of Cannabinoids in the Treatment of Epilepsy. *Epilepsy Behav.*, 2017, 70, 313–318.
- [12] Meuth, S.G.; Vila, C. Effect of Sativex on Spasticity-Associated Symptoms in Patients with Multiple Sclerosis. *Expert. Rev. Neurother.*, 2015, 15, 909–918.