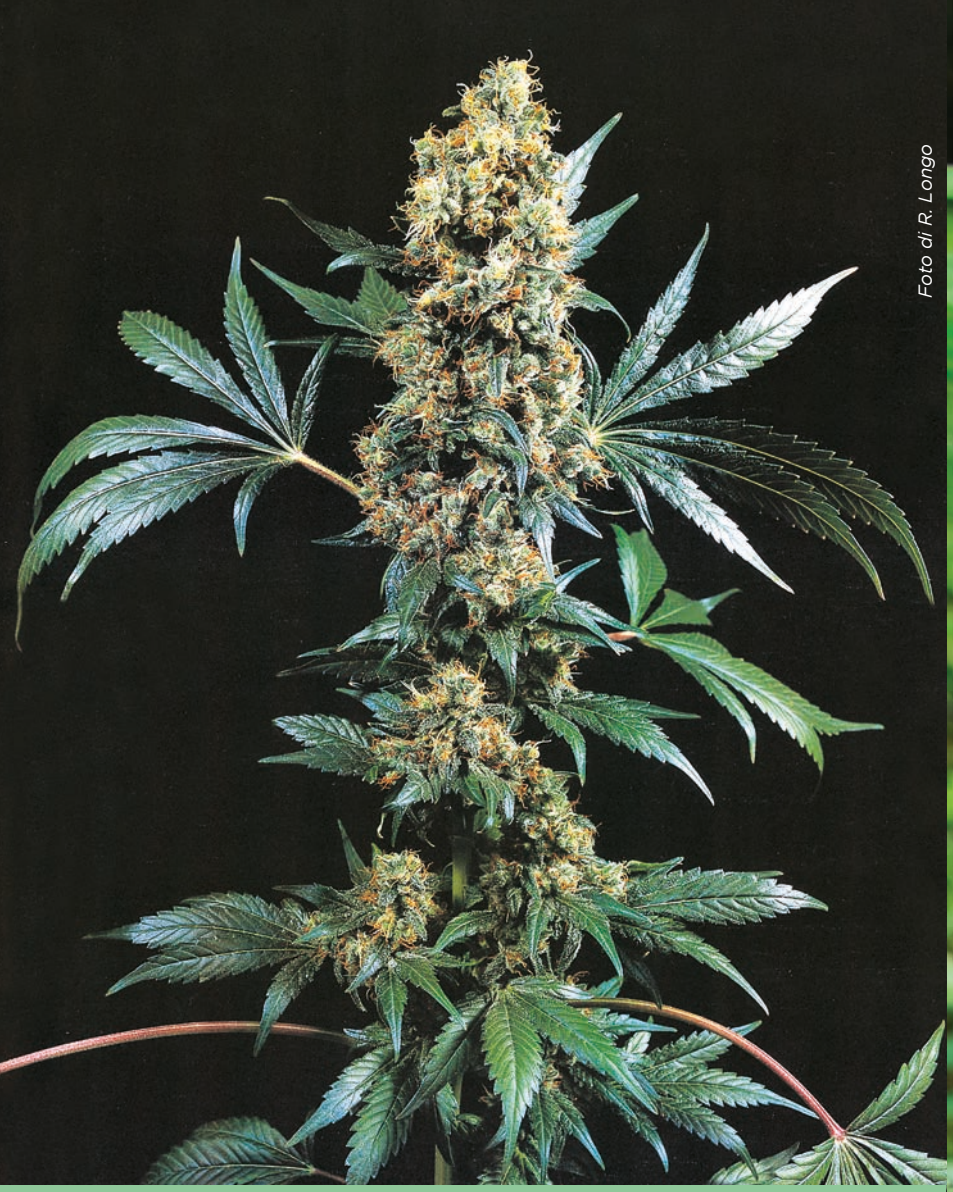


Foto di R. Longo

I risultati della ricerca presentata dimostrano che è possibile ipotizzare che estratti standardizzati di Cannabis sativa L., privi della componente psicotropa, siano buoni candidati per la terapia del dolore neuropatico.

Il possibile ruolo della Cannabis sativa L. non psicotropa nella neuropatia periferica

In questo lavoro viene illustrato il ruolo farmacologico di un estratto standardizzato di Cannabis sativa L. non psicotropa (in assenza di Δ9-THC) nel trattamento della sintomatologia associata al dolore neuropatico, riducendo la neuroinfiammazione in un modello di neuropatia SNI.

**** Daniele Spina***
**** Nicoletta Galeotti***

Eziologia, epidemiologia e rimedi nel dolore neuropatico

Il dolore neuropatico è un dolore causato da una lesione del sistema nervoso somatosensoriale (Meacham et al., 2017) che colpisce il 7-8% della popolazione mondiale, tra cui principalmente gli anziani, i diabetici, le persone infette da HIV, i soggetti sottoposti ad intervento chirurgico, i malati di cancro e i soggetti colpiti da herpes zoster (Bennett et al., 2012; Johansen et al., 2012; Mills et al., 2019). Ad oggi non sono presenti trattamenti curativi, ma solamente alcuni farmaci che combattono la sintomatologia, tra i quali troviamo antidepressivi, antiepilettici, anestetici e oppioidi, talvolta accompagnati da terapie psicologiche. La maggior parte dei pazienti con neuropatie non raggiunge un completo sollievo dal dolore, ma può aspettarsi solo una temporanea riduzione della sintomatologia che lo renda tollerabile: infatti, una riduzione del dolore del 30% nella scala NRS (Numerical Rating Scale) sarebbe già considerato un risultato clinicamente importante (Zilliox, 2017). Dal momento che i trattamenti ad oggi disponibili sono efficaci in meno del 50% dei pazienti e sono caratterizzati da numerosi effetti collaterali che ne limitano l'utilizzo prolungato (Hansson et al., 2010), sempre più persone supportano l'utilizzo della terapia con piante medicinali: la fitoterapia presenta infatti un ruolo rilevante nel contrastare il dolore neuropatico (Singh et al., 2017). Tra le piante medicinali maggiormente studiate troviamo: la Curcuma longa, che modula le citochine pro-infiammatorie (Zhao et al., 2012), la Salvia officinalis (Forouzanfar & Hosseinzadeh, 2018), che interagisce con il sistema oppioide e i

recettori TRPA1, la Lavanda (Cavanagh & Wilkinson, 2002), che riduce la percezione algica e la necessità di analgesici convenzionali, e lo zenzero, che inibisce la produzione di prostaglandine attraverso il blocco delle COX e presenta un'attività antiossidante (Borgonetti et al., 2020). A queste si aggiunge la *Cannabis sativa* L., anch'essa utilizzata nella terapia del dolore cronico, che, attraverso l'interazione con il sistema endocannabinoide (Rahn & Hohmann, 2009), inibisce il rilascio di NMDA e glutammato, andando così a modulare le vie nervose del dolore. I cannabinoidi principalmente investigati sono il Δ9-THC, che costituisce la componente psicotropa della pianta e modula la funzione immunitaria, e il CBD, che presenta proprietà analgesiche ed antiinfiammatorie (Bonini et al., 2018). Nonostante siano presenti numerosi studi che riportano l'effetto di questi due costituenti nel dolore neuropatico, ancora oggi è difficile trovare un estratto privo della componente psicotropa che sia efficace alla pari dei farmaci nei quali si trova un elevato contenuto di Δ9-THC, come il sativex (MacCallum & Russo, 2018). Gli effetti collaterali dovuti alla presenza del Δ9-THC limitano l'utilizzo della cannabis prolungato nel tempo e, per questo motivo, nel presente articolo valuteremo il possibile effetto analgesico di un estratto standardizzato di *Cannabis sativa* L. non psicotropa in un modello animale di neuropatia periferica e ne investigheremo il meccanismo d'azione.

Cannabis Sativa L.

Gli estratti utilizzati per lo studio condotto sono di *Cannabis sativa* L., una pianta fiorita annuale della famiglia delle Cannabinacee, la cui origine è asiatica, probabilmente da una zona ai piedi dell'Himalaya (Monthony et al., 2021). La droga è presente nelle infiorescenze femminili: durante lo sviluppo del fiore femminile, prima dell'allungamento dello stigma, si sviluppano dei tricomi ghiandolari sulla brattea che circonda l'ovario (Farag & Kayser, 2017b). Questi tricomi ghiandolari producono cannabinoidi ed altre sostanze in quantità considerevole: sono stati individuati all'interno del fitocomplesso "cannabis" più di 540 composti fitochimici, 18 differenti classi chimiche e più di 100 fitocannabinoidi diversi (Andre et al., 2016). I principali componenti presenti all'interno della *C. sativa* L. sono i cannabinoidi, come il Δ9-THC e il CBD, i terpeni, come il β-cariofillene e il limonene, e i flavonoidi, come la quercetina e l'apigenina. L'attività terapeutica della *Cannabis sativa* L. deriva dall'interazione delle sostanze della pianta con il sistema endocannabinoide, il quale è coinvolto nella modulazione di numerosi pathways intracellulari ed in vari stati fisiopatologici. I CBR sono una classe di recettori appartenenti a questo sistema e sono accoppiati a proteine Gi/o e divisibili in CB1, localizzati principalmente a livello del SNC, e CB2, maggiormente espressi a livello del sistema immunitario sia centrale che periferico e controllano la normale trasmissione sinaptica di tipo eccitatorio (Glutammato) ed inibitorio (GABA), prevenendo l'eccitotossicità. Essi sono inoltre coinvolti nei processi di tipo infiammatorio e controllano il rilascio di fattori neurotrofici (Lu & Mackie, 2020).

Estratti utilizzati

Per investigare il possibile effetto anti-iperalgesico della *Cannabis sativa* L. non psicotropa, sono state utilizzate tre diverse tipologie di estratti di cannabis, fornite e chimicamente caratterizzate dal laboratorio della Prof.ssa Pellati dell'Università di Modena e Reggio Emilia. I tre estratti utilizzati sono:

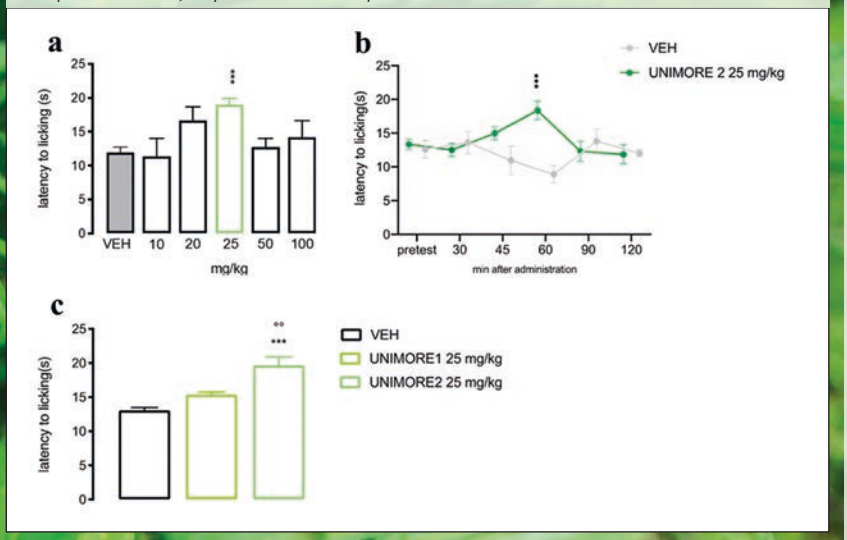
- UNIMORE 1 (UNI1): estratto standardizzato di *Cannabis sativa* L. (var. Kompolti) in olio di oliva (Ph. Eur) privo della componente terpenica, titolato in CBD allo 0.4%.
- UNIMORE 2 (UNI2): estratto standardizzato di *Cannabis sativa* L. (var. Kompolti) in olio d'oliva (Ph. Eur.) arricchito in terpeni, titolato in CBD allo 0.4%. UNIMORE 2 costituisce l'estratto completo.
- Olio essenziale canapa (var. Kompolti) (CEO): olio essenziale ottenuto dalla distillazione in corrente di vapore di *Cannabis sativa* L. (var. Kompolti) costituito quindi quasi unicamente dalla componente terpenica.

Per verificare il coinvolgimento dei recettori dei cannabinoidi, nell'attività finale dell'estratto sono state utilizzate AM630 come agonista inverso del recettore CB2 cannabinoide e AM251 come agonista inverso del recettore CB1 cannabinoide. Gli estratti e l'olio sono stati somministrati su topi tramite gavaggio, utilizzando come veicolo la carbossimetilcellulosa 1% in PBS1X e testati a diverse tempistiche dopo la somministrazione orale durante i behavior test delle tappe sperimentali in vivo.

Procedura sperimentale effettuata per i test in vivo

Inizialmente sono state valutate le proprietà farmacologiche di UNIMORE 2 nel dolore acuto mediante l'Hot Plate Test, calcolando il tempo di risposta del topo ad uno stimolo termico di 52,5°C; (Immagine 1) dai risultati emerge la massima attività analgesica alla dose di 25 mg/kg 60 minuti dopo la somministrazione orale. Confrontando gli estratti a questa dose, l'effetto dell'estratto UNIMORE 2 risulta migliore rispetto a UNIMORE 1. Probabilmente l'inefficacia mostrata da UNIMORE 1, costituito unicamente dalla componente cannabinoide, alla dose testata deriva dal fatto che, in assenza di terpeni, non è presente

*Fig 1. - 1a) Il grafico mostra la curva dose-risposta dell'estratto UNIMORE 2. Le linee nere rappresentano l'errore standard della media (S.E.M).1b) Il grafico mostra il confronto dell'effetto analgesico dell'estratto di Cannabis sativa L. nel tempo somministrato negli animali alla dose di 25 mg/kg, rispetto agli animali non trattati (VEH). 1c) Il grafico mostra il confronto dell'attività analgesica di UNIMORE 1 e UNIMORE 2. Le linee verticali rappresentano l'errore standard della media (S.E.M), la cui significatività statistica è stata valutata attraverso un'analisi di varianza (ANOVA), seguito dal Sidak's comparisons Test, ***p<0.01 vs VEH °°p<0.01 vs UNIMORE1.*



l'effetto sinergico che aumenta l'efficacia finale dell'estratto, osservabile invece in UNIMORE 2. È stato poi valutato UNIMORE 2 in un modello di dolore neuropatico "spared nerve injury" (SNI), il quale produce in modo affidabile sia allodinia che iperalgesia in risposta a stimolazione meccanica o termica a livello della zampa posteriore lesa (In, 2014; Jaggi et al., 2011). Il modello di neuropatia utilizzato è stato ottenuto attraverso un'incisione sulla superficie laterale della coscia e un successivo sezionamento del muscolo bicipite femorale, esponendo il nervo sciatico in corrispondenza delle tre diramazioni in cui si divide (nervo surale, peroneale comune e tibiale). Successivamente si procede con la separazione e l'isolamento della branca surale per effettuare una doppia legatura sulla peroneale comune e sulla tibiale, preservando il nervo surale (Bourquin et al., 2006). Dopo 7 giorni dall'intervento è stata misurata l'allodinia meccanica usando il Von Frey test: il dolore neuropatico dopo lesione del nervo periferico è infatti caratterizzato da una perdita della funzione sensoriale afferente, nonché da iperalgesia e allodinia. Il Von Frey test permette di testare la soglia meccanica degli animali mediante uno stimolo sulla superficie plantare delle zampe posteriori provocato da più monofilamenti metallici con grado di forza sempre maggiore. Dai test (Von Frey e Hot Plate) è emerso che UNIMORE 2 presenta una maggior attività anti-iperalgesica rispetto ad UNIMORE 1, riducendo in maniera più marcata e prolungata l'ipersensibilità meccanica e termica che si sviluppa nella zampa operata (IPSI) (Immagine 2). Osservando quindi la maggiore efficacia dell'estratto arricchito in terpeni rispetto a quello in cui sono assenti, abbiamo deciso di testare la componente volatile dell'estratto (CEO) che differenzia UNIMORE 2 da UNIMORE 1. Dai risultati è emerso che anche questa componente ha una significativa attività anti-iperalgesica, di intensità paragonabile a UNIMORE 1. Mettendo a confronto l'estratto completo ed i suoi principali costituenti, abbia-

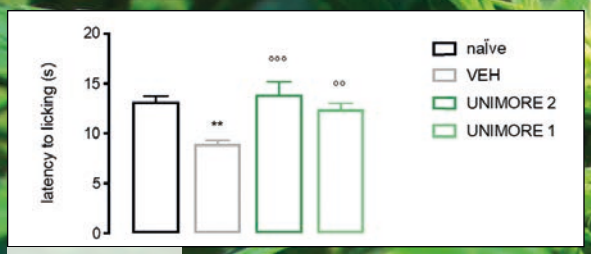


*Fig 2. Confronto dell'attività analgesica di UNIMORE 1 e 2 rispetto a VEH (animali non trattati e operati) e naïve (animali non trattati e non operati) attraverso il test della piastra calda. Le linee verticali rappresentano l'errore standard della media (S.E.M), la cui significatività statistica è stata valutata attraverso un'analisi di varianza (ANOVA), seguito dal Tukey post hoc test, **p<0.001 vs naive; °°°p<0.001 °°p<0.01 vs VEH.*

mo osservato che l'effetto finale di UNIMORE 2 è nettamente superiore rispetto a UNIMORE 1 e a CEO: questi dati indicano che entrambe le componenti dell'estratto, cannabinoidi e terpeni, partecipano sinergicamente all'azione analgesica dell'estratto completo (Immagine 3).

Coinvolgimento dei recettori cannabinoidi nel meccanismo d'azione dei 3 estratti

Per capire se il meccanismo analgesico di UNIMORE 2 fosse mediato dai recettori CBr e se ci fosse un diverso ruolo dei sottotipi CB1 e CB2, abbiamo deciso di somministrare agli animali AM251 (agonista inverso CB1) e AM630 (agonista inverso CB2); (Immagine 4) dai risultati ottenuti con Von Frey e Hot Plate test è emerso che l'effetto anti-iperalgesico prodotto da UNIMORE 2 è direttamente correlato all'attivazione dei CB2, in quanto AM630 previene completamente l'attività dell'estratto.

Similmente, anche CEO mostra un effetto dipendente dall'attivazione CB2, mentre UNIMORE 1 sembra possedere un'attività analgesica non legata all'attivazione di questi recettori. Infatti, sia l'antagonista CB1 che l'antagonista CB2 non producono alcuna variazione dell'effetto antinocicettivo. L'attività anti-iperalgesica della *Cannabis sativa* L. è stata ampiamente dimostrata sia nei modelli animali che in clinica (Huestis et al., 2019); tuttavia, in questo lavoro abbiamo messo in risalto il ruolo della componente terpenica, che sembra essere importante nell'attività finale osservata e soprattutto il sinergismo tra quest'ultima ed il CBD facendo prevalere il concetto di fitocomplesso e non più di singola sostanza.

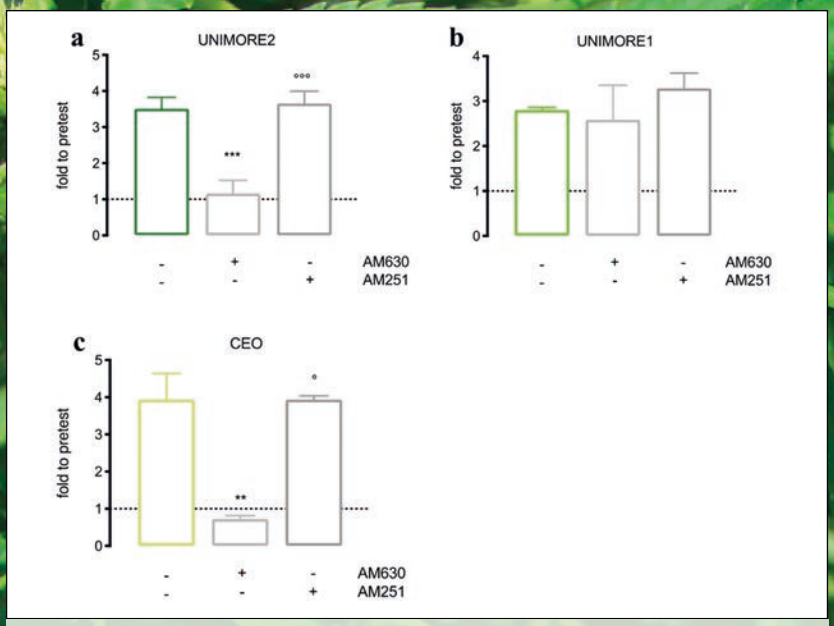


*Fig 4. grafici mostrano un confronto tra l'effetto analgesico di UNIMORE 2 (immagine 4a), UNIMORE 1 (immagine 4b) e CEO (immagine 4c) alla loro dose attiva in presenza degli antagonisti CB1 e CB2 e non, in un modello di dolore cronico SNI. La linea tratteggiata grigia rappresenta l'iperalgesia degli animali di controllo e le linee verticali rappresentano l'errore standard della media (S.E.M), la cui significatività statistica è stata valutata attraverso un'analisi di varianza (ANOVA), seguito dal Tukey post hoc test, ***p<0.001, **p<0.01 vs UNIMORE2,1 and CEO, °°°p<0.001 °p<0.05 vs UNIMORE2/CEO +AM630*

Valutazione degli effetti collaterali di UNIMORE 2

Una volta appurata l'azione analgesica degli estratti nel dolore neuropatico, abbiamo valutato i possibili effetti collaterali dell'estratto di cannabis non psicotropo sul comportamento locomotorio e sulle capacità esplorative dei topi; infatti, i farmaci a base di cannabis ad oggi utilizzati nella terapia del dolore neuropatico presentano Δ9-THC, che induce vari effetti collaterali quali compromissione dell'attenzione, dell'attività locomotoria, della concentrazione e della memoria a breve termine, deficit cognitivo e sonnolenza (Reece, 2009, Kobayashi 1999). Per questo motivo, è necessario dimostrare che l'utilizzo di un estratto di *Cannabis sativa* L. non psicotropo non induce effetti collaterali; attraverso il "rotarod" test abbiamo valutato la coordinazione e la funzionalità motoria nei topi: queste condizioni possono essere individuate in base alla capacità degli animali di rimanere in equilibrio su un'asta rotante, su cui, in condizioni normali,

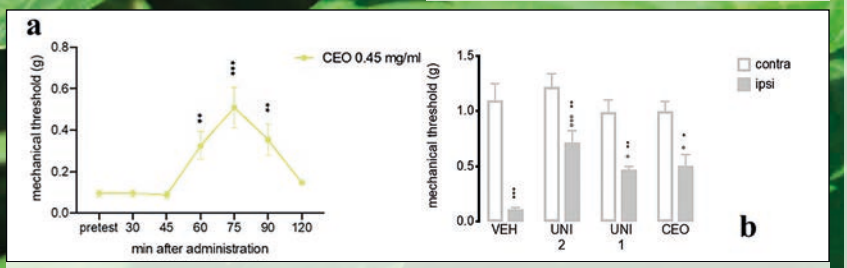
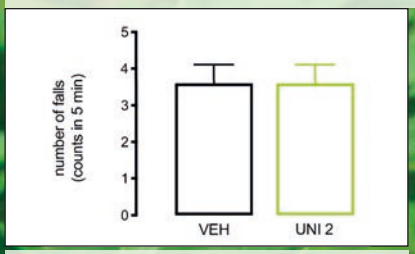


*Fig 3. - 3a) Time course dell'azione analgesica di CEO, un olio essenziale ottenuto a partire da UNIMORE 2. Le linee verticali rappresentano l'errore standard della media (S.E.M), la cui significatività statistica è stata valutata attraverso un'analisi di varianza (ANOVA), seguito dal Tukey post hoc test, ***p<0.001 vs pretest. 3b) Confronto dell'effetto analgesico di UNIMORE 1 E 2, CEO e VEH in modello SNI. Le linee verticali rappresentano l'errore standard della media (S.E.M), la cui significatività statistica è stata valutata attraverso un'analisi di varianza (ANOVA), ***p<0.001 vs contra, **p<0.01 vs contra; °°°p<0.001; °P<0.05 vs VEH.*

Fig 5. - Valutazione della coordinazione e della funzionalità motoria di animali trattati con UNIMORE 2. Il grafico rappresenta una valutazione delle capacità motorie e della coordinazione di animali trattati con quest'estratto di Cannabis sativa L. Le linee verticali rappresentano l'errore standard della media (S.E.M).



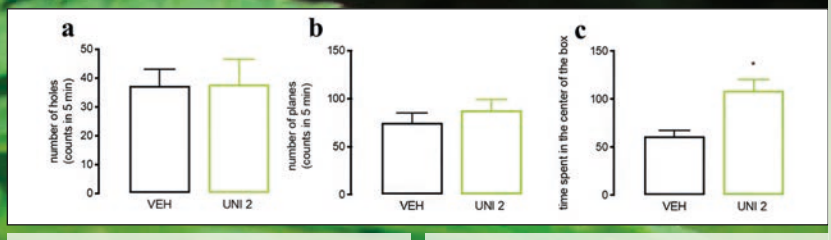


*Fig 6. - Comportamento locomotorio ed esplorativo nei topi trattati con UNIMORE 2. Il grafico rappresenta la locomozione spontanea e il comportamento esplorativo degli animali trattati con UNIMORE 2 rispetto a quelli di controllo (VEH) tramite il conteggio del numero dei buchi esplorati dall'animale (immagine 6a), dei movimenti (immagine 6b) e del tempo speso al centro della tavola (immagine 6c). Le linee verticali rappresentano l'errore standard della media (S.E.M), la cui significatività statistica è stata valutata attraverso Student's T Test *p<0.05 vs VEH*

sarebbero capaci di muoversi (Immagine 5). Attraverso l'"Hole-Board" test abbiamo valutato la locomozione spontanea e il comportamento esplorativo degli animali nei confronti di un nuovo ambiente costituito da una piattaforma sopraelevata con 16 fori distribuiti uniformemente. Tutti gli estratti alla loro dose massima non inducono alcuna compromissione della coordinazione, della funzionalità motoria e cognitiva, e sembrano inoltre ridurre i livelli di ansia, aumentando la curiosità esplorativa e la locomozione spontanea (Immagine 6). Gli animali posti all'interno della tavola a buchi, infatti, in genere trascorrono più tempo lungo i bordi delimitati della tavola e riducono la motilità e la curiosità a causa dello stress derivato dall'inserimento in un ambiente nuovo; i topi a cui è stato somministrato UNIMORE 2, al contrario, tendevano a stare al centro della piattaforma e a spostarsi continuamente, facendo ipotizzare un possibile effetto ansiolitico dell'estratto.

Procedura sperimentale effettuata per i test in vitro

Da questa prima parte è emerso che UNIMORE 2 risulta essere un promettente candidato per il trattamento del dolore neuropatico. Per poter indagare più dettagliatamente il suo meccanismo d'azione, abbiamo condotto studi in vitro su midolli spinali di animali neuropatici di controllo, trattati con UNIMORE 2 e UNIMORE 2 + AM630 (agonista inverso CB2). In primo luogo, abbiamo analizzato attraverso la metodica di western blotting le proteine coinvolte nell'infiammazione, in modo da confrontarne l'espressione tra animali trattati con gli estratti, i controlli che sono stati operati con SNI e i wild type (gli animali che non hanno subito alcun trattamento ed operazione). Il Western Blot è una tecnica molto utilizzata in vari campi di ricerca che consente di identificare, mediante l'utilizzo di anticorpi specifici, e caratterizzare l'espressione di una proteina bersaglio all'interno di una miscela complessa di proteine, precedentemente separate tramite elettroforesi su gel (metodo di Towbin et al., 1979). Sul midollo spinale abbiamo valutato l'espressione dei principali meccanismi cellulari coinvolti nel dolore neuropatico, come l'espressione delle protein-chinasi attivate da mitogeni (MAPK), i mediatori della neuroinfiammazione e dello stress ossidativo (Obata & Noguchi, 2004). Le MAPK sono costituite principalmente da tre membri: chinasi extracellulare segnale-regolate ERK (inclusi ERK1 / 2), p38 (inclusi p38α, p38β, p38γ e p38δ) e c-Jun chinasi N-terminale JNK (inclusi JNK1, JNK2 e JNK3) (Immagine 7). Per prima cosa abbiamo osservato una possibile variazione

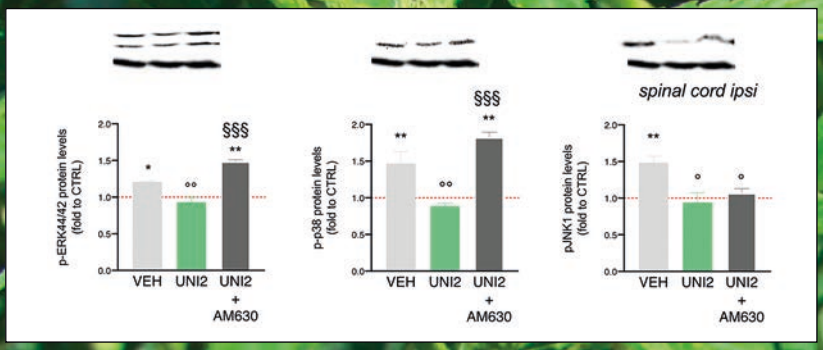


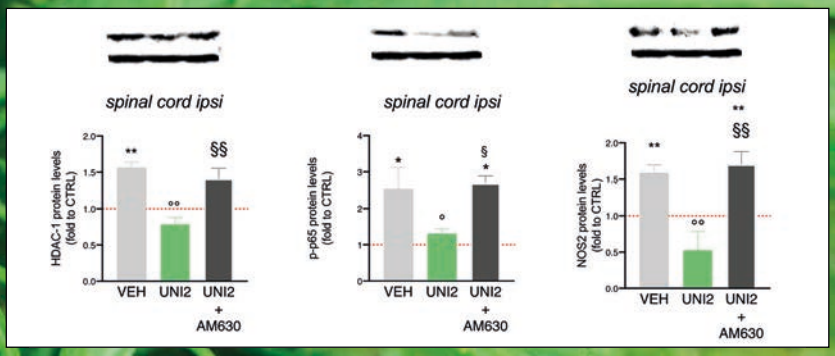
*Fig 7. Effetto di UNIMORE2 sull'espressione di p-ERK (immagine 7a), p-p38 (Immagine 7b) e pJNK1 (immagine 7c) in midollo spinale misurata attraverso Western Blot. La linea rossa tratteggiata rappresenta gli animali di controllo. Le linee verticali rappresentano l'errore standard della media (S.E.M) la cui significatività statistica è stata valutata attraverso un'analisi di varianza (ANOVA), seguito dal Tukey post hoc test, **p<0.01 *p<0.05 vs controllo; °°p<0.01 °p<0.05 vs §§§p<0.001 vs UNIMORE 2. Nell'immagine sono riportate delle bande rappresentative delle proteine di riferimento.*

dell'espressione di ERK attraverso l'azione di UNIMORE 2: i nostri risultati indicano un coinvolgimento prominente della via di ERK nell'azione di UNIMORE 2, come dimostrato dalla drastica riduzione dell'espressione di p-ERK nel midollo spinale degli animali trattati con cannabis, rispetto agli animali di controllo. Per quanto riguarda JNK, delle tre isoforme presenti JNK3 è prevalentemente espresso a livello neuronale, mentre JNK1 e JNK2 sono espressi in cellule non neuronali (Ji et al., 2007). È stato dimostrato in altri elaborati che, dopo lesione del nervo, JNK1 si localizza preferenzialmente negli astrociti spinali e la sua inibizione porta alla riduzione dell'allodinia meccanica (Borgonetti et al., 2020). Dai risultati ottenuti l'espressione proteica di JNK1 è fortemente ridotta dalla somministrazione dell'estratto di cannabis. Infine, abbiamo osservato l'espressione di p-p38 a seguito di somministrazione di UNIMORE 2: delle quattro diverse isoforme di p38, p38α e p38β sono le più importanti e risultano particolarmente coinvolte nell'autoimmunità, nelle risposte infiammatorie e nella gestione del dolore (X. Lin et al., 2014, Cheng et al., 2014). Dai risultati ottenuti l'espressione proteica di p-p38 è fortemente ridotta da UNIMORE 2. Abbiamo valutato poi l'espressione proteica delle MAPK in presenza dell'agonista inverso CB2 AM630: l'effetto di UNIMORE 2 sull'espressione proteica di p-ERK e p-p38 è antagonizzato da AM630, effetto che invece non si verifica per pJNK 1, espresso principalmente a livello astrocitario. Questo ha fatto ipotizzare un meccanismo di tipo microgliale dell'estratto. In letteratura è stato osservato che, a seguito di lesione nervosa del corno dorsale del midollo spinale, l'attivazione delle MAPK non si verifica unicamente a livello neuronale, ma anche nelle cellule gliali, dimostrando un ruolo importante della microglia nello sviluppo e mantenimento del dolore (Borgonetti et al., 2020). I recettori CB2 sono presenti nella microglia, una popolazione di cellule macrofagiche funzionalmente e anatomicamente simili ai mastociti; inoltre, la microglia secerne fattori pro-infiammatori e induce il rilascio di mediatori quali ossido nitrico, neurotrofine e radicali liberi, associati alla formazione di nuove sinapsi e alla plasticità neuronale. È stato osservato nel dolore un aumento dell'espressione CB2 a livello della microglia e la loro stimolazione ne attenua l'attivazione; ne consegue un'interessante via terapeutica per il trattamento del dolore neuropatico, poiché è attenuato il rilascio di citochine che notoriamente sviluppano sensibilizzazione a livello spinale. Diversi studi hanno dimostrato che gli agonisti CB2 diminuiscono la sensibilità al dolore (Komorowska-Müller & Schmöle, 2021), riducendo anche la microgliosi e l'astrocitosi; per questo motivo, la sovraespressione dei recettori CB2 riduce l'attivazione gliale dopo una lesione del nervo sciatico, mentre una loro riduzione di espressione causa un dolore maggiore associato ad un aumento della proliferazione della microglia e di nuove attivazioni gliali. L'inefficacia di UNIMORE 2, in presenza dell'antagonista AM630, sull'espressione proteica di pJNK1, presente principalmente a livello astrocitario, fa ipotizzare un meccanismo d'azione dell'estratto di tipo microgliale: non è presente infatti un'interazione tra l'estratto e i recettori CB2 che induca la riduzione di pJNK, che dipende da un altro meccanismo d'azione ancora da investigare.

Analisi per la valutazione del possibile meccanismo d'azione dell'estratto

A questo punto della ricerca, abbiamo focalizzato l'indagine sul ruolo della microglia nel meccanismo d'azione di UNIMORE 2, valutando se effettivamente dei marker enzimatici specifici per la microglia attivata fossero modulati nel nostro modello di neuropatia a seguito della somministrazione dell'estratto UNIMORE 2: i marker presi in considerazione sono stati HDAC-1, iNOS e p65 (Immagine 8). Come già precedentemente evidenziato, una caratteristica della neuroinfiammazione è l'attivazione di cellule gliali nel SNC, con conseguente rilascio di mediatori proinfiammatori, e una lesione nervosa induce un'elevata attivazione microgliale a livello spinale (Borgonetti & Galeotti, 2021). Un marker specifico microgliale è HDAC-1, un enzima epigenetico che modifica lo stato di acetilazione degli istoni, favorendo o sfavorendo l'accesso al DNA dei fattori di trascrizione (Denk et al., 2013). Quest'enzima può regolare la risposta infiammatoria delle cellule gliali, infatti, l'inibizione di HDAC-1 promuove un'attività anti-neuroinfiammatoria attraverso la riduzione dell'attivazione microgliale. HDAC-1 è espresso prevalentemente a livello microgliale nel midollo spinale di animali neuropatici e la somministrazione di inibitori selettivi comporta una riduzione dell'iperalgesia e allodinia indotta dal modello

*Fig 8. - Espressione di HDAC-1 (immagine 8a), p-p65 (immagine 8b) e NOS2 (immagine 8c) misurata attraverso Western Blot in animali di controllo con neuropatia (VEH), animali con neuropatia trattati con UNIMORE 2 a 25 mg/kg e animali con neuropatia trattati con UNIMORE 2 ed AM630 (UNI 2+AM630). La linea rossa tratteggiata rappresenta gli animali di controllo che non presentano un modello SNI. Le linee verticali rappresentano l'errore standard della media (S.E.M) la cui significatività statistica è stata valutata attraverso un'analisi di varianza (ANOVA), seguito dal Tukey post hoc test, **p<0.01 *p<0.05 vs controllo; °°p<0.01 °p<0.05 vs VEH;§§p<0.01 §p<0.05 vs UNIMORE 2. Nell'immagine sono riportate delle bande rappresentative delle proteine di riferimento.*



(Borgonetti & Galeotti, 2021). Dai risultati ottenuti emerge che UNIMORE 2 riduce fortemente l'espressione di HDAC-1 rispetto al controllo (Veh) e questo effetto è inibito da AM630 (agonista inverso CB2). In letteratura viene riportata una stretta correlazione tra HDAC-1 e l'attivazione del fattore di trascrizione NF-κB p65 e che questa comporti un aumento dell'attivazione microgliale (Denk et al., 2013). Per questo motivo, nella nostra ricerca abbiamo indagato anche l'effetto di UNIMORE 2 sull'espressione di p65 nel midollo spinale degli animali operati con SNI e dai risultati è emerso che l'espressione di p65 è fortemente ridotta dall'estratto e che quest'effetto viene antagonizzato da AM630. Infine, poiché in letteratura è riportato che l'attivazione della microglia promuove l'infiammazione anche attraverso la sovraespressione di NOS2 (David & Kroner, 2011), abbiamo valutato l'effetto di UNIMORE2 sull'espressione di NOS2; questo enzima catalizza la sintesi dell'ossido nitrico attraverso la conversione dell'enzima L-Arginina in L-citrullina. UNIMORE 2 riporta i valori di questo enzima ad un livello simile a quello degli animali senza neuropatia (topi naïve) ed anche in questo caso AM630 blocca l'effetto. Per questo motivo è possibile evidenziare un meccanismo principalmente microgliale di UNIMORE 2, e questo può essere confermato dalla letteratura: infatti, in uno studio è possibile vedere che in un soggetto sano i recettori CB1 e CB2 non sono espressi nelle cellule microgliali, mentre nel dolore neuropatico l'espressione dei recettori CB2 aumenta drasticamente. I cannabinoidi regolano l'attività microgliale: infatti, un'interazione con i recettori CB2 riduce la proliferazione delle cellule microgliali e la loro migrazione, riducendo il rilascio di fattori pro-infiamma-

Sitarama®
Via Michelucci, 9
50028 Barberino Tavarnelle (FI)

presenta **Hennè Color:**
una gamma completa di colorazioni naturali a base di henné, pianta tintoria conosciuta per le sue proprietà benefiche e coloranti. Senza ossidanti, ammoniaca, acqua ossigenata: composta da 6 linee di prodotti:

- **Polvere Henné Color**
  riflessanti naturali, di erbe tintorie, disponibile in 7 colorazioni
- **Polvere naturale NON colorante fortificante**
  Neutro
- **Crema Colorante Henné Nuance**
  colorazione dolce pronta all'uso, per uso frequente, disponibile in 12 colorazioni
- **Hair Mascara** per un ritocco rapido del colore; disponibile in 7 colorazioni
- **Shampo Henné mantenimento del colore**
  disponibile in 7 colorazioni oltre al neutro
- **Balsamo Henné Ristrutturante**
  doppio utilizzo: aggiunto nella preparazione fissa il colore e dopo la tinta rimuove le particelle dalla radice dei capelli lasciandoli morbidi e lucenti.

www.sitarama.com

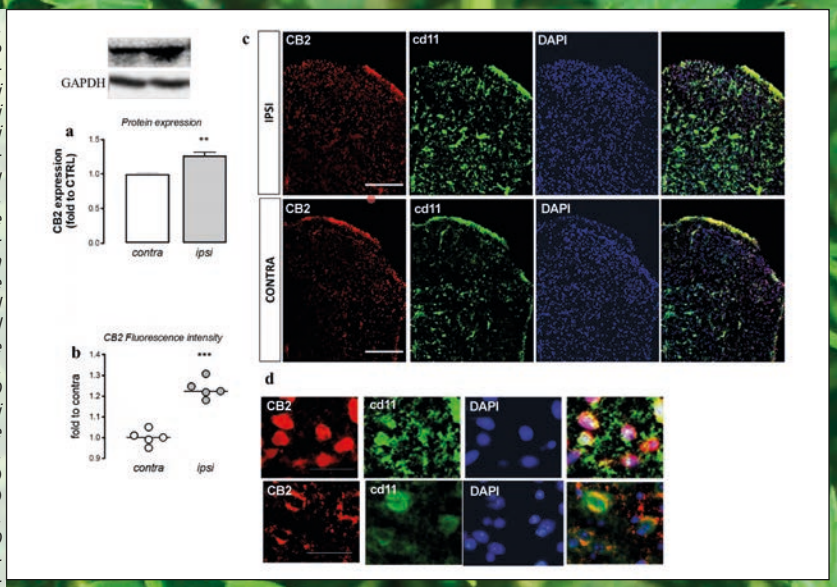


*Fig 9. Aumento dell'espressione proteica di CB2 nei midolli spinali di topi SNI tramite Western Blotting (immagine 9ª). Quantificazione tramite immunofluorescenza dell'espressione di CB2 in IPSI e CONTRA del midollo spinale (immagine 9b, Scale bar 200 um). Immagini rappresentative di CB2 (rosso), Cd11 (verde) e DAPI (blu) (immagine 9c, Scale bar 20 um). Valutazione dell'espressione dei CB2 nella microglia in midolli spinali di animali neuropatici. Nell'immagine sono riportate delle bande rappresentative delle proteine di riferimento. L'analisi statistica è stata effettuata con Student's T test ***p<0.001, **p<0.01 vs contra.*

tori tra cui citochine e radicali liberi (Stella, 2010). Successivamente abbiamo analizzato l'espressione dei recettori CB2 per individuare il possibile ruolo patofisiologico di questi recettori in modelli di dolore neuropatico; in primo luogo, è stata valutata attraverso un'analisi di western blotting l'espressione dei recettori CB2 presenti nella parte di midollo spinale che fa riferimento alla zampa lesionata IPSI rispetto alla parte sana CONTRA: i risultati ottenuti dimostrano una maggior espressione dei recettori CB2 sul lato IPSI. Questi risultati sono stati confermati da un'analisi di immunofluorescenza, sia dalle immagini sviluppate al microscopio che dalla loro quantificazione in termini di intensità di fluorescenza (Immagine 9). L'immunofluorescenza è un metodo altamente specifico utilizzato per individuare determinati antigeni presenti su un tessuto; su una sezione di tessuto viene posto un anticorpo specifico per l'antigene da analizzare, ottenendo così una reazione immunitaria antigene-anticorpo. Questa tecnica permette, quindi, di visualizzare la distribuzione della molecola bersaglio degli anticorpi all'interno di un determinato tessuto. Come detto in precedenza, dalla letteratura si evince un aumento dell'espressione di CB2 a livello della microglia e che la loro stimolazione ne attenua l'attivazione, di conseguenza è ridotto il rilascio di citochine che notoriamente sviluppano sensibilizzazione a livello spinale. Diversi studi hanno dimostrato che gli agonisti CB2 diminuiscono la sensibilità al dolore, riducendo anche la microgliosi e l'astrocitosi; pertanto, la sovraespressione dei recettori CB2 riduce l'attivazione gliale dopo una lesione del nervo sciatico, mentre una loro riduzione di espressione causa un maggiore dolore associato ad un aumento della proliferazione della microglia e di nuove attivazioni gliali (Komorowska-Müller & Schmöle, 2021). Per confermare il possibile meccanismo d'azione microgliale CB2-mediato di UNIMORE 2, nei successivi test di immunofluorescenza abbiamo deciso di utilizzare un marker specifico microgliale (Cd11) ed uno neuronale (Neun).

Cd11 partecipa nei processi di adesione cellulare in condizioni di infiammazione ed è presente sulle membrane dei leucociti; questa β-integrina rappresenta il principale marcatore della microglia durante i processi infiammatori (Roy et al., 2006). Neun è una proteina nucleare neurone-specifica che è comunemente utilizzata come biomarcatore dei neuroni per test di immunofluorescenza (Kim et al., 2009). Dai risultati ottenuti è stato possibile vedere che i recettori CB2 co-localizzano con il marker specifico microgliale Cd11 e decisamente meno con il marker neuronale Neun, confermando così il meccanismo d'azione microgliale CB2-mediato dell'estratto.

Conclusioni

In conclusione, in questo lavoro abbiamo definito il ruolo farmacologico di un estratto standardizzato di *Cannabis sativa* L. non psicotropa (in assenza di Δ9-THC) nel trattamento della sintomatologia associata al dolore neuropatico, riducendo la neuroinfiammazione in un modello di neuropatia SNI. Inoltre, è possibile affermare che la componente terpenica e il CBD sinergizzano aumentando l'effetto finale dell'estratto, e che il meccanismo d'azione di riduzione della neuroinfiammazione probabilmente dipende dalla modulazione dei recettori CB2, nello specifico dalla riduzione dell'attività microgliale. Attualmente, nel laboratorio della Prof.ssa Galeotti e Dott.ssa Borgonetti, sono in corso degli studi per poter concludere l'analisi sull'estratto, in modo da poter definire: la possibile attività ansiolitica di UNIMORE 2 attraverso specifici behavior test sull'ansia, il meccanismo d'azione in maniera approfondita, individuando il composto maggiormente attivo ed isolando i componenti più interessanti, e l'attività anti-iperalgesica dell'estratto UNIMORE 2 in un modello di neuropatia centrale. Per i risultati ad ora ottenuti è possibile ipotizzare che estratti standardizzati di *Cannabis sativa* L., privi della componente psicotropa, siano buoni candidati per la terapia del dolore neuropatico.

**** UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE - Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino (NEUROFARBA)***

La bibliografia del presente articolo è disponibile sul sito ***www.natural1.it*** nella sezione "Fitoterapia".