

**ENDOKANNABINOIDIEN VAIKUTUS MONOSYYTTIEN  
MMP-9-ERITYKSEEN**

Matti Oivo  
Syventävien opintojen kirjallinen työ  
Tampereen yliopisto  
Lääketieteen laitos  
Lääketieteellisen biokemian tutkimusryhmä  
2011

Tampereen yliopisto  
Lääketieteen laitos  
Lääketieteellisen biokemian tutkimusryhmä

## OIVO MATTI: ENDOKANNABINOIDIEN VAIKUTUS MONOSYYTTIEN MMP-9 - ERITYKSEEN

Kirjallinen työ, 27 s.  
Ohjaaja: Tiina Solakivi  
Toukokuu 2011

Avainsanat: ateroskleroosi, endokannabinoidijärjestelmä, inflammaatio, matriksin metalloproteinaasit

### **Tutkimuksen taustaa**

Endokannabinoidijärjestelmällä on todettu olevan merkittävä rooli useiden eri fysiologisten toimintojen, kuten kivun, ruokahalun, keskushermoston toiminnan sekä tulehdusreaktioiden säätelyssä. Tulehdusreaktioissa endokannabinoidilla on havaittu olevan sekä pro- että anti-inflammatorisia vaikutuksia. Useiden viimeaikaisten tutkimusten mukaan endokannabinoidilla vaikuttaisi olevan osansa myös ateroskleroosin patogeneesissa ja sen progression säätelyssä. Tässä tutkimuksessa halusimme selvittää, onko endokannabinoidilla vaikutusta humaaniin monosyyttien (MonoMac 6) MMP-9-eritykseen *in vitro* inkuboimalla niitä 24 tuntia vaihtelevissa konsentraatioissa eri endokannabinoidilla (anandamidi, noladiini sekä 2-AG). Solujen erittämä MMP-9 määritettiin kvantitatiivisesti zymografiaa apuna käyttäen.

### **Tulokset**

Havaitsimme että tutkimistamme endokannabinoidista anandamidilla ja noladiinilla oli lievä MMP-9:n eritystä lisäävä vaikutus: suurin vaikutus oli 10 mikromolaarisella anandamidilla joka kaksinkertaisti MMP-9-erityksen ( $2,10 \pm 0,31$ -kertainen lisäys,  $n = 4$ ). Noladiini lisäsi voimakkaimmin MMP-9-eritystä konsentraatiolla  $2,7 \mu\text{M}$  ( $1,95 \pm 0,49$  kertainen lisäys,  $n = 6$ ). Havaitsemassamme vaikutuksessa oli kuitenkin melko suurta vaihtelua yksittäisten kokeiden välillä, eikä vaikutuksessa ollut havaittavissa selkeää annos-vaste-suhdetta. 2-AG:lla ei havaittu olevan vaikutusta MMP-9-eritykseen.

### **Pohdinta**

Tämän tutkimuksen tulokset viittaavat siihen, että endokannabinoidilla saattaa olla monosyyttien MMP-9-eritystä lisäävä vaikutus. Tutkimuksen perusteella on siis mahdollista, että endokannabinoidit osaltaan vaikuttavat ateroskleroottisen plakin haurastumiseen MMP-9-erityksen säätelyyn osallistumalla. Endokannabinoidijärjestelmä olisi siis kenties varteenotettava farmakologinen vaikutuskohta niin ateroskleroosin kuin eräiden muidenkin tulehduksellisten sairauksien hoidossa ja komplikaatioiden ehkäisyssä. Aihe vaatii runsaasti lisätutkimuksia.

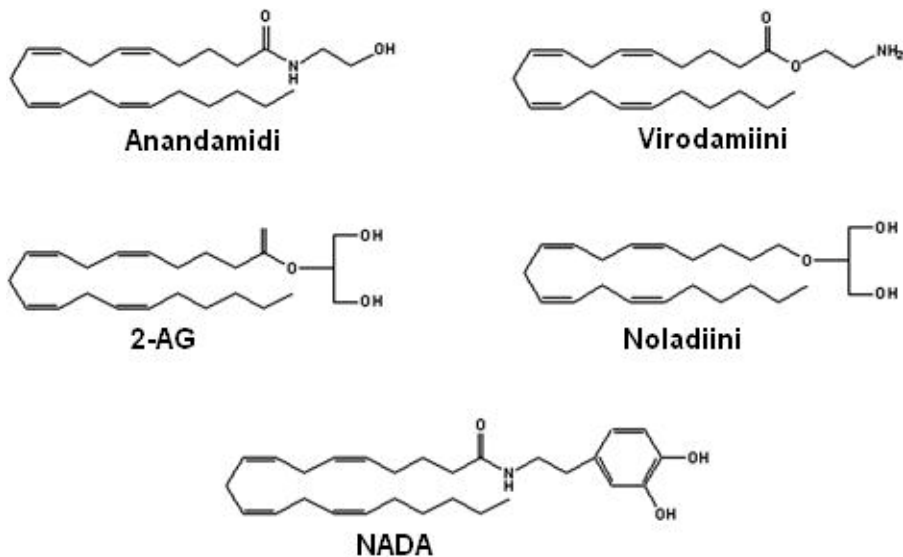
# SISÄLLYS

<b>1. JOHDANTO</b>	<b>S.</b> 1
1.1 Endokannabinoidien muodostuminen ja metabolia	4
1.2 Kannabinoidireseptorit	7
1.3 Endokannabinoidit ja inflammaatio	8
1.4 Endokannabinoidit ja ateroskleroosi	9
1.5 Endokannabinoidit ja soluväliaineen metalloproteiinaasit	11
<b>2. AINEISTO JA MENETELMÄT</b>	12
2.1 Soluviljely	13
2.2 Endokannabinoidikäsittelyt	13
2.2 Zymografia	14
2.3 Kuvien analysointi	15
2.4 Aineiston analysointi	15
<b>3. TULOKSET</b>	16
<b>4. POHDINTA</b>	19
<b>LÄHTEET</b>	22

# 1 JOHDANTO

Endokannabinoidijärjestelmä on elimistössä hyvin laajalti esiintyvä signaalintijärjestelmä, joka koostuu lukuisten eri solutyypin solukalvoilla esiintyvistä kannabinoidireseptoreista, niitä aktivoivista ligandeista eli endokannabinoidista sekä näiden metaboliaa säätelevistä entsyymeistä. Endokannabinoidijärjestelmä on mukana elimistön lähes kaikissa toiminnoissa: se säätelee mm. tulehdusreaktioita (1), ruokahalua (2), lisääntymistoimintoja (3), keskushermoston toimintaa (4), verenkiertoa (5) jne. Endokannabinoidijärjestelmä on evoluutiossa hyvin säilynyt: se esiintyy paitsi ihmisellä myös muilla selkärangkaisilla sekä useilla selkärangattomilla eliöillä (6). Tämä osaltaan viittaa sen asemaan keskeisenä signaalintijärjestelmänä eliömaailmassa.

Elimistössä esiintyy ainakin viittä eri endokannabinoidia, joita ovat arakidonyyli- etanolamiini (anandamidi), 2-arakidonyyliglyseroli (2-AG), N-arakidonyyli-dopamiini (NADA), O-arakidonyyli-etanolamiini (virodamiini) sekä 2-arakidonyyliglyserolieetteri (2-AGE, noladiini) (kuva 1). Näistä tunnetuimmat ovat anandamidi sekä 2-AG, joiden arvellaan olevan elimistön pääasiallisimmat endokannabinoidit.



Kuva 1. Endokannabinoidien rakennekaavoja. Anandamidi = arakidonyylietanolamiini, Virodamiini = O-arakidonyylietanolamiini, 2-AG = 2-arakidonyyliyglyseroli, Noladiini = 2-arakidonyyliyglyserolieetteri, NADA = N-arakidonyyliyidopamiini.

2-Arakidonyyliyglyseroli (2-AG) on erikoinen monoasyyliyglyseroli, jolla on todettu olevan merkittävä rooli soluvälitteisessä signaloinnissa. Sillä on keskeinen rooli keskushermostossa, missä se osallistuu mm. kivun, ruokahalun, motoriikan ja muistin säätelyyn. Elimistön puolustusjärjestelmän soluissa se taas osallistuu erityyppisten tulehdusreaktioiden ja immuunivasteiden säätelyyn. (7.)

Solut muodostavat 2-AG:ta vasteena useisiin erityyppisiin stimuluksiin.

Keskushermostossa 2-AG:ta syntyy etenkin kiihtyneen synaptisen transmission seurauksena, johon liittyy lisääntynyt fosfatidyyl-i-inositoli-metabolia ja kohonnut solunsisäinen kalsiumpitoisuus (7). 2-AG:lla kuten anandamidillakin on keskushermostossa erikoinen rooli retrogradisena välittäjäaineena: sitä vapautuu postsynaptisesta neuronista mutta sen sitoutuminen tapahtuu presynaptisessa neuronissa. Tällä mekanismilla 2-AG ja anandamidi ovat mukana säätelemässä nk. pitkäkestoista vahvistumista (long term potentiation, LTP) (8), jonka arvellaan olevan eräs tärkeä mekanismi muistin toiminnassa. Myös useat verisolut ja puolustusjärjestelmän solut tuottavat 2-AG:ta vasteena erilaisiin stimuluksiin; 2-AG tuotantoa on havaittu mm. lipopolysakkaridilla (LPS) stimuloituilla rotan verihiutaleilla (9), LPS-stimuloituilla rotan makrofageilla (10), verihiutaleita

aktivoivalla tekijällä (platelet activating factor, PAF) stimuloituilla ihmisen verihiutaleilla sekä PAF-stimuloituilla P388D1-makrofageilla (11).

2-AG:n tunnetuimmat vaikutukset välittyvät pääosin kannabinoidireseptorien kautta. 2-AG:n on todettu olevan todennäköisesti pääasiallinen endogeeninen kannabinoidireseptoriagonisti erityisesti kun tarkastellaan kannabinoideja-2-reseptoria (CB2-reseptori) (12).

Toinen tunnettu endokannabinoidi on anandamidi (N-arakidonoyylietanolamiini), jonka kudospitoisuus ja affiniteetti CB-reseptoreihin ovat kuitenkin alhaisemat kuin 2-AG:lla (12). Anandamidilla on yhtymistäipumusta CB-reseptorien lisäksi myös TRPV1-reseptoriin (transient receptor potential vanilloid-1-reseptori), joka on luonteeltaan ligandista riippuvainen, non-selektiivinen kationikanava. Se osallistuu mm. kipuimpulssin modulointiin perifeerisissä hermoissa. Anandamidin on todettu konsentraatiiriippuvaisesti kykenevän sekä aktivoimaan että inhiboimaan TRPV1-reseptoria (13, 14).

Vähemmän tunnettuja endokannabinoidia ovat NADA, noladiini sekä virodamiini joiden fysiologinen rooli on vielä pitkälti tuntematon. NADA:n on todettu muistuttavan vaikutuksiltaan anandamidia, koska se toimii sekä CB1- että TRPV1-reseptoriagonistina ja osallistuu mm. kivun säätelyyn (15). Sen on todettu myös kykenevän inhiboimaan endokannabinoidien hydrolyysiä katalysoivaa rasvahappo-amidihydrolaasia (16). Noladiini puolestaan aktivoi CB2-reseptoria yhtä voimakkaasti kuin 2-AG; toisaalta sen CB1-reseptoria aktivoiva vaikutus on noin kymmenen kertaa heikompi kuin 2-AG:lla (17). Se on kuitenkin eetterisidoksensa ansiosta huomattavasti metabolisesti stabiilimpi kuin 2-AG ja anandamidi (18). Virodamiini muistuttaa kemialliselta rakenteeltaan erittäin paljon anandamidia. Ainoastaan sidos, jolla arakidonihappo liittyy etanolamiiniin on erilainen: virodamiinissa on esterisidos, kun taas anandamidissa on amidisidos. Virodamiini on 2-AG:ta ja anandamidia heikompi CB1-reseptoriagonisti ja sillä on jopa lievä antagonistinen vaikutus CB1-reseptoriin 2-AG:n tai anandamidin läsnä ollessa. CB2-reseptoriin sillä puolestaan on voimakas aktivoiva vaikutus. Sen todettu myös häiritsevän anandamidin solunottoa, mikä viittaa yhteiseen kuljetusmekanismiin. (19.)

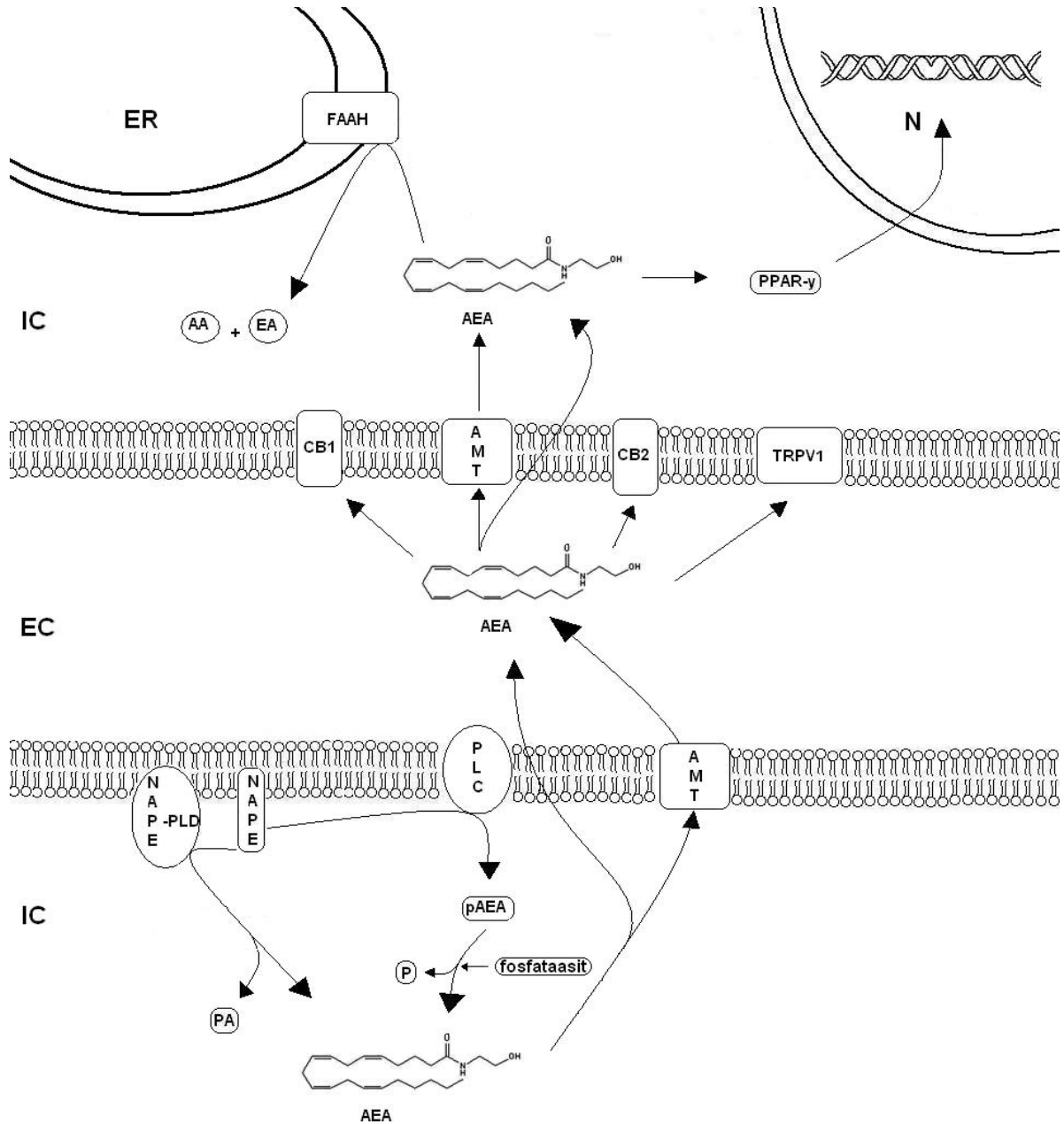
## 1.1 Endokannabinoidien muodostuminen ja metabolia

Endokannabinoidit ovat peräisin arakidonihappoa sisältävistä solukalvon lipideistä, joista niitä syntetisoidaan useiden eri entsyymien vaikutuksesta. Endokannabinoidia syntetisoidaan vain tarvittaessa mikä tarkoittaa, että ne eivät tämänhetkisen tietämyksen mukaan varastoidu soluihin. Koska tutkimustieto uusimpien endokannabinoidien kuten virodamiinin ja NADA:n suhteen on toistaiseksi puutteellista, käsittelen seuraavassa pääosin anandamidin sekä 2-AG:n metaboliaa (kuvat 2 ja 3).

Anandamidin muodostumisesta vastaa spesifinen fosfolipaasi-D (NAPE-PLD), joka katalysoi N-arakidonoyylifosfatidyylietanolamiinin (NAPE) hydrolyysiä anandamidiksi (20). Viimeisin tutkimustieto on osoittanut, että anandamidia voi muodostua myös kaksivaiheisessa reaktiossa, jossa fosfolipaasi-C (PLC) katalysoi fosfoanandamidin (pAEA) pilkkoutumista NAPE:sta, minkä jälkeen pAEA defosforyloituu erityisten fosfataasien avulla edelleen anandamidiksi (21). 2-AG on puolestaan peräisin solukalvon inositolifosfolipideistä, joiden hydrolyysiä katalysoi reaktiolle spesifinen PLC. Tuloksena syntyy diasyyloglyseroli (DAG), joka muuntuu edelleen 2-AG:ksi sn-1-DAG-lipaasin avulla (22, 23).

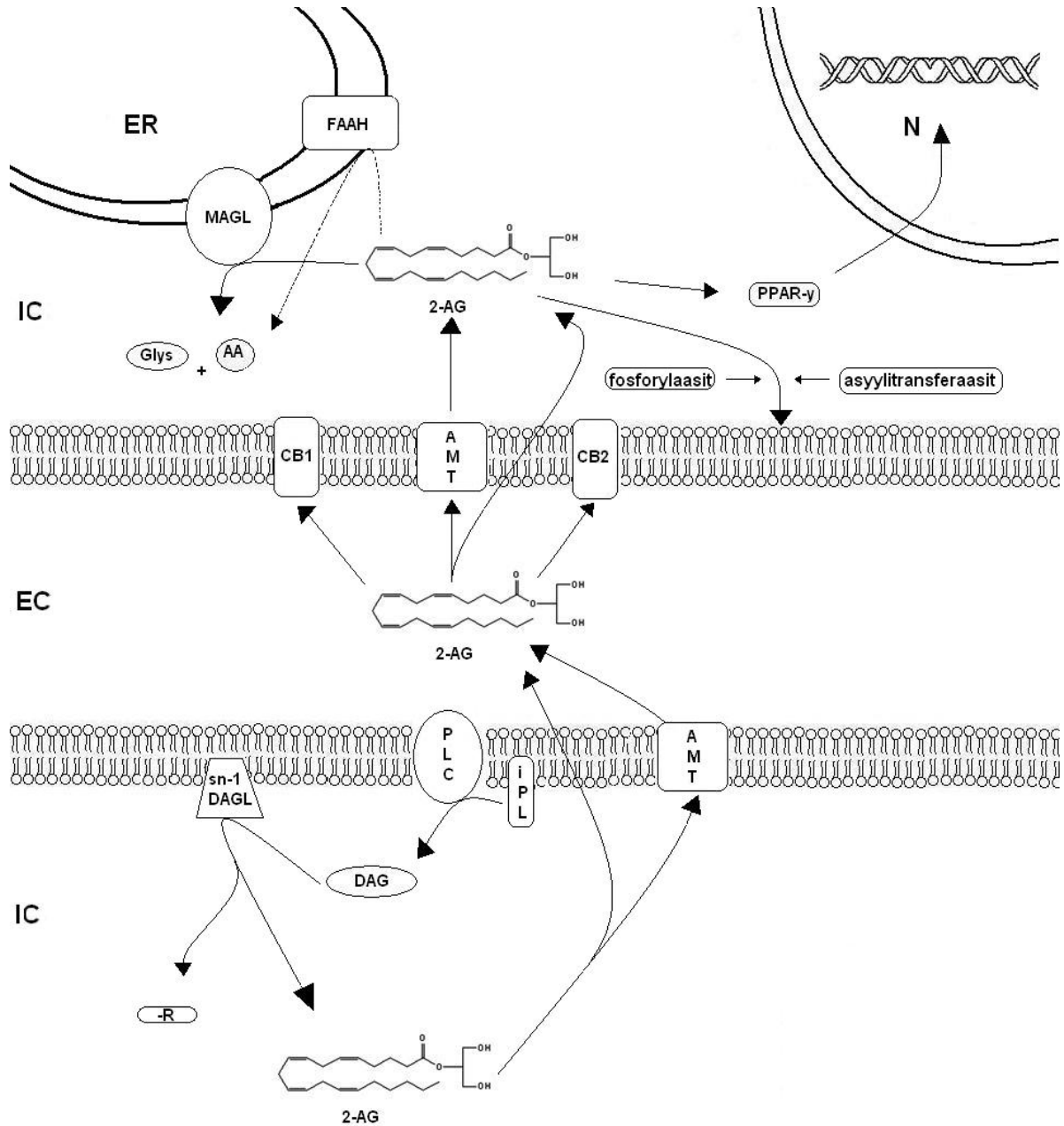
Muodostuttuaan 2-AG ja anandamidi siirtyvät solunulkoiseen tilaan joko passiivisen diffuusion tai mahdollisesti spesifisen kuljetusproteiinin avustamana (24, 25, 26). Solunulkoisessa tilassa endokannabinoidien vaikutus solukalvolla oleviin reseptoreihinsa on erittäin lyhyt. Ne otetaan nopeasti takaisin soluihin, joissa niiden kataboliaa katalysoivat useat eri entsyymit (27). Anandamidin hajottamisesta vastaa pääasiassa rasvahappoamidihydrolaasi (fatty acid amide hydrolase, FAAH). Reaktion tuloksena syntyy vapaata arakidonihappoa sekä etanolamiinia (28). 2-AG puolestaan hajoaa pääasiassa monoasyyloglyserolilipaasin (monoacylglycerol-lipase, MAGL) mutta myös FAAH:n vaikutuksesta. Reaktion seurauksena syntyy vapaata arakidonihappoa ja glyserolia (29). 2-AG kykenee myös suoraan esteröitymään takaisin kalvolipideihin sen vapaiden hydroksyyliyhymien fosforylaation ja/tai asylaation seurauksena. Endokannabinoidien metaboliaa voi ilmeisesti tapahtua jossain määrin myös niiden arakidonihappotähteen

entsyymaattisen oksidaation kautta lipoksygenaasin, syklo-oksigenaasi-2 tai p450-oksidaasien katalysoimana. (27.)



Kuva 2. Anandamidin pääasiallisimmat metaboliareitit ja sitoutumiskohdat. AA = arakidonihappo, AEA = anandamidi, AMT = endokannabinoidija siirtävä kuljetusproteiini, CB1 = CB1-reseptori, CB2 = CB2-reseptori, EA = etanolamiini, EC = solunulkoisen tila, ER = solulimakalvosto, FAAH = rasvahappoamidihydrolaasi, IC = solunsisäinen tila, N = tuma, NAPE = N-arakidonoyylifosfatidyylietanolamiini, NAPE-PLD = NAPE-spesifinen fosfolipaasi-D, P = fosfaatti, PA = fosfatidaatti, pAEA = fosfoanandamidi, PLC = fosfolipaasi-C, PPAR-γ = PPAR-γ-tumareseptori, TRPV-1 = TRPV1-reseptori.





Kuva 3. 2-AG:n pääasiällisimmat metaboliareitit ja sitoutumiskohtat. AA = arakidonihappo, AMT = endokannabinoideja siirtävä kuljetusproteiini, CB1 = CB1-reseptori, CB2 = CB2-reseptori, DAG = diasyyli glyseroli, sn-1-DAGL = sn-1-DAG-lipaasi, EC = solunulkoinen tila, ER = solulimakalvosto, FAAH = rasvahappoamidihydrolaasi, Glyc = glyseroli, IC = solunsisäinen tila, iPL = inositolifosfolipidi, MAGL = monoasyyli glyserolilipaasi, N = tuma, PLC = fosfolipaasi-C, PPAR- $\gamma$  = PPAR- $\gamma$ -tumareseptori, R = rasvahappotähde.

## 1.2 Kannabinoidireseptorit

Kannabinoidireseptoreja tunnetaan tällä hetkellä elimistössä kahdentyyppisiä: CB1-reseptorit, joita tavataan pääasiassa keskuhermostossa sekä CB2-reseptorit joita tavataan pääasiassa useissa eri leukosyyteissä (makrofagit/monosyytit, T8- ja T4-lymfosyytit, B-lymfosyytit, eosinofiilit, syöttösolut) sekä lymfaattisissa kudoksissa (suolen limakalvon lymfaattinen kudos, perna, imusolmukkeet) mutta myös tietyissä osissa aivorunkoa. CB1- ja CB2-reseptorit ovat rakenteeltaan 44-prosenttisesti identtisiä ja kuuluvat kummatkin seitsemän kertaa solukalvon lävistävien G-proteiinikytkettyjen reseptoriproteiinien perheeseen. (27.)

Pääasiallisin vaikutuksia välittävä G-proteiini kannabinoidireseptoreissa on ilmeisesti Gi/o, joka on negatiivisesti kytketty adenylaattisyklaasiin ja positiivisesti kytketty PLC:hen. Kannabinoidireseptorien aktivoitumisen seurauksia ovat siis mm. solunsisäisenä toisiolähtetä toimivan syklisen adenosinimonofosfaatin (cAMP) pitoisuuden lasku adenylaattisyklaasin inhiboituessa sekä solunsisäisen kalsiumpitoisuuden ( $[Ca^{2+}]$ ) nousu ja proteiinikinaasi-C:n aktivaatio PLC:n aktivaation seurauksena.

Osa endokannabinoidien vaikutuksista välittyy ilmeisesti ilman kannabinoidireseptorien osallisuutta. Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että miltei kaikki endokannabinoidit kykenevät aktivoimaan PPAR-tumareseptoreita (peroxisome proliferator-activated receptor) (30). PPAR-reseptorit kuuluvat tumareseptorien perheeseen ja niillä on merkittävä rooli elimistön lipidimetabolian, insuliiniherkkyyden, glukoosimetabolian ja tulehdusreaktioiden säätelyssä (31). Mekanismi, jolla endokannabinoidit aktivoivat PPAR-reseptoreita, ei ole vielä täysin selvillä. Mahdollisina vaihtoehtoina on, että ne kenties toimivat joko suoraan tai metaboloitumisen kautta PPAR-reseptoreihin sitoutuvina ligandeina tai että CB-reseptorien aktivaation seurauksena aktivoituvat solunsisäiset toisiolähtetijärjestelmät, kuten p38-MAPK, aktivoivat edelleen PPAR-reseptoreja.

### 1.3 Endokannabinoidit ja inflammaatio

Suuri määrä tutkimustietoa viittaa endokannabinoidisäätelyn osallisuuteen useissa eri inflammatorisissa tapahtumissa. Esimerkiksi anandamidin on todettu aiheuttavan annoksesta riippuvaisen mitogeenilla stimuloitujen T- ja B-lymfosyyttien proliferaation eston, joka ilmeisesti on seurausta anandamidin pro-apoptoottisesta vaikutuksesta kyseisillä soluilla. Endokannabinoidilla on ilmeisesti osansa myös multipelissa skleroosissa (MS-tauti), joka on keskushermoston tulehduksellinen autoimmuunisairaus: MS-potilailla on havaittu kohonneita pitoisuuksia anandamidia aivo-selkäydinnesteessä sekä heidän verestään eristetyissä perifeerisissä lymfosyyteissä verrattuna terveisiin kontroleihin. Nämä tulokset näyttävät viittaavan endokannabinoidisäätelyn osallisuuteen sairauden tulehduksellisessa komponentissa. (1.)

Myös 2-AG:n tiedetään osallistuvan usealla tavalla inflammaation säätelyyn erityisesti CB2-reseptorin välityksellä. Oka ym. (2005) tutkivat 2-AG:n ja CB2-reseptorin mahdollista osuutta hiiren korvassa iholle sivellyn tetradekanoyyliforboliaseatin (TPA) avulla indusoidussa akuutissa inflammaatiossa (32). He havaitsivat korvan 2-AG-pitoisuuden nousseen huomattavasti TPA:n lisäämisen jälkeen anandamidin pitoisuuden toisaalta pysyessä muuttumattomana. Mikä merkittävintä, kokeessa inflammaatioon liittyvän turvotuksen kehittyminen estyi täysin CB2-antagonisti SR144528 avulla muttei CB1-antagonisti AM251:n avulla. SR144528 vähensi paitsi turvotusta myös TPA:n indusoimaa leukotrieni-B4 tuotantoa sekä neutrofiilien infiltraatiota korvaan. Vastaavasti iholle sivelty 2-AG indusoi itsessään turvotusta hiiren korvassa ja vaikutus inhiboitui SR144528:n avulla. Edellä mainittu esimerkki sekä useat muut vastaavat tutkimukset osoittavat, että 2-AG:lla on merkittävä rooli erityyppisten inflammatoristen tilojen kehityksessä. (32.)

Tämänhetkisen tietämyksen mukaan endokannabinoidien fysiologinen rooli inflammatorisissa reaktioissa ja immuunivasteissa on seuraava: useat inflammatoriset ja immunititeettia säätelevät solut, kuten makrofagit (33, 34, 35, 36) ja dendriittisolut (37),

tuottavat stimuloituina endokannabinoidia ja vapauttavat niitä solunulkoiseen nesteeseen. Vapautuneiden endokannabinoidien sitoutuminen kohdesolujen CB-reseptoreihin moduloi erityyppisten kemokiinien, kuten IL-8:n, tuottoa. Tämä vaikuttaa neutrofiilien, makrofagien, dendriittisolujen, B-lymfosyyttien ja eosinofiilien migraatioon tulehduspaikalle. Endokannabinoidit vaikuttavat näin osaltaan tulehdusreaktion syntymisen ja kehittymisen säätelyyn.

## **1.4 Endokannabinoidit ja ateroskleroosi**

Ateroskleroosin eli valtimonkovettumataudin komplikaatiot, kuten sydän- ja aivoinfarktit ovat tällä hetkellä johtava kuolinsyy Suomessa sekä muissa länsimaissa. Ateroskleroosin korkea vallitsevuus länsimaissa on useiden eri riskitekijöiden seurausta, joista merkittävimpiä ovat dyslipidemia (veren korkea LDL- sekä alhainen HDL-pitoisuus), tupakointi, korkea verenpaine sekä tyypin I ja II diabetes. Ateroskleroosi on luonteeltaan tulehduksellinen sairaus jonka ominaispiirteisiin kuuluvat pääasiassa elastisten valtimoiden (kuten esimerkiksi sepelvaltimoiden) seinämissä sijaitsevat leesiot eli ateroskleroottiset plakit (38). Nämä leesiot sisältävät pääosin LDL-partikkeleista peräisin olevaa, osin muuntunutta kolesterolia, sidekudosta sekä tulehdussoluja kuten makrofageja, T-soluja ja syöttösoluja.

Nykykäsityksen mukaan veren kohonnut LDL-pitoisuus aiheuttaa LDL:n lisääntyneen siirtymisen valtimoiden sisäkerrokseen (intima), joka sepelvaltimoissa on erityisen paksu. Intimaan jouduttuaan LDL takertuu herkästi intiman sidekudosmatriksin proteoglykaaneihin. Tämä johtaa LDL:n retentoitumiseen intimaan, mikä ilmeisesti on ateroskleroosin patogeneesin kannalta olennainen tapahtuma. Intimassa ollessaan LDL altistuu muuntumiselle mm. hapettumisen kautta, minkä taas ajatellaan stimuloivan tulehduksen kehittymistä verisuonen seinämään.

Nykytiedon valossa verisuonen seinämän tulehdusprosessi on keskeinen ateroskleroosin etenemistä edistävä tekijä aina taudin varhaisista alkuvaiheista dramaattisiin päätetapahtumiin asti. Paikallisilla ja systeemisillä tulehdusmediaattoreilla, kuten

sytokiineilla, kemokiineilla sekä erilaisilla hormoneilla ja kasvutekijöillä, on merkittävä rooli ateroskleroottisen plakkin kehityksessä. Nämä säätelevät tulehdussolujen kulkeutumista verisuonen seinämään ja niiden aktiivisuutta plakissa sekä myös systeemisellä tasolla aikaansaavat pro-inflammatorisen tilan, joka kiihdyttää ateroskleroosin etenemistä. (38.)

Ateroskleroottisessa plakissa olevien tulehdussolujen, kuten makrofagien, T-solujen ja syöttösolujen tuottamat proteaasit ja sytokiinit johtavat ateroskleroottisen plakkin rakenteen haurastumiseen ja muuttumiseen repeämiseksi (39). Ateroskleroosin akuutit komplikaatiot ovat seurausta plakkin äkillisestä repeämisestä, joka johtaa paikallisen verihyytymän syntyyn ja edelleen verisuonen tukkeutumiseen. Kudoksissa, joissa kollateraalikierto on heikkoa, kuten sydämessä ja aivoissa, suonen tukkeutuminen voi johtaa kudoksen infarktoitumiseen varsin ikävin seurauksin.

Endokannabinoidisignaloinnin tarkkaa roolia erityyppisissä kroonisissa tulehdusairauksissa, kuten ateroskleroosissa, ei vielä tunneta. On kuitenkin vahvaa näyttöä, että endokannabinoidilla on oma osuutensa ateroskleroosin progression säätelyssä.

Steffens ym. (2005) tutkivat eksogeenisen kannabinoidireseptoriagonistin delta-9-tetrahydrokannabinolin (THC) vaikutusta ateroskleroosin etenemiseen hiirillä, joilla oli saatu aikaan hyperkolesterolemia ja ateroskleroottisia leesioita apolipoproteiini-E-geenideleetiolla (ApoE -/-). He havaitsivat THC:n inhiboivan jo syntyneiden leesioiden progressiota, johon liittyi lymfosyyttien heikentynyttä proliferaatiota ja gammainterferonin (IFN- $\gamma$ ) eritystä sekä makrofagien vähentynyttä infiltraatiota ateroskleroottiselle leesioalueelle. In vitro THC:n havaittiin inhiboivan monosyyttien kemotaktisen proteiini-1:n (MCP-1) indusoimaa makrofagien kemotaksista ja kemokiinireseptori CCR2:n vähentynyttä ekspressiota makrofageissa. Vaikutus inhiboitui CB2-reseptoriagonisti SR144528:n avulla, mikä viittaa THC:n aikaansaaman vasteen olleen mitä todennäköisimmin CB2-välitteinen. Tutkimuksessa todettiin myös CB2-reseptorin ilmentyvän sekä ihmisen että hiiren ateroskleroottisissa leesioissa, mutta ei vastaavissa terveissä valtimoissa. Tulokset viittaavat siis siihen että CB2-välitteisellä signaloinnilla on osuutensa ateroskleroosin progressiossa. (40.)

Dol-Gleizes ym. puolestaan tutkivat CB1-reseptoriantagonisti Rimonabantin vaikutusta ateroskleroosin kehitykseen hiirillä, joilta puuttui LDL-reseptori ja joita ruokittiin ”länsimaalaisella” ruokavaliolla kolmen kuukauden ajan. Tutkimuksessa havaittiin Rimonabantilla hoidetuilla rotilla merkitsevästi pienempiä ateroskleroottisia leesioita verrattuna kontrolleihin. Rimonabantti pienensi myös erilaisten pro-inflammatoristen sytokiinien, kuten MCP-1:n ja interleukiini-12:n, plasmapitoisuuksia, mikä viittaa CB1-antagonismin tulehdusta lievittäviin vaikutuksiin. (41.)

Myös ihmistutkimuksissa on havaittu endokannabinoidijärjestelmän aktivoitumista ateroskleroosin yhteydessä: Sugamura ym. (2009) havaitsivat CB1-reseptorien määrän olevan merkittävästi korkeampi epästabiilia angina pectorista sairastavien potilaiden sepelvaltimonäytteissä verrattuna stabiilia angina pectorista sairastaviin. Reseptoreista valtaosan todettiin paikallistuvan ateroskleroottisissa leesioissa oleviin makrofageihin. He havaitsivat myös CB1-reseptorien määrän lisääntymistä ja CB2-reseptorien määrän vähenemistä viljellyissä ihmisen makrofageissa, kun niitä stimuloitiin ateroskleroottisessa plakissa esiintyvillä pro-inflammatorisilla aineilla, kuten hapettunut LDL (ox-LDL) sekä makrofagikasvutekijä M-CSF. Samassa tutkimuksessa havaittiin myös kohonneita endokannabinoidipitoisuuksia sepelvaltimotautia sairastavien potilaiden veressä verrattuna terveisiin kontrolleihin. (42.)

## **1.5 Endokannabinoidit ja soluväliaineen metalloproteinaasit**

Soluväliaineen metalloproteinaasit (92 kDa:n gelatinaasi/MMP-9 ja muut MMP:t) ovat erilaisten solutyypin erittämiä entsyymejä. Ne kykenevät hajoittamaan useimpia soluväliaineen proteiineja, erityisesti eri kollageenityyppejä, jotka ovat soluväliaineen keskeisimpiä rakenneproteiineja. Metalloproteinaaseilla on roolinsa mm. normaalissa kudoksen uusiutumisessa, haavojen paranemisessa, tulehdusreaktioissa sekä syöpäkudoksen kasvussa. On arveltu että ateroskleroottisessa plakissa olevien solujen, erityisesti makrofagien, erittämät MMP:t heikentävät plakin rakennetta ja altistavat sen repeämiseksi, mikä edesauttaa trombimuodostuksen kautta sydän- ja aivoinfarktien syntymistä (43). Vaikuttamalla näiden entsyymien erityykseen olisi kenties mahdollista estää

tai hidastaa ateroskleroottisen plakkin kehittyminen repeämiseksi.

Metalloproteinaasien erityistä plakissa säätelevät useat eri valkosolujen erittämät tulehdusvälittäjäaineet. Mahdollista endokannabinoidisignaalin osuutta tässä säätelyssä ei tunneta. Kuitenkin ottaen huomioon solunsisäiset signaalijärjestelmät, joihin endokannabinoidien tiedetään vaikuttavan, on kuviteltavissa, että endokannabinoidit voisivat jollain tavoin MMP-eritykseen vaikuttaa. Esimerkiksi p38-MAPK-reitin aktivoitumisen on osoitettu stimuloivan MMP-9:n eritystä humaaneilla monosyyteillä (44). Vastaavasti 2-AG:n on todettu aktivoivan kyseistä signaalintireittiä makrofagintapaisilla HL-60-soluilla (45). Toisaalta PPAR-gamma-reseptorin aktivaation on todettu vähentävän MMP-9-eritystä (46). Endokannabinoidista ainakin 2-AG:n ja anandamidin on todettu kykenevän aktivoimaan PPAR- $\gamma$ -reseptoria (30).

Aiempiä tutkimuksia endokannabinoidien vaikutuksista eri solutyypin MMP-eritykseen on niukasti. Sugamura ym. (2009) havaitsivat CB1-antagonisti Rimonabantin vähentävän merkittävästi THP-1-soluista erilaistuneiden, LPS-stimuloitujen makrofagien MMP-9-eritystä. Tutkimuksessa ei kuitenkaan selvinnyt, oliko entsyymien heikentynyt erityis suoraa seurausta CB1-antagonismista vai johtuiko se välillisesti kenties vähentyneestä sytokiinituotannosta. (42). Rosch ym. (2006) puolestaan havaitsivat THC:n ja anandamidin lisäävän MMP-1:n, MMP-3:n, MMP-9:n sekä matriksin metalloproteinaasien kudospäisen inhibiittori-1:n (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMP-1) eritystä pigmentoitumattomilla humaaneilla siliaarisoluilla (47). Kannabinoidien ja endokannabinoidien on lisäksi havaittu estävän syöpäkudoksen kasvua ja metastasoitumista mm. TIMP-1- ja MMP-eritykseen vaikuttamalla (48).

Kirjallisuuden perusteella on siis mahdollista että endokannabinoidit voisivat vaikuttaa ateroskleroosin patogeneesiin myös tulehdussolujen MMP-eritykseen vaikuttamalla. Tässä tutkimuksessa halusimme tutkia, onko endokannabinoidella suoraa vaikutusta inflammaatiassa keskeisesti mukana olevan, tyypin IV kollageenia hajottavan MMP-9:n (49) eritykseen *in vitro* monosyyttimallissa. Tämän mahdollisen yhteyden selvittäminen auttaa ymmärtämään ateroskleroosiin liittyvän tulehduksen mekanismeista sekä antaa mahdollisesti uusia farmakologisia näkökulmia ateroskleroosin progression hidastamiseen

endokannabinoidisysteemiin vaikuttamisen kautta.

## 2 AINEISTO JA MENETELMÄT

### 2.1 Soluviljely

Endokannabinoidien vaikutusta *in vitro* tutkittiin käyttäen monosyytti-makrofagimallia (humaanit MonoMac 6 -solut) (50). Soluviljelmissä käytetyt solut ovat kaupallisesti saatavissa olevia immortaaleja solulinjoja. Soluja pidettiin yllä RPMI-1640-kasvumediumissa (BioWhittaker, Belgia), johon oli lisätty 2 mM L-glutamiinia, 5 ml/l non-essentiellejä aminohappoja, penisilliiniä (50 IU/ml), streptomysiiniä (100 µg/ml), 1 mM natriumpyruvaattia, 1 mM oksaloasetattia, 0,2 U/ml naudan insuliinia (OPI Media Supplement, Sigma Chemicals Co) sekä 10 % kuumakäsiteltyä naudan sikiöperäistä seerumia (FBS). Soluja viljeltiin tiheyksillä  $0,3-1 \times 10^6$  solua/ml (37 °C:n lämmössä 5-prosenttisessa hiilidioksidissa).

### 2.2 Endokannabinoidikäsitteilyt

Tutkiaksemme endokannabinoidien vaikutusta monosyyttien MMP-9-ekspressioon inkuboimme MonoMac-6 -soluja vaihtelevissa konsentraatioissa anandamidia, 2-AG:ta ja noladiinia 24 tunnin ajan. Noladiinilla ei nykytiedon mukaan ole fysiologista roolia ihmiselimestössä. Päädyimme kuitenkin käyttämään myös sitä kokeissamme koska se on huomattavan metabolisesti stabiili verrattuna muihin endokannabinoideihin.

Käyttämämme anandamidi- ja 2-AG-konsentraatiot olivat 10 nM, 100 nM, 1 µM sekä 10



$\mu\text{M}$ . Noladiinista käytimme korkeampia konsentraatioita (270 nM, 2,7  $\mu\text{M}$ , 13,7  $\mu\text{M}$  ja 27,5  $\mu\text{M}$ ) mikä johtuu sen merkittävästi 2-AG:ta ja anandamidia alhaisemmasta affiniteetista erityisesti CB2-reseptoriin.

Positiivisina kontroleina käytimme arakidonihapolle (10  $\mu\text{M}$ ) tai PMA:lle (1,3 nM) altistettuja soluviljelmiä. PMA:lla ja arakidonihapolla on aiemmin dokumentoitu MMP-9-eritystä MonoMac-6 -soluilla lisäävä vaikutus (53). Lisäksi koska anandamidi ja noladiini annosteltiin soluviljelmiin etanoliin liuotettuna, oli näissä kokeissa kontrollinäytteenä lisäksi soluviljelmä, joka altistettiin vastaavalle enimmäismäärälle pelkkää etanolia (0,1 tilavuusprosenttia).

Kokeita varten solut kerättiin ja ne kylvettiin 12-kuoppaisille Nunclon-levyille (Nunc A/S, Tanska) tiheydellä  $0,8 \times 10^6$  solua/ml seerumivapaaseen kasvumediumiin (X-Vivo 15, BioWhittaker, Belgia), johon oli lisätty penisilliiniä ja streptomysiiniä

Käsittelyjen jälkeen solumediumit eroteltiin talteen zymografiaa varten sentrifugoimalla näytteitä 10 000 rpm 10 minuutin ajan. Solupelletit pestiin 1-prosenttisellä fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS) ja liuotettiin 10-prosenttiseen SDS-NaOH-liuokseen. Näytteiden proteiinipitoisuus määritettiin Lowryn metodilla.

## 2.2 Zymografia

Monosyyttien MMP-9-eritystä tutkittiin soluviljelymediumeista zymografian eli substraattigeelielektroforeesin (51, 52) avulla. Menetelmän avulla voidaan molekyylipainon perusteella elektroforeettisesti erottaa näytteen erityyppiset entsyymifraktiot (tässä tapauksessa MMP-9 ja MMP-2) toisistaan ja määrittää entsyymifraktioiden aktiivisuus epäsuorasti entsyymin substraatin (tässä tapauksessa gelatiinin) hajoamisen kvantifioinnin kautta. Näin voidaan päätellä, kuinka paljon näyte sisältää tiettyä entsyymifraktiota.

Soluinkubaatioista kerätyt medium-näytteet laimennettiin elektroforeesi-näytepuskurilla ja

niille suoritettiin elektroforeesi 10-prosenttisella SDS-polyakryyliamidigeelillä, johon oli lisätty 1 mg/ml gelatiinia (Sigma) entsyymisubstraatiksi. Elektroforeesien ajoon käytimme Mini-PROTEAN II -laitetta 4 °C:n lämpötilassa. Elektroforeesin jälkeen entsyymit renaturoitiin kahdella 30 minuutin huuhtelulla 0,25-prosenttisella Triton X-100 -liuoksella, minkä jälkeen entsyymireaktioiden annettiin tapahtua inkuboimalla geelejä aktivaatio-puskuriliuoksessa (50 mM Tris-HCL-liuos, johon lisätty 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 μM ZnCl<sub>2</sub> ja 1% Triton X-100) 18 tunnin ajan 37 °C:n lämmössä. Tämän jälkeen geelit värjättiin liottamalla niitä 0,1-prosenttisella Coomassie Brilliant Blue-liuoksessa (40-prosenttinen 2-propanoli) 1,5 tunnin ajan, jonka jälkeen väri huuhdeltiin geeleistä 7-prosenttisellä etikkahappo-liuoksella 3 tunnin ajan. Geelillä olevien entsyymien molekyylipainon osoittajana käytimme BenchMark™ Protein Ladder -valmistetta (Invitrogen). Geeleissä oleva gelatiini värjäytyy muuten siniseksi, mutta metalloproteinaasiaktiivisuutta sisältävät kohdat jäävät värjäytymättä.

## 2.3 Kuvien analysointi

Geeleissä tapahtuneen gelatiinin entsyymaattisen hajoamisen määrää kvantifioitiin käyttämällä Epson Photo -skanneria tietokoneeseen kytkettynä. Geelit skannattiin digitaaliseen muotoon harmaasävyisenä Epson Scan -ohjelmiston avulla. Kuvien pikselitiheys kooditettiin asteikolle 1 (täysin läpinäkyvä) – 255 (läpinäkymätön). Skanneri kalibroitiin Stouffer Graphics -harmaakortin avulla. Kuvat analysoitiin Scion Image-ohjelmistolla (Scion Corporation). Tiheysmittaukset linearisoitiin Scion Image-ohjelmistossa olevaa Rodbard curve-fitting -toimintoa apuna käyttäen. Pikselitiheys määritettiin (taustatiheyden vähennyksen jälkeen) ja sitä käytettiin yksittäisten zymografiaraitojen integroidun tiheyden laskemiseen. MMP-9:n gelatinolyyttistä aktiivisuutta kuvaavan integroidun tiheyden suuruus suhteutettiin mitattuun proteiinikonsentraatioon ja ilmoitettiin muodossa pikseli-intensiteetin tilavuusyksikköä neliömillimetriä kohden.

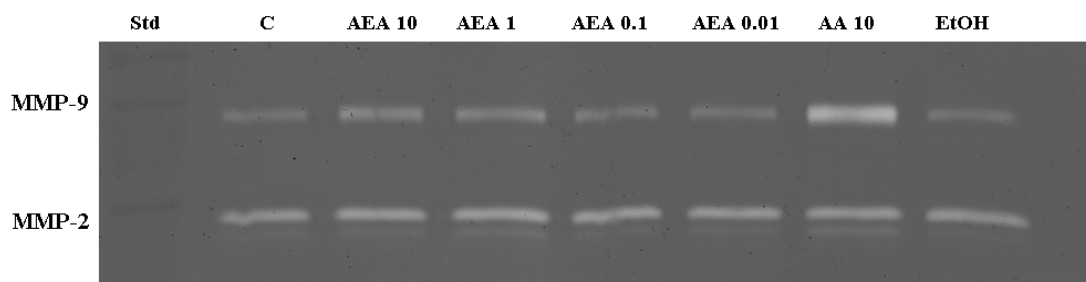
## 2.4 Aineiston analysointi

Saadusta aineistosta laskettiin endokannabinoidien suhteellinen vaikutus MMP-9 eritykseen verrattuna kontrollisolunäytteeseen. Tulokset on ilmoitettu erityksen muutoksen keskiarvoina  $\pm$  keskivirhe nollanäytteeseen verrattuna.

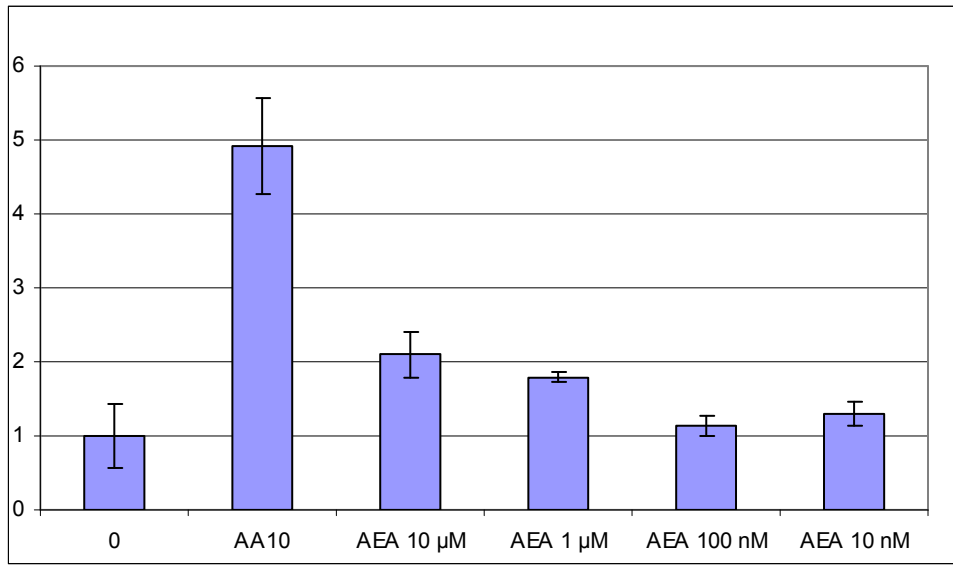
## 3 TULOKSET

MMP-9-eritys lisääntyi anandamidin sekä noladiinin vaikutuksesta (kuvat A ja B, diagrammit 1 ja 2). Suurin vaikutus oli 10 mikromolaarisella anandamidilla, joka kaksinkertaisti MMP-9-erityksen ( $2,10 \pm 0,31$  n=4) (kuva A, diagrammi 1). Noladiini lisäsi voimakkaimmin eritystä konsentraatiolla  $2,7 \mu\text{M}$  ( $1,95 \pm 0,49$ -kertainen lisäys, n = 6) (kuva B, diagrammi 2). 2-AG:lla ei havaittu olevan vaikutusta MMP-9-eritykseen (kuva C, diagrammi 3).

A

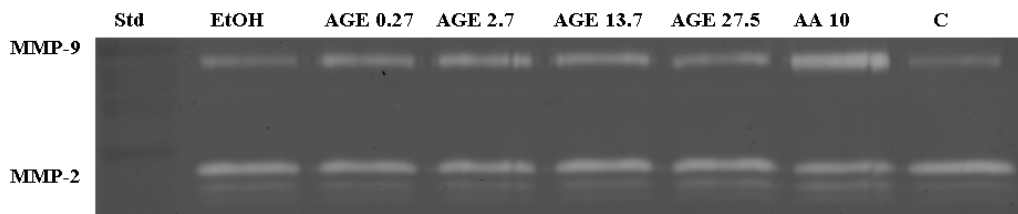


Kuva A. Anandamidin vaikutus eri konsentraatioilla (10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 100 nM, 10 nM) MonoMac-6-solujen MMP-9- ja MMP-2-eritykseen 24 tunnin soluinkubaatiossa. C = kontrolli, AA10 = 10 mikromolaarinen arakidonihappo (positiivinen kontrolli), EtOH = 0,1-prosenttinen etanoli

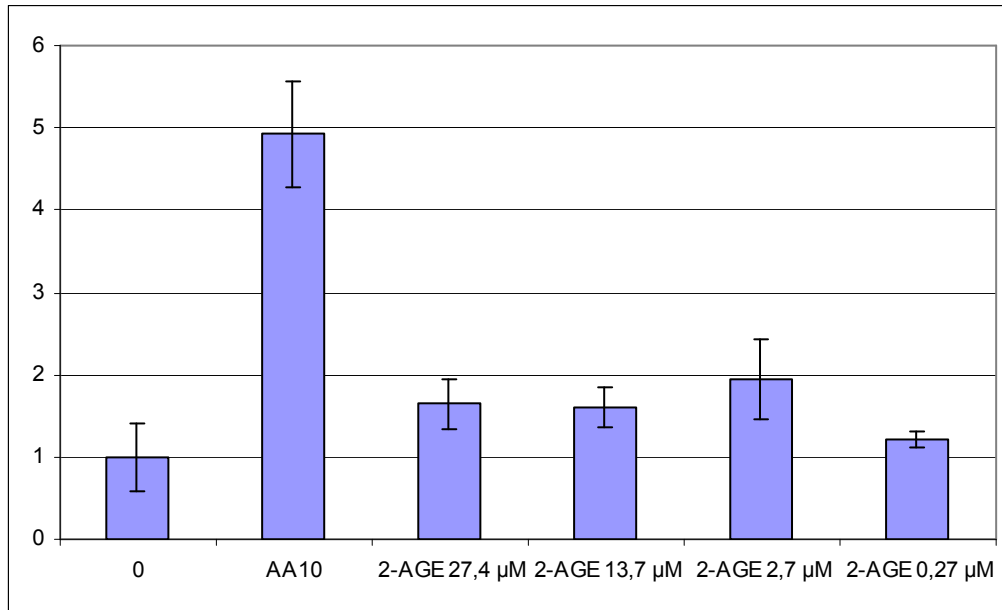


Diagrammi 1. Anandamidin vaikutus eri konsentraatioilla MonoMac-6-solujen MMP-9-eritykseen 24 tunnin soluinkubaatiossa. Taulukossa esitetyt tulokset ovat keskiarvoja  $\pm$  keskivirhe neljästä erillisestä soluinkubaatiosta. 0 = kontrolli, AA10 = 10 mikromolaarinen arakidonihappo (positiivinen kontrolli), AEA = anandamidi (neljä eri konsentraatiota).

B

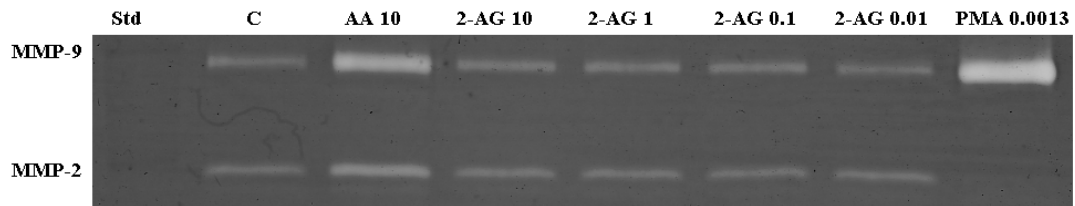


Kuva B. Noladiinin (2-AGE) vaikutus eri konsentraatioilla (27,5  $\mu$ M, 13,7  $\mu$ M, 2,7  $\mu$ M, 0,27  $\mu$ M) MonoMac-6-solujen MMP-9- ja MMP-2-eritykseen 24 tunnin soluinkubaatiossa. C = kontrolli, AA10 = 10 mikromolaarinen arakidonihappo (positiivinen kontrolli), EtOH = 0,1-prosenttinen etanoli

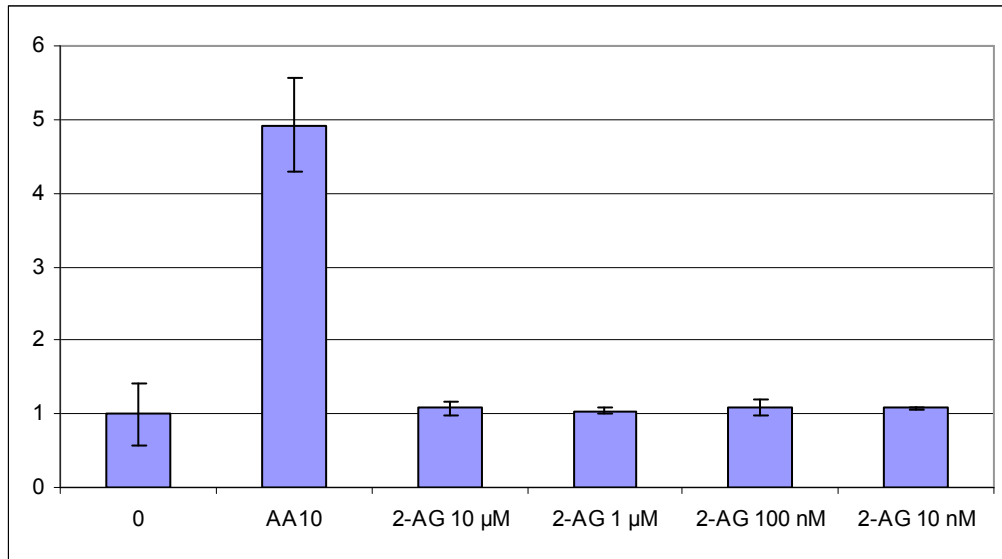


Diagrammi 2. Noladiinin vaikutus eri konsentraatioilla MonoMac-6-solujen MMP-9 eritykseen 24 tunnin soluinkubaatiossa. Taulukossa esitetyt tulokset ovat keskiarvoja  $\pm$  keskivirhe kuudesta erillisestä soluinkubaatiosta. 0 = kontrolli, AA10 = 10 mikromolaarinen arakidonihappo (positiivinen kontrolli), 2-AGE = noladiini (neljä eri konsentraatiota).

C



Kuva C. 2-AG:n vaikutus eri konsentraatioilla MonoMac-6-solujen MMP-9-eritykseen 24 tunnin soluinkubaatiossa neljällä eri konsentraatiolla (10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 100 nM, 10 nM). Taulukossa esitetyt tulokset ovat keskiarvoja  $\pm$  keskivirhe kuudesta erillisestä soluinkubaatiosta. C = kontrolli, PMA 0,0013 = 1,3 nanomolaarinen PMA (positiivinen kontrolli), AA10 = 10 mikromolaarinen arakidonihappo (positiivinen kontrolli).



Diagrammi 3. 2-AG:n vaikutus eri konsentraatioilla MonoMac-6-solujen MMP-9-eritykseen 24 tunnin soluinkubaatiossa. Taulukossa esitetyt tulokset ovat keskiarvoja  $\pm$  keskivirhe kahdesta erillisestä soluinkubaatiosta. 0 = kontrolli, AA10 = 10 mikromolaarinen arakidonihappo (positiivinen kontrolli).

## 4 POHDINTA

Tämän tutkimuksen tulokset osaltaan viittaavat siihen että endokannabinoidilla saattaisi todellakin olla vaikutusta monosyyttien MMP-9-eritykseen. Kuitenkin kokeissa havaitsemani vaikutus oli melko vaatimaton ja sen suuruudessa oli runsasta vaihtelua kokeiden välillä.

Anandamidin ja 2-AG:n ongelmana tutkimuksessani on niiden nopea soluunotto ja metabolia CB-reseptorien kannalta inaktiivisiksi yhdisteiksi, kuten arakidonihapoksi ja glyseroliksi. Noladiinilla taas on melko alhainen affiniteetti CB2-reseptoriin eikä sillä toistaiseksi ole dokumentoitua roolia inflammatoristen solujen fysiologisena säätelijänä. Myös havaitsemani MMP-9-erityksen lisäys saattaa osaltaan selittyä endokannabinoidien metabolian lopputuotteena syntyvän vapaan arakidonihapon dokumentoidulla vaikutuksella monosyyttien MMP-9-eritykseen (53), etenkin anandamidin ollessa kyseessä. Tämä ei kuitenkaan ole kovinkaan todennäköistä noladiinin aiheuttamassa erityksen

lisääntymisessä, sillä noladiini ei nykytiedon mukaan juurikaan metaboloitu vapaaksi arakidonihapoksi (27). On myöskin erikoista, että 2-AG ei lisännyt MMP-9-eritystä lainkaan, vaikka myös 2-AG metaboloituu lopulta vapaaksi arakidonihapoksi ja siten saattaisi eritystä lisätä.

Toisaalta on kenties mahdollista, että vapaan arakidonihapon aiheuttama MMP-9-erityksen lisäys olisi välillisesti seurausta kohonneista endokannabinoidipitoisuuksista soluissa, esimerkiksi vapaan arakidonihapon mahdollisesti vaikuttaessa endokannabinoidija metaboloivien entsyymien reaktiotasapainoihin. Tutkimani endokannabinoidit (2-AG, noladiini, anandamidi) ovat saattaneet myös vaikuttaa eräiden tulehdusreaktiota säätelevien sytokiinien eritykseen ja tätä kautta välillisesti MMP-9-eritykseen.

Tekemissäni kokeissa havaitsin runsasta vaihtelua MMP-9-erityksen lisääntymisen suuruudessa vasteena endokannabinoidille yksittäisten kokeiden välillä; erityisen suurta vaihtelu oli noladiinin vaikutuksessa. Tälle havainnolle on kuviteltavissa useita mahdollisia syitä; eräs todennäköisimmistä lienee se, että solujen olosuhteet eivät olleet täysin samanlaisia eri kokeiden välillä. Tähän viittaa osaltaan se, että MMP-9:n erityksessä oli suurta vaihtelua myös kontrollisoluviljelmissä eri kokeiden välillä. Piilevä solunsisäinen mikrobi-infektio (esim. mykoplasman aiheuttamana) soluviljelmissä on tekijä, joka osaltaan on saattanut vaikuttaa solujen endokannabinoidiherkkyyteen ja MMP-9-eritykseen.

Tutkimuksemme tulokset herättävät useita eri kysymyksiä, joiden selvittämiseksi lisätutkimukset ovat tarpeen. Tulevissa tutkimuksissa olisi mielenkiintoista selvittää esimerkiksi mRNA-määrityksillä, miten ja kuinka nopeasti endokannabinoidit mahdollisesti vaikuttavat MMP-9:n geeniekspressioon. Toisaalta olisi myös hyödyllistä selvittää tapahtuuko havaitsemamme vaikutus CB-reseptorien aktivaation seurauksena vai kenties jonkin muun reitin kautta. Tätä voisi selvittää esimerkiksi CB-reseptoriantagonistien avulla. Hiljattain ilmestyneessä tutkimuksessa Montecucco ym. (2009) havaitsivat CB2-antagonisti SR144528:n merkitsevästi vähentävän humaanien monosyyttien MMP-9-eritystä *in vitro* (54). Tämä osaltaan tukee hypoteesiamme, että kokeissa havaitsemamme vaikutus todellakin on kannabinoidireseptorivälitteinen.

On myös kuvattu, että monosyyttisen erilaistuminen makrofageiksi vaikuttaa suuresti niiden ilmentämien CB-reseptoreiden profiiliin. Monosyytit ilmentävät normaalitilassa ylivoimaisesti enemmän CB2-reseptoria CB1-reseptoriin verrattuna (THP-1 -soluilla CB1:CB2 = 1:17,5). Erilaistuminen makrofageiksi muuttaa reseptorien keskinäistä suhdetta niin että CB1-reseptorien ekspresio lisääntyy huomattavasti CB2-reseptorin ekspresion samalla vähentyessä. (55). Tätä monosyyttien erilaistumisasteen vaikutusta havaittuun endokannabinoidien stimuloiman MMP-9-erityksen lisääntymiseen olisi myös hyödyllistä selvittää tulevissa tutkimuksissa.

Myös erilaisten fytokannabinoidien vaikutusta havaitsemaamme ilmiöön olisi mielenkiintoista tutkia. Onhan havaittu että eräillä fytokannabinoidilla kuten THC:lla ja kannabidiolilla (CBD) on anti-inflammatorisia vaikutuksia (56). Kuitenkaan näiden yhdisteiden vaikutuksesta tulehdussolujen MMP-eritykseen ei toistaiseksi juurikaan ole tutkimustietoa.

Kokonaisuudessaan ateroskleroosin ja endokannabinoidijärjestelmän keskinäisessä suhteessa on vielä paljon epäselvää. Tulevaisuudessa tieto aiheesta tulee epäilemättä lisääntymään, ja kenties jonain päivänä voimme ehkäistä ja hoitaa ateroskleroosia tehokkaasti myös endokannabinoidijärjestelmää moduloivilla lääkeaineilla.



## LÄHTEET

1. Burstein SH, Zurier RB. Cannabinoids, endocannabinoids, and related analogs in inflammation. *AAPS Journal*. Vol 11(1) (2009) ss.109-19
2. Lambert DM, Muccioli GG. Endocannabinoids and related N-acylethanolamines in the control of appetite and energy metabolism: emergence of new molecular players. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. Vol 10(6) (2007) ss.735-44
3. Battista N, Pasquariello N, Di Tommaso M, Maccarrone M. Interplay between endocannabinoids, steroids and cytokines in the control of human reproduction. *Journal of Neuroendocrinology*. 20 Vol 1 (2008) ss.82-89
4. Hashimoto Y, Ohno-Shosaku T, Kano M. Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. *Neuroscientist*. Vol 13(2) (2007) ss.127-37
5. Hillard CJ. Endocannabinoids and vascular function. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*. Vol 294(1) (2000) ss.27-32
6. Fasano S, Meccariello R, Cobellis G. ym. The endocannabinoid system: an ancient signaling involved in the control of male fertility. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol 1163 (2009) ss.112-24
7. Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Progress in Lipid Research*. Vol 45(5) (2006) ss. 405-46
8. Slanina KA, Roberto M, Schweitzer P. Endocannabinoids restrict hippocampal long-term potentiation via CB1. *Neuropharmacology*. Vol 49(5) (2005) ss.660-68.
9. Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, Kunos G. Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension, *FASEB J* Vol 12 (1998), ss. 1035–1044
10. Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L, Melck D, Orlando P, Wagner J.A *et al.*, Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages, *European Journal of Biochemistry*. Vol 264 (1999), ss. 258–26
11. Berdyshev EV, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid HHO, Activation of PAF receptors results in enhanced synthesis of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in immune cells. *FASEB J* Vol 15 (2001), ss. 2171–78

12. Sugiura T. Kondo S. Kishimoto S. ym. Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor, *Journal of Biological Chemistry*. Vol 275(1) (2000) ss. 605-12
13. Di Marzo, V., L. De Petrocellis, F. Fezza, ym. 2002. Anandamide receptors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. Vol 66(2002) ss. 377–91.
14. Van Der Stelt, M., M. Trevisani, V. Vellani, ym. Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying Ca<sup>2+</sup>-influx via TRPV1 channels. *EMBO J*. Vol 24 (2005) ss.3517–28
15. Walker JM. Krey JF. Chu CJ. Huang SM. Endocannabinoids and related fatty acid derivatives in pain modulation. *Chemistry & Physics of Lipids*. Vol 121(1-2) (2002) ss.159-72
16. Bisogno T. Melck D. Bobrov MY ym. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochemical Journal*. Vol 351 (3) (2000) ss.817-24
17. Shoemaker JL. Joseph BK. Ruckle MB ym. The endocannabinoid noladin ether acts as a full agonist at human CB2 cannabinoid receptors. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*. Vol 314(2) (2005) ss.868-75
18. Sugiura T. Kodaka T. Nakane S. ym. Evidence that the cannabinoid CB1 receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor. Structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds. *Journal of Biological Chemistry*. Vol 274(5) (1999) ss.2794-801.
19. Porter AC. Sauer JM. Knierman MD. ym. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*. Vol 301(3) (2002) ss.1020-24
20. Okamoto Y. Morishita J. Tsuboi K. ym. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *Journal of Biological Chemistry*. Vol 279 (2004) ss. 5298–305
21. Liu J. Wang L. Harvey-White J. ym. A biosynthetic pathway for anandamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol 103(36) (2006) ss.13345-50
22. Stella N. Schweitzer P. Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates longterm potentiation. *Nature*. Vol 388 (1997) ss. 773–78
23. Bisogno T. Howell F. Williams G. ym. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *Journal Of Cell Biology*. Vol 163 (2003) ss.463–68

24. Beltramo M. Stella N, Malignano A. ym. Functional role of high-affinity anandamide transport as revealed by selective inhibition. *Science*. Vol 277 (1997) ss. 1094–97
25. Beltramo M. Piomelli D. Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-Arachidonoyl-glycerol. *NeuroReport*. Vol 11(2000) ss.1231–35
26. Mechoulam R. Deutsch DG. 2005. Toward an anandamide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol 102 (2005) ss.17541–42
27. De Petrocellis L. Cascio MG. Di Marzo V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *British Journal of Pharmacology*. Vol 141 (5) (2004) ss.765-74
28. McKinney MK. Cravatt BF. 2005. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annual Review of Biochemistry* .Vol 74 (2005) ss.411–32
29. Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM. ym. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol 99 (2002) ss. 10819–24
30. O'Sullivan SE. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *British Journal of Pharmacology*. Vol 152(5) (2007) ss.576-82
31. Chinetti G. Fruchart J-C. Staels B. Peroxisome proliferator activated receptors and inflammation: from basic science to clinical applications, *International J of Obesity* Vol 27(2003), ss. 41-45
32. Oka S. Yanagimoto S. Ikeda S. ym. Evidence for the involvement of the cannabinoid CB2 receptor and its endogenous ligand 2-arachidonoylglycerol in 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced acute inflammation in mouse ear. *Journal of Biological Chemistry*. Vol 280 (2005) ss.18488–97
33. Bisogno T. Sepe N. Melck D. ym. Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. *Biochemistry Journal* Vol 322 (1997) ss. 671–77
34. Di Marzo V. Bisogno T. De Petrocellis L. ym. Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages, *European Journal of Biochemistry*. Vol 264 (1999) ss. 258–67
35. Berdyshev EV. Schmid PC. Krebsbach RJ. Schmid HHO. Activation of PAF receptors results in enhanced synthesis of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in immune cells. *FASEB Journal* Vol 15 (2001) ss. 2171–78
36. Liu J. Batkai S. Pacher P. ym. Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF- $\kappa$ B independently of platelet-activating factor. *Journal of Biological Chemistry* Vol 278 (2003) ss. 45034–39

37. Matias I. Pochard P. Orlando P. ym. Presence and regulation of the endocannabinoid system in human dendritic cells, *European Journal of Biochemistry*. Vol 269 (2002) ss. 3771-78
38. Glass CK. Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. Vol 104(4) (2001) ss.503-16
39. Galis ZS. Vulnerable plaque: the devil is in the details. *Circulation*. Vol 110(3) (2004) ss.244-46
40. Steffens S. Veillard NR. Arnaud C. ym. Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature*. Vol 434(7034) (2005) ss.782-86
41. Dol-Gleizes F. Paumelle R. Visentin V. ym. Rimonabant, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*. Vol 29(1) (2009) ss.12-18
42. Sugamura K. Sugiyama S. Nozaki T . ym. Activated endocannabinoid system in coronary artery disease and antiinflammatory effects of cannabinoid 1 receptor blockade on macrophages. *Circulation*. Vol 119(1) (2009) ss.28-36
43. Lindstedt KA. Kovanen PT. Proteolysis of pericellular matrix: a process linking inflammation to plaque destabilization and rupture. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*. Vol 24 (2004) ss. 2205-06
44. Nguyen J. ym. Protein tyrosine kinase and p38 MAP kinase pathways are involved in stimulation of matrix metalloproteinase-9 by TNF- $\alpha$  in human monocytes. *Immunology Letters*. Vol 106 (2006) ss. 34-41
45. Sugiura T. Oka S. Gokoh M. ym. New perspectives in the studies on endocannabinoid and cannabis: 2-arachidonoylglycerol as a possible novel mediator of inflammation. *Journal of Pharmacological Sciences*. Vol 96 (4) (2004) ss. 367-75
46. Chinetti G. Fruchart J-C. Staels B. Peroxisome proliferator activated receptors and inflammation: from basic science to clinical applications. *International Journal of Obesity*. Vol 27 (2003) ss. 41-45
47. Rosch S. Ramer R. Brune K. Hinz B. R(+)-methanandamide and other cannabinoids induce the expression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinases in human nonpigmented ciliary epithelial cells. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*. Vol 316(3) (2006) ss. 1219-28
48. Ramer R. Hinz B. Inhibition of cancer cell invasion by cannabinoids via increased expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *Journal of the National Cancer Institute*. Vol 100(1) (2008) ss. 59-69.

49. Brown DL. Hibbs MS. Kearney M. *et al.* Identification of 92kDa gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation*. Vol 91(8) (1995) ss. 2125-31
50. Drexler HG. Dirks W. MacLeod RAF. *ym.* *DSMZ Catalogue of human and animal cell lines*. Vol 8 (2001)
51. Woessner JF Jr. *Matrix* (Suppl.) 1, 425 (1992)
52. Laemmli UK. *Nature*. Vol 277 (680) (1970)
53. Solakivi T. Kunnas T. Karkkainen S. Jaakkola O. Nikkari ST. Arachidonic acid increases matrix metalloproteinase 9 secretion and expression in human monocytic MonoMac 6 cells. *Lipids in Health & Disease*. Vol 8 (11) (2009)
54. Montecucco F. Matias I. Lenglet S. *ym.* Regulation and possible role of endocannabinoids and related mediators in hypercholesterolemic mice with atherosclerosis. *Atherosclerosis*. Vol 205 (2) (2009) ss. 433-41
55. Han KH. Lim S. Ryu J. *ym.* CB1 and CB2 cannabinoid receptors differentially regulate the production of reactive oxygen species by macrophages. *Cardiovascular Research*. Vol 84 (3) (2009) ss. 378-86
56. Greineisen WE. Turner H. Immunoactive effects of cannabinoids: Considerations for the therapeutic use of cannabinoid receptor agonists and antagonists. *International Immunopharmacology*. Vol 10 (5) (2010) ss. 547-55

