

**Atypický kanabinoid Abn-CBD znižuje zápal a chráni  
pečeň, pankreas a tukové tkanivo na myšom  
modeli prediabetes a nealkoholického tukového  
ochorenia pečene  
(Voľný preklad)**

**Autori:**

Silvana Y. Romero-Zerbo, María García-Fernández, Vanesa Espinosa-Jiménez, Macarena Pozo-Morales, Alejandro Escamilla-Sánchez, Lourdes Sánchez-Salido, Namiera Estrella Larille, Alex Rafacho, Gabriel Oliveira, Gemma Rojo-Martínez, Benoit R. Gauthier, Isabel González-Mariscal, Francisco J. Bermúdez-Silva

**Publikované:**

Online 6.3.2020

**Originálny článok dostupný na:**

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7067697/>

# **Atypický kanabinoid Abn-CBD znižuje zápal a chráni pečeň, pankreas a tukové tkanivo na myšom modeli prediabetes a nealkoholického tukového ochorenia pečene**

## **Abstrakt**

Pozadie a ciele: Nedávno sa ukázalo, že syntetický atypický kanabinoid Abn-CBD, derivát kanabidiolu (CBD), moduluje imunitný systém v rôznych orgánoch, ale jeho vplyv na meta-zápal súvisiaci s obezitou zostáva nepreskúmaný. Skúmali sme účinky Abn-CBD na metabolické a zápalové parametre pomocou myšacieho modelu obezity vyvolanej diétou (DIO) prediabetu a nealkoholického tukovatenia pečene (NAFLD).

Materiály a metódy: Desaťtýždňové myši C57Bl/6J boli kŕmené stravou s vysokým obsahom tukov počas 15 týždňov, po 2-týždňovej liečbe dennými intraperitoneálnymi injekciami s Abn-CBD alebo vehikulom. V 15. týždni boli myši obézne, prediabetické a vyvinula sa u nich NAFLD. Sledovala sa telesná hmotnosť a glukózová homeostáza. Myši boli usmrtené a krv, pečeň, tukové tkanivo a pankreas boli odoberané a spracované na metabolickú a zápalovú analýzu.

Výsledky: Profily telesnej hmotnosti a triglyceridov v krvi a pečeni boli porovnateľné medzi myšami DIO liečenými vehikulom a Abn-CBD. Liečba Abn-CBD však znížila hyperinzulinémiu a markery systémového zápalu nízkeho stupňa v plazme a tuku, čo tiež podporuje hneďnutie bieleho tukového tkaniva. Pankreatické ostrovčeky z myší liečených Abn-CBD vykazovali nižšiu apoptózu, zápal a oxidačný stres ako myši DIO liečené vehikulom a bola indukovaná proliferácia beta buniek. Okrem toho Abn-CBD znížila fibrózu pečene, zápal a infiltráciu makrofágov v pečeni v porovnaní s myšami DIO liečenými vehikulom. Dôležité je, že rovnováha medzi proliferáciou hepatocytov a apoptózou sa zlepšila u myší liečených Abn-CBD v porovnaní s myšami DIO liečenými vehikulom.

Záver: Tieto výsledky naznačujú, že Abn-CBD má priaznivé imunomodulačné účinky v pečeni, pankrease a tukovom tkanive DIO prediabetických myší s NAFLD, čím chráni tkanivá. Preto by Abn-CBD a príbuzné zlúčeniny mohli predstavovať nové farmakologické stratégie na zvládanie metabolických porúch súvisiacich s obezitou.

Kľúčové slová: kanabinoidy, zápal, prediabetes, NAFLD, obezita, pečeň, Langerhansove ostrovčeky, tukové tkanivo

## **Úvod**

Západná strava a sedavý životný štýl zvyšujú prevalenciu obezity na celom svete. Obezita je okrem iného rizikovým faktorom pre rozvoj cukrovky a kardiovaskulárnych a pečenej ochorení, čím sa znižuje počet rokov bez ochorenia, keďže obezita sa stáva závažnejšou (1). Poruchy súvisiace s obezitou vznikajú postupne; prediabetes a nealkoholické tukové ochorenie pečene (NAFLD) sú skoré

štádiá poškodenia pankreasu a pečene. Hoci tieto patológie možno diagnostikovať, neexistujú žiadne liečby na úrovni základných molekulárnych mechanizmov. Súčasný biomedicínsky výskum sa zameriava na štúdium skorých štádií chorôb súvisiacich s obezitou s cieľom vytvoriť liečebné postupy zamerané na zastavenie jej progresie a komplikácií.

Začína byť evidentné, že dysfunkcia molekulárnej integrácie imunitného a metabolického systému je základom metabolických ochorení, ako je diabetes 2. typu ( 2 ). V skutočnosti sa chronický zápal nízkeho stupňa (metazápal), ktorý sa vyskytuje pri obezite, považuje za dôležitý faktor mnohých porúch súvisiacich s obezitou, vrátane cukrovky 2. typu ( 3 ). Niekoľko štúdií odhalilo zmeny zápalových cytokínov u ľudí s prediabetom ( 4 – 6). Zistilo sa, že tukové tkanivo je zdrojom množstva zápalových signálov, ktoré, keď sa dostanú do obehu, indukujú aktiváciu lymfocytov. Akumulácia triglyceridov v netukových tkanivách skutočne spúšťa zápal, infiltráciu makrofágmi a apoptózu. Trvalo vysoká hladina glukózy v krvi je spojená so zvýšením oxidačného stresu a intracelulárneho zápalu, ktorý v konečnom dôsledku vedie k strate hmoty beta buniek ( 7 , 8 ). Akumulácia triglyceridov v pečeni vedie k NAFLD, ktorá nakoniec končí zlyhaním pečene ( 9 ).

Je známe, že kanabinoidy modulujú metabolizmus lipidov a glukózy, ako aj zápalové procesy ( 10 ). V skutočnosti je rimonabant, antagonist kanabinoidného receptora typu 1 (CB1R), na trhu na liečbu komplikovanej obezity, hoci centrálné vedľajšie účinky nakoniec viedli k jeho stiahnutiu ( 11 ). Odvtedy sa vývoj druhej generácie liekov na báze kanabinooidov bez vedľajších účinkov na liečbu metabolických ochorení stal predmetom intenzívneho výskumu. Atypické kanabinoidy sú ligandy, ktoré nie sú zamerané na kanonické kanabinoidné receptory CB1R a CB2R. Prototypom tohto druhu molekúl je fyto-kanabinoid kanabidiol (CBD), ktorý nemá psychoaktívne účinky a je jednou z hlavných zložiek Cannabis sativa .rastlina. Väčšina syntetických atypických kanabinooidov pochádza v konečnom dôsledku z CBD a zahŕňa abnormálne CBD (Abn-CBD), O-1602, O-1918 a O-1821 ( 12 ). Bolo hlásené, že CBD a niektoré syntetické atypické kanabinoidy vykazujú protizápalové a antioxidačné vlastnosti vrátane potenciálnych antidiabetických účinkov ( 13 – 16 ). Žiaľ, klinické štúdie s CBD nepreukázali zlepšenie glykemických a lipidových parametrov u pacientov s diabetom 2. typu ( 17 ). Účinky syntetických atypických kanabinooidov na zápal súvisiaci s obezitou a skoré štádiá súvisiacich chorôb však zostávajú do značnej miery nepreskúmané.

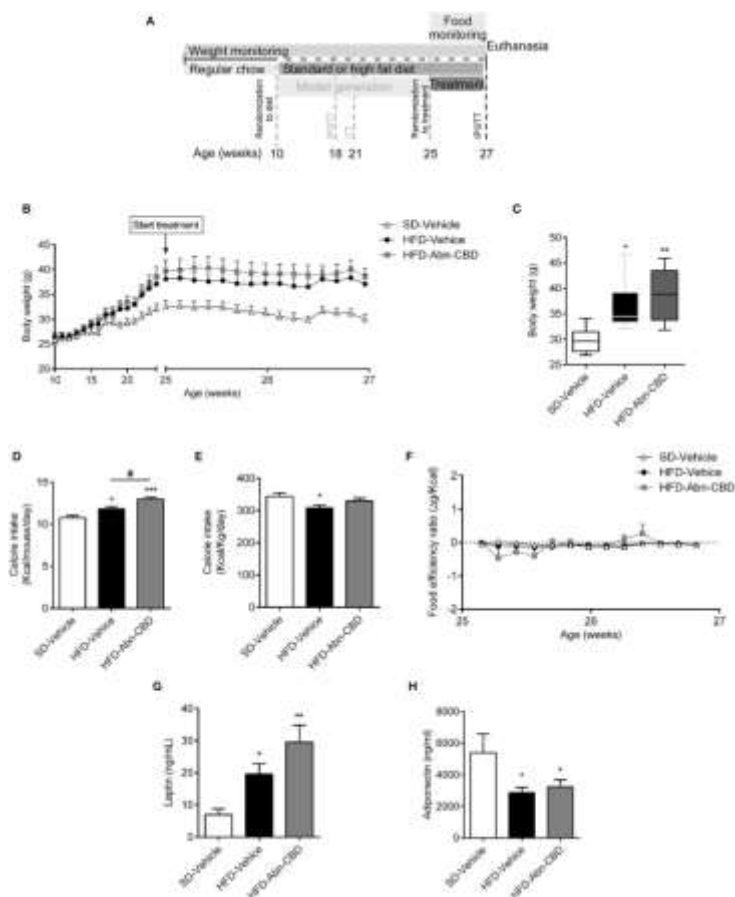
Abn-CBD je výsledkom transpozície fenolovej hydroxylovej skupiny a pentylového bočného reťazca CBD ( 18 ). In vitro zistenia poukazujú na to, že Abn-CBD vykazuje modulačné účinky na neutrofile pri zápalových stavoch, ako je experimentálna kolitída a ateroskleróza ( 19 , 20 ). Zistilo sa, že Abn-CBD skutočne zlepšuje glukózovú toleranciu u diabetických myší vyvolaných streptozotocínom ( 15 ). V súlade s týmito zisteniami sme nedávno uviedli, že Abn-CBD znižuje cytokínmi indukovanú apoptózu u myších a ľudských izolovaných ostrovčekov, pričom podporuje proliferáciu beta buniek ( 21). Vplyv Abn-CBD na meta-zápal súvisiaci s obezitou a jeho vzťah s prediabetom a NAFLD však zostáva nepreskúmaný.

Tu sme sa zamerali na skúmanie metabolických účinkov a protizápalových vlastností Abn-CBD v pečeni a pankrease myšacieho modelu prediabetu vyvolaného stravou a NAFLD.

## Materiály a metódy

Návrh štúdie a generovanie diétou indukovaných prediabetických myší a myší NAFLD

Boli dodržané odporúčania Európskej únie (2010/63/EÚ) o pokusoch na zvieratách. Všetky pokusy na zvieratách boli schválené Etickou komisiou Univerzity v Malage (č. autorizácie 2012–0061A) a dodržiavali princíp 3R. Desaťtýždňové samce myší C57BL/6J boli zakúpené od Charles River (Francúzsko) a boli aklimatizované v zariadení pre zvieratá počas jedného týždňa s potravou a vodou dostupnou ad libitum a so zapnutými svetlami medzi 8:00 a 20:00. Myši boli potom kŕmené 10% tukovou stravou (kontrola) alebo 45% tukovou stravou (45% Kcal z bravčovej masti, nasýtených tukov, HFD) počas 15 týždňov (n= 10 a 30 myši). Telesná hmotnosť sa monitorovala dvakrát týždenne a glukózová a inzulínová tolerancia sa hodnotili intraperitoneálnou glukózovou toleranciou (GTT) a inzulínovým tolerančným testom (ITT). Stručne, GTT sa uskutočňovalo po nočnom hladovaní injekciou 2 g/kg D(+)glukózy (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Glukóza v krvi sa monitorovala z chvostovej žily na začiatku a 15, 30, 60 a 90 minút pomocou glukomera (Accu-check, Roche Diagnostic). Pre ITT boli myši nalačno 6 hodín a potom im bolo injekčne podané 0,5 U/kg inzulínu (Humulin, Lilly, Francúzsko). Vzorky krvi sa odoberali z chvostovej žily ako je uvedené vyššie a glukóza v krvi sa merala v rovnakých časových bodoch pomocou glukometra. Plocha glukózy a inzulínu pod krivkou (AUC) sa vypočítala z ich zodpovedajúcich grafov pomocou softvéru IMAGEJ (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA). Akonáhle myši kŕmené HFD vykazovali vyššiu telesnú hmotnosť ako kontrolné myši, glukózovú intoleranciu a inzulínovú rezistenciu, zvieratá boli náhodne rozdelené na vehikulum alebo liečby a 10 myši bolo liečených syntetickým kanabinoidom Abn-CBD. Tu uvedená štúdia s Abn-CBD predstavuje podskupinu väčšej štúdie, ktorá zahŕňala aj kanabinoidný ligand LH-21. Prediabetický fenotyp týchto myší (HFD-vehikulum vs. SD-vehikulum) bol už skôr opísaný (22). Podrobná schéma dizajnu štúdie Abn-CBD je znázornená v Obrázok 1A.



Účinok Abn-CBD na telesnú hmotnosť a príjem potravy. Myši kŕmené štandardnou stravou (SD) alebo stravou s vysokým obsahom tukov (HFD) počas 15 týždňov boli randomizované na vehikulum alebo Abn-CBD počas ďalších 2 týždňov (A). Telesná hmotnosť sa merala týždenne počas prvých 15 týždňov a denne počas liečby (B). (C) Telesná hmotnosť po 2-týždňovej liečbe vehikulom alebo Abn-CBD. (D) Priemerný denný príjem kalórií na myš a (E) na kg hmotnosti počas 2-týždňovej liečby a (F) účinnosť potravy. Hladiny leptínu (G) a adiponektínu (H) v plazme na konci štúdie. Údaje ukazujú priemer  $\pm$  SEM okrem (C), ktorý ukazuje medián  $\pm$  min až max.  $n = 6$  SD-vozdíel,  $n = 7$  HFD-vozdíel a  $n = 8$  HFD-Abn-CBD. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  a \*\*\*  $p < 0,001$  v porovnaní s SD-vehikulom; #  $p \leq 0,05$  v porovnaní s vozidlom HFD.

#### Subchronická liečba Abn-CBD a sledovanie telesnej hmotnosti a príjmu potravy

HFD myši boli liečené denne počas posledných 2 týždňov experimentálneho dizajnu s 0,05 mg/kg Abn-CBD (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI) alebo vehikulom. Dávkovanie bolo zvolené na základe predchádzajúcej literatúry (15, 23). Zásobný roztok Abn-CBD sa rozpustil v etanole, rozdelil na alikvóty a skladoval pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do použitia. Každý deň sa dávka na injekciu čerstvo pripravila zriedením alikvoty vo fyziologickom roztoku-Tween80 (1 % konečný obsah etanolu, 5 % Tween80) a potom sa podala intraperitoneálne. Denne sa monitorovala telesná hmotnosť a príjem potravy a množstvo prijatej potravy sa prepočítavalo na kilokalórie. Účinnosť potravy sa vypočítala ako variácia telesnej hmotnosti (v gramoch) oproti príjmu kalórií (v kcal). Päť dní pred eutanáziou sa všetkým skupinám myši tiež denne injekčne podávalo 75 mg/kg 5-bróm-2'-deoxyuridínu (BrdU) rozpusteného vo fyziologickom roztoku (Sigma-Aldrich). Na konci liečebného obdobia boli myši usmrtené cervikálnou dislokáciou a tkanivá boli odoberaté na ďalšiu histologickú a biochemickú analýzu. Vzorky z tukového tkaniva, pankreas a pečeň sa fixovali v 4% PFA ponorením cez noc a potom sa zaliali do parafínu na histochemiu a imunohistochemiu. Paralelne boli vzorky plazmy, tukového tkaniva, pankreasu a pečene tiež rýchlo zmrazené a uložené pri teplote  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  na biochemickú analýzu. Počet zvierat použitých na každý experiment je podrobne uvedený v legendách obrázkov.

#### Stanovenie adipokínov a cytokínov

Plazma sa získala odstredením ( $2\ 000 \times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , počas 10 minút) celej krvi v skúmavkách potiahnutých EDTA. Plazmatické hladiny inzulínu a niekoľkých zápalových cytokínov (IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-6, CXCL1, IL-10) sa merali pomocou poľa Meso Scale Discovery Multi (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MA, USA) v MSD prístroj (SECTOR S 600) vybavený viacpoľovou elektrochemiluminiscenčnou detekčnou technológiou (Meso Scale Diagnostics). Plazmatické hladiny leptínu (BioVendor, Česká republika) a HMW adiponektínu (Shibayagi Co., Japonsko) sa merali testom ELISA v súlade s pokynmi výrobcu.

#### Biochemická analýza vo vzorkách plazmy

Profil lipidov v plazme (triglyceridy, celkový cholesterol, HDL-c, LDL-c, NEFA a glycerol), hladina glukózy v krvi a pečeňový marker alaníntransamináza (ALT) boli stanovené rutinnými laboratórnymi metódami s použitím autoanalyzátoru Cobas Mira (Roche Diagnostic System, Basel, Švajčiarsko) a reagentie od Spinreact (Spinreact SAU, Girona, Španielsko) a Biosystems (Biosystems SA, Barcelona, Španielsko). Hladiny inzulínu v plazme sa merali použitím komerčného testu ELISA podľa pokynov výrobcu (Merckodia, Uppsala, Švédsko).

## Meranie peroxidácie lipidov

Peroxidácia lipidov bola stanovená meraním látok reaktívnych s kyselinou tiobarbiturovou (TBARS). Malondialdehyd (MDA), prírodný vedľajší produkt peroxidácie lipidov, reaguje s kyselinou tiobarbiturovou (TBA) za vzniku aduktu MDA-TBA, ktorý možno ľahko kvantifikovať pri 532 nm v spektrofotometri. Vzorky tkaniva sa homogenizovali s ľadovo studeným Tris-HCl pufrom (150 mM KCl, 50 mM Tris, pH 7,4) doplneným butylovaným hydroxytoluénom, aby sa zabránilo umelej peroxidácii počas testu. Supernatant sa inkuboval s MDA, aby sa získali TBARS. Merala sa absorbancia (VERSAmax, Molecular Devices LLC, San Jose, CA, USA) a interpolovala sa do štandardnej krivky s použitím malondialdehyd-bisdietylacetalu (MDA, Sigma-Aldrich). Konečné hodnoty boli vyjadrené ako nanomóly TBARS na miligram tkaniva.

## Glukózou stimulovaná sekrécia inzulínu (GSIS)

Langerhansove ostrovčeky boli izolované z dvoch myší v každej skupine použitím metódy štiepenia kolagenázou, ako už bolo opísané ( 24 ). Ostrovčeky sa potom kultivovali 20–24 hodín v médiu RPMI-1640 doplnenom 11 mM glukózou (Invitrogen, CA, USA), 2 mM glutamínom, 200 IU/ml penicilínu, 200 µg/ml streptomycínu a 8 % fetálnym hovädzím sérom zbaveným aktívne uhlie-dextrán (Invitrogen). Pre experimenty GSIS sa ostrovčeky predinkubovali pri 37 °C počas 2 hodín v Krebsovom bikarbonátovom tlmivom roztoku obsahujúcom 14 mM NaCl, 0,45 mM KCl, 0,25 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM HEPES a 3 mM glukózový roztok. s 95 % O<sub>2</sub> : 5 % CO<sub>2</sub> pri pH 7,4. Ostrovčeky zodpovedajúcej veľkosti, päť v každej jamke z 24-jamkovej platne, sa naočkovali do 0,5 ml čerstvého pufru obsahujúceho 3 mM glukózy alebo 11 mM glukózy. Potom sa ostrovčeky inkubovali počas 1 hodiny pri 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Po inkubácii sa do každej jamky pridal 1% hovädzí albumín a doštička sa ochladila na 4 °C počas 15 minút, aby sa zastavila sekrécia inzulínu. Médiá sa potom zozbierali a skladovali pri -20 °C až do merania inzulínu pomocou ELISA (Mercodia, Uppsala, Švédsko), podľa pokynov výrobcu.

## Morfometrická analýza ostrovčiek

Počet ostrovčiek a plocha ostrovčiek boli hodnotené morfometrickou analýzou v rezoch pankreasu. Pankreasy každej myši zaliate v parafíne boli narezané na štyroch rôznych úrovniach a zafarbené hematoxylínom a eozínom. Mikrofotografie s nízkym zväčšením boli urobené mikroskopom Olympus BX41 (Olympus Corporation, Tokio, Japonsko) a analyzované softvérom ImageJ.

## Meranie pečeneňového glykogénu

Stanovenie pečeneňového glykogénu prebiehalo podľa predchádzajúcich správ s určitými úpravami ( 25 , 26 ). Stručne, vzorky pečene (300–500 mg) sa preniesli do skúmaviek obsahujúcich 30 % KOH (w/v) a varili sa 1 hodinu až do úplnej homogenizácie. Potom sa pridal Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a glykogén sa vyzrážal etanolom. Vzorky sa centrifugovali pri 800 g počas 10 minút, supernatanty sa vyhodili a glykogén sa rozpustil v horúcej destilovanej vode. Pridal sa etanol a pelety získané po druhej centrifugácii sa rozpustili v destilovanej vode na konečný objem 25 ml. Obsah glykogénu sa meral tak, že sa na fixný objem vzorky pôsobilo fenolovým činidlom a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbancia sa potom odčítala pri 490 nm pomocou spektrofotometra (VERSAmax, Molecular Devices LLC).

## Izolácia RNA a PCR v reálnom čase

Tkanivá (100 mg tukového tkaniva) sa vyrezali a izolovala sa mRNA s použitím Trizol Reagent (Sigma-Aldrich) a RNeasy Mini Kit (Qiagen) podľa pokynov výrobcu. Retrotranskripcia sa uskutočnila pomocou SuperScript IV RT (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) a expresia mRNA sa analyzovala v zariadení Applied Biosystems® 7500 rýchlo s použitím Fast Advanced Master Mix (všetko od Thermo Fisher Scientific) a príslušného Taqman značeného FAM. priméry a sondy pre Cxcl1, 1110 a Ucp1. Priméry a sonda značené VIC sa použili na udržiavacie gény.

## Farbenie ektopického ukladania lipidov v pečeni olejovou červenou O

Zmrazené vzorky pečene sa nakrájali na plátky v kryostate, pripojili sa k mikroskopickým sklíčkam a sušili sa na vzduchu pri teplote miestnosti počas 30 minút. Rezy pečene sa potom farbili v čerstvej olejovej červeni O počas 10 minút, opláchli sa v destilovanej vode a ihneď sa kontrastne farbili hematoxylínom počas 1 minúty. Mikrofotografie boli urobené na mikroskope Olympus BX41 a intenzita farbenia Oil red O bola kvantifikovaná pomocou softvéru Image J.

## Massonovo trichrómové farbenie fibrózy pečene

Fibróza pečene bola hodnotená na histologickej úrovni farbením kolagénových vlákien farbením Massonovým trichrómom. Na tento účel boli rezy zaliate do parafínu hydratované a zafarbené pomocou Massonovej trichrómovej súpravy (Casa Álvarez Material Científico SA, Madrid, Španielsko) podľa pokynov výrobcu.

## Imunohistochemia a imunofluorescenčné farbenie

Rezy tkaniva zaliateho parafínom (3  $\mu$ m) boli zbavené vosku, hydratované a ošetrované roztokom na odmaskovanie antigénu na báze kyseliny citrónovej (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) počas 20 minút v parnom hrnci a potom 20 minút na ochladenie. Rezy boli trikrát premyté fyziologickým roztokom pufrovaným fosfátom (PBS). Endogénna peroxidáza sa uhasila 2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v PBS počas 30 minút za miešania a endogénny biotín, biotínové receptory a väzbové miesta avidínu boli blokovanie súpravou na blokovanie avidín/biotín podľa pokynov výrobcu (Vector Laboratories Inc.). Imunohistochemia sa uskutočňovala inkubáciou cez noc pri 4 °C s primárnou protilátkou 1/100 (anti-inzulín, Sigma-Aldrich; anti-F4/80, Abcam, Paríž, Francúzsko; anti-pNFkB, Abcam), trikrát premyla PBS a nasledovala kozou anti-krysou/myšou polyklonálnou protilátkou konjugovanou s HRP polymérom (1 h) a nakoniec znova trikrát premyté a vyvolané diaminobenzidínovým substrátom. Sklíčka boli opláchnuté vo vode z vodovodu, jemne kontrastne zafarbené Mayerovým hematoxylínom, opláchnuté v dehydratovanom chloride amónnom a pripevnené k médiu DPX (Shandon, Pittsburgh, Pennsylvania, USA).

Pre imunofluorescenčnú primárnu protilátku (anti-inzulín 1/100 cez noc, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas TX, USA; anti-5-bróm-2'-deoxyuridín 1/100 cez noc, Sigma-Aldrich; anti- $\alpha$ SMA, 1/100 cez noc, Santa Cruz Biotechnology) inkubácia bola nasledovaná anti-králičím IgG-AlexaFluor488 a/alebo anti-myším IgG-AlexaFluor568 (1/1000; Thermo Fisher Scientific), počas 1 hodiny pri teplote miestnosti. Sklíčka boli prekryté a chránené pred fotobielením pomocou Fluoroshield Mounting Media

(Sigma-Aldrich). Mikrofotografie boli urobené na Olympus BX41 a ďalej spracované softvérom Image J na kvantifikáciu intenzity signálu.

### Hodnotenie apoptózy

Apoptóza sa hodnotila technikou TUNEL s použitím súpravy na detekciu apoptózy in situ (Roche) podľa pokynov výrobcu. Obrázky sa analyzovali pomocou softvéru ImageJ. Počet TUNEL-pozitívnych buniek sa normalizoval na plochu ostrovčekov.

### Analýza dát

Údaje sú vyjadrené ako priemer  $\pm$  štandardná chyba priemeru (SEM) pre údaje zodpovedajúce normálnemu rozdeleniu a medián  $\pm$  min až maximum pre nenormálne rozdelenia. Štatistická významnosť rozdielov v priemerných alebo stredných hodnotách bola hodnotená Studentovým t - testom alebo analýzou rozptylu (ANOVA), po ktorej nasledoval Tukeyho viacnásobný porovnávací test pre normálne rozdelenia a Mann-Whitneyov test alebo Kruskal-Wallisov test, po ktorom nasledoval Dunnov viacnásobný porovnávací test. pre nenormálne distribúcie. Všetky analýzy sa uskutočnili s GraphPad Prism 6.07 alebo 7.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A  $p < 0,05$  sa považovalo za významné.

## Výsledky

### ABN-CBD neovplyvňuje telesnú hmotnosť

Desaťtýždňovým samcom myší C57Bl/6J bola počas 15 týždňov podávaná strava s vysokým obsahom tukov (HFD) alebo štandardná strava (SD). Myši kŕmené HFD vážili významne viac ako myši kŕmené SD ( $37,9 \pm 0,9$  vs.  $32,6 \pm 1,2$  g, v tomto poradí; Obrázok 1B). Myši s diétou indukovanou obezitou (DIO) mali glukózovú intoleranciu a inzulínovú rezistenciu, ale nevykazovali zhoršenú glukózu nalačno [ $103 \pm 7$  vs.  $108 \pm 4$  mg/dl, myši SD a HFD, v tomto poradí ( 22 )]. DIO myši sa potom náhodne rozdelili na denné intraperitoneálne injekcie vehikula (myši s HFD vehikulom) alebo 0,05 mg/kg Abn-CBD (myši HFD-Abn-CBD) počas 2 týždňov (Obrázok 1A). Dávkovanie pre Abn-CBD bolo vybrané na základe ipGTT na chudých myšiach ( doplnkový obrázok 1 ) a predchádzajúcej literatúry ( 15 ). Po 2 týždňoch liečby boli telesné hmotnosti myší s HFD-vehikulom a HFD-Abn-CBD porovnateľné ( $36,5 \pm 0,8$  a  $38,9 \pm 1,7$  g, v uvedenom poradí), zatiaľ čo myši kŕmené SD vážili  $29,8 \pm 1,8$  g (Obrázky 1B,C). Myši s HFD-Abn-CBD aj HFD-vehikulom zostali neznášateľné na glukózu ( doplnkový obrázok 2 ). Príjem kalórií na myš bol významne vyšší v skupine s HFD-Abn-CBD ako v skupine s nosičom HFD (Obrázok 1D), hoci kalórií na gram (Obrázok 1E) a potravinová účinnosť bola porovnateľná v oboch skupinách (Obrázok 1F). Pri obezite adipozita pozitívne koreluje s hladinami leptínu v plazme. Myši s HFD nosičom mali 2,8-násobné zvýšenie hladín leptínu v plazme v porovnaní s chudými myšami (Obrázok 1G). V súlade s ich zvýšenou telesnou hmotnosťou a konzumáciou potravy (Obrázky 1C,D), HFD-Abn-CBD myši mali vyššie hladiny leptínu (4,2-krát vyššie v porovnaní s chudými myšami), hoci rozdiely zistené medzi HFD-vehikulom a -Abn-CBD myšami nedosiahli štatistickú významnosť (  $p = 0,07$ ) (Obrázok 1G). Je známe, že adiponektín, hormón vylučovaný z tukového tkaniva na reguláciu homeostázy glukózy, sa znižuje pri obezite ( 27 ). Hladiny adiponektínu v plazme boli významne nižšie u myší kŕmených HFD v porovnaní s myšami kŕmenými SD, nezávisle od liečby (Obrázok 1H).

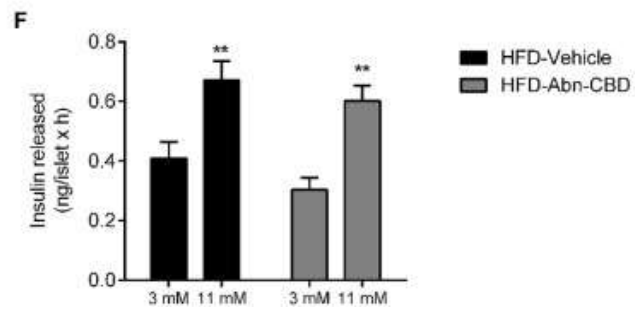
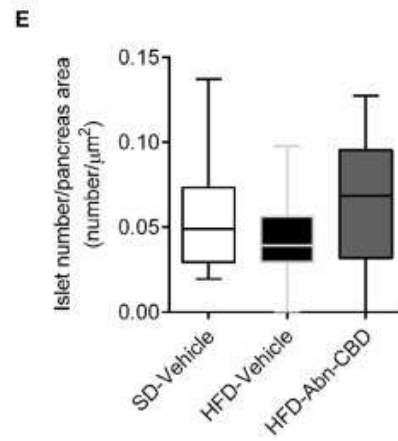
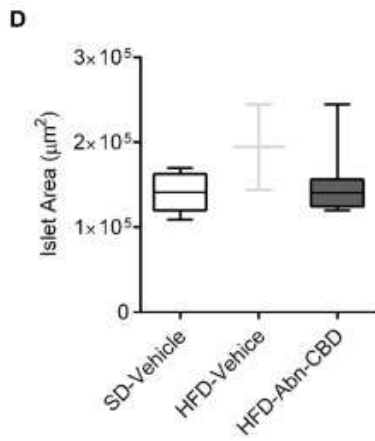
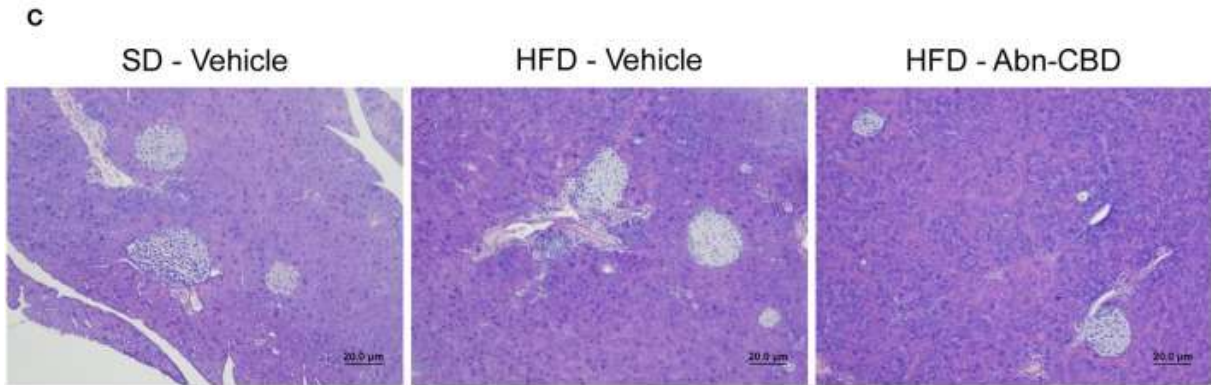
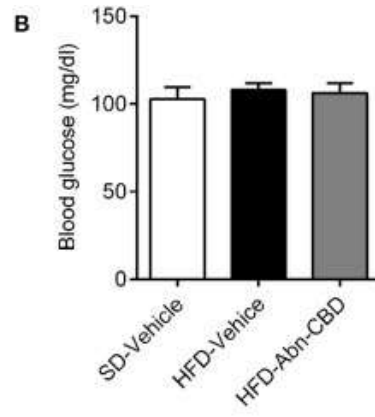
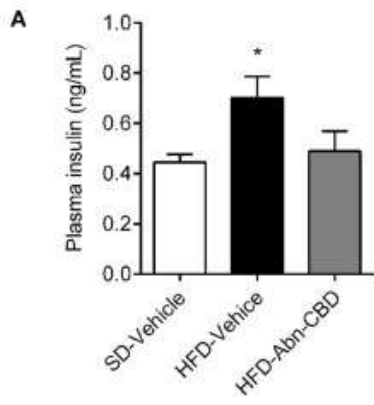


## Abn-CBD nemení plazmatický lipidový profil

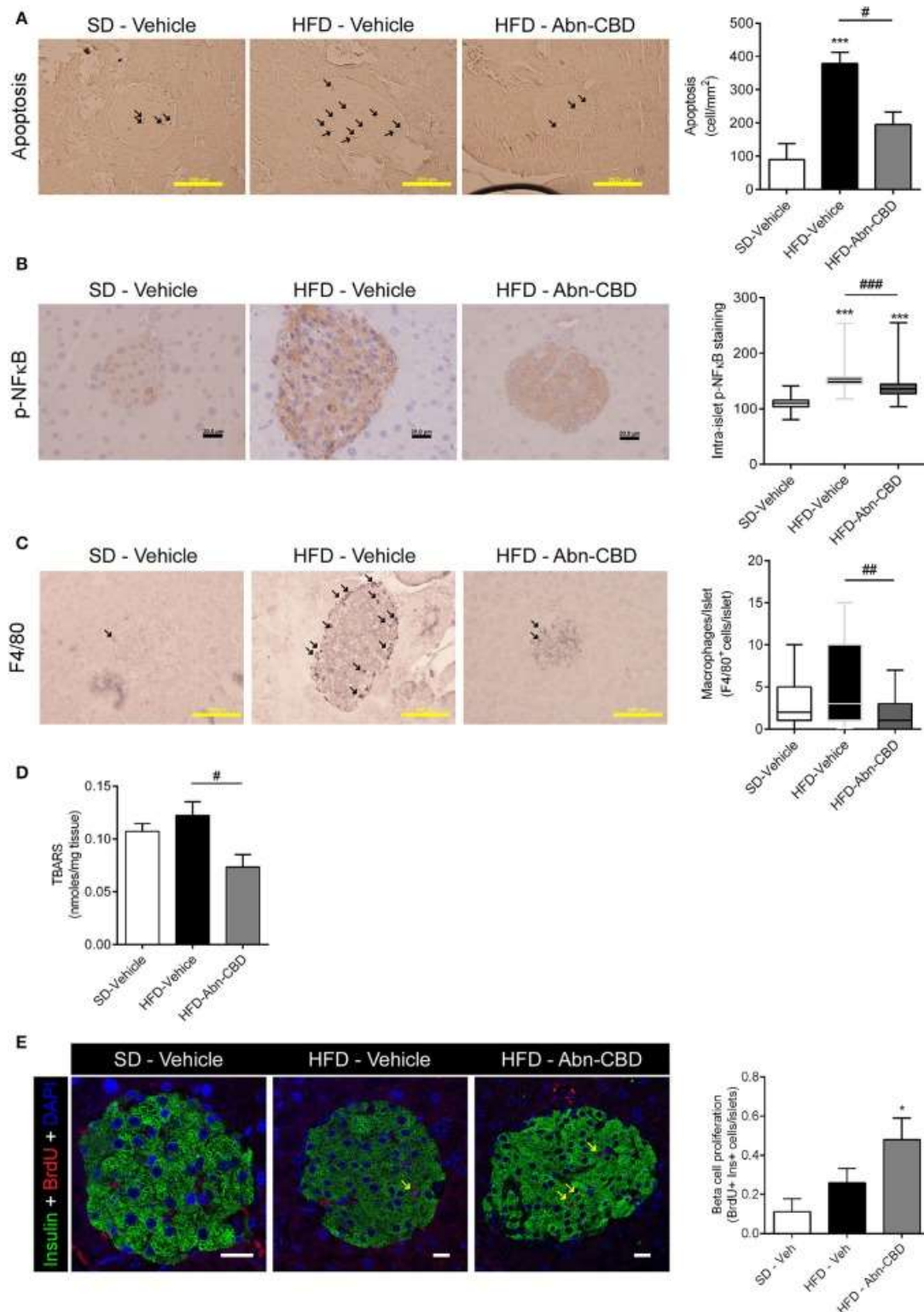
Keďže DIO je spojená so zvýšenými hladinami triglyceridov, voľných mastných kyselín a cholesterolu v obehu, analyzovali sme plazmatický lipidový profil myší kŕmených SD, HFD-vehikulom a HFD-Abn-CBD myší. Hoci hladiny triglyceridov v plazme u myší kŕmených HFD boli podobné tým, ktoré sa našli u myší kŕmených SD, celkový cholesterol bol 1,3-krát vyšší u myší kŕmených HFD v porovnaní s myšami kŕmenými SD (stôl 1). Obsah lipoproteínov s vysokou hustotou (HDL) a neesterifikovaných mastných kyselín (NEFA) v plazme bol tiež významne vyšší u myší kŕmených HFD ako v plazme od myší kŕmených SD (1,5- a 1,6-násobok, v uvedenom poradí; stôl 1). Nezistili sa žiadne významné rozdiely v hladinách lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL) v plazme, ani v hladinách glycerolu medzi myšami kŕmenými HFD a SD (stôl 1). Lipidový profil zistený v plazme myší s HFD-Abn-CBD bol porovnateľný s profilom zisteným u myší s vehikulom HFD, vrátane vysokého cholesterolu, zvýšených HDL a NEFA (1,25-, 1,5- a 1,6-krát vyšších, v uvedenom poradí, ako u SD - kŕmené myši; stôl 1).

ABN-CBD zlepšuje hyperinzulinémiu, chráni beta bunky pred apoptózou vyvolanou DIO, znižuje zápal a stimuluje proliferáciu beta buniek

Po 2 týždňoch liečby vehikulom alebo Abn-CBD boli myši s vehikulom HFD hyperinzulinemické v porovnaní s myšami kŕmenými SD (Obrázok 2A), zatiaľ čo hladiny glukózy v krvi boli porovnateľné (Obrázok 2B). Tieto údaje naznačujú, že myši zostali rezistentné na inzulín ako pred začatím liečby, ale ešte sa u nich nerozvinul diabetes. Je pozoruhodné, že myši liečené Abn-CBD mali podobnú inzulinémiu ako SD-vehikulom (Obrázok 2A), pričom sa hladina glukózy v krvi udržiava na rovnakej úrovni ako u myší s nosičom SD a HFD (Obrázok 2B). Langerhansove ostrovčeky pankreasu sme analyzovali na morfometrickej aj funkčnej úrovni (Obrázky 2C–F). Medzi skupinami neboli zistené žiadne zmeny v počte ostrovčekov (Obrázok 2E). Avšak myši kŕmené HFD vykazovali silnú tendenciu k väčším ostrovčekom ako myši kŕmené SD ( $p = 0,06$ ), zatiaľ čo táto hypertrofia chýbala v ostrovčekoch HFD-Abn-CBD (Obrázok 2D). Liečba Abn-CBD nemala žiadny vplyv na celkovú kapacitu sekrécie inzulínu, ako ukazuje in vitro statický test sekrécie inzulínu stimulovaný glukózou (Obrázok 2F). Pri DIO je strata hmoty beta buniek spojená so zvýšeným zápalom a oxidačným stresom v beta bunkách, čo vedie k smrti beta buniek. V súlade s tým sme zistili zvýšenú apoptózu medzi ostrovčekmi (Obrázok 3A), fosforylácia p65 (p-NFκB) (Obrázok 3B) a mierne nevýznamné zvýšenie TBARS pankreasu (Obrázok 3D) vo vozidle HFD v porovnaní s vozidlom SD. Dôležité je, že Abn-CBD významne znížil obsah TBARS v pankrease (Obrázok 3D), farbenie pNFκB vo vnútri ostrovčekov (Obrázok 3Ba infiltračia makrofágmi (Obrázok 3C) výrazne znižuje apoptózu (Obrázok 3A). Okrem toho Abn-CBD indukovala proliferáciu beta buniek, ako bolo merané BrdU pozitívnym farbením beta buniek, v porovnaní s myšami kŕmenými SD (Obrázok 3E). Abn-CBD teda chránila hmotu beta buniek bez toho, aby zmenila funkciu beta buniek.



Účinok Abn-CBD na homeostázu glukózy, morfológiu a funkčnosť ostrovčiek. (A) Hladiny inzulínu v plazme nalačno (cez noc) a (B) hladiny glukózy v krvi na konci štúdie. (C) Reprerzentatívne mikrofotografie ostrovčiek. (D,E) Morfometrická analýza ostrovčiek. Údaje ukazujú priemer  $\pm$  SEM okrem (D,E), ktoré ukazujú medián  $\pm$  min až max.  $n = 6$  SD-vozidiel,  $n = 7$  HFD-vozidiel a  $n = 8$  HFD-Abn-CBD okrem (D),  $n = 51$ – $66$  ostrovčiek od 4 myši z každej skupiny, (E)  $n = 52$ – $81$  ostrovčiek zo 4 myši v každej skupine. \*  $p \leq 0,05$  a \*\* $p \leq 0,01$  v porovnaní s vozidlom SD. (F) Statická glukózou stimulovaná sekrécia inzulínu v HFD-vehikule a HFD-Abn-CBD izolovaných ostrovčekom.  $N = 11$ – $12$  jamiek pre každú podmienku, ostrovčeky od 2 myši v každej skupine.

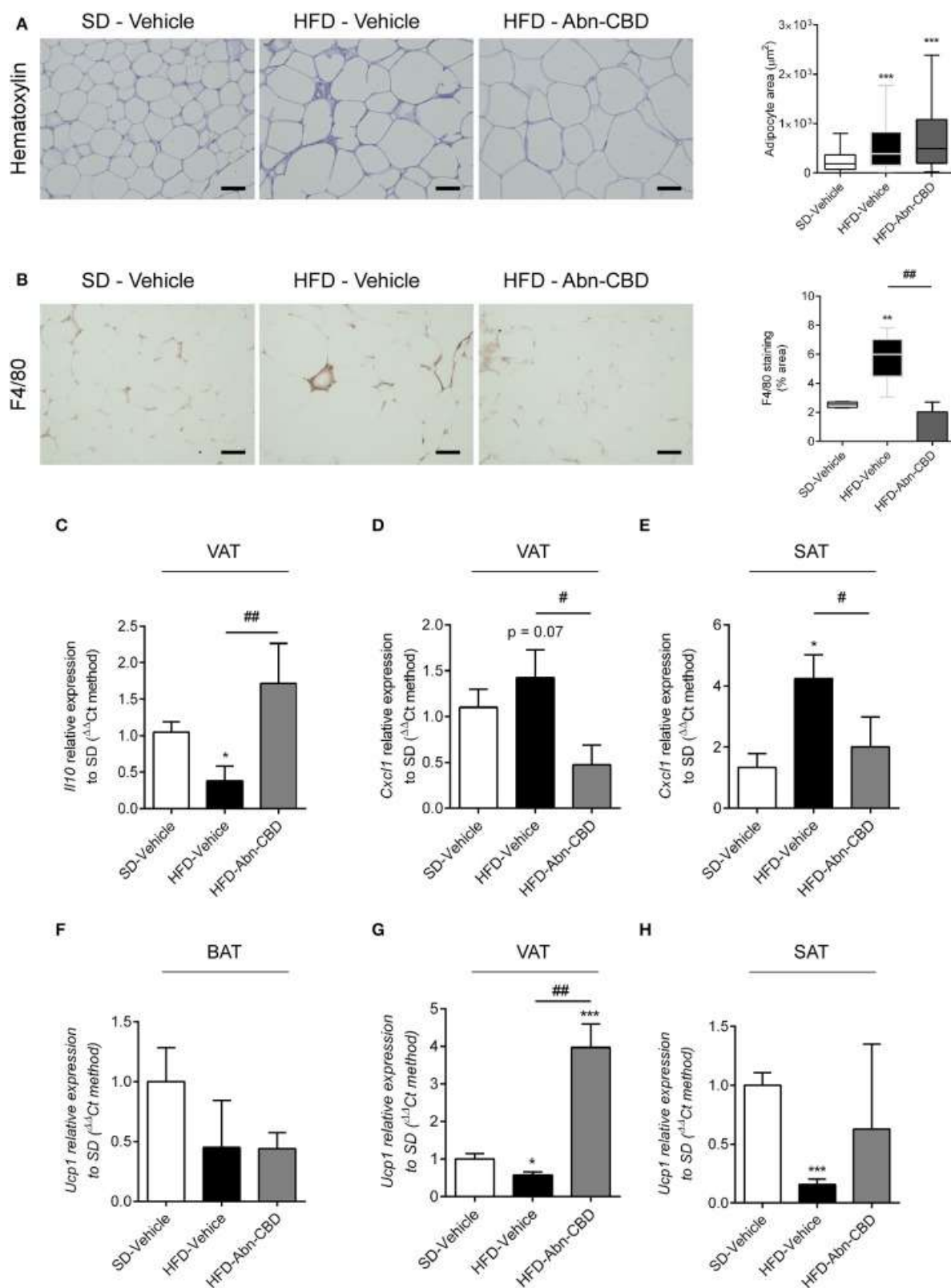


Účinok Abn-CBD na životaschopnosť beta-buniek pankreasu a intraostrovčekový zápal. Reprezentatívne mikrofotografie a kvantifikácia ostrovčekov imunofarbených na apoptózu (A) a p-NFκB (B) ; šípky označujú apoptotické bunky; Imunofarbenie p-NFκB sa kontrastne zafarbilo hematoxylínom. (C) farbenie F4/80; šípky označujú makrofágy. (D) Kvantifikácia peroxidácie lipidov produkciou TBARS. (E) Reprezentatívne mikrofotografie dvojitého inzulinu (zelená) a BrdU (červená) imunofarbenia v ostrovčekoch a kvantifikácia buniek BrdU+/Insulin+; šípky označujú proliferatívne beta bunky; mierka je 20 μm. n = 6 vozidiel SD, n = 7 vozidiel HFD a n= 8 HFD-Abn-CBD. \* p ≤ 0,05 a \*\*\* p ≤ 0,001 v porovnaní s SD-vehikulom; # p ≤ 0,05, ## p ≤ 0,01 a ### p ≤ 0,001 v porovnaní s HFD vozidlom.

#### Abn-CBD Znižuje DIO-indukovaný meta-zápal

Chronický zápal nízkeho stupňa je spojený s komplikáciami súvisiacimi s DIO. V súlade s tým plazma myši s HFD nosičom vykazovala významne vyššie hladiny interleukínu 6 (IL-6; 3,2-násobné zvýšenie; Obrázok 4A) a CXCL-1 (2,4-násobné zvýšenie; Obrázok 4B) v porovnaní s myšami kŕmenými SD, zatiaľ čo hladiny interleukínu 5 (IL-5) mali tendenciu byť 1,6-krát vyššie (Obrázok 4C). Dôležité je, že liečba Abn-CBD obnovila hladiny IL-6, CXCL-1 a IL-5 na hladiny nájdené u myši kŕmených SD (Obrázky 4A–C). Myši kŕmené HFD nevykazovali žiadnu zmenu ani v jednom interferóne gama (IFNγ; Obrázok 4D) ani interleukín 10 (IL-10; Obrázok 4E) v porovnaní s myšami kŕmenými SD, nezávisle od liečby.

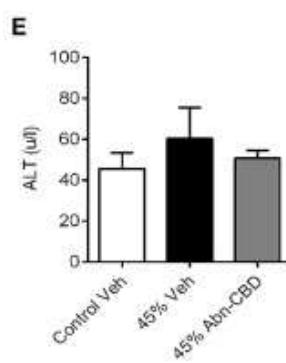
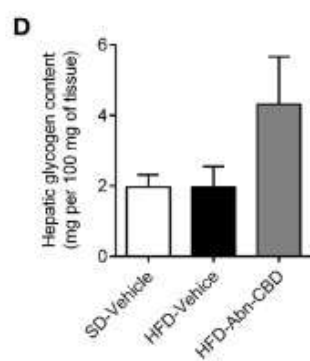
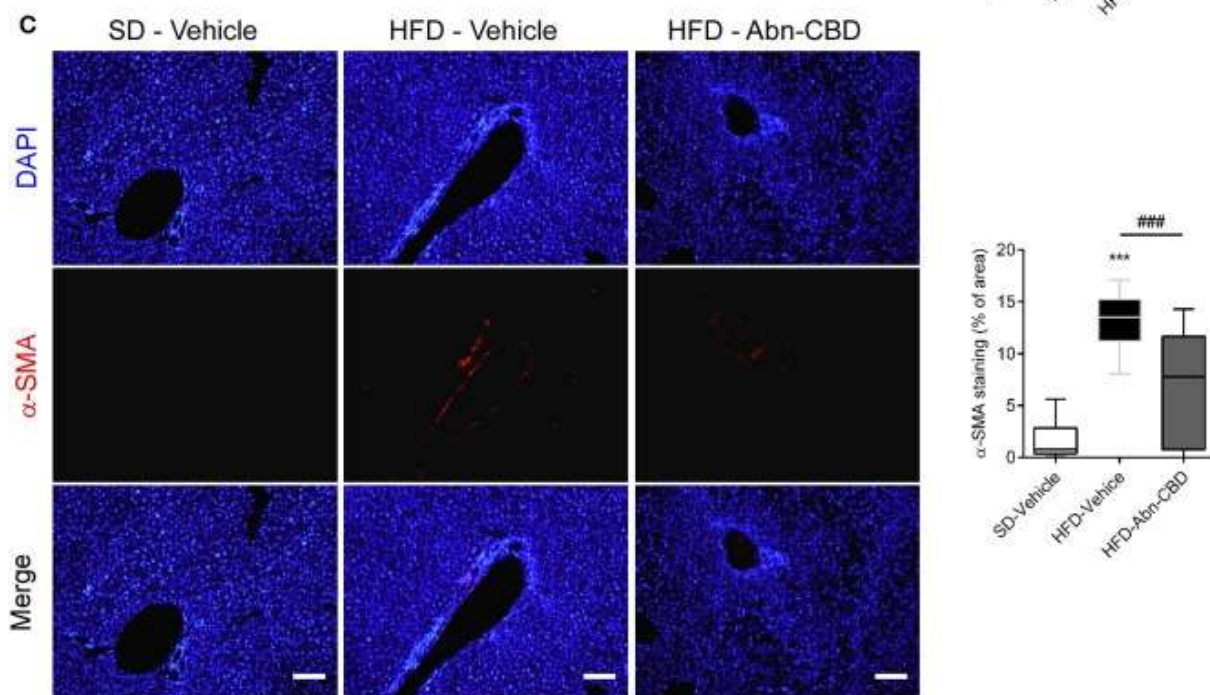
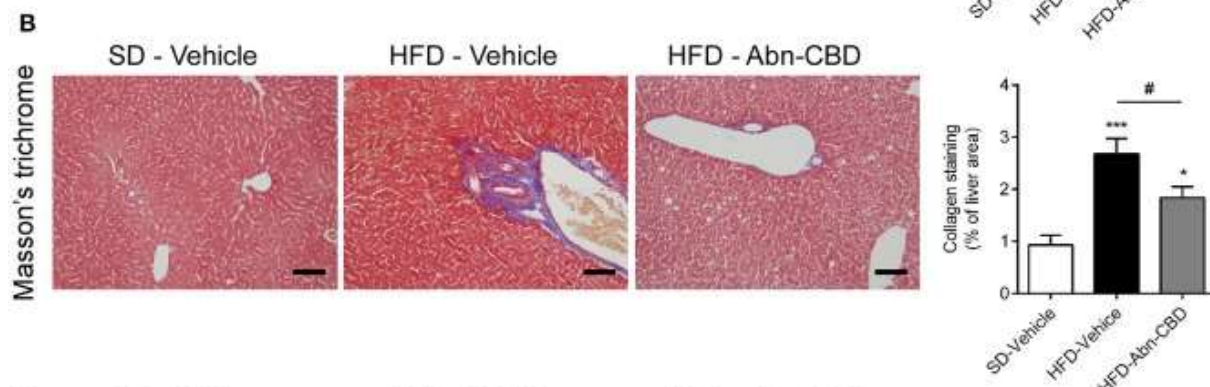
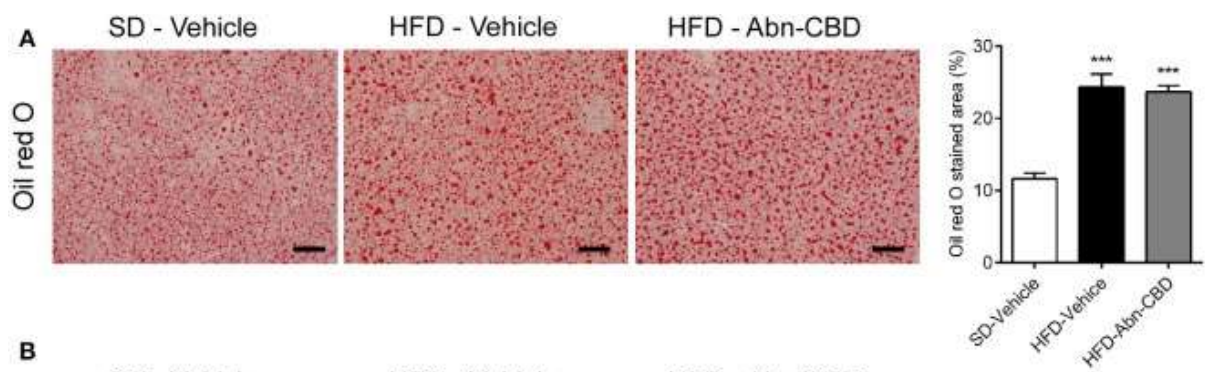
Keďže obezita je silne spojená so zápalom v bielom tukovom tkanive (WAT) (28), analyzovali sme zápal vyskytujúci sa vo viscerálnom (VAT) a subkutánnom tukovom tkanive (SAT). Myši kŕmené HFD vykazovali očakávané zvýšenie veľkosti adipocytov v porovnaní s myšami kŕmenými SD, nezávisle od liečby (Obrázok 5A). Zistili sme zvýšenie prítomnosti korunových štruktúr v HFD-vehikule WAT po farbení F4/80, čo bolo významne znížené vo WAT od myši liečených Abn-CBD (Obrázok 5B). Analýza expresie cytokínov ukázala významné zníženie expresie Il10 v DPH (Obrázok 5C) a významné zvýšenie expresie Cxcl1 u DPH ( p = 0,07) aj SAT u myši s nosičom HFD (Obrázky 5D,E, respektíve). Je zaujímavé, že liečba Abn-CBD zabránila zmenám pozorovaným pri expresii cytokínov v DPH (Obrázky 5C,D) a SAT (Obrázok 5E), čo ukazuje, že Abn-CBD chráni WAT pred zápalom vyvolaným stravou. Chceli sme tiež preskúmať, či by Abn-CBD mohol podporiť posun smerom k hneďnutiu vo WAT. Na tento účel sme analyzovali expresiu Ucp1 v BAT, DPH a SAT. Zatiaľ čo medzi skupinami neboli zistené žiadne významné rozdiely v hneďnom tukovom tkanive (Obrázok 5F), myši s nosičom HFD vykazovali významný pokles expresie Ucp1 v DPH a SAT, proti čomu pôsobil Abn-CBD (Obrázky 5G,H).



Účinok Abn-CBD na zápal v bielom tukovom tkanive. Reprezentatívne mikrofotografie a kvantifikácia (A) veľkosti adipocytov a (B) korunkových štruktúr v bielom tukovom tkanive. Relatívna expresia (C) 1110 a (D) Cxcl1 vo viscerálnom tukovom tkanive a (E) Cxcl1 v subkutánnom tukovom tkanive. Relatívna expresia Ucp-1 v (F) hnedom tukovom tkanive, (G) viscerálnom tukovom tkanive a (H) subkutánnom tukovom tkanive. Ako referenčný gén sa použil p-aktín. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  a \*\*\*  $p \leq 0,001$  v porovnaní s SD-vehikulom; #  $p \leq 0,05$  a ##  $p \leq 0,01$  v porovnaní s vozidlom HFD.

## Abn-CBD nechráni pred NAFLD

Akumulácia triglyceridov v pečeni vedie k NAFLD, ktorá nakoniec vedie k zlyhaniu pečene ( 9 ). V tomto prípade myši DIO akumulovali triglyceridy v pečeni nezávisle od liečby, pričom vykazovali 2-násobný nárast obsahu lipidov v porovnaní s chudými myšami, ako ukazuje farbenie olejovou červenou-O (Obrázok 6A). Okrem toho pečeň myší s vehikulom HFD vykazovala fibrózu, čo bolo určené významným zvýšením obsahu kolagénu v porovnaní s myšami kŕmenými SD (Obrázok 6B), ako aj raní tvorcovia fibrózy pečene, ako je  $\alpha$ -SMA (Obrázok 6C). Je zaujímavé, že pečeň myší HFD-Abn-CBD mala výrazne nižší kolagén ako myši s nosičom HFD (Obrázok 6B) a znížené zafarbenie  $\alpha$ -SMA (Obrázok 6C). Okrem toho bol obsah pečeňového glykogénu porovnateľný u myší liečených vehikulom kŕmených HFD aj SD (Obrázok 6D). Hoci nedosahujú štatistickú významnosť (  $p = 0,07$  ), myši HFD-Abn-CBD vykazovali 2,2-krát vyšší obsah pečeňového glykogénu ako myši s nosičom HFD (Obrázok 6D). Na posúdenie poškodenia pečene sme merali plazmatické hladiny alanínaminotransferázy (ALT). Hladiny ALT u DIO myší boli porovnateľné s hladinami nájdenými u chudých myší, nezávisle od liečby (Obrázok 6E).

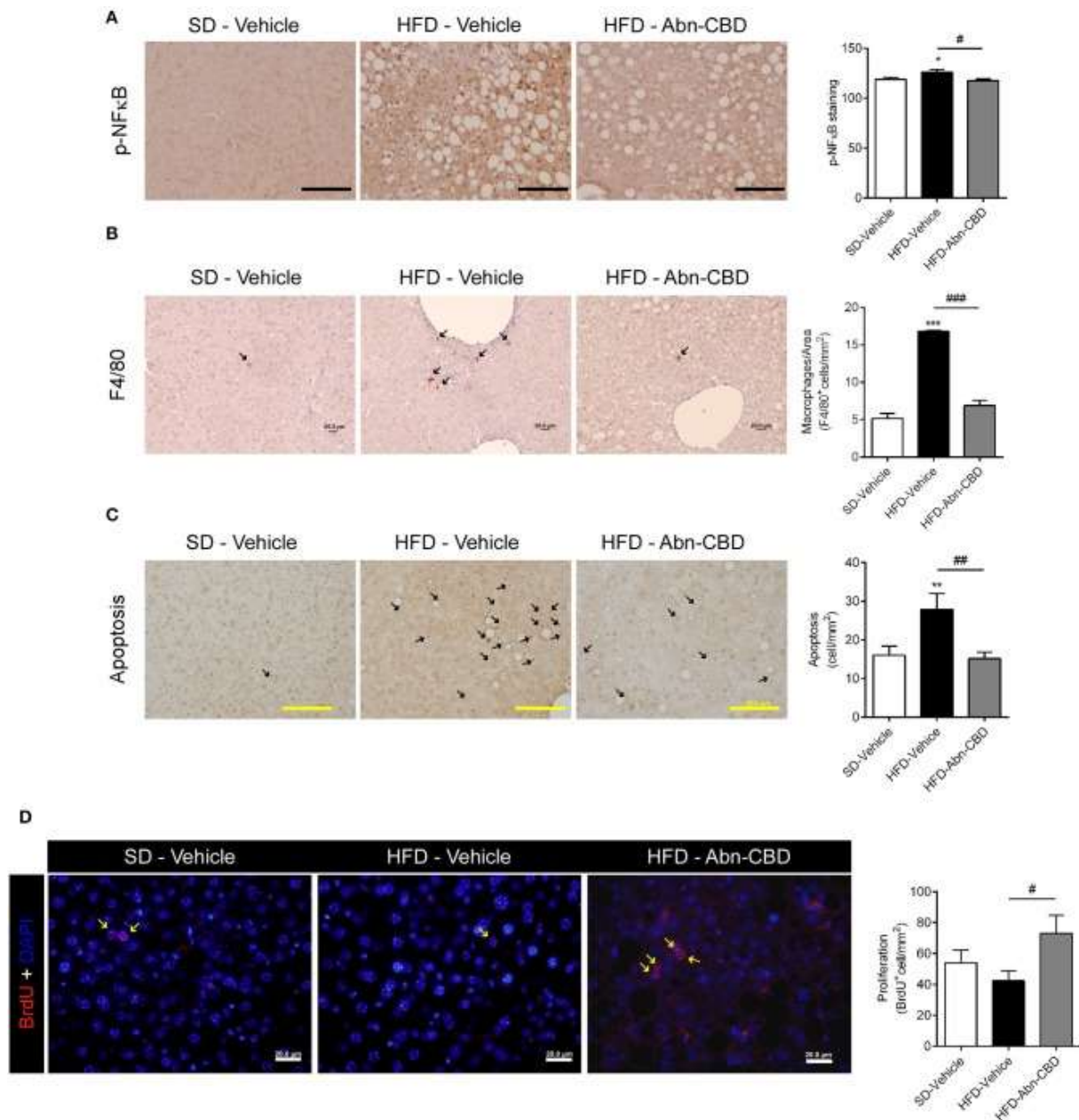


Účinok Abn-CBD na štruktúru a funkciu pečene. Reprezentatívne mikrofotografie a kvantifikácia pečene zafarbených na lipidové kvapôčky (A) a kolagénové vlákna (B) , mierka je 100  $\mu\text{m}$ . Reprezentatívne mikrofotografie imunofluorescencie v pečeni pre  $\alpha$ -SMA (červené), kontrastne zafarbené DAPI (modro) (C) . Biochemické stanovenie obsahu pečeneového glykogénu (D) a cirkulujúcich hladín alanínaminotransferázy (E) .  $n = 7-8$  SD-vozidlo,  $n = 5-8$  HFD-Vozidlo a  $n = 6-8$  HFD-Abn-CBD. \*  $p \leq 0,05$  a \*\*\*  $p \leq 0,001$  v porovnaní s SD-vehikulom; # $p \leq 0,05$  a ###  $p \leq 0,001$  v porovnaní s vozidlom HFD.

Abn-CBD chráni hepatocyty pred DIO-indukovanou infiltráciou imunitných buniek

Keďže myši HFD-Abn-CBD vykazovali zníženú fibrózu pečene súčasne s nižšími hladinami niekoľkých cirkulujúcich prozápalových cytokínov v porovnaní s myšami s vehikulom HFD, ďalej sme hodnotili stupeň zápalu pečene. Pečeň myší s nosičom HFD mala zvýšený p-NF $\kappa$ B v porovnaní s pečťou myší kŕmených SD, zatiaľ čo pečeň myší HFD-Abn-CBD mala významne znížené hladiny p-NF $\kappa$ B porovnateľné s hladinami v pečeni myší kŕmených SD (Obrázok 7A). Okrem toho pečeň myší s nosičom HFD vykazovala významné 3,3-násobné zvýšenie počtu makrofágov (bunky F4/80 + ) v porovnaní s myšami kŕmenými SD (Obrázok 7B). Liečba Abn-CBD výrazne znížila počet makrofágov na úrovne zistené u myší kŕmených SD (Obrázok 7B). Potom sme určili životaschopnosť hepatocytov meranú ako apoptózu a proliferáciu. Hepatocyty z myší s nosičom HFD prechádzali výrazne väčšou apoptózou ako u myší kŕmených SD, čo sa vrátilo po liečbe Abn-CBD (Obrázok 7C). Okrem toho Abn-CBD zvýšila proliferáciu hepatocytov v porovnaní s nosičom HFD, ale nie nad hladiny zistené v hepatocytoch z myší kŕmených SD (Obrázok 7D).





Účinok Abn-CBD na životaschopnosť hepatocytov a zápal pečene. (A) Reprezentatívne mikrofotografie a kvantifikácia pečene zafarbených na zápalový marker p-NFκB (A) , makrofágový marker F4/80 (B) a apoptotické bunky (C) ; šípky označujú zafarbené bunky; stupnica je 100 μm (A) , 20 μm (B) a 200 μm (C) . (D) Reprezentatívne mikrofotografie a kvantifikácia BrdU imunofluorescencie (červená) v pečeni, kontrastne zafarbená DAPI (modrá). Šípky označujú proliferujúce bunky. n = 7–8 SD vozidlo, n = 5–8 HFD vozidlo a n = 6–8 HFD-Abn-CBD. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 a \*\*\* p < 0,001 v porovnaní s SD-vehikulom; # p ≤ 0,05, ## p ≤ 0,01 a ### p ≤ 0,001 v porovnaní s HFD vozidlom.

## Diskusia

CBD a Abn-CBD nemajú psychoaktívne účinky, a preto sú atraktívnymi kandidátmi na výskum liečivého kanabisu. Tu sme skúmali in vivo pôsobenie Abn-CBD pri metabolických a zápalových dysfunkciách, ktoré vznikajú v súvislosti s obezitou, prediabetom a NAFLD. Na biochemickej a bunkovej úrovni sa u myší C57Bl6/J kŕmených 45 % HFD (nasýtené tuky z bravčovej masti) počas 15 týždňov prejavila dyslipidémia, hyperleptinémia, hypoadiponektinémia, hyperinzulinémia a zvýšená apoptóza buniek ostrovčekov. Okrem toho sa u myší vyvinula tukovatená pečeň s infiltráciou makrofágov, zvýšená apoptóza hepatocytov a znížená proliferácia hepatocytov. Nezistili sme však zhoršenú funkciu pečene, čo zdôrazňuje platnosť tohto myšacieho modelu na posúdenie nových terapií zameraných na skoré štádiá komorbidít obezity.

Celkovo subchronická liečba Abn-CBD v tomto myšacom modeli zlepšila zápal nízkeho stupňa, zvrátila hyperinzulinémiu a znížila fibrózu pečene bez zmeny telesnej hmotnosti alebo ektopickej akumulácie tuku v pečeni.

Hoci Abn-CBD neovplyvňuje telesnú hmotnosť ani lipidový profil, zvyšuje hladiny leptínu. V akútnych testoch bolo opísané, že CBD znižuje príjem potravy ( 29 , 30 ), ale jeho vplyv na telesnú hmotnosť je nedostatočne preskúmaný a kontroverzný ( 31 , 32 ). Predchádzajúce údaje s použitím modelu diabetickej myši indukovanej streptozotocínom (STZ) ukázali, že Abn-CBD znižuje príjem potravy ( 15 ), ktorá bola spojená s obnovenými hladinami inzulínu v plazme. Nezrovnalosti našich výsledkov s týmito zisteniami môžu spočívať v zjavných rozdieloch medzi modelom STZ a modelom DIO. Model STZ skutočne neindukuje obezitu, inzulínovú rezistenciu a hyperinzulinémiu, čo naznačuje, že základné mechanizmy pre zmeny príjmu potravy vyvolané Abn-CBD sú odlišné v modeli inzulínovej rezistencie a v modeli s deficitom produkcie inzulínu.

Zápal a inzulínová rezistencia sú úzko súvisiace procesy a v súčasnosti existujú dôkazy naznačujúce, že zápal je spôsobený inzulínovou rezistenciou ( 33 ). Bohužiaľ, po liečbe Abn-CBD sme nemohli zmerať toleranciu na inzulín alebo citlivosť na inzulín, ale absencia hyperinzulinémie bez zvýšenia hladín glukózy nalačno nepriamo naznačuje, že Abn-CBD môže zlepšiť citlivosť na inzulín v našom myšom modeli. Na jednoznačné stanovenie vplyvu Abn-CBD na inzulínovú toleranciu/citlivosť by však boli potrebné techniky zlatého štandardu, ako je euglykemická hyperinzulinemická svorka. Vzhľadom na to, že priame protizápalové vlastnosti boli pripisované Abn-CBD a iným agonistom GPR55 ( 19 , 34 , 35 ), znížený zápal v našom modeli by mohol súvisieť so zlepšenou citlivosťou na inzulín, priamym pôsobením na receptory, ako sú GPR18 a GPR55, alebo oboje. Ďalšie štúdie v tomto ohľade by boli potrebné na dešifrovanie molekulárneho mechanizmu, ktorý je základom úlohy Abn-CBD v citlivosti na inzulín voči zápalovým procesom.

My a iní sme už predtým demonštrovali, že Abn-CBD môže priamo stimulovať sekréciu inzulínu in vitro ( 21 , 23 ), ako aj in vivo na myšom modeli mierneho diabetu 1. typu ( 15 ). Podľa našich najlepších vedomostí však nebol testovaný na myšom modeli obezity a prediabetu. Tu sa nezdá, že by Abn-CBD interferoval s funkciou ostrovčekov, pretože nezmenil citlivosť ostrovčekov na glukózu, ako bolo hodnotené pomocou GSIS ex vivo experimenty. Hoci subchronická liečba Abn-CBD pri prediabetu

nezlepšuje sekréciu inzulínu, uvádzame tu, že hyperinzulinémia, ako aj trend zväčšovania plochy ostrovčekov u myši s nosičom HFD boli zvrátené, čo naznačuje, že subchronická liečba Abn-CBD v prediabete znižuje zápalový stav, ktorý vedie k smrti beta buniek.

Bez ohľadu na to, imunohistologická analýza pankreasu ukázala, že liečba Abn-CBD výrazne znížila apoptózu buniek ostrovčekov, pričom vyvolala proliferáciu beta buniek, čím podporila zachovanie hmoty beta buniek. Tieto zistenia sú v súlade s našou predchádzajúcou prácou, ktorá ukazuje proliferatívnu a ochrannú úlohu Abn-CBD proti apoptóze vyvolanej cytokínmi na izolovaných ostrovčekoch chudých myši a ľudí ( 21 ). Podobné pozorovania boli získané aj u diabetických myši vyvolaných STZ inou skupinou ( 15 ). Dôležité je, že už predtým sa ukázalo, že kanabinoidy a kanabinoídne receptory modulujú životaschopnosť ostrovčekov u DIO myši ( 36 , 37 ). Tu sme tiež zistili významné zníženie oxidačného stresu v pankrease izolovanom z myši HFD-Abn-CBD v porovnaní s myšami s nosičom HFD. Okrem toho Abn-CBD významne znížilo hladiny fosforylovaného (tj aktívneho) NF $\kappa$ B, čo potvrdzuje nižšiu apoptózu buniek v ostrovčekoch z myši liečených HFD-Abn-CBD. Abn-CBD teda zachováva životaschopnosť ostrovčekov a hmotu beta buniek in vivo znížením apoptózy buniek ostrovčekov a zvýšením proliferácie beta buniek.

Dôležité je, že proadipozitný účinok zistený pri liečbe Abn-CBD bol nielen zbavený ďalšej prozápalovej zložky, ale bol skôr sprevádzaný poklesmi plazmatických hladín cytokínov zapojených do systémového zápalu nízkeho stupňa, ako je IL-6, IL-5 a úroveň CXCL1. V skutočnosti je IL-6 jedným z primárnych mediátorov zápalu nízkeho stupňa pri obezite ( 3 ) a zistilo sa, že CXCL-1 aj IL-5 sú zmenené pri prediabete ( 6 , 38 ). Existujú určité dôkazy poukazujúce na Abn-CBD ako modulátor zápalovej odpovede ( 19 ) a dva hlavné receptory spojené s G-proteínom (GPCR), ktoré doteraz súviseli s účinkami Abn-CBD, tj GPR18 a GPR55. sa široko podieľa na zápaloch a súvisiacich procesoch ( 39 , 40 ). V porovnaní s našimi údajmi, GPR55 agonista O-1602 významne znížil hladiny IL-6 v plazme aj tkanive pankreasu u myši s pankreatitídou vyvolanou ceruleínom ( 34 ). Naše výsledky preto podporujú protizápalový účinok Abn-CBD pri prediabete a NAFLD. Predpokladané zapojenie Abn-CBD do procesov hnednutia nebolo doteraz preskúmané. Naše výsledky ukazujú, že Abn-CBD silne zvyšuje Ucp1 expresie v DPH, čo tiež pôsobí proti poklesu SAT vyvolanému HFD. To naznačuje, že Abn-CBD podporuje hnednutie vo WAT, čo by potenciálne mohlo prispievať k zníženiu meta-zápalu. Tento prvý dôkaz si vyžaduje ďalšie skúmanie úlohy, ktorú môže mať Abn-CBD na výdaj energie. NAFLD je čoraz väčším problémom pri komorbiditách súvisiacich s obezitou, pretože zhoršuje metabolický syndróm, rozvoj inzulinovej rezistencie a kardiovaskulárne ochorenia ( 41 ). Ako sa očakávalo, HFD vyvolalo výrazné zvýšenie ektopického tuku v pečeni nášho myšacieho modelu. Hoci liečba Abn-CBD neresorbovala depot tuku, znížila zafarbenie kolagénu, čo naznačuje zníženie fibrózy, s najväčšou pravdepodobnosťou znížením prozápalového prostredia. Dôležité je, že liečba Abn-CBD neovplyvnila funkciu pečene, pretože jej kapacita ukladať glykogén ani marker funkcie pečene ALT neboli ohrozené. Predtým sa zistilo, že CBD chráni pečeň pred steatózou vyvolanou alkoholom aj nealkoholom mechanizmami vrátane inhibície oxidačného stresu, zvýšenia autofágie a zníženia akumulácie lipidov ( 42 , 43 ). Na rozdiel od toho nedávna správa zistila škodlivý účinok chronického podávania atypických kanabinooidov O-1918 a O-1602 v pečeni potkanov DIO Sprague-Dawley ( 44 ). Podané dávky však boli 100-krát vyššie ako dávky použité v našej štúdii, čo by mohlo zodpovedať za zvýšené mimocieľové účinky a chemickú toxicitu. Tiež sme zistili, že Abn-CBD znížil apoptózu a zachoval proliferáciu v pečenných bunkách. Zvýšená proliferácia hepatocytov by mohla niesť riziko rozvoja hepatocelulárneho karcinómu, ktorý súvisí s nástupom NAFLD ( 45 ). V skutočnosti vysoké hladiny IL-6 potláčajú proliferáciu hepatocytov pri obezite ( 46 ), možno ako ochranný mechanizmus. Abn-CBD však zvýšila proliferáciu hepatocytov

iba v porovnaní s nosičom HFD, ale proliferatívne hladiny neboli vyššie ako hladiny zistené u zdravých myší (myši kŕmené SD). To súhlasí s tým, že Abn-CBD zachováva proliferáciu hepatocytov bez indukcie tumorogenézy. Je zaujímavé, že sa uvádza, že Abn-CBD má skôr protinádorovú aktivitu než podporuje nekontrolovanú proliferáciu ( 47 , 48). Vzhľadom na to, že Abn-CBD tiež znížila hladiny IL-6 u našich myší, priaznivé účinky Abn-CBD na zachovanie proliferácie hepatocytov môžu byť sprostredkované znížením hladín IL-6. Počet makrofágov infiltrujúcich pečeň a aktivácia dráhy p-NFκB sa tiež znížila, čo naznačuje znížený intrahepatálny zápal. Je zaujímavé, že IL-6, pre ktorý boli zvýšenia sprostredkované DIO v našej štúdii zvrátené pomocou Abn-CBD, sa zistilo, že hrá dôležitú úlohu pri zápale pečene vyvolanom obezitou ( 49 , 50 ). Ukázalo sa tiež, že CBD chráni pečeň moduláciou zápalu, oxidačného stresu a bunkovej smrti ( 51 ). Za zmienku stojí, že CBD pôsobí ako funkčný antagonist CB1R ( 52), ktorých blokáda údajne zvrátila steatózu pečene u myší DIO ( 53 ). Navyše, O-1918, považovaný za antagonistu Abn-CBD receptora, zvýšil hladiny cirkulujúcich prozápalových cytokínov u DIO potkanov ( 44 ). Celkovo tieto výsledky poukazujú na to, že Abn-CBD podporuje zdravšie bunkové prostredie aj v pečeni.

V súhrne tu uvádzame dôkaz, že atypický kanabinoid Abn-CBD je schopný vyvolať prospešné metabolické a protizápalové účinky na systémovej aj tkanivovej úrovni v myšom modeli prediabetu vyvolaného diétou a NAFLD. Vzhľadom na pohlavné obmedzenie našej štúdie - vykonanej iba u mužov - sú opodstatnené ďalšie štúdie na potvrdenie týchto účinkov u žien. Tieto výsledky si vyžadujú ďalšie skúmanie potenciálu tejto zlúčeniny a/alebo príbuzných molekúl pri liečbe skorých štádií metabolických ochorení vyvolaných obezitou.

## Referencie

1. Nyberg ST, Batty GD, Pentti J, Virtanen M, Alfredsson L, Fransson EI, et al. . Obesity and loss of disease-free years owing to major non-communicable diseases: a multicohort study. *Lancet Public Heal.* (2018) 3:e490–7. 10.1016/S2468-2667(18)30139-7 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
2. Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol.* (2008) 8:923–34. 10.1038/nri2449 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
3. Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes: The good, the bad, or the indifferent? *Diabetes.* (2005) 54:S114–24. 10.2337/diabetes.54.suppl\_2.S114 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
4. Cardellini M, Andreozzi F, Laratta E, Marini MA, Lauro R, Hribal ML, et al. . Plasma interleukin-6 levels are increased in subjects with impaired glucose tolerance but not in those with impaired fasting glucose in a cohort of Italian Caucasians. *Diabetes Metab Res Rev.* (2007) 23:141–5. 10.1002/dmrr.679 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
5. Konukoglu D, Hatemi H, Bayer H, Bagriaçik N. Relationship between serum concentrations of interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in female Turkish subjects with normal and impaired glucose tolerance. *Horm Metab Res.* (2006) 38:34–7. 10.1055/s-2006-924974 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
6. Lucas R, Parikh SJ, Sridhar S, Guo DH, Bhagatwala J, Dong Y, et al. . Cytokine profiling of young overweight and obese female African American adults with prediabetes. *Cytokine.* (2013) 64:310–5. 10.1016/j.cyto.2013.05.025 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

7. Donath MY, Størling J, Maedler K, Mandrup-Poulsen T. Inflammatory mediators and islet  $\beta$ -cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *J Mol Med.* (2003) 81:455–70. 10.1007/s00109-003-0450-y [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
8. Westwell-Roper CY, Ehses JA, Verchere CB. Resident macrophages mediate islet amyloid polypeptide-induced islet IL-1 $\beta$  production and  $\beta$ -cell dysfunction. *Diabetes.* (2014) 63:1698–711. 10.2337/db13-0863 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
9. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol.* (2015) 62:547–64. 10.1016/j.jhep.2014.12.012 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
10. Cluny NL, Reimer RA, Sharkey KA. Cannabinoid signalling regulates inflammation and energy balance: the importance of the brain-gut axis. *Brain Behav Immun.* (2012) 26:691–8. 10.1016/j.bbi.2012.01.004 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
11. Bermudez-Silva FJ, Viveros MP., McPartland JM, Rodriguez de Fonseca F. The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? *Pharmacol Biochem Behav.* (2010) 95:375–82. 10.1016/j.pbb.2010.03.012 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
12. Ashton JC. The atypical cannabinoid O-1602: targets, actions, and the Central Nervous System. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* (2012) 12:233–9. 10.2174/187152412802430156 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
13. Booz GW. Cannabidiol as an emergent therapeutic strategy for lessening the impact of inflammation on oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* (2011) 51:1054–61. 10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.007 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
14. El-Remessy AB, Al-Shabrawey M, Khalifa Y, Tsai NT, Caldwell RB, Liou GI. Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes. *Am J Pathol.* (2006) 168:235–44. 10.2353/ajpath.2006.050500 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
15. McKillop AM, Moran BM, Abdel-Wahab YHA, Gormley NM, Flatt PR. Metabolic effects of orally administered small-molecule agonists of GPR55 and GPR119 in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetic and incretin-receptor-knockout mice. *Diabetologia.* (2016) 59:2674–85. 10.1007/s00125-016-4108-z [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
16. Weiss L, Zeira M, Reich S, Har-Noy M, Mechoulam R, Slavin S, et al. . Cannabidiol lowers incidence of diabetes in non-obese diabetic mice. *Autoimmunity.* (2006) 39:143–51. 10.1080/08916930500356674 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
17. Jadoon KA, Ratcliffe SH, Barrett DA, Thomas EL, Stott C, Bell JD, et al. . Efficacy and safety of cannabidiol and tetrahydrocannabivarin on glycemic and lipid parameters in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group pilot study. *Diabetes Care.* (2016) 39:1777–86. 10.2337/dc16-0650 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
18. J rai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, et al. . Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1999) 96:14136–41. 10.1073/pnas.96.24.14136 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
19. Krohn RM, Parsons SA, Fichna J, Patel KD, Yates RM, Sharkey KA, et al. . Abnormal cannabidiol attenuates experimental colitis in mice, promotes wound healing and inhibits neutrophil recruitment.

J Inflamm. (2016) 13:21. 10.1186/s12950-016-0129-0 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

20. Montecucco F, Bondarenko AI, Lenglet S, Burger F, Piscitelli F, Carbone F, et al. . Treatment with the GPR55 antagonist CID16020046 increases neutrophil activation in mouse atherogenesis. *Thromb Haemost.* (2016) 116:987–97. 10.1160/TH16-02-0139 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

21. Ruz-Maldonado I, Pingitore A, Liu B, Atanes P, Huang GC, Baker D, et al. . LH-21 and abnormal cannabidiol improve  $\beta$ -cell function in isolated human and mouse islets through GPR55-dependent and -independent signalling. *Diabetes, Obes Metab.* (2018) 20:930–42. 10.1111/dom.13180 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

22. Romero-Zerbo SY, Ruz-Maldonado I, Espinosa-Jiménez V, Rafacho A, Gómez-Conde AI, Sánchez-Salido L, et al. . The cannabinoid ligand LH-21 reduces anxiety and improves glucose handling in diet-induced obese pre-diabetic mice. *Sci Rep.* (2017) 7:3946. 10.1038/s41598-017-03292-w [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

23. McKillop AM, Moran BM, Abdel-Wahab YH, Flatt PR. Evaluation of the insulin releasing and antihyperglycaemic activities of GPR55 lipid agonists using clonal beta-cells, isolated pancreatic islets and mice. *Br J Pharmacol.* (2013) 170:978–90. 10.1111/bph.12356 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

24. Bermudez-Silva FJ, Romero-Zerbo SY, Haissaguerre M, Ruz-Maldonado I, Lhamyani S, El Bekay R, et al. . The cannabinoid CB1 receptor and mTORC1 signalling pathways interact to modulate glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech.* (2016) 9:51–61. 10.1242/dmm.020750 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

25. Giozzet VAG, Rafacho A, Boscherio AC, Carneiro EM, Bosqueiro JR. Dexamethasone treatment in vivo counteracts the functional pancreatic islet alterations caused by malnourishment in rats. *Metabolism.* (2008) 57:617–24. 10.1016/j.metabol.2007.12.004 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

26. Lo S, Russell JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol.* (1970) 28:234–6. 10.1152/jappl.1970.28.2.234 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

27. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem.* (1996) 271:10697–703. 10.1074/jbc.271.18.10697 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

28. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* (2005) 115:911–9. 10.1016/j.jaci.2005.02.023 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

29. Farrimond JA, Whalley BJ, Williams CM. Cannabinol and cannabidiol exert opposing effects on rat feeding patterns. *Psychopharmacology.* (2012) 223:117–29. 10.1007/s00213-012-2697-x [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

30. Sofia RD, Knobloch LC. Comparative effects of various naturally occurring cannabinoids on food, sucrose and water consumption by rats. *Pharmacol Biochem Behav.* (1976) 4:591–9. 10.1016/0091-3057(76)90202-1 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

31. Ignatowska-Jankowska B, Jankowski MM, Swiergiel AH. Cannabidiol decreases body weight gain in rats: Involvement of CB2 receptors. *Neurosci Lett.* (2011) 490:82–4. 10.1016/j.neulet.2010.12.031 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

32. Wierucka-Rybak M, Wolak M, Bojanowska E. The effects of leptin in combination with a cannabinoid receptor 1 antagonist, AM 251, or cannabidiol on food intake and bodyweight in rats fed

a high-fat or a free-choice high sugar diet. *J Physiol Pharmacol.* (2014) 65:487–96. [PubMed] [Google Scholar]

33. Shimobayashi M, Albert V, Woelnerhanssen B, Frei IC, Weissenberger D, Meyer-Gerspach AC, et al. . Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue. *J Clin Invest.* (2018) 128:1538–50. 10.1172/JCI96139 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

34. Li K, Feng J, Li Y, Yuce B, Lin X, Yu L, et al. . Anti-Inflammatory role of cannabidiol and O-1602 in cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Pancreas.* (2013) 42:123–9. 10.1097/MPA.0b013e318259f6f0 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

35. Schicho R, Storr M. A potential role for GPR55 in gastrointestinal functions. *Curr Opin Pharmacol.* (2012) 12:653–8. 10.1016/j.coph.2012.09.009 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

36. González-Mariscal I, Montoro RA, Doyle ME, Liu Q-R, Rouse M, O'Connell JF, et al. . Absence of cannabinoid 1 receptor in beta cells protects against high-fat/high-sugar diet-induced beta cell dysfunction and inflammation in murine islets. *Diabetologia.* (2018) 61:1470–83. 10.1007/s00125-018-4576-4 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

37. Jourdan T, Godlewski G, Cinar R, Bertola A, Szanda G, Liu J, et al. . Activation of the Nlrp3 inflammasome in infiltrating macrophages by endocannabinoids mediates beta cell loss in type 2 diabetes. *Nat Med.* (2013) 19:1132–40. 10.1038/nm.3265 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

38. Rebuffat SA, Sidot E, Guzman C, Azay-Milhau J, Jover B, Lajoix AD, et al. . Adipose tissue derived-factors impaired pancreatic  $\beta$ -cell function in diabetes. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* (2018) 1864:3378–87. 10.1016/j.bbadis.2018.07.024 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

39. Rajaraman G, Simcocks A, Hryciw DH, Hutchinson DS, McAinch AJ. G protein coupled receptor 18: a potential role for endocannabinoid signaling in metabolic dysfunction. *Mol Nutr Food Res.* (2016) 60:92–102. 10.1002/mnfr.201500449 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

40. Yang H, Zhou J, Lehmann C. GPR55 - A putative 'type 3' cannabinoid receptor in inflammation. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* (2016) 27:297–302. 10.1515/jbcpp-2015-0080 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

41. Vanni E, Bugianesi E, Kotronen A, De Minicis S, Yki-Järvinen H, Svegliati-Baroni G. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Dig Liver Dis.* (2010) 42:320–30. 10.1016/j.dld.2010.01.016 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

42. Silvestri C, Paris D, Martella A, Melck D, Guadagnino I, Cawthorne M, et al. . Two non-psychoactive cannabinoids reduce intracellular lipid levels and inhibit hepatosteatosis. *J Hepatol.* (2015) 62:1382–90. 10.1016/j.jhep.2015.01.001 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

43. Yang L, Rozenfeld R, Wu D, Devi LA, Zhang Z, Cederbaum A. Cannabidiol protects liver from binge alcohol-induced steatosis by mechanisms including inhibition of oxidative stress and increase in autophagy. *Free Radic Biol Med.* (2014) 68:260–7. 10.1016/j.freeradbiomed.2013.12.026 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

44. Simcocks AC, Jenkin KA, O'Keefe L, Samuel CS, Mathai ML, McAinch AJ, et al. . Atypical cannabinoid ligands O-1602 and O-1918 administered chronically in diet-induced obesity. *Endocr Connect.* (2019) 8:203–16. 10.1530/EC-18-0535 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

45. Sanyal AJ, Yoon SK, Lencioni R. The etiology of hepatocellular carcinoma and consequences for treatment. *Oncologist*. (2010) 15:14–22. 10.1634/theoncologist.2010-S4-14 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
46. Sun R, Jaruga B, Kulkarni S, Sun H, Gao B. IL-6 modulates hepatocyte proliferation via induction of HGF/p21cip1: regulation by SOCS3. *Biochem Biophys Res Commun*. (2005) 338:1943–9. 10.1016/j.bbrc.2005.10.171 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
47. Tomko A, O'Leary L, Trask H, Achenbach JC, Hall SR, Goralski KB, et al. . Antitumor activity of abnormal cannabidiol and its analog O-1602 in taxol-resistant preclinical models of breast cancer. *Front Pharmacol*. (2019) 10:1124. 10.3389/fphar.2019.01124 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
48. Tucker AN, Friedman MA. Effects of cannabinoids on L1210 murine leukemia. 1. Inhibition of DNA synthesis. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol*. (1977) 17:703–14. [PubMed] [Google Scholar]
49. Miller AM, Wang H, Bertola A, Park O, Horiguchi N, Hwan Ki S, et al. . Inflammation-associated interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 activation ameliorates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in interleukin-10-deficient mice. *Hepatology*. (2011) 54:846–56. 10.1002/hep.24517 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
50. Park EJ, Lee JH, Yu GY, He G, Ali SR, Holzer RG, et al. . Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*. (2010) 140:197–208. 10.1016/j.cell.2009.12.052 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
51. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Horváth B, Bátkai S, Park O, Tanchian G, et al. . Cannabidiol protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating inflammatory signaling and response, oxidative/nitrative stress, and cell death. *Free Radic Biol Med*. (2011) 50:1368–81. 10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.021 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
52. Bisogno T, Hanuš L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, et al. . Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol*. (2001) 134:845–52. 10.1038/sj.bjp.0704327 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
53. Jourdan T, Djaouti L, Demizieux L, Gresti J, Vergès B, Degrace P. CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes*. (2010) 59:926–34. 10.2337/db09-1482 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]