



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

Διδρυματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
Μοριακή-Κυτταρική Βιολογία και Βιοτεχνολογία

**«Ο ρόλος του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος στο  
πειραματικό πρότυπο Fmr1 KO: Εστιάζοντας σε  
συμπεριφορικούς και νευροβιολογικούς δείκτες που  
σχετίζονται με την πλαστικότητα και εκφάνσεις γνωστικών  
λειτουργιών»**

Διατριβή Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης

Νάτση Εύα Μαρία

Βιολόγος

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Κατερίνα Αντωνίου

Ιωάννινα, 2024



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Φαρμακολογίας κυρίας Κατερίνας Αντωνίου. Ολοκληρώνοντας την θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίηση της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Ευστάθιο Φριλίγγο, Καθηγητή Βιολογικής Χημείας και διευθυντή του Δ.Π.Μ.Σ. «Μοριακή-Κυτταρική Βιολογία και Βιοτεχνολογία» καθώς και την επιτροπή επιλογής, που ενέκριναν την ένταξή μου στο συγκεκριμένο πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών κατά το ακαδημαϊκός έτος 2021-2022.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της εργασίας, κυρία Κατερίνα Αντωνίου για την συνεργασία, τη συνεχή καθοδήγηση, τις εποικοδομητικές συζητήσεις, τις πολύτιμες συμβουλές καθώς και την αμέριστη υποστήριξη της όλο το διάστημα της εκπόνησης της εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ομότιμη Καθηγήτρια κυρία Αναστασία Πολίτου, την Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας κυρία Θωμαΐς Παπαμαρκάκη, τον Καθηγητή Βιολογικής Χημείας κύριο Ευστάθιο Φριλίγγο και τον Επίκουρο Καθηγητή Βιολογίας κύριο Δημήτριο Λιακόπουλο που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην πενταμελή εξεταστική επιτροπή.

Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου, τον διδάκτορα Χάρη Μπρακατσέλο, τους υποψήφιους διδάκτορες Γιώργο Ντούλα, Γεράσιμο Νάκα και Όλγα Τσαρνά, καθώς και τον συνεργάτη Μιχάλη Ασπρογέρακα, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές, τις γνώσεις και τις δεξιότητες που μου μέτεδωσαν, την υποστήριξη καθώς και το φιλικό κλίμα που επικρατούσε όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου, το σύντροφό μου και τις φίλες μου που με υποστήριζαν και ήταν δίπλα μου κάθε φορά που τους χρειάστηκα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το σύνδρομο του εύθραυστου X (Fragile X Syndrome, FXS) αποτελεί την πιο κοινή αιτία κληρονομούμενης νοητικής υστέρησης καθώς και την κυρίαρχη μονογονιδιακή αιτία αυτισμού, και προκαλείται από την έλλειψη της πρωτεΐνης FMRP. Οι προκλινικές έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα εστιάζουν στη σημασία της γλουταματεργικής και GABA-εργικής νευροδιαβίβασης, καθώς διαταραχές σε αυτήν την ισορροπία έχουν συσχετιστεί με διάφορες νευροψυχιατρικές παθήσεις, συμπεριλαμβανομένου και του συνδρόμου του εύθραυστου X. Ωστόσο, ελάχιστες μελέτες διερευνούν το ρόλο του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος στην παθοφυσιολογία του συνδρόμου FXS. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιόλης σε συγκεκριμένους συμπεριφορικούς και νευροβιολογικούς δείκτες στο πειραματικό πρότυπο Fmr1 KO επίμυων. Το πειραματικό πρότυπο Fmr1 KO αντανάκλα την συμπτωματολογία του Συνδρόμου Ευθραύστου X, εμφανίζοντας ένα προφίλ υπερκινητικότητας και ελλειμάτων σε γνωστικές λειτουργίες που σχετίζονται με την χωρική και αναγνωριστική μνήμη και μάθηση. Πραγματοποιήθηκαν συμπεριφορικές δοκιμασίες για την καταγραφή παραμέτρων που σχετίζονται με την κινητική δραστηριότητα και συγκεκριμένες γνωστικές λειτουργίες, κατόπιν οξείας χορήγησης κανναβιδιόλης ή εκδόχου. Επιπλέον, εξετάστηκε η λειτουργία του γλουταματεργικού συστήματος μέσω αξιολόγησης της πρωτεϊνικής έκφρασης των υπομονάδων των υποδοχέων NMDA και μορίων του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, σε διαφορετικές εγκεφαλικές περιοχές, που σχετίζονται με τη γνωστική λειτουργία και τη νευροπλαστικότητα.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η χορήγηση κανναβιδιόλης στη δόση των 30mg/kg κατέστειλε την υπερκινητικότητα στους Fmr1 KO επίμυες, χωρίς ωστόσο να βελτιώσει τα ελλείμματα στη βραχυπρόθεσμη αναγνωριστική και χωρική μνήμη. Παράλληλα, η κανναβιδιόλη ανέστρεψε την μείωση στην πρωτεϊνική έκφραση της υπομονάδας GluN2B του NMDA υποδοχέα στον κοιλιακό ιππόκαμπο, υποδηλώνοντας πιθανή θετική επίδραση στη συναπτική πλαστικότητα. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές ως προς την έκφραση του ενζύμου FAAH υποδεικνύοντας την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση. Τα ευρήματά μας καταδεικνύουν την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης της κανναβιδιόλης σε επιπλέον δείκτες νευροπλαστικότητας και γλουταματεργικής λειτουργίας ενώ καθίσταται αναγκαία και η περαιτέρω διερεύνηση του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος.

## **ABSTRACT**

Fragile X Syndrome (FXS) is the most common inherited cause of intellectual disability and the predominant single gene cause of autism, caused by the lack of the FMRP protein. Preclinical research has focused on the significance of glutamatergic and GABAergic neurotransmission, as disruptions in this balance have been associated with various neuropsychiatric disorders, including Fragile X Syndrome. However, few studies have investigated the role of the endocannabinoid system in the pathophysiology of FXS. In the present study, the effects of acute cannabidiol administration on specific behavioral and neurobiological markers were investigated using the Fmr1 KO rat model. The Fmr1 KO rat model reflects the symptomatology of Fragile X Syndrome, displaying a profile of hyperactivity and deficits in cognitive functions related to spatial and recognition memory and learning. Behavioral tests were conducted to record parameters related to motor activity and specific cognitive functions following acute administration of cannabidiol or vehicle. Additionally, the function of the glutamatergic system was examined by evaluating the protein expression of NMDA receptor subunits and molecules of the endocannabinoid system, using Western immunoblotting, in different brain regions associated with cognitive function and neuroplasticity.

The results of the present study showed that cannabidiol administration at a dose of 30 mg/kg suppressed hyperactivity in Fmr1 KO rats but did not improve deficits in short-term recognition and spatial memory. At the same time, cannabidiol reversed the decrease in protein expression of the GluN2B subunit of the NMDA receptor in the ventral hippocampus, suggesting a possible positive effect on synaptic plasticity. However, no changes were observed in the expression of the FAAH enzyme, indicating the need for further investigation. Our findings highlight the necessity for further investigation of the effects of cannabidiol on additional markers of neuroplasticity and glutamatergic function, as well as the endocannabinoid system.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

|              |  |
|--------------|--|
| <b>FMR1</b>  | Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1 gene |
| <b>FMRP</b>  | Fragile X messenger ribonucleoprotein        |
| <b>FXR1P</b> | Fragile X related protein 1                  |
| <b>FXR2P</b> | Fragile X related protein 2                  |
| <b>FXS</b>   | Fragile X Syndrome                           |
| <b>GABA</b>  | $\gamma$ -Aminobutyric acid                  |
| <b>KO</b>    | Knock Out                                    |
| <b>LTD</b>   | Long-term Depression                         |
| <b>LTP</b>   | Long-term Potentiation                       |
| <b>NES</b>   | Nuclear Export Signal                        |
| <b>NLS</b>   | Nuclear Localization Signal                  |
| <b>PFC</b>   | Prefrontal Cortex                            |
| <b>V.Hip</b> | Ventral Hippocampus                          |
| <b>D.Hip</b> | Dorsal Hippocampus                           |
| <b>WT</b>    | Wild Type                                    |
| <b>ECS</b>   | Endocannabinoid System                       |
| <b>CBD</b>   | Cannabidiol                                  |
| <b>DGKk</b>  | Diacylglycerol kinase kappa                  |

## Πίνακας περιεχομένων

|   |    |
|---|----|
| <b>1. 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....   | 1  |
| <b>1.1 Σύνδρομο Εύθραστου X</b> .....   | 2  |
| <b>1.2 Επιπολασμός και Κλινικά χαρακτηριστικά του FXS</b> .....   | 3  |
| <b>1.3 Γονίδιο FMR1 και Πρωτεΐνη FMRP</b> .....   | 4  |
| <b>1.5 Νευροβιολογικοί Μηχανισμοί</b> .....   | 8  |
| 1.5.1 Γλουταματεργική Νευροδιαβίβαση.....   | 8  |
| 1.5.2 GABAεργικό σύστημα.....   | 12 |
| 1.5.3 Ενδοκανναβινοειδές Σύστημα.....   | 12 |
| <b>1.6 Κανναβιδιόλη (CBD)</b> .....   | 17 |
| <b>1.7 Μοντέλα μελέτης FXS και Κανναβιδιόλη</b> .....   | 19 |
| <b>ΣΚΟΠΟΣ</b> .....   | 22 |
| <b>2. 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....  | 23 |
| <b>2.1 Πειραματόζωα</b> .....   | 24 |
| <b>2.2 Γονοτύπηση μέσω PCR</b> .....  | 25 |
| <b>2.3 Φάρμακα</b> .....  | 25 |
| <b>2.4 Συμπεριφορικές δοκιμασίες</b> .....  | 26 |
| 2.4.1 Δοκιμασία Ανοιχτού Πεδίου ( Open Field Test, OFT).....  | 26 |
| 2.4.2 Δοκιμασία Αναγνώρισης Θέσης Αντικειμένου (Novel Object Location Task, NOLT).....                        | 27 |
| 2.4.3 Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου (Novel Object Recognition Task, NORT).....                      | 29 |
| <b>2.5 Προσδιορισμός νευροβιολογικών παραμέτρων μέσω Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blotting)</b> ..... | 30 |
| 2.5.1 Θυσία πειραματοζώων και απομόνωση εγκεφαλικών περιοχών.....   | 30 |
| 2.5.2 Ομογενοποίηση Εγκεφαλικών Περιοχών.....   | 31 |
| 2.5.3 Ανοσοαποτύπωση (Immunoblotting).....  | 32 |
| 2.5.9 Στατιστική Ανάλυση.....   | 33 |
| <b>3. 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....   | 34 |
| <b>3.1 Συμπεριφορικές Δοκιμασίες</b> .....  | 35 |
| 3.1.1 Δοκιμασία Ανοιχτού Πεδίου (Open Field Test).....  | 35 |
| 3.1.2 Δοκιμασία Αναγνώρισης Θέσης Αντικειμένου (NOLT).....  | 36 |
| 3.1.3 Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου αντικειμένου (NORT).....   | 37 |
| <b>3.2 Εκτίμηση επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western</b> .....                     | 38 |

|  |           |
|--|-----------|
| Προμετωπιαίος Φλοιός (PFC) .....                 | 38        |
| Ραχιαίος Ιππόκαμπος (Dorsal Hippocampus) .....   | 39        |
| Κοιλιακός Ιππόκαμπος (Ventral Hippocampus) ..... | 40        |
| <b>4. 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....                      | <b>41</b> |
| <b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....                     | <b>47</b> |



# **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## 1.1 Σύνδρομο Εύθραυστου X

Τα γονίδια τα οποία εμπλέκονται στη φυσιολογική και εύρυθμη λειτουργία του εγκεφάλου είναι εκατοντάδες και διασκορπισμένα σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Διαταραχές στη δομή ή λειτουργία τους σχετίζονται με την εμφάνιση νευροαναπτυξιακών διαταραχών όπως είναι η νοητική υστέρηση αλλά και οι Διαταραχές του Φάσματος του Αυτισμού (ΔΑΦ, Autism Spectrum Disorder - ASD) (Miyachi & Voineagu, 2013). Υπάρχουν περισσότερα από εκατό γονίδια σε διαφορετικά χρωμοσώματα που μπορεί να εμπλέκονται στην πρόκληση διαφορετικού βαθμού φάσματος του αυτισμού. Ορισμένες μεταλλάξεις ή συνδυασμοί μεταλλάξεων μπορεί να προκαλέσουν συγκεκριμένη συμπτωματολογία και να επηρεάσουν τον βαθμό σοβαρότητας της διαταραχής, με την πιθανότητα εμφάνισης αυτισμού. Πάνω από 100 σπάνια γενετικά σύνδρομα έχουν συσχετιστεί με τον αυτισμό. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται σύνδρομα όπως το Σύνδρομο Ευθραύστου X (μεταλλαγή στο γονίδιο FMR1), η διαταραχή Rett (μεταλλαγή στο γονίδιο MECP2), το σύνδρομο Timothy κ.ά. (Caglayan, 2010; Miyachi & Voineagu, 2013). Έχει βρεθεί ότι 1-3% των ατόμων με ΔΑΦ διαγιγνώσκονται με το Σύνδρομο Ευθραύστου X, γεγονός που το καθιστά την πιο συχνή μορφή γενετικής αιτίας αυτισμού.

Το **Σύνδρομο του Εύθραυστου X** (Fragile X Syndrome - FXS) αποτελεί την πιο κοινή αιτία κληρονομούμενης νοητικής υστέρησης καθώς και την κυρίαρχη μονογονιδιακή αιτία αυτισμού (Dionne & Corbin, 2021). Πρόκειται για μια νευροαναπτυξιακή γενετική ασθένεια, η οποία προκαλείται από μετάλλαξη του γονιδίου FMR1 (Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1 gene), το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα X, με συνέπεια την πλήρη απουσία ή την παραγωγή μη λειτουργικής πρωτεΐνης FMRP (Fragile X messenger ribonucleoprotein). Το σύνδρομο περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τους James Purdon Martin και Julia Bell, το 1943, σε μια οικογένεια ως ένα σύνδρομο νοητικής υστέρησης με μορφολογικά χαρακτηριστικά, το οποίο επηρέαζε κυρίως τους άνδρες (Purdon Martin & Bell, 1943). Αρκετά χρόνια αργότερα, το 1969 (Lubs H, 1969), έγινε γνωστό ως σύνδρομο του Ευθραύστου X επειδή ορισμένα άτομα με τη διαταραχή αυτή βρέθηκαν να έχουν ένα τμήμα του χρωμοσώματος X, σπασμένο ή εύθραυστο, χωρίς όμως να έχει αποχωριστεί. Το 1991, τρεις ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες εργάστηκαν ανεξάρτητα, δίνοντάς του την ονομασία FMR1 (Fragile X Mental Retardation type 1). Ειδικότερα, αναφέρθηκε για πρώτη φορά η παρουσία μιας «δυναμικής μετάλλαξης» στο γονίδιο αυτό, δηλαδή μια επέκταση της τριπλέτας των βάσεων CGG, η οποία αυξάνεται μεταξύ των γενεών (Oberlé et al., 1991; Verkerk et al., 1991; Yu et al., 1991). Μετά την ανακάλυψη του γονιδίου FMR1, διεξήχθησαν διάφορες μελέτες για να περιγραφεί ο κλινικός φαινότυπος των ατόμων με το σύνδρομο εύθραυστου X. Οι έρευνες συνεχίζονται μέχρι σήμερα, με αλλαγή όπως προαναφέρθηκε στην ονομασία του γονιδίου και της πρωτεΐνης, για να αποσαφηνιστούν τόσο οι μοριακοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί του συνδρόμου, αλλά και για να αναπτυχθούν, νέες

στρατηγικές φαρμακευτικών και καταλληλότερων θεραπευτικών προσεγγίσεων (Mila et al., 2018).

## 1.2 Επιπολασμός και Κλινικά χαρακτηριστικά του FXS

Πρόκειται για μια φυλοσύνδετη γενετική διαταραχή, που επηρεάζει περίπου 1 στους 7.000 άνδρες και 1 στις 11.000 γυναίκες (Hunter et al., 2014), ένα γεγονός που οφείλεται στην τυχαία απενεργοποίηση του ενός από τα δύο χρωμοσώματα X στα θηλυκά άτομα (Hagerman et al., 2017). Το κυριότερο σύμπτωμα του συνδρόμου είναι η εμφάνιση ήπιας έως μετρίου βαθμού νοητικής υστέρησης (Dionne & Corbin, 2021). Η νοητική υστέρηση είναι ένας ευρύς και σύνθετος όρος που περιλαμβάνει πολλές λειτουργίες, εκ των οποίων το καθοριστικό χαρακτηριστικό είναι η σημαντική διαταραχή των νοητικών διεργασιών. Πρόκειται όμως για μια γενικευμένη διαταραχή, η οποία επηρεάζει περίπου το 1-3% του γενικού πληθυσμού, και εμφανίζεται ως κυρίαρχη ή δευτερεύουσα συμπτωματολογία πολλών διαφορετικών διαταραχών και συνδρόμων (Bagni & Zukin, 2019). Παράλληλα με τη γενικότερη νοητική υστέρηση έχουν παρατηρηθεί ανεπάρκειες ως προς την αντίληψη του χώρου και διαταραχές προσοχής αλλά και βραχυπρόθεσμης οπτικής και ακουστικής μνήμης, ενώ εντοπίζονται δυσκολίες και ως προς την επαρκή επεξεργασία διαδοχικών πληροφοριών (Schmitt et al., 2019).

Ο συμπεριφορικός φαινότυπος στα άτομα με FXS καλύπτει ένα ευρύ φάσμα, με κάποιες βασικές συμπεριφορές να θεωρούνται ως χαρακτηριστικά της διαταραχής. Αυτές οι συμπεριφορές εμπίπτουν στις κατηγορίες της προσοχής, της υπερδιέγερσης, του άγχους και της επιθετικότητας (Elhawary et al., 2023). Τα υψηλά επίπεδα κινητικής δραστηριότητας, οι στερεοτυπικές κινήσεις (π.χ. κινήσεις χεριών), η αποστροφή του βλέμματος και οι επίμονες/επαναλαμβανόμενες συμπεριφορές περιγράφονται συχνά ως αποτέλεσμα της υπερδιέγερσης (Hagerman et al., 2017; Protic et al., 2022). Επιπλέον, η συμπτωματολογία του συνδρόμου περιλαμβάνει ελλείμματα στην κοινωνική αλληλεπίδραση και επικοινωνία, μειωμένη οπτική επαφή και διαταραχές του λόγου (Elhawary et al., 2023; Hagerman et al., 2017). Αυτά τα ελλείμματα κοινωνικών δεξιοτήτων και επικοινωνίας είναι κεντρικά χαρακτηριστικά της διαταραχής και συμβάλλουν στην δυσκολία προσαρμογής των ατόμων με FXS στις καθημερινές κοινωνικές καταστάσεις.

Όσον αφορά στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου, γίνονται εμφανή κατά την παιδική και εφηβική ηλικία και περιλαμβάνουν αδρά χαρακτηριστικά προσώπου με μεγάλα και προεξέχοντα αυτιά και πηγούνι, υπερεκτασιμότητα των αρθρώσεων, πλατυποδία και αυξημένο μέγεθος των όρχεων που αναπτύσσεται κατά την εφηβεία, αποτελώντας κυρίαρχο χαρακτηριστικό στους άρρενες (Elhawary et al., 2023; Protic et al., 2022). Αυτά τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά είναι αναγνωρίσιμα σημεία του συνδρόμου και συχνά βοηθούν στη διάγνωση. Τα θηλυκά άτομα-φορείς εμφανίζουν επίσης πρόωρα

διαταραχές ως προς τη λειτουργία των ωοθηκών (Yang & Yang, 2023). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αλλαγές στα μορφολογικά χαρακτηριστικά δεν παρατηρούνται σε όλους τους ασθενείς, ιδίως δε στα θηλυκά άτομα εμφανίζεται πιο ήπια συμπτωματολογία, γεγονός που μπορεί να καθυστερήσει τη διάγνωση και την παρέμβαση.

Συνοψίζοντας, τα άτομα με σύνδρομο εύθραυστου X παρουσιάζουν ένα σύνθετο προφίλ συμπεριφορών και φυσικών χαρακτηριστικών που απαιτεί πολυεπίπεδη προσέγγιση για την κατανόηση και την υποστήριξή τους. Η έρευνα συνεχίζει να αποκαλύπτει τις λεπτομέρειες αυτών των συμπεριφορών και χαρακτηριστικών, προκειμένου να βελτιωθεί η διάγνωση και η θεραπευτική προσέγγιση του συνδρόμου (Dionne & Corbin, 2021; Elhawary et al., 2023; Protic et al., 2022).



*Εικόνα 1. Τέσσερα αδέρφια με τυπικά φυσικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου FXS. Όλα έχουν αδρά χαρακτηριστικά στο πρόσωπο και προεξέχοντα αυτιά (Protic et al.2022)*

### 1.3 Γονίδιο FMR1 και Πρωτεΐνη FMRP

Το γονίδιο **FMR1** εδράζεται στο χρωμόσωμα X, στη θέση q27.3. Το μέγεθος του γονιδίου είναι 40 Kb και περιλαμβάνει 17 εξώνια. Πρόκειται για ένα εξαιρετικά συντηρημένο γονίδιο, καθώς εμφανίζεται σε διάφορα είδη συμπεριλαμβανομένων των *Drosophila*, *Xenopus*, *aplysia*, σε μυς και επίμυες, και στον άνθρωπο (Protic et al., 2022). Το παραγόμενο mRNA έχει μέγεθος περίπου 3.9 kb, εντοπίζεται σε πολύ μεγάλες ποσότητες στον εγκέφαλο και τους όρχεις και υποβάλλεται σε εναλλακτικό μάτισμα δίνοντας ισόμορφες της πρωτεΐνης FMRP (Dionne & Corbin, 2021).

Χαρακτηριστικό του γονιδίου FMR1 είναι ότι μια αλληλουχία τριών νουκλεοτιδίων επαναλαμβάνεται πολλές φορές αυξάνοντας το μέγεθός του. Στο 5' άκρο του γονιδίου υπάρχει η νησίδα CpG και δεξιά βρίσκεται μια πολυμορφική, ως προς το μέγεθος, επαναλαμβανόμενη αλληλουχία CGG. Οι νησίδες CpG είναι περιοχές πλούσιες σε GC, βρίσκονται συνήθως στους υποκινητές και σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων και συμβάλλουν στην πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων. Όταν δεν μεθυλιώνονται επιτρέπουν τη δέσμευση των μεταγραφικών παραγόντων. Η μεθυλίωση τους σχετίζεται με τη σίγαση των γονιδίων, καθώς εμποδίζει τη δέσμευση των μεταγραφικών παραγόντων οδηγώντας σε μειωμένη γονιδιακή έκφραση. Το σημείο έναρξης της μετάφρασης εντοπίζεται μετά την αλληλουχία CGG υποδηλώνοντας ότι η αλληλουχία αυτή δεν μεταφράζεται στο πρωτεϊνικό παράγωγο του γονιδίου. Το σύνδρομο προκαλείται κυρίως από επανάληψη της τρινουκλεοτιδικής αλληλουχίας CGG στην 5' αμετάφραστη περιοχή ανοδικά από την κωδική περιοχή του γονιδίου. Η επέκταση της αλληλουχίας στην περιοχή του υποκινητή οδηγεί σε υπερμεθυλίωση της περιοχής κοντά στη νησίδα CpG οδηγώντας σε μεταγραφική σίγαση του γονιδίου με αποτέλεσμα την πλήρη απουσία της πρωτεΐνης FMRP και την εμφάνιση του συνδρόμου FXS (Bagni & Zukin, 2019; Dionne & Corbin, 2021; Hagerman et al., 2017).

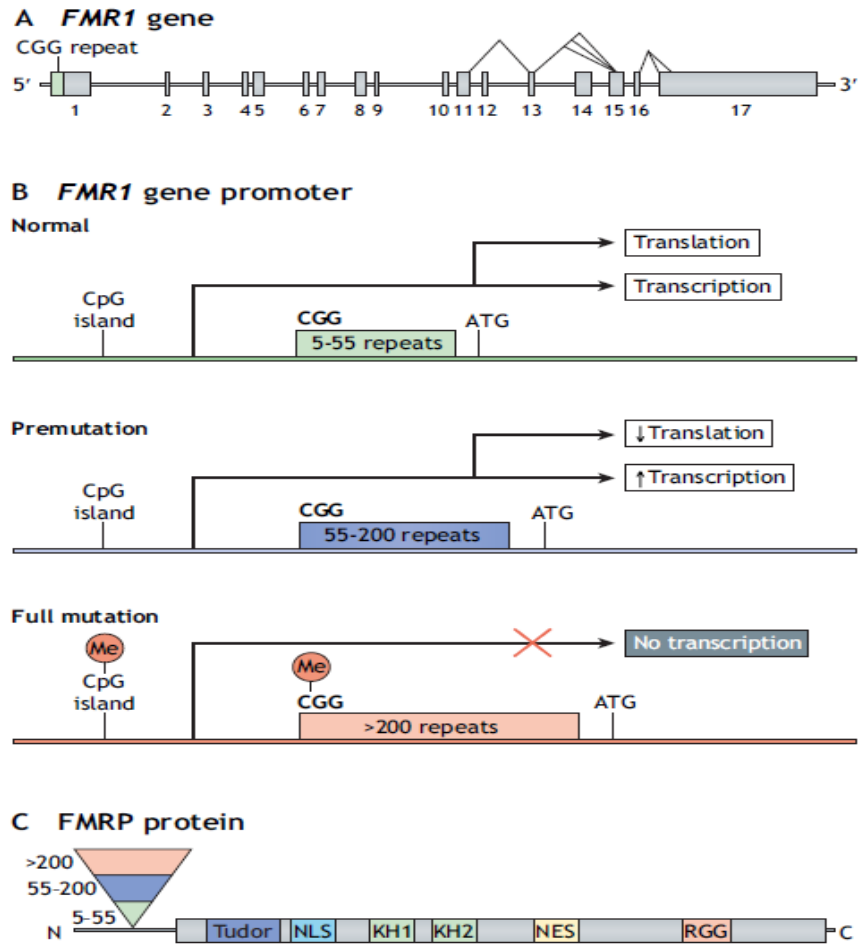
Η αλληλουχία CGG του FXS εμφανίζει μεγάλη πολυμορφία στον άνθρωπο και συναντάται στον γενικό πληθυσμό σε τρεις βασικές μορφές: τη φυσιολογική, την προ-μετάλλαξη και την πλήρη μετάλλαξη (Dionne & Corbin, 2021). Ο υψηλός αριθμός επαναλήψεων σχετίζεται ευθέως με την έκφραση του συνδρόμου ευθραύστου X. Η φυσιολογική μορφή περιέχει από 6 ως 53 επαναλήψεις της αλληλουχίας CGG, οι οποίες παρεμβάλλονται από τριπλέτες AGG, και τα συνηθέστερα αλληλόμορφα έχουν μέγεθος 29-30 επαναλήψεων. Μια αύξηση στον αριθμό των επαναλήψεων ή απώλεια μιας από τις παρεμβαλλόμενες επαναλήψεις AGG, είναι δυνατό να επηρεάσει τη σταθερότητα της περιοχής, ευνοώντας την επέκταση της. Αξίζει να σημειωθεί ότι όταν εμφανίζονται 45-54 επαναλήψεις της τριπλέτας, διαμορφώνεται μια κατηγορία χαρακτηριζόμενη ως «γκρίζα ζώνη αλληλομόρφων», όπου τα αλληλόμορφα είναι σχετικά σταθερά και μπορούν να μεταβιβαστούν στους απογόνους με την πιθανότητα όμως να μετατραπούν σε αλληλόμορφα της μορφής της προ-μετάλλαξης. Στην κατηγορία της προ-μετάλλαξης οι επαναλήψεις κυμαίνονται από 55 έως και 200, και το γονίδιο μπορεί ακόμη να μεταγραφεί (Dionne & Corbin, 2021). Η προ-μετάλλαξη μπορεί να οδηγήσει στην εκδήλωση άλλων διαταραχών, γνωστών ως πρωτοπαθής ωοθηκική ανεπάρκεια που σχετίζεται με το εύθραυστο X (Fragile X - Associated Primary Ovarian Insufficiency, FXPOI) (Allingham-Hawkins et al., 1999) ή το σύνδρομο τρόμου - αταξίας που σχετίζεται με το εύθραυστο X (Fragile X - Associated Tremor/Ataxia Syndrome, FXTAS)(Hagerman et al., 2001). Οι φορείς προμετάλλαξης μπορεί να μην εμφανίζουν κλινική συμπτωματολογία του συνδρόμου έχουν όμως αυξημένο κίνδυνο να αποκτήσουν απογόνους που θα νοσούν, καθώς σε αυτό το στάδιο οι επαναλήψεις τείνουν να αυξάνονται σε αριθμό σε κάθε

κυτταρική διαίρεση. Η πλήρης μετάλλαξη που χαρακτηρίζει τους πάσχοντες-FXS, ξεπερνά σε μέγεθος τις 200 επαναλήψεις (>230 επαναλήψεις) και συνήθως προκαλεί υπερμεθυλίωση τόσο της ίδιας της αλληλουχίας CGG όσο και της παρακείμενης νησίδας CpG. Η νησίδα αυτή όπως προαναφέρθηκε αποτελεί τμήμα του υποκινητή του γονιδίου και σε φυσιολογικά άτομα είναι αμεθυλιωτή στο ενεργό X των θηλέων και στο μοναδικό X χρωμόσωμα των αρρένων. Μεθυλίωση της νησίδας έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφική απενεργοποίηση του γονιδίου FMR1 και ως εκ τούτου τη μη παραγωγή της πρωτεΐνης FMRP (Dionne & Corbin, 2021; Pieretti et al., 1991). Οι άνδρες που φέρουν την πλήρη μετάλλαξη εκδηλώνουν πάντα το σύνδρομο του Εύθραυστου X, ενώ μόνο το 30% έως 50% των γυναικών που φέρουν την πλήρη μετάλλαξη επηρεάζονται λόγω της τυχαίας απενεργοποίησης του ενός από τα δύο χρωμοσώματα X που συμβαίνει στα θηλυκά άτομα. Επιπλέον, ο διαφορετικός βαθμός μεθυλίωσης στην περιοχή CpG, μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στη σοβαρότητα και το είδος των συμπτωμάτων που εκδηλώνουν οι ασθενείς με FXS. Όταν η μεθυλίωση δεν είναι πλήρης, και επιτρέπεται σε ένα βαθμό η έκφραση της πρωτεΐνης FMRP τα άτομα μπορεί να εμφανίζουν πιο ήπια συμπτωματολογία (Mila et al. 2018). Επίσης, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, παρόλο που η επέκταση των επαναλήψεων CGG είναι η συνηθέστερη αιτία πρόκλησης του συνδρόμου (περίπου 98% των περιπτώσεων), σημειακές μεταλλάξεις ή ελλείματα μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε απώλεια λειτουργίας του γονιδίου FMR1 (περίπου 1-2% των περιπτώσεων) (Myrick *et al.*, 2014).

Το φυσιολογικό αλληλόμορφο του γονιδίου FMR1 **κωδικοποιεί τη πρωτεΐνη FMRP**, η οποία ανήκει σε μια μικρή οικογένεια πρωτεϊνών που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες FXR1P και FXR2P, οι οποίες συνδέονται με το σύνδρομο εύθραυστου X. Η FMRP εμφανίζει περίπου 60% ομοιότητα στην αλληλουχία των αμινοξέων με τις πρωτεΐνες FXR1 και FXR2 (Chen & Joseph, 2015). Πρόκειται για μια υψηλά συντηρημένη πρωτεΐνη και οι ομόλογες μορφές της εμφανίζονται σε αρκετά είδη. Στα θηλαστικά, η πρωτεΐνη FMRP εκφράζεται κυρίως στους νευρώνες του ΚΝΣ και στους όρχεις (Hagerman et al., 2017). Στον εγκέφαλο, η έκφραση της πρωτεΐνης περιορίζεται στους νευρώνες και στα κύτταρα Purkinje ιδιαίτερα στον υπόκαμπο την παρεγκεφαλίδα και τους νευρώνες του φλοιού (Greco et al., 2011). Εντάσσεται στην οικογένεια των ετερογενών ριβονουκλεοπρωτεϊνών, οι οποίες ρυθμίζουν mRNAs. Ειδικότερα, η FMRP δεσμεύει πάνω από 1.000 mRNAs στον εγκέφαλο, τα οποία εμπλέκονται σε νευρωνικές διαδικασίες όπως η συναπτογένεση και η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, καθώς και σε ρυθμιστικές λειτουργίες του κυτταροσκελετού, των μικροσωληνίσκων και του μεταβολισμού (Dionne & Corbin, 2021; Richter & Zhao, 2021). Επιπλέον, η FMRP δεσμεύει mRNAs που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες και επιγενετικούς ρυθμιστές της χρωματίνης, ιδιαίτερα σε ανώριμα κύτταρα, όπως τα νευρικά βλαστοκύτταρα και οι ανώριμοι νευρώνες (Richter & Zhao, 2021).

Φυσιολογικά, η FMRP ρυθμίζει τη μετάφραση ενός αριθμού μετασυναπτικών πρωτεϊνών, οι περισσότερες από τις οποίες είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της συναπτικής ισχύος, η οποία αντιπροσωπεύει το επίπεδο της απόκρισης που προκαλείται από αυξήσεις ή μειώσεις της συναπτικής δραστηριότητας (Dionne & Corbin, 2021; Sidorov et al., 2013). Έχει εξέχοντα ρόλο στους μετασυναπτικούς νευρώνες καθώς αλληλοεπιδρά με πολυριβόσωματα στο ενδοπλασματικό δίκτυο αλλά και ελεύθερα ριβοσώματα στους δενδρίτες και τις δενδριτικές άκανθες, ρυθμίζοντας τοπικά την πρωτεϊνοσύνθεση. Η δράση της είναι κυρίως ανασταλτική όσον αφορά την πρωτεϊνοσύνθεση, παρεμποδίζοντας κυρίως είτε την έναρξη της μετάφρασης είτε το στάδιο της επιμήκυνσης (Richter & Zhao, 2021).

Η ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης στα νευρικά κύτταρα είναι σημαντική, όπως προαναφέρθηκε για την ανάπτυξη, διαμόρφωση των συνάψεων και τη νευρωνική πλαστικότητα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η FMRP διαδραματίζει έναν ευρύ και κρίσιμο ρόλο στη νευρωνική λειτουργία η απώλεια της μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτη συναπτική δραστηριότητα και διαταραχές στην πλαστικότητα, οδηγώντας έτσι στην εμφάνιση διαταραχών νοητικής ή αισθητηριακής αντίληψης. Συγκεκριμένα, απώλεια της πρωτεΐνης μπορεί να προκαλέσει ανεξέλεγκτη πρωτεϊνοσύνθεση, καθώς και αλλαγές στην απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, όπως το γλουταμικό οξύ και το γ-αμινοβουταρικό οξύ (GABA), επηρεάζοντας την ομαλή λειτουργία των συνάψεων και την ισορροπία των νευρωνικών κυκλωμάτων (Wang et al.2023).



Εικόνα 2. Δομή και Έκφραση του Γονιδίου FMR1 και της Πρωτεΐνης FMRP. (A) Σχηματική αναπαράσταση του FMR1, με τις πιθανές θέσεις εναλλακτικού ματίσματος στο γονίδιο. (B) Σχηματική απεικόνιση της μεταγραφής και της μετάφρασης του FMR1 γονιδίου. Φυσιολογικά, ο αριθμός των επαναλήψεων CGG κυμαίνεται μεταξύ 5-54, μεταξύ 55-200 εμφανίζεται η πρόμετάλλαξη, και σε πάνω από 200 επαναλήψεις εμφανίζεται η πλήρης μετάλλαξη. (C) Δομικές και λειτουργικές επικράτειες της FMRP περιλαμβάνοντας τις περιοχές KH1, KH2 και RGG για τη δέσμευση μορίων RNA καθώς και αλληλουχίες υπεύθυνες για την είσοδο και έξοδο της πρωτεΐνης από τον πυρήνα (Willemsen & Kooy, 2023).

## 1.5 Νευροβιολογικοί Μηχανισμοί

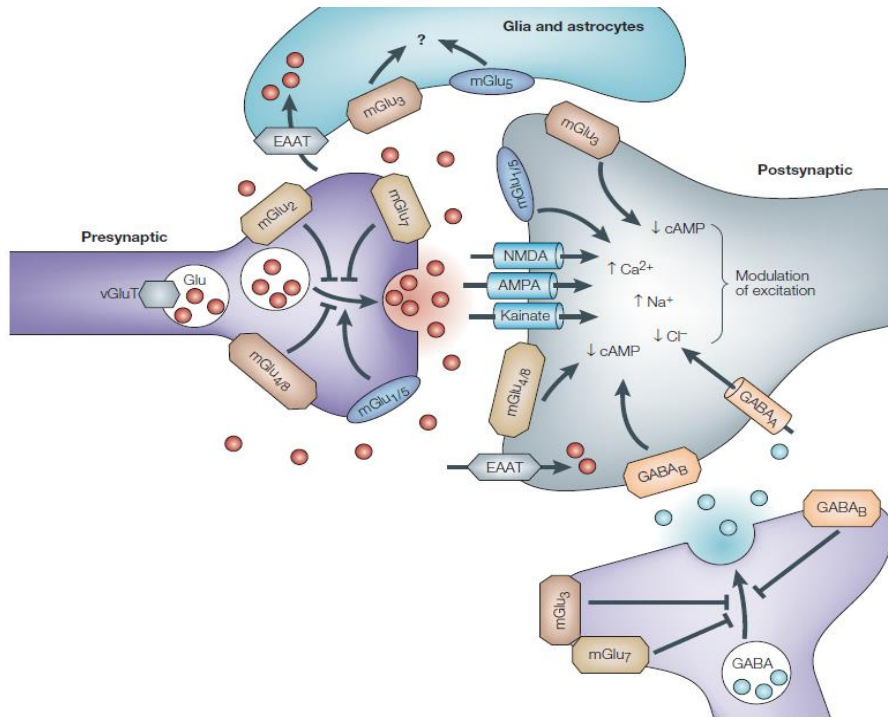
### 1.5.1 Γλυταματεργική Νευροδιαβίβαση

Η γλυταματεργική νευροδιαβίβαση παίζει σημαντικό ρόλο στις γνωστικές λειτουργίες που ελέγχονται από το φλοιό, τον ιππόκαμπο και άλλες περιοχές του ΚΝΣ, στην κινητική λειτουργία του πυραμιδικού και εξωπυραμιδικού συστήματος, στη λειτουργία της παρεγκεφαλίδας και στην αισθητηριακή λειτουργία (Greenamyre JT, 1994). Οι γλυταματεργικοί νευρώνες διανέμονται ευρέως στο ΚΝΣ, κυρίως στον πρόσθιο εγκέφαλο, και συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της κωδικοποίησης πληροφοριών, το σχηματισμό και την ανάκτηση μνημών, τη χωρική



αναγνώριση, τη διατήρηση της προσοχής και τη συναπτική πλαστικότητα (Mcentee & Crook, 1993).

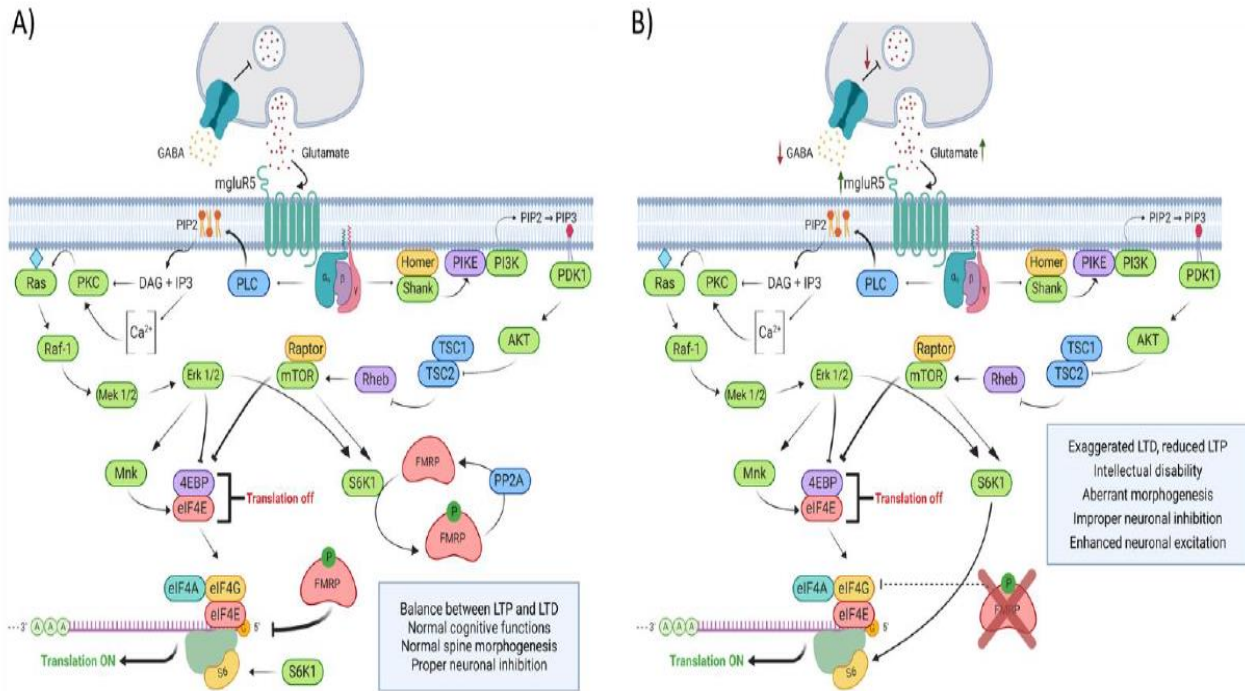
Το **γλουταμικό οξύ (Glu)** είναι ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) και προέρχεται μόνο από τοπική σύνθεση, εφόσον δεν μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Οι υποδοχείς του γλουταμικού ανήκουν σε δύο κατηγορίες τους **ιοντοτροπικούς** και τους **μεταβοτροπικούς**. Οι ιοντοτροπικοί υποδοχείς (iGluRs) είναι ιοντικοί διάλυτοι, που αποτελούνται από τέσσερις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες-υπομονάδες, που σχηματίζουν έναν κεντρικό πόρο διάλυτου ιόντων και διαχωρίζονται με βάση την εκλεκτική συγγένεια τους με συγκεκριμένους αγωνιστές, σε τρεις κατηγορίες: του Ν-μεθυλο-D-ασπαραγινικού οξέος (NMDA), του α-αμινο,3-υδροξυ,5-μεθυλ,4-ισοξαζολοπροπιονικού οξέος (AMPA), και αυτοί του καϊνικού οξέος. Οι υποδοχείς NMDA και AMPA διαδραματίζουν κύριο ρόλο στη συναπτική διαβίβαση και είναι κρίσιμης σημασίας για την ανάπτυξη του ΚΝΣ, τη λειτουργία της μάθησης και της μνήμης, καθώς και τη συναπτική πλαστικότητα. Οι μεταβοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμικού είναι υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες (GPCRs) και χωρίζονται σε τρεις ομάδες (Group I-III). Οι υποδοχείς της ομάδας I (mGluR1 και mGluR5) βρίσκονται κυρίως μετασυναπτικά και εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C, προκαλώντας απελευθέρωση ασβεστίου από ενδοκυτταρικές αποθήκες, γεγονός που επηρεάζει την συναπτική πλαστικότητα και τους μηχανισμούς μάθησης και μνήμης.



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση γλουταματεργικής σύναψης. Οι υποδοχείς NMDA, AMPA εντοπίζονται μετασυναπτικά και διαμεσολαβούν τη γρήγορη συναπτική μετάδοση. Οι μετατροπικοί υποδοχείς εντοπίζονται και προ- και μετασυναπτικά ρυθμίζοντας την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών (Swanson et al., 2005).

Μέχρι σήμερα, η προκλινική έρευνα έχει εστιάσει το ενδιαφέρον της στην διεγερτική γλουταματεργική νευροδιαβίβαση, ιδίως αυτή που διαμεσολαβείται μέσω των μετατροπικών υποδοχέων τύπου I του γλουταμικού (mGluR1, mGluR5) καθώς και την ανασταλτική διαβίβαση του GABA για να συσχετίσει την έλλειψη της πρωτεΐνης FMRP με τη βάση των νευροβιολογικών μηχανισμών που διέπουν το σύνδρομο FXS (Bear et al., 2004a; Braat & Kooy, 2015; Gross et al., 2012; Hagerman et al., 2017; Van der Aa & Kooy, 2020). Αξίζει να σημειωθεί ότι η διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ μακρόχρονης συναπτικής ενδυνάμωσης (Long Term Potentiation, LTP) και εξασθένησης (Long Term Depression, LTD) αποτελεί κρίσιμο πλαίσιο για τη φυσιολογική λειτουργία της συναπτικής διαμόρφωσης, νευρωνικής πλαστικότητας και κατ' επέκταση φυσιολογικών διαδικασιών μνήμης και μάθησης. Έχει προταθεί ότι ενεργοποιούνται προσυναπτικά οι υποδοχείς GABA, οι οποίοι μειώνουν την απελευθέρωση του γλουταμικού στη συναπτική σχισμή, ενώ μετασυναπτικά η FMRP δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της μετάφρασης πρωτεϊνών που ευνοούν το LTD (Dionne & Corbin, 2021). Ας προστεθεί ότι για την επαγωγή της μακροπρόθεσμης συναπτικής εξασθένησης (Long-term depression – LTD), σε φυσιολογικές συνθήκες, ύστερα από την απελευθέρωση του γλουταμικού στη συναπτική σχισμή ακολουθεί η ενεργοποίηση των mGluR5 υποδοχέων μετασυναπτικά καθώς και η επακόλουθη πυροδότηση καθοδικών μονοπατιών όπως το Ras/Raf/Mek/Erk

και το PI3K/AKT/mTOR. Τα καθοδικά αυτά μονοπάτια οδηγούν σε έκφραση πρωτεϊνών που θα προωθήσουν το LTD.



Εικόνα 4. Σχηματικό μοντέλο φυσιολογίας FXS, που προκύπτει λόγω ανισορροπίας μεταξύ διεγερτικής (γλουταματεργικής) και ανασταλτικής (GABA) νευροδιαβίβασης. (A) Ενεργοποίηση των υποδοχέων GABA προσυναπτικά αναστέλλει την απελευθέρωση Glu στη συναπτική σχισμή. Απελευθέρωση γλουταμικού και ενεργοποίηση των mGluR5 οδηγεί στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών για την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με το LTD. (B) Στην περίπτωση του συνδρόμου χάνεται ο ρυθμιστικός έλεγχος μέσω της FMRP και παράλληλα μειώνεται η προσυναπτική ρύθμιση με αποτέλεσμα ενισχυμένη γλουταματεργική σηματοδότηση μέσω mGluR5 και διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ LTP και LTD (Dionne & Corbin, 2021)

Λόγω όμως της έλλειψης της πρωτεΐνης FMRP, ο μετασυναπτικός ρυθμιστικός έλεγχος χάνεται και διαταράσσεται η συναπτική πλαστικότητα. Παράλληλα μειώνεται η προσυναπτική ρύθμιση, οδηγώντας σε ενισχυμένη γλουταματεργική σηματοδότηση μέσω mGluR5 και διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ LTP και LTD, όπως έχουν δείξει μελέτες με Fmr1 KO μύες που ανέφεραν αυξημένη σηματοδότηση μέσω mGluR τύπου I στον υπόκαμπο (Bear et al., 2004b; Huber et al., 2002; Osterweil et al., 2010) και στην παρεγκεφαλίδα (Koekkoek et al., 2005). Η αυξημένη σηματοδότηση από τον mGluR5 οδηγεί επίσης και στην υπερενεργοποίηση των κάτωθεν σηματοδοτικών μονοπατιών Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT/mTOR τόσο στον φλοιό, όσο και στον υπόκαμπο (Berkeley & Levey, 2003; Gallagher et al., 2004; Sharma et al., 2010) που προωθούν το LTD όπως προαναφέρθηκε. Ενισχύοντας τα προαναφερθέντα, μελέτες οι οποίες χρησιμοποιούν αρνητικούς αλλοστερικούς ρυθμιστές του mGluR5 (Michalou et al., 2012; Osterweil et al., 2010) ή μειώνουν την έκφραση του (Dölen et al., 2007) φαίνεται να διορθώνουν την αυξημένη πρωτεϊνοσύνθεση.

Αξίζει όμως να αναφερθεί ότι δεν υπάρχουν μελέτες που να εστιάζουν παράλληλα και στους ιοντικούς υποδοχείς του γλουταμικού οξέος οι οποίοι σχετίζονται άμεσα με τη συναπτική πλαστικότητα όπως προαναφέρθηκε, προκειμένου να αποτυπωθούν και άλλοι κρίσιμοι κόμβοι της παθοφυσιολογίας του FXS.

### 1.5.2 GABAεργικό σύστημα

Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής του ΚΝΣ. Συντίθεται στον εγκέφαλο από το γλουταμικό οξύ μέσω της δράσης του ενζύμου αποκαρβοξυλάση του γλουταμικού οξέος (GAD). Το GABA ενεργοποιεί ιονοτροπικούς υποδοχείς GABA<sub>A</sub> και τους μεταβοτροπικούς υποδοχείς GABA<sub>B</sub>. Η ισορροπία της GABAεργικής νευροδιαβίβασης συμβάλλει στην ορθή λειτουργία πολλών φυσιολογικών διεργασιών, όπως η ορμονική ρύθμιση, η μάθηση και η μνήμη, η ρύθμιση του πόνου και η διαχείριση του ύπνου. Οι διαταραχές στη GABA-εργική σηματοδότηση σχετίζονται με την εμφάνιση νευρολογικών και ψυχιατρικών διαταραχών, όπως άγχος, επιληψία, αϋπνία και κατάθλιψη, καθώς επηρεάζουν την αρμονική λειτουργία των νευρικών κυκλωμάτων (Jahangir et al., 2021; Shan et al., 2023).

Αρκετές μελέτες αναφέρουν τροποποιήσεις στην GABA-εργική σηματοδότηση στον εγκέφαλο Fmr1 KO μυών, όπως μείωση της έκφρασης των υπομονάδων των υποδοχέων GABA (Braat & Kooy, 2015; Curia et al., 2009; D'Hulst et al., 2006), τροποποιήσεις που οδηγούν σε μείωση της νευροδιαβίβασης μέσω GABA, αλλά και μείωση στην έκφραση ενζύμων του GABAεργικού συστήματος (D'Hulst et al., 2006; Olmos-Serrano et al., 2010). Ειδικότερα, έχουν εντοπιστεί μειωμένα επίπεδα μορίων mRNA των υπομονάδων του GABA-A στους φλοιό, ιππόκαμπο και παρεγκεφαλίδα των Fmr1 KO επίμυων, κάτι που υποδηλώνει ότι αυτά τα μόρια mRNA αποτελούν στόχους της FMRP (Curia et al., 2009; D'Hulst et al., 2009; Hong et al., 2012). Αναφορικά με τα επίπεδα του GABA, έχει βρεθεί ότι η διαθεσιμότητα του GABA στη συναπτική σχισμή της αμυγδαλής των Fmr1 KO μυών είναι μειωμένη (Olmos-Serrano et al., 2010), ενώ σε άλλη μελέτη διαπιστώθηκαν χαμηλότερα ενδοκυτταρικά επίπεδα GABA στην παρεγκεφαλίδα (Davidovic et al., 2011). Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί μείωση στην έκφραση των ενζύμων που σχετίζονται με τη σύνθεση, τον καταβολισμό και την επαναπρόσληψη του GABA στον φλοιό, την αμυγδαλή και την παρεγκεφαλίδα των Fmr1 KO μυών (D'Hulst et al., 2009; Olmos-Serrano et al., 2010). Αυτές οι αλλαγές, σε συνδυασμό με τις τροποποιήσεις στη γλουταματεργική διαβίβαση, προκαλούν μια ανισορροπία μεταξύ διεγερτικής και ανασταλτικής νευροδιαβίβασης, η οποία αποτελεί το κρίσιμο παθοφυσιολογικό υπόστρωμα για την εμφάνιση της συμπτωματολογίας που παρατηρείται στο FXS (Hagerman et al., 2017).

### 1.5.3 Ενδοκανναβινοειδές Σύστημα

Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα (ECS) αποτελεί ένα εκτεταμένο νευρορρυθμιστικό σύστημα, με κρίσιμο ρόλο στην νευρωνική ανάπτυξη και λειτουργία, καθώς συμβάλλει στη

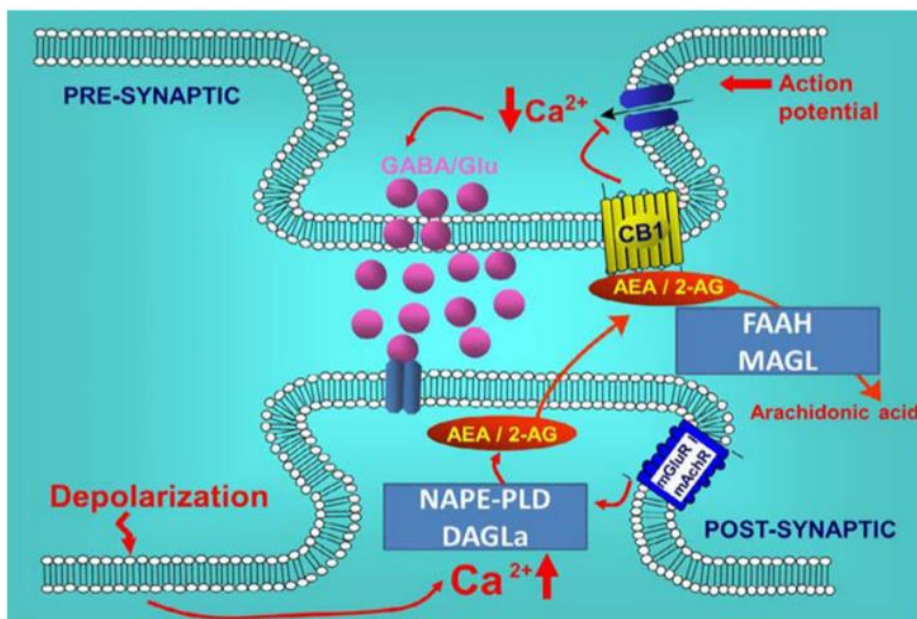
συναπτική ομοιοστάση και τη λειτουργία των νευρωνικών δικτύων. Πρόκειται για ένα ρυθμιστικό σύστημα λιπιδίων, το οποίο αποτελείται από α) τους υποδοχείς των κανναβινοειδών, β) τους ενδογενείς αγωνιστές αυτών, δηλαδή τα ενδογενή κανναβινοειδή και γ) τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή, μεταφορά και αποδόμηση των εν λόγω προσδεμάτων (Schoevers et al., 2020). Συμμετέχει σε πλήθος φυσιολογικών διεργασιών και λειτουργιών, όπως το κύκλωμα της ανταμοιβής και η ρύθμιση της κίνησης, αλλά και σε γνωστικές λειτουργίες, όπως η μνήμη και η μάθηση, καθώς και στην αντίληψη του πόνου, και την ανοχή στο στρες (Schoevers et al., 2020). Σημαντικός είναι ο ρόλος του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος στη ρύθμιση της ενεργειακής ισορροπίας, τον μεταβολισμό των λιπιδίων, την ομοιοστασία της γλυκόζης και τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού (Mechoulam & Parker, 2013). Αξίζει να σημειωθεί ότι η εκτεταμένη παρουσία του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος στο ΚΝΣ αλλά και στην περιφέρεια καταδεικνύει το σημαντικό ρόλο του στη ρύθμιση και ομοιοστασία διαφόρων φυσιολογικών λειτουργιών.

Δύο τύποι υποδοχέων είναι καλά χαρακτηρισμένοι, ο CB1 (Cannabinoid receptor 1) υποδοχέας, που βρίσκεται κυρίως στο ΚΝΣ αλλά και στους περιφερικούς ιστούς και ο CB2 (Cannabinoid receptor 2) υποδοχέας, που συναντάται κυρίως περιφερειακά και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, αλλά και στο ΚΝΣ. Οι υποδοχείς CB1 και CB2 των κανναβινοειδών ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών με επτά διαμεμβρανικές περιοχές, οι οποίες συζευγνύονται με πρωτεΐνες G (G-protein coupled receptors - GPCRS) τύπου Gi/o, συνεπώς η διέγερσή τους έχει ανασταλτικό αποτέλεσμα (Schoevers et al., 2020). Οι φυσικοί προσδέτες των κανναβινοειδικών υποδοχέων, δηλαδή τα ενδοκανναβινοειδή, σε αντίθεση με τους κλασσικούς νευροδιαβιβαστές συντίθεται και απελευθερώνονται μόνο όταν είναι αναγκαία, δηλαδή «κατά παραγγελία» (“**on demand**”). Η ανανδαμίδη ή N-αραχιδοנוύλαιθανολαμίνη (AEA) και η 2-αραχιδοנוλογλυκερόλη (2-AG) αποτελούν κύρια ενδοκανναβινοειδή (Schoevers et al., 2020). Στη σύνθεση της ανανδαμίδης συμμετέχει το ένζυμο N-acylphosphatidylethanolamine (NAPE)- specific phospholipase D-like hydrolase (NAPE – PLD), ενώ στον καταβολισμό της το ένζυμο υδρολάση του αμιδίου των λιπαρών οξέων (Fatty Acid Amide Hydrolase, FAAH). Τη σύνθεση της 2-AG καταλύει το ένζυμο διακυλογλυκεριδάση (Diacylglycerol lipase, DAGL) και την υδρόλυση της το ένζυμο λιπάση της μονοακυλογλυκερόλης (Monoacylglycerol Lipase, MAGL) (Loss et al., 2021).

Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος είναι ότι συμμετέχει στην ηλεκτροφυσιολογική διεργασία της **παλίνδρομης μετάδοσης σημάτων**, μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η αναστολή της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών από τις πρόσυναπτικές απολήξεις των νευρώνων. Το μοτίβο επικοινωνίας που πραγματοποιείται κυρίως μέσω των CB1 προσυναπτικών υποδοχέων, θέλει το σήμα να μεταφέρεται παλίνδρομα από το μετασυναπτικό προς το προσυναπτικό κύτταρο. Ειδικότερα, μετά από εκπόλωση και, σε συνδυασμό με τη διέγερση των μετασυναπτικών μεταβοτροπικών

υποδοχέων του γλουταμινικού οξέος (mGluRs), προκαλείται άνοιγμα των τασεοεξαρτώμενων διαύλων  $Ca^{2+}$  και ενεργοποιούνται ένζυμα που συνθέτουν τα ενδοκανναβινοειδή. Αμέσως μετά τη σύνθεσή τους, τα ενδογενή κανναβινοειδή απομακρύνονται από το μετασυναπτικό κύτταρο και απελευθερώνονται στη συναπτική σχισμή, όπου αλληλοεπιδρούν με τους CB υποδοχείς (Hillard & Jarrahian, 2003). Η ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών ως δευτέρων αγγελιοφόρων αναστέλλει την προσυναπτική εισροή  $Ca^{2+}$  και το τελικό αποτέλεσμα είναι η μείωση της απελευθέρωσης ανασταλτικών (GABA) ή διεγερτικών (γλουταμικό) νευροδιαβιβαστών από το προσυναπτικό κύτταρο στη συναπτική σχισμή. Ακολουθείται, όπως προαναφέρθηκε, μια διεργασία «παλίνδρομης μετάδοσης σημάτων» (Ohno-Shosaku et al., 2012). Έτσι, καθώς το ECS φαίνεται να ρυθμίζει την ανάπτυξη και τη λειτουργία των νευρώνων, ιδιαίτερα τη συναπτική ομοιόσταση και πλαστικότητα, η μη φυσιολογική του λειτουργία έχει συσχετισθεί με διαταραχές γνωστικών λειτουργιών και εμφάνιση συμπεριφορικών προβλημάτων και η φαρμακολογική παρέμβαση αυτής της οδού, όταν διαταράσσεται, θα μπορούσε να αποδειχθεί μια ευεργετική θεραπευτική προσέγγιση (Palumbo et al., 2023).

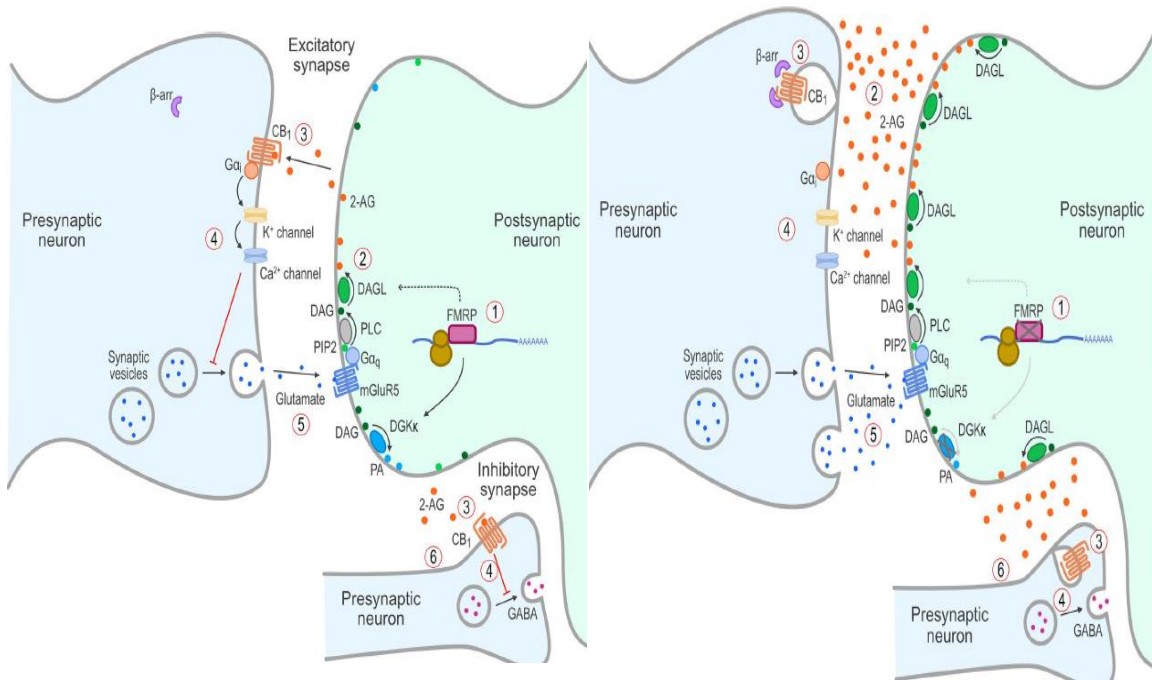
Το ECS μπορεί να επάγει μακροχρόνια συναπτική καταστολή (Long-term depression, LTD), μια κλασική μορφή αποδυνάμωσης της συναπτικής ισχύος, η οποία μπορεί να προκληθεί με διάφορους μηχανισμούς. Η καλύτερα μελετημένη μορφή LTD που διαμεσολαβείται από το ενδοκανναβινοειδές σύστημα είναι αυτή που προκαλείται ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των mGluR υποδοχέων. Για την μείωση της απελευθέρωσης του γλουταμικού από το προσυναπτικό κύτταρο, τα ενδοκανναβινοειδή μπορεί να μεσολαβήσουν ενεργοποιώντας τους προσυναπτικούς υποδοχείς CB1 είτε στην ίδια τη σύναψη που υφίσταται διέγερση (ομοσυναπτικό LTD) είτε σε γειτονική (ετεροσυναπτικό LTD).



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργικότητας του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος (Pietro Paolo et al. 2020)

Το Σύνδρομο του Ευθραύστου Χ, συγκεκριμένα, φαίνεται να συνδέεται με απορρύθμιση του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος στο ΚΝΣ, καταλήγοντας σε υπερδιέγερση και απευαισθητοποίηση των υποδοχέων CB1 των κανναβινοειδών (Palumbo et al., 2023). Η FMRP, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί ένα σημαντικό στοιχείο του μεταφραστικού ελέγχου, καθώς εμπλέκεται στην καταστολή της διακίνησης του mRNA σε δενδρίτες και συνάψεις. Συγκεκριμένα, συμβάλλει στην έκφραση του ενζύμου DGKκ και διαθέτει ένα μοτίβο αναγνώρισης για το mRNA της DAGL και φυσιολογικά, η FMRP προσδέεται στο mRNA της DAGL, στο οποίο δρα ως μεταφραστικός καταστολέας.

Απουσία όμως της FMRP, διαταράσσει την κανονική διακίνηση DAGL με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη παραγωγή της 2-AG, η οποία απελευθερώνεται εκτοπικά. Χάνεται, δηλαδή, η απελευθέρωση ενδοκανναβινοειδών κατ' απαίτηση και η ανάδρομη σηματοδότηση στο FXS. Η έκτοπη απελευθέρωση της 2-AG επιφέρει την υπερδιέγερση των πρόσυναπτικών CB1 υποδοχέων. Η προκύπτουσα υπερδιέγερση τους οδηγεί στη συνέχεια τη στρατολόγηση και φωσφορυλίωση της β-αρρεστίνης, η οποία προκαλεί εσωτερίκευση και απευαισθητοποίηση των υποδοχέων CB1 και απορρύθμιση της ανάδρομης σηματοδότησης ενδοκανναβινοειδών σε απόκριση στη νευρωνική δραστηριότητα. Επομένως, η απουσία FMRP απορυθμίζει την απελευθέρωση «κατ' απαίτηση» της 2-AG μέσω DAGL, διαταράσσοντας έτσι την κανονική λειτουργία ECS στην νευρωνική λειτουργία και τη συναπτική πλαστικότητα (Palumbo et al., 2023).



Εικόνα 6. Α) Σηματοδότηση μέσω ενδοκανναβινοειδών στο ΚΝΣ σε φυσιολογική κατάσταση. Σε μια φυσιολογική κατάσταση με παρουσία της πρωτεΐνης FMR1: Η FMRP υποστηρίζει την έκφραση της DGKk και μεταφέρει το mRNA της DAGL, οδηγώντας σε φυσιολογική παραγωγή του 2-AG και την απελευθέρωσή του στη συναπτική σχισμή, η οποία διεγείρει τους προσυναπτικούς υποδοχείς CB1, με αποτέλεσμα ανάδρομη ανασταλτική σηματοδότηση και βέλτιστη απελευθέρωση γλουταμικού και ενεργοποίηση των υποδοχέων mGluR5, ενώ ρυθμίζει τη λειτουργία των GABAεργικών συνάψεων. Β) Δυσλειτουργία του ECS στο FXS λόγω έλλειψης FMRP. Η έλλειψη FMRP στο FXS οδηγεί σε: μειωμένη έκφραση της DGKk και ανώμαλη μεταφορά του mRNA της DAGL, που έχει ως αποτέλεσμα την εκτοπική/ανώμαλη παραγωγή του 2-AG και την απελευθέρωσή του στη συναπτική σχισμή, γεγονός που προκαλεί πρόσληψη β-αρρεστίνης, εσωτερίκευση και απεναισιθητοποίηση των υποδοχέων CB1, οδηγώντας σε απώλεια της φυσιολογικής ανάδρομης ανασταλτικής σηματοδότησης και αυξημένη απελευθέρωση γλουταμικού και ενεργοποίηση των υποδοχέων mGluR5 και αλλαγή στην απελευθέρωση του GABA (Palumbo et al.2023)

Πειραματικές μελέτες που χρησιμοποιούν Fmr1 KO μύες και εστιάζουν στην μελέτη του ενδοκανναβινοειδούς, ανέφεραν απορυθμισμένη σηματοδότηση ως προς τον CB1 υποδοχέα (MacCarrone et al., 2010), ενώ άλλη πειραματική μελέτη δεν ανέφερε μεταβολές ως προς τα επίπεδα CB1 υποδοχέων, αν και παρατηρήθηκε αυξημένη κινητοποίηση ενδοκανναβινοειδών μέσω των υποδοχέων γλουταμικού οξέος (Zhang & Alger, 2010). Άλλες μελέτες αναφέρουν ότι η γενετική ή φαρμακολογική αναστολή των CB1 υποδοχέων σε FMR1 KO μύες προκαλεί βελτίωση στις γνωστικές διαταραχές (Busquets-Garcia et al., 2013; Zhang & Alger, 2010). Παράλληλα, η απουσία της FMRP έχει συσχετιστεί και με αλλαγές στις αποκρίσεις που προκαλούνται από το ενδοκανναβινοειδές σύστημα προς τις GABAεργικές συνάψεις, υποδεικνύοντας διακοπή της ανάδρομης σηματοδότησης από το ECS σε ανασταλτικές GABAεργικές συνάψεις (MacCarrone et al., 2010). Αυτή η επίδραση στην αρνητική ανάδραση της νευρωνικής σηματοδότησης με τη μεσολάβηση του ECS μπορεί να είναι ένας από τους κύριους φυσιολογικούς μηχανισμούς που οδηγούν



στην ανάπτυξη νευρωνικών δυσλειτουργιών στο σύνδρομο Εύθραυστου Χ και στην εκδήλωση συγκεκριμένης συμπτωματολογίας, όπως έντονο κοινωνικό άγχος, γνωστικές διαταραχές, διεγερσιμότητα και ευερεθιστότητα (Palumbo et al., 2023). Συγκεντρώνοντας τα προαναφερθέντα ευρήματα υποδεικνύεται ότι η δυσλειτουργική σηματοδότηση μέσω των CB1 υποδοχέων παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση γνωστικών και αναπτυξιακών δυσλειτουργιών που παρατηρούνται στο FXS, καθιστώντας το ενδοκανναβινοειδές σύστημα και τους CB1 υποδοχείς ως πιθανούς στόχους για νέες θεραπευτικές παρεμβάσεις.

## 1.6 Κανναβιδιόλη (CBD)

Η κανναβιδιόλη, CBD, είναι ένα από τα πολλά κανναβινοειδή που έχουν ταυτοποιηθεί στο φυτό της κάνναβης. Πρόκειται για ένα κύριο φυτοκανναβινοειδές που αντιπροσωπεύει μεγάλο ποσοστό του εκχυλίσματος του φυτού της κάνναβης. Είναι ένα φαινολικό τερπένιο, το οποίο είναι αδιάλυτο στο νερό αλλά διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες. Αξίζει να σημειωθεί ότι υπό όξινες συνθήκες μετατρέπεται σε THC. Συντίθεται φυσικά μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του πρόδρομου οξέος της του κανναβιδιολικού οξέος (CBDA), το οποίο είναι εκείνο που εντοπίζεται στο φυτό της κάνναβης. Η αποκαρβοξυλίωση του CBDA συμβαίνει μέσω της θέρμανσης, της έκθεσης στο φως ή της γήρανσης της κάνναβης. Η CBD παρουσιάζει ιδιότητες αναλγητικού, αντισπασμωδικού, μυοχαλαρωτικού, αγχολυτικού και πιθανώς αντιψυχωτικού φαρμάκου. Μεταξύ άλλων ιδιοτήτων που έχουν διερευνηθεί είναι η νευροπροστατευτική, αντιφλεγμονώδης και αντιοξειδωτική της δράση ενώ έχει εγκριθεί η κλινική της χρήση για την αντιμετώπιση της επιληψίας (εγκεκριμένο σκεύασμα: Epidyolex ©).

Η CBD ασκεί τις δράσεις της και στον αναπτυγμένο, αλλά και στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο μέσω διαφορετικών μηχανισμών (Manduca et al., 2024). Αλληλοεπιδρά με μια ποικιλία μοριακών στόχων, η πληθώρα αυτών των στόχων είναι ενζυματικοί, κυτταρικοί και μεμβρανικοί μεταφορείς και τέλος το μικρότερο ποσοστό αφορά υποδοχείς και ιοντικά κανάλια (Bih et al., 2015).

Αν και φυτοκανναβινοειδές η κανναβιδιόλη έχει ασθενή επίδραση στην ενεργοποίηση του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος μέσω υποδοχέων δεδομένου ότι η συγγένεια της για τους υποδοχείς των ενδοκανναβινοειδών CB1 και CB2 είναι χαμηλή (Pertwee, 2008). Έχει αναφερθεί ότι η φαρμακολογική δράση που ασκεί η κανναβιδιόλη στους CB1 υποδοχείς είναι αυτή του αρνητικού αλλοστερικού τροποποιητή (negative allosteric modulator, NAM) (Laprairie et al., 2015). Άλλη μελέτη, υποστηρίζει ότι η CBD αναστέλλει τη δράση του ενζύμου FAAH, εμποδίζοντας τον καταβολισμό της ανανδαμίδης. Παράλληλα εμποδίζει και την επαναπρόσληψη του ίδιου του

ενδοκανναβινοειδούς, έχοντας ως τελικό αποτέλεσμα την αύξηση του ενδοκανναβινοειδούς τόνου (De Petrocellis et al., 2004).

Η CBD επίσης προκαλεί την ενεργοποίηση και απευαισθητοποίηση των βανιλλοειδικών υποδοχέων (TRPV 1-2) (Bisogno et al., 2001) και με τον τρόπο αυτό πιθανώς να εμφανίζει αντιεπιληπτική, αγχολυτική και αντι-υπεραλγησιακή δράση (Elsaid et al., 2019). Πιο πρόσφατα, η προσοχή στράφηκε στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ CBD και των ορφανών υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνη G (GPCRS), καθώς φαίνεται πως δρα ως ανταγωνιστής των GPR55 (Sylantyeve et al., 2013). Ο υποδοχέας GPR55 συμμετέχει στην ρύθμιση της απελευθέρωσης  $Ca^{2+}$  από ενδοκυτταρικές αποθήκες, συνεπώς εμπλέκεται με τη περαιτέρω ρύθμιση της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών, όπως το γλουταμικό. Επιπλέον, έχει δειχθεί η δράση της κανναβιδιόλης ως θετικός αλλοστερικός τροποποιητής των υποδοχέων  $GABA_A$  (Bakas et al., 2017), ενισχύοντας έτσι την αποτελεσματικότητά τους. Ακόμη, ενεργεί ως αλλοστερικός τροποποιητής του υποδοχέα σεροτονίνης 5HT1A στα βασικά γάγγλια και στο μεταιχμιακό σύστημα (Russo et al., 2005). Ο υποδοχέας 5HT1A είναι συνδεδεμένος με την G πρωτεΐνη  $Gi/o$ , όπου φαίνεται να μεσολαβεί την ανασταλτική διαβίβαση. Η αλληλεπίδραση αυτή πιστεύεται ότι σχετίζεται με την αγχολυτική, αντιψυχωτική και αντικαταθληπτική δράση της CBD (Bih et al., 2015; Elsaid et al., 2019).

Η επαναπρόσληψη των νευροδιαβιβαστών είναι ζωτικής σημασίας για την ομοίωση της νευροχημικής δραστηριότητας και σημαντική οδός για την πρόσληψη νευροδιαβιβαστών είναι μέσω πρωτεϊνών μεταφοράς. Αξίζει να αναφερθεί ότι ένα μικρό ποσοστό των φαρμακολογικών στόχων της κανναβιδιόλης αποτελούν μόρια μεταφορείς. Πέρα του μεταφορέα επαναπρόσληψης της αναδαμίδης, που αναφέρθηκε πιο πάνω, έχει δειχθεί πειραματικά η δράση της CBD ως αναστολέας του μεταφορέα επαναπρόσληψης της νοραδρεναλίνης, της ντοπαμίνης, της σεροτονίνης και του GABA (Bih et al., 2015).

Η χρήση της κανναβιδιόλης στο FXS φαίνεται να έχει ελπιδοφόρα αποτελέσματα, όπως προκύπτει από κλινικά δεδομένα αλλά και τρέχουσες κλινικές δοκιμές (clinicaltrials.gov). Οι μελέτες αυτές αναφέρουν βελτίωση ως προς τα συμπτώματα του συνδρόμου τόσο σε συναισθηματικό όσο και σε συμπεριφορικό επίπεδο, όπως άγχος, κοινωνική αποφυγή και ευερεθιστότητα (Heussler et al., 2019). Συγκεκριμένα, στην κλινική δοκιμή CONNECT-FX, το διαδερμικό τζελ κανναβιδιόλης, ZYN002, συσχετίστηκε με βελτιώσεις στην κοινωνική συνδιαλλαγή και την ευερεθιστότητας, ιδιαίτερα σε ασθενείς με υψηλή μεθυλίωση του γονιδίου FMR1 (Heussler et al., 2019).

Αξίζει να αναφερθεί ότι υπάρχουν αρκετά δεδομένα από πολλές αναφορές αλλά και αποτελέσματα κλινικών ερευνών και δοκιμών τα οποία αναδεικνύουν την ευεργετική δράση της κανναβιδιόλης μετά από οξεία αλλά και χρόνια κυρίως χορήγηση. Ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ο νευροβιολογικός μηχανισμός με τον οποίο η κανναβιδιόλη ασκεί την ευεργετική της επίδραση. Ακολουθούν στο επόμενο κεφάλαιο αποτελέσματα

κυρίως από προκλινικές-πειραματικές μελέτες που συνεισφέρουν στη διερεύνηση της δράσης της κανναβιδιόλης στο FXS.

## 1.7 Μοντέλα μελέτης FXS και Κανναβιδιόλη

Για να μελετηθεί η αιτιοπαθολογία του συνδρόμου και η λειτουργία της πρωτεΐνης έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα μοντέλα, τόσο σε *in vitro*, όσο και σε *in vivo* συνθήκες. Τα μοντέλα αυτά χρησιμοποιούνται για την καλύτερη κατανόηση των νευρωνικών και μοριακών μηχανισμών που αποτελούν τη βάση του συνδρόμου. Το 2005 από τους Verlinsky και την ομάδα του, απομονώθηκε για πρώτη φορά η ανθρώπινη εμβρυϊκή σειρά βλαστοκυττάρων που φέρει την πλήρη μετάλλαξη για το FMR1 (Fragile X – human Embryonic Stem Cells, FX-hESC) (Verlinsky et al., 2005). Τα ανθρώπινα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (hPSCs) συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστούκτυττών (hESCs) και ιδιαίτερα επαγόμενα PSC (hiPSCs), προσφέρουν ένα μοντέλο μελέτης όπου μπορούν να διερευνηθούν τόσο κυτταρικά όσο και μοριακά γεγονότα που υποκρύπτουν την μη λειτουργική νευρωνική ανάπτυξη, και έχουν χρησιμοποιηθεί σε πλήθος μελετών (Mor-Shaked & Eiges, 2016; Verlinsky et al., 2005).

Το πρώτο ζωικό μοντέλο για το FXS, το οποίο χρησιμοποιείται έως και σήμερα, δημιουργήθηκε το 1994 και πρόκειται για ένα μοντέλο μύς *Fmr1* knockout (KO), στο οποίο έχει διαγραφεί το εξώνιο 5 του γονιδίου διακόπτοντας έτσι την κωδική αλληλουχία με αποτέλεσμα να μην παράγεται καθόλου mRNA και πρωτεΐνη και η κλινική τους εικόνα προσομοιάζει με αυτή των ασθενών με FXS που εμφανίζουν χαρακτηριστικά προβλήματα συμπεριφοράς και ανάπτυξης με εκπαιδευτικές δυσκολίες και υπερκινητικότητα (Baker et al 1994; Kazdoba et al., 2014; Kooy et al., 2017). Εκτός από το μοντέλο του μύς, έχουν δημιουργηθεί και άλλα ζωικά μοντέλα *Fmr1* KO, όπως το ψάρι ζέβρα (*Zebrafish*), η «φρουτόμυγα» (*Drosophila*), μύες (*Mus*) και επίμους (*Rattus*) (Protic et al., 2022). Τα μοντέλα αυτά έχουν συμβάλει στην κατανόηση μοριακών, κυτταρικών αλλά και συμπεριφορικών διαταραχών που σχετίζονται με το σύνδρομο, και ιδιαίτερα τα μοντέλα του μύς και του επίμου προσέθεσαν νέες γνώσεις στην κατανόηση μαθησιακών, κινητικών, γνωστικών και συμπεριφορικών διαταραχών που σχετίζονται με το FXS (Gross et al., 2012; Kazdoba et al., 2014).

Αξίζει να τονιστεί ότι το μοντέλο του επίμου προσφέρει πολλαπλά οφέλη στην έρευνα των νευροψυχιατρικών διαταραχών και ειδικότερα στο FXS παρέχει πρόσθετη εγκυρότητα σε σχέση με το μοντέλο του *Fmr1* KO μύς αλλά και των υπολοίπων οργανισμών, εφόσον διαθέτει πολλές ομοιότητες με τον άνθρωπο όσον αφορά την ανατομία, τη φυσιολογία και το γονότυπο, μιας και σχεδόν για κάθε ανθρώπινο γονίδιο βρίσκεται και ένα ομόλογο γονίδιο στον επίμου. Επιπλέον, τα μοντέλα των επιμύων διαθέτουν μεγαλύτερη μεταφραστική αξία συγκριτικά με τους μύς δεδομένου ότι, οι επίμους επιδεικνύουν

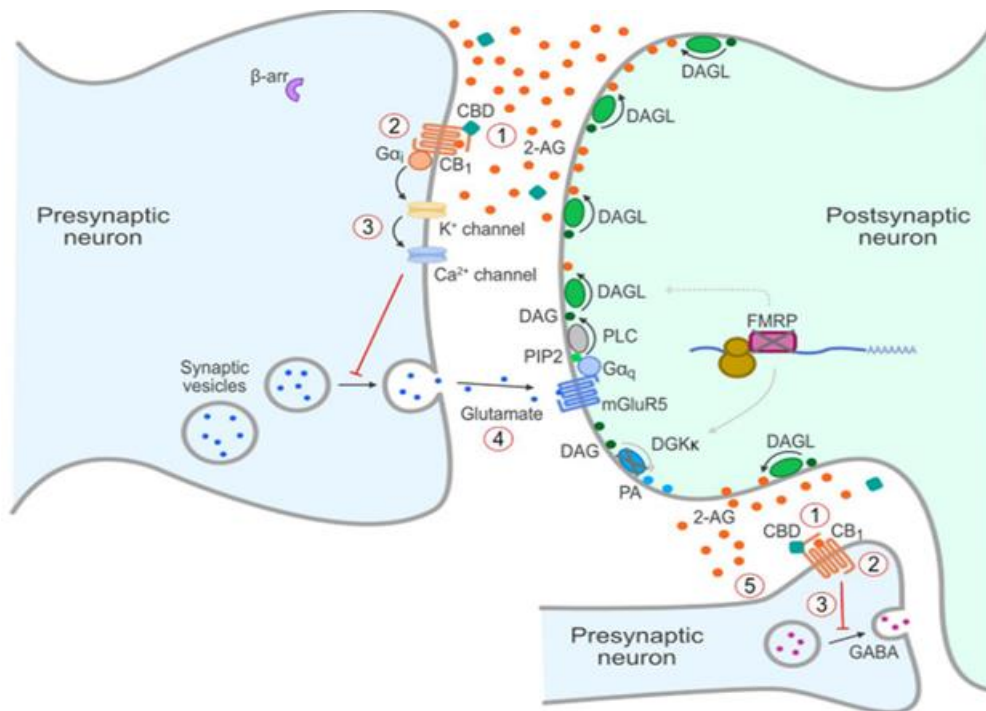
κοινωνική πολυπλοκότητα ως προς την συνδιαλλαγή και ποικιλία συμπεριφορών εστιασμένων ακόμη και σε ανώτερες γνωστικές λειτουργίες συγκριτικά με τους, επιτρέποντας έτσι την μελέτη ενός ευρέως φάσματος απλών και σύνθετων συμπεριφορικών αποκρίσεων που αντανακλούν τη συμπτωματολογία που έχει καταγραφεί για το σύνδρομο FXS (Belzung et al., 2005).

Οι προκλινικές έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι τώρα επικεντρώνονται στη σημασία της γλουταματεργικής και GABA-εργικής νευροδιαβίβασης, καθώς η ισορροπία μεταξύ αυτών των συστημάτων είναι απαραίτητη για την κανονική λειτουργία του εγκεφάλου. Διαταραχές σε αυτήν την ισορροπία, όπως ήδη προαναφέρθηκε, έχουν συσχετιστεί με διάφορες νευροψυχιατρικές παθήσεις, συμπεριλαμβανομένου και του συνδρόμου του εύθραυστου X. Ωστόσο, ελάχιστες μελέτες διερευνούν το ρόλο της κανναβιδιόλης στο πειραματικό πρότυπο Fmr1 KO. Συγκεκριμένα, σε μελέτη που χρησιμοποιεί Fmr1 KO μύες ως προκλινικό μοντέλο μελέτης του συνδρόμου, τα αποτελέσματα της οξείας χορήγησης CBD διερευνήθηκαν εφαρμόζοντας διάφορες συμπεριφορικές δοκιμασίες. Παρατηρήθηκε ότι η οξεία χορήγηση CBD οδήγησε σε μείωση δεικτών αγχώδους συμπεριφοράς τόσο στους KO μύες όσο και στην ομάδα ελέγχου, χωρίς να επηρεάζεται η κινητική δραστηριότητα, η κοινωνική αλληλεπίδραση ή η γνωστική απόδοση, υποδηλώνοντας έτσι την αγχολυτική επίδραση της κανναβιδιόλης (Zieba et al., 2019).

Οι Palumbo και η ερευνητική του ομάδα (Palumbo et al., 2023) έχουν παρουσιάσει μια σειρά από πιθανούς μηχανισμούς μέσω των οποίων μπορεί η CBD ενδέχεται να λειτουργεί ευεργετικά ως προς τα συμπτώματα του Συνδρόμου Ευθραύστου X. Συγκεκριμένα, υποστηρίζουν ότι η CBD ενεργώντας ως αρνητικός αλλοστερικός ρυθμιστής του CB1, έχει τη δυνατότητα να αποκαταστήσει τη συναπτική ομοιόσταση εξασθενώντας την υπερδιέγερση, την εσωτερίκευση και την απευαισθητοποίηση του υποδοχέα CB1 που προκαλείται από έκτοπη απελευθέρωση της 2-AG. Συνεπώς, θα αυξηθεί ο εντοπισμός λειτουργικών υποδοχέων CB1 προσυναπτικά, αποκαθιστώντας την φυσιολογική ανάδρομη ανασταλτική σηματοδότηση που μειώνει την απελευθέρωση του γλουταμικού, ενώ παράλληλα αποκαθιστά και τη λειτουργία των GABAεργικών συνάψεων (Palumbo et al., 2023). Επιπλέον, μελέτες που χρησιμοποιούν προκλινικά μοντέλα μελέτης του Συνδρόμου Ευθραύστου X, υπογραμμίζουν τη σημασία της ανανδαμίδης, καθώς έχουν δείξει ότι αυξημένα επίπεδα του ενδοκανναβινοειδούς σχετίζονται με βελτιωμένη κοινωνική αλληλεπίδραση καθώς και με βελτιωμένη γνωστική λειτουργία (Qin et al., 2005; Wei et al., 2016). Η CBD επιδρά επίσης στο ένζυμο FAAH, το οποίο είναι υπεύθυνο για την αποδόμηση της ανανδαμίδης, και όπως προαναφέρθηκε ενισχύει με αυτό τον τρόπο τον ενδοκανναβινοειδικό τόνο που ενδεχομένως σχετίζεται με την ύφεση των συμπτωμάτων. Τέλος, η δράση της κανναβιδιόλης ως θετικός αλλοστερικός ρυθμιστής των υποδοχέων GABA<sub>A</sub>, σε συνδυασμό με την ικανότητα της να ενισχύει τον ενδοκανναβινοειδές τόνο, θα μπορούσε να διευκολύνει την ισορροπία μεταξύ της

ανασταλτικής και διεγερτικής μετάδοσης και να συμβάλλει στην αποκατάσταση της νευρωνικής λειτουργίας και συναπτικής πλαστικότητας που φαίνονται πως επηρεάζονται στο σύνδρομο του ευθραύστου Χ. Επιπλέον, υπάρχει μελέτη που διερευνά το ρόλο της κανναβιδιόλης σε Fmr1 KO επίμυες τόσο σε συμπεριφορικό, όσο και σε νευροβιολογικό επίπεδο. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υποδεικνύουν ότι η CBD βελτιώνει τα γνωστικά ελλείματα που εμφανίζονται στο μοντέλο αυτό, και επιδρά στην έκφραση διαφόρων στοιχείων του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος στον ιππόκαμπο (Guillé, 2012).

Η κανναβιδιόλη δείχνει επομένως να είναι μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική επιλογή για το FXS, λειτουργώντας μέσω πολλαπλών μηχανισμών για την αποκατάσταση της ομοιόστασης και της πλαστικότητας του ECS, και επηρεάζει και άλλες σημαντικές μοριακές διαδικασίες που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του συνδρόμου.



Εικόνα 1. Προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσης της κανναβιδιόλης στο ECS στο FXS: Η κανναβιδιόλη δρα ως αρνητικός αλλοστερικός ρυθμιστής (NAM) στους υποδοχείς CB1, με αποτέλεσμα τη μείωση της πρόσληψης β-αρρεστίνης, καθώς και την πρόληψη της εσωτερίκευσης και απευαισθητοποίησης των υποδοχέων CB1 παρουσία έκτοπη/γιάνωμαλης 2-AG, γεγονός που οδηγεί σε αποκατάσταση της ανδρόμης ανασταλτικής σηματοδότησης και μείωση της απελευθέρωσης γλουταμικού και ενεργοποίηση των υποδοχέων mGluR5, ενώ αποκαθίσταται η λειτουργία των GABAεργικών συνάψεων (Palumbo et al. 2023)

## **ΣΚΟΠΟΣ**

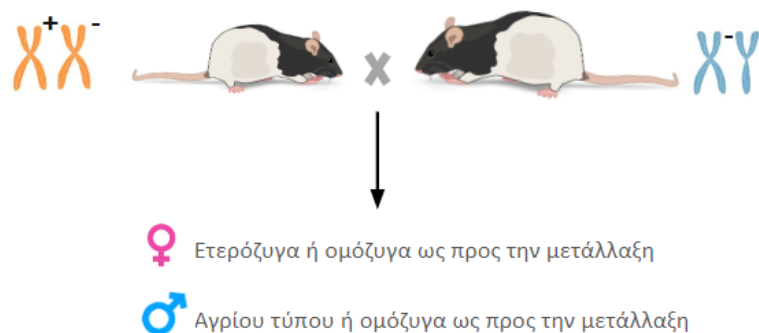
Λαμβάνοντας υπόψη όσα προαναφέρθηκαν στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο Fmr1 KO επίμυς, ως μοντέλο μελέτης του Συνδρόμου Ευθραύστου X (FXS). Οι στόχοι της μελέτης αφορούσαν στη διερεύνηση της επίδρασης της κανναβιδιόλης σε συμπεριφορικές και νευροβιολογικές παραμέτρους των επιμύων Fmr1 KO και αγρίου τύπου. Ειδικότερα πραγματοποιήθηκαν συμπεριφορικές δοκιμασίες με στόχο την καταγραφή παραμέτρων που σχετίζονται με την κινητική δραστηριότητα και συγκεκριμένες γνωστικές λειτουργίες, κατόπιν οξείας χορήγησης κανναβιδιόλης (CBD) και εκδόχου. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μελέτη της λειτουργίας του γλουταματεργικού συστήματος μέσω αξιολόγησης της πρωτεϊνικής έκφρασης των υπομονάδων των υποδοχέων NMDA, και μορίων του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος σε διαφορετικές εγκεφαλικές περιοχές, που σχετίζονται με την έκφραση γνωστικών λειτουργιών και τη νευροπλαστικότητα. Η χρήση της CBD κατόπιν οξείας χορήγησης εστιάστηκε σε συγκεκριμένες συμπεριφορικές και νευροβιολογικές παραμέτρους που σχετίζονται με τη παθοφυσιολογία και τη συμπτωματολογία του FXS, όπως προαναφέρθηκε και συμβάλλει με αυτό τον τρόπο στην αναγνώριση των πιθανών ευεργετικών δράσεων της κανναβιδιόλης και στην αποτύπωση στοιχείων του νευροβιολογικού της μηχανισμού.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2.1 Πειραματόζωα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο *Fmr1* KO επίμυς του στελέχους Long Evans (LE) *Fmr1*<sup>em2Mcwi</sup>, το οποίο δημιουργήθηκε από το Simons Foundation Autism Research Initiative (SFARI) σε συνεργασία με το MCW Gene Editing Rat Resource Center. Η μεταλλαγή που έχει υποστεί το γονίδιο *Fmr1* είναι η εισαγωγή 2 ζευγών βάσεων (Base pairs -Bp) στο εξόνιο 8, μέσω τεχνολογίας CRISPR/Cas9.

Για τους σκοπούς της συγκεκριμένης μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές κοορτές πειραματοζώων, οι οποίες αποτελούνταν από ενήλικες, περίπου 3 μηνών, αρσενικούς επίμυες αγρίου τύπου (Wild Type, WT) και *Fmr1* Knock Out (KO). Οι επίμυες αυτοί προέκυψαν από διασταυρώσεις που έγιναν μεταξύ ετεροζυγων θηλυκών επιμύων ως προς την μετάλλαξη ( $X^+X^-$ ) και KO αρσενικών ( $X^-Y$ ). Η αναπαραγωγή και διατήρηση των πειραματοζώων έγινε στο εκτροφείο πειραματοζώων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Μετά από τον απογαλακτισμό τους, την 21η ημέρα μετά την γέννηση, τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς κλωβούς διαστάσεων 42.5 x 26.6 x 15.5 cm, ανά δύο ή τρεις, με ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή, σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 21°C ±2°C και υγρασίας και με νυχθημερήσιο 12 ωρών (έναρξη της φωτεινής περιόδου στις 07.00 π.μ.). Όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα που αφορούσαν τον χειρισμό των ζώων πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις ευρωπαϊκές οδηγίες για τη φροντίδα και τη χρήση των πειραματοζώων (EEC Council 86/609; 27/01/1992, European Communities Council Directive 86/609/EEC) και οι πειραματικές διαδικασίες σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν η ταλαιπωρία και ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων πειραματοζώων βάσει των κατευθυντηρίων γραμμών της FELASA (Tzimas et al., 2021).



Εικόνα 7. Απεικόνιση διασταυρώσεων επιμύων. Διασταύρωση ετερόζυγων θηλυκών ως προς τη μετάλλαξη για το *Fmr1* με αρσενικά *Fmr1*KO.



## 2.2 Γονοτύπηση μέσω PCR

Η εξακρίβωση του γονότυπου των επίμυων πραγματοποιήθηκε με γονοτύπηση μέσω PCR. Συλλέχθηκαν δείγματα από το άκρο της ουράς των επίμυων για την απομόνωση γονιδιωματικού DNA, που έγινε χρησιμοποιώντας το Tissue DNA Kit (Omega Tek, D3396-02) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του PCR Kit (Kappa, KK1015) και του θερμικού κυκλοποιητή Peltier (Bio-Rad) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του γονότυπου ήταν οι εξής:

Εμπρόσθιος εκκινητής: GTTTATTTGCTTCTCTGAGGG

Αντίστροφος εκκινητής: ACCTTTTAAATGGCATAGACCT

Η αντίδραση PCR ρυθμίστηκε με το απομονωμένο γονιδιωματικό DNA ως πρότυπο και τα αναμενόμενα μεγέθη του προϊόντος ήταν 413 bp για τους WT επίμυς και 415 bp για τους Fmr1 KO. Τα προϊόντα PCR υποβλήθηκαν σε πέψη με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου RsaI (R0167L) της NEB στο αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα. Η πέψη πραγματοποιήθηκε για 3 ώρες στους 37°C και τα προϊόντα της PCR φορτώθηκαν στην γέλη για ηλεκτροφόρηση. Οι ζώνες DNA απεικονίστηκαν υπό υπεριώδες φως. Τα παρατηρούμενα μοτίβα ζωνών στο πήκτωμα συγκρίθηκαν με τα αναμενόμενα θραύσματα ζωνών για τον προσδιορισμό του γονότυπου των επιμύων. Η γονοτύπηση πραγματοποιήθηκε από τον Τομέα Βασικής Ερευνάς- ΕΥ: Πάνος Πολίτης, ΙΙΒΕΑΑ, Αθήνα.

## 2.3 Φάρμακα

Κανναβιδιόλη: Η CBD (>99%) απομονώθηκε από ταξιανθίες *Cannabis* από την ερευνητική ομάδα του κ. Λεάνδρου Σκαλτσούνη, Καθηγητή Φαρμακογνωσίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ (με μέθοδο που έχει ήδη περιγραφεί (Brakatselos et al., 2021; Tzimas et al., 2021) και το τελικό προϊόν διαλύθηκε σε διάλυμα εκδόχου (Vehicle, VEH) που περιείχε 5% διμεθυσουλφοξείδιο (DMSO, Sigma) 5% Cremophor EL (Sigma) και 90% φυσιολογικό ορό σε συγκέντρωση 10 mg/mL.

Πριν από την έναρξη των πειραμάτων, παρασκευάστηκαν αποθέματα των φαρμάκων, τα οποία διατηρήθηκαν στους -20°C. Τα τελικά διαλύματα προετοιμάστηκαν την ημέρα της χορήγησής τους. Όλες οι χορηγήσεις πραγματοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις (i.p.).

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας (Brakatselos et al.2021) έχουμε δει δόσοεξαρτώμενες μεταβολές ύστερα από οξεία χορήγηση της κανναβιδιόλης και ειδικότερα κατά τη Δοκιμασία Ανοιχτού Πεδίου. Συγκεκριμένα, στο FXS ξεκινήσαμε με τη δόση των 10mg/kg κάνοντας προκαταρκτικά πειράματα, και παρατηρήσαμε ότι δεν

υπήρχαν μεταβολές όσον αφορά την υπερκινητικότητα. Έτσι, προχωρήσαμε στη δόση των 30mg/kg η οποία χρησιμοποιήθηκε και στις ακόλουθες συμπεριφορικές δοκιμασίες.

## 2.4 Συμπεριφορικές δοκιμασίες

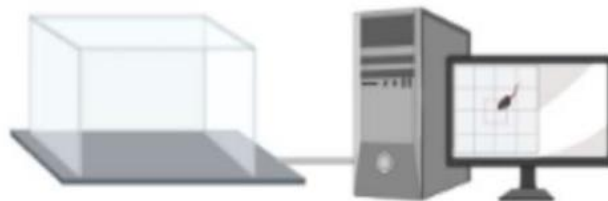
Η έναρξη των συμπεριφορικών πειραμάτων έγινε όταν οι επίμυες ήταν σε ηλικία 3 μηνών περίπου, αφού προηγήθηκε καθημερινή εξοικείωση με τον πειραματιστή για μια εβδομάδα. Επίσης, όλα τα πειραματόζωα εξοικειώνονταν στο δωμάτιο πειραματισμού για 60 λεπτά τουλάχιστον πριν τη διενέργεια του εκάστοτε πειράματος. Όλες οι δοκιμασίες διεξήχθησαν κατά τη φωτεινή περίοδο του ημερήσιου κύκλου και τερματίστηκαν τουλάχιστον 3 ώρες πριν την έναρξη της σκοτεινής περιόδου.

Σκοπός των συμπεριφορικών πειραμάτων ήταν να αξιολογηθεί η κινητική δραστηριότητα καθώς και η χωρική και η αναγνωριστική μνήμη των Fmr1 KO και WT αρσενικών επιμύων ύστερα από χορήγηση της κανναβιδιόλης (CBD). Πραγματοποιήθηκαν:

### 2.4.1 Δοκιμασία Ανοιχτού Πεδίου ( Open Field Test, OFT)

Για την διερεύνηση της επίδρασης του φαρμάκου (CBD) ή εκδόχου (vehicle) στην κινητικότητα χρησιμοποιήθηκε η Δοκιμασία Ανοιχτού Πεδίου. Χρησιμοποιήθηκαν επίμυες (n=30), οι οποίοι χωρίστηκαν σε τέσσερις πειραματικές ομάδες 6-8 επιμύων : WT/Vehicle, WT/CBD30, KO/Vehicle, KO/CBD30, λαμβάνοντας χορήγηση των Vehicle ή CBD σε δόση των 30mg/kg i.p. Τριάντα λεπτά πριν από την έναρξη της δοκιμασίας, κάθε επίμυς έλαβε την αντίστοιχη χορήγηση στον κλωβό διαβίωσης του. Κατά τη δοκιμασία αυτή ο επίμυς αφήνεται να εξερευνησει έναν καινούργιο χώρο για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Μέσω της Δοκιμασίας Ανοιχτού Πεδίου είναι δυνατόν να αντληθούν πληροφορίες για την κινητική δραστηριότητα, την διεγερσιμότητα, την εξερευνητικότητα, τις εκφάνσεις της γνωστικής του λειτουργίας και για την κατάσταση της «εσωτερικής διεγερσιμότητας» - κινητοποίησής του πειραματόζωου (Galanoopoulos et al., 2014; Pitsikas et al., 2008; Pitsikas & Markou, 2014).

Η πειραματική συσκευή ανοικτού πεδίου αποτελείται από έναν διαφανή κλωβό διαστάσεων 40 x 40 x 40 cm, ανοικτό στο επάνω μέρος και με μια ηλεκτρική μονάδα καταγραφής Αρχικά, ο επίμυς τοποθετείται στον κλωβό κινητικότητας, ο οποίος διαθέτει



Εικόνα 8. Διάταξη συσκευής ανοικτού πεδίου.

φωτοκύτταρα (ENV515, Activity Monitor, version 5, Med Associates). Οι επιφάνειες του κλωβού είναι εξοπλισμένες με οριζόντιες και κάθετες σειρές ανιχνευτών με αποτέλεσμα η κίνηση του πειραματοζώου να προκαλεί διακοπές στις δεσμίδες φωτός, οι οποίες καταγράφονται αυτόματα στο σύστημα και με αυτό τον τρόπο παρατηρείται η αυθόρμητη κινητικότητα του πειραματοζώου (Spontaneous Motor Activity).

Πριν την εισαγωγή κάθε επίμυ, το δάπεδο καθαρίζεται επιμελώς με νερό και διάλυμα αιθανόλης 70%, για την απάλειψη των οσμών από προηγούμενα πειραματοζώα. Στη συνέχεια, τοποθετούνται στον κλωβό, όπου καταγράφεται η κινητικότητά τους για μια ώρα. Συγκεκριμένα, γίνεται η αυτόματη καταγραφή μιας σειράς κινητικών παραμέτρων, όπως της οριζόντιας κινητικότητας - εκφρασμένη ως διανυθείσα απόσταση και ως συχνότητα οριζόντιας κινητικότητας (ambulatory distance και ambulatory counts, αντίστοιχα) - και της κάθετης κινητικότητας - εκφρασμένη ως συχνότητα κάθετης κινητικότητας (vertical counts)

#### 2.4.2 Δοκιμασία Αναγνώρισης Θέσης Αντικειμένου (Novel Object Location Task, NOLT)

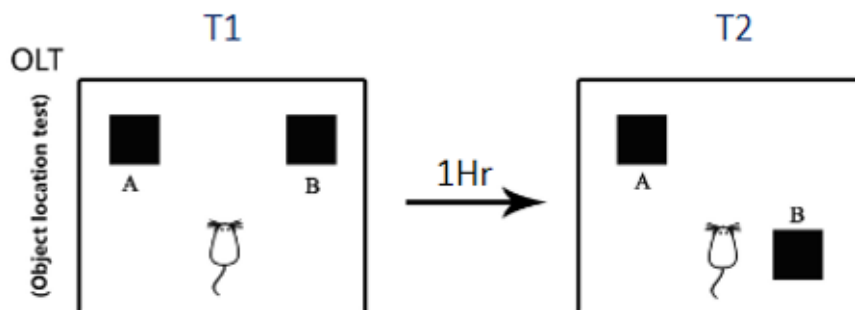
Για την εξέταση της επίδρασης του φαρμάκου (CBD) ή εκδόχου (vehicle-VEH) στην αναγνωριστική βραχυπρόθεσμη χωρική μνήμη των Fmr1 KO πειραματοζώων πραγματοποιήθηκε η Δοκιμασία Αναγνώρισης Θέσης Αντικειμένου. Μια δεύτερη κοορτή επίμυων (n=30) χρησιμοποιήθηκε, η οποία χωρίστηκε επίσης σε 4 ομάδες (WT/VEH, WT/CBD30, KO/VEH και KO/CBD30) λαμβάνοντας χορήγηση των VEH ή CBD σε δόση των 30mg/kg.

Η δοκιμασία αυτή περιλαμβάνει τρεις φάσεις (Galanopoulos et al., 2014; Pitsikas et al., 2008; Pitsikas & Markou, 2014) και πραγματοποιείται σε έναν αδιαφανή λευκό ξύλινο κλωβό διαστάσεων 50 x 50 x 50 cm και ανοικτό από πάνω. Πριν από την έναρξη της δοκιμασίας, οι επίμυες μεταφέρονται με τα κλουβιά τους στον πειραματικό χώρο όπου έχει ρυθμιστεί σταθερή θερμοκρασία. Η πρώτη φάση είναι αυτή της εξοικείωσης, κατά την οποία οι επίμυες τοποθετούνται ατομικά στον πειραματικό κλωβό ώστε να τον εξερευνήσουν για πέντε λεπτά (5 min) και στη συνέχεια επιστρέφουν στα κλουβιά διαβίωσής τους. Η διαδικασία εξοικείωσης επαναλαμβάνεται μετά από μία ώρα, καθώς και την επόμενη ημέρα. Οι δύο επόμενες φάσεις της δοκιμασίας πραγματοποιούνται την τρίτη ημέρα. Κατά την πρώτη φάση, τοποθετούνται στον κλωβό δύο πανομοιότυπα αντικείμενα (πλαστικά, μεταλλικά ή γυάλινα κυλινδρικού σχήματος και τυχαία καταναμημένα στα πειραματοζώα), έτσι ώστε να καλύπτουν τη μία πλευρά του κουτιού, σε απόσταση περίπου 10 cm από το τοίχωμα. Στη συνέχεια, κάθε επίμυς αφήνεται στο κέντρο του κλωβού ώστε να εξερευνήσει τα δύο αντικείμενα για 5 λεπτά (T1=5 min) κι ακολούθως επιστρέφει στο κλουβί του. Ο χρόνος που δαπανάται στο κάθε αντικείμενο από το πειραματοζώο καταγράφεται από τον ερευνητή με τη χρήση ηλεκτρονικού προγράμματος. Ως χρόνος εξερεύνησης ενός αντικειμένου ορίζεται η χρονική διάρκεια

κατά την οποία ο επίμυς ακουμπάει το αντικείμενο ή η μύτη του απέχει λιγότερο από 2 cm από αυτό και με κατεύθυνση προς αυτό, ενώ αν κάθεται στάσιμο δε θεωρείται ότι εκδηλώνει εξερευνητική συμπεριφορά. Μετά από μία ώρα οι επίμυες επανατοποθετούνται στο κέντρο του κλωβού με διαφορετική όμως πειραματική διάταξη για 3 λεπτά (T2=3 min). Στη φάση αυτή, το ένα από τα δύο πανομοιότυπα αντικείμενα παραμένει στην ίδια θέση με αυτήν της προηγούμενης φάσης, η οποία είναι ήδη γνωστή για τους επίμυες, και χαρακτηρίζεται ως οικεία (Familiar, F), ενώ το άλλο αντικείμενο τοποθετείται σε διαφορετική θέση, διαγώνια από την αρχική, η οποία χαρακτηρίζεται ως νέα (Novel, N). Ο χρόνος παραμονής στο κάθε αντικείμενο της φάσης T2 σημειώνεται ξανά από τον παρατηρητή. Για την αποφυγή προτίμησης των επιμύων στη θέση ή το υλικό κάποιου αντικειμένου χρησιμοποιείται εναλλάξ διαφορετικό ζεύγος αντικειμένων και γίνεται τοποθέτησή τους σε διαφορετικό σημείο του κλωβού (δεξιά - αριστερά στις γωνίες). Επίσης, γίνεται καλός καθαρισμός τόσο των αντικειμένων όσο και του δαπέδου του κλωβού με διάλυμα 70% αιθανόλης, πριν την εισαγωγή του κάθε πειραματόζωου στον πειραματικό χώρο για την απόλυση πιθανών οσμών. **Στην παρούσα μελέτη, οι επίμυες αφού ολοκλήρωσαν την T1 φάση του πειράματος, έλαβαν τις ανάλογες χορηγήσεις 30' πριν την έναρξη της T2 φάσης.**

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται με τη χρήση ενός Δείκτη Ικανότητας Διάκρισης (Discrimination Index), χαρακτηριστικού για το κάθε πειραματόζωο, που ορίζεται ως το πηλίκο της διαφοράς του χρόνου εξερεύνησης του αντικειμένου στην καινούργια θέση μείον τον χρόνο εξερεύνησης του αντικειμένου στην οικεία θέση προς το άθροισμα των δύο αυτών χρόνων, δηλαδή προς τον συνολικό χρόνο εξερεύνησης των δύο αντικειμένων (Cavoy & Delacour, 1993). Αυξημένος χρόνος για το αντικείμενο στη νέα θέση και συνεπώς μεγαλύτερος δείκτης διάκρισης, υποδηλώνει την ύπαρξη μνήμης σχετικά με τη θέση του μη μετατοπισμένου αντικειμένου.

$$DI = (N - F) / (N + F)$$



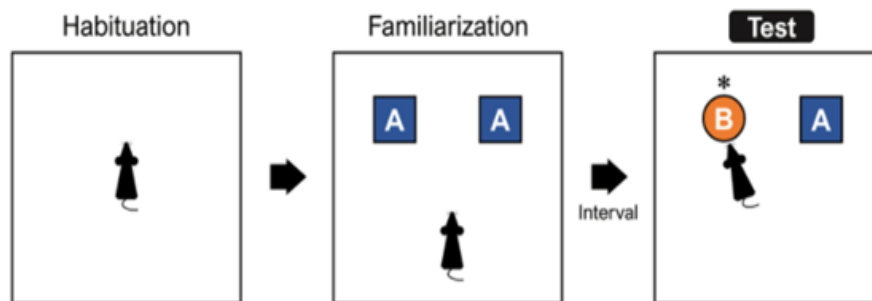
Εικόνα 9. . Η πειραματική διάταξη της δοκιμασίας Αναγνώρισης Θέσης Αντικειμένου. (Familiar (F): οικεία θέση, Novel (N): νέα θέση)

#### 2.4.3 Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου (Novel Object Recognition Task, NORT)

Η διερεύνηση της επίδρασης της CBD στην αναγνωριστική μη-χωρική μνήμη πραγματοποιήθηκε μέσω της Δοκιμασίας Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου, πρωτόκολλο που αρχικά περιγράφηκε από τους Ennaceur και Delacour (1998) με ελάχιστες τροποποιήσεις το οποίο έκτοτε έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως ένα μοντέλο αξιολόγησης της αναγνωριστικής (μη-χωρικής) μνήμης μέσω της αυθόρμητης εξερευνητικής δραστηριότητας. Χρησιμοποιήθηκε μια τρίτη κοορτή επίμυων ( $n=30$ ), η οποία χωρίστηκε επίσης σε 4 ομάδες ((WT/VEH, WT/CBD30, KO/VEH και KO/CBD30) λαμβάνοντας χορήγηση των VEH ή CBD σε δόση των 30mg/kg.

Το πειραματικό πρωτόκολλο ακολουθεί παρόμοια μεθοδολογία με το NOLT (Δοκιμασία Αναγνώρισης Θέσης), με εξαίρεση την τρίτη φάση. Ενώ και στις δύο μεθόδους τα πειραματόζωα εξοικειώνονται με τον χώρο και στη συνέχεια εξερευνούν αντικείμενα, εδώ στην T2 φάση η αλλαγή έγκειται στην αντικατάσταση ενός οικείου αντικειμένου με ένα νέο, διατηρώντας όμως την ίδια χωρική διάταξη. Συγκεκριμένα, κατά την φάση T1 τοποθετούνται στον πειραματικό κλωβό δύο πανομοιότυπα αντικείμενα και αφήνεται ο επίμυς να τα εξερευνήσει για 5 λεπτά. Ο χρόνος που περνά το πειραματόζωο σε κάθε αντικείμενο καταγράφεται από τον ερευνητή. Μετά από μία ώρα ξεκινάει η T2 φάση, διάρκειας 3 λεπτών, όπου κάθε επίμυς επανατοποθετείται στο κέντρο του κλωβού και αφήνεται να εξερευνήσει τα αντικείμενα που έχουν τοποθετηθεί στις ίδιες θέσεις με την προηγούμενη φάση αλλά δεν είναι πανομοιότυπα. Συγκεκριμένα, ένα από τα 2 οικεία αντικείμενα παραμένει στη θέση του (F), ενώ ένα νέο αντικείμενο (N) τοποθετείται στην άλλη θέση.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται με τη χρήση ενός Δείκτη Ικανότητας Διάκρισης (Discrimination Index)  $DI=(N-F)/(N+F)$ , χαρακτηριστικού για το κάθε πειραματόζωο, που ορίζεται ως το πηλίκο της διαφοράς του χρόνου εξερεύνησης του νέου αντικειμένου μείον τον χρόνο εξερεύνησης του οικείου αντικειμένου προς το άθροισμα των δύο αυτών χρόνων, δηλαδή προς τον συνολικό χρόνο εξερεύνησης των δύο αντικειμένων. Αυξημένος χρόνος εξερεύνησης για το νέο αντικείμενο και συνεπώς μεγαλύτερος δείκτης διάκρισης, υποδηλώνει την ύπαρξη αναγνωριστικής μνήμης σχετικά με το οικείο αντικείμενο.



Εικόνα 10. Η πειραματική διάταξη της δοκιμασίας Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου. (Familiar (F): οικεία θέση, Novel (N): νέα θέση)

## 2.5 Προσδιορισμός νευροβιολογικών παραμέτρων μέσω Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blotting)

Η τεχνική του Western Blot, είναι μια ημιποσοτική τεχνική ανάλυσης, που επιτρέπει την ανίχνευση, ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση μιας πρωτεΐνης ενδιαφέροντος σ' ένα κυτταρικό εκχύλισμα. Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων των υποδοχέων NMDA (**GluN2A**, **GluN2B**), καθώς και τα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου **FAAH** σε συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τις περιοχές του προμετωπιαίου φλοιού (PFC), του ραχιαίου ιππόκαμπου (D.Hipp) και του κοιλιακού ιππόκαμπου (V.Hipp).

Για την εκτίμηση των επιπέδων της πρωτεϊνικής έκφρασης των υπομονάδων των υποδοχέων του γλουταμικού μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, χρησιμοποιήθηκε μια τέταρτη κοορτή αποτελούμενη από 30 επίμνες. Οι επίμνες δέχθηκαν τη χορήγηση VEH ή CBD στην δόση των 30 mg/kg, 30 λεπτά πριν την αναισθητοποίηση με ισοφλουράνιο και τον αποκεφαλισμό με την χρήση λαιμητόμου προς απομόνωση των εγκεφαλικών δομών ενδιαφέροντος.

### 2.5.1 Θυσία πειραματοζώων και απομόνωση εγκεφαλικών περιοχών

Τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν με αποκεφαλισμό, με τη βοήθεια λαιμητόμου, αφού πρώτα είχαν αναισθητοποιηθεί με ισοφλουράνιο και είχε διαπιστωθεί η απουσία αντανακλαστικού σε μηχανικό ερέθισμα. Οι εγκεφαλοί απομακρύνθηκαν ταχύτατα και μεταφέρθηκαν σε πάγο προκειμένου να απομονωθούν οι περιοχές ενδιαφέροντος μέσω ψυχόμενης μικροτόμου. Οι εγκεφαλικές δομές προς ανάλυση επιλέχθηκαν βάσει της εμπλοκής τους στο βιολογικό υπόστρωμα του συνδρόμου. Συγκεκριμένα απομονώθηκαν ο ραχιαίος (Dorsal hippocampus, DH) και κοιλιακός (Ventral hippocampus, VH) ιππόκαμπος (hippocampus, HIP) και ο προμετωπιαίου φλοιός (prefrontal cortex, PFC). Ακολούθως, εναποτέθηκαν σε προζυγισμένα και προσημειωμένα με τον αριθμό του πειραματόζωου σωληνάρια erpendorf που ήταν εμβαπτισμένα σε πάγο. Ακολούθησε

ζύγιση των eppendorf και καταγραφή, ώστε αφαιρώντας την τιμή του προζυγισμένου σωληναρίου να υπολογιστεί το καθαρός βάρος του εγκεφαλικού ιστού σύμφωνα με την απλή σχέση:

$$\text{Βάρος ιστού (mg)} = \text{Βάρος (eppendorf + ιστού) (mg)} - \text{Βάρος eppendorf (mg)},$$

### 2.5.2 Ομογενοποίηση Εγκεφαλικών Περιοχών

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση του συστήματος υπερήχων (Virsonic). Η ομογενοποίηση έγινε σε sonicator με τη βοήθεια του διαλύματος λύσης RIPA (Tris; NaCl; EDTA; SDS; NaDOC; Triton; Glycerol) (Πίνακας 1), το οποίο εμπλουτίστηκε με αναστολείς φωσφατασών και πρωτεασών (RIPA+) (Πίνακας 2), προστέθηκαν 200  $\mu\text{L}$  RIPA+ σε κάθε δείγμα και καθόλη τη διάρκεια της διαδικασίας να κρατήθηκαν στον πάγο. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε rocking στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα και έπειτα, φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (Eppendorf  $\text{\textcircled{R}}$  5415C) στις 14000 στροφές (rpm) σε θερμοκρασία  $4^{\circ}\text{C}$ . Τα ληφθέντα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν σε νέα σωληνάρια eppendorf και αποθηκεύθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , έως ότου έγινε η ανάλυσή τους με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western

| Compound                | Stock concentration | Concentration RIPA | Vtotal for 50mL RIPA |
|-------------------------|---------------------|--------------------|----------------------|
| <i>Tris-HCL pH= 7,5</i> | 1 M                 | 50 mM              | 2,5 mL               |
| <i>NaCl</i>             | 5M                  | 150 mM             | 1,5 mL               |
| <i>EDTA (pH=8)</i>      | 0,5 M               | 2 mM               | 200 $\mu\text{L}$    |
| <i>SDS</i>              | 10%                 | 0.1 %              | 500 $\mu\text{L}$    |
| <i>NaDOC</i>            | 10%                 | 1%                 | 5 mL                 |
| <i>Triton</i>           | 10%                 | 1%                 | 5 mL                 |
| <i>Glycerol</i>         | 100%                | 10%                | 5 mL                 |

Πίνακας 1. Τα συστατικά και οι ποσότητες για την παρασκευή του διαλύματος RIPA. Ο τελικός όγκος (50mL) συμπληρώνεται με ddH<sub>2</sub>O.

|                                    |                                      |        |                      |
|------------------------------------|--------------------------------------|--------|----------------------|
| <i>BGP</i>                         | 500 mM                               | 2 mM   | 16 $\mu\text{L}$     |
| <i>NaF</i>                         | 500 mM                               | 2 mM   | 16 $\mu\text{L}$     |
| <i>PMSF</i>                        | 100 mM                               | 0.2 mM | 80 $\mu\text{L}$     |
| <i>Inhibitor cocktail (tablet)</i> | 7x(tablet in 150 $\mu\text{L}$ RIPA) | 1x     | 4x 150 $\mu\text{L}$ |

Πίνακας 2. Τα συστατικά και οι ποσότητες τους για την παρασκευή του διαλύματος λύσης RIPA+. Σημειώνεται ότι ο τελικός όγκος (50mL) συμπληρώνεται με διάλυμα RIPA. NaF: Αναστολέας φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης, NaVO<sub>3</sub>: Αναστολέας τυροσινικής φωσφατάσης, PMSF: Αναστολέας πρωτεασών σερίνης, BGP: αναστολέας φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης, Na<sub>3</sub>MoO<sub>4</sub>: Σταθεροποιεί τους υποδοχείς και λειτουργεί ως αναστολέας φωσφατασών.

### 2.5.3 Ανοσοαποτύπωση (Immunoblotting)

Η μέτρηση της ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των ομογενοποιημένων δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο BCA (Bicinchoninic Acid) χρησιμοποιώντας το πακέτο BCA Protein Assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit), με τη χρήση φασματοφωτόμετρου Nanodrop. Πριν τη διαδικασία ηλεκτροφόρησης είναι απαραίτητη η προετοιμασία των δειγμάτων έτσι ώστε να περιέχουν την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης. Τα δείγματα αραιώνονται με ρυθμιστικό διάλυμα ισοφόρτωσης πρωτεϊνών (Laemmli loading Buffer, LB) και στη συνέχεια υφίστανται θερμική αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια φορτώθηκαν σε ηλεκτροφόρηση τύπου SDS-PAGE. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου είναι μια αναλυτική μέθοδος, η οποία επιτρέπει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Η πυκνότητα των πηκτών διαφέρει ανάλογα με το μέγεθος των πρωτεϊνών που θέλουμε για διαχωρίσουμε. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πηκτές διαχωρισμού 10%-12% ενώ η πηκτή επιστοιβαξης είναι πάντοτε 5%. Η πηκτή διαχωρισμού παρασκευάζεται πρώτη και όταν πήξει παρασκευάζεται η πηκτή επιστοιβαξης (Πίνακας 3).

Παρακάτω παρουσιάζονται τα συστατικά για την παρασκευή των πηκτωμάτων:

| Διάλυμα                             | Separating gel<br>10% | Separating gel<br>12% | Stacking gel 5%         |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
| <i>ddH<sub>2</sub>O</i>             | 5,9 mL                | 4,9 mL                | 3,4 mL                  |
| <i>30% Acrylamide mix</i>           | 5,0 mL                | 6,0 mL                | 830 μL                  |
| <i>Tris 1,5M, pH=8,8<br/>(sep.)</i> | 3,8 mL                | 3,8 mL                | 1,0 M, pH=6,6 630<br>μL |
| <i>SDS 10%</i>                      | 150 μL                | 150 μL                | 50 μL                   |
| <i>APS 10%</i>                      | 150 μL                | 150 μL                | 50 μL                   |
| <i>TEMED</i>                        | 6 μL                  | 6 μL                  | 5 μL                    |

Πίνακας 3. Συστατικά και ποσότητες για τις πηκτές επιστοιβαξης και διαχωρισμού. Σημειώνεται ότι οι ποσότητες αντιστοιχούν σε 2 πηκτές ανά κατηγορία. Επίσης, τα αντιδραστήρια APS and TEMED είναι υπεύθυνα για την κατάλυση του πολυμερισμού της πηκτής για αυτό προστίθενται τελευταία.

Για την ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών χρησιμοποιείται η μέθοδος Υγρής Μεταφοράς (Criterion™ Blotter), κατά την οποία οι πρωτεΐνες του πηκτώματος μεταφέρθηκαν ηλεκτροφορητικά πάνω σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Protran, πόροι 0.45μm). Μετά το πέρας της μεταφοράς ακολούθησε η χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με κατάλληλη χρωστική (Ponceau Red, Sigma-Aldrich P7170), ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Μετά την ηλεκτρομεταφορά, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα αποκλεισμού (διάλυμα 5% γάλακτος σε TBS-Tween 0,01%), υπό ανακίνηση (rocking). Ακολουθεί ολονύκτια (overnight) επώαση σε θερμοκρασία συντήρησης (4°C) με τα πρωτογενές αντίσωμα και η επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το



δευτερογενές αντίσωμα. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο horseradish peroxidase (HRP) και αναγνωρίζει ανοσοσφαιρίνες του ζώου από το οποίο έχει παραχθεί το πρώτο αντίσωμα.

| <b>Αντίσωμα</b>               | <b>Εταιρία-Κωδικός</b>      | <b>Είδος που αναπτύχθηκε</b> | <b>Αραίωση</b> | <b>Χρήση</b> | <b>Μοριακό Βάρος (kDA)</b> |
|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------|--------------|----------------------------|
| <b>Anti-NMDA R2A (GluN2A)</b> | <b>Cell Signaling-4205</b>  | <b>Rabbit mAb</b>            | <b>1: 1000</b> | <b>WB</b>    | <b>180</b>                 |
| <b>Anti-NMDA R2B (GluN2B)</b> | <b>Cell Signaling-14544</b> | <b>Rabbit mAb</b>            | <b>1: 1000</b> | <b>WB</b>    | <b>190</b>                 |
| <b>Anti-FAAH1</b>             | <b>Abcam-ab54615</b>        | <b>Mouse mAb</b>             | <b>1: 1000</b> | <b>WB</b>    | <b>63</b>                  |
| <b>Anti-a-Tubulin</b>         | <b>Sigma-T6199</b>          | <b>Mouse mAb</b>             | <b>1:20000</b> | <b>WB</b>    | <b>50</b>                  |

**Πίνακας 4. Λίστα αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.**

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με το σύστημα ECL (Enhanced ChemiLuminescence) της εταιρείας Biorad, Clarity™ Western ECL Blotting Substrates, που βασίζεται στη χημειοφωταύγεια. Η εμφάνιση πραγματοποιείται με τη χρήση κάμερας που συνδέεται με το Chemidoc XRS software (Biorad) και το λογισμικό Quantity One. Η οπτική πυκνότητα κάθε ζώνης πρωτεΐνης μετρήθηκε με ημιποσοτικό τρόπο με χρήση κατάλληλου λογισμικού (ImageJ for Windows). Για την κανονικοποίηση των δειγμάτων και για να αποδοθεί η ακριβής οπτική απορρόφησή τους, η οπτική πυκνότητα κάθε ζώνης διαιρέθηκε με την οπτική πυκνότητα της ζώνης της  $\alpha$ -τουμπουλίνης από το ίδιο δείγμα.

#### 2.5.9 Στατιστική Ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS (Version 26.0 για Windows). Ενώ για την δημιουργία των γραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraphPad Prism [Version 8.0.1]. Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με ανάλυση μεταβλητότητας δύο παραγόντων : γονότυπος και χορήγηση φαρμάκου/εκδόχου. Ακολούθησαν οι επιμέρους στατιστικές αναλύσεις (Student's t-tests) προκειμένου να ανιχνευθούν οι διαφορές μεταξύ των ομάδων κατόπιν συγκρίσεων είτε με παράγοντα το φάρμακο/έκδοχο είτε με παράγοντα το γονότυπο.

## **3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### 3.1 Συμπεριφορικές Δοκιμασίες

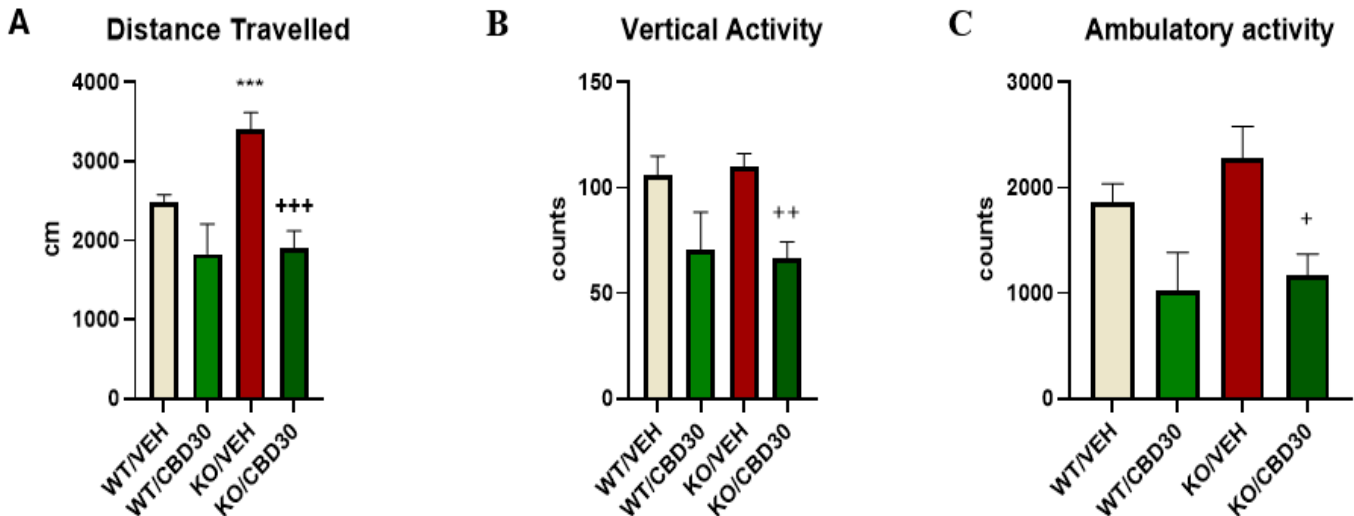
#### 3.1.1 Δοκιμασία Ανοιχτού Πεδίου (Open Field Test)

Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο παράγοντες του γονοτύπου και της χορήγησης του φαρμάκου κανναβιδιόλης, έδειξαν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα ως προς την αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα, που μελετήθηκε μέσω της δοκιμασίας ανοιχτού πεδίου (αλληλεπίδραση: γονότυπος x χορήγηση φαρμάκου:  $F(1,28)=6.553$ ,  $p=0.017$ ;  $F(1,28)=4.445$ ,  $p=0.023$ , για τη συνολική διανυθείσα απόσταση και τη συχνότητα της οριζόντιας κινητικότητας αντιστοίχως).

Οι ακόλουθες συγκρίσεις αναφορικά με τους δείκτες της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας έδειξαν μείωση της κινητικής δραστηριότητας των *Fmr1* KO επίμυων ύστερα από τη χορήγηση της, η οποία εκφράζεται από τη συνολική διανυθείσα απόσταση (Γράφημα 1A,  $p<0.001$ ) τη συχνότητα της οριζόντιας κινητικότητας (Γράφημα 1C,  $p=0.016$ ), αλλά και της κάθετης κινητικότητας (Γράφημα 1B,  $p=0.002$ ) συγκριτικά με τους *Fmr1*KO επίμυες που έλαβαν το έκδοχο (ομάδα vehicle). Η χορήγηση κανναβιδιόλης στους WT επίμυες, προκάλεσε παρόμοια τάση για μείωση τόσο της οριζόντιας (Γράφημα 1A, C) όσο και της κάθετης (Γράφημα 1B) αυθόρμητης κινητικότητας, χωρίς όμως να είναι στατιστικώς σημαντική.

Ως προς το γονότυπο, οι *Fmr1*KO επίμυες διένυσαν στατιστικώς σημαντικά περισσότερη απόσταση σε σχέση με τους αγρίου τύπου επίμυες (Γράφημα 1A,  $p<0.001$ ),

### Spontaneous Motor Activity



Γράφημα 1. Οριζόντια (A, C) και κάθετη (B) κινητικότητα για τους *Fmr1* KO και WT επίμυες που έλαβαν τη CBD, καθώς και για τους *Fmr1* KO και WT επίμυες που έλαβαν έκδοχο, για το διάστημα καταγραφής αυθόρμητης κινητικότητας (0-30min, A,B,C). Μέσες τιμές  $\pm$  SEM. Σύγκριση μεταξύ των ομάδων που έλαβαν CBD ή έκδοχο: + $p<0.05$ , ++ $p<0.01$ , +++ $p<0.001$ . Σύγκριση μεταξύ αρσενικών WT και KO επίμυων: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

και αυξημένη συχνότητα οριζόντιας δραστηριότητας αν και μη σημαντική υποδηλώνοντας αυξημένη κινητικότητα σε αυτό το πειραματικό μοντέλο FXS.

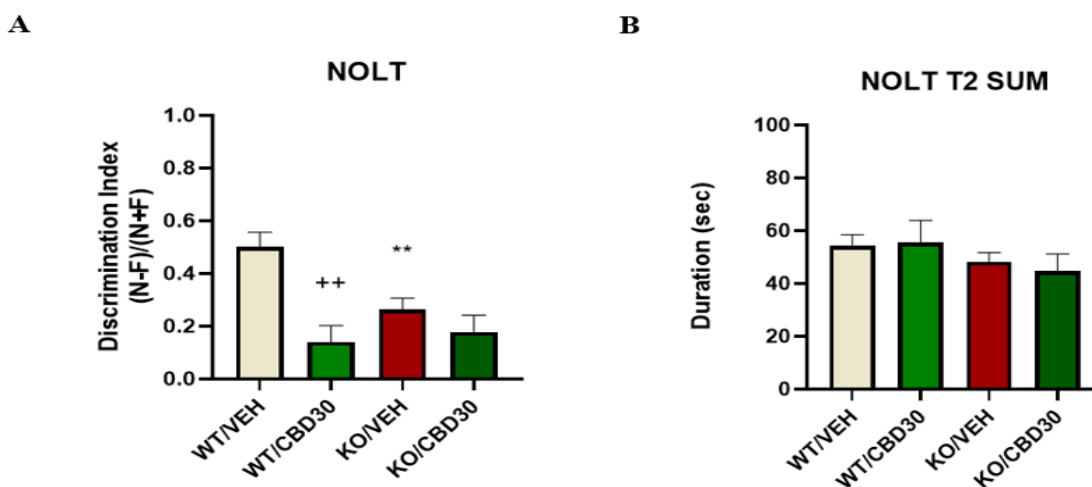
### 3.1.2 Δοκιμασία Αναγνώρισης Θέσης Αντικειμένου (NOLT)

Η στατιστική επεξεργασία ανέδειξε στατιστικώς σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων (γονότυπος x χορήγηση φαρμάκου) ως προς την εκτίμηση της βραχυπρόθεσμης αναγνωριστικής χωρικής μνήμης [ $F_{(1,24)}=7.519$ ,  $p=0.011$ ], που μελετήθηκε μέσω της δοκιμασίας αναγνώρισης νέας θέσης αντικειμένου.

Οι ακόλουθες συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων ανέδειξαν ότι η χορήγηση κανναβιδιόλης στους *Fmr1*KO επίμυες δεν προκάλεσε μεταβολή ως προς το δείκτη διάκρισης της δοκιμασίας αναγνώρισης νέου αντικειμένου, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (ομάδα *Fmr1* KO με χορήγηση εκδόχου) (Γράφημα 2A).

Τα αγρίου τύπου πειραματόζωα που έλαβαν το φάρμακο εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικά μειωμένο δείκτη διάκρισης σε σχέση με την ομάδα εκδόχου ( $p=0.008$  Γράφημα 2A), όμως ο συνολικός χρόνος εξερεύνησης κατά την T2 περίοδο δεν έδειξε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των υπό σύγκριση ομάδων (Γράφημα 2B).

Αξίζει να αναφερθεί ότι παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση του δείκτη διάκρισης στην ομάδα των KO επίμυων σε σχέση με τους WT επίμυες (Γράφημα 2A,  $p=0.003$ ), γεγονός που υποδηλώνει ότι τα *Fmr1*KO πειραματόζωα εμφάνισαν έλλειμμα ως προς την βραχυπρόθεσμη χωρική μνήμη, ωστόσο το έλλειμα αυτό, όπως προαναφέρθηκε δεν ανατρέπεται από την οξεία χορήγηση κανναβιδιόλης.



Γράφημα 2. Δείκτης διάκρισης βραχυπρόθεσμης αναγνωριστικής χωρικής μνήμης για τους *Fmr1* KO και WT επίμυες που έλαβαν τη CBD, καθώς και για τους *Fmr1* KO και WT επίμυες που έλαβαν έκδοχο (A). Συνολικός χρόνος εξερεύνησης των δύο αντικειμένων κατά την T2 φάση (B). Σύγκριση μεταξύ των ομάδων που έλαβαν CBD και έκδοχο: + $p<0.05$ , ++ $p<0.01$ , +++ $p<0.001$ . Σύγκριση μεταξύ αρσενικών WT και KO επίμυων: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$

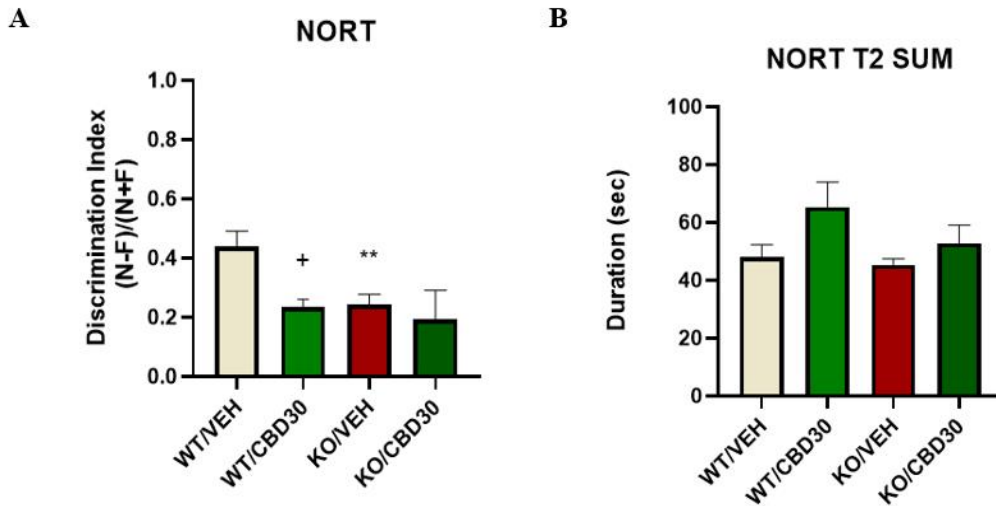
### 3.1.3 Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου αντικειμένου (NORT)

Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο παράγοντες (αλληλεπίδραση γονότυπος x χορήγηση φαρμάκου) έδειξε στατιστικώς σημαντική αλληλεπίδραση [ $F(1,24)=5.346$ ,  $p=0.03$ ] ως προς την εκτίμηση της βραχυπρόθεσμης αναγνωριστικής μνήμης, που μελετήθηκε μέσω της δοκιμασίας αναγνώρισης νέου αντικειμένου.

Συγκεκριμένα, ως προς την επίδραση της χορήγησης κανναβιδιόλης στους *Fmr1*KO επίμυες δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μεταβολή στον δείκτη διάκρισης της δοκιμασίας αναγνώρισης νέου αντικειμένου, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Γράφημα 3A).

Επιπλέον, τα αγρίου τύπου πειραματόζωα που έλαβαν το φάρμακο εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικά μειωμένο δείκτη διάκρισης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου τους ( $p=0.021$  Γράφημα 2A). Ωστόσο, ο συνολικός χρόνος εξερεύνησης κατά την T2 περίοδο δεν έδειξε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά για καμία από τις ομάδες που υποβλήθηκαν σε σύγκριση (Γράφημα 3B).

Αναφορικά με το γονότυπο, να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένος δείκτης διάκρισης στην ομάδα των *KO* επίμυων σε σχέση με τους *WT* επίμυες (Γράφημα 2A,  $p=0.005$ ), υποδηλώνοντας ότι τα *Fmr1*KO πειραματόζωα εμφάνισαν έλλειμμα ως προς την βραχυπρόθεσμη αναγνωριστική μνήμη, γεγονός όμως το οποίο όπως προαναφέρθηκε δεν μεταβλήθηκε από την οξεία χορήγηση της κανναβιδιόλης.



Γράφημα 3. Δείκτης διάκρισης βραχυπρόθεσμης αναγνωριστικής μνήμης για τους *Fmr1* KO και WT επίμυες που έλαβαν CBD, καθώς και για τους *Fmr1* KO και WT επίμυες που έλαβαν έκδοχο (A). Συνολικός χρόνος εξερεύνησης των δύο αντικειμένων κατά την T2 φάση (B). Σύγκριση μεταξύ των ομάδων που έλαβαν CBD και έκδοχο : + $p<0.05$ , ++ $p<0.01$ , +++ $p<0.001$ . Σύγκριση μεταξύ αρσενικών WT και KO επίμυων: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

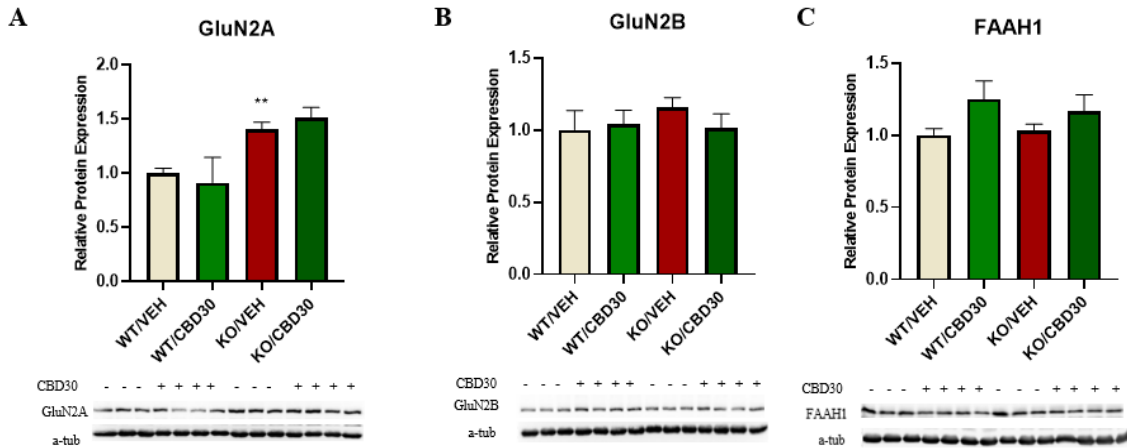
### 3.2 Εκτίμηση επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western

Προμετωπιαίος Φλοιός (PFC)

Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο παράγοντες έδειξε στατιστικώς σημαντική επίδραση του γονοτύπου ως προς την πρωτεϊνική έκφραση της υπομονάδας NR2A [F(1,13)=10.60, p=0.009]. Επιπλέον παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική επίδραση της χορήγησης του φαρμάκου ως προς την πρωτεϊνική έκφραση FAAH για τον προμετωπιαίο φλοιό [F(1,13)=4.37, p=0.046].

Οι επιμέρους συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων δεν ανέδειξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές κατόπιν της χορήγησης κανναβιδιόλης στους Fmr1KO επίμυες συγκριτικά με τα KO πειραματόζωα που έλαβαν το έκδοχο. Αξίζει να σημειωθεί ότι η χορήγηση κανναβιδιόλης προκάλεσε μια αύξηση στα KO και WT πειραματόζωα ως προς την έκφραση του ενζύμου FAAH χωρίς όμως να είναι στατιστικώς (Γράφημα 4).

ξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκε αύξηση ως προς την έκφραση της υπομονάδας NR2A στους Fmr1 KO επίμυες σε σχέση με τους αγρίου τύπου, η οποία όπως προαναφέρθηκε δεν μεταβλήθηκε κατόπιν οξείας χορήγησης κανναβιδιόλης (Γράφημα 4A, p=0.008)



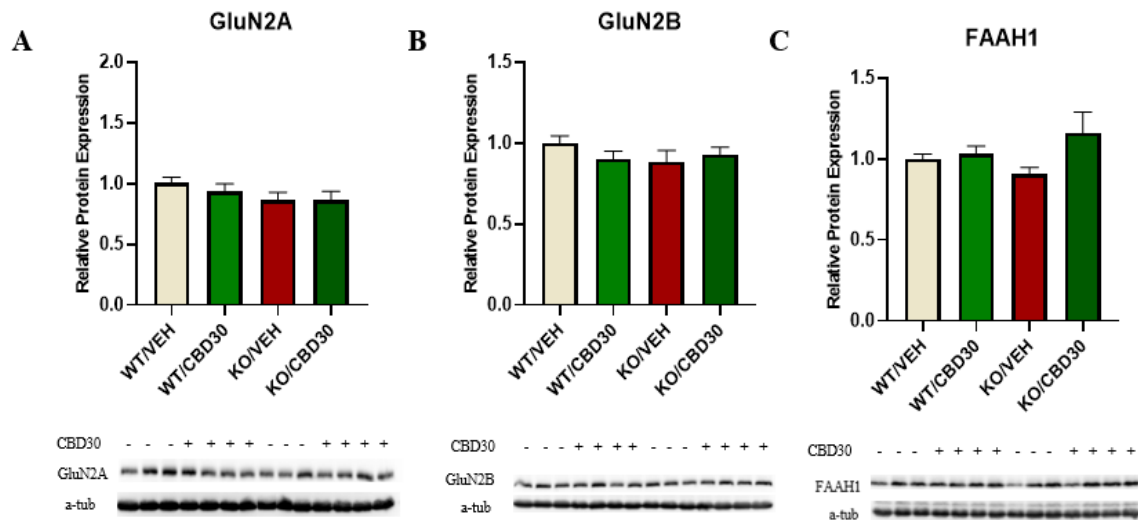
Γράφημα 4. Επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης των υπομονάδων GluN2A (A), GluN2B (B) του υποδοχέα NMDA, και του ενζύμου FAAH (C) για τους Fmr1 KO και WT επίμυες που έλαβαν τη CBD ή το έκδοχο, για τον προμετωπιαίο φλοιό. Μέσες τιμές ± SEM του λόγου-εκφρασμένος επί % της ομάδας ελέγχου-της σχετικής οπτικής πυκνότητας (O.D.) της εκάστοτε υπομονάδας προς την α-τουμπουλίνη. Σύγκριση μεταξύ αρσενικών WT και KO επίμυων: \*p<0.05, \*\*p<0.01.

## Ραχιαίος Ιππόκαμπος (Dorsal Hippocampus)

Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο παράγοντες του γονοτύπου και της χορήγησης του φαρμάκου της κανναβιδιόλης, δεν εμφάνισε κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή ως προς τους δείκτες γλουταματεργικής δραστηριότητας και εκείνους του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος που μελετήθηκαν στη περιοχή του ραχιαίου ιππόκαμπου (Γράφημα 5).

Αξίζει να αναφερθεί ότι παρατηρείται μια μείωση της πρωτεϊνικής έκφρασης των υπομονάδων NMDA μεταξύ των KO και WT επιμύων η οποία όμως δεν είναι στατιστικώς σημαντική και δεν μεταβάλλεται μετά από τη χορήγηση κανναβιδιόλης.

Επίσης τα επίπεδα έκφρασης της FAAH μειώνονται στα KO πειραματόζωα και η χορήγηση κανναβιδιόλης φαίνεται να αντιστρέφει τη συγκεκριμένη μείωση αλλά οι μεταβολές αυτές δεν χαρακτηρίζονται από στατιστική σημαντικότητα.



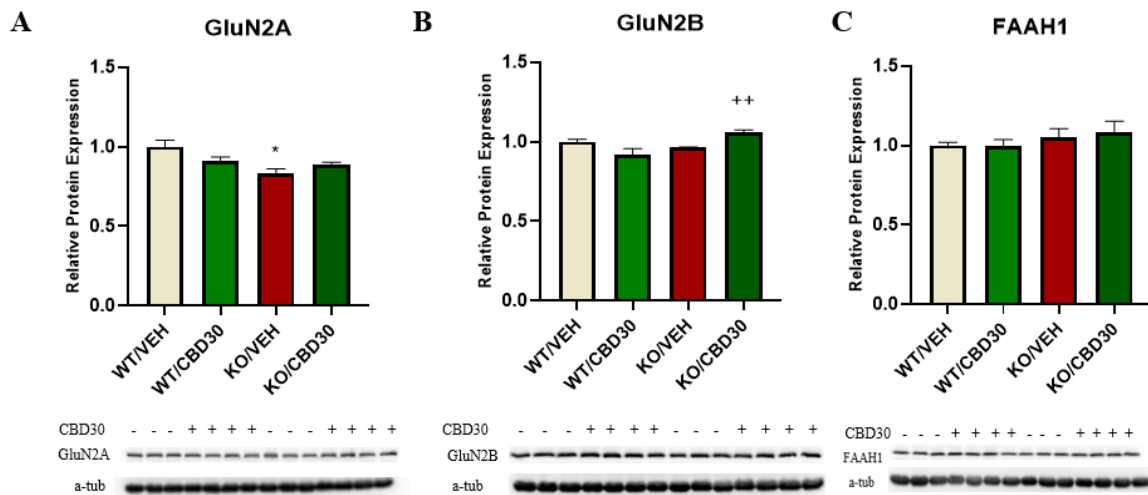
Γράφημα 5. Επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης των υπομονάδων GluN2A (A), GluN2B (B) του υποδοχέα NMDA, και του ενζύμου FAAH (C) για τους *Fmr1* KO και WT επιμύες που έλαβαν CBD ή το έκδοχο για τον ραχιαίο ιππόκαμπο. Μέσες τιμές  $\pm$  SEM του λόγου-εκφρασμένος επί % της ομάδας ελέγχου-της σχετικής οπτικής πυκνότητας (O.D.) της εκάστοτε υπομονάδας προς την  $\alpha$ -τουμπουλίνη.

## Κοιλιακός Ιππόκαμπος (Ventral Hippocampus)

Η στατιστική ανάλυση έδειξε στατιστικώς σημαντική επίδραση του γονοτύπου ως προς την πρωτεϊνική έκφραση της υπομονάδας NR2A [ $F_{(1,13)}=8.67$ ,  $p=0.017$ ]. Επιπλέον παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική επίδραση της χορήγησης του φαρμάκου ως προς την πρωτεϊνική έκφραση της υπομονάδας NR2B για τον κοιλιακό ιππόκαμπο [ $F_{(1,13)}=4.17$ ,  $p=0.048$ ].

Πιο συγκεκριμένα, οι επιμέρους αναλύσεις έδειξαν αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της υπομονάδας NR2B στους Fmr1KO επίμυες μετά από τη χορήγηση κανναβιδιόλης συγκριτικά με τους KO επίμυες που έλαβαν έκδοχο (Γράφημα 6,  $p=0.005$ ).

Αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκε μείωση ως προς την έκφραση της πρωτεΐνης NR2A (Γράφημα 6A,  $p=0.0284$ ) στους Fmr1KO επίμυες σε σχέση με τους αντίστοιχους WT, η οποία μετριάσθηκε από τη χορήγηση της κανναβιδιόλης, δεδομένου ότι δεν διαφέρει η πρωτεϊνική έκφραση στους KO επίμυες που έλαβαν κανναβιδιόλη συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (WT-vehicle). Η μείωση ως προς την υπομονάδα NR2B που παρατηρήθηκε επίσης στους KO επίμυες συγκριτικά με τους WT, αν και δεν ήταν στατιστικώς σημαντική, αντιστράφηκε κατόπιν της χορήγησης της κανναβιδιόλης όπως προαναφέρθηκε.



Γράφημα 6. Επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης των υπομονάδων GluN2A (A), GluN2B (B) του υποδοχέα NMDA, και του ενζύμου FAAH (C) για τους Fmr1 KO και WT επίμυες που έλαβαν τη CBD ή το έκδοχο, για τον κοιλιακό ιππόκαμπο. Μέσες τιμές  $\pm$  SEM του λόγου-εκφρασμένος επί % της ομάδας ελέγχου-της σχετικής οπτικής πυκνότητας (O.D.) της εκάστοτε υπομονάδας προς την  $\alpha$ -τουμπουλίνη. Σύγκριση μεταξύ των ομάδων που έλαβαν τη CBD με τις αντίστοιχες ομάδες ελέγχου :  $+p<0.05$ ,  $++p<0.01$ . Σύγκριση μεταξύ αρσενικών WT και KO επίμυων:  $*p<0.05$ .



## **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της οξείας χορήγησης κανναβιδιόλης σε συγκεκριμένους συμπεριφορικούς και νευροβιολογικούς δείκτες στο πειραματικό πρότυπο Fmr1 KO επίμυων. Το πειραματικό πρότυπο Fmr1 KO αντανακλά την συμπτωματολογία του Συνδρόμου Ευθραύστου X, εμφανίζοντας ένα προφίλ υπερκινητικότητας και ελλειμάτων σε γνωστικές λειτουργίες που σχετίζονται με την χωρική και αναγνωριστική μνήμη και μάθηση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγηση κανναβιδιόλης στη δόση των 30mg/kg μειώνει την υπερκινητικότητα, ωστόσο δε φαίνεται να βελτιώνει τα ελλείματα στην βραχυπρόθεσμη αναγνωριστική και χωρική μνήμη, που εμφανίζουν οι Fmr1KO επίμυες. Παράλληλα, η οξεία χορήγηση της κανναβιδιόλης ανέστρεψε κάποιες από τις απορυθμίσεις που παρατηρήθηκαν σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης υπομονάδων NMDA στον κοιλιακό ιππόκαμπο στους KO επίμυες που προσομοιάζουν το FXS σύνδρομο.

Η εκτίμηση της επίδρασης της CBD στην αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη Δοκιμασία Ανοιχτού πεδίου. Κατά την συγκεκριμένη συμπεριφορική δοκιμασία σε μη εξοικειωμένους επίμυες εμφανίστηκε μείωση της αυθόρμητης οριζόντιας και κάθετης κινητικής δραστηριότητας των KO πειραματοζώων κατόπιν οξείας χορήγησης της CBD στη δόση των 30mg/kg. Η αυθόρμητη οριζόντια κινητικότητα που εμφανίζεται όταν τα πειραματόζωα τοποθετούνται σε ένα νέο περιβάλλον, εκφράστηκε τόσο από τη συνολική διανυθείσα απόσταση αλλά και από τη συχνότητα της οριζόντιας κινητικότητας, και αποτελεί έναν δείκτη για την διεγερσιμότητα και την υπερκινητικότητα των πειραματοζώων, ενώ η κάθετη κινητικότητα αποτελεί ένα δείκτη της εξερευνητικότητας και της «εσωτερικής διεγερσιμότητας» των πειραματοζώων. Φαίνεται, λοιπόν ότι η κανναβιδιόλη επιδρά κατασταλτικά στην υπερκινητικότητα και διεγερσιμότητα των Fmr1 KO επίμυων, συνεπώς προκαλείται αναστροφή του υπερκινητικού φαινοτύπου των Fmr1 KO επίμυων σε σχέση με τους Fmr1 KO επίμυες που έλαβαν μόνο το διάλυμα εκδόχου. Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι η οξεία χορήγηση στους αγρίου τύπου επίμυες (WT) εμφανίζει μια τάση για μείωση της αυθόρμητης κινητικότητας, χωρίς ωστόσο να έχει στατιστικώς σημαντική. Προηγούμενη μελέτη που αξιολογεί την επίδραση της CBD στην κινητική δραστηριότητα των Fmr1 KO μυών, έδειξε πως η χορήγηση κανναβιδιόλης σε χαμηλότερες δόσεις 5mg/kg και 20 mg/kg δεν επηρέασαν την κινητικότητα των πειραματοζώων κατά τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (Zieba et al., 2019). Αντίστοιχο αποτέλεσμα στην κινητικότητα, παρουσιάστηκε και από πρόσφατη μελέτη που χρησιμοποιεί το πειραματικό μοντέλο Fmr1 KO επίμυ, χορηγώντας κανναβιδιόλη στη δόση των 10mg/kg, 2 ώρες πριν από την έναρξη της συμπεριφορικής δοκιμασίας (Manduca et al., 2024). Τα αποτελέσματα αυτά σε επίμυες συμφωνούν με προκαταρκτικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης (στα γραφήματα δεν απεικονίζονται τα ευρήματα) όπου η χαμηλότερη δόση 10mg/kg CBD δεν επηρέασε το προφίλ της υπερκινητικής δραστηριότητας των Fmr1 KO επιμύων αν και οφείλει να σημειωθεί ότι στο συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό η καταγραφή της συμπεριφοράς πραγματοποιείται μισή ώρα μετά από τη χορήγηση της δόσης και όχι δύο ώρες αργότερα.

Αξίζει εδώ να συμπληρωθεί ότι προηγούμενες μελέτες, οι οποίες αξιολογούν την κινητική δραστηριότητα των Fmr1 KO επιμύων, έχουν δείξει σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας είτε αυξημένη αυθόρμητη κινητικότητα (Kozono et al., 2020; Ntoulas et al., 2024; Zieba et al., 2019), είτε μη μεταβολή (Hamilton et al. 2014; Tian et al., 2017). Αυτές οι διαφορές μπορούν να αποδοθούν στο διαφορετικό στέλεχος επίμου που χρησιμοποιείται, τη γενετική τροποποίηση που έχει δεχθεί η και στις διαφορές ως προς τα πειραματικά συμπεριφορικά πρωτόκολλα που ακολουθούνται.

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι, η χορήγηση κανναβιδιόλης στη δόση των 30mg/kg μειώνει άμεσα την υπερκινητικότητα που καταγράφεται στο μοντέλο Fmr1 KO επιμύων, ενώ χαμηλότερες δόσεις δεν φαίνεται να τροποποιούν την εμφάνιση της αυξημένης αυθόρμητης κινητικότητας των συγκεκριμένων επιμύων. Η μη καταγραφή μείωσης της κινητικότητας που παρατηρήθηκε και στους μυς (Zieba et al., 2019) θα μπορούσε επίσης να αποδοθεί στη χαμηλότερη δόση που χρησιμοποιήθηκε. Η χρήση υψηλότερων δόσεων κατά την οξεία χορήγηση και η σχετικά άμεση εκτίμηση του αποτελέσματος κρίνονται μάλλον ως απαραίτητα στοιχεία μεθοδολογικού σχεδιασμού για την εμφάνιση κατασταλτικής δράσης σε πειραματικά μοντέλα του FXS συνδρόμου.

Η επίδραση της χορήγησης κανναβιδιόλης σε γνωστικές λειτουργίες αποκτά ιδιαίτερη σημασία δεδομένου ότι το προφίλ των Fmr1 KO πειραματοζώων χαρακτηρίζεται από έκφρασης της αναγνωριστικής και χωρικής μνήμης και μάθησης, σύμφωνα με τα δικά μας ευρήματα και προηγούμενες μελέτες (Asiminas et al., 2019; Schiavi et al., 2023; Ventura et al., 2004).

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η οξεία χορήγηση της κανναβιδιόλης στη δόση των 30mg/kg δεν είχε καμία επίδραση στη βελτίωση της μειωμένης ικανότητας διάκρισης των Fmr1 KO συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Αξίζει να σημειώσουμε ότι οι συμπεριφορικές αυτές δοκιμασίες βασίζονται στην αυθόρμητη εξερευνητική ικανότητα των τρωκτικών, η οποία φαίνεται να μειώνεται από τη χορήγηση της κανναβιδιόλης όπως ήδη συζητήθηκε. Ωστόσο, να τονίσουμε ότι ο συνολικός χρόνος εξερεύνησης των δύο αντικειμένων κατά την δεύτερη φάση της επαφής με τα αντικείμενα (χρόνος επαφής: νέο και παλιό αντικείμενο NORT, νέα και παλαιά θέση αντικειμένου NOLT) δοκιμασιών δεν επηρεάστηκε από τη χορήγηση της κανναβιδιόλης τόσο στα KO όσο και στα WT πειραματόζωα (Γραφήματα 2 και 3). Συνεπώς, ο μειωμένος δείκτης διάκρισης στους KO-CBD και KO-VEH επίμους αλλά και στους WT επίμους πιθανά υποδηλώνει ότι η οξεία χορήγηση κανναβιδιόλης αδυνατεί να αποκαταστήσει τους δείκτες διάκρισης εγκατάστασης βραχυπρόθεσμης αναγνωριστικής και χωρικής μνήμης στα KO πειραματόζωα, ενώ επιβαρύνει τη γνωστική απόδοση των πειραματόζωων αγρίου τύπου. Όμως η πρόσφατη μελέτη των (Manduca et al., 2024) έδειξε βελτίωση του δείκτη διάκρισης των Fmr1 KO επιμύων που έλαβαν οξεία χορήγηση κανναβιδιόλης στη δόση των 10mg/kg κατά τη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου. Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης της κανναβιδιόλης σε

χαμηλότερες δόσεις ή μέσω επαναλαμβανόμενων σχημάτων χορήγησης, προκειμένου να αξιολογηθεί πιθανή βελτίωση εκφάνσεων γνωστικών λειτουργιών που παρατηρούνται στα πειραματικά πρότυπα που προσομοιάζουν το FXS σύνδρομο.

Συμπερασματικά, οι συμπεριφορικές πειραματικές δοκιμασίες της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η οξεία χορήγηση κανναβιδιόλης στη δόση των 30mg/kg μείωσε την υπερκινητική δραστηριότητα αλλά δεν βελτίωσε τα ελλείματα που αφορούν εκφάνσεις γνωστικής λειτουργίας που εμφανίζονται στο πειραματικό πρότυπο Fmr1KO επίμυων.

Οι νευροβιολογικοί δείκτες που μελετήθηκαν αφορούσαν πρωτεϊνική έκφραση των υπομονάδων των υποδοχέων NMDA του γλουταμικού οξέος και έκφραση του ενζύμου FAAH που μεταβολίζει το ενδοκανναβινοειδές ανανδαμίδη.

Οι υπομονάδες GluN2A και GluN2B κατέχουν έχουν κύριο ρόλο στην συναπτική πλαστικότητα που διαμεσολαβείται μέσω του NMDA υποδοχέα. Συγκεκριμένα, η παρουσία των υπομονάδων GluN2B στους υποδοχείς NMDA είναι κρίσιμη για την επαγωγή της LTD, καθώς αυτοί οι υποδοχείς έχουν μεγαλύτερη αγωγιμότητα για το Ca<sup>2+</sup> και αλληλοεπιδρούν ισχυρότερα με την CaMKII (Schiavi et al., 2023). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η οξεία χορήγηση κανναβιδιόλης δεν αντέστρεψε την αύξηση ως προς την έκφραση των NR2A υπομονάδων στον προμετωπιαίο φλοιό καθώς και την αντίθετη εικόνα που παρατηρήθηκε ως προς τις υπομονάδες NMDA υποδοχέων στον ραχιαίο ιππόκαμπο των KO επίμυων. Ωστόσο, παρατηρήθηκε αντιστροφή της μειωμένης πρωτεϊνικής έκφρασης της υπομονάδας GluN2B στον κοιλιακό ιππόκαμπο των KO επίμυων κατόπιν της οξείας χορήγησης κανναβιδιόλης. Η αύξηση στην έκφραση της υπομονάδας GluN2B που παρατηρείται ύστερα από χορήγηση κανναβιδιόλης στους Fmr1 KO επίμυες, υποδηλώνει ότι η CBD μπορεί να έχει θετική επίδραση στη συναπτική πλαστικότητα και λειτουργία των γλουταματεργικών συνάψεων στον κοιλιακό ιππόκαμπο, η οποία όμως δεν επαρκεί ή δεν ευρίσκεται σε απόλυτη συσχέτιση με αντίστοιχη βελτίωση των γνωστικών παραμέτρων χωρικής και αναγνωριστικής μνήμης που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Αξίζει εδώ να συμπληρώσουμε ότι προηγούμενες μελέτες σε Fmr1 KO μυς, έχουν παρουσιάσει διαφορετικά αποτελέσματα ως προς τις πρωτεϊνικές εκφράσεις των υπομονάδων των NMDA υποδοχέων σε σύγκριση με WT πειραματόζωα ανάλογα και με την περιοχή που εξετάστηκε, ενώ καμία μελέτη δεν έχει επιπλέον διερευνήσει την επίδραση εξωγενώς χορηγούμενων κανναβινοειδών στους δείκτες που προαναφέρθηκαν. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι στον προμετωπιαίο φλοιό παρουσιάζεται μείωση ή μη μεταβολή της υπομονάδας GluN2A μεταξύ KO και WT μυών (Krueger et al., 2011; Xu et al., 2009). Διαφοποιημένο πρότυπο έκφρασης έχει επίσης παρατηρηθεί και στον ιππόκαμπο, όπου έχει παρατηρηθεί μείωση αλλά και αύξηση των επιπέδων έκφρασης για την υπομονάδα GluN2A (Bostrom et al., 2015; Lundbye et al., 2018).

Συμπερασματικά θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι οι διαφορές ανάμεσα στις μελέτες πιθανόν να αποδίδονται σε διαφορετικούς μεθοδολογικούς σχεδιασμούς, το στέλεχος και

την εκάστοτε γενετική τροποποίηση των πειραματόζωων αλλά και στην επιλογή ολόκληρης της περιοχής η μέρος αυτής όπως συμβαίνει για την περίπτωση του ιππόκαμπου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας κρίθηκε σημαντικό να εστιάσουμε και σε άλλους δείκτες της γλουταματεργικής δραστηριότητας και πλαστικότητας στον προμετωπιαίο φλοιό και στον ιππόκαμπο (η έρευνα μας σε εξέλιξη) για να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση της οξείας χορήγησης κανναβιδιόλης σε μοριακούς στόχους με τοποειδική αναφορά, που σχετίζονται με νευροβιολογικές μεταβολές που παρατηρούνται επί των Fmr1 KO πειραματόζωων συγκριτικά με εκείνα του αγρίου τύπου.

Η προσέγγιση της ενδοκανναβινοειδούς δραστηριότητας στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με την εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης τους ενζύμου FAAH που μεταβολίζει το ενδοκανναβινοειδές ανανδαμίδη λαμβάνοντας υπόψη και τις φαρμακολογικές ιδιότητες της κανναβιδιόλης που αναφέρουν εκτός των άλλων και αύξηση του ενδοκανναβινοειδούς τόνου (βλέπε εισαγωγή, Elsaid et al., 2019). Τα αποτελέσματα μας δεν δείχνουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές ως προς την έκφραση της FAAH, ωστόσο παρατηρείται μια τάση αύξησης της έκφρασης της μετά από την οξεία χορήγηση της κανναβιδιόλης η οποία στην περίπτωση του ραχιαίου ιππόκαμπου φαίνεται να αντιστρέφει τη μείωση που παρατηρείται στα KO συγκριτικά με τα WT πειραματόζωα. Η μελέτη των Manduca et al. (2024) ανέφερε επίσης γονοτυπικές διαφορές καθώς η έκφραση του FAAH ήταν μειωμένη στον ιππόκαμπο των Fmr1 KO επιμύων σε σχέση με τους WT (Manduca et al., 2024).

Τα ευρήματα μας ως προς τη μελέτη του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος εμπλουτίζονται από επιπλέον πειράματα που ευρίσκονται υπό εξέλιξη για διερεύνηση τόσο των γονοτυπικών διαφορών όσο και της επίδρασης της κανναβιδιόλης.

|                                | KO/CBD vs KO/VEH |        |      | KO vs WT |        |      |
|--------------------------------|------------------|--------|------|----------|--------|------|
| <b>Behavioral Effects</b>      |                  |        |      |          |        |      |
| OFT                            | ↓                |        |      | ↑        |        |      |
| NOLT                           | -                |        |      | ↓        |        |      |
| NORT                           | -                |        |      | ↓        |        |      |
| <b>Neurobiological effects</b> |                  |        |      |          |        |      |
|                                | GluN2A           | GluN2B | FAAH | GluN2A   | GluN2B | FAAH |
| PFC                            | -                | -      | -    | ↑        | -      | -    |
| D.Hipp                         | -                | -      | -    | -        | -      | -    |
| V.Hipp                         | -                | ↑      | -    | ↓        | -      | -    |

Πίνακας 5 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η οξεία χορήγηση κανναβιδιόλης στη δόση των 30 mg/kg επηρέασε συγκεκριμένες συμπεριφορικές και νευροβιολογικές παραμέτρους που εξετάστηκαν. Ειδικότερα η κανναβιδιόλη κατέστειλε την υπερκινητικότητα ενώ δεν βελτίωσε τα γνωστικά ελλείμματα στη βραχυπρόθεσμη αναγνωριστική και χωρική μνήμη που παρατηρήθηκαν στους Fmr1 KO επίμυες. Επιπλέον, τα αποτελέσματα μας έδειξαν για πρώτη φορά πως επηρεάζει η χορήγηση κανναβιδιόλης τη γλουταματεργική λειτουργία και τον ενδοκανναβινοειδικό τόνο στους συγκεκριμένους δείκτες που επιλέχθηκαν. Συγκεκριμένα, η κανναβιδιόλη αντέστρεψε την μείωση στην έκφραση της υπομονάδας GluN2B στον κοιλιακό ιππόκαμπο των KO πειραματοζώων, υποδεικνύοντας μια πιθανή θετική επίδραση στη συναπτική πλαστικότητα. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν ήπιες μεταβολές ως προς στην έκφραση του ενζύμου FAAH, υποδεικνύοντας την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση του συγκεκριμένου αποτελέσματος. Τα ευρήματα μας καταδεικνύουν την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης της κανναβιδιόλης σε επιπλέον δείκτες νευροπλαστικότητας και γλουταματεργικής λειτουργίας ενώ καθίσταται αναγκαία και η περαιτέρω διερεύνηση του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος. Επιπλέον οι μελλοντικές μας έρευνες οφείλουν να εμπλουτισθούν με πειραματικές μελέτες χρησιμοποιώντας και μικρότερες δόσεις για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα προκειμένου να αποτυπωθεί με καλύτερο τρόπο και μεταφραστική αξία η χρήση και το θεραπευτικό δυναμικό της κανναβιδιόλης στο σύνδρομο FXS.

# **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Allingham-Hawkins, D. J., Babul-Hirji, R., Chitayat, D., Holden, J. J. A., Yang, K. T., Lee, C., Hudson, R., Gorwill, H., Nolin, S. L., Glicksman, A., Jenkins, E. C., Brown, W. T., Howard-Peebles, P. N., Becchi, C., Cummings, E., Fallon, L., Seitz, S., Black, S. H., Vianna-Morgante, A. M., ... Vieri, F. (1999). Fragile X Premutation Is a Significant Risk Factor for Premature Ovarian Failure: The International Collaborative POF in Fragile X Study-Preliminary Data Europe PMC Funders Group. In *Am J Med Genet* (Vol. 83, Issue 4).
- Asiminas, A., Jackson, A. D., Louros, S. R., Till, S. M., Spano, T., Dando, O., Bear, M. F., Chattarji, S., Hardingham, G. E., Osterweil, E. K., A Wyllie, D. J., Wood, E. R., & Kind, P. C. (2019). Sustained correction of associative learning deficits after brief, early treatment in a rat model of Fragile X Syndrome. In *Sci. Transl. Med* (Vol. 11). <http://stm.sciencemag.org/>
- Bagni, C., & Zukin, R. S. (2019). A Synaptic Perspective of Fragile X Syndrome and Autism Spectrum Disorders. In *Neuron* (Vol. 101, Issue 6, pp. 1070–1088). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.041>
- Bakas, T., van Nieuwenhuijzen, P. S., Devenish, S. O., McGregor, I. S., Arnold, J. C., & Chebib, M. (2017). The direct actions of cannabidiol and 2-arachidonoyl glycerol at GABAA receptors. *Pharmacological Research*, 119, 358–370. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.02.022>
- Bear, M. F., Huber, K. M., & Warren, S. T. (2004a). The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends in Neurosciences*, 27(7), 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.04.009>
- Bear, M. F., Huber, K. M., & Warren, S. T. (2004b). The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends in Neurosciences*, 27(7), 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.04.009>
- Belzung, C., Leman, S., Vourc'h, P., & Andres, C. (2005). Rodent models for autism: A critical review. In *Drug Discovery Today: Disease Models* (Vol. 2, Issue 2, pp. 93–101). <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2005.05.004>
- Berkeley, J. L., & Levey, A. I. (2003). *Cell-Specific Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation by Multiple G Protein-Coupled Receptor Families in Hippocampus*. <http://molpharm.aspetjournals.org>
- Bih, C. I., Chen, T., Alistair, & Nunn, V. W., Bazelot, M., Dallas, M., & Whalley, B. J. (2015). Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders. *Neurotherapeutics*, 12, 699–730. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0377-3>



- Bisogno, T., Hanuš, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D. E., Brandi, I., Moriello, A. S., Davis, J. B., Mechoulam, R., & Di Marzo, V. (2001). Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: Effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *British Journal of Pharmacology*, *134*(4), 845–852. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704327>
- Bostrom, C. A., Majaess, N. M., Morch, K., White, E., Eadie, B. D., & Christie, B. R. (2015). Rescue of NMDAR-dependent synaptic plasticity in Fmr1 knock-out mice. *Cerebral Cortex*, *25*(1), 271–279. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht237>
- Braat, S., & Kooy, R. F. (2015). Insights into GABAergic system deficits in fragile X syndrome lead to clinical trials. In *Neuropharmacology* (Vol. 88, pp. 48–54). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.06.028>
- Brakatselos, C., Delis, F., Asprogerakas, M. Z., Lekkas, P., Tseti, I., Tzimas, P. S., Petrakis, E. A., Halabalaki, M., Skaltsounis, L. A., & Antoniou, K. (2021). Cannabidiol Modulates the Motor Profile and NMDA Receptor-related Alterations Induced by Ketamine. *Neuroscience*, *454*, 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.09.029>
- Busquets-Garcia, A., Gomis-González, M., Guegan, T., Agustín-Pavón, C., Pastor, A., Mato, S., Pérez-Samartín, A., Matute, C., De La Torre, R., Dierssen, M., Maldonado, R., & Ozaita, A. (2013). Targeting the endocannabinoid system in the treatment of fragile X syndrome. *Nature Medicine*, *19*(5), 603–607. <https://doi.org/10.1038/nm.3127>
- Caglayan, A. O. (2010). Genetic causes of syndromic and non-syndromic autism. In *Developmental Medicine and Child Neurology* (Vol. 52, Issue 2, pp. 130–138). <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2009.03523.x>
- Cavoy, A., & Delacour, J. (1993). Spatial But Not Object Recognition Is Impaired by Aging in Rats. In *Physiology & Behavior* (Vol. 53).
- Chen, E., & Joseph, S. (2015). Fragile X mental retardation protein: A paradigm for translational control by RNA-binding proteins. In *Biochimie* (Vol. 114, pp. 147–154). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.02.005>
- Curia, G., Papouin, T., Séguéla, P., & Avoli, M. (2009). Downregulation of tonic GABAergic inhibition in a mouse model of fragile X syndrome. *Cerebral Cortex*, *19*(7), 1515–1520. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhn159>
- Davidovic, L., Navratil, V., Bonaccorso, C. M., Catania, M. V., Bardoni, B., & Dumas, A. E. (2011). A metabolomic and systems biology perspective on the brain of the Fragile

X syndrome mouse model. *Genome Research*, 21(12), 2190–2202.  
<https://doi.org/10.1101/gr.116764.110>

- De Petrocellis, L., Cascio, M. G., & Di Marzo, V. (2004). The endocannabinoid system: A general view and latest additions. *British Journal of Pharmacology*, 141(5), 765–774. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705666>
- D’Hulst, C., De Geest, N., Reeve, S. P., Van Dam, D., De Deyn, P. P., Hassan, B. A., & Kooy, R. F. (2006). Decreased expression of the GABAA receptor in fragile X syndrome. *Brain Research*, 1121(1), 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.08.115>
- D’Hulst, C., Heulens, I., Brouwer, J. R., Willemsen, R., De Geest, N., Reeve, S. P., De Deyn, P. P., Hassan, B. A., & Kooy, R. F. (2009). Expression of the GABAergic system in animal models for fragile X syndrome and fragile X associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Brain Research*, 1253, 176–183.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.11.075>
- Dionne, O., & Corbin, F. (2021). An “omic” overview of fragile X syndrome. In *Biology* (Vol. 10, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biology10050433>
- Dölen, G., Osterweil, E., Rao, B. S. S., Smith, G. B., Auerbach, B. D., Chattarji, S., & Bear, M. F. (2007). Correction of Fragile X Syndrome in Mice. *Neuron*, 56(6), 955–962.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.12.001>
- Elhawary, N. A., AlJahdali, I. A., Abumansour, I. S., Azher, Z. A., Falemban, A. H., Madani, W. M., Alosaimi, W., Alghamdi, G., & Sindi, I. A. (2023). Phenotypic variability to medication management: an update on fragile X syndrome. In *Human Genomics* (Vol. 17, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40246-023-00507-2>
- Elsaid, S., Kloiber, S., & Le Foll, B. (2019). Effects of cannabidiol (CBD) in neuropsychiatric disorders: A review of pre-clinical and clinical findings. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 167). Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.06.005>
- Galanopoulos, A., Polissidis, A., Georgiadou, G., Papadopoulou-Daifoti, Z., Nomikos, G. G., Pitsikas, N., & Antoniou, K. (2014). WIN55,212-2 impairs non-associative recognition and spatial memory in rats via CB1 receptor stimulation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 124, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.05.014>
- Gallagher, S. M., Daly, C. A., Bear, M. F., & Huber, K. M. (2004). Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression in hippocampal area CA1. *Journal of*

*Neuroscience*, 24(20), 4859–4864. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5407-03.2004>

Greco, C. M., Navarro, C. S., Hunsaker, M. R., Maezawa, I., Shuler, J. F., Tassone, F., Delany, M., Au, J. W., Berman, R. F., Jin, L. W., Schumann, C., Hagerman, P. J., & Hagerman, R. J. (2011). Neuropathologic features in the hippocampus and cerebellum of three older men with fragile X syndrome. *Molecular Autism*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/2040-2392-2-2>

Greenamyre, J. T. (n.d.). *The Role of Glutamate in Neurotransmission and in Neurologic Disease*. <http://archneur.jamanetwork.com/>

Gross, C., Berry-Kravis, E. M., & Bassell, G. J. (2012). Therapeutic strategies in fragile X syndrome: Dysregulated mGluR signaling and beyond. In *Neuropsychopharmacology* (Vol. 37, Issue 1, pp. 178–195). <https://doi.org/10.1038/npp.2011.137>

Guillén, J. (2012). *FELASA guidelines and recommendations*. [www.felasa.eu](http://www.felasa.eu);

Hagerman, R. J., Berry-Kravis, E., Hazlett, H. C., Bailey, D. B., Moine, H., Kooy, R. F., Tassone, F., Gantois, I., Sonenberg, N., Mandel, J. L., & Hagerman, P. J. (2017). Fragile X syndrome. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3, 17065. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.65>

Hagerman, R. J., Leehey, ; M, Heinrichs, ; W, Med, ;, Tassone, ; F, Wilson, ; R, Hills, ; J, Grigsby, ; J, Gage, ; B, Hagerman, P. J., Hagerman, J., & Hager, P. J. (2001). *Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X*.

Heussler, H., Cohen, J., Silove, N., Tich, N., Bonn-Miller, M. O., Du, W., O'Neill, C., & Sebree, T. (2019). A phase 1/2, open-label assessment of the safety, tolerability, and efficacy of transdermal cannabidiol (ZYN002) for the treatment of pediatric fragile X syndrome. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s11689-019-9277-x>

Hillard, C. J., & Jarrahan, A. (2003). Cellular accumulation of anandamide: Consensus and controversy. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 140, Issue 5, pp. 802–808). <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705468>

Hong, A., Zhang, A., Ke, Y., El Idrissi, A., & Shen, C. H. (2012). Downregulation of GABA(A)  $\beta$  subunits is transcriptionally controlled by Fmr1p. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, 46(2), 272–275. <https://doi.org/10.1007/s12031-011-9531-5>

- Huber, K. M., Gallagher, S. M., Warren, S. T., & Bear, M. F. (2002). *Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation* (Vol. 99). [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.122205699](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.122205699)
- Hunter, J., Rivero-Arias, O., Angelov, A., Kim, E., Fotheringham, I., & Leal, J. (2014). Epidemiology of fragile X syndrome: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, *164*(7), 1648–1658. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36511>
- Instability of a 550-Base Pair DNA Segment and ~ b n o A a l Methylation in F r e e X syndrome.* (n.d.).
- Jahangir, M., Zhou, J. S., Lang, B., & Wang, X. P. (2021). GABAergic System Dysfunction and Challenges in Schizophrenia Research. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.663854>
- Kazdoba, T. M., Leach, P. T., Silverman, J. L., & Crawley, J. N. (2014). Modeling fragile X syndrome in the Fmr1 knockout mouse. *Intractable and Rare Diseases Research*, *3*(4), 118–133. <https://doi.org/10.5582/irdr.2014.01024>
- Koekkoek, S. K. E., Yamaguchi, K., Milojkovic, B. A., Dortland, B. R., Ruigrok, T. J. H., Maex, R., De Graaf, W., Smit, A. E., VanderWerf, F., Bakker, C. E., Willemsen, R., Ikeda, T., Kakizawa, S., Onodera, K., Nelson, D. L., Mientjes, E., Joosten, M., De Schutter, E., Oostra, B. A., ... De Zeeuw, C. I. (2005). Deletion of FMR1 in purkinje cells enhances parallel fiber LTD, enlarges spines, and attenuates cerebellar eyelid conditioning in fragile X syndrome. *Neuron*, *47*(3), 339–352. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.07.005>
- Kooy, R. F., Jin, P., Bao, H., Till, S., Kind, P., & Willemsen, R. (2017). Animal Models of Fragile X Syndrome. *Fragile X Syndrome: From Genetics to Targeted Treatment*, 123–147. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804461-2.00007-X>
- Kozono, N., Okamura, A., Honda, S., Matsumoto, M., & Mihara, T. (2020). Gamma power abnormalities in a Fmr1-targeted transgenic rat model of fragile X syndrome. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75893-x>
- Krueger, D. D., Osterweil, E. K., Chen, S. P., Tye, L. D., & Bear, M. F. (2011). Cognitive dysfunction and prefrontal synaptic abnormalities in a mouse model of fragile X syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(6), 2587–2592. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013855108>
- Laprairie, R. B., Bagher, A. M., Kelly, M. E. M., & Denovan-Wright, E. M. (2015). Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor.

*British Journal of Pharmacology*, 172(20), 4790–4805.

<https://doi.org/10.1111/bph.13250>

Loss, C. M., Teodoro, L., Rodrigues, G. D., Moreira, L. R., Peres, F. F., Zuardi, A. W., Crippa, J. A., Hallak, J. E. C., & Abílio, V. C. (2021). Is Cannabidiol During Neurodevelopment a Promising Therapy for Schizophrenia and Autism Spectrum Disorders? *Frontiers in Pharmacology*, 11(February).

<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.635763>

Lubs', H. A. (n.d.). *A Marker X Chromosome*.

Lundbye, C. J., Toft, A. K. H., & Banke, T. G. (2018). Inhibition of GluN2A NMDA receptors ameliorates synaptic plasticity deficits in the Fmr1-/- mouse model. *Journal of Physiology*, 596(20), 5017–5031. <https://doi.org/10.1113/JP276304>

M H Verkerk, A. J., Pieretti, Y., Sutcliffe, J. S., Fu, Y.-H., A Kuhl, D. P., Pixxuti, A., Refner, O., Richards, S., Victoria, M. F., Zhang, F., Eussen, B. E., Ommen, van, J Bionden, L. A., Riggins, G. J., Jane Chastain, S. L., Gaijaard, H., Thomas Caskey, C., Nelson, D. L., Oostra, B. A., & Warren, S. T. (1991). Identification of a Gene (HIM?-1) Containing a CGG Repeat Coincident with a Breakpoint Cluster Region Exhibiting Length Variation in Fragile X Syndrome. In *Cell* (Vol. 65).

MacCarrone, M., Rossi, S., Bari, M., De Chiara, V., Rapino, C., Musella, A., Bernardi, G., Bagni, C., & Centonze, D. (2010). Abnormal mGlu 5 receptor/endocannabinoid coupling in mice lacking FMRP and BC1 RNA. *Neuropsychopharmacology*, 35(7), 1500–1509. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.19>

Manduca, A., Buzzelli, V., Rava, A., Feo, A., Carbone, E., Schiavi, S., Peruzzi, B., D'Oria, V., Pezzullo, M., Pasquadibisceglie, A., Polticelli, F., Micale, V., Kuchar, M., & Trezza, V. (2024). Cannabidiol and positive effects on object recognition memory in an in vivo model of Fragile X Syndrome: Obligatory role of hippocampal GPR55 receptors. *Pharmacological Research*, 203. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2024.107176>

Mcentee, W. J., & Crook, T. H. (1993). Glutamate: its role in learning, memory, and the. In *Psychopharmacology* (Vol. 111).

Mechoulam, R., & Parker, L. A. (2013). The endocannabinoid system and the brain. *Annual Review of Psychology*, 64, 21–47. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-113011-143739>

Michalon, A., Sidorov, M., Ballard, T. M., Ozmen, L., Spooren, W., Wettstein, J. G., Jaeschke, G., Bear, M. F., & Lindemann, L. (2012). Chronic Pharmacological mGlu5

Inhibition Corrects Fragile X in Adult Mice. *Neuron*, 74(1), 49–56.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.009>

Mila, M., Alvarez-Mora, M. I., Madrigal, I., & Rodriguez-Revenga, L. (2018). Fragile X syndrome: An overview and update of the FMR1 gene. In *Clinical Genetics* (Vol. 93, Issue 2, pp. 197–205). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/cge.13075>

Miyauchi, S., & Voineagu, I. (2013). Autism susceptibility genes and the transcriptional landscape of the human brain. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 113, pp. 303–318). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418700-9.00010-1>

Mor-Shaked, H., & Eiges, R. (2016). Modeling fragile X syndrome using human pluripotent stem cells. In *Genes* (Vol. 7, Issue 10). MDPI AG.  
<https://doi.org/10.3390/genes7100077>

Ntoulas, G., Brakatselos, C., Nakas, G., Asprogerakas, M. Z., Delis, F., Leontiadis, L. J., Trompoukis, G., Papatheodoropoulos, C., Gkikas, D., Valakos, D., Vatsellas, G., Politis, P. K., Polissidis, A., & Antoniou, K. (2024). Multi-level profiling of the Fmr1 KO rat unveils altered behavioral traits along with aberrant glutamatergic function. *Translational Psychiatry*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-024-02815-0>

Ohno-Shosaku, T., Tanimura, A., Hashimoto-dani, Y., & Kano, M. (2012). Endocannabinoids and retrograde modulation of synaptic transmission. In *Neuroscientist* (Vol. 18, Issue 2, pp. 119–132).  
<https://doi.org/10.1177/1073858410397377>

Olmos-Serrano, J. L., Paluszkiwicz, S. M., Martin, B. S., Kaufmann, W. E., Corbin, J. G., & Huntsman, M. M. (2010). Defective GABAergic neurotransmission and pharmacological rescue of neuronal hyperexcitability in the amygdala in a mouse model of fragile X syndrome. *Journal of Neuroscience*, 30(29), 9929–9938.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1714-10.2010>

Osterweil, E. K., Krueger, D. D., Reinhold, K., & Bear, M. F. (2010). Hypersensitivity to mGluR5 and ERK1/2 leads to excessive protein synthesis in the hippocampus of a mouse model of fragile X syndrome. *Journal of Neuroscience*, 30(46), 15616–15627.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3888-10.2010>

Palumbo, J. M., Thomas, B. F., Budimirovic, D., Siegel, S., Tassone, F., Hagerman, R., Faulk, C., O'Quinn, S., & Sebree, T. (2023). Role of the endocannabinoid system in fragile X syndrome: potential mechanisms for benefit from cannabidiol treatment.

*Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 15(1), 1–10.  
<https://doi.org/10.1186/s11689-023-09475-z>

- Pertwee, R. G. (2008). The diverse CB 1 and CB 2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids:  $\Delta$  9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and  $\Delta$  9-tetrahydrocannabivarin. *British Journal of Pharmacology*, 153(2), 199–215.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707442>
- Pieretti, M., Zhang, F., Fu, Y.-H., Warren, S. T., Oostra, B. A., Caskey, C. T., & Nelson, D. L. (1991). Absence of Expression of the HIM-7 Gene in Fragile X Syndrome. In *Cell* (Vol. 66).
- Pitsikas, N., Boultadakis, A., & Sakellaridis, N. (2008). Effects of sub-anesthetic doses of ketamine on rats' spatial and non-spatial recognition memory. *Neuroscience*, 154(2), 454–460. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.001>
- Pitsikas, N., & Markou, A. (2014). The metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist LY379268 counteracted ketamine- and apomorphine-induced performance deficits in the object recognition task, but not object location task, in rats. *Neuropharmacology*, 85, 27–35.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.05.008>
- Protic, D. D., Aishworiya, R., Salcedo-Arellano, M. J., Tang, S. J., Milisavljevic, J., Mitrovic, F., Hagerman, R. J., & Budimirovic, D. B. (2022). Fragile X Syndrome: From Molecular Aspect to Clinical Treatment. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23041935>
- Purdon Martin, J., & Bell, J. (n.d.). *A PEDIGREE OF MENTAL DEFECT SHOWING SEX-LINKAGE*.
- Qin, M., Kang, J., & Smith, C. B. (2005). A null mutation for Fmr1 in female mice: Effects on regional cerebral metabolic rate for glucose and relationship to behavior. *Neuroscience*, 135(3), 999–1009.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.081>
- Richter, J. D., & Zhao, X. (2021). The molecular biology of FMRP: new insights into fragile X syndrome. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 22, Issue 4, pp. 209–222). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00432-0>
- Russo, E. B., Burnett, A., Hall, B., & Parker, K. K. (2005). Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT<sub>1a</sub> receptors. *Neurochemical Research*, 30(8), 1037–1043.  
<https://doi.org/10.1007/s11064-005-6978-1>

- Schiavi, S., Manduca, A., Carbone, E., Buzzelli, V., Rava, A., Feo, A., Ascone, F., Morena, M., Campolongo, P., Hill, M. N., & Trezza, V. (2023). Anandamide and 2-arachidonoylglycerol differentially modulate autistic-like traits in a genetic model of autism based on FMR1 deletion in rats. *Neuropsychopharmacology*, *48*(6), 897–907. <https://doi.org/10.1038/s41386-022-01454-7>
- Schmitt, L. M., Shaffer, R. C., Hessel, D., & Erickson, C. (2019). Executive function in fragile X syndrome: A systematic review. In *Brain Sciences* (Vol. 9, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/brainsci9010015>
- Schoevers, J., Leweke, J. E., & Leweke, F. M. (2020). Cannabidiol as a treatment option for schizophrenia: Recent evidence and current studies. *Current Opinion in Psychiatry*, *33*(3), 185–191. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000596>
- Shan, Y., Zhao, J., Zheng, Y., Guo, S., Schrodi, S. J., & He, D. (2023). Understanding the function of the GABAergic system and its potential role in rheumatoid arthritis. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1114350>
- Sharma, A., Hoeffler, C. A., Takayasu, Y., Miyawaki, T., McBride, S. M., Klann, E., & Suzanne Zukin, R. (2010). Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome. *Journal of Neuroscience*, *30*(2), 694–702. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3696-09.2010>
- Sidorov, M. S., Auerbach, B. D., & Bear, M. F. (2013). Fragile X mental retardation protein and synaptic plasticity. In *Molecular Brain* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1756-6606-6-15>
- Supplemental Material for Fmr1 and Nlgn3 Knockout Rats: Novel Tools for Investigating Autism Spectrum Disorders. (2014). *Behavioral Neuroscience*. <https://doi.org/10.1037/a0035988.supp>
- Swanson, C. J., Bures, M., Johnson, M. P., Linden, A. M., Monn, J. A., & Schoepp, D. D. (2005). Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 4, Issue 2, pp. 131–144). <https://doi.org/10.1038/nrd1630>
- Sylantsev, S., Jensen, T. P., Ross, R. A., & Rusakov, D. A. (2013). Cannabinoid- and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(13), 5193–5198. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211204110>



- Tian, Y., Yang, C., Shang, S., Cai, Y., Deng, X., Zhang, J., Shao, F., Zhu, D., Liu, Y., Chen, G., Liang, J., Sun, Q., Qiu, Z., & Zhang, C. (2017). Loss of FMRP impaired hippocampal long-term plasticity and spatial learning in rats. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00269>
- Tzimas, P. S., Petrakis, E. A., Halabalaki, M., & Skaltsounis, L. A. (2021). Effective determination of the principal non-psychoactive cannabinoids in fiber-type *Cannabis sativa* L. by UPLC-PDA following a comprehensive design and optimization of extraction methodology. *Analytica Chimica Acta*, *1150*. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338200>
- Van der Aa, N., & Kooy, R. F. (2020). GABAergic abnormalities in the fragile X syndrome. In *European Journal of Paediatric Neurology* (Vol. 24, pp. 100–104). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2019.12.022>
- Ventura, R., Pascucci, T., Catania, M. V, Musumeci, S. A., Puglisi-Allegra, S., & Puglisi-Allegra, S. (2004). Object recognition impairment in *Fmr1* knockout mice is reversed by amphetamine: involvement of dopamine in the medial prefrontal cortex. In *Behavioural Pharmacology* (Vol. 15). Lippincott Williams & Wilkins.
- Verlinsky, Y., Strelchenko, N., Kukhareno, V., Rechitsky, S., Verlinsky, O., Galat, V., & Kuliev, A. (2005). Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reproductive BioMedicine Online*, *10*(1), 105–110. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60810-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60810-3)
- Wang, X., Sela-Donenfeld, D., & Wang, Y. (n.d.). *Axonal and presynaptic FMRP: localization, signal, and functional implications*.
- Wei, D., Dinh, D., Lee, D., Li, D., Anguren, A., Moreno-Sanz, G., Gall, C. M., & Piomelli, D. (2016). Enhancement of Anandamide-Mediated Endocannabinoid Signaling Corrects Autism-Related Social Impairment. *Cannabis and Cannabinoid Research*, *1*(1), 81–89. <https://doi.org/10.1089/can.2015.0008>
- Willemsen, R., & Kooy, R. F. (2023). Mouse models of fragile X-related disorders. In *DMM Disease Models and Mechanisms* (Vol. 16, Issue 2). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/dmm.049485>
- Xu, Z., Chen, R. Q., Gu, Q. H., Yan, J. Z., Wang, S. H., Liu, S. Y., & Lu, W. (2009). Metaplastic regulation of long-term potentiation/long-term depression threshold by activity-dependent changes of NR2A/NR2B ratio. *Journal of Neuroscience*, *29*(27), 8764–8773. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1014-09.2009>

- Yang, X., & Yang, L. (2023). Current understanding of the genomic abnormalities in premature ovarian failure: chance for early diagnosis and management. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 10). Frontiers Media SA.  
<https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1194865>
- Yu, S., Pritchard, M., Kremer, E., Lynch, M., Nancarrow, J., site BAKER, fragile E., Holman, K., Mulley, J. C., Warren, S. T., Schlessinger, D., Sutherland, G. R., Richards, R. I., Nancarrow, J., Baker, E., & Sutherland, G. R. (1942). Region of DNA from the DNA of a fragile X-affected individual and therefore ought to contain the sequences necessary for expression of the relies on polymorphic DNA markers that are. In *Soc. Neurosci. Abstr* (Vol. 51, Issue 9). Wiley.
- Zhang, L., & Alger, B. E. (2010). Enhanced endocannabinoid signaling elevates neuronal excitability in fragile X syndrome. *Journal of Neuroscience*, *30*(16), 5724–5729.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0795-10.2010>
- Zieba, J., Sinclair, D., Sebree, T., Bonn-Miller, M., Gutterman, D., Siegel, S., & Karl, T. (2019). Cannabidiol (CBD) reduces anxiety-related behavior in mice via an FMRP-independent mechanism. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *181*(May), 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2019.05.002>