

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA  
VPLIV EKSTRAKTA KANABIDIOLA NA CELIČNO  
RAST IN PREŽIVETJE

GAJA JENKO

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Vpliv ekstrakta kanabidiola na celično rast in preživetje**

(The impact of cannabidiol extract on cell growth and survival)

Ime in priimek: Gaja Jenko

Študijski program: Biodiverziteta

Mentor: doc. dr. Zala Jenko Pražnikar

Somentor: doc. dr. Ana Petelin

Koper, avgust 2018

## **Ključna dokumentacijska informacija**

Ime in PRIIMEK: Gaja JENKO

Naslov zaključne naloge: Vpliv ekstrakta kanabidiola na celično rast in preživetje

Kraj: Koper

Leto: 2018

Število listov: 29

Število slik: 11

Število referenc: 23

Mentor: doc. dr. Zala Jenko Pražnikar

Somentor: doc. dr. Ana Petelin

Ključne besede: kanabinoidi, endokanabinoidni sistem, kanabidiol, celična rast, celično preživetje

Izvleček: Fitokanabinoidi, ki so značilni za rastlino iz rodu konoplje, so v svoji kemični zgradbi dovolj podobni endogenim kanabinoidom, ki nastajajo znotraj telesa vretenčarjev, da se lahko vežejo in aktivirajo receptorje endokanabinoidnega sistema (EKS). Fitokanabinoidi so zato izkazali velik terapevtski potencial pri zdravljenju in lajšanju simptomov nekaterih boleznih, ki jih znanstveniki povezujejo z delovanjem EKS. Med drugim so raziskave pokazale, da imajo kanabinoidi vpliv na celično rast in preživetje ter da lahko preko mehanizma apoptoze povzročijo celično smrt, kar izkazuje možno terapevtsko pot predvsem pri rakastih celicah, ki imajo lasten mehanizem za naravno smrt okvarjen. V zaključni nalogi smo se osredotočili na kanabidiol (CBD), kanabinoid, ki je poleg tetrahidrokanabinola (THC) najbolj pogosta substanca v konoplji, vendar nima psihoaktivnega učinka, zaradi česar smo ga tudi mi uporabili v zaključni nalogi. V raziskovalnem delu smo želeli preučiti učinke CBD na celično rast in preživetje ter na apoptozo in na aktivnost kaspaze-3. Preverili smo, ali CBD inhibira celično rast ali sproži apoptozo ter ali ima večji učinek na rakaste celice v primerjavi z zdravimi celičnimi linijami. CBD je inhibiral celično rast zdrave (HUVEC) in rakaste (HEP-G2) celične linije ter sprožil apoptozo pri zdravi (Hek293T) celični liniji, na rakasto (MCF-7) celično linijo pa učinka ni imel. Jasni zaključki glede na majhno obsežnost eksperimentalnega dela (samo štiri linije in en kanabinoid) niso mogoči; smiselno bi bilo teste ponoviti na večjem številu celičnih linij v kombinaciji z drugimi kanabinoidi.

### Key words documentation

Name and SURNAME: Gaja JENKO

Title of the final project paper: The impact of cannabidiol extract on cell growth and survival

Place: Koper

Year: 2018

Number of pages: 29

Number of figures: 11

Number of references: 23

Mentor: Assist. Prof. Zala Jenko Pražnikar, PhD

Co-Mentor: Assist. Prof. Ana Petelin, PhD

Keywords: cannabinoids, endocannabinoid system, cannabidiol, cell growth, cell survival

Abstract: Phytocannabinoids which are a characteristic of cannabis plants, are in their chemical structure sufficiently similar to endogenous cannabinoids, which are developed in the body of vertebrates in order to bind and activate endocannabinoid system receptors (ECS). Phytocannabinoids have therefore shown great therapeutic potential in the treatment and alleviation of symptoms of certain diseases, which associate with the functioning of the ECS. Among other issues, recent research has shown that cannabinoids influence cell growth and survival; moreover, they can cause cell death through the mechanism of apoptosis, which demonstrates a possible therapeutic pathway especially for cancer cells that have their own (but defective) mechanism of natural death. In the our work, we have been focused on cannabidiol (CBD), a cannabinoid, which, in addition to tetrahydrocannabinol (THC), is the most common substance in cannabis and has no psychoactive effect, which is also the reason why we used it in our final work. We wanted to study the effects of CBD on cell growth and survival, on apoptosis and on the activity of caspase-3. We have checked whether CBD inhibits cell growth, triggers apoptosis, and whether CBD has a greater effect on cancer cells if compared to healthy cell lines. CBD inhibited cellular growth of the healthy (HUVEC) and cancerous (HEP-G2) cell lines, and triggered apoptosis in a healthy (Hek293T) cell line but did not have any effect on the cancerous (MCF-7) cell line. Given the small extent of the experimental work (only four cell lines and one cannabinoid), clearer conclusions are not possible but it would make sense to repeat the tests on a larger number of cell lines in combination with other cannabinoids.

## ZAHVALA

Iskreno zahvalo izrekam svojim mentoricama, doc. dr. Zali Jenko Pražnikar in doc. dr. Ani Petelin, za vso potrpežljivost, spodbudne misli in predvsem za njuno zelo korektno opravljeno mentorsko delo ter vso strokovno pomoč, hitro odzivnost in vodenje skozi proces priprave zaključne naloge. Sta mentorici v pravem pomenu besede in sem resnično hvaležna, da sem lahko sodelovala z njima.

Velika zahvala gre tudi dr. Maruši Hafner Česen za pomoč pri meritvah kaspazne aktivnosti in meritvah pretočne citometrije, gospe Miri Hedžet Krkač za lektoriranje celotne zaključne naloge ter Lari Vanessi Voler za pomoč pri angleščini.

Posebno zahvalo izrekam moji neomajni podpori in večno optimistični družini. Draga mama, oče in brat, hvala za vso spodbudo, za vse tople in pozitivne besede ter za vso potrpežljivost; skupaj zmoremo vse!

Iskreno se zahvaljujem tudi Mateju za vso podporo, pomoč in predano znanje ter Michaelu za vso potrpežljivost in motivacijo.

Prav tako gre velika zahvala tudi vsem učiteljem, profesorjem in asistentom, ki so bili del učnega procesa od osnovne šole naprej. Hvala za vso predano znanje, vložen čas, trud in da ste pomagali izoblikovati osebo, kakršna sem danes. Vaše besede bodo vedno del mene in moje ljubezni do biologije.

Zahvala gre tudi vsem sošolcem in iskrenim prijateljem, ki so mi bili vedno v spodbudo in pripravljeni priskočiti na pomoč.

## KAZALO VSEBINE

1 UVOD.....	1
1.1 Taksonomska klasifikacija konoplje, njene bioaktivne substance in kultivacija.....	1
1.2 Kratek zgodovinski pregled uporabe konoplje .....	3
1.3 Endokanabinoidni sistem in terapevtski učinki bioaktivnih substanc konoplje .....	5
1.4 Namen dela in raziskovalna vprašanja.....	7
2 METODE DELA IN MATERIALI.....	8
2.1 Celične linije in gojenje celic .....	8
2.2 Tripsinizacija celic.....	8
2.3 Odmrzovanje celic.....	8
2.4 Reagenti.....	8
2.5 Test preživetja celic .....	9
2.6 Sprožitev apoptoze .....	9
2.7 Priprava popolnega celičnega lizata s pufrom RIPA (pufer za lizo celic).....	9
2.8 Merjenje aktivnosti kaspaze-3 .....	10
2.9 Določanje deleža apoptotskih celic z metodo pretočne citometrije .....	10
2.10 Statistična analiza .....	11
3 REZULTATI Z DISKUSIJO.....	12
3.1 Test preživetja celic .....	12
3.1.1 Analiza rasti celic pri različnih koncentracijah CBD po 24 urah .....	12
3.1.2 Analiza rasti celic pri koncentraciji CBD 6 $\mu$ M in 15 $\mu$ M v različnih časovnih intervalih.....	13
3.2 Delež apoptotskih celic in kaspazna aktivnost .....	16
4 ZAKLJUČEK.....	19
5 LITERATURA IN VIRI.....	20

## KAZALO SLIK IN GRAFIKONOV

Slika 1: Test preživetja celic na celični liniji HUVEC z različnimi koncentracijami CBD in časom 24 ur.....	12
Slika 2: Test preživetja celic na celični liniji HEP-G2 z različnimi koncentracijami CBD in časom 24 ur.....	12
Slika 3: Primerjava rezultatov testa preživetja celic celičnih linij HUVEC in HEP-G2 z različnimi koncentracijami CBD in časom 24 ur .....	13
Slika 4: Test preživetja celic na celični liniji HUVEC s koncentracijo CBD 6 $\mu\text{M}$ v različnih časovnih intervalih.....	14
Slika 5: Test preživetja celic na celični liniji HUVEC s koncentracijo CBD 15 $\mu\text{M}$ v različnih časovnih intervalih.....	14
Slika 6: Test preživetja celic na celični liniji HEP-G <sub>2</sub> s koncentracijo CBD 6 $\mu\text{M}$ v različnih časovnih intervalih.....	15
Slika 7: Test preživetja celic na celični liniji HEP-G <sub>2</sub> s koncentracijo CBD 15 $\mu\text{M}$ v različnih časovnih intervalih.....	15
Slika 8: Primerjava števila preživelih celic v različnih časovnih intervalih pri koncentraciji CBD 6 $\mu\text{M}$ in 15 $\mu\text{M}$ na celični liniji HUVEC in celični liniji HEP-G <sub>2</sub> .....	16
Slika 9: Določanje deleža apoptotskih teles z metodo pretočne citometrije na celični liniji Hek297T .....	16
Slika 10: Določanje deleža apoptotskih teles z metodo pretočne citometrije na celični liniji MCF-7 .....	17
Slika 11: Aktivnost kaspaze-3 za celični liniji Hek293T in MCF7 pri koncentraciji .....	18

## SEZNAM KRATIC

2-AG	2-arahidonilglicerol
7-AAD	7-aminoactinomicin D
Ac-DEVD-AFC	substrat za kaspazo-3
AEA	anandamid
angl.	angleško
AMEM	medij za rast celic (angl. Advanced Minimum Essential Medium)
dH <sub>2</sub> O	deionizirana voda
FBS	fetalni goveji serum (angl. Fetal bovine serum)
CB <sub>1</sub>	kanabinoidni receptor podtipa 1, sklopljen s proteinom G
CB <sub>2</sub>	kanabinoidni receptor podtipa 2, sklopljen s proteinom G
CBC	kanabikromen
CBD	kanabidiol
CBE	kanabielsoin
CBG	kanabigerol
CBL	kanabiciklol
CBN	kanabinol
CBND	kanabinodiol
CBT	kanabitriol
CHAPS	obojestranski surfaktant
DDT	dikloro-difenil-trikloroetan
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EKS	endokanabinoidni sistem
GPR55	receptor podtipa 55, sklopljen s proteinom G
Hek293T	endotelijske ledvične celice človeškega embria
HEPES	angl. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HEP-G <sub>2</sub>	epitelijske celice humanega hepatocelularnega karcinoma
HUVEC	humane endotelijske celice vene popkovnice
MCF-7	epitelijske celice humanega adenokarcinoma prsnih žlez
NaCl	natrijev klorid
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NP-40	pufer za lizo celic
PBS	fosfatni pufer
RIPA	pufer za lizo celic
TRPV1	vaniloidni receptor tipa 1
Δ <sup>8</sup> THC	delta-8-trans-tetrahidrokanabinol
Δ <sup>9</sup> THC	delta-9-trans-tetrahidrokanabinol



## 1 UVOD

Med množico farmacevtskih snovi, s katerimi si sodobni človek lajša simptome in zdravi bolezni, se pojavlja vprašanje, kakšen je mehanizem delovanja teh snovi, ali snovi delujejo tarčno na bolezen oziroma obolele predele, in ne navsezadnje kako kombinacija več različnih snovi skupaj delujejo na organizem ter kakšen je dolgoročni učinek uporabe na organizme in okolje. Zavedanje, da nam snovi, ki nam življenje lajšajo in podaljšujejo, lahko na dolgi rok tudi škodujejo, pripelje do tega, da je danes v porastu iskanje naravnih alternativ, ki bi bile enako učinkovite kot sintetične, vendar organizmu in okolju manj škodljive. Že ob hitrem pregledu različne poljudne literature je hitro razvidno, da nam narava ponuja veliko možnosti, vendar se hitro znajdemo v zagati, na kakšen način in v kakšni količini bi bilo smiselno določeno snov uporabiti, ali bomo prišli do zelenega učinka in ne navsezadnje, kje je tista meja med zdravilnim in škodljivim učinkom. Kot taka je v zadnjem času močno aktualna »ponovno odkrita« konoplja, vir številnih bioaktivnih substanc.

### 1.1 Taksonomska klasifikacija konoplje, njene bioaktivne substance in kultura

Konoplja je dvodomna, enoletna rastlina iz rodu *Cannabis*, družine Cannabaceae. Zaradi izjemne morfološke variabilnosti in biokemične diverzitete si znanstveniki še vedno niso enotni glede taksonomske klasifikacije vrst rodu *Cannabis* (Russo 2007). Nekateri znanstveniki zagovarjajo obstoj ene vrste *Cannabis sativa*, medtem ko drugi menijo, da je rod možno klasificirati v dve vrsti *C. sativa* in *C. indica*, nekateri pa zagovarjajo tudi obstoj tretje vrste *C. ruderalis* (Salentijn 2015). Med njimi je tudi Hilling (2005), ki je v svoji raziskavi na podlagi podatkov alocimov 157 vzorcev populacij kanabisa, znanega geografskega razvoja, potrdil obstoj treh genetskih linij *C. sativa*, *C. indica* in *C. ruderalis* in predlagal politipični koncept (obstoj različnih variacij in podvrst) s sedmimi domnevnimi taksoni. Različni avtorji (Russo 2007, Salentijn 2015, Hilling 2005) tako pri taksonomski klasifikaciji poudarjajo pomembnost geografskega porekla, možnosti prostorske izolacije in kemotaksonomije (glede na podvrsto je opazna različna koncentracija bioaktivnih snovi).

Konoplja je zelo kompleksna rastlina v svoji kemični zgradbi. Do leta 2005 je bilo raziskanih 489 sestavin konoplje, od tega več kot 60 kanabinoidov (ElShoy in Slade 2005). Iz medicinskega in ekonomskega vidika so najbolj zanimivi s kanabinoidi bogati (tudi do 80 %) terpenoidni izločki, ki nastajajo v specializiranih laskih t. i. granularnih trihomih, ki so razporejeni skozi celoten cvet ženske rastline. Iz tega vidika moške rastline niso tako

zanimive, saj ne proizvajajo tako velike količine granularnih trihomov kakor ženske (Clarke in Watson 2007).

Danes kanabinoide sicer razvrščamo v tri glavne skupine, to so: endokanabinoidi, ki nastajajo znotraj telesa vretenčarjev kot del regulatornega endokanabinoidnega sistema, sintetični kanabinoidi ter fitokanabinoidi, ki naravno nastajajo v rastlinah rodu *Cannabis* (Russo 2017). V zaključni nalogi se bomo osredotočili predvsem na fitokanabinoide, saj so bili prav njihovi bioaktivni učinki povod za nadaljnje raziskave, ki so pripeljale do odkritja endokanabinoidnega sistema in pričetka proizvodnje sintetičnih kanabinoidov (Brenneisen 2008; Russo 2017).

Izraz fitokanabinoidi predstavlja snovi, ki jih s kemijskega vidika uvrščamo v skupino C<sub>21</sub> terpeno-fenolnih spojin in so unikatne za skupino rastlin iz rodu *Cannabis*. Do danes poznamo okoli 70 fitokanabinoidov, klasificiranih v 10 podskupin (tipov) spojin, ki so naslednje: kanabigerol (CBG) s sedmimi znanimi spojinami, kanabikromen (CBC) s petimi znanimi spojinami, kanabidiol (CBD) s sedmimi znanimi spojinami, delta-9-trans-tetrahidrokanabinol ( $\Delta^9$ -THC) z devetimi znanimi spojinami, delta-8-trans-tetrahidrokanabinol ( $\Delta^8$ -THC) z dvema znanima spojinama, kanabiciklol (CBL) s tremi znanimi spojinami, kanabielsoin (CBE) s petimi znanimi spojinami, kanabinol (CBN) s sedmimi znanimi spojinami, kanabinodiol (CBND) z dvema znanima spojinama, kanabitriol (CBT) z devetimi znanimi spojinami, ter skupina z mešanim tipom kanabinoidov, pri kateri je znanih štirinajst spojin (ElSohy in Slade 2005).

Najbolj poznana in raziskana spojina je  $\Delta^9$ -THC, ki ima psihoaktivne lastnosti.  $\Delta^9$ -THC je skupaj s CBD in CBN najbolj zastopan fitokanabinoid v konoplji, pri čemer CBD in CBN nimata psihoaktivnega učinka. Glede na vsebnost THC je možno razlikovati med industrijsko in medicinsko konopljo, ki sta prav za prav podvrst *C. sativa*. Fenotipi *C. sativa* so bili kategorizirani glede na razmerje koncentracij (THC + CBN)/CBD. Če je razmerje večje kakor 1, je rastlina medicinska konoplja, če je razmerje manjše od 1, rastlina velja za industrijsko konopljo (Lachenmeier in sod. 2003). V Evropski uniji je dovoljeno gojiti industrijsko konopljo, katere vrednosti THC ne smejo presegati 0,2 % (Cannabis legislation in Europe 2018). Na podlagi Pravilnika o pogojih za pridobitev dovoljenja za gojenje konoplje in maka (2011) se v Sloveniji konoplja lahko goji za namen nadaljnjega razmnoževanja, za pridobivanje olja, za pridobivanje substanc za kozmetične namene, prehrano živali, pridelavo vlaken in za industrijske namene. Leta 2014 je sprememba Uredbe o razvrstitvi prepovedanih drog pričela dovoljevati uporabo THC v medicini, leta 2017 pa so bile sprejete dopolnitve, ki dovoljujejo uporabo konoplje (ekstraktov, rastline, smole) v medicinske namene; dovoljena je v zdravilih v skladu z Zakonom o zdravilih in Zakonom o lekarniški dejavnosti (Ureditev regulative medicinske konoplje v Sloveniji 2017).

Konoplja ima velik potencial, ne samo kot vir bioaktivnih snovi, ampak tudi kot surovina za mnogo katere izdelke in hkrati tudi rešitev za nekatere okoljevarstvene težave. Kot bioakumulator vase veže strupene kovine in bi lahko pomagala pri regeneriranju okolja, ki je z njimi zasičeno. Za gojenje načeloma ne potrebujemo pesticidov, ker s svojimi sekundarnimi metaboliti odganja škodljivce, in herbicidov, ker je hitro rastoča rastlina, zaradi česar je tudi odlična surovina za papir, tkanine in vlakna. Zaradi svojih antiseptičnih učinkovin je zelo uporabna v kozmetiki, kjer lahko nadomesti umetno sintetizirane sestavine. Kot vir pomembnih prehranskih snovi je pomembna v prehranski industriji ljudi in živali. Iz konoplje je možno narediti tudi biorazgradljivo plastiko in gorivo, kar bi lahko nadomestilo do sedaj poznane produkte (Salentijn in sod. 2015; Cole in Zurbo 2008).

## 1.2 Kratek zgodovinski pregled uporabe konoplje

Da konoplja ni na novo odkrito potencialno zdravilo za tegobe, s katerimi se spopada novodobno človeštvo, odkriva kratek pregled zgodovine uporabe, ki sega v čas pred našim štetjem. *Cannabis sativa* velja za eno izmed kultiviranih rastlin. Prvi dokazi o vzgoji konoplje v namen pridobivanja vlaken so bili najdeni na Kitajskem iz časa dinastije Han 104–87 let pred našim štetjem. Takratno ljudstvo je uporabljalo konopljinna semena tudi v prehranske namene. Da pa so konopljo uporabljali tudi v medicinske namene, priča najstarejša farmakopeja na svetu pen-ts'ao ching, ki sicer temelji na ustnem izročilu iz časa carja Shen-Nunga, iz obdobja 2.700 let pred našim štetjem. Omenjena farmakopeja navaja tudi, da ima konoplja psihoaktivne učinke (Zuardi 2006).

Zuardi (2006) navaja, da je bil razlog za širitev uporabe konoplje v centralno in zahodno Azijo ter Indijo verjetno posledica omejitve šamanstva na Kitajskem. V Indiji je bila uporaba konoplje razširjena tako v medicinske namene kot v obredne, kar je bilo verjetno posledica močne povezave med takratno medicino in religijo. Psihoaktivne lastnosti konoplje so bile v Indiji dobro poznane, prav tako so se razvili trije tipi priprave konoplje: bhang z najšibkejšim učinkom, ki vsebuje suho listje brez cvetov; ganja, ki vsebuje ženske cvetove, ter charas z najmočnejšim učinkom, ki vsebuje le smolo, ki pokriva ženske cvetove. Z medicinskega vidika je bila konoplja uporabljena kot analgetik, anestetik, kot protivnetna učinkovina, antibiotik, učinkovina proti parazitom, proti prebavnim težavam, kot stimulans apetita, diuretik, antiafrodiziak ali afrodiziak, ter kot pomoč pri respiratornih boleznih, kot so bronhitis in astma (Zuardi 2006).

Arheološki in zgodovinski dokazi nakazujejo, da so v Evropo konopljo prinesli Skiti (iranska nomadska ljudstva). Herodot je 450 let pred našim štetjem opisoval skitsko pogrebno ceremonijo in omenil, da so v ritualu vdihavali pare gorečih konopljinih semen,

kar je bilo kasneje potrjeno s strani arheologov pri raziskovanju Skitskih grobnic v Sibiriji in Nemčiji (Zuardi 2006).

Stari Egipt danes velja za eno prvih naprednejših civilizacij, ki je imela napredni zdravstveni sistem. Znanstveniki so iz tekstov, napisanih na stenah piramid iz časa 2.350 pred našim štetjem, odkrili opise rastlin, iz katerih so izdelovali vrvi, kar je ekvivalentno konoplji. Omembo konoplje so našli tudi na papirusu, kjer opis zdravilca nakazuje, kako pozdraviti bolečine v prstu zaradi vnetja. Protivnetne učinkovine konoplje so kasneje opisovali tudi v arabski kulturi; podobne opise lahko najdemo tudi v Galenovih poročilih (Russo 2007).

Od začetka našega štetja pa do 18. stoletja je bila uporaba konoplje zelo pogosta v Indiji in arabskem svetu. V Evropi je bila v tem času konoplja gojena izključno za pridelavo vlaken. Uporaba konoplje v medicinske namene se je v Evropi razširila šele v 19. stoletju. Ključna sta bila predvsem Williama B. O'Shaughnessya, irski zdravnik, ki je v Indiji preučeval učinke konoplje, ter Jacquesa-Josepha Moreaua, francoskega psihiatra, ki je opazoval predvsem učinke hašiša (smola). Oba sta imela velik vpliv na zahodno medicino, uporaba konoplje v medicinske namene pa se je iz Anglije in Francije razširila tudi drugod po Evropi in kasneje v Severno Ameriko. Leta 1860 je bila v Ameriki organizirana prva klinična konferenca o konoplji, organiziral jo je Ohio State Medical Society (Zuardi 2006).

V prvih desetletjih 20. stoletja je uporaba konoplje v medicinske namene upadla. Ker so v tistem času uporabljali le ekstrakte in tinkture, pripravljene iz rastline, in ker izolacije posameznih substanc iz rastline še niso poznali, so se pokazale težave zaradi velike variabilnosti kemične sestave rastline, pri čemer je bilo težko zagotoviti vedno enake pogoje in ponovljive medicinske učinke pripravka iz rastline. Posledično so se začele uvajati omejitve pri uporabi konoplje v medicinske namene in pri samem eksperimentiranju z njo. Tako je bila konoplja leta 1941 popolnoma umaknjena iz ameriške farmakopeje. V drugi polovici 20. stoletja je sicer konoplja dosegla veliko povpraševanje v družbi, predvsem z namenom uporabe konoplje v hedonistične namene. Z napredkom tehnologije pa sta leta 1964 Gaoni in Mechoulam definirala kemično strukturo molekule  $\Delta^9$ -THC, kar je vodilo v nadaljnje raziskave o bioaktivnih sestavinah konoplje (Zuardi 2006).

Danes ponovno beležimo veliko zanimanje za uporabo konoplje in njenih bioaktivnih substanc tudi v znanstvenih krogih, medicinski učinki so ponovno predmet velikega števila raziskav. Razvoj tehnologije nam omogoča podrobnejše analize posameznih komponent konoplje ter ekstrakcijo le-teh. Posledično imamo boljši vpogled v delovanje bioaktivnih substanc na organizem in v dovoljene količine vnosa posameznih bioaktivnih substanc.

Raziskave o delovanju psihoaktivnih substanc konoplje na živčni sistem so vodile tudi do odkritja endokanabinoidnega sistema (Zuardi 2006).

### **1.3 Endokanabinoidni sistem in terapevtski učinki bioaktivnih substanc konoplje**

Rastline so za človeka pomemben vir zdravilnih substanc že stoletja in konoplja ni izjema. Vendar je delovanje kanabinoidov na organizem bolje razumljeno šele zadnjih 25 let. Začelo se je z odkritjem endokanabinoidnega sistema (Russo 2016).

Endokanabinoidni sistem (EKS) je notranji homeostatsko regulatorni sistem, ki se pojavlja pri vseh vretenčarjih. Zaradi svojega fiziološko regulatornega delovanja v telesu je EKS postal tarča pri razvoju zdravil in terapij (Olaizola in sod. 2017). EKS vključuje dva glavna kanabinoidna receptorja, sklopljena s proteinom G, in sicer CB<sub>1</sub> in CB<sub>2</sub>. Novejše raziskave so pokazale, da sta vaniloidni receptor tipa 1 (TRPV1) in receptor 55 sklopljena z G proteinom (GPR<sub>55</sub>) tudi verjetna receptorja, ki sta prav tako neposredno povezana z EKS (Olaizola in sod. 2017), z endokanabinoidi, ki nastajajo znotraj telesa, ter z encimi, ki so ključni za sintezo in razgradnjo endokanabinoidov (Russo 2016).

Endogeni kanabinoidi so endogeni lipidi, ki se vežejo na endokanabinoidne receptorje in nastajajo znotraj telesa po potrebi. Prva odkrita in najbolj opisana endokanabinoida sta anandamid (AEA) in 2-arahidonilglicerol (2-AG) (Hui-Chen in Mackie 2016, Russo 2017). Fitokanabinoidi konoplje so v kemični strukturi zelo podobni endokanabinoidom in se zato lahko spajajo z endokanabinoidnimi receptorji (Olaizola in sod. 2017). Praviloma se endokanabinoidi sintetizirajo po potrebi in naj se ne bi shranjevali v zalogah. To hipotezo so nedavno ovrgli, saj se anandamid kopiči v nekaterih celicah (Ferjan in sod. 2015). Sinteza endokanabinoidov poteka po več poteh, prav tako njihova razgradnja (Ferjan in sod. 2015).

CB<sub>1</sub> ali neuromodulatorni kanabinoidni receptor je bil odkrit leta 1988 kot rezultat raziskav na THC, ki je primarna psihoaktivna substanca konoplje, in ima dokazano največji vpliv na centralni živčni sistem, kjer je CB<sub>1</sub> tudi v največji meri izražen; aktivacija tega receptorja povzroči psihoaktivne učinke (Russo 2016). CB<sub>1</sub> receptor lahko najdemo tudi v drugih tkivih (jetrih, pljučih, žilah, vranici, živčnih končičih, nadledvični žlezi, srcu, prostati, kostnem mozgu, priželjcu) (Ferjan in sod. 2015). CB<sub>2</sub> receptor je prisoten predvsem v periferiji in ima imunoregulatorno vlogo. Je receptor, ki ima pomembno vlogo pri regulaciji bolečine, vnetij in pri fiziološki obrambi, vendar njegova aktivacija v primerjavi s CB<sub>1</sub> ne povzroča občutka omame, nanj se vežejo snovi, ki imajo zgradbo, podobno molekuli CBD (Russo 2017). Zlasti veliko receptorjev tipa CB<sub>2</sub> je izraženih na limfocitih

B, odkrili so jih tudi v velikih možganih in možganskem deblu (Ferjan in sod. 2015). TRPV1 receptorji so vpleteni v uravnavanje telesne temperature in prenosa bolečine, receptorji GPR<sub>55</sub> pa se izražajo predvsem v možganih, jetrih, vranici, žilnem sistemu, črevesju, tkivih ploda in posteljici.

Delovanje EKS lahko razdelimo na delovanje na centralni in periferni živčni sistem in vključuje zelo raznolike procese, kot so plastičnost možganov, učenje in spomin, celično smrt, razvoj nevronov, regulira občutek bolečine, vnetne procese, regulacijo apetita in prebave, uravnavanje energije, spalni cikel, termogenezo, gibljivost, vpliva na regulacijo stresa in občutkov ter zasvojenosti (Olaizola in sod. 2017). Vendar EKS ni ključen le za komunikacijo med perifernim in centralnim živčnim sistemom, ampak je pomemben tudi kot regulacijski sistem za različne organe in sisteme, vključujoč vaskularni sistem, muskularni in skeletni sistem, prebavni trakt in imunski sistem (Russo 2017). Na njegovo končno delovanje (endokanabinoidni tonus) v veliki meri vpliva življenjski slog, kar vključuje tudi prehrano in aerobno aktivnost. Endokanabinoidni tonus je izraz, ki označuje predvsem gostoto endokanabinoidnih receptorjev in njihov funkcionalni status, kar pomeni, da se aktivnost EKS spreminja glede na potrebe organizma (Russo 2016).

Zadnje raziskave se osredotočajo predvsem na povezavo med EKS in različnimi boleznimi (Olaizola in sod. 2017). Russo 2017 trdi, da je s pomanjkanjem kanabinoidov v EKS oziroma z znižanim endokanabinoidnim tonusom povezanih veliko bolezni in simptomov, predvsem tistih, pri katerih pacienti občutijo prekomerno bolečino, vendar patoloških sprememb tkiva ne zaznamo, to so na primer artritis, sindrom razdraženega črevesa ter migrene (Russo 2017). Zanimivo je, da THC kljub temu, da povečuje lakoto preko neposrednega delovanja v možganih, preprečuje povišanje telesne mase, ker uravnava rast zdravih bakterij v črevesju (Russo 2017).

Prekomerno porabo konopljinih pripravkov in predvsem nekontroliran vnos kanabinoidov lahko spremljajo stranski učinki, ki so: akutna toksičnost, ki lahko sproži apnejo in/ali srčni zastoj in kronična toksičnost, ki se kaže pri rednih uživalcih konoplje kot zasvojenost in toleranca z odtegnitvenimi simptomi, povečano tveganje za akutni miokardni infarkt ter deficit pri verbalnem učenju, spominu ter pozornosti pri rednih uživalcih (Ferjan in sod. 2015).

V zaključni nalogi smo se odločili izpostaviti EKS kot možni sistem, ki regulira celično smrt preko mehanizma apoptoze, kar ima možen potencial pri zdravljenju rakavih obolenj. Rak je skupina bolezni, pri katerih je značilna nenadzorovana rast celic, ki se pojavi kot posledica ignoriranja signalov telesa, ki sprožijo celično smrt (National Cancer Institute), torej je ravnovesje med celično rastjo in smrtjo porušeno (Wong 2011). Kanabinoidi imajo že dokazano protitumorsko delovanje v *in-vitro* razmerah, ker lahko povzročijo smrt

celice, inhibirajo rast tumorskih celic in preprečujejo invazivnost in metastaziranje (Ferjan in sod. 2015).

Terapevtski potencial, ki ga imajo kanabinoidi pri zdravljenju raka, je še vedno predmet različnih razprav, vendar je pomembno poiskati učinkovite metode za izboljšanje terapij, ki bi izboljšale kvaliteto življenja in zmanjšale stranske učinke terapij pri pacientih z rakom (Guindon in Hohman 2011). Kliničnih študij, ki bi proučevale neposredni antitumorski učinek kanabinoidov, še nimamo, obstajajo pa študije, ki preučujejo blagodejni vpliv kanabinoidov na simptome, kot so slabost, bolečina in apetit pri bolnikih z rakom (Ferjan in sod. 2015).

Guindon in Hohman (2011) v svojem članku navajata, da je mehanizmov, preko katerih kanabinoidi lahko vplivajo na celično rast, migracijo in apoptozo pri rakastih celicah več, njihovo razumevanje pa ostaja še ne popolnoma pojasnjeno. Mehanizmi so lahko različni pri različnih tipih raka in vključujejo pro-apoptotske, kot tudi anti-apoptotske učinke kanabinoidov. Shrivastava in sodelavci (2011) navajajo, da kanabinoidi lahko zavirajo celični cikel in kemotakso ter inhibirajo angiogenezo. Slednji so se osredotočili na učinek CBD-ja na celično preživetje, saj kljub temu, da je THC boljše karakterizirana spojina, njeno psihoaktivno delovanje omejuje uporabo pri terapijah pacientov, obolenih z rakom. Ker molekula CBD psihoaktivnih lastnosti nima, je postala predmet številnih raziskav, kljub temu, da njeno delovanje še ni popolnoma razjasnjeno. Predvsem zaradi odsotnosti psihoaktivnih lastnosti spojine CBD smo se nanj osredotočili tudi mi v zaključni nalogi.

## **1.4 Namen dela in raziskovalna vprašanja**

Namen raziskovalnega dela je bil raziskati delovanje spojine CBD na posameznih celičnih linijah, pri čemer smo želeli preveriti naslednje zastavljene hipoteze:

- hipoteza 1: CBD inhibira celično rast celičnih linij HUVEC in HEP-G<sub>2</sub>
- hipoteza 2: CBD sproži apoptozo pri celičnih linijah Hek293T in MCF-7
- hipoteza 3: CBD ima večji učinek na rakaste celice celičnih linij MCF-7 in HEP-G<sub>2</sub> v primerjavi z učinkom na zdrave celične linije HUVEC in Hek293T

## **2 METODE DELA IN MATERIALI**

### **2.1 Celične linije in gojenje celic**

Za raziskavo smo uporabili naslednje celične linije adherentnega tipa: epitelijske celice humanega hepatocelularnega karcinoma (Hep-G<sub>2</sub>), epitelijske celice humanega adenokarcinoma prsnih žlez (MCF7), humane endotelijske celice vene popkovnice (HUVEC), endotelijske ledvične celice človeškega embria (Hek293T).

Celične linije smo gojili v za to namenjenih 25-ml plastičnih posodih v kontrolirani atmosferi (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, z nasičeno vodno paro). Za gojenje celic smo uporabili medij AMEM, katerega smo obogatili s 5 % fetalnim govejim serumom FBS (fetalni goveji serum) glutaminom v obliki preparata GlutaMAX ter s 300 µm antibiotika.

### **2.2 Tripsinizacija celic**

Ker so vse uporabljene celične linije adherentnega tipa, smo jih morali za nadaljnjo uporabo tripsinizirati. Vse snovi, ki smo jih uporabili v procesu precepitve celic, smo predhodno segreti v vodni kopeli na temperaturo 37 °C. Celicam smo odstranili medij in jih sprali s 3 ml PBS (fosfatni pufer), ki smo ga nato odstranili. Nato smo celicam dodali 1 ml encima tripsina in jih inkubirali v inkubatorju, dokler se celice niso odlepile od podlage. Zatem smo celicam dodali nekaj mililitrov medija, da smo inaktivirali tripsin. Raztopino smo preložili v centrifugirko in za 5 minut centrifugirali v centrifugi pri 1750 rpm. Dobili smo 2 fazi, celice so se usedle na dno centrifugirke, medij pa smo odstranili. Celice smo nato resuspendirali v čistem mediju in raztopino prenesli v nove posodice s svežim medijem ter celice postavili nazaj v inkubator.

### **2.3 Odmrzovanje celic**

Celice so bile predhodno zamrznjene v kriovialah pri –80 °C. Odtajali smo jih v vodni kopeli pri 37 °C in jih nato prenesli v posodico za gojenje z medijem.

### **2.4 Reagenti**

Pri raziskavi smo uporabili ekstrakt kanabidiola (CBD), raztopljenega v 5-% metanolu pri koncentraciji 1 mg/ml (Sigma – Aldrich).



## 2.5 Test preživetja celic

Celični liniji HUVEC in HEP-G<sub>2</sub> smo nacepili na mikrotitrne ploščice s 96 luknjicami in jih inkubirali 2 dni. Test preživetja celic je potekal v dveh delih. Pri obeh delih smo celicam najprej odstranili medij in jim dodali predhodno pripravljeno raztopino medija in raztopine CBD-ja v različnih koncentracijah.

V prvem delu smo celice tretirali z različnimi koncentracijami CBD-ja (3  $\mu\text{M}$ , 6  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$  in 30  $\mu\text{M}$ ) 24 ur. V drugem delu pa smo celice tretirali z raztopinama s koncentracijo CBD-ja 15  $\mu\text{M}$  in 6  $\mu\text{M}$  v različnih časovnih obdobjih – 3, 6, 10, 39 in 48 ur. Za oba dela preizkusa preživetja celic smo naredili tudi kontrolo, in sicer s samim medijem in s 5-% metanolom, saj smo želeli preveriti, kakšen učinek ima dodatek 5-% metanol na preživetje celic.

Po inkubaciji celic smo raztopino odstranili in celicam dodali 10  $\mu\text{l}$  barvila AlamarBlue. AlamarBlue je fluorescenčno barvilo, ki vsebuje resazurin. Žive celice resazurin metabolizirajo in pretvorijo v resorufin, kar lahko spremljamo kot rdečo fluorescenco; kar pomeni, da je količina fluorescence, proporcionalna s številom živih celic (ThermoFisher scientific). To smo inkubirali 1 uro in 30 minut, nato pa celice prešteli.

## 2.6 Sprožitev apoptoze

Ali se apoptoza, pri implikaciji CBD sproži smo preverili na celičnih linijah MCF7 in Hek293T, tako da smo jih tretirali s 15  $\mu\text{M}$  in 40  $\mu\text{M}$  CBD v časovnih obdobjih 7 in 16 ur.

## 2.7 Priprava popolnega celičnega lizata s pufrom RIPA (pufer za lizo celic)

Medij in tripsinizirane celice smo prenesli v centrifugirko in centrifugirali 5 minut pri 3000 rpm. Medij smo odstranili, celice dvakrat sprali s hladnim pufrom PBS. Celice smo nato resuspendirali v 50  $\mu\text{l}$  pufra RIPA (50 mM TRIS, 100 mM NaCl (natrijev klorid), 0,1-% odstopni (w/v) NaDS, 1-% odstopni (v/v) NP-40, 0,5-% odstopna (w/v) deoksiholna kislina, 1 mM EDTA (etilendiamintetraocetna kislina) ter zmes inkubirali na ledu 10 minut. Potem smo celice centrifugirali 10 minut pri 14000 rpm in 4 °C, nato pa supernatant prenesli v svežo epruveto ter shranili pri –70 °C oziroma takoj uporabili. Tako pripravljene vzorce smo uporabili za merjenje aktivnosti encima kaspaze-3.

## 2.8 Merjenje aktivnosti kaspaze-3

Kaspaze so cisteinske proteaze, ki igrajo pomembno vlogo pri uravnavanju apoptoze. Kaspaza-3 je glavna efektorska kaspaza in aktivira fazo kaspazne kaskade, v kateri je potek celične smrti nepovraten (Pižem in Cör 2001), torej prisotnost kaspaze-3 potrjuje proces apoptoze v celicah.

Črno mikrotitrno ploščo s 96-timi luknjicami (Greiner) smo v vsako luknjico nanegli ustrezen volumen vzorca, tako da je bil končni delež proteinov v vseh luknjicah enak. Preostanek smo dopolnili z dH<sub>2</sub>O (deionizirana voda) tako, da je bil končni volumen v vseh luknjicah 40 µl. Nato smo v vsako luknjico dodali 50 µl 2-kratnega kaspaznega pufra (100 mM HEPES (angl. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 200 mM NaCl, 0,2-odstotni (w/v) CHAPS (obojestranski surfaktant), 20-odstotna (w/v) saharoza, 2 mM EDTA, 20 mM DDT (dikloro-difenil-trikloroetan), pH = 7,4) ter vzorce inkubirali pri 37 °C 10 minut. Po končani inkubaciji smo dodali 10 µl substrata Ac-DEVD-AFC (substrat za kaspazo-3) (Bachem), tako, da je bila njegova končna koncentracija v luknjicah 100 µM. Fluorescenco smo merili pri valovni dolžini vzbujanja 400 nm ter valovni dolžini emisije 505 nm. Rezultati so podani kot sprememba fluorescence v časovni enoti (naklon).

## 2.9 Določanje deleža apoptotskih celic z metodo pretočne citometrije

Delež zgodnje in pozno apoptotskih celic lahko zaznamo z uporabo barvil Annexin-V-PE in 7-AAD. Annexin-V, na katerega je vezan pikoeritin (Annexin-V-PE). To nam omogoča določitev deleža zgodnje apoptotskih celic, veže se na fosfatidilserin, ki se na zunanjo membrano izpostavi med apoptozo. Kasneje med apoptozo prihaja tudi do kondenzacije in fragmentacije DNK, tako da nam uporaba 7-AAD, ki se veže na DNK, omogoča določitev deleža pozno apoptotskih oziroma nekroznih celic.

Celice smo tripsinizirali in centrifugirali pri 1300 rpm 5 minut. Medij smo odstranili in celice resuspendirali v 1 ml pufra PBS, jih prešteli ter ponovno centrifugirali pri 1300 rpm 5 minut. Celice smo nato ponovno sprali s 5 ml pufra PBS ter jih resuspendirali v pufri za vezavo konjugiranega Annexina V-PE (Beckton Dickinson). V epruveto, namenjeno pretočni citometriji, smo prenesli toliko celic, da je bilo končno število 10<sup>5</sup> celic/ml, dodali smo 5 µl konjugiranega annexina V-PE (Beckton Dickinson) in 5 µl 7-AAD (Beckton Dickinson) ter inkubirali 15 minut v temi pri sobni temperaturi. Po 15 minutah smo vzorcu dodali še 400 µl pufra za vezavo konjugiranega Annexina V-PE ter pomerili fluorescenco označenega vzorca z napravo za pretočno citometrijo FACScalibur cytometer (Beckton Dickinson) in ustreznim programom (CellQuest software).

## **2.10 Statistična analiza**

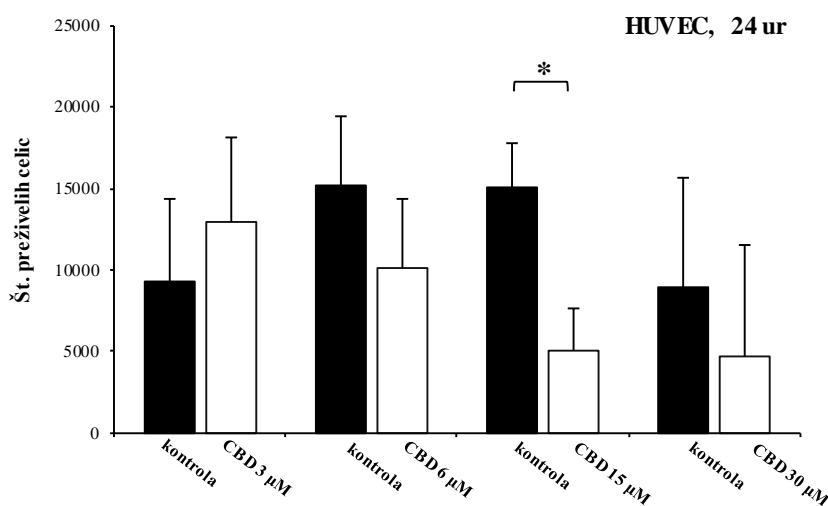
Za statistično analizo testa preživetja celic smo uporabili standardni t-test za neodvisne vzorce v programu Excel. Standardni t-test smo uporabili, ker smo imeli normalno porazdeljene spremenljivke.

### 3 REZULTATI Z DISKUSIJO

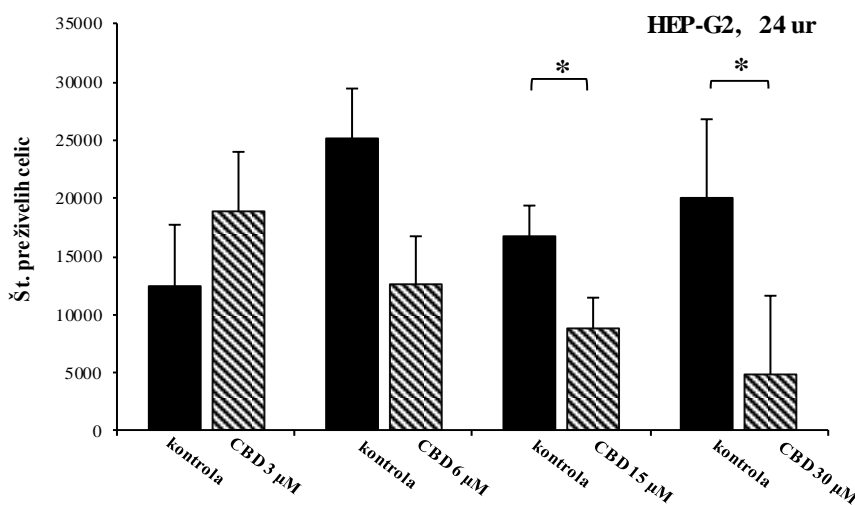
#### 3.1 Test preživetja celic

##### 3.1.1 Analiza rasti celic pri različnih koncentracijah CBD po 24 urah

V začetku raziskovalno-eksperimentalnega dela nas je zanimalo, pri kateri koncentraciji CBD in po kolikšnem času tretiranja celic s CBD opazimo učinek bioaktivne snovi na rast celic. Na podlagi preučene literature (Shrivastava in sod. 2011) smo se odločili za koncentracije CBD pri 3  $\mu$ M, 6  $\mu$ M, 15  $\mu$ M in 30  $\mu$ M in času tretiranja 24 ur. Uporabili smo celični liniji HUVEC in HEP-G<sub>2</sub>, zanje pa smo se odločili, ker smo želeli primerjati odziv zdravih in rakastih celic na ekstrakt CBD ter preveriti hipotezo 1 in 2.

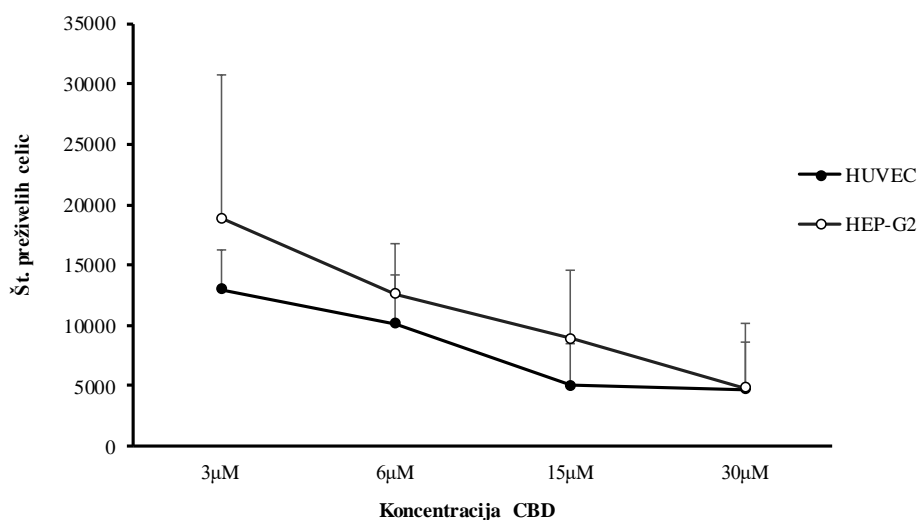


Slika 1: Test preživetja celic na celični liniji HUVEC z različnimi koncentracijami CBD in časom 24 ur



Slika 2: Test preživetja celic na celični liniji HEP-G<sub>2</sub> z različnimi koncentracijami CBD in časom 24 ur

Rezultati so pokazali statistično značilne razlike ( $*p < 0,05$ ) med kontrolnimi celicami, inkubiranimi le v prisotnosti 5 % metanola ter celicami tretiranimi s CBD v prisotnosti 5 % metanola pri koncentraciji CBD 15  $\mu\text{M}$  za celično linijo HUVEC (Slika 1), ter pri 15  $\mu\text{M}$  in 30  $\mu\text{M}$  za celično linijo HEP-G<sub>2</sub> (Slika 2). 30  $\mu\text{M}$  koncentracija CBD-ja se pri HUVEC celicah ni izkazala za citotoksično predvsem zaradi nizkega števila celic kontrolnega vzorca. S prvim delom eksperimentalnega dela smo potrdili hipotezo, da je CBD citotoksičen, saj lahko iz grafov razberemo, da s povečevanjem koncentracije CBD upada rast in število preživelih celic obeh celičnih linij (Slika 3).

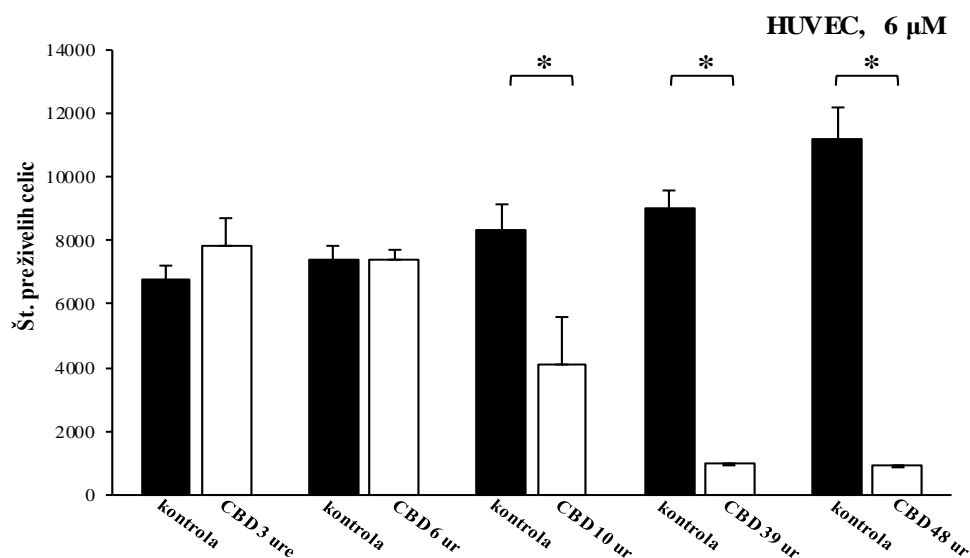


**Slika 3:** Primerjava rezultatov testa preživetja celic celičnih linij HUVEC in HEP-G<sub>2</sub> z različnimi koncentracijami CBD in časom 24 ur

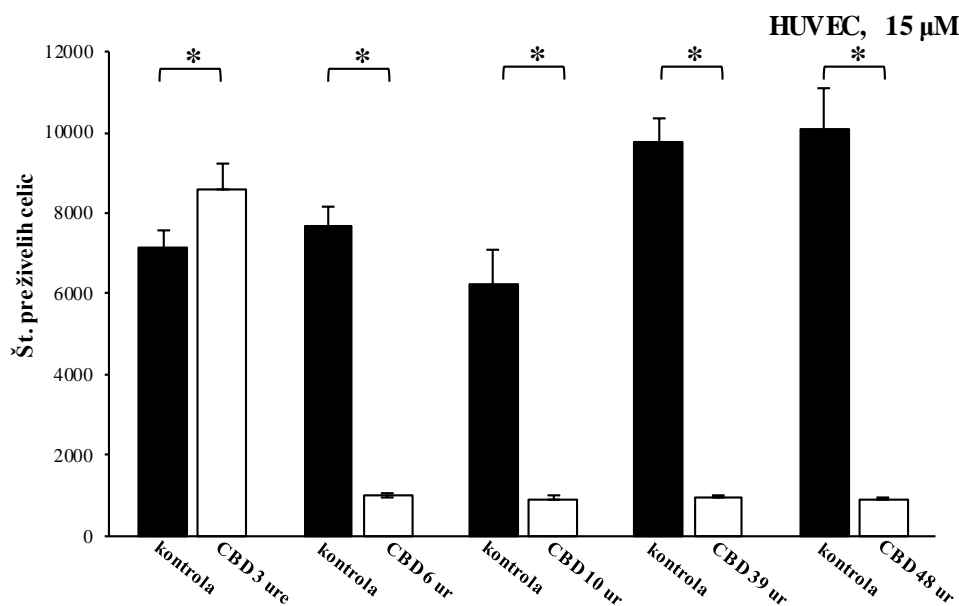
### 3.1.2 Analiza rasti celic pri koncentraciji CBD 6 $\mu\text{M}$ in 15 $\mu\text{M}$ v različnih časovnih intervalih

V drugem delu testa preživetja celic smo se odločili še preveriti učinek ekstrakta CBD v različnih časovnih intervalih (3, 6, 10, 39 in 48 ur) pri 6  $\mu\text{M}$  in 15  $\mu\text{M}$  koncentraciji CBD. Za izbrano koncentracijo 15  $\mu\text{M}$  smo se odločili na podlagi rezultatov prvega dela preizkusa, kjer so se že začele kazati statistično značilne razlike. Za koncentracijo 6  $\mu\text{M}$  pa smo se odločili na podlagi raziskave, v kateri Russo (2017) navaja, da je koncentracija snovi, ki jih uporabljamo v terapevtske namene, zelo pomembna in bi morala biti najnižja možna, pri kateri še lahko dosežemo želen terapevtski učinek in s tem ne povzročimo odvisnosti in pojava tolerance. Toleranca se lahko razvije pri ponavljajoči se uporabi kanabinoidov zaradi zmanjšanja števila kanabinoidnih receptorjev, prav tako želimo preprečiti stranske učinke, ki nastanejo v povezavi z uporabo kanabinoidov (akutna in kronična toksičnost) (Ferjan in sod. 2015). Zato smo se odločili preveriti, kakšen vpliv ima

na celične linije povečevanje časa inkubacije s CBD pri koncentraciji 6  $\mu\text{M}$  koncentraciji, kljub temu da v 24 urah ni bilo zaznati statistično značilnih razlik v prvem delu.

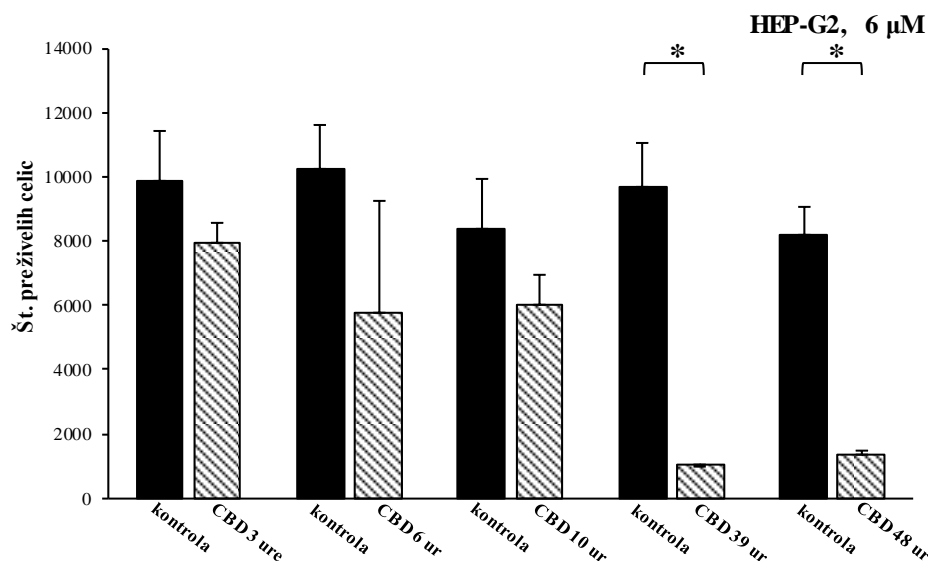


**Slika 4:** Test preživetja celic na celični liniji HUVEC s koncentracijo CBD 6  $\mu\text{M}$  v različnih časovnih intervalih

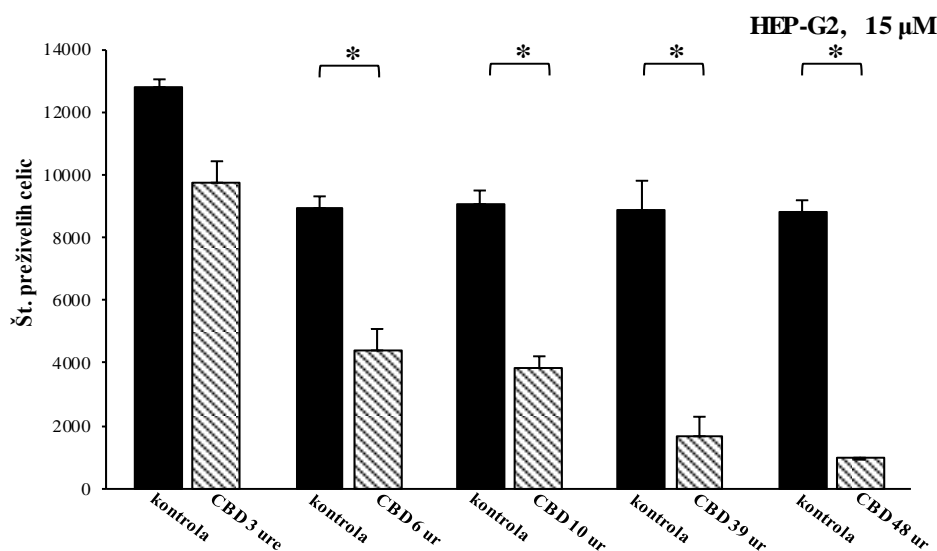


**Slika 5:** Test preživetja celic na celični liniji HUVEC s koncentracijo CBD 15  $\mu\text{M}$  v različnih časovnih intervalih

S povečevanjem časa inkubacije se pri celični liniji HUVEC zmanjšuje število preživelih celic, tako pri koncentraciji CBD 6  $\mu\text{M}$  (Slika 4) kot pri koncentraciji 15  $\mu\text{M}$  (Slika 5). Statistično značilne razlike ( $*p < 0,05$ ) se začnejo kazati po 10 urah inkubacije s 6  $\mu\text{M}$  CBD in po 3 urah inkubacije s 15  $\mu\text{M}$  CBD.



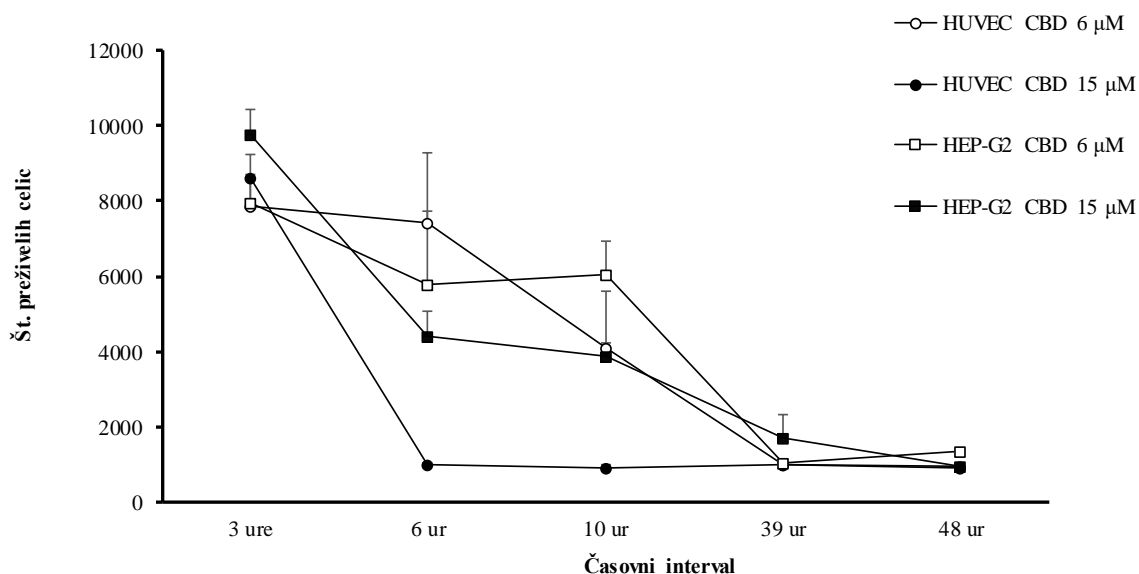
**Slika 6:** Test preživetja celic na celični liniji HEP-G<sub>2</sub> s koncentracijo CBD 6 µM v različnih časovnih intervalih



**Slika 7:** Test preživetja celic na celični liniji HEP-G<sub>2</sub> s koncentracijo CBD 15 µM v različnih časovnih intervalih

S povečevanjem časa inkubacije se pri celični liniji HEP-G<sub>2</sub> zmanjšuje število preživelih celic, tako pri 6 µM CBD (Slika 6) kot pri 15 µM CBD (Slika 7). Statistično značilne razlike (\*p<0,05) se začnejo kazati po 39 urah inkubacije s 6 µM CBD in po 6 urah inkubacije s 15 µM CBD.

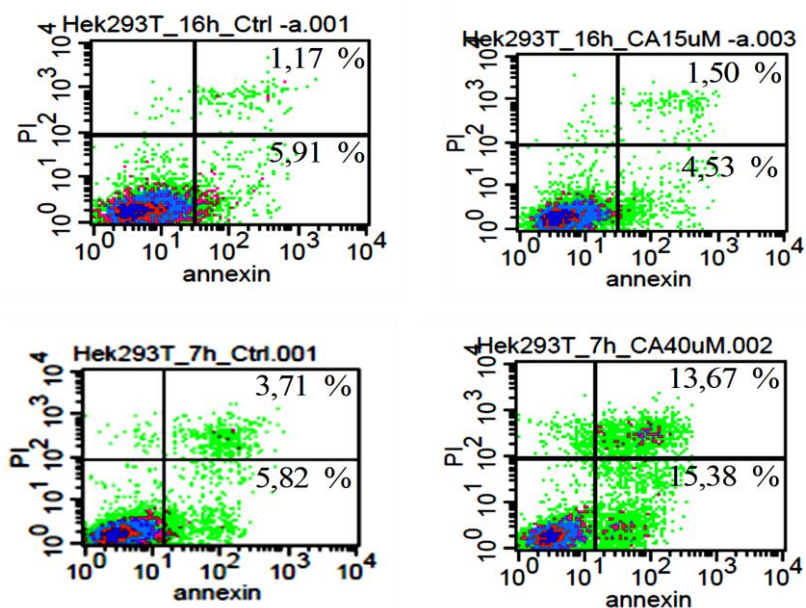
Iz rezultatov testa preživetja celic lahko potrdimo prvo hipotezo, da ima CBD citotoksičen učinek. Ne moremo pa potrditi hipoteze, da tarčno vpliva le na rakave celice, saj je iz naših rezultatov razvidno, da ima zaviralen učinek na obe preiskovani celični liniji, tako na HEP-G<sub>2</sub> kot na HUVEC (Slika 8).



**Slika 8:** Primerjava števila preživelih celic v različnih časovnih intervalih pri koncentraciji CBD 6 μM in 15 μM na celični liniji HUVEC in celični liniji HEP-G2

### 3.2 Delež apoptotskih celic in kaspazna aktivnost

Na podlagi literature (Shrivastava in sod. 2011; Guzman in sod. 2002; Guindon in Hohmann 2011) in postavke, da je delovanje kanabinoidov, natančno CBD (Shrivastava in sod. 2011) in posledično delovanje EKS, povezano s sprožitvijo apoptoze pri rakastih celicah, smo se odločili trditev preveriti na celični liniji MCF-7, ki je v raziskavi Shrivastave in sodelavcev 2011 pokazala, da se s povežanjem koncentracije CBD, povežuje tudi delež apoptoznih celic. Za primerjavo smo vzeli še zdravo celično linijo Hek293T.

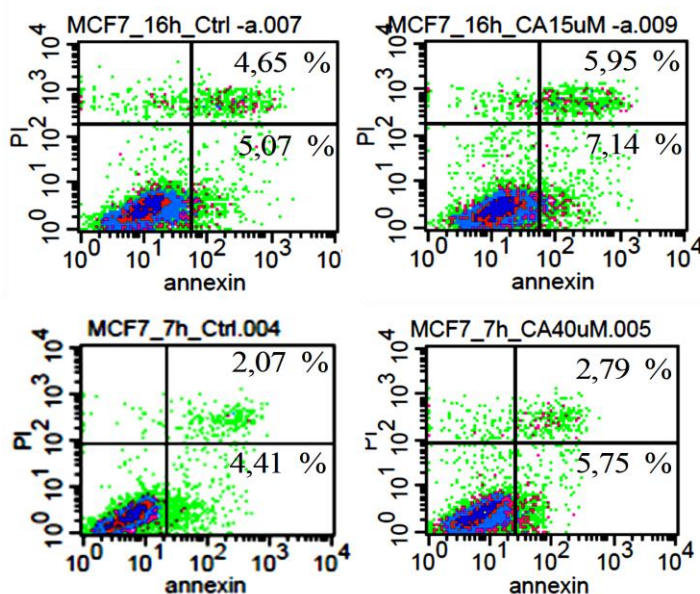


**Slika 9:** Določanje deleža apoptotskih teles z metodo pretočne citometrije na celični liniji Hek293T



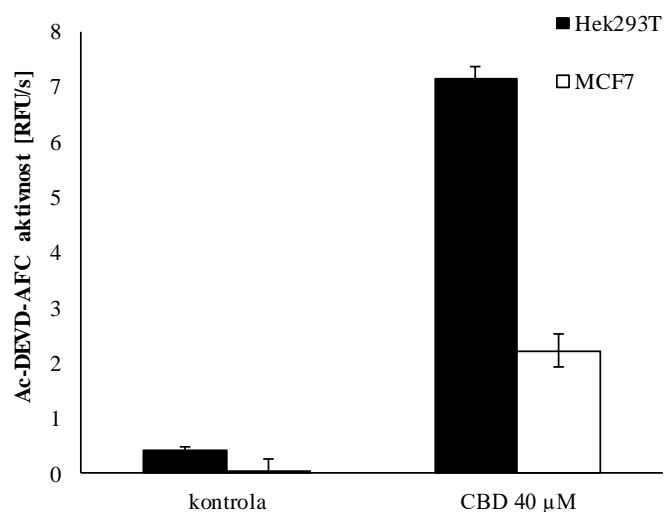
Rezultati so pokazali, da se delež zgodnje apoptotskih celic (zgoraj levo, spodnji desni kvadrant, slika 9) v primerjavi s kontrolo (zgoraj desno, spodnji desni kvadrant, slika 9) pri celični liniji Hek293T pri koncentraciji CBD 15  $\mu\text{M}$  po 16 urah ni bistveno spremenil (upadel za 1,38 %). Prav tako se v primerjavi s kontrolo (zgoraj levo, zgornji desni kvadrant, slika 9) ni bistveno spremenil delež pozno apoptotskih in nekroznih celic (zgoraj desno, zgornji desni kvadrant, slika 9), po inkubaciji celic s 15  $\mu\text{M}$  CBD, se je delež povečal za 0,33 %.

Razlike so se med kontrolo in ekstraktom CBD pri celični liniji Hek293T pričele kazati po 7-urni inkubaciji z 40  $\mu\text{M}$  CBD, kjer se je delež zgodnje apoptotskih celic (spodaj desno, spodnji desni kvadrant, slika 9) v primerjavi s kontrolo (spodaj levo, spodnji desni kvadrant, slika 9) dvignil za 9,56 %. Delež pozno apoptotskih in nekroznih celic (spodaj desno, zgornji desni kvadrant, slika 9) se je v primerjavi s kontrolo (spodaj levo, zgornji desni kvadrant, slika 9) dvignil za 9,96 %.



**Slika 10:** Določanje deleža apoptotskih teles z metodo pretočne citometrije na celični liniji MCF-7

Za celično linijo MCF-7 vidimo, da večjih sprememb v deležu apoptotskih celic v primerjavi s kontrolo ni bilo. Pri 15  $\mu\text{M}$  CBD po 16 urah (zgoraj, slika 10) delež zgodnje apoptotskih celic v primerjavi s kontrolo naraste za 2,07 % ter pozno apoptotskih in nekroznih celic naraste za 1,34 %. Prav tako pri povišanju koncentracije CBD na 40  $\mu\text{M}$  (spodaj, slika 10) opazimo, da se delež zgodnje apoptotskih celic v primerjavi s kontrolo zviša le za 1,30 % ter pozno apoptotskih celic za 0,72 %, pri čemer lahko povzamemo, da CBD nima vpliva na sprožitev apoptoze pri MCF-7 celični liniji, kar je v nasprotju z raziskavo Shrivastave in sodelavcev 2011, ki so pokazali, da se z višanjem koncentracije CBD sorazmerno zvišuje tudi delež apoptotskih celic MCF-7 celične linije.



**Slika 11:** Aktivnost kaspaze-3 za celični liniji Hek293T in MCF7 pri koncentraciji

Glede na pridobljene rezultate torej lahko povzamemo, da CBD sproži apoptozo šele pri višjih koncentracijah (40 μM), kar potrjuje tudi aktivnost kaspaze-3 (Slika 11), ki je bistveno višja pri celicah Hek293T pri koncentraciji CBD 40 μM kot pri MCF7. S tem lahko potrdimo hipotezo, da CBD sproži apoptozo, vendar iz rezultatov obeh testov ponovno ne moremo splošiti, da CBD tarčno oziroma bolj vpliva na rakaste celice MCF-7 kot na zdravo celično linijo Hek293T, ker je v našem primeru CBD sprožil apoptozo le pri zdravi celični liniji Hek297T.

## 4 ZAKLJUČEK

Kljub temu, da so se pripravki iz konoplje izkazali kot zelo zanimivi pri terapijah za raznovrstne bolezni, je uporaba konoplje in njenih pripravkov še vedno zelo kontroverzna. Namreč, do sedaj so bile vse klinične študije časovno prekratke, niso zajemale dovolj velikega števila vzorcev, kot problem pa se je izkazal tudi pomanjkanje kontrolnih študij s placebom. Problem predstavlja tudi neponovljivost in nestandardizirana priprava ekstraktov, saj je zaradi visoke genetske (epigenetske) variabilnosti rastline težko pridobiti enak material (Russo 2017).

V tej zaključni nalogi smo predstavili rezultate testa preživetja celic in sprožitve apoptoze, vsega skupaj le na 4 celičnih linijah z ekstraktom samo enega kanabinoida, kar je po našem mnenju bistveno premalo za posploševanje rezultatov in zaključke, predvsem pa bi bilo smiselno teste ponoviti na več različnih celičnih linijah v kombinaciji z drugimi kanabinoidi. V splošnem smo dokazali, da je spojina CBD citotoksična in inhibira rast celic, vendar v našem primeru vseh preiskovanih celičnih linij – rakastih in zdravih. Kljub temu, da je danes možno ekstrahirati posamezne kanabinoide (THC in CBD v kristalni obliki), je ta postopek zelo drag, terapevtski indeks pa manjši, kot pri uporabi zmesi, ki jo najdemo v konoplji, ker med njimi ni sinergijskega učinka, trdi tudi Russo (2017).

Problematika trenutne zakonodaje in posledično rastoče prodaje na črnem trgu za seboj pripelje tudi problematiko nekakovostnih in zdravju nevarnih pripravkov, ki so brez ustrezne kontrole. Taki izdelki imajo lahko nevarne vrednosti pesticidov, strupenih kovin ekstrakti so lahko pripravljene z neustreznimi topili, kot so na primer alkoholne pijače, razredčila, naftni derivati (smola, ki nastaja na površini cvetov konoplje je topna samo v polarnih topilih), katerih sledi ostanejo v ekstraktih in se z njimi vnesejo v organizem tistega, ki jih zaužije. (Russo 2017). Prav tako pri rekreativnih uporabnikih ni strokovnega nadzora nad koncentracijo bioaktivnih snovi, ki jo zaužijejo, pri čemer ima tudi sam način aplikacije v organizem (kajenje ali preko zaužitja čez prebavni trakt) veliko vlogo na končni učinek. Pri hitrem delovanju (na primer kajenju), je učinek praktično takojšnji, možnost stranskih učinkov pa večja (Russo 2017).

## 5 LITERATURA IN VIRI

Brenneisen R. 2007. Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents. Chapter 2. Marijuana and the Cannabinoids: 17-49

Cannabis legislation in Europe. An overview. 2018. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.

(<http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/4135/TD0217210ENN.pdf>)

(datum dostopa: 23.6.2018)

Clarke C.R., Watson P.D. 2007. Cannabis and Natural Cannabis Medicines. Chapter 1. Marijuana and the Cannabinoids: 1-15

Cole C., Zurbo B. 2008. Industrial hemp – a new crop for NSW. Prime facts: 801

ElSohly M.A., Slade D. 2005. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. Life Sciences 78: 539-548

Ferjan I., Kržan M., Lipnik-Štangelj M., Žiberna L., Stanovnik L., Černe K. 2015. Farmakologija kanabinoidov. Zdrav Vestn 84: 456-471

Guindon J., Hohmann G. A. 2011. The endocannabinoid system and cancer: therapeutic implication. British Journal of Pharmacology 163: 1447-1463

Guzman M., Sanchez C., Galve-Roperh I. 2002. Cannabinoids and cell fate. Pharmacology & Therapeutics 95: 175-184

Hilling W.K. 2005. Genetic evidence for speciation in *Cannabis* (Cannabaceae). Genetic Resources and Crop Evolution 52: 161-180

Kerstin Petrič V., Hren J. 2017. Ureditev regulative medicinske konoplje v Sloveniji. Ministerstvo za zdravje.

[http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/pageuploads/javno\\_zdravje\\_2015/droge/posvet\\_konoplja\\_060417/Ureditev\\_regulative\\_medicinske\\_konoplje\\_v\\_Sloveniji\\_4.4.2017.pdf](http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/pageuploads/javno_zdravje_2015/droge/posvet_konoplja_060417/Ureditev_regulative_medicinske_konoplje_v_Sloveniji_4.4.2017.pdf)

(datum dostopa: 23.6.2018).

Lachenmeier W.D., Kroener L., Musshoff F., Madea B. 2003. Determination of cannabinoids in hemp food products by use of headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry 387: 183-189

National cancer Institute. What is cancer? <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (datum dostopa: 25.6.2018)

Olaizola A.O., Elezgarai I., Rico-Barrio I., Zarandona I. Etxebarria N., Usobiaga A. 2017. Targeting the endocannabinoid system; future therapeutic strategies. *Drug discovery* 22, 1

Pravilnik o pogojih za pridobitev dovoljenja za gojenje konoplje in maka. 2011. Uradni list Republike Slovenije

Pižem J., Cör A. 2001. Kaspaze. *Med. razlg.* 40: 283-291

Russo E. B. 2016. Beyond Cannabis: Plants and Endocannabinoid System. *Trends in Pharmacological Sciences* 37, št. 7

Russo E. B. 2007. History of Cannabis and Its preparation Saga, Science and Sobriquet. *Chemistry and Biodiversity* 4: 1614 – 1648

Salentijn M.J. E., Zhang Q., Amaducci S., Yang M., Trindade M. L. 2015. New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. *Industrial Crops and Products* 68: 32-41

Shrivastava A., Kuzontkoski P.M., Groopman J.E., Prasad A. 2011. Cannabidiol Induces Programmed Cell Death in Breast Cancer Cells by Coordinating the Cross-talk between Apoptosis and Autophagy. *Molecular Cancer Therapeutics* 10: 1161-1172

The Endocannabinoid System in Health and Disease - Dr Ethan Russo - Part 1. 2017. <https://www.youtube.com/watch?v=fGzG3-Mtmxk> (datum dostopa: 26.4.2018)

The Endocannabinoid System in Health and Disease - Dr Ethan Russo - Part 2. 2017. [https://www.youtube.com/watch?v=xdW\\_VbcbwI0](https://www.youtube.com/watch?v=xdW_VbcbwI0) (datum dostopa: 26.4.2018)

ThermoFisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/alarblue-rapid-and-accurate-cell-health-indicator.html> (datum dostopa: 14.6.2017)

Wong SY R. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 30:87

Jenko G. Vpliv ekstrakta kanabidiola na celično rast in preživetje.

Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije, 2018 22

---

Zuardi W.A. 2006. History of cannabis as a medicine: a review. Rev. Bras. Psiquiatr 28: št. 2