

57. državno srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2023

EKSTRAKTI MEDICINSKE KONOPLJE (*Cannabis sativa*) IN NJIHOVI UČINKI NA CELICE MELANOMA

Raziskovalno področje: DRUGA PODROČJA (zdravstvo)

Raziskovalna naloga

Avtorica: Nuša Ačko

Mentorja: Katja Holnhaner Zorec, Jan Rožanc

II. gimnazija Maribor

Maribor, februar 2023

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	IV
ZAHVALA.....	V
1 UVOD.....	1
1.1 Teoretično ozadje	2
1.1.1 Konoplja	2
1.1.2 Konoplja v medicini	3
1.1.3 Fitokanabinoidi	4
1.1.4 Terpeni.....	6
1.1.5 Endokanabinoidni sistem.....	6
1.1.6 Melanom	7
1.1.7 Kanabinoidi in rak.....	8
1.2 Raziskovalna vprašanja in hipoteze	11
1.2.1 Raziskovalna vprašanja	11
1.2.2 Hipoteze.....	11
2 METODE IN MATERIALI	12
2.1 Rastlinski materiali.....	12
2.2 Ekstrakcija konopljе	14
2.3 Visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC)	16
2.4 Celične kulture	17
2.4.1 Test celične viabilnosti	18
2.5 Obdelava podatkov.....	18
3 REZULTATI.....	19
3.1 Ekstrakcije	19
3.2 Analiza kanabinoidov	19

3.3	Celične analize	22
4	RAZPRAVA.....	29
5	ZAKLJUČEK	32
6	DRUŽBENA ODGOVORNOST.....	33
7	VIRI.....	34
 <u>KAZALO SLIK</u>		
Slika 1:	Kemijske strukture glavnih kanabinoidov, prisotnih v Cannabis sativa L.	5
Slika 2:	HPLC metoda (Aryal, 2022).	6
Slika 3:	Ultrazvočna kopel (lastni vir).....	14
Slika 4:	Priprava za vakuumsko filtriranje (lastni vir).	15
Slika 5:	Vakuumski rotacijski izparjevalnik (lastni vir).....	15
Slika 6:	Liofilizator (lastni vir).	16
Slika 7:	Primer eksperimentalne zasnove (lastni vir).	18
Slika 8:	Izkoristek ekstrakcije različnih vrst konoplje.	19
Slika 9:	Kromatogram raztopine vseh uporabljenih standardov. Koncentracije vseh standardov, razen CBL-A, na tem kromatogramu znašajo 62,50 mg/ml, koncentracija CBL-A pa 31,25 mg/ml.....	20
Slika 10:	Koncentracije 16 kanabinoidov v ekstraktih konoplje.	21
Slika 11:	Vpliv različnih koncentracij dekarboksiliranih ekstraktov konoplje na celično viabilnost (+/- 1 standardna deviacija).	23
Slika 12:	Vpliv različnih koncentracij nedekarboksiliranih ekstraktov konoplje na celično viabilnost (+/- 1 SD).....	24

Slika 13: Primerjava vpliva posameznih dekarboksiliranih ekstraktov pri koncentracijah 15 in 20 µg/ml na različne celične linije (+/- 1 SD).....26

Slika 14: Primerjava učinkovitosti različnih dekarboksiliranih ekstraktov na celično viabilnost pri posameznih celičnih linijah (+/- 1 SD).....28

POVZETEK

Konoplja se uporablja v medicinske namene že od starih civilizacij in vse več raziskav se osredotoča na njene zdravilne učinke. Namen naloge je bil proučiti vpliv 5 sort medicinske konoplje (Bedrocan, Bedrolite, Berdabinol, Bedica in Bediol) na celične linije melanoma (SK-MEL 28, SK-MEL 2, WM1366 in MEL-JUSO). Najprej smo s pomočjo ultrazvočne kopeli izvedli ekstrakcijo dekarboksiliranih in nedekarboksiliranih vzorcev konoplje. Nato smo s pomočjo HPLC metode ekstraktom določili kanabinoidne profile, pri čemer smo opazili razlike med dekarboksiliranimi in nedekarboksiliranimi ekstrakti. Melanomske in zdrave celične linije smo izpostavili različnim koncentracijam konopljinih ekstraktov in spremljali celično viabilnost. Ugotovili smo, da so Bedrolite pri koncentraciji 15 µg/ml, Bedrobinol in Bediol pri koncentraciji 20 µg/ml statistično pomembno zmanjšali viabilnost določenih melanomskih celičnih linij v primerjavi z zdravimi celičnimi linijami ($p < 0,05$). Opazili smo statistično pomemben trend, pri katerem se je z višanjem koncentracij manjšala celična viabilnost. Različni ekstrakti konoplje so imeli na neko celično linijo različen vpliv in nek ekstrakt je imel na različne celične linije različen vpliv.

ZAHVALA

Iskreno bi se zahvalila svojima mentorjema, ki sta me pri nastajanju te raziskovalne naloge ves čas spodbujala ter mi pomagala z nasveti in dodatnimi razlagami.

Posebej bi se zahvalila Medicinski fakulteti v Mariboru oz. Inštitutu za biomedicinske vede, ki mi je omogočil uporabo svojih laboratorijev in s tem udejanjenje zamišljene raziskave. Zahvaljujem se tudi dvema študentoma te fakultete, ki sta mi pomagala pri izvedbi praktičnega dela.

Prav tako se zahvaljujem Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Maribor, ki je izvedla HPLC metodo.

Zahvaljujem se tudi svojima profesoricama kemije in biologije za dodatne nasvete ter razlage.

Zahvala gre tudi lektorici za jezikovni pregled naloge.

Hvala vsem.

1 UVOD

Cannabis sativa je rastlina, ki vsebuje več kot 100 različnih kanabinoidov in drugih spojin, ki imajo terapevtski potencial (Damijan, 2021). Najbolj znani in raziskani spojini sta CBD oz. kanabidiol in Δ^9 -THC oz. delta-9-tetrahidrokanabinol, ki je ena glavnih psihotropnih sestavin v rastlini. Konoplja vsebuje tudi Δ^8 -THC, vendar je ta manj pogost, zato kadar govorimo o THC-ju ciljamo na Δ^9 -THC. Poleg THC-ja in CBD-ja pa se kljub manjši raziskanosti domneva, da imajo tudi drugi kanabinoidi in terpeni, ki jih najdemo v konoplji, farmakološke učinke. Vse pogosteje se raziskuje sinergijsko učinkovanje ekstraktov (NAMDAR, in drugi, 2019).

Endokanabinoidni sistem je pomemben fiziološki sistem, ki ima v človeškem telesu homeostatsko vlogo, saj sodeluje pri zagotavljanju ravnovesja v različnih patoloških in fizioloških procesih, kot so obvladovanje bolečine, uravnavanje energije, stresa in čustev ter imunski odziv, zato ima velik potencial za zdravljenje številnih bolezni, vključno z rakom (Aizpurua-Olaizola, in drugi, 2016). Endokanabinoidni sistem aktivirajo kanabinoidi, med katere spadajo endokanabinoidi, ki jih telo proizvaja samo, fitokanabinoidi, ki jih najdemo v rastlinah in sintetični kanabinoidi, ki so narejeni v laboratoriju (Damijan, 2021).

Čeprav se z uporabo imunoterapije manjša smrtnost pri bolnikih z melanomom, ta še zmeraj predstavlja najbolj smrtonosno obliko kožnega raka. Problem imunoterapije je predvsem klinična odpornost, ki pa se iz neznanega razloga pogosto pojavi (Moreira, Heinzerling, Bhardwa, & Friedlander, 2021).

Številni rezultati raziskav o uspešnosti kanabinoidov pri zdravljenju melanoma in problematika visoke umrljivosti zaradi te bolezni spodbujajo pospešeno raziskovanje tega področja. Namen raziskovalne naloge je bil raziskati protitumorske učinke kanabinoidov na celičnih linijah melanoma. Omenjene fitokemikalije predstavljajo velik potencial za razvoj zdravil za mnoge fiziološke in psihološke bolezni. Prav tako kot mnoge znanstvenike, ki z željo po uspehu svoje delo posvečajo iskanju alternativne metode za zdravljenje melanoma, je tudi nas med pisanjem raziskovalne naloge vodila želja po tem. Veliko zanimanje za proučevanje zdravilnih učinkov konoplje se kaže v velikem številu raziskav, katere so mi pomagale pri pisanku teoretičnega dela in načrtovanju eksperimentalnega dela.

1.1 Teoretično ozadje

1.1.1 Konoplja

Navadna konoplja (*Cannabis sativa* L.) je enoletna dvodomna rastlina. Začetki njene uporabe segajo 4500 let nazaj na Kitajsko, kjer so jo uporabljali predvsem v tekstilne namene. Kasneje so jo začeli pridelovati tudi stari Grki in Egipčani. Danes jo gojijo za pridobivanje celuloze iz vlaken, torej v tekstilni, papirni in gradbeni industriji. Konopljina vlakna so visoko cenjena, saj so močna, so dober izolator, nanje ne vplivajo žuželke in pršice ter so biorazgradljiva. Pomembna so tudi konopljina semena, ki se uporabljam tako za prehrano ljudi, kot tudi živali (Slapnik, 2018). Konoplja ima zelo pestro kemijsko zgradbo, vsebuje številne kanabinoide, terpene, ogljikove hidrate, fenolne spojine, maščobne kisline in njihove estre, amine, amide in fitosterole (Pellati, in drugi, 2018).

Pri poimenovanju konoplje prihaja do zmede, nekateri avtorji podpirajo idejo, da je navadna konoplja ena vrsta z več podvrstami, drugi avtorji pa navajajo, da obstajata vsaj dve, če ne tri vrste konoplje (Bizjak, 2017). Začetki raziskovanja konopljine taksonomije segajo v čas Linnaeus, ki je prvi konopljo poimenoval kot *Cannabis sativa*, kasneje pa se je z njeno taksonomijo ukvarjal tudi Lamarck (Basyal & Regmi, 2021). Leta 1974 so Schultes in drugi kategorizirali konopljo v tri vrste: *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* in *Cannabis ruderalis* (Schultes, Klein, Plowman, & Lockwood, 1974). Dve leti kasneje sta Small in Cronquist (1976) opredelila navadno konopljo kot eno vrsto z dvema podvrstama in štirimi tipi. Podvrsti sta ločila predvsem glede na vsebnost psihoaktivne snovi THC. Podvrsto z nižjo vsebnostjo THC-ja sta poimenovala *Cannabis sativa* ssp. *sativa*, podvrsto z višjo vsebnostjo THC-ja pa *Cannabis sativa* ssp. *indica* (Small & Cronquist, 1976). Novejše raziskave uporabljajo poimenovanje *Cannabis sativa* kot samostojne vrste s tremi podvrstami, saj je križanje med njimi možno. Te tri vrste so poimenovane kot *Cannabis sativa* ssp. *sativa*, ssp. *indica* in ssp. *ruderalis*. Navadna konoplja spada v družino konopljevk oz. Cannabaceae, mednje spada prib. 120 vrst, ki spadajo med drevesa ali grmičevje, zato je konoplja kot zelišče izjema. Predstavnike te družine najdemo predvsem v tropskem in zmerinem podnebju. V to družino spada tudi navadni hmelj (*Humulus lupulus*), ki je konopljin najbližji sorodnik (Schilling, in drugi, 2021).

Vse pogosteje se uporabljata izraza medicinska in industrijska konoplja, ki se razlikujeta predvsem v načinu pridelave. Medicinska konoplja se goji v rastlinjakih, kjer so pogoji za rast

kontrolirani in omogočajo največji možni izkoristek oz. pridelek. V takšnih rastlinjakih so točno določeni pogoji, kot so namakanje, delež CO₂ v zraku, tip luči, moč in trajanje osvetlitve, gnojenje ter obrezovanje, kar omogoča natančno standardizacijo izdelkov, namenjenih medicinski uporabi. Industrijska konoplja pa v nasprotju z medicinsko raste prosto v naravi, kjer pogoji niso regulirani. Konoplja uspeva le v toplejših podnebjih, saj je primerna za setev, ko se temperature dvignejo nad 12–14 °C (Bilalis, in drugi, 2019).

1.1.2 Konoplja v medicini

Cannabis sativa se že tisočletja uporablja za terapevtske namene. S povečanim zanimanjem za uporabo konoplje v medicini se je v zadnjem desetletju povečalo tudi raziskovanje na tem področju. Zelo pomembna odkritja na področju farmakologije so pokazala, da konoplja lahko zdravi ali pomaga pri lajšanju stranskih učinkov pri rakavih obolenjih. Kanabinoidi lahko spreminjajo rast raka, vendar se njihov učinek razlikuje glede na tip raka in odmerke zdravila. Raziskave so pokazale tudi konopljino analgetično oz. protibolečinsko učinkovitost. Konoplja je lahko tudi dober nadomestek za opioide in tudi druge vrste zdravil na recept (npr. pomirjevala). Izjemno pomembna odkritja njenega delovanja so bila učinkovitost pri zdravljenju nevrodegenerativnih bolezni. S CBD-jem je učinkovito odpravljanje vedenjskih težav pri avtistih, kot so hiperaktivnost, samopoškodovanje in izbruhi jeze. Osebe z duševnimi motnjami se pogosto zatekajo h konoplji, CBD je učinkovito antipsihotično zdravilo, ki ima v primerjavi s standardnimi zdravili manj stranskih učinkov. CBD pomaga tudi pri zdravljenju bipolarne motnje in ob uživanju le tega se izboljšajo kognitivne funkcije. Problem standardnih antiepileptičnih zdravil je, da so pogosto epileptiki odporni na njih, medtem ko raziskave kažejo učinkovitost zdravljenja epilepsije s konopljinimi pripravki (Čulić, Bregar, & Macur, 2021). V Sloveniji je zelo aktivna razprava o uporabi konoplje v otroški nevrologiji in onkologiji. Narejena je bila raziskava pri kateri so spremljali učinek CBD-ja pri otrocih z epilepsijo med starostjo 6 mesecev in 24 let in ugotovili pozitivne učinke. Prib. polovica otrok je imela več kot 50-odstotno izboljšanje napadov, približno 20 % pa jih je bilo popolnoma brez napadov. Poleg zdravljenja otrok z epilepsijo so študije pokazale tudi pozitivne rezultate pri otrocih z avtizmom, različnimi psihičnimi stanji in celo pri cerebralni paralizi (Neubauer, Perkovič-Benedik, & Osredkar, 2019).

Zdravljenje s konopljo mora biti za vsakega posameznika specifično in individualno. Zdravljenje se zmeraj začne z doziranjem nižjih odmerkov, ki se jih počasi zviša. Glede na

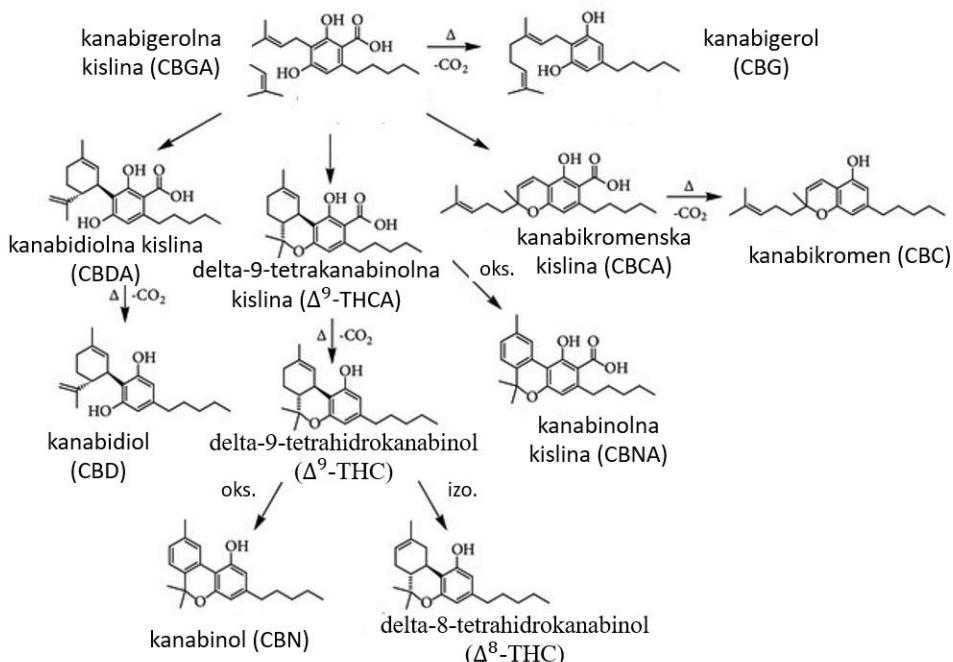
učinek, ki ga pacient potrebuje, se določi želeno razmerje med CBD-jem in THC-jem (Čulić, Bregar, & Macur, 2021).

Konoplja ima poleg pozitivnih učinkov tudi nekatere negativne. Ti so povezni predvsem z visoko vsebnostjo THC-ja. Pri razmerju pod 10 : 1 med CBD-jem in THC-jem, lahko že pride do psihoaktivnega učinka, ki sproži motnje v občutenu in zaznavanju. Te povzročajo nezmožnost varnega vključevanja v promet in presoje v različnih situacijah, v višjih odmerkih pa paranojo in psihozo. Dolgotrajna in pogosta uporaba konoplje povzroča odvisnost in tudi večjo možnost za razvoj nekaterih bolezni, kot sta kronični bronhitis, ki se pogosto razvije zaradi načina uporabe konoplje, torej kajenje in kronična psihoza, pri osebah z genetskimi predispozicijami za razvoj duševne motnje. Aktivne raziskave potekajo o morebitnem uravnavanju negativnih učinkov THC-ja z uživanjem CBD-ja ali terpenoidov, ki se nahajajo v popru, pinjolah in pravem kolmežu. Problem predstavlja tudi nenadno prenehanje dolgotrajne uporabe konoplje, ki povzroča glavobol, tesnobo, vročino, mrzlico, težave s spanjem in depresivno razpoloženje (Čulić, Bregar, & Macur, 2021).

1.1.3 Fitokanabinoidi

Med kanabinoide uvrščamo več kot 100 različnih spojin, ki jih delimo v tri večje skupine. Fitokanabinoidi so kanabinoidi, ki so prisotni v konoplji, endokanabinoidi so kanabinoidi, ki so prisotni v našem telesu, in sintetični kanabinoidi so kanabinoidi, ki so umetno proizvedeni v laboratoriju (Damijan, 2021).

Med najpomembnejše fitokanabinoide spadajo tetrahidrokanabinol (THC), kanabidiol (CBD), kanabiniol (CBN), kanabigerol (CBG) in njihove kislinske oblike: tetrahidrokanabinolna kislina (THCA), kanabidiolna kislina (CBDA) in kanabigerolna kislina (CBGA) (Horvat, 2020). Kakor je razvidno iz slike 1 je CBGA predhodnica vseh glavnih kanabinoidov v konoplji, ki nastanejo s procesi dekarboksilacije, izomerizacije in oksidacije (Pellati, in drugi, 2018). THC in CBD izhajata iz njunih kislinskih predhodnikov iz THCA in CBDA. Iz kislinske oblike se pretvorita s procesom dekarboksilacije, ki ga sproži povečana temperatura ali izpostavljenost svetlobi (Alves, Amaral, Teixeira, & Correia-da-Silva, 2020). Med dekarboksilacijo kanabinoidi izgubijo dokaj nestabilno karboksilno skupino v obliki ogljikovega dioksida, kar lahko vidimo na sliki 1 (Damijan, 2021).



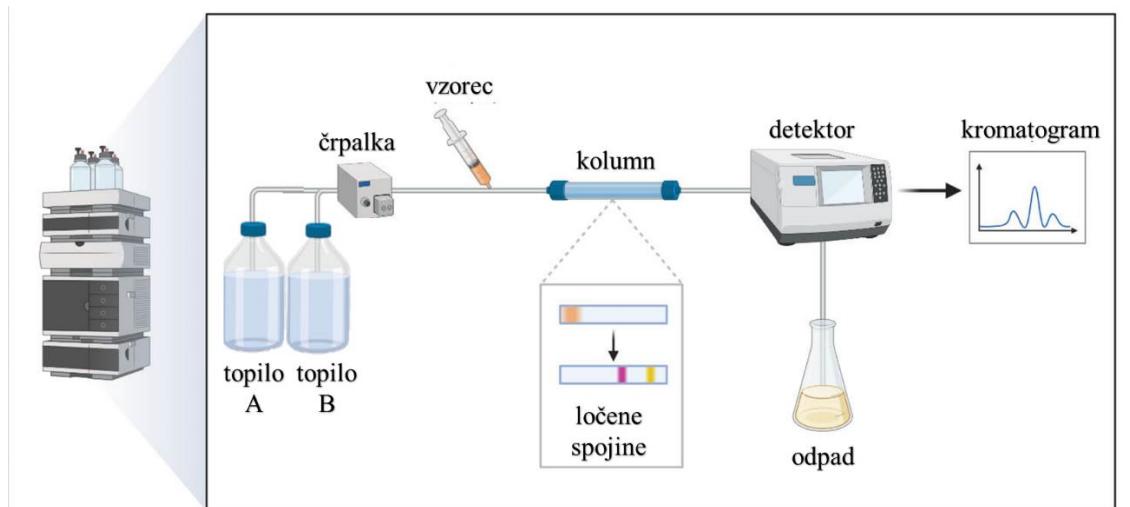
Slika 1: Kemijske strukture glavnih kanabinoidov, prisotnih v *Cannabis sativa* L.

Okrajšave: Δ = segrevanje; oks. = oksidacija; izo. = izomeracija (Pellati, in drugi, 2018).

Vsebnost kanabinoidov v konoplji je odvisna od več biotskih in abiotiskih dejavnikov. Najpomembnejši so genotip, spol, temperatura, svetloba, dostopnost hranil in dolžina dneva. Večina kanabinoidov se nahaja v žleznih trihomih in v cvetovih, v koreninah pa jih sploh ni (Zagožen, Kreft, & Čerenak, 2018).

1.1.3.1 Analiza kanabinoidov

Za določanje kanabinoidnih profilov konoplje se najpogosteje uporablja postopek, imenovan visokotlačna tekočinska kromatografija oz. HPLC. S HPLC-jem lahko analiziramo koncentracijo 16 kanabinoidov (Aubin, Layton, & Helmueller, 2018). Ta metoda je zelo primerna, saj se med samim postopkom ne poviša temperatura, ki bi lahko z dekarboksilacijo povzročila spremembo v strukturi kanabinoidov. Vsaka HPLC analiza je sestavljena iz več faz (slika 2). Prva je mobilna faza, kjer črpalka potisne topilo skozi sistem. Da je možna popolna separacija spojin se uporabljata dva topila, katerima se določa gradient v določenem časovnem intervalu. Potem se vzorec vbrizga do kolumna, kjer poteka stacionarna faza. Spojine se v kolumnu fizično ločijo in potujejo do detektorja, ki je povezan z računalnikom, na katerem se izriše kromatogram (Aryal, 2022).



Slika 2: HPLC metoda (Aryal, 2022).

1.1.4 Terpeni

V konoplji najdemo poleg kanabinoidov tudi več kot 100 različnih terpenov, ki so odgovorni predvsem za njen vonj in okus. Poznamo več oblik terpenov glede na ponavljajočo se izoprensko enoto (C_5H_8), npr. monoterpeni (2 izoprena), seskviterpeni (3 izopreni) in triterpeni (6 izoprenov) (Andre, Hausman, & Guerriero, 2016).

Terpeni s svojim močnim vonjem rastlinam omogočajo zaščito pred rastlinojedimi živalmi in pred škodljivci (Bizjak, 2017). Terpeni sami po sebi delujejo antikancerogeno, analgetično in protivnetno. Najdemo jih v različnih eteričnih oljih. Izkaže se, da imajo terpeni v konoplji zaradi sinergističnega delovanja s kanabinoidi številne zdravilne učinke, npr. kombinacija CBD-ja in nekaterih terpenov pomaga pri zdravljenju aken, anksioznosti, demence in zasvojenosti, v kombinaciji terpenov s THC-jem pa prispevajo k analgetičnemu in psihotičnemu učinku. Zanimivo je, da obstaja korelacija med vsebnostjo kanabinoidov in terpenov, več kot je kanabinoidov, več je terpenov, razlog za to je najverjetneje to, da večina terpenov in tudi kanabinoidov nastaja v žleznih trihomih konoplje (Andre, Hausman, & Guerriero, 2016).

1.1.5 Endokanabinoidni sistem

Endokanabinoidni sistem je kompleksen fiziološki sistem, ki pripomore k zagotavljanju homeostaze in vzdrževanju človekovega zdravja (Mlinar, 2021). Endokanabinodni sistem se aktivira ob porušenem patološkem stanju z namenom, da zagotavlja homoestazo v telesu (Aizpurua-Olaizola, in drugi, 2016). Sestavljen je iz kanabinoidnih receptorjev,

endokanabinoidov in proteinov, ki sintetizirajo, transportirajo in razgrajujejo endokanabinoide (Mlinar, 2021). Kanabinoidna receptorja CB₁ in CB₂ sta del ogromne družine G-proteinskih receptorjev (GPCR) (Grotenhermen, 2006). V to družino spadajo tudi drugi receptorji, ki se prav tako sprožijo ob aktivaciji endokanabinoidnega sistema, to so npr. TRPV₁, TRPV₂, TRPV₃, GPR₅₅, GPR₁₁₉ in GPR₁₈ (Aizpurua-Olaizola, in drugi, 2016). Receptorji CB₁ so najštevilčnejši GPCR receptorji v možganih, nahajajo se v živčnih celicah v možganih, v hrbtenjači in v perifernem živčnem sistemu, najdemo pa jih tudi v nekaterih žlezah, slinavki, levkocitih, koži in srcu. Receptorji CB₁ so še posebej izraženi v delih možganov, ki nadzorujejo gibanje, spomin in bolečino. Receptorji CB₂ se nahajajo predvsem v celicah imunskega sistema, levkocitih, v vranici in v mandljih. Ker kanabinidi, ki selektivno aktivirajo le receptor CB₂, ne povzročajo psihoaktivne reakcije, so izjemno pomembni za uporabo v terapevtske namene (Grotenhermen, 2006).

Endokanabinoidi so derivati polinenasičenih maščobnih kislin, ki jih proizvaja naše telo samo. Najpogostejsa sta N-arahidonoletanamin (anandamid, AEA) in 2-arahidonolglicerol (2-AG) (Grotenhermen, 2006).

Različni kanabinoidi imajo različno afiniteto na vezavo na CB₁ in CB₂ receptorja. Npr. THC in anandamid se slabše ujameta z CB₂ kot CB₁ receptorjem (Grotenhermen, 2006). Raziskave kažejo, da ima THC zaradi podobne kemijske sestave kot anandamid tudi podoben vpliv na telo. Oba vplivata predvsem na nevrone v različnih delih možganov (Pragna Bathula & MacIver, 2022). Pomembno je vedeti, da je vsak kanabinoid označen z edinstvenim prstnim odtisom in lahko deluje le na določene receptorje. Ta kanabinoid lahko deluje kot agonist ali kot antagonist, zaradi česar je predvidevanje kanabinoidnega delovanja zahtevno (Tóth, Ádám, Bíró, & Oláh, 2019).

1.1.6 Melanom

Obstajajo tri vrste kožnega raka. Najpogostejsi oblici sta rak ploščatih celic in rak bazalnih celic. Rak se najpogosteje pojavi na obrazu ali na vratu. Prizadene pa predvsem ljudi s svetlo poltjo, očmi in lasmi (Kumar, 2012). Najnevarnejša oblika kožnega raka je maligni melanom, to obliko ima namreč le 15% bolnikov kožnega raka, vendar je odgovoren za 90% smrti zaradi kožnega raka (Onkološki inštitut Ljubljana, 2019).

Maligni melanom je najagresivnejša oblika kožnega raka, ki nastane zaradi mutacij v melanocitah. Melanocite so celice, ki se nahajajo v povrhnjici naše kože in proizvajajo pigment melanin (Karami Fath, in drugi, 2022). K nastanku melanoma so bolj podvrženi ljudje, katerih predniki so preboleli kožnega raka, so pogosto izpostavljeni UV-žarkom, imajo večje število materinih znamenj in svetlopolti ljudje. UV-žarki so v večini primerov sprožitelji nastanka mutacij. Mutacije nastanejo zaradi napak pri podvajanju DNA ali pri poškodbi same molekule (Eddy, Shah, & Chen, 2021). Med najpogosteje mutacije spada mutacija gena BRAF, ta se namreč pojavi pri več kot 50% bolnikov. BRAF gen je gen, ki uravnava celično rast, z mutacijo tega gena, kjer namesto aminokisline glutamin nastane valin (Rožanc, in drugi, 2018). Pogosto se pojavlja tudi mutacija na genu NRAS, ki tako kot mutacija na genu BRAF povzroča pospešeno rast rakavih celic. V večini primerov se ti dve mutaciji zgodita zaradi izpostavljenosti UV-svetlobi in nista prirojeni (Bauer, A. Curtin, Pinkel, & C. Bastian, 2007). Za mutacijami vstopijo mutirane celice v fazo pospešene delitve oz. rasti, bolezen pa nadaljuje v fazo malignega melanoma. Pogosta mutacija, ki nastane med razvojem melanoma, daje celicam metastatsko sposobnost (Eddy, Shah, & Chen, 2021). Glavni razlog za visoko smrtnost bolnikov z melanomom je ravno metastaza melanoma. Metastaza nastane, ko se nekatere rakave celice ločijo od mesta, kjer je tumor nastal in se razširijo v krvni obtok in do posameznih organov (Vaseghi, Javad Taki, & Haghjooy Javanmard, 2017).

Začetne faze melanoma se lahko zdravijo z operacijo, kjer odstranijo rakave celice. Pri zdravljenju bolezni v poznejših fazah se uporabi kemoterapija, imunoterapija, radioterapija in ciljne terapije. Zdravljenje poznih faz melanoma je precej zahtevno, pride lahko do rezistence tumorja na zdravila in stranskih učinkov terapij, kot sta slabost in izčrpanost, zato je razvoj novih terapevtskih pristopov zelo pomemben (Cunha, Daniel-da-Silva, & Oliveira, 2022).

1.1.7 Kanabinoidi in rak

Takoj za kardiovaskularnimi boleznimi predstavlja rak drugi najpogosteji vzrok za smrt. Značilnost raka je nenadzorovana rast mutiranih celic kjerkoli po telesu (Malić, 2021).

Mnoge raziskave kažejo, da so komponente endokanabinoidnega sistema receptorji in kanabinoidi v tumorskem tkivu povečani (Zhao, Yang, Zhao, Fang, & Li, 2012). Kar pomeni, da bi lahko aktivacija endokanabinoidnega sistema spodbujala nastanek tumorja (Zheng, in drugi, 2008). V nasprotju s temi raziskavami so nekatere raziskave pokazale pozitivne učinke kanabinoidov pri zdravljenju levkemije, melanoma, raka na možganih, prsih, črevesju,

ledvicah, jetrih, požiralniku, jajčnikih, trebušni slinavki, prostati in ščitnici (Stuart Reece & Kenneth Hulse, 2022). Dokazani pozitivni učinki so predvsem lajšanje bolečin zaradi raka, lajšanje stranskih učinkov drugih terapij, kot so slabost, bruhanje, pomanjkanje apetita (Abrams, 2022).

Poleg blažilnih učinkov pa vse več raziskav kaže tudi na protitumorsko delovanje kanabinoidov, te so pokazale sposobnost zaviranja rasti tumorskih celic in metastaz (Morales & Jagerovic, 2019). Velik napredek na področju raziskav, povezanih z vplivom kanabinoidov na raka, predstavlja raziskava Munsona in sodelavcev, ko so leta 1975 dokazali, da sta CBD in THC zavirala rast celic pljučnega tumorja v *in vitro* celični liniji in tudi v *in vivo* modelu miši (Munson, Harris, Friedman, Dewey, & Carchman, 1975). V nadaljnjih raziskavah so dokazali, da je konoplja povzročila apoptozo celic oz. celično smrt in preprečila nadaljnje delitve rakavih celic. Z vstopom kanabinoidov v telo se aktivirata receptorja CB₁ in CB₂, ob aktivaciji teh receptorjev se sproži tudi sinteza ceramida. Sinteza ceramida stimulira izdelavo endoplazemskih retikelnih stresnih proteinov, ki regulirajo oz. zavirajo metabolizem rakavih celic (Bachari, Piva, Alireza Salami, Jamshidi, & Mantri, 2020). *In vivo* poskusi na miših so pokazali, da so kanabinoidi preprečili angiogenezo tumorja (Álvarez, in drugi, 2004). Angiogeneza je rast novih kapilarnih krvnih žil, ki omogočajo širitev in metastazo raka. Sredstva, ki preprečujejo angiogenezo predstavljajo potencialno terapevtsko metodo za zdravljenje različnih vrst tumorjev (Heymach, in drugi, 2022).

V zadnjem času je bilo objavljenih kar nekaj raziskav, ki kažejo, da je uporaba celih konopljinih ekstraktov učinkovitejša, kot uporaba izoliranih posameznih spojin. Nabassi in drugi so leta 2016 pokazali ravno to. Kombinacija CBD-ja in THC-ja je povzročila smrt rakavih celic, medtem ko je uporaba čistega THC-ja in CBD-ja ni (Nabissi, in drugi, 2016). Prav tako so leta 2018 Blasco-Benito in drugi na celičnih linijah raka na dojki dokazali, da je celoten ekstrakt konoplje učinkovitejši od čistega THC-ja (Blasco-Benito, in drugi, 2018). Leta 2019 so Baram in drugi naredili zanimivo raziskavo, kjer so poleg večje učinkovitosti celotnih ekstraktov v primerjavi s čistim THC-jem dokazali tudi, da so ekstrakti s podobnimi količinami THC-ja povzročili bistveno različne učinke na celičnih linijah rakavih celic. Na primeru pljučnega raka so dokazali selektivno delovanje konoplje, isti ekstrakt konoplje je povzročil smrt več celic pri rakavi celični liniji kot pri zdravi (Baram, in drugi, 2019).

1.1.7.1 Kanabinoidi in melanom

Čeprav pogostost ljudi z melanomom narašča, je preživetje ljudi z metastaziranim melanomom še zmeraj manjše od 10 %, zato je nova metoda za zdravljenje melanoma nujna (Armstrong, in drugi, 2015). Celice malignega melanoma izražajo CB₁ in CB₂ receptorje, oz. so ti celo prekomerno izraženi v primerjavi z zdravimi melanocitami (Zhao, Yang, Zhao, Fang, & Li, 2012). Pokazalo se je, da je aktivacija CB₁ in CB₂ receptorjev pri melanomu prav tako kot pri nekaterih drugih vrstah raka povzročila apoptozo celic, zavirala metastazo ali preprečila delitve. Glodde in drugi (2015) so dokazali, da je THC v 25 dneh zmanjšal rast melanoma pri miših kar za 50 %. Dokazali so tudi, da se rast teh celic ni zmanjšala pri miših brez CB₁ in CB₂ receptorja (Glodde, Jakobs, Bald, Tüting, & Gaffal, 2015). Leta 2015 so Armstrong in drugi v *in vitro* raziskavah dokazali, da je vsebnost THC-ja povzročila autofagijo in posledično tudi apoptozo celic melanoma (Armstrong, in drugi, 2015). Autofagija je mehanizem, pri katerem celica s pomočjo lisosomov razgradi celične komponente (Mulcahy Levy, Towers, & Thorburn, 2017). Prav tako so Armstrong in drugi (2015) dokazali učinkovitost kanabinoidov v *in vivo* raziskavah, pri čemer so delali poskus na miših. Uporabili so kombinacijo 1 : 1 THC-ja ter CBD-ja in raziskave so pokazale pozitivne učinke. Kanabinoidi so bili primerjavi s klasičnim kemoterapevtskim zdravilom temozolomid učinkovitejši, saj so bolje zavirali celično rast in delitev ter hkrati povečali autofagijo in apoptozo rakavih celic (Armstrong, in drugi, 2015). Tudi v raziskavi Rožanca in drugih (2021) je konoplja pokazala pozitiven učinek. Najprej so iz konoplje pripravili ekstrakte in nato proučevali njihov vpliv na celice raka na črevesju. S svojo raziskavo so dokazali selektivno učinkovitost, kar pomeni, da je konoplja zmanjšala celično viabilnost v obolenih celicah ne pa tudi v zdravih (Rožanc, in drugi, 2021).

Zanimivo je, da nekatere raziskave kažejo celo učinkovitost preventivne uporabe zlasti ne psihoaktivnih kanabinoidov, kot so CBD, CBC in CBG za zaščito pred kožnim rakom (Ramer, in drugi, 2022).

V eni izmed raziskav je bilo dokazano, da je UV-sevanje aktiviralo CB₁ in CB₂ receptorje. Pokazali so tudi, da odsotnost CB₁ in CB₂ receptorjev v miših vodi k zmanjšanju raka na koži, zaradi UV-žarkov. Kar pomeni, da bi lahko prekomerna aktivacija endokanabinoidnega sistema tudi spodbujala nastanek raka (Zheng, in drugi, 2008).

1.2 Raziskovalna vprašanja in hipoteze

1.2.1 Raziskovalna vprašanja

1. Kakšni so kanabinoidni profili pred in po dekarboksilaciji petih sort konoplje, ki so bile uporabljene v raziskavi (Bedrocan, Bedrolite, Berdabinol, Bedica in Bediol)?
2. Kakšni so učinki dekarboksiliranih in nedekarboksiliranih vrst ekstraktov konoplje Bedrocan, Bedrolite, Berdabinol, Bedica in Bediol na viabilnost melanomskeih ter zdravih kožnih celic *in vitro*?
3. Kako različne koncentracije ekstraktov konoplje vplivajo na viabilnost melanomskeih celic *in vitro*?
4. Kako različne sorte konoplje (Bedrocan, Bedrolite, Berdabinol, Bedica in Bediol) vplivajo na viabilnost melanomskeih celic *in vitro*?
5. Ali obstaja razlika v učinkih ekstraktov konoplje na melanomske celične linije z različnimi mutacijami ali stopnjami napredovanja?

1.2.2 Hipoteze

H₁: Sorte konoplje, uporabljene v raziskavi, bodo imele različne kanabinoidne profile. Dekarboksilacija bo povečala koncentracijo THC in CBD v ekstraktu ter vplivala na razmerje med THC in CBD in koncentracijo drugih kanabinoidov.

Razlaga hipoteze: Predvidevamo, da bomo izvedli ekstrakcijo in dekarboksilacijo uspešno. Zato bi morale različne sorte konoplje, ki imajo, kot navaja proizvajalec (Bedrocan International) različne kanabinoidne profile, imeti tudi po ekstrakciji različne koncentracije kanabinoidov. Da se po dekarboksilaciji spremeni koncentracija THC-ja in CBD-ja sklepamo iz predhodnih raziskav več avtorjev, ki razlagajo, da se iz kislinskih oblik kanabinoidov ti spremenijo v nevtralne (Lim Kim, in drugi, 2022, Lewis, Yang, Wasilewski, A. Clarke, & P. Kotra, 2017, Lewis-Bakker, Yang, Vyawahare, & P. Kotra, 2019).

H₂: Dekarboksilirani in nedekarboksilirani izvlečki konoplje bodo zavirali rast in proliferacijo melanomskeih celic ter bodo imeli minimalen ali nikakršen učinek na zdrave kožne celice *in vitro*.

Razlaga hipoteze: To lahko sklepamo na podlagi predhodnih raziskav, ki so pokazale učinkovitost konoplje pri zdravljenju melanoma (Glodde, Jakobs, Bald, Tüting, & Gaffal, 2015, Armstrong, in drugi, 2015). Na podlagi raziskave, ki so jo izvedli Marzeda in drugi (2022) smo predvidevali, da konoplja ne bo delovala toksično na zdrave kožne celice (Marzeda, in drugi, 2022).

H₃: Povečevanje koncentracij ekstraktov konoplje bo povzročilo zmanjšanje viabilnosti melanomskeh celic *in vitro*.

Razlaga hipoteze: Večja koncentracija ekstraktov pomeni večje koncentracije kanabinoidov, ki delujejo antikancerogeno (Stuart Reece & Kenneth Hulse, 2022).

H₄: Ekstrakti različnih sort konoplje bodo imele različen vpliv na viabilnost melanomskeh celic *in vitro*.

Razlaga hipoteze: Različni ekstrakti imajo različne koncentracije oz. vsebnost določenih kanabinoidov. O različnem vplivu ekstraktov z različno vsebnostjo določenih kanabinoidov lahko sklepamo, ker nimajo vsi kanabinoidi enakega vpliva na določeno celično linijo (Baram, in drugi, 2019).

H₅: Ekstrakti konoplje bodo imeli različne učinke glede na melanomske celične linije z različnimi mutacijami ali stopnjami napredovanja

Razlaga hipoteze: Tako kot druge terapije, ki se uporabljajo za zdravljenje melanoma, predvidevamo, da bo tudi terapija s konopljo imela na melanomske celične linije z različnimi mutacijami ali stopnjami napredovanja različen učinek (Marzeda, Drozd, Wróblewska-Łuczka, & Łuszczki, 2021).

2 METODE IN MATERIALI

2.1 Rastlinski materiali

V raziskavi smo uporabili vseh pet različic konoplje proizvajalca Bedrocan. Ratlinski materiali so bili posušeni in pakirani v 5-gramske embalaže. Proizvajalec navaja, da se lahko konoplja uporablja za medicinski razvoj, klinično uporabo in za bolnike. Ker jo gojijo v točno določenih

pogojih, imajo vse različice točno določeno sestavo aktivnih sestavin, katera mora biti zagotovljena za uporabo v medicini (Bedrocan International).

Prva različica, ki smo jo uporabili, se imenuje Bedrocan oz. *Cannabis sativa L. 'Afina'*, ta vsebuje visoko vsebnost THC-ja, kar 22 %. Poleg njega vsebuje dokaj visoko koncentracijo CBG-ja in nekoliko manjšo koncentracijo (pod 1 %) CBD-ja, THCV-ja in CBC-ja. Ima tudi pestro sestavo terpenov, in sicer največ vsebuje mircena in terpinolena – 5mg/g, v manjših koncentracijah vsebuje tudi cis-ocimen, α -gvajen, γ -kadinen, trans-bergamoten in trans- β -farnezen. Bedrocan je najbolj uporabljen različica medicinske konoplje in je bil uporabljen v večini raziskav (Bedrocan International).

Uporabili smo tudi Bedrobinol oz. *Cannabis sativa L. 'Ludina'*, ki ima prav tako v primerjavi z drugimi kanabinoidi visoko koncentracijo THC-ja, to je 13,5 %. Ta različica se glede na THC tretira kot srednje močna. V koncentracijah, manjših od 1 %, vsebuje tudi THCV, CBD, CBC in CBG. Med terpeni prevladuje mircen, katerega vsebnost znaša 10 mg/g. Dokaj visoka je tudi vsebnost α -2-pinena, to je 2 mg/g, v njem pa najdemo tudi BCP, β -2-pinena, cis-ocimen in α -humulen, vendar je vsebnost teh bistveno manjša (Bedrocan International).

Bediol oz. *Cannabis sativa L. 'Elida'* je eden izmed prvih produktov medicinske konoplje z višjo koncentracijo CBD-ja (8 %) kot THC-ja (6,3 %). Poleg THC-ja in CBD-ja vsebuje tudi CBC (1%) in CBGM in CBG v manjših količinah. Glede terpenov ima dokaj podobno kemijo zgradbo kot Bedrobinol, med terpeni s 7 mg/g prevladuje mircen, sledijo mu α -2-pinena, BCP, terpinolen in α -terpineol. Bediol se pogosto uporablja za paciente, ki konoplje kot zdravilo niso predhodno uporabljali (Bedrocan International).

Bedica oz. *Cannabis sativa L. 'Talea'* je edini produkt, ki pripada podvrsti *Cannabis sativa* ssp. *indica*, ostale sorte namreč pripadajo podvrsti *Cannabis sativa* ssp. *sativa*. Bedica vsebuje 14 % THC-ja in prib. 1 % CBG-ja, v manjših količinah pa tudi CBD, THCV in CBC. V Bedici je zelo visoka vsebnost terpena mircene (1 mg/g), ki ima pomirjevalni učinek, poleg njega vsebuje α -2-pinena, cis-ocimen, BCP, α -bisabolol in β -2-pinena (Bedrocan International).

Bedrolite oz. *Cannabis sativa L. 'Rensina'* je najnovejši produkt in ima največje razmerje med CBD in THC. Koncentracija CBD-ja je 7,5 %, prisoten je tudi CBC, ki ima 1 % koncentracije, v manjši meri pa še CBGM, THC in CBG. V primerjavi z ostalimi rastlinskimi materiali ima Bedrolite precej majhno vsebnost terpenov. Največ je sicer mircena, vendar le 1.5 mg/g, sledi

mu BCP z 0,8 mg/g, v majhnih količinah pa vsebuje tudi α -humulen, α -2-pinен, β -2-pinен, terpinolen in trans- β -farnezen (Bedrocan International).

2.2 Ekstrakcija konoplje

Pri ekstrakciji konoplje smo sledili predvsem protokolu Barama in drugih (2019) z nekaj spremembami. Iz vsake izmed petih različic konoplje smo naredili dva ekstrakta, dekarboksliranega in nedekarboksiliranega, torej smo imeli na koncu deset ekstraktov. Najprej smo rastlinski material, ki je prišel v 5–gramske embalaži, z električnim mlinčkom zmleli, da smo dobili prah. 10 gramov praha smo s topoto dekarboksilirali. Dekarboksilacijo konoplje smo izvedli v vnaprej ogreti pečici na 130 °C in pustili 1 uro. Celotna pečica je bila zaradi varnostnih razlogov v digestoriju. Digestorij je omari podoben zastekljen prostor, ki preprečuje, da bi se škodljivi plini, ki so nastali med poskusom širili v prostor. Medtem smo začeli z ekstrakcijo nedekarboksiliranega prahu. V bučko smo natehtali 10,0 gramov suhega materiala in dodali 250 ml absolutnega etanola, katerega smo odmerili s pomočjo merilnega valja. Bučko smo nato zatesnili in jo postavili v ultrazvočno kadičko za 30 minut. V ultrazvočni kopeli (slika 3) se aktivne spojine ločijo od delcev konoplje (Baram, in drugi, 2019). Za ultrazvočno metodo ekstrakcije smo se odločili, ker je glede na raziskavo Rožanca in drugih (2021) imela ta ekstrakcija največji izkoristek fenolov (Rožanc, in drugi, 2021).



Slika 3: Ultrazvočna kopel (lastni vir).

Bučko smo nato postavili na stresalnik za 15 minut pri 120 obratih na minuto. Po 15 minutah smo rastlinski material vakuumsko odfiltrirali. To smo naredili z erlenmajerico, na katero smo namestili lij, nanj pa filtrirni papir (slika 4). Erlenmajerica je imela odprtino za namestitev vakuma, s katerim smo pospešili postopek in povečali izkoristek.



Slika 4: Priprava za vakuumsko filtriranje (lastni vir).

Prefiltrirano tekočino smo nato prelili v bučko, to pa namestili na vakuumski rotacijski izparjevalnik (Rotavapor® R- 100, BÜCHI Labortechnik AG) (slika 5). Polovičko bučke smo potopili v vodo, ki je imela 38 °C, in vklopili vrtenje ter začeli postopoma zniževati tlak, do prib. 10 mbar. To smo pustili dokler ni ves etanol izhlapel.



Slika 5: Vakuumski rotacijski izparjevalnik (lastni vir).

Končni ekstrakt smo z žličko postrgali iz bučke in ga prestavili v manjše stekleničke. V zadnjem koraku smo stekleničke z ekstrakti čez noč pustili v liofilizatorju (VirTis BenchTop 6K, SP Industries Inc., Warminster, PA, USA) (slika 6), kjer smo dokončno odstranili ves etanol. Do uporabe smo ekstrakte hranili na - 20 °C.



Slika 6: Liofilizator (lastni vir).

Postopek smo ponovili za vseh 5 sort konoplje. Po dekarboksilaciji ostalih 5 vzorcev smo počakali, da so se ti ohladili in tudi z njimi izvedli enak postopek.

2.3 Visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC)

Za izvedbo HPLC metode je potrebna posebna naprava, uporabljen je bil Vanquish Core HPLC sistem (Thermoscientific, Waltham, USA) opremljen z VC-D11-A PDA detektorjem (Thermoscientific, Waltham, USA) in kolumnom Accucore 150×2.1 mm C18, velikosti $2.6 \mu\text{m}$ (Thermoscientific, Waltham, USA). HPLC smo izvajali po metodi, ki jo je razvil Waters (Aubin, Layton, & Helmueller, 2018) in jo prilagodili našemu sistemu. Topilo, uporabljeno v stacionarni fazi A je 0.1 % trifluorocetna kislina z vodo, v stacionarni fazi B pa acetonitril. Pretočnost skozi sistem je bila nastavljena na 0,4 ml/min. Separacija spojin je bila dosežena z uporabo gradientov: 0 - 20.0 min je koncentracija topila A naraščala 49,0–52,0 %; 20.0–40.0 min, je koncentracija topila A ponovno naraščala 52,0–60,0 %; 40.0–58.4 min, je bila koncentracija topila A konstantno 60,0 %; 58.4–58.5 min, je koncentracija topila A hitro padala 60,0–49,0 %, Na koncu 85.5–62.0 min pa je bila koncentracija topila A ponovno konstantna 49,0%. Gradienti so bili določeni s poskušanjem, da je na tak način mogoče razbrati rezultate. Elucija spojin je bila narejena na valovni dolžini 280 nm.

Meritveni standardi so bili pripravljeni kot mešana raztopina vseh standardov (CBDV-A, CBPV, CBD-A, THCV, CBG-A, CBD, CBG, THCV-A, CBN, d9-THC, d8-THC, CBL,

THC-A, CBC, CBL-A, CBC-A) in metanola. Koncentracije vsakega standarda so bile: 3,125, 10,00, 31,25 in 62,50 mg/ml, z izjemo CBL-A-ja, pri katerem so bili standardi polovični: 1,563, 3,125, 10,00 in 31,25 mg/ml. Poleg mešane raztopine smo pomerili tudi posamezne standarde, da smo lahko določili retencijski čas oz. čas, ko detektor zazna spremembo in se na grafu izriše vrh.

Šele nato so se začele meritve ekstraktov. Vse ekstrakte smo v koncentraciji 10–20 mg/ml raztopili v etanolu, da je bila dosežena popolna topnost in nato ponovno redčili v razmerju 1 : 10 in 1 : 100. Nižja koncentracija je bila pripravljena za določanje glavnih komponent ekstraktov, višja koncentracija pa nam je pomagala zaznati tudi kanabinoide, ki se v ekstraktu nahajajo v manjši koncentraciji. Oba rezultata sta bila združena, da bi dobili celotno sestavo ekstraktov.

2.4 Celične kulture

Uporabili smo 4 različne celične linije melanoma. Od tega je bila ena celična linija melanoma, ki je že metastaziral. SK-MEL2 (HTB-68) je celična linija, izolirana iz kožnega tkiva 60-letnika z mutacijo na genu NRAS (Q61R), kupljena pri proizvajalcu American Type Culture Collection (ATCC), ki se nahaja v Virginiji. Tri celične linije so bile primarne celične linije. SK-MEL28 (HTB72) je celična linija celic melanocit z mutacijo na genu BRAF (V600E), proizvajalca ATCC, izolirana iz kožnega tkiva 51-letnega moškega. MEL-JUSO (ACC74) je primarna celična linija, pridobljena od 58-letne ženske z melanomom, z mutacijo gena NRAS (Q61L). Kupljena je bila pri proizvajalcu Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), ki se nahaja v Braunschweigu. WM1366 (WC00078) je celična linija, kupljena pri The Wistar Institute of Anatomy and Biology, ki se nahaja v Filadelfiji. Je primarna celična linija 79 let starega moškega z melanomom, pri katerem je prisotna mutacija na genu NRAS (Q61L). Pri raziskavi smo uporabili tudi dve liniji zdravih kožnih celic. Uporabili smo celice Detroit 551, to so kožni fibroblasti, ki se nahajajo v usnjici zdravega svetlopoltega ženskega embrija, kupljene so bile pri proizvajalcu ATCC. Uporabili smo tudi celice HACAT, ki so keranocite, katere se nahajajo v povrhnjici, in jih je za raziskavo podarila Prof. dr. Elsa Fabbretti iz Univerze na Primorskem. Celice smo inkubirali v Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 mediju podjetja Thermo Fisher Scientific in v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂.

2.4.1 Test celične viabilnosti

Za pripravo ekstraktov za celične teste smo ekstrakte raztopili v dimetil sulfoksidu (DMSO) v koncentraciji 20 mg/ml. Tako pripravljene ekstrakte smo nato dalje redčili v celičnem mediju, da smo pripravili ekstrakte v koncentracijskem območju med 5 µg/ml in 25 µg/ml.

V plošče s 96 vodnjaki smo napisali 10 000 celic na en vodnjak in jih pustili čez noč v inkubatorju. Primer eksperimentalne zasnove je prikazan na sliki 7. V vsak vodnjak smo dodali določeno koncentracijo ekstraktov v mediju in nato ponovno inkubirali 48 ur. Za analizo celične viabilnosti smo uporabili Alamar Blue test. Po 48 urah inkubacije smo odstranili celični medij z ekstrakti in dodali svež medij z Alamar Blue reagentom v koncentraciji 16 µg/ml. Plošče smo ponovno inkubirali 4 ure. Ob dodatku tega barvila se v prisotnosti metabolno aktivnih celic modra, ne-flourescentna molekula resazurina spremeni v rdeče flourescentno molekulo resufurina. Po inkubaciji smo pustili plošče na orbitalnem stresalniku za 5 minut in nato izmerili flourescentno jakost na Ex 530–560nm / Em 590nm z Varioscan spektrofotometrom (Thermoscientific, Waltham, USA). Pomerili smo tudi flourescentno jakostjo kontrole, kateri nismo dodali ekstraktov ampak le DMSO in je bila določena na 100 %, celično viabilnost ostalih vzorcev pa smo izračunali glede na dobljeno kontrolo.

Slika 7: Primer eksperimentalne zasnove (lastni vir).

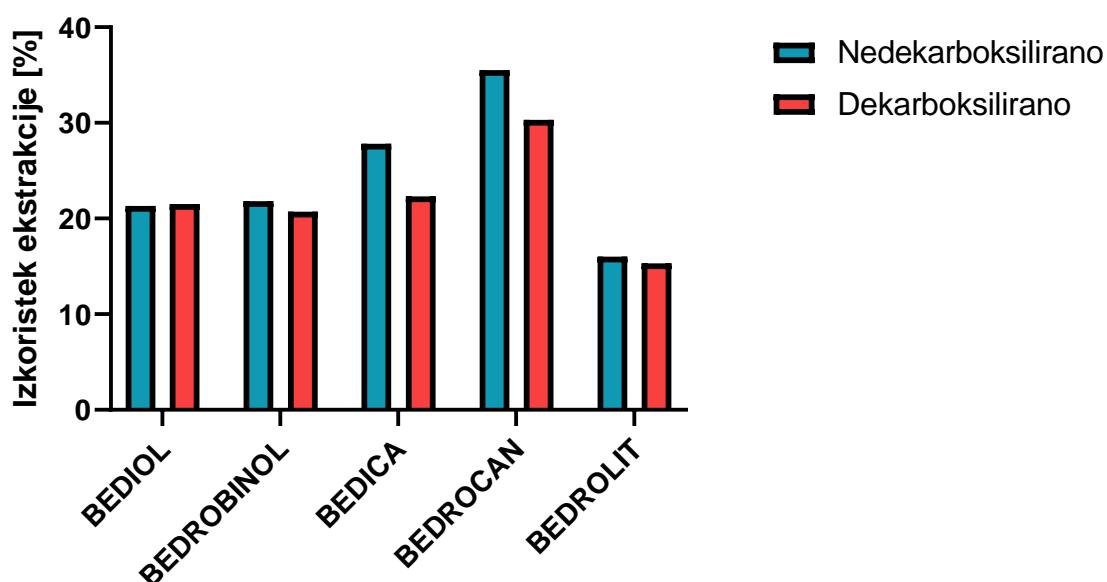
2.5 Obdelava podatkov

Vse podatke in grafe smo obdelali z uporabo programa GraphPad Prism, s katerim smo izračunali povprečje meritev in standardne deviacije. Za statistično analizo podatkov smo uporabili T-test za neodvisne vzorce. S tem smo preverjali, če obstajajo statistično značilne razlike med neodvisnimi skupinami celic. P-vrednosti manjše od 0,05 smo ovrednotili kot statistično značilne.

3 REZULTATI

3.1 Ekstrakcije

Pridobljene ekstrakte konoplje smo najprej stehtali in izračunali masni izkoristek pridobljenih ekstraktov iz rastlinskega materiala. Slika 8 prikazuje izkoristek ekstrakcije vseh petih uporabljenih vrst ekstraktov konoplje (Bedrocan, Bedrolite, Berdobinol, Bedica in Bediol) v dekarboksilirani in nedekarboksilirani obliki. V vseh vrstah, razen pri Bediolu, lahko vidimo, da je izkoristek nedekarboksiliranih ekstraktov nekoliko večji kot izkoristek dekarboksiliranih ekstraktov.

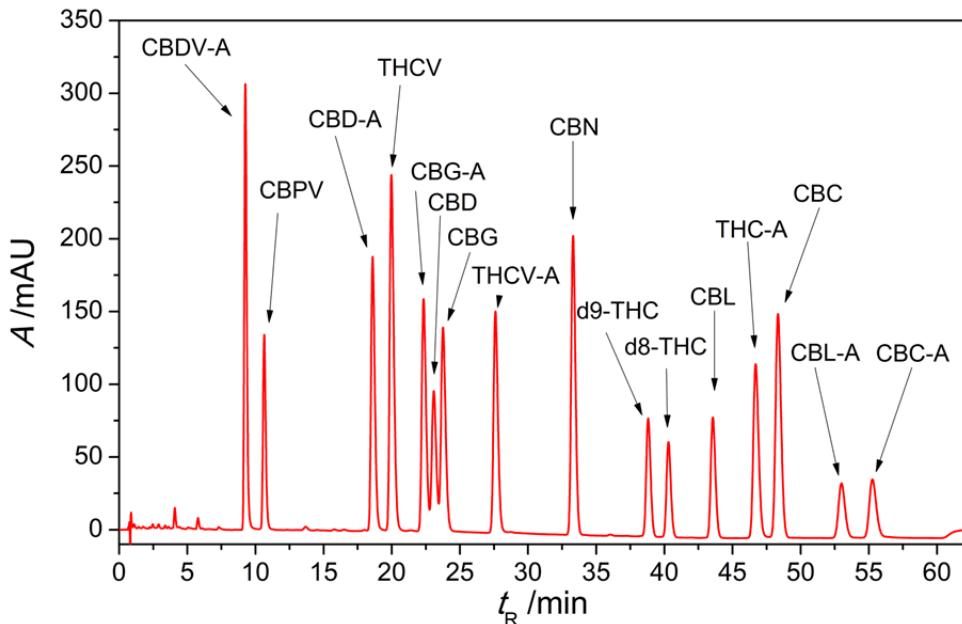


Slika 8: Izkoristek ekstrakcije različnih vrst konoplje.

3.2 Analiza kanabinoidov

Nato smo nadaljevali z analizo kanabinoidov, ki smo jo izvedli s pomočjo metode HPLC. Kot je razvidno iz slike 9, vrstni red elucije v našem sistemu nekoliko odstopa od vrstnega reda, navedenega v izvirni metodi (Aubin, Layton, & Helmueller, 2018). Razlog za to so manjša odstopanja v sestavi mobilne faze, ki dokaj enostavno spremenijo retencijski čas več vrhov (npr. vrha CBD). Dobljeni vrstni red elucije je CBDV-A, CBPV, CBD-A, THCV, CBG-A, CBD, THCV-A, CBN, d9-THC, d8-THC, CBL, THC-A, CBC, CBL-A in CBC-A. S pomočjo kromatogramov standardov (slika 9) smo sestavili umeritvene krivulje. Na koncu smo izmerili

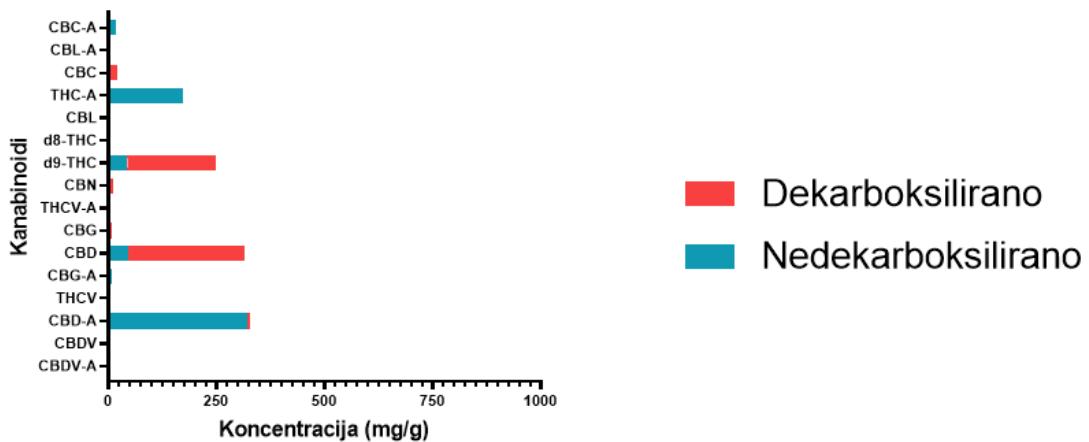
kromatograme raztopin vzorcev. Spojine v vzorcu so bile določene s primerjavo retencijskega časa in UV/Vis spektra spojin z UV/Vis spektri in retencijskimi časi standardov. Na koncu smo za vsak ekstrakt pripravili dve raztopini.



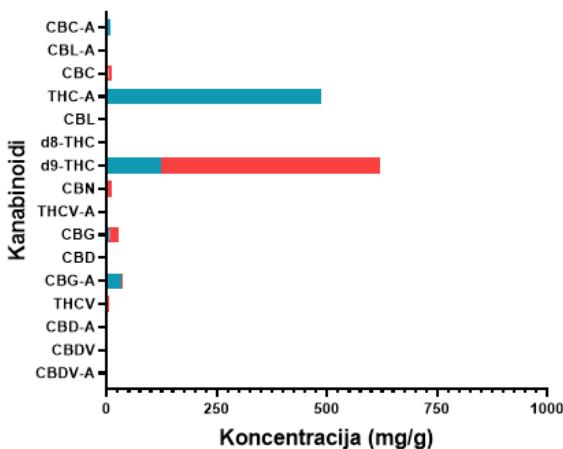
Slika 9: Kromatogram raztopine vseh uporabljenih standardov. Koncentracije vseh standardov, razen CBL-A, na tem kromatogramu znašajo 62,50 mg/ml, koncentracija CBL-A pa 31,25 mg/ml.

Po meritvah standardov in izrisu umeritvenih krivulj smo pomerili naše ekstrakte. Imeli smo 5 različnih vrst ekstraktov, znotraj vsake vrste ekstrakta pa še dekarboksilirano in nedekarboksilirano obliko. Na sliki 10 so razvidne koncentracije 16 kanabinoidov: CBDV-A, CBPV, CBD-A, THCV, CBG-A, CBD, CBG, THCV-A, CBN, d9-THC, d8-THC, CBL, THC-A, CBC, CBL-A in CBC-A v petih različnih vrstah konopljinih ekstraktov. V vseh vrstah ekstraktov lahko vidimo, da v nedekarboksiliranih ekstraktih prevladujejo kislinske oblike kanabinoidov, npr. CBD-A in THC-A. V dekarboksiliranih pa prevladujejo nekislinske oblike, kot sta CBD in THC, kar nakazuje na uspešno izveden proces dekarboksilacije. Zanimiv je graf Bedrolita, kjer je v nedekarboksiliranem ekstraktu koncentracija CBD-A-ja 722,4 mg/g, v dekarboksilirani pa je koncentracija CBD-ja le 202,62 mg/g.

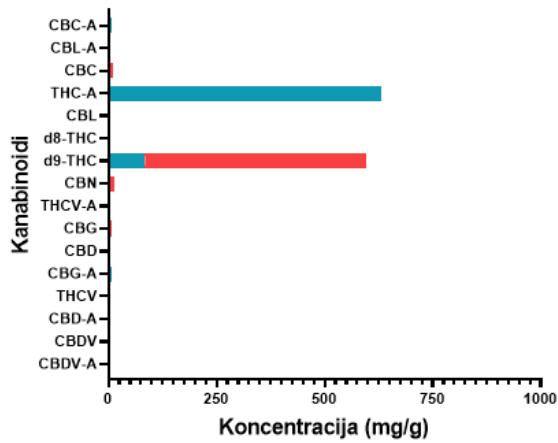
BEDIOL



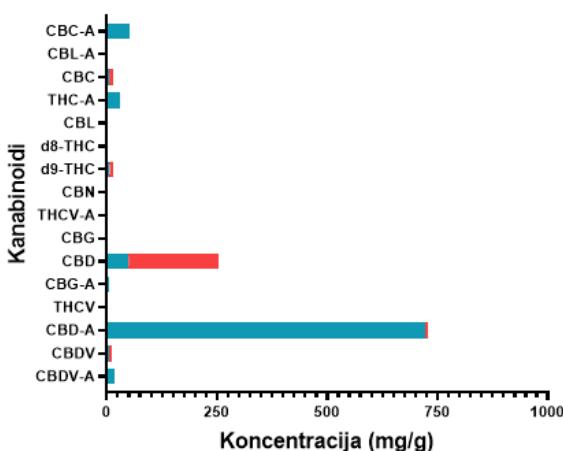
BEDICA



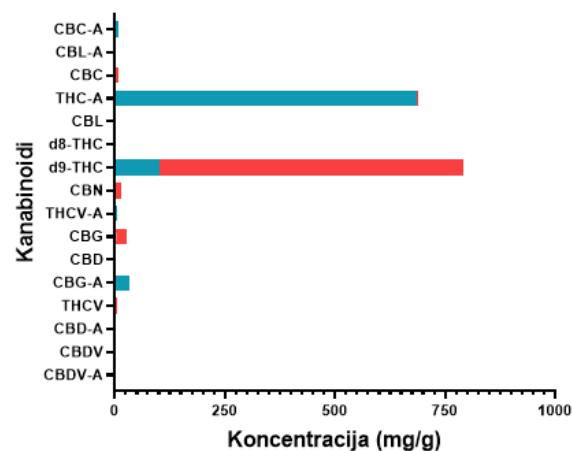
BEDROBINOL



BEDROLITE



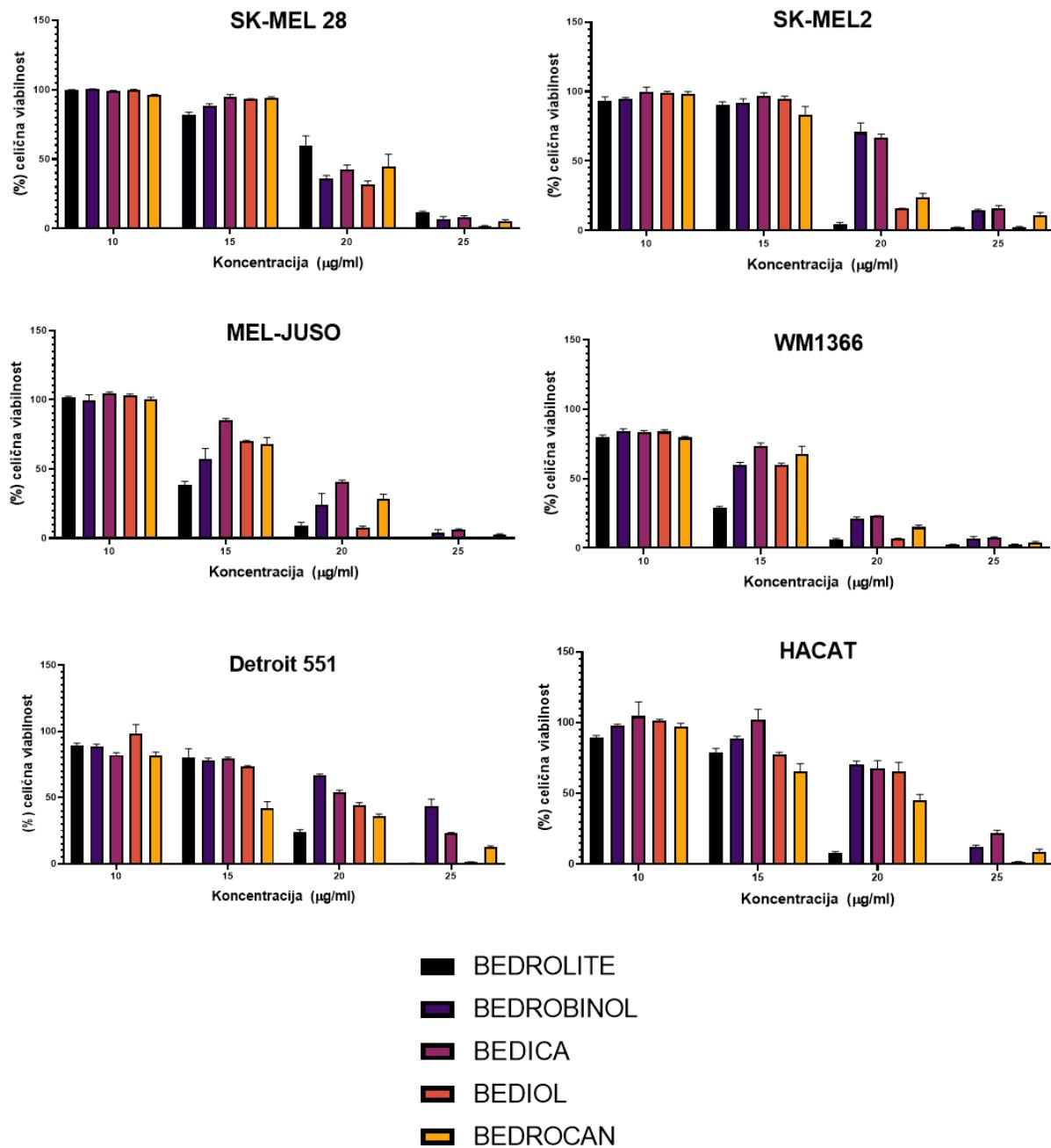
BEDROCAN



Slika 10: Koncentracije 16 kanabinoidov v ekstraktih konoplje.

3.3 Celične analize

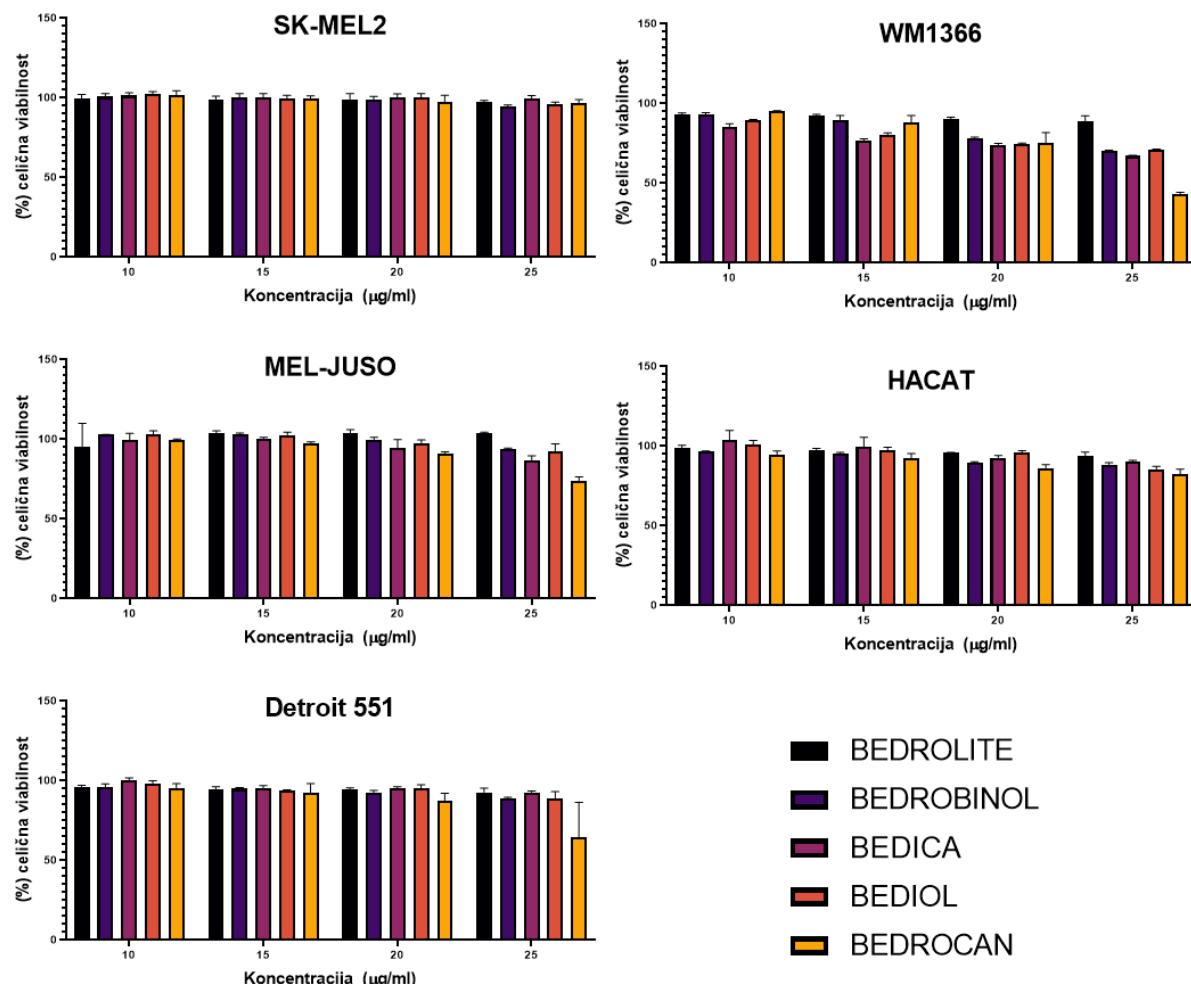
Testi celične viabilnosti so bili izvedeni na različnih celičnih linijah melanoma ter zdravih kožnih celicah . Celice so bile 48 ur izpostavljene različnim koncentracijam (0, 10, 15, 20 in 25 µg/ml) ekstraktov. Celična viabilnost v odstotkih (%) je izračunana glede na kontrolo, kateri nismo dodali ekstrakta, vendar le DMSO in je bila določena na 100 %. Za vsako celično linijo, ki smo ji dodali določeno koncentracijo nekega ekstrakta smo naredili štiri ponovitve. Slika 11 prikazuje vpliv različnih koncentracij (10, 15, 20 in 25 µg/ml) dekarboksiliranih ekstraktov na celično viabilnost melanomskeh celic SK-MEL2, SK-MEL28, MEL-JUSO in WM1366 ter zdravih celic Detroit 551 in HACAT. Pri koncentraciji 10 µg/ml lahko vidimo, da se celična viabilnost ni bistveno zmanjšala. Nekoliko se je zmanjšala le pri melanomski celični liniji WM1366 in minimalno pri obeh zdravih celičnih linijah. Pri koncentraciji 15 µg/ml so že vidni večji učinki, predvsem na celični liniji MEL-JUSO in WM1366. Tako v celični liniji MEL-JUSO kot tudi WM1366 je najbolj protitumorno deloval Bedrolite. Pri celični liniji MEL-JUSO je bila celična viabilnost manj kot 40 %, pri celični liniji WM1366 pa manj kot 30 %. Najmanjši vpliv je imela vrsta Bedica. Pri koncentraciji 20 µg/ml pa je bila pri vseh celicah, tudi zdravih, zmanjšana celična viabilnost. Pri vseh, razen pri celični liniji SK-MEL 28, je Bedrolite najbolj zmanjšal celično viabilnost, pri celični liniji SK-MEL 28 pa je Bedrolite najmanj zmanjšal celično viabilnost. Opazimo lahko trend pri katerem se vidi manjše zmanjšanje celične viabilnosti zdravih celičnih linij kot melanomskeh, razen v primeru Bedrolita. Bedrobinol in Bedica imata izrazito majhen vpliv na SK-MEL 2 celično linijo v primerjavi z ostalimi vrstami konoplje. Koncentracija 25 µg/ml je pri vseh celičnih linijah zmanjšala celično viabilnost. Najmanj se je celična viabilnost zmanjšala pri zdravih celičnih linijah z dodanim Bedrobinolom in Bedico. T-test kaže, da je razlika med celično viabilnostjo vseh celičnih linij, ki smo jim dodali najnižjo koncentracijo ekstrakta (10 µg/ml), in celično viabilnostjo vseh celičnih linij, ki smo jim dodali najvišjo koncentracijo ekstrakta (25 µg/ml), statistično pomembna ($p < 0,05$).



Slika 11: Vpliv različnih koncentracij dekarboksiliranih ekstraktov konoplje na celično viabilnost (+/- 1 standardna deviacija).

Slika 12 prikazuje vpliv različnih koncentracij (10, 15, 20 in 25 µg/ml) nedekarboksiliranih ekstraktov na celično viabilnost melanomskih celic SK-MEL2, MEL-JUSO in WM1366 ter zdravih celic Detroit 551 in HACAT. Pri skoraj vseh koncentracijah in celicah vidimo, da je vpliv ekstraktov na celično viabilnost minimalen. Opazni rezultati so le pri celični liniji WM1366, kjer se je pri koncentraciji 20 µg/ml zmanjšala viabilnost celic za približno 20%, ko

smo jim dodali Bedrobinol, Bedico, Bediol ali Bedrocan, ter pri koncentraciji 25 µg/ml celičnih linij WM1366, MEL-JUSO in Detroit 551, kjer se je celična viabilnost zmanjšala predvsem vzorcem, ki smo jim dodali Bedrocan.

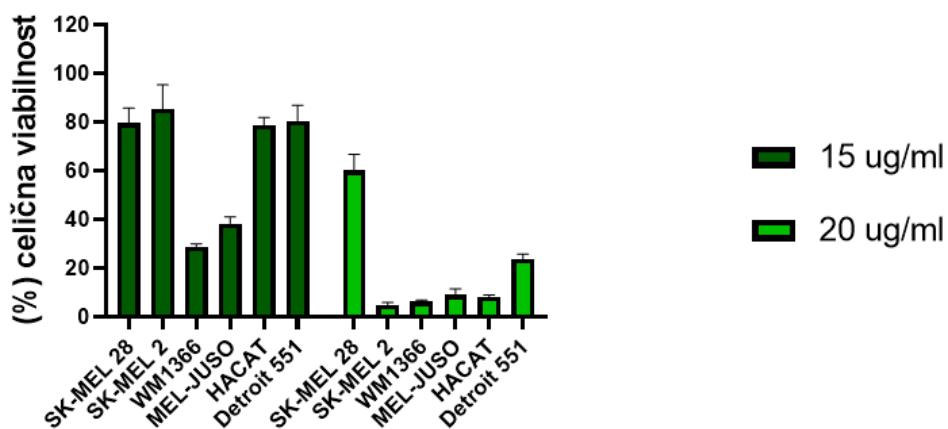


Slika 12: Vpliv različnih koncentracij nedekarboksiliranih ekstraktov konoplje na celično viabilnost (+/- 1 SD).

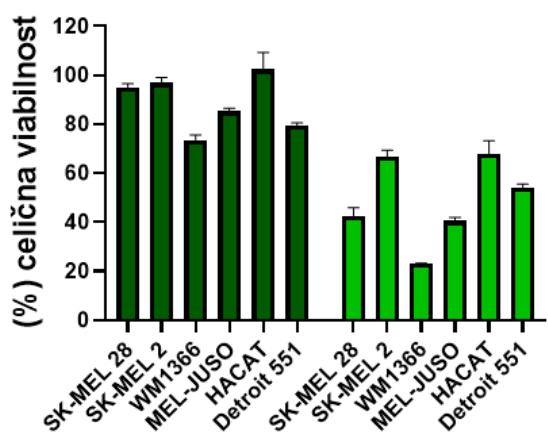
V naslednjem koraku smo želeli narediti primerjavo posameznih dekarboksiliranih ekstraktov na različne celične linije. Slika 13 prikazuje vpliv najbolj optimalnih koncentracij dekarboksilirane konoplje torej 15 in 20 µg/ml na celično viabilnost vseh šestih celičnih linij. Vidimo lahko, da se je celična viabilnost ob dodanem Bedrolitu pri koncentraciji 15 µg/ml zmanjšala predvsem pri celičnih linijah WM1366 in MEL-JUSO, celična viabilnost zdravih celic pa se je le malo zmanjšala. T-test kaže, da je razlika med obema melanomskima celičnima linijama in obema zdravima linijama statistično pomembna ($p < 0,05$). Pri koncentraciji 20

$\mu\text{g}/\text{ml}$ se je zmanjšala celična viabilnost vseh celic, izvzemši celične linije SK-MEL 28. Pri Bedici, Bedrobinolu in Bediolu, pri koncentraciji 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ne vidimo pomembnega zmanjšanja celične viabilnosti. Zanimivo je, da Bedrocan pri koncentraciji 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ povzroči najmanjšo celično viabilnost ravno zdrave celične linije (Detroit 551). Pri koncentraciji 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vidimo večji učinek, torej manjšo viabilnost vseh celic. Pri Bedici in Bedrobinolu se je celična viabilnost zmanjšala predvsem celičnim linijam WM1366, SK-MEL 28 in MEL-JUSO, pri tem pa je celična viabilnost zdravih celic ostala dokaj visoka. T-test potrjuje statistično signifikantno razliko med temi tremi melanomskimi celičnimi linijami in zdravima celičnima linijama ob dodanem ekstraktu Bedice ali Bedrobinola v koncentraciji 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0,05$). Bedrocan je zmanjšal celično viabilnost vseh celic, tudi zdravih. Pri koncentraciji 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dodanega Bediola se je zmanjšala celična viabilnost predvsem melanomskih celičnih linij. Celična viabilnost zdravih celičnih linij je bila pri HACAT celični liniji prib. 66 %, pri celični liniji Detroit 551 pa 45 %, kar je še zmeraj dober rezultat, saj je celična viabilnost večja kot pri melanomskih celičnih linijah, pri katerih se je gibala med 30 % in 6 %. Če naredimo T-test in primerjamo celično viabilnost melanomskih celičnih linij s celično viabilnostjo obeh zdravih celičnih linij ob dodanem Bediolu v koncentraciji 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, lahko potrdimo, da so naši rezultati statistično pomembni ($p < 0,05$).

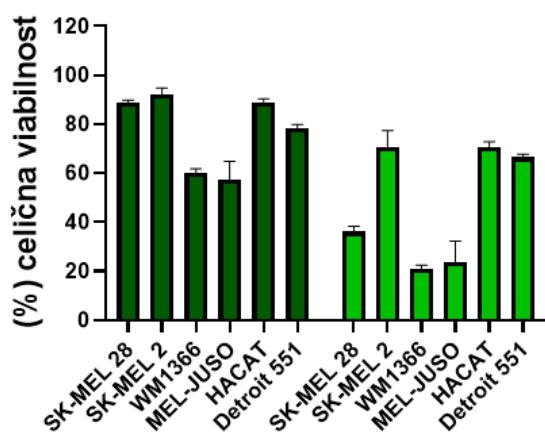
Bedrolite



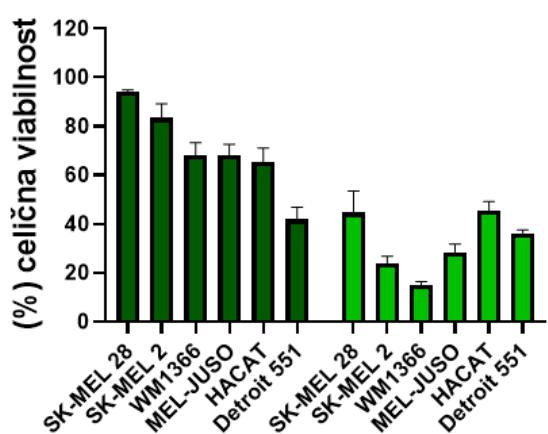
Bedica



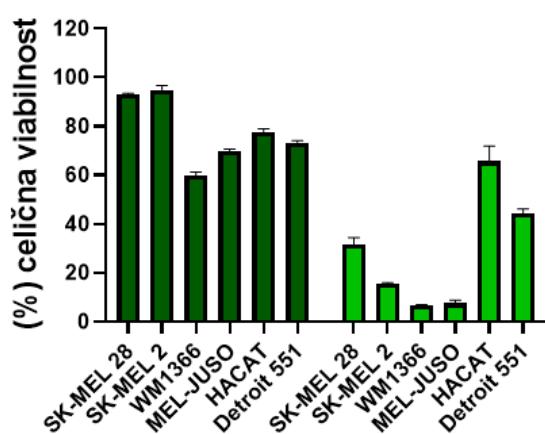
Bedrobinol



Bedrocan

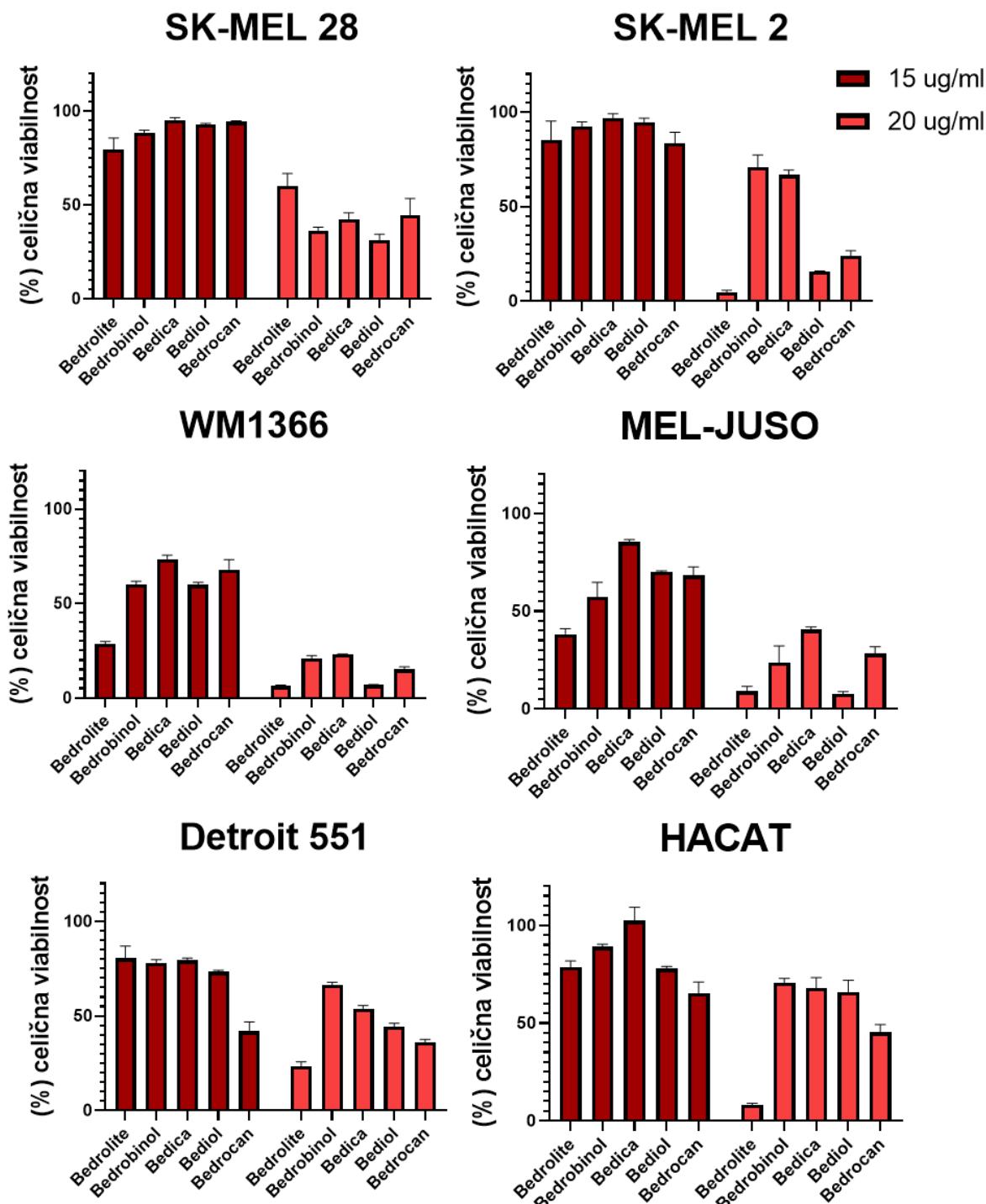


Bediol



Slika 13: Primerjava vpliva posameznih dekarboksiliranih ekstraktov pri koncentracijah 15 in 20 µg/ml na različne celične linije (+/- 1 SD).

V zadnjem koraku smo naredili še primerjavo različnih dekarboksiliranih ekstraktov znotraj posameznih celičnih linij. Na sliki 14 je prikazano, na katere celične linije so imele različne vrste ekstraktov konoplje največji učinek pri koncentracijah 15 in 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, saj sta se ti koncentraciji izkazali za najuspešnejši. Pri celični liniji SK-MEL 28 so vse vrste ekstraktov konoplje pri koncentraciji 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ imele nespremenjeno oz. minimalno zmanjšano celično viabilnost, v nasprotju s koncentracijo 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pri kateri se je celična viabilnost ob vseh dodanih vrstah konoplje zmanjšala na 27–65%. Linija SK-MEL 2 je imela pri koncentraciji 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ podobno celično viabilnost kot kontrola, kar pomeni, da se ta ni zmanjšala. Pri tej liniji pa pri koncentraciji 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vidimo močan učinek predvsem Bedrolita pa tudi Bediola in Bedrocana. Bedrobinol in Bedica sta minimalno zmanjšala celično viabilnost celične linije SK-MEL 2. Konoplja se je pri celični liniji WM1366 že pri koncentraciji 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ izkazala za precej toksično, predvsem vrsta ekstrakta konoplje Bedrolite. Pri koncentraciji 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ je pri tej liniji celična viabilnost zelo nizka, pri vseh vrstah ekstraktov je manjša kot 25 %. Tudi celična linija MEL-JUSO deluje precej občutljivo na konopljo. Pri koncentraciji 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se je celična viabilnost najbolj zmanjšala ob dodanem Bedrolitu, pri 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pa sicer pri Bedrolitu in Bediolu, vendar so tudi ostale tri vrste konopljinih ekstraktov zmanjšale celično viabilnost pod 41 %. Zanimivo je, da je pri koncentraciji 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ na obe zdravi celični liniji (Detroit 551 in HACAT) najbolj vplival Bedrocan, ki pri rakavih celicah ni imel najmočnejšega učinka. Pri celični liniji Detroit 551 je bila pri koncentraciji 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ celična viabilnost ob vseh dodanih ekstraktih, izvzemši Bedrocan, pri katerem je bila manjša, prib. 80 %. Pri koncentraciji 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pa je najmanjša celična viabilnost v vzorcih z dodanim Bedrolitom, tj. 24 %. Celična linija HACAT je bila na vse vrste in koncentracije konoplje precej odporna, z izjemo Bedrolita s koncentracijo 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ki je povzročil smrt oz. prekinitev metabolizma v 92 % celic.



Slika 14: Primerjava učinkovitosti različnih dekarboksiliranih ekstraktov na celično viabilnost pri posameznih celičnih linijah (+/- 1 SD).

4 RAZPRAVA

Da bi lahko dosegli glavni namen raziskovalne naloge, ta je bil raziskati morebitne učinke konoplje na celične linije melanoma, smo morali najprej izvesti ekstrakcijo konoplje. Ekstrakte smo nato s pomočjo metode HPLC okarakterizirali, da smo lahko nadalje sklepali o vplivih različnih kanabinoidov v konoplji na melanom. Opazimo lahko, da imajo različne vrste ekstraktov različne kanabinoidne profile. Če primerjamo kanabinoidne profile dekarboksiliranih ekstraktov s kanabinoidnimi profili, ki jih navaja proizvajalec (Bedrocan International), opazimo, da so si zelo podobni. S tem lahko potrdimo troje, uspešnost ekstrakcije, dekarboksilacije in tudi HPLC metode. Če primerjamo dekarboksilirane in nedekarboksilirane kanabinoidne profile ekstraktov, lahko vidimo, da v nedekarboksiliranih prevladujejo kislinske oblike kanabinoidov, medtem ko jih v dekarboksiliranih ni, ali pa v so v minimalni količini. V večini ekstraktov so se kislinske oblike npr. THC-A in CBD-A pretvorile v nekislinske kot sta THC in CBD. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi drugi raziskovalci, ki so uporabljali podobne metode ekstrakcije in dekarboksilacije, kar potrdi uspešnost naše metode (Lim Kim, in drugi, 2022). Izjema pa je kanabinoidni profil Bedrolita, kjer se je iz kislinske oblike CBD-A v nekislinsko obliko CBD pretvorilo le prib. 28 %. Razlog za to bi lahko bila kompleksnost kanabinoidov in njihove zmožnosti pretvarjanja iz ene oblike v drugo. Kot kaže slika 1 je možnih veliko reakcij s pomočjo katerih se lahko kanabinoidi pretvarjajo iz ene oblike v drugo, možno je, da so se poleg dekarboksilacije vrstile druge reakcije, ki so pretvorile molekulo CBD-A v CBD in tudi v neko drugo molekulo. Ta druga molekula pa kot vidimo iz slike 10, iz grafa Bedrolita ni bila ena izmed 16 testiranih kanabinoidov. Težko sklepamo, v katero se je pretvorila, saj ima konoplja izjemno pestro kemijsko sestavo, poleg več kot 100 različnih kanabinoidov vsebuje še mnoge terpene in terpenoide. Do podobnega sklepa so prišli tudi Moreno in drugi (2020), ki so prav tako ugotovili, da je med dekarboksilacijo prišlo do le delne pretvorbe iz kislinske oblike CBD-A v nekislinsko CBD (Moreno, Dyer, & Tallon, 2020). Podobno so ugotovili tudi Iffland in drugi (2016) le v primeru THC-ja, kjer se je iz kislinske v nevtralno obliko pretvorilo le 33 % (Iffland, Carus, & Grotenhermen, 2016). Zaradi teh ugotovitev so Citti in drugi (2018) izvedli raziskavo, v kateri so ugotovili, da je ekstrakcija še posebej CBD-ja uspešna pri nižji eno- do dvourni izpostavljenosti temperaturi prib. 90 °C, kar pa je manj kot v našem primeru. Da bi izboljšali uporabljeni metodo, bi lahko pri ekstraktih z visoko vsebnostjo CBD-ja izvedli dekarboksilacijo po njihovem zgledu. Citti in drugi (2018) razlagajo, da se to zgodi zaradi

procesov razgradnje (Citti, Pacchetti, Vandelli, Forni, & Cannazza, 2018). Razmerje med THC-jem in CBD-jem se je po ekstrakciji spremenilo, saj so se kislinske oblike spremenile v nevtralne in so bile te ključne za določanje končnega razmerja med THC in CBD. Z danimi rezultati lahko potrdimo našo prvo hipotezo, ki pravi, da bodo imele različne sorte konoplje različne kanabinoidne profile in da se bo po dekarboksilaciji povečala koncentracija CBD-ja in THC-ja, razmerje med CBD-jem in THC-jem pa bo spremenjeno.

Po analizi kanabinoidnih profilov smo preverili vpliv različnih konopljinih ekstraktov tako na celičnih linijah melanoma kot tudi zdravih celičnih linijah. Pri primerjavi vpliva dekarboksiliranih in nedekarboksiliranih ekstraktov na viabilnost celičnih linij so bile vidne očitne razlike. Nedekarboksilirane oblike imajo v testiranih koncentracijah zelo majhen učinek torej glede na kontrolo skoraj ne-spremenjeno celično viabilnost. V nasprotju z dekarboksiliranimi oblikami ekstraktov, kjer se je celična viabilnost zmanjšala. Ker poznamo glavne razlike med kemično zgradbo dekarboksiliranih in nedekarboksiliranih oblik ekstraktov, lahko sklepamo, da zaviranje rasti celic in prekinitev metabolizma povzročajo predvsem nevtralne oz. nekislinske oblike kanabinoidov. Do podobnih zaključkov so prišli tudi Baram in drugi (2019), ki so sicer proučevali vpliv konopljinih ekstraktov na raku na prostate. Ugotovili so, da so dekarboksilirani izvlečki močneje zavirali rast celic, z izjemo ene vrste raka na prostate, kjer je bila uspešnejša nedekarboksilirana oblika. Ti rezultati poudarjajo selektivno naravo vpliva ekstraktov konoplje na preživetje določene rakave celične linije (Baram, in drugi, 2019). S tem ovržemo prvi del druge hipoteze, ki pravi, da bodo imeli tako dekarboksilirani, kot tudi nedekarboksilirani ekstrakti konoplje vpliv na celične linije melanoma. Vendar trdimo lahko le, da nedekarboksilirane oblike ekstraktov nimajo vpliva oz. imajo minimalen vpliv na celice v testiranih koncentracijah, sklepamo pa lahko, da bi se ob višjih koncentracijah lahko pokazali učinki zaviranja rasti in ustavitev celičnega metabolizma tako melanomskeih kot tudi zdravih celičnih linij. Če primerjamo vpliv ekstraktov na zdrave in melanomske celice, lahko vidimo, da imajo ekstrakti vpliv na obojne. Razlika med vplivom na zdrave celične linije in melanomske celične linije je statistično pomembna. Vendar lahko vidimo, da to velja le za nižje koncentracije, v višjih koncentracijah se namreč celična viabilnost zmanjša tudi zdravim linijam. Drugega dela druge hipoteze, ki pravi, da izvlečki konoplje ne bodo imeli vpliva ali pa bo ta vpliv minimalen na melanomske celice, ne moremo potrditi. Res pa je, da je bil vpliv na zdrave celice manjši.

Osredotočili smo se na štiri koncentracije, ki so se najpogosteje pojavljale v literaturi, to so bile 10, 15, 20 in 25 µg/ml. Pri teh koncentracijah dekarboksiliranih ekstraktov konoplje smo opazili trend, da je odziv pogojen s koncentracijo, kar pomeni, da se z višanjem koncentracij ekstraktov manjša celična viabilnost, razlika je statistično pomembna. To lahko opazimo tudi pri nedekarboksiliranih ekstraktih, vendar je učinek minimalen. Tako smo potrdili našo tretjo hipotezo, ki pravi, da se bo z večanjem koncentracij ekstraktov manjšala celična viabilnost. Opazili smo tudi, da imajo različni ekstrakti pri istih koncentracijah različen vpliv na celično viabilnost različnih celičnih linij. Zanimivo je, da v večini odzivi z višanjem koncentracij ne ohranjajo enakega vzorca, vendar se pri različnih koncentracijah opazijo različne velikosti učinkov, kar namiguje na koncentracijsko selektivnost odzivov.

V nadalnjih analizah smo se osredotočili na najuspešnejše koncentracije, torej 15 in 20 µg/ml in na dekarboksilirane oblike ekstraktov, saj so ti pokazali večje učinke. Ker smo s pomočjo HPLC metode izmerili kanabinoidne profile ekstraktov, lahko sklepamo na povezave med vsebnostjo kanabinoidov in njihovim vplivom na celice. Celostno gledano je melanomskim in zdravim celičnim linijam najbolj zmanjšal celično viabilnost Bedrolite. Bedrolite ima visoko vsebnost CBD-ja, vendar še vseeno manjšo kot Bediol, ima pa vseeno največje razmerje med CBD-jem in THC-jem. Bediol, v katerem je razmerje med CBD-jem in THC-jem prib. 5 : 4, je pokazal zanimive rezultate, že pri nizki koncentraciji je zmanjšal celično viabilnost melanomskih celičnih linij in hkrati manj vplival na celično viabilnost zdravih celičnih linij. Najmanjše razmerje je v Bedici, Bedrobinolu in Bedrocanu in ti imajo tudi najmanjši vpliv na celično viabilnost celic. Glede na dane rezultate lahko vidimo, da večje kot je razmerje med CBD-jem in THC-jem, večji je vpliv ekstrakta na celične linije. Žitek in drugi (2022) so v svoji raziskavi prav tako uporabili ekstrakte konoplje z visoko vsebnostjo CBD-ja in ugotovljali njihov vpliv na melanomu in ugotovili so, da je ekstrakt s CBD-jem uspešno zmanjšal rast melanomskih celic (Žitek, in drugi, 2022). Marzeda in drugi (2022) so v svoji raziskavi uporabili namesto ekstraktov le CBD v različnih koncentracijah. Ugotovili so, da je CBD zmanjšal proliferacijo (rast in razmnoževanje) celic malignega melanoma, ob tem pa le za malo zmanjšal proliferacijo zdravih kožnih celic, celične linije HACAT (Marzeda, in drugi, 2022). Baram in drugi (2019) pa so v nasprotju z našo raziskavo pokazali, da so bili pri zaviranju proliferacije melanomskih celic uspešni predvsem izvlečki konoplje, ki so bili bogati s THC-jem. V raziskavi so uporabili tudi različne ekstrakte samega THC-ja, ki se pa ni izkazal za uspešnega, ugotovili so tudi, da je napovedovanje oz. sklepanje o vplivu posameznih spojin v

ekstraktu na celice nesmiselno, saj je pri konoplji zelo pomembno sinergijsko delovanje fitokanabinoidov in tudi drugih aktivnih molekul v konoplji (Baram, in drugi, 2019). Četrto hipotezo, ki pravi, da bodo imeli različni ekstrakti različen vpliv na celične linije melanoma, lahko potrdimo.

Prav tako nas je zanimalo, kako se različni tipi melanomskih celic glede na njihove mutacije in stopnje napredovanja odzovejo na posamezne ekstrakte. V raziskavi smo uporabili celične linije z NRAS ter BRAF mutacijami. Opazimo lahko, da so med različnimi vrstami melanomskih celičnih linij precejšnje razlike. Zanimiv je primer celične linije SK-MEL 28, ki je edina celična linija, ki ima prisotno mutacijo na genu BRAF (V600E) in le na njo Bedrolite ni vplival. Bedrolite, ki ima največje razmerje med CBD-jem in THC-jem, pa je imel zelo velik učinek na ostale celične linije s prisotno mutacijo NRAS, kar lahko nakazuje na to da Bedrolite močneje zavira rast celic s prisotnostjo NRAS mutacije. Vendar lahko ob primerjavi z zdravima celičnima linijama, ki nimata prisotne NRAS mutacije, ugotovimo, da to ne drži, saj je Bedrolite močno zmanjšal celično viabilnost tudi zdravih celic. Videti je tudi, da sta v primerjavi z drugimi celičnimi linijami celični liniji WM1366 in MEL-JUSO bolj občutljivi na vse ekstrakte. Možna razloga za to bi lahko bila mutacija na genu NRAS (Q61L), ki se pojavi le pri teh dveh celičnih linijah, vendar moramo vedeti, da je v celicah še mnogo mutacij, ki bi lahko vplivale na odziv. V našem primeru ni bilo nobene posebne povezave med različnimi stopnjami napredovanja melanoma ali različnimi mutacijami melanoma in celično viabilnostjo ob dodanih konopljinih ekstraktih, zato je zadnja hipoteza ovržena. Vendar lahko vseeno vidimo razlike v vplivu nekega ekstrakta na različne celične linije melanoma.

5 ZAKLJUČEK

V raziskovalni nalogi nas je zanimal predvsem vpliv konoplje na melanom, ampak ker predstavljata tako melanom kot tudi konoplja izjemno kompleksno tematiko, je bilo za obravnavo te tematike potrebnega kar nekaj predhodnega raziskovanja in branja literature. Najprej smo se osredotočili na pripravo rastlinskih materialov. Vemo, da ima konoplja več podvrst, v teh podvrstah pa še več različic. Izbrali smo material s kar se da raznolikimi kanabinoidnimi profili. Da smo dobili želeno obliko spojin v konoplji, smo morali izvesti proces dekarboksilacije. Po dekarboksilaciji smo izvedli ekstrakcijo dekarboksiliranih in tudi nedekarboksiliranih vzorcev in jim nato s pomočjo metode HPLC določili kanabinoidne profile. Ugotovili smo, da se ta po dekarboksilaciji spremeni, saj se kislinske oblike kanabinoidov

prevorijo v nevtralne oblike. Nato smo začeli s celičnimi analizami. Uporabili smo 4 vrste melanomskih celičnih linij in dve zdravi. Ugotovili smo, da so ekstrakti zavirali proliferacijo vseh celic, vendar je bil vpliv na zdrave celice bistveno manjši, s čimer smo potrdili selektivno učinkovitost. Dokazali smo, da različne vrste ekstraktov konoplje vplivajo na neko celično linijo precej različno in tudi to, da neka vrsta ekstraktov konoplje vpliva različno na različne celične linije melanoma. S tem smo ugotovili, da bi bil za uporabo konoplje v namene zdravljenja melanoma potreben personaliziran pristop k vsakemu bolniku s predhodno *in vitro* raziskavo njegovega tipa melanoma. Pri vseh štirih uporabljenih celičnih linijah je bil najučinkovitejši ekstrakt Bediola s koncentracijo 20 µm/ml, saj je zmanjšal proliferacijo vseh rakavih celic in hkrati ni imel velikega vpliva na zdrave celice. Pri celičnih linijah WM1366 in MEL-JUSO je bil zelo učinkovit tudi Bedrolite v koncentraciji 15 µm/ml, pri celičnih linijah SK-MEL 28, WM1366 in MEL-JUSO pa Bedrobinol v koncentraciji 20 µm/ml. Čeprav je na tem področju že kar nekaj raziskano, se moramo zavedati kompleksnosti problema. V tej raziskavi smo preverjali vpliv le 16 kanabinoidov na melanomu, poznamo pa jih več kot 100. Poleg teh pa konoplja vsebuje številne druge aktivne spojine, kot so terpeni. Zato bi bilo v prihodnje smiselno analizirati vplive različnih terpenov na melanomu in raziskati vplive konoplje tudi na druge bolezni. Zanimivo bi bilo poskusiti z uporabo standardov sestaviti specifično mešanico učinkovin, ki bi imela učinek na točno določeno vrsto raka.

6 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Raziskovalne naloge smo se lotili s poznavanjem in upoštevanjem osnovnih načel družbene odgovornosti. Naše raziskovanje je potekalo na podlagi predhodnih raziskav, npr. za ekstrakcijo smo izbrali metodo z ultrazvočno kopeljo, saj smo s tem dosegli najmanjšo možno porabo vhodnega materiala. Naloga je bila narejena na okolju kar se da prijazen način, z minimalno količino odpadkov, te pa smo v skladu s smernicami pravilno odstranili. Pomembno je tudi omeniti naš doprinos k rešitvi enega izmed najaktualnejših problemov v medicini, to je zdravilo za raka. Naša raziskava je pripomogla k temu, da smo korak bližje rešitvi. S to nalogo prav tako spodbujamo odgovorno percepcijo konoplje, saj ta rastlina v sebi skriva mnoge potenciale za uporabo v medicinske namene. Ta uporaba bi morala biti skrbno načrtovana s strani specialistov, ki se s tem ukvarjajo, saj, kot smo ugotovili, vsaka vrsta raka in tudi druge bolezni drugače odreagirajo na njeno prisotnost.

7 VIRI

- Abrams, I. D. (2022). *Cannabis, Cannabinoids and Cannabis-Based Medicines in Cancer Care.* Integrative Cancer Therapies. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.1177/15347354221081772>
- Aizpurua-Olaizola, O., Elezgarai, I., Rico, I., Zarandona, I., Etxebarria, N., & Usobiaga, A. (2016). *Targeting the endocannabinoid system: future therapeutic strategies.* Drug Discovery Today. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.08.005>
- Álvarez, L., Haro, A., Casanova, M., Guzmán, M., Blázquez, C., & González-Feria, L. (2004). *Cannabinoids Inhibit the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Gliomas.* Cancer research. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3927>
- Alves, P., Amaral, C., Teixeira, N., & Correia-da-Silva, G. (2020). *Cannabis sativa: Much more beyond Δ9-tetrahydrocannabinol.* Pharmacological Research, Volume 157. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104822>
- Andre, M. C., Hausman, J.-F., & Guerriero, G. (2016). *Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules.* Frontiers in Plant Science. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019>
- Armstrong, L., Hill, D., McKee, C., Hernandez-Tiedra, S., Lorente, M., Lopez-Valero, I., . . . Lovat, P. (2015). *Exploiting cannabinoid-induced cytotoxic autophagy to drive melanoma cell death.* Journal of Investigative Dermatology. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.1038/jid.2015.45>
- Aryal, S. (2022). *HPLC- Definition, Principle, Parts, Types, Uses, Diagram.* Microbe Notes. Pridobljeno iz <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>
- Aubin, J. A., Layton, C., & Helmueller, S. (2018). *Separation of 16 Cannabinoids in Cannabis Flower and Extracts Using a Reversed-Phase Isocratic HPLC Method.* Waters Corporation. Pridobljeno iz <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006426en.pdf>

Bachari, A., Piva, J. T., Alireza Salami, S., Jamshidi, N., & Mantri, N. (2020). Roles of Cannabinoids in Melanoma: Evidence from In Vivo Studies. *Int. J. Mol. Sci.* 21(17). Pridobljeno iz <https://doi.org/10.3390/ijms21176040>

Baram, L., Peled, E., Berman, P., Yellin, B., Besser, E., Benami, M., . . . Meiri, D. (2019). *The heterogeneity and complexity of Cannabis extracts as antitumor agents*. Oncotarget. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26983>

Basyal, P., & Regmi, P. (2021). *Ethnobotany, Taxonomy and Phytochemistry of Cannabis sativa*. International Journal of Medicine & Biomedical Sciences. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.55530/ijmbiosnepal.v5i2.37>

Bauer, J., A. Curtin, J., Pinkel, D., & C. Bastian, B. (2007). *Congenital Melanocytic Nevi Frequently Harbor NRAS Mutations but no BRAF Mutations*. Journal of Investigative Dermatology. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700490>

Bedrocan International . . (brez datuma). Cannabis Products. Pridobljeno iz <https://bedrocan.com/cannabis-products/>

Bilalis, D., Karidogianni, S., Roussis, I., Kouneli, V., Kakakouki, I., & Folina, A. (2019). *Cannabis sativa L.: A New Promising Crop for Medical and Industrial Use*. Agricultural University of Athens, School of Plant Sciences. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-hort:2019.0020>

Bizjak, T. (2017). *Genetske razlike med različnimi tipi navadne konoplje (Cannabis sativa L.)*. Dipl. delo (UN). Ljubljana: Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije. Pridobljeno iz <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=104226>

Blasco-Benito, S., Seijo-Vila, M., Caro-Villalobos, M., Tundidor, I., Andradas, C., García-Taboada, E., . . . Sánchez, C. (2018). *Appraising the "entourage effect": Antitumor action of a pure cannabinoid versus a botanical drug preparation in preclinical models of breast cancer*. Biochemical Pharmacology. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.06.025>

Citti, C., Pacchetti, B., Vandelli, M., Forni, F., & Cannazza, G. (2018). *Analysis of cannabinoids in commercial hemp seed oil and decarboxylation kinetics studies of*

cannabidiolic acid (CBDA). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.11.044>

Cunha, C., Daniel-da-Silva, A., & Oliveira, H. (2022). *Drug Delivery Systems and Flavonoids: Current Knowledge in Melanoma Treatment and Future Perspectives.* Micromachines. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.3390/mi13111838>

Čulić, A., Bregar, B., & Macur, M. (2021). Raba konoplje v medicinske namene: integrativni pregled. *Obzornik zdravstvene nege*, 274–286. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.14528/snr.2021.55.4.3063>

Damijan, T. (2021). *Vpliv velikosti delcev na vsebnost polifenolov in kanabinoidov v ekstraktih industrijske konoplje.* Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. Pridobljeno iz <https://dk.um.si/Dokument.php?id=155927&lang=slv>

Eddy, K., Shah, R., & Chen, S. (2021). *Decoding Melanoma Development and Progression: Identification of Therapeutic Vulnerabilities.* Front. Oncol. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.626129>

Glodde, N., Jakobs, M., Bald, T., Tüting, T., & Gaffal, E. (2015). *Differential role of cannabinoids in the pathogenesis of skin cancer.* Life Sciences, 138. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.04.003>

Grotenhermen, F. (2006). *Cannabinoids and the Endocannabinoid System.* Hürth: Nova-Institut. Pridobljeno iz https://www.cannabis-med.org/data/pdf/en_2006_01_2.pdf

Heymach, V. J., Zurita-Saavedra, A., Kopetz, S., Cascone, T., Nilsson, M., & Guijarro, I. (2022). *Tumor angiogenesis.* Holland-Frei Cancer Medicine. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.1002/9781119000822.hfcm017.pub2>

Horvat, D. (2020). *Izolacija kanabinoidov iz industrijske konoplje: Magistrsko delo študijskega programa II. stopnje.* Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. Pridobljeno iz <https://dk.um.si/Dokument.php?id=146870&lang=slv>

Iflland, K., Carus, M., & Grotenhermen, F. (2016). *Decarboxylation of Tetrahydrocannabinolic acid (THCA) to active THC.* European Industrial Hemp Association (EIHA). Pridobljeno iz <https://eiha.org/media/2014/08/16-10-25-Decarboxylation-of-THCA-to-active-THC.pdf>

- Karami Fath, M., Azargoonjahromi, A., Soof, A., Almasi, F., Hosseinzadeh, S., Khalili, S., . . . Pourzardosht, N. (2022). *Current understanding of epigenetics role in melanoma treatment and resistance.* Cancer Cell Int 22. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02738-0>
- Kumar, J. (2012). *Znanje, stališča in vedenje učencev o vsebinah, povezanih z UV sevanjem.* Ljubljana. Pridobljeno iz http://pefprints.pef.uni-lj.si/1012/1/Diplomsko_delo_Jasmina_Kumar.pdf
- Lewis, M., Yang, Y., Wasilewski, E., A. Clarke, H., & P. Kotra, L. (2017). *Chemical Profiling of Medical Cannabis Extracts.* American Chemical Society. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00996>
- Lewis-Bakker, M., Yang, Y., Vyawahare, R., & P. Kotra, L. (2019). *Extractions of Medical Cannabis Cultivars and the Role of Decarboxylation in Optimal Receptor Responses.* Cannabis and Cannabinoid Research. Pridobljeno iz <http://doi.org/10.1089/can.2018.0067>
- Lim Kim, A., Jae Yun, M., Woo Choi, H., Hong, C.-H., Joo Shim, H., Hwan Lee, J., & Kim, Y.-C. (2022). *Profiling Cannabinoid Contents and Expression Levels of Corresponding Biosynthetic Genes in Commercial Cannabis (*Cannabis sativa L.*) Cultivars.* Plants. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.3390/plants11223088>
- Malić, M. (2021). *Biološka aktivnost antioksidantov v konopljinih ekstraktih pri raku prostate.* Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. Pridobljeno iz <https://dk.um.si/Dokument.php?id=150389&lang=slv>
- Marzeda, P., Drozd, M., Wróblewska-Łuczka, P., & Łuszczki, J. J. (2021). *Cannabinoids and their derivatives in struggle against melanoma.* Pharmacological Reports. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00308-1>
- Marzeda, P., Wróblewska-Łuczka, P., Drozd, M., Florek-Łuszczki, M., Załuska-Ogryzek, K., & J. Łuszczki, J. (2022). *Cannabidiol Interacts Antagonistically with Cisplatin and Additively with Mitoxantrone in Various Melanoma Cell Lines—An Isobolographic Analysis.* International Journal of Molecular Sciences. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.3390/ijms23126752>

- Mlinar, K. (2021). *Določitev izražanja kanabinoidnih receptorjev na ravni informacijske RNA v celičnih linijah raka dojke*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. Pridobljeno iz <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=146784&lang=slv>
- Morales, P., & Jagerovic, N. (2019). *Antitumor Cannabinoid Chemotypes: Structural Insights*. Frontiers Pharmacology. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00621>
- Moreira, A., Heinzerling, L., Bhardwa, N., & Friedlander, P. (2021). *Current Melanoma Treatments: Where Do We Stand?* Cancers. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.3390/cancers13020221>
- Moreno, T., Dyer, P., & Tallon, S. (2020). *Cannabinoid Decarboxylation: A Comparative Kinetic Study*. Ind. Eng. Chem. Res. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c03791>
- Mulcahy Levy, J., Towers, C., & Thorburn, A. (2017). *Targeting autophagy in cancer*. Nature Reviews Cancer. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.53>
- Munson, A., Harris, L., Friedman, M., Dewey, W., & Carchman, R. (1975). *Antineoplastic Activity of Cannabinoids*. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.1093/jnci/55.3.597>
- Nabissi, M., Morelli, M., Offidani, M., Amantini, C., Gentili, S., Soriani, A., . . . Santoni, G. (2016). *Cannabinoids synergize with carfilzomib, reducing multiple myeloma cells viability and migration*. Oncotarget. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12721>
- Namdar, D., Voet, H., Ajjampura, V., Nadarajan, S., Mayzlish-Gati, E., Mazuz, M., . . . Koltai, H. (2019). *Terpenoids and Phytocannabinoids Co-Produced in Cannabis Sativa Strains Show Specific Interaction for Cell Cytotoxic Activity*. Molecules. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.3390/molecules24173031>
- Neubauer, D., Perkovič-Benedik, M., & Osredkar, D. (2019). *Priporočila za uporabo kanabidiola in kanabinoidov (medicinske konoplje) v pediatriji – otroški nevrologiji*. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra za pediatrijo – Podiplomski študij otroške nevrologije. Pridobljeno iz https://www.institut-icanna.com/files/ULTIMO_Web.pdf

Onkološki inštitut Ljubljana. (2019). *Kožni rak*. Pridobljeno iz Onkološki inštitut Ljubljana:
https://www.onko-i.si/za_javnost_in_bolnike/vrste_raka/kozni_rak

Pellati, F., Borgonetti, V., Brighenti, V., Biagi, M., Benvenuti, S., & Corsi, L. (2018). *Cannabis sativa L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and Role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer*. Pridobljeno iz <https://downloads.hindawi.com/journals/bmri/2018/1691428.pdf>

Pragna Bathula, P., & MacIver, M. (2022). *Medicinal Cannabis in Cancer Treatment*. Pridobljeno iz Preprints: doi: 10.20944/preprints202208.0418.v1

Ramer, R., Wendt, F., Wittig, F., Schäfer, M., Boeckmann, L., Emmert, S., & Hinz, B. (2022). *Impact of Cannabinoid Compounds on Skin Cancer*. Cancers. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.3390/cancers14071769>

Rožanc, J., Kotnik, P., Milojević, M., Gradišnik, L., Knez Hrnčič, M., Knez, Ž., & Maver, U. (2021). *Different Cannabis sativa Extraction Methods Result in Different Biological Activities against a Colon Cancer Cell Line and Healthy Colon Cells*. Plants. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.3390/plants10030566>

Rožanc, J., Sakellaropoulos, T., Antoranz, A., Guttà, C., Podder, B., Vetma, V., . . . G. Alexopoulos, L. (2018). *Phosphoprotein patterns predict trametinib responsiveness and optimal trametinib sensitisation strategies in melanoma*. Cell Death & Differentiation. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0210-8>

Schilling, S., A. Dowling, C., Shi, J., Ryan, L., Hunt, D., O'Reilly, E., . . . Melzer, R. (2021). *The Cream of the Crop: Biology, Breeding and Applications of Cannabis sativa*. University College Dublin. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0740>

Schultes, R., Klein, W., Plowman, T., & Lockwood, T. (1974). *CANNABIS: AN EXAMPLE OF TAXONOMIC NEGLECT*. Harvard University Herbaria. Pridobljeno iz <https://www.jstor.org/stable/41762285>

Slapnik, M. (2018). *Določanje spola pri navadni konoplji s pomočjo DNA markerjev in vplivanje na njegovo izražanje*. Ljubljana. Pridobljeno iz <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=113960&lang=slv>

Small, E., & Cronquist, A. (1976). A Practical and Natural Taxonomy for Cannabis. *Taxon*, 25, 4, str. 405-435.

Stuart Reece, A., & Kenneth Hulse, G. (2022). *Novel Insights into Potential Cannabis-Related Cancerogenesis from Recent Key Whole Epigenome Screen of Cannabis Dependence and Withdrawal: Epidemiological Commentary and Explication of Schrott et al. Genes*. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.3390/genes14010032>

Tóth, K., Ádám, D., Bíró, T., & Oláh, A. (2019). *Cannabinoid Signaling in the Skin: Therapeutic Potential of the “C(ut)annabinoid” System*. Molecules. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.3390/molecules24050918>

Vaseghi, G., Javad Taki, M., & Haghjooy Javanmard, S. (2017). *Standardized Cannabis sativa extract attenuates tau and stathmin gene expression in the melanoma cell line*. Iran J Basic Med Sci. Pridobljeno iz file:///C:/Users/Nu%C5%A1a/Downloads/Standardized_Cannabis_sativa_extract_attenuates_ta.pdf

Zagožen, M., Kreft, S., & Čerenak, A. (2018). Kanabidiol (CBD) in delta-9-tetrahidrokanabinol (THC) v navadni konoplji (*Cannabis sativa L.*). *Hmeljarski bilten*, 25, 59–65. Pridobljeno iz <https://www.dlib.si/stream/URN:NBN:SI:DOC-JRSFDY8J/3a0a94ad-c55a-4eb0-ba33-1fe3bebb2f84/PDF>

Zhao, Z., Yang, J., Zhao, H., Fang, X., & Li, H. (2012). *Cannabinoid receptor 2 is upregulated in melanoma*. Journal of Cancer Research and Therapeutics. Pridobljeno iz <https://www.cancerjournal.net/text.asp?2012/8/4/549/106534>

Zheng, D., M Bode, A., Zhao, Q., Cho, Y.-Y., Zhu, F., Ma, W.-Y., & Dong, Z. (2008). *The cannabinoid receptors are required for ultraviolet-induced inflammation and skin cancer development*. Cancer research. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6594>

Žitek, T., Bjelić, D., Kotnik, P., Golle, A., Jurgec, S., Potočnik, U., . . . Knez Marevcí, M. (2022). *Natural Hemp-Ginger Extract and Its Biological and Therapeutic Efficacy*. Molecules. Pridobljeno iz <https://doi.org/10.3390/molecules27227694>