

58. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2024

VPLIV FRAKCIJ EKSTRAKTOV KONOPLJE (*Cannabis sativa*) NA CELICE MELANOMA

Raziskovalna naloga

Raziskovalno področje: zdravstvo

Avtorici: Rozalija Lia Muršec, Jona Novak

Mentorica: Katja Holnhaner Zorec

Somentor: dr. Jan Rožanc



Maribor, februar 2024

KAZALO VSEBINE

1	Uvod.....	1
1.1	Raziskovalna vprašanja	1
1.2	Hipoteze	1
2	Teoretični del	4
2.1	Konoplja (<i>Cannabis sativa</i>)	4
2.1.1	Aktivne učinkovine v konoplji.....	5
2.1.2	Kanabinoidni receptorji	5
2.1.3	Endokanabinoidi, fitokanabinoidi in sintetični kanabinoidi	6
2.1.4	Endokanabinoidni sistem	7
2.1.5	»Entourage« efekt	8
2.1.6	Uporaba konoplje v medicini.....	8
2.2	Melanom.....	9
2.2.1	Zdravljenje melanoma	11
2.3	Sorodne raziskave	12
3	Metodologija dela	15
3.1	HPLC metoda.....	15
3.2	Test celične viabilnost po izpostavitvi frakcijam ekstraktov Berobinol in Bedrolit.	16
3.3	Statistični testi	17
4	Rezultati	18
4.1	HPLC.....	18
4.2	Testi celične viabilnosti.....	19
4.2.1	Frakcije ekstrakta Bedrolita	19
4.2.2	Frakcije ekstrakta Bedrobinola	22
5	Razprava	25

6	Družbena odgovornost.....	30
7	Zaključek in sklepi.....	31
8	Viri in literatura.....	32

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijske strukture glavnih kanabinoidov, prisotnih v <i>Cannabis sativa</i> L. Okrajšave: Δ = segrevanje; oks. = oksidacija; izo. = izomeracija (vir: (Ačko, 2023)).....	6
Slika 2: HPLC metoda (Aryal, 2023).....	15
Slika 3: Tretiranje celičnih plošč (vir: lasten).....	17
Slika 4: Kanabinoidni profili frakcij ekstraktov a) Bedrobinol in b) Bedrolit – rezultati metode HPLC (vir: lasten).....	18
Slika 5: Viabilnost celične linije MEL - JUSO v odvisnosti od koncentracije frakcij ekstrakta Bedrolit a) po 24 urah, b) po 48 urah (+/- 1 SD – standardna deviacija) (vir: lasten).....	20
Slika 6: Viabilnost celične linije SK – MEL 2 v odvisnosti od koncentracije frakcij ekstrakta Bedrolit a) po 24 urah, b) po 48 urah (+/- 1 SD) (vir: lasten).....	21
Slika 7: Viabilnost celične linije SK – MEL 28 v odvisnosti od koncentracije frakcij ekstrakta Bedrolit a) po 24 urah, b) po 48 urah (+/- 1 SD) (vir: lasten).....	22
Slika 8: Viabilnost celičnih linij (a) MEL - JUSO, b) SK - MEL 2, c) SK - MEL 28) v odvisnosti od koncentracije frakcij ekstrakta Bedrobinol (+/- 1 SD) (vir: lasten).....	23
Slika 9: Celična viabilnost celičnih linij MEL - JUSO, SK - MEL 2 in SK - MEL 28 v odvisnosti od frakcije v koncentraciji a) 10 µg/mL, b) 15 µg/mL, c) 20 µg/mL in d) 25 µg/mL pri časovni točki 48 ur za frakcije ekstrakta Bedrolita in pri časovni točki 24 ur za frakcije ekstrakta Bedrolita in pri časovni točki 24 ur za frakcije ekstrakta Bedrobinola (+/- 1 SD) (vir: lasten).	24

POVZETEK

Konoplja (*Cannabis sativa*) postaja pomembna pri alternativnih načinih zdravljenja različnih bolezni. Kožni rak je ena najpogostejših oblik raka – melanom je ena najsmrtonosnejših oblik. Namen raziskave je bil ugotoviti vpliv posameznih frakcij dveh vrst konoplje, Bedrolita in Bedrobinola, na celično viabilnost linij: MEL – JUSO, SK – MEL 2 in SK – MEL 28. Celice smo tretirali s frakcijami (10, 15, 20 in 25 µg/mL) ter izvedli test celične viabilnosti z Alamar Blue. Vsebnost kanabinoidov v frakcijah smo določili z metodo HPLC. Ugotovili smo, da sta frakcija F3 ekstrakta Bedrolit z največ kanabinoida CBD in frakcija F4 ekstrakta Bedrobinol z največ THC pri koncentraciji 10 µg/mL statistično pomembno ($p < 0,05$) znižali celično viabilnost. Opazili smo trend upadanja celične viabilnosti z višanjem koncentracije frakcij. Frakcije z različnimi kanabinoidnimi profili so imele različne vplive na celice vseh celičnih linij, z izjemo štirih frakcij in obeh ekstraktov so frakcije imele podoben vpliv na vse celične linije.

Ključne besede: melanom, konoplja (*Cannabis sativa*), frakcije, ekstrakti, Bedrolit, Bedrobinol, celična viabilnost, HPLC

ABSTRACT

Cannabis (*Cannabis sativa*) is becoming important in alternative treatments for various diseases. Skin cancer is one of the most common forms of cancer, and melanoma is one of the deadliest forms. The aim of the study was to determine the effect of individual fractions of two sorts of Cannabis, Bedrolit and Bedrobinol, on cell viability of lines: MEL – JUSO, SK – MEL 2 and SK – MEL 28. Cells were treated with fractions (10, 15, 20 and 25 µg/mL) and cell viability test was performed with Alamar Blue. The cannabinoid content of the fractions was determined by HPLC. We found that the F3 fraction of Bedrolit extract with the highest CBD and the F4 fraction of Bedrobinol extract with the highest THC at a concentration of 10 µg/mL significantly ($p < 0.05$) reduced cell viability. We observed a trend of decreasing cell viability with increasing concentrations of fractions. Fractions with different cannabinoid profiles had different effects on cells of all cell lines, with the exception of four fractions and both extracts, fractions had similar effects on all cell lines.

Keywords: melanoma, Cannabis (*Cannabis sativa*), fractions, extracts, Bedrolite, Bedrobinol, cell viability, HPLC

ZAHVALA

Zahvaljujemo se našima mentorjem, ki sta nas vodila in nam stala ob strani med raziskovanjem. Hvala, da sta nam omogočila raziskovanje zastavljenega problema z Vašo podporo, pomočjo in nasveti.

Zahvala gre Medicinski fakulteti v Mariboru oziroma Inštitutu za biomedicinske vede, ki nam je omogočil uporabo laboratorijev in zagotovil potreben material za raziskovanje. Hvala tudi študentkama fakultete, ki sta nam pomagali pri izvedbi praktičnega dela raziskovanja.

Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Maribor se zahvaljujemo za pomoč pri izvedbi HPLC metode.

Hvala vsem.

KRATICE

BB – ekstrakt Bedrobinol

BL – ekstrakt Bedrolit

CBC – kanabikromen

CBCA – kanabikromenska kislina

CBD – kanabidiol

CBDA – kanabidiolna kislina

CBE – kanabielsoin

CBG – kanabigerol

CBGA – kanabigerolna kislina

CBL – kanabiciklol

CBN – kanabinol

CBNA – kanabinolna kislina

CBND – kanabinodiol

CBNDA – kanabidiolna kislina

CBT – kanabitriol

DMSO – dimetil sulfoksid

ECS – endokanabinoidni sistem

SD – standardna deviacija

THC – tetrahidrokanabinol

THCA – tetrahidrokanabinolna kislina

1 UVOD

Namen naše raziskovalne naloge je bil odkriti vpliv frakcij ekstraktov konoplje, vrst *Cannabis sativa* L. ‘Ludina’ (Bedrobinol) in *Cannabis sativa* L. ‘Rensina’ (Bedrolit) na celice melanoma. S temi ugotovitvami želimo pripomoči medicinskim raziskavam, ki se ukvarjajo z odkrivanjem zdravila za raka. Zavedamo se, da zdravljenje rakavih obolenj nima prihodnosti zgolj v obstoječih metodah zdravljenja, temveč so za to pomembne tudi alternativne metode zdravljenja, med njimi konoplja. Cilj raziskave je bil odkriti, katera frakcija ozziroma kateri kanabinoid prisoten v posamezni frakciji najbolj zmanjšuje celično viabilnost in s tem manjša sposobnost preživetja rakave celice.

1.1 RAZISKOVALNA VPRAŠANJA

RV1: Kakšni so kanabinoidni profili Bedrolita in Bedrobinola ter ali kanabinoidni profil frakcije vpliva na njen učinek na viabilnost celic iz linij MEL – JUSO, SK – MEL 2 in SK – MEL 28?

RV2: Kako bodo različne koncentracije frakcije ekstraktov konoplje (Bedrobinol in Bedrolit) vplivale na celično viabilnost celic iz linij MEL – JUSO, SK – MEL 2 in SK – MEL 28?

RV3: Kakšen vpliv ima frakcija ekstrakta Bedrobinol, ki vsebuje največ kanabinoida THC, na viabilnost celic iz linij MEL – JUSO, SK – MEL 2 in SK – MEL 28?

RV4: Kakšen vpliv ima frakcija ekstrakta Bedrolit, ki vsebuje največ kanabinoida CBD, na viabilnost celic iz linij MEL – JUSO, SK – MEL 2 in SK – MEL 28?

RV5: Ali bo vpliv posamezne frakcije enak pri celičnih linijah MEL – JUSO, SK – MEL 2 in SK – MEL 28?

1.2 HIPOTEZE

H1: Frakcije ekstraktov Bedrobinola in Bedrolita bodo imele različne koncentracije kanabinoidov, zato bo njihov vpliv na viabilnost celic iz linij MEL – JUSO, SK – MEL 2 in SK – MEL 28 različen.

Razlaga hipoteze: Proizvajalec Bedrocan International navaja, da imajo različne sorte konoplje različne kanabinoidne profile (Bedrocan, 2024), zato bi morale imeti frakcije po ekstrakciji različne koncentracije kanabinoidov, ki bodo imele različen vpliv na celično viabilnost. Glede na to lahko pričakujemo podobne rezultate.

H2: Ekstrakti konoplje (Bedrobinol in Bedrolit) in njihove frakcije bodo pri višjih koncentracijah celično viabilnost linij MEL – JUSO, SK – MEL 2 in SK – MEL 28 zmanjšali bolj kot pri nižjih koncentracijah.

Razlaga hipoteze: V raziskavi Peerija in drugih so potrdili vpliv kanabigerola (CBG) na celično viabilnost multiformnega glioblastoma (GBM) in vitro. V raziskavi so ugotovili, da je celično viabilnost zmanjšal metanolni ekstrakt DQ, ki je bil citotoksičen za celično linijo GBM A172, pri frakcijah F4 v koncentraciji IC₅₀ 9,81 µg/mL, F5 v koncentraciji IC₅₀ 7,01 µg/mL, F6 v koncentraciji IC₅₀ 7,25 µg/mL in F7 v koncentraciji IC₅₀ 10,22 µg/mL je bila celična smrt 90% (Peeri, in drugi, 2021). Eksperimenti so bili izvedeni tudi na človeških rakavih celicah debelega črevesa, ki so bili tretirani z različnimi koncentracijami ekstraktov, ki so se postopoma povečevale (0,625-20 µg/mL), prav tako so bile celice tretirane s čistima THC in CBD za 48 ur. V odvisnosti od odmerka je bila dokazana zmanjšana celična viabilnost (predvsem pri koncentraciji 10 in 20 µg/mL) (Rožanc, in drugi, 2021). Glede na to lahko pričakujemo podobne rezultate.

H3: Frakcija ekstrakta Bedrobinol z največjo vsebnostjo THC bo imela največji vpliv na celično viabilnost celic iz linij MEL – JUSO, SK – MEL 2 in SK – MEL 28 glede na druge frakcije tega ekstrakta.

Razlaga hipoteze: Frakcije F4, F5, F6 in F7 v raziskavi Posebne sestave spojin *Cannabis sativa* imajo citotoksično delovanje ter zavirajo gibljivost in nastajanje kolonij celic človeškega glioblastoma in vitro, katerih koncentracija in čas tretiranja sta bila standardizirana za vse frakcije, so najbolj znižale celično viabilnost. Imele so različne kanabinoidne profile. V frakcijah F5, F6 in F7 je procentualno prevladoval kanabinoid THC (F5: 91,7%; F6: 96,9%; F7: 68,9%) (Peeri, in drugi, 2021). Glede na to lahko pričakujemo podobne rezultate.

H4: Frakcija ekstrakta Bedrolit z največjo vsebnostjo CBD bo imela največji vpliv na celično viabilnost celic iz linij MEL – JUSO, SK – MEL 2 in SK – MEL 28 glede na druge frakcije tega ekstrakta.

Razlaga hipoteze: V raziskavi Kanabidiol zavira proliferacijo in invazivnost celic raka prostate so bile celice raka prostate 72 ur zdravljene z naraščajočimi koncentracijami CBD (0,25-

128 µM). Razvidno je bilo, da se je celična viabilnost z naraščanjem koncentracije CBD zmanjševala pri uporabljenih celičnih linijah DU145, PC-3 in LNCaP (O'Reilly, in drugi, 2023). Glede na to lahko pričakujemo podobne rezultate.

H5: Posamezna frakcija ekstraktov Bedrobinol in Bedrolit bo imela podoben vpliv na celično viabilnost linij MEL – JUSO, SK – MEL 2 in SK – MEL 28.

Razlaga hipoteze: Različne raziskave pri raziskovanju uporabljajo različne celične linije, pri katerih beležijo podobne rezultate z istimi frakcijami (Namdar, in drugi, 2019). Sklepamo lahko, da bo tako tudi pri našem raziskovanju.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 KONOPLJA (*CANNABIS sativa*)

Konoplja je enoletnica, ki lahko zraste do štirih metrov in 1,5 metra premera. Značilni listi rastline so palmasti. Konoplja je dvodomna rastlina, razvije moške in ženske rastline, ki so si zelo različne. V našem prostoru so prisotne tudi enodomne rastline, ki jih prepoznamo po moškem socvetju na vrhu rastline, ženski cvetovi so pod listi grozdastih socvetij (Bagar, 2020). Listi in steba rastline so bogati s trihomimi, strukturami, ki vsebujejo sekundarne metabolite, ki so odgovorni za obrambo, značilen vonj ipd. (Obuzor, in drugi, 2022). V naravi se konoplja razmnožuje spolno, pridelovalci jo razmnožujejo tudi nespolno (s potaknjenci) (Bagar, 2020). Plodovi konoplje, semena so majhni posušeni oreščki z botaničnim imenom rožka (Borille, González, Steffens, Scorsatto Ortiz, & Pereira Limberger, 2017). Konopljina semena so prepoznana kot prehransko bogata hrana (Al-Kazaleh, in drugi, 2024). Semena vsebujejo vlaknine, beljakovine, maščobne kisline (Rupasinghe, Davis, Kumar, Murray, & Zheljazkov, 2020). Učinkovine v semenih in olju prispevajo k zdravju srca, pomagajo pri delovanju možganov in imajo protivnetne značilnosti (Al-Kazaleh, in drugi, 2024). Rastlina bujno raste v sončnem okolju z nevtralnimi do alkalnimi tlemi, ker potrebujejo veliko hranil in vode (Borille, González, Steffens, Scorsatto Ortiz, & Pereira Limberger, 2017). Rastlina domnevno izhaja iz vlažnih območij Azije, nove študije kažejo, da bi lahko izvirala tudi iz Vzhodne Evrope. Konoplja je rastlina, ki se v naravi uspešno križa, zato jo je načrtno križal tudi človek ter tako povzročil nastanek novih sort. Zaradi tega jo je težko taksonomsko uvrstiti (Bagar, 2020). Morfološka in genetska variabilnost rastline sta značilnosti, ki sta znanstvenike privedli do prepoznavanja različnih podvrst, kot so *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* in *Cannabis ruderalis*, ki se razlikujejo po vsebnosti in sestavi fitokemikalij, vsebnosti terpenov in drugih spojin (Al-Kazaleh, in drugi, 2024). Urad Združenih narodov za droge in kriminal v "Priporočenih metodah za identifikacijo in analizo konoplje in izdelkov iz konoplje" navaja, da ima rastlina le eno priznano vrsto (Borille, González, Steffens, Scorsatto Ortiz, & Pereira Limberger, 2017). Rastline znotraj te vrste se razlikujejo po obliki, rasti in količini aktivnih sestavin. Namesto o sortah govorimo o kemovarjih ali kemičnih različicah (Bagar, 2020).

Izraz industrijska konoplja se uporablja za rastlino, ki jo gojijo zaradi stebel in semen, ki jih uporabijo kot surovino za različne industrije. Vrednost THC v njej ne sme presegati 0,3% na osnovi suhe snovi (Visković, in drugi, 2023).

2.1.1 Aktivne učinkovine v konoplji

Iz konoplje je bilo izoliranih več kot 500 snovi (Bismarck, Nogueira Alencar, Freitas de Bem, Fontes-Dantas, & Carneiro Montes, 2023). Kemijski razredi, ki so identificirani v konoplji so CBG, CBC, CBD, CBL, CBE, CBN, CBND, CBT, dušikove spojine, enostavni estri, laktoni, steroidi, terpeni ipd. (Asati, Sahoo, Sahu, & Dwivedi, 2017). Konopljni kemovarji so lahko THC-dominantni ali CBD-dominantni ali pa sta oba kanabinoida v enakem razmerju. Zaradi mutacij so se razvili kemovarji, ki vsebujejo malo ali pa skoraj nič THC in CBD, zato pa vsebujejo veliko CBG (Bagar, 2020). Nekateri kanabinoidi so pridobljeni iz srove konoplje, drugi pa so pridobljeni po segrevanju. Značilen vonj rastline povzročajo terpenoidi (Bilalis, in drugi, 2019). Prevladujoče spojine v konoplji so THCA, CBDA, CBNA, CBGA, CBCA in CBNDA (Andre, Hausman, & Guerriero, 2016). Oznaka A pomeni, da se snov v sveži rastlini nahaja v obliki kanabinoidne kisline. Ob segrevanju se odcepi CO, kar imenujemo dekarboksilacija, pri kateri nastanejo THC, CBD in CBG. THC je najbolj znan kanabinoid, ki je psihoaktivен, zato je bil prvi, ki je bil temeljiteje preučevan. Poleg njegovih terapevtskih učinkov so preučevali tudi njegove škodljive učinke (Bagar, 2020).

2.1.2 Kanabinoidni receptorji

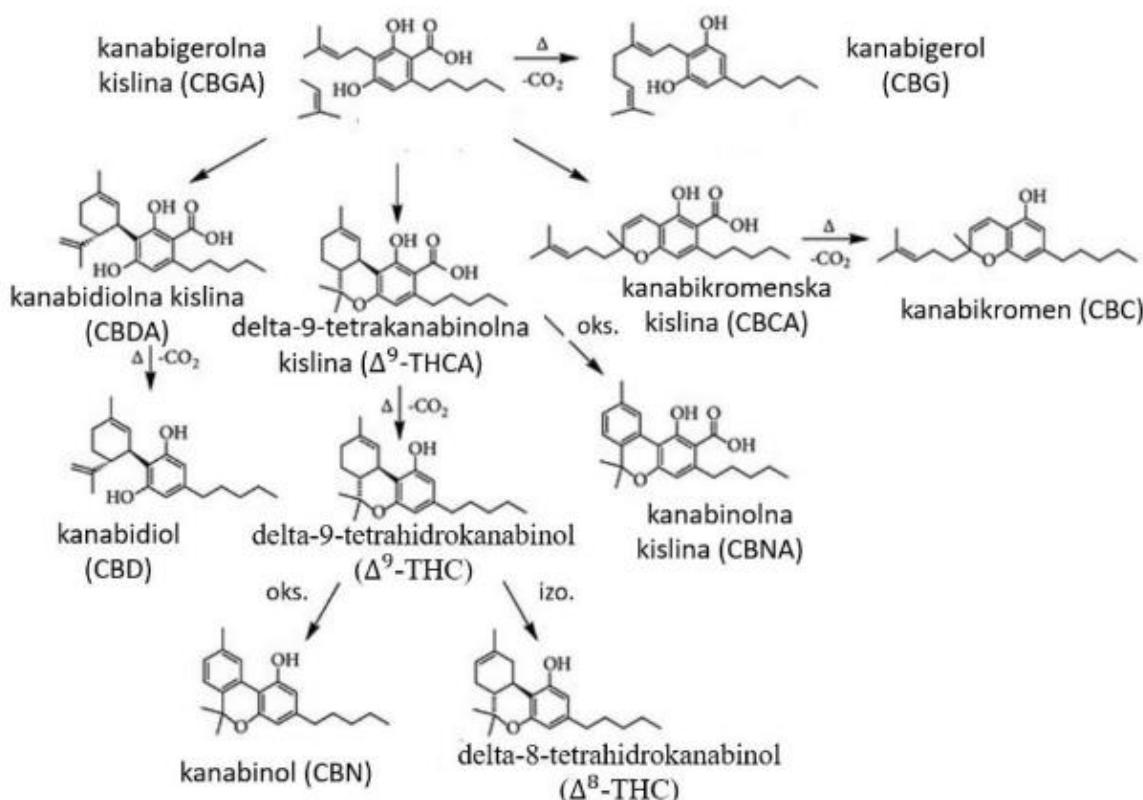
Raziskovalci so odkrili, da večino učinkov, ki jih povzročajo THC in drugi kanabinoidi, omogoča sposobnost ligandov¹, da se usmerijo na drugo družino receptorjev. Identificirana sta bila dva kanabinoidna receptorja, in sicer CB1 in CB2 (Pertwee, 2007). Ta receptorja se razlikujeta po zaporedju aminokislin in njihovi porazdelitvi v tkivih. CB₁ receptorji se nahajajo v možganih, kardiovaskularnem sistemu, pljučih, mišicah, reproduktivnem sistemu ipd., CB2 receptorji pa se nahajajo v imunskejem sistemu, kosteh, koži, jetrih ipd. Farmakološke raziskave kažejo, da bi lahko kanabinoidne molekule delovale na receptorje, ki niso CB1 in CB2. To so vaniloidni receptorji (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPA1, TRPM8), metabotropni² receptorji (GPR55, GPR3, GPR6, GPR12, GPR19), encimi, proteini ... (Bismarck, Nogueira Alencar, Freitas de Bem, Fontes-Dantas, & Carneiro Montes, 2023).

¹ navadno majhna, topna ali redkeje na celični površini izražena molekula, ki se specifično veže na svoj receptor in sproži določen celični odziv

² receptor s sedmimi transmembranskimi domenami, sklopljen s proteinom G, preko katerega uravnava (spodbuja ali zavira) aktivnost tarčnih beljakovin

2.1.3 Endokanabinoidi, fitokanabinoidi in sintetični kanabinoidi

Endokanabinoidi so podobni kanabinoidom, ki so prisotni v konoplji (*Cannabis sativa*), a te kanabinoide proizvaja človeško telo (predpona »endo« pomeni »znotraj«) (De Pietro, 2021). Endokanabinoidi niso klasični nevrotransmitorji, ampak so atipični sporočevalci zaradi mehanizma retrogradne signalizacije (Bismarck, Nogueira Alencar, Freitas de Bem, Fontes-Dantas, & Carneiro Montes, 2023). Fitokanabinoidi so kanabinoidi pridobljeni iz konoplje (*Cannabis sativa*) in so najbolj koncentrirani v trihomih cvetov glave ženske rastline. Mednje spadata THC in CBD (The University of Sydney, b. d.). Sintetični kanabinoidi so laboratorijsko izdelane kemične snovi, ki so podobne kemikalijam v konoplji (*Cannabis sativa*). Proizvodnja in prodaja sintetičnih kanabinoidov je nezakonita (National Institute on Drug Abuse, 2023).



Slika 1: Kemische Strukturen glavnih kanabinoidov, prisotnih v *Cannabis sativa* L. Okrajšave: Δ = segrevanje; oks. = oksidacija; izo. = izomeracija (vir: (Ačko, 2023)).

2.1.4 Endokanabinoidni sistem

Endokanabinoidni sistem (v nadaljevanju ESC) je kompleksen biološki sistem, ki je bil odkrit leta 1988. ESC je endogeni signalni sistem, ki ga sestavljajo endokanabinoidi, encimi, ki sodelujejo pri njihovi sintezi in razgradnji, kanabinoidnih receptorjev in drugih elementov (Rupasinghe, Davis, Kumar, Murray, & Zheljazkov, 2020). ESC sodeluje pri številnih fizioloških procesih, kot so homeostaza, apetit, čustveno vedenje, delovanje živčevja, zaznavanje bolečine ipd. (Lowe, Toyang, Steele, Bryant, & Ngwa, 2021). ESC je sposoben hitrega prilagajanja spreminjačim se razmeram (Aizpurua-Olaizola, in drugi, 2017). Kanabinoidi so SOS-molekule, ki se aktivirajo, ko je izzvano naše notranje ravnovesje. ESC se tako aktivira, kadar utrpimo fizično poškodbo, se srečamo s patološkimi mikrobi in kadar smo pod stresom (Bagar, 2020). Pri raznih boleznih je sistem uravnavan s spojinami, ki povečajo ali zmanjšajo njegovo delovanje. Kanabinoidi lahko pomagajo pri vzpostavitvi ravnovesja v ESC (Christensen, Rose, Cornett, & Allesø, 2023). ESC in različni fitokanabinoidi so zmožni aktivacije, antagonizacije ali inhibicije več celičnih tarč (Fanni Tóth, Ádám, Bíró, & Oláh, 2019). Kanabinoidi imajo neposredne smrtonosne učinke na tumorje, ker z CB1 receptorjem tvorijo komplekse (Abrams, 2022). Dokazano je bilo, da ima THC velik terapevtski potencial v medicini v nizkih odmerkih. THCA nima psihoaktivnih učinkov, saj se ne veže na CB1-receptorje. Znanstveniki so ugotovili, da ima tudi CBD velik terapevtski potencial in nima opojnih učinkov, kar velja tudi za CBG (Bagar, 2020). Kanabinoidi vplivajo na bistvene celične procese in signalne poti, ki so ključne za razvoj tumorja (Dariš, Tancer Verbotan, Knez, & Ferk, 2019). ESC in fitokanabinoidi vplivajo na tri mehanizme: apoptozo³, angiogenezo⁴ in metastazirajo⁵ (Bagar, 2020). ESC je eden izmed glavnih tarč za nova terapevtska sredstva (Aizpurua-Olaizola, in drugi, 2017).

³ programirana celična smrt, pri kateri tumorsko spremenjene celice ne odmrejo, medtem ko bi zdrave celice po zaključku življenjskega cikla odmrle; a je mehanizem v tumorskih celicah okvarjen in zato se kopiji čedalje več tumorskih celic – nastane tumor

⁴ tvorba novih krvnih žil; ko tumor raste, potrebuje veliko kisika in hranil, zato njegove celice sprožajo nastanek novih krvnih žil

⁵ širjenje tumorskih celic s primarnega tumorja na druga tkiva; tumorske celice morajo za metastaziranje proizvajati vrsto molekul, ki omogočijo, da se tumorske celice ločijo od primarnega tumorja v druge dele telesa

2.1.5 »Entourage« efekt

Konoplja poleg kanabinoidov vsebuje številne druge snovi – fenole, flavonoide, aminokisline, proteine, vitamine in minerale. Učinek posamezne učinkovine na telo je edinstven, a se lahko spreminja v odvisnosti od drugih spojin v mešanici, kar imenujemo »entourage« efekt (Bagar, 2020). Natančni mehanizmi delovanja so neznani, a domnevajo, da so vanje vključene farmakokinetične in farmakodinamične interakcije, do katerih pride, ko na aktivnost ene spojine vplivajo druge spojine. Med spojinami konoplje so možni različni kombinirani učinki – aditivni, sinergistični in antagonistični. Aditivni učinki so seštevek učinkov posameznih spojin. Sinergistični učinek je posledica usklajenosti dveh ali več spojin, ki povzročijo močnejši skupni učinek, kot je vsota posameznih učinkov. Antagonistične interakcije povzročajo kombiniran učinek, ki je manjši od vsote posameznih učinkov. V terapevtskem smislu je to marsikdaj neučinkovito, vendar je lahko koristno, če se zaradi tega zmanjšajo nezaželeni učinki. »Entourage« efekt je opisan kot posledica sinergističnih učinkov (Christensen, Rose, Cornett, & Allesø, 2023). Ta efekt omogoča, da z nižjimi odmerki kanabinoidov dosežemo enake učinke. Pri uporabi izvlečkov iz cele rastline je zabeleženih tudi manj stranskih učinkov (Bagar, 2020).

2.1.6 Uporaba konoplje v medicini

Konoplja se v medicini uporablja pri lajšanju stresa, bolečin, črevesnih težav, nevroloških bolezni ipd. Znanstveni izsledki so potrdili, da je za medicinske namene najbolje uporabljati fitokanabinoide iz konoplje (Bagar, 2020). ESC vpliva in regulira respiratorni, fiziološki, kardiovaskularni, prebavni, skeletni, reproduktivni, imunski in nevrološki sistem (Barrales-Cureño, in drugi, 2020). V večini evropskih držav in v Sloveniji lahko zdravniki predpišejo zdravila na osnovi kanabinoidov za onkološka stanja. Vsaka država posebej predpiše, katera vrsta kanabinoidov, oblika cveta in kateri kemovarji so dovoljeni. Najbolj učinkoviti za bolnike so izvlečki iz cele rastline in ne posamezni izolirani oziroma sintetični kanabinoidi, saj »entourage« efekt tam ni zastopan. Onkologi so glede uporabe konoplje zadržani, ker še ni dovolj standardiziranih kliničnih raziskav (Bagar, 2020).

2.1.6.1 Konoplja in rak

Konoplja je razširjena za lajšanje in zdravljenje rakavih obolenj. Kanabinoidi dokazano učinkujejo proti slabosti, antidepresivno, analgetično ipd., zato jih uporablajo pri zdravljenju rakavih bolnikov, ki prejemajo uveljavljene tehnike zdravljenja (kemoterapija, radioterapija) in pri bolnikih z virusom HIV. Kanadski zvezni zavod je ugotovil, da dronabinol in nabiksimol zagotavlja olajšanje pri obvladovanju bolečin, ki so povezane z rakom, vendar so bili nekateri njihovi rezultati statistično nepomembni (Mouhamed, in drugi, 2018). Več fito-, endo- in sintetičnih kanabinoidov učinkuje proti raku z različnimi mehanizmi; povzročijo apoptozo, autofagijo, zaustavijo celični cikel obolelih celic in njihovo metastaziranje. Več kanabinoidov, med njimi $\Delta 9$ -THC, CBD, CBDA, HU120, WIN-552122 so v raziskavah na več tipih raka pokazali proti rakave lastnosti (Lowe, Toyang, Steele, Bryant, & Ngwa, 2021). Najboljša strategija za boj proti raku je kombinirano zdravljenje, vendar mora biti to zdravljenje prilagojeno potrebam in karakteristikam bolnika. Kanabinoidi na razvoj tumorjev različno vplivajo: zavirajo preživetje tumorskih celic, resetirajo celični cikel, sprožijo autofagijo in apoptozo, zmanjšajo širjenje metastaz, spodbudijo imunski odziv na rak ... Izmed teh sta najbolje raziskana THC in CBD. Ugotovljeno je, da CBD učinkuje na apoptozo, angiogenezo in metastaziranje in jih tudi regulira. Za THC je raziskan močan vpliv na autofagijo. Pri raku je ta proces moten, THC ga lahko ponovno vzpostavi. Kombinacija obeh učinkovin vpliva na celične procese in uničuje maligno spremenjene celice (Bagar, 2020). Zdravljenje raka s kanabinoidi je že preizkušeno. Kanabinoidi in kemoterapevtiki so na celični liniji raka trebušne slinavke pokazali obetavne rezultate. Raziskovalci so kombinirali gemcitabin in kanabinoide; kemoterapevtik je povečal autofagijo, ki so jo povzročili kanabinoidi, ti so okrepili apoptotični učinek gemcitabina (Mangal, in drugi, 2021).

2.2 MELANOM

Rakave celice so celice, ki so telesu lastne in izkrivljene, zato se lahko izognejo imunskemu uničenju z imunskim urejanjem, ki vključuje tri faze: izločanje, ravnotežje in pobeg. Celice imunogenega izločanja odkrijejo celice, ki jih prenesejo citotoksičnim T celicam, ki so specifične za melanom. Te aktivirajo protitumorske odzive. V procesu delovanja odziva preživijo celice z nizko imunogenostjo. Tako se izognejo imunski detekciji. Imunsko odporni

kloni celic, ki so preživele, se razmnožujejo in nemoteno potujejo v organe (Eddy, Shah, & Chen, 2021).

Obstajata dve vrsti kožnega raka: nemelanomski kožni rak in melanom. Pod nemelanomske oblike kožnega raka spadata bazalnocelični karcinom ter ploščatocelični karcinom (Jazbinšek, 2019). Pri melanomu poznamo različne histološke tipe; melanom s površinskim širjenjem, lentigo maligni, nodelarni, akralni lentigoinozni, dezmplastični melanon, melanom sluznice. Melanom je oblika malignega tumorja, ki nastane zaradi mutacij v melanocitih. Čeprav predstavlja le 4% primerov kožnega raka, predstavlja 75% smrti zaradi kožnega raka (podatki iz leta 2019) (Davis, 2019). Kožni melanom je neoplazma melanocitov. V bazalni plasti kožne povrhnjice se nahajajo celice imenovane melanocite, ki so odgovorne za proizvodnjo pigmenta melanina (Liu, 2014). Melanin absorbira UV sevanje in tako ščiti jedra celic izpostavljenih soncu. Zgornjo plast kože sestavljajo celice, imenovane keratinocite, ki po dozorenju keratinizirajo, ostanejo brez jedra in odmrejo. Plast odmrlih keratinocit, ki vsebujejo melanin, predstavlja zaščito za plasti živih celic pod njo (Davis, 2019).

Izpostavljenost ultravijoličnemu sevanju je eden izmed glavnih dejavnikov tveganja za nastanek melanoma. Študije kažejo, da samo ena sončna opeklina z mehurčki v otroštvu več kot podvoji tveganje za melanom. UV sevanje vodi do baznih mutacij DNK, ki so visoko prisotne v kožnem melanomu (Liu, 2014). Na pojavnost in napredovanje melanoma vplivajo genetske mutacije ciklinsko odvisnega inhibitorja kinaze 2A (CDKN2A), ciklinsko odvisne kinaze 4 (CDK4), Ras gena, okvare v procesu poprave DNA ... (Fath, in drugi, 2022). Najbolj raziskana signalna pot v melanocitah je z mitogenom aktiviran protein kinaza (MAPK), na kateri so tudi zelo pogoste genetske spremembe. Mutacija gena BRAF je prisotna pri več kot 50% melanocitov, pri tem je najbolj pogosta substitucija valina v glutamin (V600E), v približno 25% je prisotna mutacija gena GTPaze NRas (NRAS), manj prisotna pa je mutacija MEK (Rožanc J. S., 2019). Mutaciji genov BARF in NRAS povzročata proliferacijo⁶ celic in s tem nenadzorovano rast tumorjev (Liu, 2014).

Osebe s svetlo kožo, svetlimi ali rdečimi lasmi in svetlimi očmi so doveznejše za razvoj melanoma v primerjavi s celotno populacijo, saj oblika melanina, ki jo proizvajajo (feomelanin), kožo pred UV sevanjem ščiti manj kot eumelanin. Večje nagnjenje k nastanku melanoma imajo tudi osebe, katerih sorodniki so razvili to bolezen, saj je 5 – 12% melanomov dednih (Davis, 2019).

⁶ rast in razmnoževanje kakih struktur

2.2.1 Zdravljenje melanoma

Za zmanjšanje umrljivosti je najpomembnejše zgodnje odkrivanje melanoma. Primarna oblika zdravljenja v zgodnjih fazah je kirurška ekscizija, ki temelji na širokem kirurškem obrezu. Petletno preživetje znaša 99% (Marzeda, Drozd, Wróblewska-Łuczka, & Łuszczki, 2021). V začetnih fazah je primarna oblika zdravljenja kirurška resekcija, ki predstavlja visoko stopnjo preživetja, v kolikor se še metastaze niso razvile. Z razvitimi metastazami kirurška odstranitev ni pretirano učinkovita. Zdravljenje so poskusili z radioterapijami, ki so se prav tako izkazale za neučinkovite (Liu, 2014). Kemoterapije z dakarbazinom so ena najboljših možnosti, pri tem je stopnja enoletnega preživetja 27%. Razvit še ni bil noben drug kemoterapevtik, ki bi bil učinkovitejši in manj toksičen. Novejša odkritja zdravil so izboljšala prognozo zdravljenja in se preusmerila k tarčnim terapijam in imunoterapijam (Davis, 2019).

Ko bolezen napreduje v agresivno ali metastatsko stanje, se zdravi s kemoterapijami učinkovin dakarbazin, temozolomid, lomustin in vinorelbin, terapijami na osnovi citokinov in zaviralcev receptorjev imunske kontrole točke (Pathipaka, 2023). Za zdravljenje melanoma se najpogosteje uporablja kombinacija cisplatina in 5-fluorouracila, ki spodbujata apoptozo s poseganjem v sintezo DNK v aktivnih rakavih celicah (Bachari, Piva, Salami, Jamshidi, & Mantri, 2020). Tarčne terapije vključujejo zaviralce BRAF (Pathipaka, 2023).

Inhibitorji BRAF vemurafenib, debrafenib in encorafenib se uporabljajo za zdravljenje melanoma z mutacijo BRAF^{V600}. Te učinkovine so selektivni zaviralci BRAF kinaze. Z inhibicijo BRAF ovirajo signalno pot, ki regulira proliferacijo in preživetje melanomskeh celic. BRAF inhibitorji obnavljajo imunsko stimulacijski mikrookolje v BRAF-mutiranem melanomu, kar storijo tako, da povečajo izražanje imunsko stimulacijskih molekul/citokinov. Prav tako povečajo infiltracijo T celic v tumorsko mikrookolje in izboljšajo prepoznavanje melanomskeh celic ter tako zmanjšujejo možnost, da bi tumorske celice ušle prepoznavi T celic. BRAF inhibitorji izboljšajo aktivnost efektorskih T celic, ker povečajo njihovo aktivnost (Proietti, in drugi, 2020).

Kljub učinkovitosti ciljnih terapij, tumorske celice pogosto razvijejo odpornost, kar zmanjša klinično prognozo bolnikov. Imunoterapije vključujejo anti-citotoksični T limfocitni antigen-4 (anti-CTLA-4, ipilimumab), anti-programirani protein celične smrti 1 (anti-PD-1, nivolumab in pembrolizumab) in anti-PD-ligand 1 (anti- PD-L1, atezolizumab). Te učinkovine zmanjšujejo rast tumorja in metastaz. Uporabljajo se v kombinaciji z drugimi terapijami (Pathipaka, 2023).

Intralesionalno zdravljenje je vbrizgavanje večje koncentracije zdravila neposredno v kožne spremembe (Jagdish, in drugi, 2021). En takih zdravljenj je talimogene laherparepvec (v nadaljevanju T-VEC). T-VEC je genetsko spremenjen onkolitičen HSV-1 virus (herpes simplex), ki nima zmožnosti replikacije v nevronih, a ima ohranjeno sposobnost okužbe in razmnoževanja v tumorskih celicah, prav tako je tumorsko specifičen. Virus vključuje gen, ki kodira človeški GM-CSF, ki se sprosti ob lizi tumorskih celic, kar povzroči izboljšan imunski odziv. Terapija je pokazala omejeno klinično učinkovitost kot monoterapija (Knight, Karapetyan, & Kirkwood, 2023).

Kot potencialno zdravljenje so bili predstavljeni tudi zaviralci histonske demetilaze in deacetilaze, ki nadzorujejo aktivacijo ali zatiranje histona na tarčnih mestih genov (Sabit, Klaiyadan, & Menezes, 2020).

Učinkovitost terapij je pogosto omejena zaradi njihove toksičnosti, neželenih stranskih učinkov, metastaz in mehanizmov odpornosti (Marzeda, Drozd, Wróblewska-Łuczka, & Łuszczki, 2021).

2.3 SORODNE RAZISKAVE

V raziskavi učinkov ekstraktov konoplje na celice melanoma so preučevali vpliv ekstraktov Berocan, Bedrolit, Bedrobinol, Bedica in Bediol na celične linije SK – MEL 28, SK – MEL 2, WM1366 in MEL – JUSO. Celice so izpostavili različnim koncentracijam ekstraktov in spremljali njihovo celično viabilnost. Rezultati raziskave so pokazali statistično pomembno zmanjšanje celične viabilnosti pri koncentraciji 15 µg/mL ekstraktov na celične linije MEL – JUSO, WM1366. Najbolj protitumorno je deloval Bedrolit, ki je pri celični liniji MEL – JUSO viabilnost zmanjšal na manj kot 40%, pri liniji WM1366 na manj kot 30%. Najmanjši vpliv je imel ekstrat Bedica. Bedrolit je izmed ekstraktov najbolj zmanjšal celično viabilnost celičnih linij, razen linije SK – MEL 28, kjer je imel izmed vseh ekstraktov najmanjši vpliv. Na liniji SK – MEL 2 imata Bedrobinol in Bedica v primerjavi z drugimi linijami izrazito majhen vpliv. Koncentracija 25 µg/mL je pri vseh celičnih linijah zmanjšala celično viabilnost (Ačko, 2023).

V raziskavi so Rožanc in sodelavci preučevali vpliv konoplje na celično viabilnost celic karcinoma debelega črevesa, pri kateri so analizirali vpliv šestih različnih kanabinoidov in čistih THC in CBD na celice v 48 urah. Pri koncentraciji 10 µg/mL je THC povečal celično

viabilnost, CBD pa jo je zmanjšal. Pri koncentraciji 20 µg/mL sta THC kot CBD zmanjšala celično viabilnost (Rožanc, in drugi, 2021).

V raziskavi Peeri in sodelavcev so preučevali vpliv ekstrakta DQ (Dairy Queen) in njegovih frakcij na celično linijo A-172. Štiri od enajstih frakcij (F4-F7) so bile signifikantno citotoksične. Navedeno je, da je frakcija F4 vsebovala procentualno največ kanabinoida CBG, frakcije F5, F6 in F7 pa kanabinoida THC (Peeri, in drugi, 2021).

V raziskavi Armstrong in sodelavcev so ugotovili, da THC aktivira avtofagijo in apoptozo celic melanoma. Učinek THC so preučevali tudi na celični liniji SK – MEL 28, ki so bile kanabinoidu izpostavljene 48 ur, kjer so zabeležili zmanjšanje celične viabilnosti v odvisnosti od koncentracije (od 1 do 5 µM). Celice so izpostavili tudi temozolomidu (koncentracija od 0 do 50 µM), kjer niso zaznali upada celične viabilnosti, ter mešanici THC in CBD v enakem razmerju (vsak od 0,5 do 2,5 µM), kjer so zabeležili upad celične viabilnosti (Armstrong, in drugi, 2015).

V raziskavi Blázquez in sodelavcev so preučevali s kanabinoidi povzročeno inhibicijo rasti celic melanoma. Raziskali so, da bila rast celic zavirana pri 48 urnem tretiranju pri 1µM THC (celična viabilnost je znašala 70%) (Blázquez, in drugi, 2006).

V raziskavi Anis in sodelavcev so preučevali citotoksično aktivnost frakcij ekstrakta konoplje z veliko vsebnostjo CBD na celično linijo UC T24. Celice so izpostavili frakcijam (F4-F7) v koncentraciji 30 µg/mL za 48 ur, kjer so frakcije F4, F6 in F7 imele največji vpliv v primerjavi z ostalimi frakcijami. Te frakcije so bile enako učinkovite na celični liniji HTB-9. Zapisane frakcije so kemično analizirali s HPLC metodo. Najaktivnejša frakcija F7 je vsebovala procentualno največ CBC, in sicer 85,8% (Anis, in drugi, 2021).

V raziskavi Richtig in sodelavcev so na celični liniji A375 ugotovili redukcijo celične viabilnosti v odvisnosti od koncentracije THC in CBD, kjer se je viabilnost znižala že pri koncentraciji 1µM. V rezultatih so zabeležili, da je CBD viabilnost zmanjševal hitreje (naklon grafa pri CBD je večji kot pri grafu THC). Celice so tretirali tudi z mešanicami THC in CBD, kjer sta bila ta kanabinoida v razmerju 1:1. Opazili so zmanjšanje celične viabilnosti, začenši pri 1µM. Naklon grafa je bil izmed vseh treh najvišji, kar pove, da je bil skupen učinek THC in CBD večji od učinka posameznega kanabinoida. Podobne rezultate so zabeležili tudi pri celični liniji SK – MEL 28 (Richtig, in drugi, 2023).

V raziskavi Hosami in sodelavcev so celice človeškega pljučnega raka A549 tretirali z različnimi koncentracijami (50-900 ng/mL) *Cannabis sativa* za 24, 36 in 48 ur. V 24 urah se je

celična viabilnost zmanjšala v rangu koncentracij 400 – 900 ng/mL, v 36 urah so ugotovili, da se je viabilnost zmanjšala med 300 in 500 ng/mL (med 15% in 25%), v 48 urah so prav tako zabeležili podobna opažanja (Hosami, in drugi, 2021).

V raziskavi García-Morales in sodelavcev so preučevali učinek CBD na viabilnost 6D in MCF-7 celic raka dojke. Celična viabilnost se je zmanjševala v skladu z naraščajočimi koncentracijami (5-20 µM). Najmanjša celična viabilnost je bila, pri obeh celičnih linijah, pri koncentraciji 20 µM, in sicer 25% (García-Morales, in drugi, 2020).

V raziskavi Hughes in sodelavcev so raziskovali bioaktivne spojine *Cannabis sativa* kot zdravilo za raka seroznega jajčnika visoke stopnje. Pri delu so uporabili celične linije COV318, OVCAR-4 in CAOV-3, ki so jih tretirali s CBD, CBG in CBDA v koncentracijah od 0 µM do 100 µM za 24, 48, 72 in 144 ur. Ugotovili so, da so vse tri spojine pri določeni koncentraciji znižale viabilnost vseh celičnih linij. Pri raziskovanju so uporabili tudi nerakovo linijo HFF2, na katero sta vplivala CBD in CBG, ki sta znižala celično viabilnost te celične linije. CBDA viabilnosti ni znižal, kar nakazuje, da učinkuje selektivno na rakave celice (Hughes, Magee, Gallagher, Schilling, & Perry, 2024).

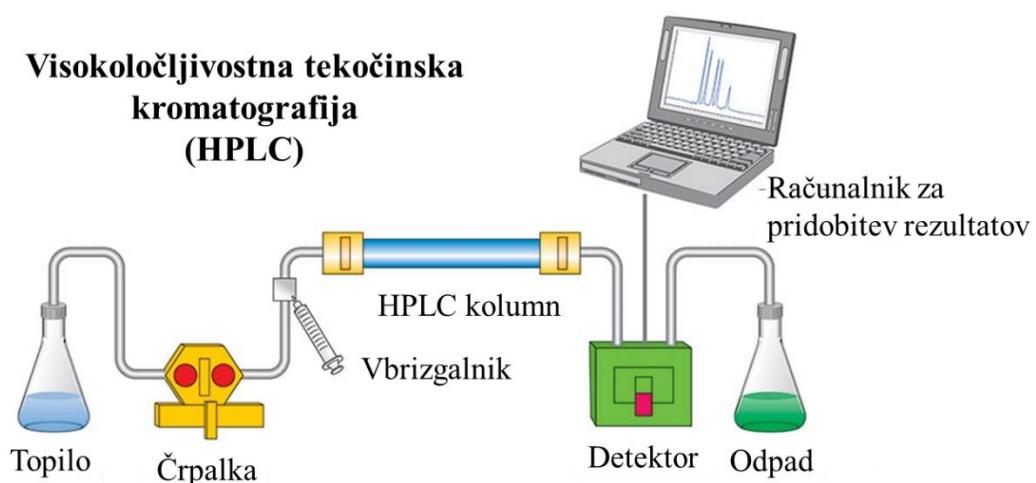
V raziskavi Baram in sodelavcev so preučevali heterogenost in kompleksnost izvlečkov konoplje kot protitumorska sredstva. V raziskavi so za preučevanje celične smrti zaradi apoptoze izpostavili celično linijo A549 THC dominantnemu, CBD dominantnemu in CBG dominantnemu ekstraktu. Po 24 urah so zaznali apoptozo v odvisnosti od odmerka (Baram, in drugi, 2019).

3 METODOLOGIJA DELA

3.1 HPLC METODA

Metoda HPLC je metoda tekočinske kromatografije visoke ločljivosti, ki smo jo izvedli na preparativnem kromatografu Interchim PuriFlash 5.250, opremljenim s PDA in ELSD detektorji (Interchim SA, Francija). V stacionarni fazi A smo kot topilo uporabili 0,1% vodno raztopino trifluoroacetne kisline, v stacionarni fazi B smo uporabili acetonitril. Ločevanje je bilo izvedeno z uporabo 25% A v B kot mobilne faze. Pretočni sistem sistema je bil 16 mL/min, zato je ločevanje posameznega vzorca potekalo 40 minut. Ločene vzorce smo opazovali na valovnih dolžinah 228 nm, 268 nm in 305 nm. Zbrali smo glavne vrhove, ki smo jih opazili na kromatogramu. Pridobili smo podatke za vse vzorce in določili vsebnost kanabinoidov z uporabo analitičnega HPLC.

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, 17 THC-A, CBC, CBL-A, CBC-A) in metanola. Koncentracije vsakega standarda so bile: 3,125, 10,00, 31,25 in 62,50 µg/mL, z izjemo CBL-A, pri katerem so bili standardi polovični: 1,563, 3,125, 10,00 in 31,25 µg/mL. Pripravili smo vzorce frakcij raztopljenih v DMSO v koncentraciji 1 µg/mL. Vzorce smo nato ponovno redčili v razmerju 1:10 in 1:100. Oba rezultata sta bila združena, da smo dobili celotno sestavo frakcij.



Slika 2: HPLC metoda (Aryal, 2023).

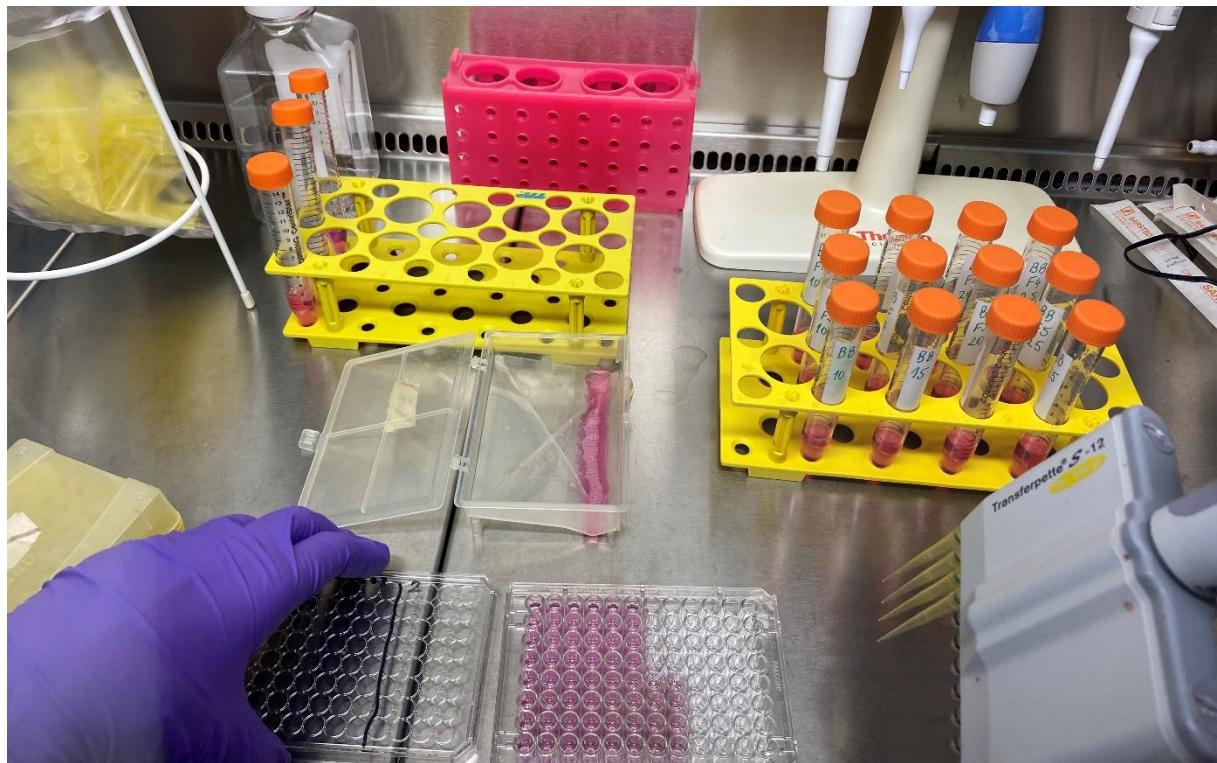
Skladno z razvojem konopljine industrije so bile objavljene mnoge HPLC metode, ki obravnavajo različne kolumne, kombinacije mobilnih faz, prilagoditev pH ipd. (Aubin, Layton, & Helmueller, 2018).

3.2 TEST CELIČNE VIABILNOST PO IZPOSTAVITVI FRAKCIJAM EKSTRAKTOV BEROBINOL IN BEDROLIT

Preučevali smo vpliv frakcij ekstraktov konoplje, vrst *Cannabis sativa* L. ‘Ludina’ (Bedrobinol (Bedrocan, Nizozemska)) in *Cannabis sativa* L. ‘Rensina’ (Bedrolit (Bedrocan, Nizozemska)) na celice melanoma, linij MEL – JUSO, SK – MEL 2 in SK – MEL 28 (ATTC, Manassas, VA, ZDA). Celična linija MEL – JUSO je linija melanomskih celic pridobljenih iz primarnega tumorja 58-letne ženske (MEL-JUSO, n.d.). Celična linija SK – MEL 2 je ena izmed linij celic melanoma z divjim BRAF tipom in mutacijo NRAS (SK-MEL-2: Human Melanoma Cell Line (ATCC HTB-68), n.d.). Celična linija SK – MEL 28 je linija melanocit z mutacijo BRAF in divjim tipom NRAS (SK-MEL-28: Human Melanoma Cell Line (ATCC HTB-72), n.d.).

V plošče s 96 vodnjaki smo v vsak vodnjak napipetirali 7500 celic in jih čez noč pustili v inkubatorju, da so se pritrstile na podlago. Po inkubaciji smo celicam odstranili medij ter jim dodali nov medij z dodano koncentracijo frakcije ekstrakta. Ekstrakte in frakcije smo raztopili v DMSO (Sigma-Aldrich, Missouri, MO, ZDA) v koncentraciji 1 µg/mL. Te smo zmešali s celičnim medijem v koncentracijah 10, 15, 20 in 25 µg/mL za tretiranje celic. Celične linije tretirane z Bedrolitom smo tretirali na dveh ploščah, eno ploščo smo inkubirali 24 ur, drugo pa 48 ur. Ker smo poskus z Bedrobinolom opravljali kasneje, smo celice inkubirali samo 24 ur, saj smo iz rezultatov poskusa z Bedrolitom opazili, da daljša inkubacija bistveno ne spremeni rezultatov. Za analizo celične viabilnosti smo uporabili Alamar Blue (Santa Cruz, Dallas, TX, ZDA) test. Tretiranim celičnim linijam smo po inkubaciji odstranili medij s frakcijami in dodali sveži medij z Alamar Blue reagentom v koncentraciji 10 µg/mL. Reagent Alamar Blue se ob prisotnosti metabolno aktivnih celic iz modre barve, ki je barva ne-fluorescentne molekule resazurina, spremeni v rdečo, fluorescentno molekulo resufurina. Plošče smo inkubirali 4 ure, jih dali na orbitalni stresalnik za 5 minut in jim izmerili fluorescenco, ki smo jo merili pri vzbujevalni valovni dolžini 530 nm in emisijski valovni dolžini 590 nm z uporabo bralnika plošč z več vodnjaki Varioskan Flash (Thermo Scientific, Manassas, VA, ZDA). Merili smo tudi fluorescenco vodnjakov brez celic in celice, h katerim smo dodali samo DMSO, ki so

služile kot kontrola. Kontrola je veljala za 100% celično viabilnost, glede na to vrednost smo izračunali viabilnost vzorcev.



Slika 3: Tretiranje celičnih plošč (vir: lasten).

3.3 STATISTIČNI TESTI

Podatke smo statistično obdelali s T-testi za neodvisne vzorce. Preverjali ali obstajajo statistično značilne razlike med neodvisnimi skupinami celic ter različnimi frakcijami v istih koncentracijah pri posamezni celični liniji. P-vrednosti, ki so manjše od 0,05 smo ovrednotili kot statistično značilne.

4 REZULTATI

Raziskovalci na Medicinski Fakulteti Univerze v Mariboru (MFUM) so nam pripravili frakcije ekstraktov Bedrobinol in Bedrolit za testiranje njihovega vpliva na viabilnost celic melanoma. Z metodo HPLC smo frakcijam in ekstraktoma določili kanabinoidne profile ter testirali njihov vpliv na celično viabilnost celic melanoma linij MEL – JUSO, SK – MEL 2, SK – MEL 28. Frakcije, za katere predpostavimo, da na celično viabilnost nimajo vpliva, viabilnosti niso znižale pod 95%.

4.1 HPLC

Ekstrakt Bedrobinol (Slika 4a) vsebuje 54,696% w/w THC, 1,358% w/w CBN in 1,015% w/w CBC, ostali kanabinoidi so prisotni v manj kot 1% w/w. Frakcija F1 vsebuje THC, vendar je prisoten v manj kot 1% w/w. Frakcija F2 vsebuje 3,472% w/w CBD-ja, 3,272% w/w CBG-A, 3,025% w/w THCV, 1,548% w/w CBDV-A, 1,523% w/w CBN in 1,426% w/w CBG. Frakcija F3 vsebuje 63,669% w/w CBN. Frakcija F4 vsebuje 87,298% w/w THC. Frakcija F5 vsebuje 35,562% w/w CBC in 3,224% w/w THC-A.

Ekstrakt Bedrolit (Slika 4b) vsebuje 38,108% w/w CBD, 2,132% w/w CBC, 1,670% w/w THC, 1,030% w/w CBDV, ostali kanabinoidi so prisotni v manj kot 1% w/w. Frakcija F1 vsebuje 6,690% w/w CBC. Frakcija F2 vsebuje 15,365% w/w CBDV in 3,447% w/w CBC. Frakcija F3 vsebuje 65,679% w/w CBD in 1,571% w/w THC. Frakcija F4 vsebuje 5,571% w/w CBD in 3,108% w/w THC.

a)

%w/w	THC-A	d9-THC	CBD-A	CBD	THCV-A	THCV	CBDV-A	CBDV	CBG-A	CBG	CBC-A	CBC	CBN	CBL-A	CBL	d8-THC
Bedrobinol (BB)	0,048	54,696		0,116		0,107	0,033		0,084	0,035	0,070	1,015	1,358			
BB - F1		0,097														0,033
BB - F2		0,003	0,502	3,472		3,025	1,548	0,021	3,272	1,426				1,523		
BB - F3				0,024				0,024					63,669	0,032		0,349
BB - F4		87,298		0,037	0,005		0,003	0,274			0,048		0,116			0,076
BB - F5	3,224	0,985				0,100			0,006		0,000	36,562	0,014			

b)

%w/w	THC-A	d9-THC	CBD-A	CBD	THCV-A	THCV	CBDV-A	CBDV	CBG-A	CBG	CBC-A	CBC	CBN	CBL-A	CBL	d8-THC
Bedrolit (BL)		1,670		38,108				1,030			0,079	2,132	0,043			
BL - F1	0,015			0,031		0,135	0,064					6,690				
BL - F2				0,652			0,315	15,364				3,447	0,045			
BL - F3		1,571		65,679										0,126		
BL - F4	0,047	3,108		5,571							0,007	0,077			0,047	

Slika 4: Kanabinoidni profili frakcij ekstraktov a) Bedrobinol in b) Bedrolit – rezultati metode HPLC (vir: lasten).

4.2 TESTI CELIČNE VIABILNOSTI

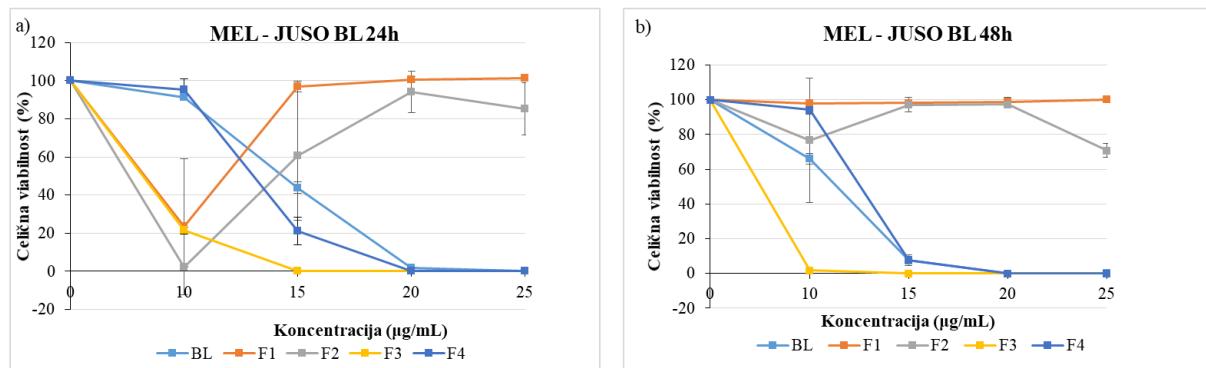
4.2.1 Frakcije ekstrakta Bedrolita

Rezultati vpliva frakcij ekstraktov konoplje, vrste *Cannabis sativa* L. ‘Rensina’ (Bedrolit), na celično linijo MEL – JUSO so pokazali, da ima frakcija F3 pri nižjih koncentracijah statistično pomembno ($p < 0,05$) največji vpliv na viabilnost, sledjo ji celoten ekstrakt Bedrolit, frakcije F4, F2 in nato F1. Na grafu je ta trend težje opaziti, saj so določene vrednosti celične viabilnosti znižane zaradi mrtvih celic v osmih vodnjakih na plošči, ki je bila inkubirana 24 ur in enega mrtvega vodnjaka na plošči inkubirani 48 ur.

Po 24 urah se je viabilnost celic MEL – JUSO (Slika 5a) izpostavljenih frakcijam F1, F2 in F3 pri koncentraciji 10 µg/mL znižala pod 25%. Procent celične viabilnosti se je pri koncentraciji 15 µg/mL pri frakcijah F1 in F2 zvišal na 97% in 61%, kar nakazuje, da je v vodnjakih, ki so bili izpostavljeni frakcijama F1 in F2 v koncentraciji 10 µg/mL, prišlo do napake, ki je povzročila celično smrt. Naš sklep potrjujejo tudi rezultati 48 urne izpostavitve, ki ne kažejo enakega upada viabilnosti. Koncentracija 15 µg/mL frakcije F3 je viabilnost znižala pod 0,1%, enak učinek je imela tudi frakcija F4 pri koncentraciji 20 µg/mL. Celično viabilnost je ekstrakt Bedrolit znižal pod 2% pri koncentraciji 20 µg/mL. Frakciji F1 in F2 viabilnosti nista znižali pod 85% pri koncentracijah 20 µg/mL in 25 µg/mL.

Po 48 urni izpostavljenosti celic MEL - JUSO (Slika 5b) frakcijam ekstraktov smo opazili, da je frakcija F3 pri koncentraciji 10 µg/mL viabilnost znižala pod 2%. Frakcija F4 in ekstrakt Bedrolit sta v koncentraciji 15 µg/mL celično viabilnost znižala pod 8%. Frakcija F2 je v koncentraciji 25 µg/mL viabilnost znižala na 70%, v nižjih koncentracijah vpliva ni imela (pri tem je izjema koncentracija 10 µg/mL, kjer so bile v enem izmed štirih tretiranih vodnjakov

mrtve celice). Frakcija F1 celične viabilnosti ni znižala.

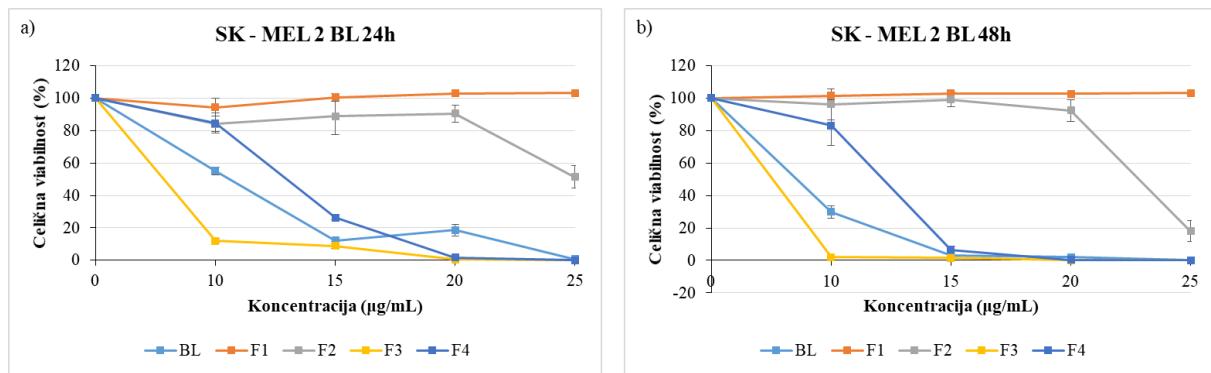


Slika 5: Viabilnost celične linije MEL - JUSO v odvisnosti od koncentracije frakcij ekstrakta Bedrolit a) po 24 urah, b) po 48 urah (+/- 1 SD – standardna deviacija) (vir: lasten).

Rezultati vpliva frakcij ekstraktov konoplje, vrste *Cannabis sativa* L. ‘Rensina’ (Bedrolit), na celično linijo SK – MEL 2 so pokazali, da ima frakcija F3 pri koncentraciji 10 µg/mL statistično pomembno ($p < 0,05$) največji vpliv na celično viabilnost, sledijo ji celoten ekstrakt Bedrolit, frakcije F4, F2 in nato F1. Podoben vzorec opazimo tudi pri celični liniji MEL – JUSO.

Rezultati 24 urne izpostavitve celic SK - MEL 2 (Slika 6a) so pokazali, da je frakcija F3 glede na ostale frakcije in celoten ekstrakt celično viabilnost najbolj znižala pri najnižji koncentraciji (10 µg/mL). Pri koncentraciji 10 µg/mL je bila viabilnost 12%. Celoten ekstrakt Bedrolit (BL) je celično viabilnost znižal pod 20% pri koncentraciji 15 µg/mL, frakcija F4 pa je pri isti koncentraciji viabilnost zmanjšala pod 30%. Pri koncentraciji 25 µg/mL so frakciji F3 in F4 ter ekstrakt Bedrolit viabilnost znižali pod 1%. Frakcija F2 je v koncentraciji 25 µg/mL viabilnost znižala na približno 50%, v nižjih koncentracijah vpliva ni imela. Frakcija F1 vpliva na celično viabilnost ni imela.

Podobne rezultate smo dobili po 48 urni izpostavitvi SK - MEL 2 (Slika 6b) frakcijam ekstrakta in ekstrakta samega. Frakcija F3 je v vseh koncentracijah viabilnost zmanjšala pod 2%, frakcija F4 je v koncentraciji 15 µg/mL viabilnost zmanjšala pod 7%. Ekstrakt Bedrolit je v koncentraciji 15 µg/mL viabilnost zmanjšal pod 3%. Frakcija F2 je pri koncentraciji 25 µg/mL viabilnost znižala na 18%, medtem ko v nižjih koncentracijah ni imela vidnejšega vpliva. Frakcija F1 vpliva na celično viabilnost ni imela.



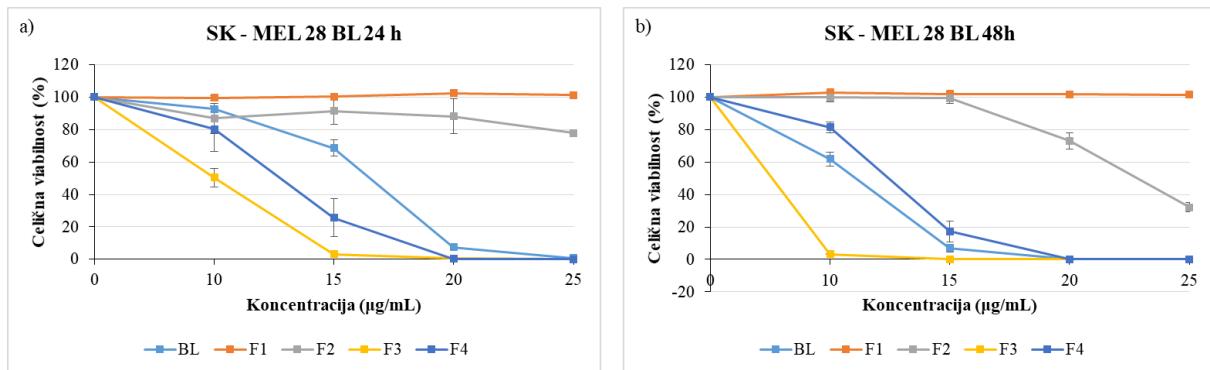
Slika 6: Viabilnost celične linije SK – MEL 2 v odvisnosti od koncentracije frakcij ekstrakta Bedrolit a) po 24 urah, b) po 48 urah (+/- 1 SD) (vir: lasten).

Rezultati vpliva frakcij ekstraktov konoplje, vrste *Cannabis sativa* L. ‘Rensina’ (Bedrolit), na celično linijo SK – MEL 28 so pokazali, da ima frakcija F3 pri koncentraciji 10 µg/mL statistično pomembno ($p < 0,05$) največji vpliv na celično viabilnost, sledita ji frakcija F4 in celoten ekstrakt Bedrolit (njuno nasledje se obrne pri 48 urni izpostavitvi), nato še frakciji F2 in F1.

Po 24 urni izpostavitvi SK – MEL 28 (Slika 7a) je frakcija F3 viabilnost znižala pod 4% pri koncentraciji 15 µg/mL. Frakcija F4 je podoben učinek dosegla pri koncentraciji 20 µg/mL. Pri enaki koncentraciji je ekstrakt Bedrolit viabilnost znižal pod 8%. Pri koncentraciji 25 µg/mL so frakciji F3 in F4 ter ekstrakt Bedrolit viabilnost znižali pod 1%. Frakcija F2 je viabilnost v koncentraciji 25 µg/mL znižala na 78%, v nižjih koncentracijah je imela manjši vpliv. Frakcija F1 vpliva na celično viabilnost ni imela.

Iz rezultatov 48 urne izpostavitve SK - MEL 28 (Slika 7b) lahko opazimo, da daljša izpostavitev celic frakcijam poveča vpliv na celično viabilnost. Frakcija F3 je pri koncentraciji 10 µg/mL viabilnost znižala pod 4%, frakcija F4 je pri koncentraciji 15 µg/mL viabilnost znižala pod 20%, pri 20 µg/mL pa je ta znašala manj kot 1%. Ekstrakt Bedrolit je pri koncentraciji 15 µg/mL viabilnost zmanjšal pod 10%, pri koncentraciji 20 µg/mL pa pod 1%. Frakcija F2 je vidnejši vpliv na viabilnost imela šele v koncentraciji 20 µg/mL, pri koncentraciji 25 µg/mL je viabilnost znižala pod 35%. Frakcija F1 vpliva na celično

viabilnost ni imela.



Slika 7: Viabilnost celične linije SK – MEL 28 v odvisnosti od koncentracije frakcij ekstrakta Bedrolit a) po 24 urah, b) po 48 urah (+/- 1 SD) (vir: lasten).

4.2.2 Frakcije ekstrakta Bedrobinola

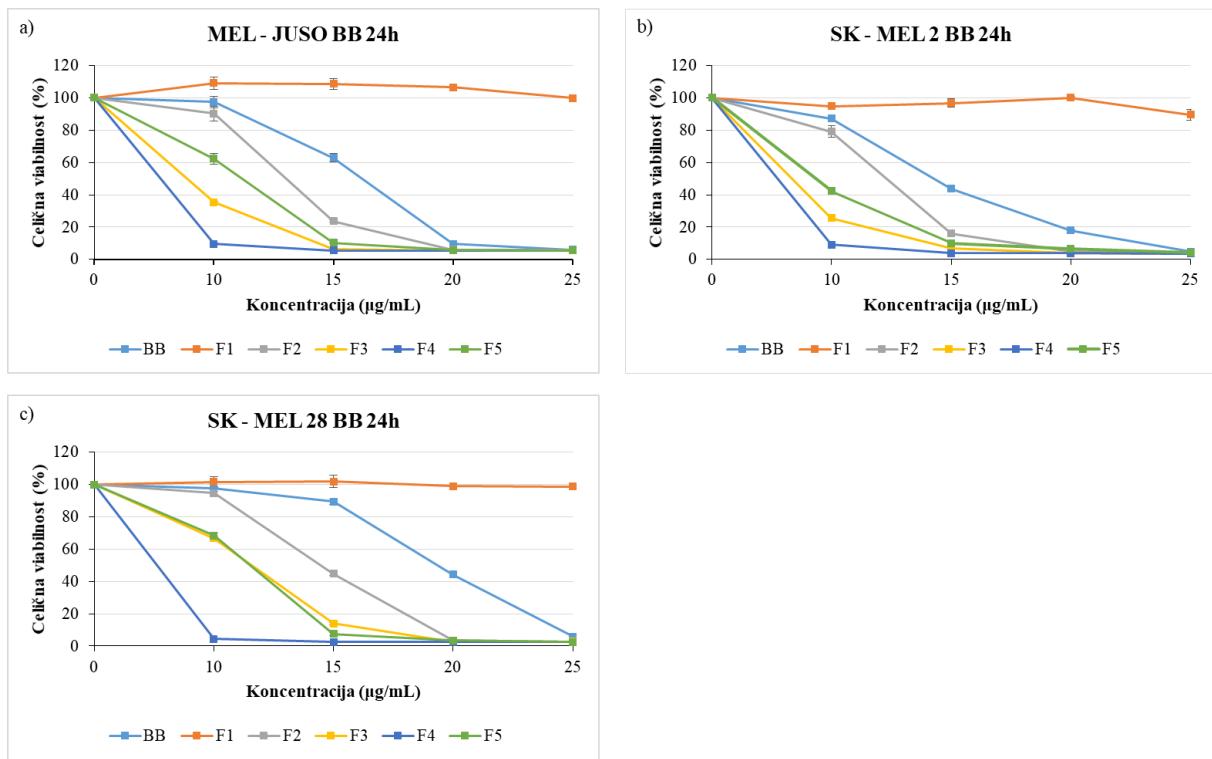
Rezultati vpliva frakcij ekstraktov konoplje, vrste *Cannabis sativa* L. ‘Ludina’ (Bedrobinol), na celično viabilnost linij MEL – JUSO, SK – MEL 2 in SK – MEL 28 (Slika 8) so pokazali, da je na vse tri linije frakcija F4 koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ statistično pomembno ($p < 0,05$) največji vpliv na celično viabilnost. Sledila ji je frakcija F3, z izjemo pri celični liniji SK – MEL 28, kjer je sledila frakcija F5. Frakciji F3 je pri linijama MEL – JUSO in SK – MEL 2 sledila frakcija F5, pri liniji SK – MEL 28 pa je frakciji F5 sledila frakcija F3. Pri vseh celičnih linijah je bila naslednja z največjim vplivom na viabilnost pri nižjih koncentracijah frakcija F2, nato celoten ekstrakt Bedrobinol in F1.

Rezultati so pokazali, da je na viabilnost celične linije MEL – JUSO (Slika 8a) imela frakcija F4 statistično pomembno ($p < 0,05$) največji vpliv pri koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$. Viabilnost se je znižala pod 10%. Frakciji F3 in F5 sta podoben učinek dosegli v koncentraciji 15 $\mu\text{g/mL}$, frakcija F2 in celoten ekstrakt Bedrolita pri 20 $\mu\text{g/mL}$. Frakcija F1 na viabilnost ni imela vpliva.

Celično viabilnost linije SK – MEL 2 (Slika 8b) je frakcija F4 pri koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ znižala pod 10%. Pri koncentraciji 15 $\mu\text{g/mL}$ so frakcije F2, F3 in F5 viabilnost znižale pod 20%. Celoten ekstrakt je imel tak vpliv v koncentraciji 20 $\mu\text{g/mL}$. Pri koncentraciji 25 $\mu\text{g/mL}$ so vse frakcije, razen F1, in celoten ekstrakt viabilnost znižale pod 5%. Frakcija F1 je viabilnost znižala za približno 10% pri koncentraciji 25 $\mu\text{g/mL}$.

Na viabilnost celične linije SK – MEL 28 (Slika 8c) je imela frakcija F4 statistično pomembno ($p < 0,05$) največji vpliv pri koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$. Viabilnost se je znižala pod 5%. Frakciji

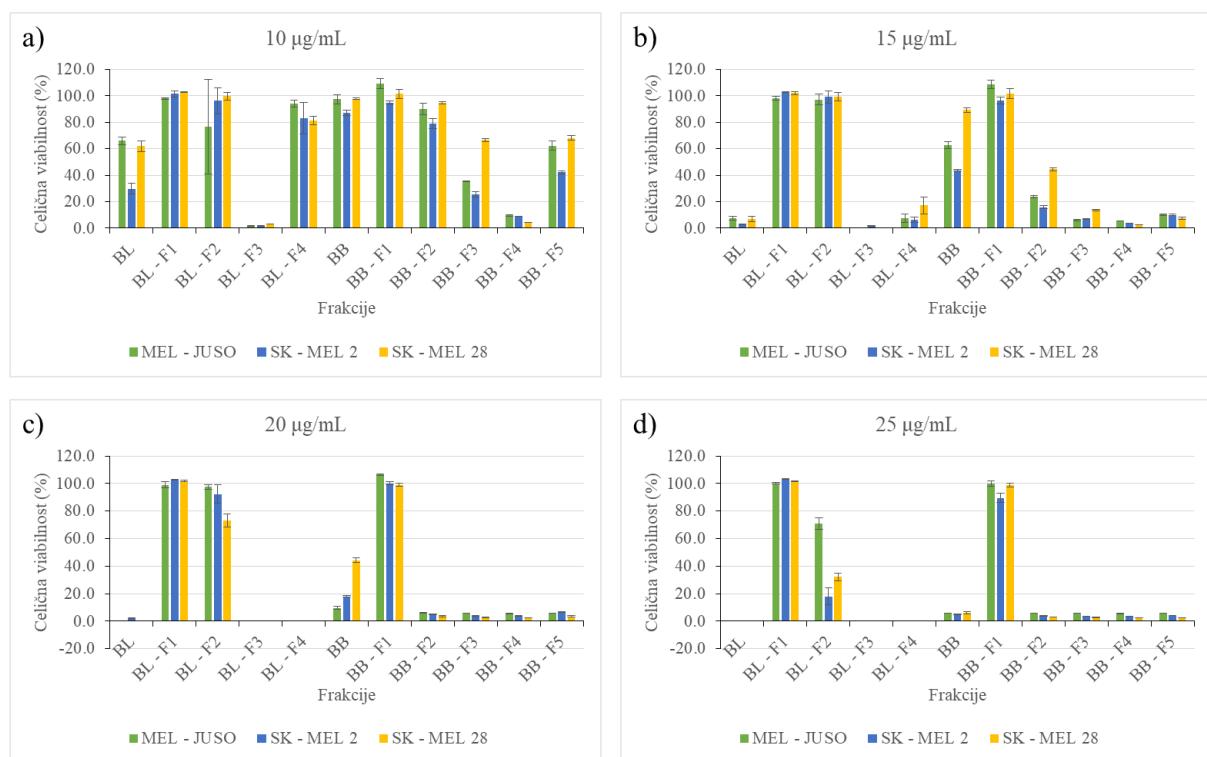
F3 in F5 sta viabilnost znižali pod 15% v koncentraciji 15 µg/mL, frakcija F2 pri 20 µg/mL in celoten ekstrakt Bedrolita pri 25 µg/mL. Frakcija F1 na viabilnost ni imela vpliva.



Slika 8: Viabilnost celičnih linij (a) MEL - JUSO, b) SK - MEL 2, c) SK - MEL 28) v odvisnosti od koncentracije frakcij ekstrakta Bedrobinol (+/- 1 SD) (vir: lasten).

V Sliki 9 je prikazana viabilnost različnih celičnih linij od izpostavitvi različnim frakcijam pri isti koncentraciji. Iz grafov je možno razbrati vpliv posamezne frakcije na različne celične linije. Ekstrakt Bedrolit ima pri koncentraciji 10 µg/mL največji vpliv na viabilnost linije SK – MEL 2, medtem ko viabilnost ostalih dveh linij zmanjša 30% manj. Pri višjih koncentracijah je njegov vpliv na različne linije podoben. Frakcija F1 ekstrakta Bedrolit pri vseh treh celičnih linijah v nobeni koncentraciji ni znižala celične viabilnosti. Frakcija F2 ekstrakta Bedrolit je vpliv na viabilnost imela le v koncentracijah 20 µg/mL in 25 µg/mL. Viabilnost je najbolj znižala pri liniji SK – MEL 2, nato SK – MEL 28 in najmanj pri MEL – JUSO. Frakcija F3 ekstrakta Bedrolit je viabilnost v vseh koncentracijah znižala pod 2%. Tak učinek je imela tudi frakcija F4 ekstrakta Bedrolit v koncentracijah 20 µg/mL in 25 µg/mL. Vpliv ekstrakta Bedrobinol se je med celičnimi linijami razlikoval pri koncentracijah 15 µg/mL in 20 µg/mL, v koncentraciji 10 µg/mL je imel 10% večji vpliv na linijo SK – MEL 2, pri koncentraciji 25 µg/mL je pri vseh linijah viabilnost znižal pod 6%. Frakcija F1 ekstrakta Bedrobinola vpliva na viabilnost skoraj ni imela, pri koncentraciji 25 µg/mL je viabilnost znižala le liniji SK – MEL 2 za 10%. Frakcija F2 ekstrakta Bedrobinol je v koncentracijah 10 µg/mL in 15 µg/mL

imela najmanjši vpliv na linijo SK – MEL 28, največji pa na linijo SK – MEL 2, v koncentracijah 20 µg/mL in 25 µg/mL je viabilnost znižal pod 6%. Frakcija F3 ekstrakta Bedrobinola je pri koncentraciji 10 µg/mL na linijo SK – MEL 28 imela več kot 30% manjši vpliv na viabilnost kot pri ostalima linijama, v višjih koncentracijah pa je viabilnost znižala najprej pod 15%, nato pa pod 6%. Frakcija F4 ekstrakta Bedrobinola je imela na vse linije podoben vpliv in je viabilnost znižala pod 6%. Frakcija F5 ekstrakta Bedrobinol je v koncentraciji 10 µg/mL imela več kot 20% večji vpliv na linijo SK – MEL 2 kot na ostali dve liniji, v višjih koncentracijah je viabilnost nižala podobno pri vseh linijah in jo pri koncentraciji 25 µg/mL znižala pod 6%.



BL: Bedrolit BL - F1: Bedrolit frakcija 1 BL - F2: Bedrolit frakcija 2 BL - F3: Bedrolit frakcija 3 BL - F4: Bedrolit frakcija 4 BB: Bedrobinol
 BB - F1: Bedrobinol frakcija 1 BB - F2: Bedrobinol frakcija 2 BB - F3: Bedrobinol frakcija 3 BB - F4: Bedrobinol frakcija 4 BB - F5: Bedrobinol frakcija 5

Slika 9: Celična viabilnost celičnih linij MEL - JUSO, SK - MEL 2 in SK - MEL 28 v odvisnosti od frakcije v koncentraciji a) 10 µg/mL, b) 15 µg/mL, c) 20 µg/mL in d) 25 µg/mL pri časovni točki 48 ur za frakcije ekstrakta Bedrolita in pri časovni točki 24 ur za frakcije ekstrakta Bedrobinola (+/- 1 SD) (vir: lasten).

5 RAZPRAVA

Namen naše raziskovalne naloge je bil ugotoviti vpliv frakcij ekstraktov konoplje na različne celične linije melanoma. S pomočjo metode HPLC smo ugotovili, katere kanabinoide vsebuje posamezna frakcija ekstraktov dveh sort konoplje (Bedrolit in Bedrobinol). Njihov vpliv na celične linije smo ugotavljali z meritvami celične viabilnosti z reagentom Alamar Blue. Glede na pridobljene rezultate testov z Bedrobinolom je imela frakcija F4 na vse tri celične linije največji vpliv, saj je najbolj znižala celično viabilnost. Sledile so frakcije F5, F3 in F2, frakcija F1 je imela na celice minimalen vpliv, in sicer je najmanj znižala celično viabilnost. Frakcija F4 je vsebovala največ kanabinoida THC, frakcija F5 kanabinoida CBD, frakcija F3 kanabinoida CBN, frakcija F2 pa mešanico kanabinoidov v nižjih vsebnostih. Frakcija F1 je vsebovala manjše deleže različnih kanabinoidov, njihove vrednosti so bile pod 1% w/w. Rezultati viabilnosti po tretiranju z ekstraktom Bedrolitom so pokazali, da je viabilnost vseh treh celičnih linij najbolj znižala frakcija F3, zatem F4. Frakcija F2 je imela vpliv v višjih koncentracijah. Tudi pri tem ekstraktu je imela F1 minimalen vpliv na celice. Frakcija F3 je vsebovala glede na ostale frakcije največji delež kanabinoida CBD in manjši delež THC, podobno frakcija F4, vendar so deleži kanabinoidov manjši. Frakcija F2 je vsebovala kanabinoida CBDV in CBC, frakcija F1 pa kanabinoid CBC.

Med pregledom rezultatov smo ugotovili, da so v nekaterih vodnjakih celične linije MEL - JUSO mrtve celice pri frakcijah v najnižji koncentraciji, kar ni v skladu z ostalimi rezultati in sorodnimi raziskavami. Na plošči celične linije MEL – JUSO izpostavljeni frakcijam ekstrakta Bedrolita za 24 ur smo zabeležili mrtve celice v vodnjakih B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1 in H2. Ker smo poskus izvajali na dveh ploščah, pri čemer smo eno izpostavljeni frakcijam 24 ur, drugo pa 48 ur, smo ugotovili, da mrtve celice niso posledica izpostavitve frakcijam, čeprav smo na plošči linije MEL – JUSO izpostavljeni frakcijam 48 ur zabeležili en vodnjak mrtvih celic (H1), ki pa ne dokazuje, da je smrt celice povzročena zaradi frakcije. Razlogi za smrt celic bi lahko bili uporaba nečiste pipete, kontaminacija celic, poškodovanje celic s konico pipete, toksičnost reagenta Alamar Blue ali nepravilno zaprta plošča. Navedeni razlogi so malo verjetni, saj smo raziskovanje opravljali v sterilnih laminarijih, uporabljali smo multikanalne pipete s sterilnimi konicami (kar ovrže vse razlage s pipetami), učinek vseh teh razlag pa bi bil viden pri vseh vodnjakih celic vseh celičnih linij. Največji toksičen učinek bi med vsemi uporabljenimi pripomočki lahko imelo razkužilo (70% etanol), ki smo ga nanašali na rokavice pred delom v sterilnem okolju laminarija. Pred delom s celicami ves etanol morda ni izhlapel

iz rokavic, s katerimi smo se približali plošči. To bi pojasnilo tudi položaj mrtvih vodnjakov, ki se nahajajo na levem robu plošč. Možna razloga pojava je tudi prisotnost tovarniške napake na vodnjakih na teh dveh ploščah, kar bi povzročilo, da celice niso rasle. V nadaljevanju diskusije teh rezultatov nismo upoštevali.

Rezultati HPLC kromatografije so pokazali vsebnost kanabinoidov v posamezni frakciji ter v obeh ekstraktih. Vsebnosti kanabinoidov so se med frakcijami obeh ekstraktov razlikovale, kar potrjuje prvi del prve hipoteze, ki se glasi »*Frakcije ekstraktov Bedrobinola in Bedrolita bodo imele različne koncentracije kanabinoidov, zato bo njihov vpliv na viabilnost celic iz linij MEL – JUSO, SK – MEL 2 in SK – MEL 28 različen.*« Iz grafov je razvidno, da se vplivi posameznih frakcij na viabilnost razlikujejo. Vpliv na viabilnost se razlikuje glede na koncentracijo, pri kateri se viabilnost zniža in glede na vrednost viabilnosti, na katero jo posamezna koncentracija frakcije zniža. Pri poskusih s frakcijami ekstrakta Bedrobinol (Slika 8) je razvidno, da je vpliv na viabilnost pri posamezni koncentraciji, in sicer frakcija F4, ki vsebuje največji delež THC, je viabilnost statistično pomembno ($p < 0,05$) najbolj znižala, sledila ji je frakcija F3, ki ima največji delež CBN, nato F5 z največjim deležem CBC. Sledila je frakcija F2 z vsebnostjo različnih kanabinoidov v manjših deležih, nato celoten ekstrakt in frakcija F1, ki je imela najmanjšo vsebnost kanabinoidov. Pri poskusih s frakcijami ekstrakta Bedrolit (Slike 5, 6, 7) je prav tako možno opaziti, da je viabilnost statistično pomembno ($p < 0,05$) najbolj znižala viabilnost, sledil ji je celoten ekstrakt, ki vsebuje CBD in manjši delež kanabinoidov THC, CBDV in CBC. Sledila je frakcija F4 s kombinacijo CBD in THC v manjših deležih, nato pa F2 z večjim deležem CBDV in deležem CBC ter F1, ki je viabilnosti ni znižala in vsebuje manjši delež CBC. Rezultati vpliva frakcij na viabilnost potrjujejo drugi del hipoteze, zato smo hipotezo v celoti potrdili.

Naši rezultati so drugo hipotezo, ki se glasi »*Ekstrakti konoplje (Bedrobinol in Bedrolit) in njihove frakcije bodo pri višjih koncentracijah celično viabilnost linij MEL – JUSO, SK – MEL 2 in SK – MEL 28 zmanjšali bolj kot pri nižjih koncentracijah*« potrdili. Višja kot je bila koncentracija frakcije, manjša je bila celična viabilnost. Padanje celične viabilnosti z naraščanjem koncentracije je razvidno na grafih frakcij ekstrakta Bedrobinola (Slika 8). Pri frakcijah ekstrakta Bedrolita ta trend ni viden na grafu Slike 5a pri frakcijah F1 in F2 ter na grafu Slike 5b pri frakciji F2 zaradi mrtvih celic. Hipotezo smo vseeno potrdili na podlagi rezultatov 48 urne izpostavitve frakcijam. Pri grafu Slike 7a opazimo odstopanja pri frakciji

F2. Pri koncentracijah 10 µg/mL in 15 µg/mL je frakcija po 24 urni izpostavitvi celično viabilnost znižala bolj kot v istih koncentracijah po 48 urni izpostavitvi. Vodnjaki, kjer smo dobili nepričakovane rezultate, so na enakem območju kot vodnjaki mrtvih celic pri celični liniji MEL – JUSO. Ta odstopanja zato pripisujemo etanolu ali napaki pri pipetiranju, zato smo hipotezo potrdili.

Pridobljeni rezultati so tretjo hipotezo, ki se glasi »*Frakcija ekstrakta Bedrobinol z največjo vsebnostjo THC bo imela največji vpliv na celično viabilnost celic iz linij MEL – JUSO, SK – MEL 2 in SK – MEL 28 glede na druge frakcije tega ekstrakta*« potrdili. Glede na rezultate metode HPLC je imela največjo koncentracijo kanabinoida THC frakcija F4, ki je najbolj znižala celično viabilnost. Na grafih Slike 8 je razvidno, da je frakcija F4, glede na naklon grafa, celično viabilnost statistično pomembno ($p < 0,05$) zmanjšala pri koncentraciji 10 µg/mL in jo pri višjih koncentracijah še zmanjševala. Takšne rezultate so dobili tudi pri rakavih celicah debelega črevesa, kjer so upad celične viabilnosti pri tretiraju s THC zabeležili pri koncentraciji 20 µg/mL (Rožanc, in drugi, 2021). V raziskavi (Peeri, in drugi, 2021) so pri frakcijah, ki so vsebovale procentualno največ THC, zabeležili citotoksičnost. Nasprotno z našimi ugotovitvami, je v raziskavi (Rožanc, in drugi, 2021) THC pri tej koncentraciji viabilnost povečal. Pri naših rezultatih podoben učinek frakciji F4 dosežeta tudi frakciji F3 in F5 (Slika 8), vendar pri višjih koncentracijah, zato smo hipotezo potrdili.

Četrto hipotezo »*Frakcija ekstrakta Bedrolit z največjo vsebnostjo CBD bo imela največji vpliv na celično viabilnost celic iz linij MEL – JUSO, SK – MEL 2 in SK – MEL 28 glede na druge frakcije tega ekstrakta*« smo na podlagi rezultatov potrdili. Glede na rezultate HPLC je imela najvišjo vsebnost kanabinoida CBD frakcija F3. Frakcija F3 pri grafu Slike 5a in 5b celično viabilnost glede na ostale frakcije statistično pomembno ($p < 0,05$) bolj zniža že pri 10 µg/mL, ničelno vrednost viabilnosti doseže pri koncentraciji 15 µg/mL. Pri grafu Slike 5b pri koncentraciji 15 µg/mL podobno kot frakcija F3 viabilnost znižata frakcija F4 in celoten ekstrakt, ki sta prav tako vsebovala CBD. Pri grafih Slike 6 celične linije SK – MEL 2 lahko opazimo, da je frakcija F3 viabilnost statistično pomembno ($p < 0,05$) znižala že pri 10 µg/mL, medtem ko so ostale frakcije viabilnost primerljivo znižale šele v višjih koncentracijah. Na grafu Slike 7 celične linije SK – MEL 28 je frakcija F3 viabilnost statistično pomembno ($p < 0,05$) znižala bolj kot ostale frakcije pri nižji koncentraciji. V raziskavi (Rožanc, in drugi, 2021) so upad celične viabilnosti pri 48 urnem tretiraju s CBD zabeležili pri 20 µg/mL, kar se od naših rezultatov razlikuje, saj je frakcija z največ CBD (F3) viabilnost znižala že pri koncentraciji 10 µg/mL. V raziskavi (Anis, in drugi, 2021) so različne celične linije tretirali s

frakcijami in ugotovili, da je frakcija z največjim vplivom vsebovala največ CBD. Glede na naše rezultate smo hipotezo potrdili.

Peto hipotezo »*Posamezna frakcija ekstraktov Bedrobinol in Bedrolit bo imela podoben vpliv na celično viabilnost linij MEL – JUSO, SK – MEL 2 in SK – MEL 28*« smo delno potrdili. Posamezne frakcije so imele podoben vpliv na celično viabilnost vseh celičnih linij, vendar nekateri rezultati niso sovpadali s tem trendom. Na grafu Slika 9a opazimo podoben vpliv na vse tri raziskovane celične linije pri frakcijah ekstrakta Bedrolit F1, F3 in F4 ter pri frakcijah ekstrakta Bedrobinola F1, F2 in F4. Vrednosti viabilnosti se pri tem razlikujejo za manj kot 15%. Vrednosti viabilnosti pri frakcijah Bedrolita F2 in Bedrobinola F3 ter F5 pa se med celičnimi linijami razlikujejo za več kot 20%. Frakcija Bedrolita F2 je imela na celično linijo MEL - JUSO v primerjavi z linijo SK – MEL večji vpliv, prav tako v primerjavi z SK – MEL 28. Frakcija F3 Bedrobinola je na linijo SK – MEL 28 imela glede na MEL – JUSO in SK – MEL 2 manjši vpliv na viabilnost. Frakcija Bedrobinola F5 je imela na linijo SK – MEL 2 v primerjavi z linijo MEL – JUSO in z linijo SK – MEL 28 večji vpliv na viabilnost. Med linijami se je razlikoval tudi vpliv celotnega ekstrakta, vendar ti rezultati niso bistveni za vrednotenje hipoteze, saj smo opazovali le vpliv posamezne frakcije. Pri koncentraciji 15 µg/mL (Slika 9b) se je vpliv frakcije na posamezno linijo razlikoval pri frakciji ekstrakta Bedrobinol F2. Ta je imela od vseh največji vpliv na linijo SK – MEL 2. Pri koncentracijah 20 in 25 µg/mL (Slika 9c in 9d) se je vpliv razlikoval pri frakciji F2 ekstrakta Bedrolit. Frakcija je v koncentraciji 20 µg/mL celično viabilnost linije SK – MEL 28 bolj znižala glede na linijo MEL – JUSO in SK – MEL 2. Pri koncentraciji 25 µg/mL je vrednost viabilnosti najnižja pri liniji SK – MEL 2. S pridobljenimi rezultati lahko hipotezo le delno potrdimo, saj jo večina rezultatov potrjuje. Rezultati pri frakcijah Bedrobinola F2 (15 µg/mL), F3 (10 µg/mL) in F5 (10 µg/mL) ter frakcija Bedrolita F2 (10, 20 in 25 µg/mL) hipotezo zavračajo z več kot 15% odstopanj v vplivu na posamezne celične linije. Omeniti je potrebno, da imajo različne celične linije različne mutacije, zato tudi različno izražene kanabinoidne receptorje in različno zavrte ali aktivirane signalne poti, kar vpliva na njihov drugačen odziv na kanabinoide. Pri določenih koncentracijah frakcij smo različen vpliv na različne linije opazili, mnoge frakcije pa so na različno mutirane celice vplivale podobno. V praksi se pri zdravljenju raka uporablja personalizirane terapije zdravljenja, saj se mutacije na rakavih celicah od pacienta do pacienta razlikujejo. Kanabinoid oziroma mešanica kanabinoidov, ki je učinkovita na enem tipu melanoma, morda ne bo imela enakega vpliva na vseh tipih melanoma.

Med raziskovanjem smo naleteli na nepojasnjene napake, ki so lahko posledica površnosti pri delu (pipetiranju), pri razlogih za mrtve celice v določenih vodnjakih smo omenili tudi možne tovarniške napake na ploščah, ki smo jih uporabljali. Rezultate bi lahko izboljšali s ponovitvijo poskusa, pri katerem je prišlo do nepojasnjene celične smrti v določenih vodnjakih, česar zaradi časovne omejitve nismo storili. Raziskavo bi bilo smiselno razširiti na več celičnih linij melanoma ter na druge tipe raka. Raziskati bi bilo potrebno tudi vpliv posameznih frakcij na zdrave melanocite brez prisotnih rakavih mutacij. Nadgradnja naše raziskave bi bilo iskanje vpliva posameznih kanabinoidov pridobljenih iz *Cannabis Sative L.* in njihov vpliv na celično viabilnost celic melanoma. S tem bi ugotovili, ali imajo posamezni kanabinoidi vpliv na viabilnost in ali je padec viabilnosti ob prisotnosti določene frakcije posledica delovanja le enega kanabinoida ali sinergističnega učinka več kanabinoidov. Iz naših rezultatov je pri nekaterih frakcijah že koncentracija 10 µg/mL viabilnost znižala pod 1%. Poskus bi za te frakcije ponovili pri nižjih koncentracijah in s tem ugotovili najnižjo koncentracijo, ki znižuje celično viabilnost. Naša raziskava se navezuje le na 16 kanabinoidov, poznamo pa jih še več. Ekstrakti konoplje in njihove frakcije poleg kanabinoidov vsebujejo tudi druge aktivne snovi, kot so terpeni, flavinoidi ... Raziskati bi bilo potrebno tudi njihov vpliv na celice, da bi lahko izključili njihovo vlogo pri vplivu frakcij na celično viabilnost.

6 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Raziskovanja smo se lotili s poznavanjem in upoštevanjem načel družbene odgovornosti. Raziskovali smo na okolju prijazen način, raziskovanje opravljali v zaščitenem okolju in z minimalnim odpadom. Nastal biološki in ostali odpad smo po predpisih odstranili. Z našo raziskavo smo ugotavljali vpliv posameznih kanabinoidov prisotnih v konoplji na celice melanoma, ki je ena izmed smrtonosnejših oblik raka. Različne oblike raka so v mnogih primerih smrtonosne, pravega zdravila pa ne poznamo. Mnoge razvite terapije imajo zdravilni učinek, vendar se marsikdaj z zdravljenjem le podaljšuje bolnikovo življenje. Alternativne metode zdravljenja se išče v imunoterapijah tudi s kanabinoidi konoplje. Ugotovitve iz naše raziskave pripomorejo k iskanju primernih načinov zdravljenja raka in pripomorejo k iskanju rešitve za to visoko prisotno bolezen. Ta naloga prav tako spodbuja uporabo konoplje v medicinske namene, saj ta rastlina vsebuje mnogo zdravilnih in potencialno zdravilnih snovi. Konoplja vsebuje različne učinkovine, ki so lahko za razne bolnike koristne, vendar mora biti njena uporaba načrtovana s strani specialistov, ki se s tem ukvarjajo. Vsaka bolezen, kot tudi različni tipi raka, na konopljine učinkovine odreagirajo drugače, zato je pomembna pravilna in primerna uporaba konoplje.

7 ZAKLJUČEK IN SKLEPI

V raziskovalni nalogi nas je zanimal vpliv posameznih frakcij ekstraktov konoplje, vrst *Cannabis sativa* L. ‘Ludina’ (Bedrobinol) in *Cannabis sativa* L. ‘Rensina’ (Bedrolit), na celice melanoma, linij MEL – JUSO, SK – MEL 2 in SK – MEL 28. Konoplja je rastlina, ki vsebuje veliko aktivnih učinkovin, zato ima velik potencial za uporabo v zdravstvene namene. Veliko raziskav se ukvarja z možnostmi njene uporabe na področju onkologije, kar zajema tudi njen potencialno uporabo pri zdravljenju različnih tipov melanoma. Pred raziskovanjem smo poiskali literaturo iz tega področja in se lotili raziskovanja. Celične linije melanoma z različnimi mutacijami smo tretirali z v naprej pripravljenimi frakcijami ekstraktov Bedrolit in Bedrobinol v koncentracijah 10, 15, 20 in 25 µg/mL, jih inkubirali in nato opravili test celične viabilnosti z reagentom Alamar Blue. Dobili smo podatke o fluorescenci, ki smo jih pretvorili v procente viabilnosti. Ugotovili smo, da večja koncentracija frakcije intenzivnejše zniža celično viabilnost. S pomočjo HPLC metode smo frakcijam določili kanabinoidne profile. Kanabinoidni profili frakcij se med frakcijami razlikujejo kot tudi njihov vpliv na celično viabilnost. Pri tem smo opazili vzorec vsebnosti kanabinoidov v frakcijah glede na vpliv posamezne frakcije na celično viabilnost. V frakciji, ki je imela največji vpliv na celično viabilnost, je prevladoval kanabinoid CBD, nato THC, CBN, kombinacija CBD in THC-A, frakcije z mešanico kanabinoidov z manjšimi deleži posameznih kanabinoidov in CBC, ki sam ni imel vpliva. Frakcija ekstrakta Bedrobinol, ki je imela največ THC, je v primerjavi z drugimi frakcijami imela največji vpliv na celično viabilnost in enako tudi frakcija ekstrakta Bedrolit, ki je vsebovala največ CBD. Nekatere frakcije so na vse celične linije imele enak učinek, medtem ko so frakcije F2, F3 in F5 pri ekstraktu Bedrobinol in F2 pri ekstraktu Bedrolit ter oba ekstrakta od tega odstopale z več kot 20% razlikami v vplivu na različne celične linije. Zaradi entourage efekta med učinkovinami v konoplji je njen učinek na rakave celice težko napovedati, zato so potrebne še mnoge raziskave na tem področju, za optimalno uporabo pri zdravljenju rakavih obolenj.

8 VIRI IN LITERATURA

- Abrams, D. I. (2022). Cannabis, Cannabinoids and Cannabis-Based Medicines in Cancer Care. *SAGE journals*, 1. doi:<https://doi.org/10.1177/15347354221081772>
- Ačko, N. (2023). *EKSTRAKTI MEDICINSKE KONOPLJE (Cannabis sativa) IN NJIHOVI UČINKI NA CELICE MELANOMA*. Pridobljeno iz Zveza prijateljev mladine Slovenije: <https://zpm-mb.si/raziskovalne-naloge/>
- Aizpurua-Olaizola, O., Elezgarai, I., Rico-Barrio, I., Zarandona, I., Etxebarria, N., & Usobiaga, A. (2017). *Targeting the endocannabinoid system: future therapeutic strategies*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.08.005>
- Al-Kazaleh, A. K., Zhou, X., Bhuyan, D. J., Münch, G. W., Al-Dalabeeh, E. A., Jaye, K., & Chang, D. (2024). The Neurotherapeutic Arsenal in Cannabis sativa: Insights into Anti-Neuroinflammatory and Neuroprotective Activity and Potential Entourage Effects. *Molecules*, 2. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules29020410>
- Andre, C. M., Hausman, J.-F., & Guerriero, G. (2016). Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Front. Plant Sci*, 2-3. doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019>
- Anis, O., Vinayaka, A. C., Shalev, N., Namdar, D., Nadarajan, S., Anil, S. M., . . . Koltai, H. (2021). Cannabis-Derived Compounds Cannabichromene and Δ9-Tetrahydrocannabinol Interact and Exhibit Cytotoxic Activity against Urothelial Cell Carcinoma Correlated with Inhibition of Cell Migration and Cytoskeleton Organization. *Molecules*, 2. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules26020465>
- Armstrong, J. L., Hill, D. S., McKee, C. S., Hernandez-Tiedra, S., Lorente, M., Lopez-Valero, I., . . . Lovat, P. E. (2015). Exploiting Cannabinoid-Induced Cytotoxic Autophagy to Drive Melanoma Cell Death. *Journal of Investigative Dermatology*, 1630-1634. doi:[10.1038/jid.2015.45](https://doi.org/10.1038/jid.2015.45)
- Aryal, S. (2023). *HPLC: Principle, Part, Types, Uses, Diagram*. Pridobljeno iz Microbe Notes: <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>
- Asati, A. K., Sahoo, H. B., Sahu, S., & Dwivedi, A. (2017). Phytochemical and pharmacological profile of Cannabis sativa L. *Int J Ind Herbs Drugs*, 37-38.

Pridobljeno

iz

<https://www.saap.org.in/journals/index.php/herbsanddrugs/article/view/44/37>

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*, 5. Pridobljeno iz <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006426en.pdf>

Bachari, A., Piva, T. J., Salami, S. A., Jamshidi, N., & Mantri, N. (2020). Roles of Cannabinoids in Melanoma: Evidence from In Vivo Studies. *Int. J. Mol. Sci.*, 2. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms21176040>

Bagar, T. (2020). *Konoplja v medicini*. Ljubljana: ICANNA - Mednarodni inštitut za kanabinoide. Pridobljeno iz ICANNA - Mednarodni inštitut za kanabinoide.

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*, 4094. doi:<https://doi.org/10.18632/oncotarget.26983>

Barrales-Cureño, H. J., López-Valdez, L. G., Reyes, C., Cetina-Alcalá, V. M., Vasquez-García, I., Diaz-Lira, O. F., & Herrera-Cabrera, B. E. (2020). Chemical Characteristics, Therapeutic Uses, and Legal Aspects of the Cannabinoids of Cannabis sativa: A Review. *Human and Animal Health*, 6. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2020190222>

Bedrocan. (2024). *Cannabis Products*. Pridobljeno iz Bedrocan: <https://bedrocan.com/Cannabis-products/>

Bilalis, D., Karidogianni, S., Roussis, I., Kouneli, V., Kakabouki, I., & Folina, A. (2019). Cannabis sativa L.: A New Promising Crop for Medical and Industrial Use. *Bulletin UASVM Horticulture*, 146. doi:<https://doi.org/10.15835/buasvmcn-hort:2019.0020>

Bismarck, R., Nogueira Alencar, A., Freitas de Bem, G., Fontes-Dantas, F. L., & Carneiro Montes, G. (2023). Endocannabinoid System: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Pharmaceuticals*, 2. doi:<https://doi.org/10.3390/ph16020148>

Blázquez, C., Carracedo, A., Barrado, L., Real, P. J., Fernández-Luna, J. L., Velasco, G., . . . Guzmán, M. (2006). Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *The FASEB Journal*, 2202. Pridobljeno iz <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1096/fj.06-6638fje>

- Borille, B. T., González, M., Steffens, L., Scorsatto Ortiz, R., & Pereira Limberger, R. (2017). Cannabis sativa: A systematic review of plant analysis. *Drug Analytical Research*, 1-3. Pridobljeno iz <https://seer.ufrgs.br/index.php/dar/article/view/73676/43167>
- Christensen, C., Rose, M., Cornett, C., & Allesø, M. (2023). Decoding the Postulated Entourage Effect of Medicinal Cannabis: What It Is and What It Isn't. *Biomedicines*, 1-3. doi:<https://doi.org/10.3390/biomedicines11082323>
- Dariš, B., Tancer Verbotan, M., Knez, Ž., & Ferk, P. (2019). *Cannabinoids in cancer treatment: Therapeutic potential and legislation*. Pridobljeno iz <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6387667/>
- Davis, L. E. (2019). *Current state of melanoma diagnosis and treatment*. Pridobljeno iz Cancer biology & therapy: <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1640032>
- De Pietro, M. (2021). *What to know about endocannabinoids and the endocannabinoid system*. Pridobljeno iz <https://www.medicalnewstoday.com/articles/endocannabinoid>
- Eddy, K., Shah, R., & Chen, S. (2021). Decoding Melanoma Development and Progression: Identification of Therapeutic Vulnerabilities. *frontiers in Oncology*, 3. doi:<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.626129>
- Fanni Tóth, K., Ádám, D., Bíró, T., & Oláh, A. (2019). Cannabinoid Signaling in the Skin: Therapeutic Potential of the “C(ut)annabinoid” System. *Molecules*, 2. doi:[10.3390/molecules24050918](https://doi.org/10.3390/molecules24050918)
- Fath, M. K., Azargoonyahromi, A., Soofi, A., Almasi, F., Hosseinzadeh, S., Khalili, S., . . . Pourzardosht, N. (2022). Current understanding of epigenetics role in melanoma treatment and resistance. *Cancer Cell International*, 1. doi:<https://doi.org/10.1186/s12935-022-02738-0>
- García-Morales, L., Castillo, A. M., Ramírez, J. T., Zamudio-Meza, H., Domínguez-Robles, M., & Meza, I. (2020). CBD Reverts the Mesenchymal Invasive Phenotype of Breast Cancer Cells Induced by the Inflammatory Cytokine IL-1β. *Int. J. Mol. Sci.*, 2-3. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms21072429>
- Hosami, F., Manayi, A., Salimi, V., Khodakhah, F., Nourbakhsh, M., Nakstad, B., & Tavakoli-Yaraki, M. (2021). The pro-apoptosis effects of Echinacea purpurea and Cannabis sativa extracts in human lung cancer cells through caspase-dependent pathway. *BMC*

Complementary Medicine and Therapies, 4-6. doi:<https://doi.org/10.1186/s12906-021-03204-6>

Hughes, C., Magee, R., Gallagher, W., Schilling, S., & Perry, A. (2024). *Abstract B019: Investigating Cannabis sativa bioactive compounds as an anti-cancer treatment in high-grade serous ovarian cancer.* doi:<https://doi.org/10.1158/1538-7445.OVARIAN23-B019>

Jagdish, S., Dhruv, S., Jitesh, K., Hirapara, B., Purohit, M., Bhalala, K., . . . Dudhatra, N. (2021). Intralesional Agents in Dermatology: Pros and Cons. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 1. doi:[10.4103/JCAS.JCAS_109_20](https://doi.org/10.4103/JCAS.JCAS_109_20)

Jazbinšek, I. (2019). *OZAVEŠČENOST ŠTUDENTOV ZDRAVSTVENE NEGE O KOŽNEM RAKU KOT POSLEDICI SONČENJA.* Pridobljeno iz <https://dk.um.si/Dokument.php?id=138669&lang=slv>

Knight, A., Karapetyan, L., & Kirkwood, J. (2023). Immunotherapy in Melanoma: Recent Advances and Future Directions. *Cancers*, 9-10. doi:<https://doi.org/10.3390/cancers15041106>

Liu, Y. &. (2014). *Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management.* Pridobljeno iz Molecular and cellular pharmacology: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4346328/>

Lowe, H., Toyang, N., Steele, B., Bryant, J., & Ngwa, W. (2021). The Endocannabinoid System: A Potential Target for the Treatment of Various Diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 1-2, 8-9. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms22179472>

Mangal, N., Erridge, S., Habib, N., Sadanandam, A., Reebye, V., & Sodergren, M. (2021). Cannabinoids in the landscape of cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 6. doi:[10.1007/s00432-021-03710-7](https://doi.org/10.1007/s00432-021-03710-7)

Marzeda, P., Drozd, M., Wróblewska-Łuczka, P., & Łuszczki, J. J. (2021). Cannabinoids and their derivatives in struggle against melanoma. *Pharmacological Reports*, 1486-. doi:<https://doi.org/10.1007/s43440-021-00308-1>

MEL-JUSO. (brez datuma). Pridobljeno iz Creative Bioarray: <https://www.creative-bioarray.com/MEL-JUSO-CSC-C0235-item-1085.htm>

Mouhamed, Y., Vishnyakov, A., Qorri, B., Sambi, M., Frank, S. S., Nowierski, C., . . . Szewczuk, M. R. (2018). Therapeutic potential of medicinal marijuana: an educational

primer for health care professionals. *Drug, Healthcare and Patient Safety*, 51. doi:<https://doi.org/10.2147/DHPS.S158592>

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*, 7-8. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules24173031>

National Institute on Drug Abuse. (2023). *Synthetic Cannabinoids*. Pridobljeno iz <https://nida.nih.gov/research-topics/synthetic-cannabinoids>

O'Reilly, E., Khalif, K., Cosgrave, J., Azam, H., Prencipe, M., Simpson, J. C., . . . Perry, A. S. (2023). Cannabidiol Inhibits the Proliferation and Invasiveness of Prostate Cancer Cells. *Journal of Natural Products*, 2152. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.3c00363>

Obuzor, G. U., Oyedeji, O. O., Gondwe, M., Hosu, Y. S., Oyedeji, A. O., & Odieka, A. E. (2022). The Medicinal Natural Products of Cannabis sativa Linn.: A Review. *Molecules*, 3. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules27051689>

Pathipaka, R. T. (2023). *Melatonin kot ponovno uporabljeno zdravilo za zdravljenje melanoma*. Pridobljeno iz MDPI: <https://www.mdpi.com/2076-3271/11/1/9>

Peeri, H., Shalev, N., Vinayaka, A. C., Nizar, R., Kazimirska, G., Namdar, D., . . . Koltai, H. (2021). Specific Compositions of Cannabis sativa Compounds Have Cytotoxic Activity and Inhibit Motility and Colony Formation of Human Glioblastoma Cells In Vitro. *Cancers*, 7-8. doi:<https://doi.org/10.3390/cancers13071720>

Pertwee, R. (2007). The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ9-tetrahydrocannabivarin. *British Journal of Pharmacology*, 200. Pridobljeno iz <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1038/sj.bjp.0707442>

Proietti, I., Skroza, N., Michelini, S., Mambrini, A., Balduzzi, V., Bernardini, N., . . . Potenza, C. (2020). BRAF Inhibitors: Molecular Targeting and Immunomodulatory Actions. *Cancers*, 4-6. doi:<https://doi.org/10.3390/cancers12071823>

Richtig, G., Kienzl, M., Rittchen, S., Roula, D., Eberle, J., Sarif, Z., . . . Heinemann, A. (2023). Cannabinoids Reduce Melanoma Cell Viability and Do Not Interfere with Commonly

Used Targeted Therapy in Metastatic Melanoma In Vivo and In Vitro. *Biology*, 5-6.
doi:<https://doi.org/10.3390/biology12050706>

Rožanc, J. S. (2019). *Fosfoproteinski vzorci napovedujejo odzivnost na trametinib in optimalne strategije preobčutljivosti na trametinib pri melanomu.* . Pridobljeno iz Cell Death Different 26: <https://doi.org/10.1038/s41411>

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*, 7. doi:10.3390/plants10030566

Rupasinghe, H. V., Davis, A., Kumar, S. K., Murray, B., & Zheljazkov, V. D. (2020). Industrial Hemp (Cannabis sativa subsp. sativa) as an Emerging Source for Value-Added Functional Food Ingredients and Nutraceuticals. *Molecules*, 1, 7. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules25184078>

Sabit, H., Klaiyadan, F., & Menezes, R. G. (2020). Malignant melanoma: Underlying epigenetic mechanisms. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 478. doi:10.4103/ijdvl.IJDVL_791_19

SK-MEL-2: Human Melanoma Cell Line (ATCC HTB-68). (brez datuma). Pridobljeno iz Memorial Sloan Kettering Cancer Center: <https://www.mskcc.org/research-advantage/support/technology/tangible-material/human-melanoma-cell-line-sk-mel-2>

SK-MEL-28: Human Melanoma Cell Line (ATCC HTB-72). (brez datuma). Pridobljeno iz Memorial Sloan Kettering Cancer Center: <https://www.mskcc.org/research-advantage/support/technology/tangible-material/human-melanoma-cell-line-sk-mel-28>

The University of Sydney. (b. d.). *Phytocannabinoids.* Pridobljeno iz <https://www.sydney.edu.au/lambert/medicinal-Cannabis/phytocannabinoids.html>

Visković, J., Zheljazkov, V. D., Sikora, V., Noller, J., Latković, D., Ocamb, C. M., & Koren, A. (2023). Industrial Hemp (Cannabis sativa L.) Agronomy and Utilization: A Review. *Agronomy*, 1. doi:<https://doi.org/10.3390/agronomy13030931>