

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ

Д-р Ервин Миленов Иванов

*Противотуморна активност на  
фитоканабиноиди прилагани като разтвори и  
иновативни лекарство-доставящи системи*

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

на дисертационен труд за присъждане на  
образователната и научна степен  
**“ДОКТОР”**

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт  
Професионално направление: 7.1. Медицина  
Научна специалност: Фармакология  
(вкл. фармакокинетика и химиотерапия)

Научен ръководител: Доц. д-р Жоржета Ст. Бочева, дм  
Научен консултант: Проф. д-р Спиро М. Константинов, дм, дфн

София, 2024 г.

Дисертационният труд е написан на 115 стандартни печатни страници и е онагледен с 15 фигури и 13 таблици. Библиографията включва 212 литературни източника, като над 70% от тях са публикувани през последните 10 години.

Дисертационният труд е обсъден на 01.10.24 г. на заседание на катедрен съвет на Катедрата по Фармакология и токсикология и секция Клинична Фармакология при Медицински Факултет, Медицински Университет - София, с разширен състав, и е одобрен и насочен за защита към СНС по докторска програма „Фармакология“ (вкл.Фармакокинетика и химиотерапия), в професионално направление 7.1 **Медицина**, от област на висше образование.

Публичната защита ще се състои он-лайн на 16.12.2024 г. от 10 часа.

Материалите по защитата са на разположение на страницата на МУ-София.

# Съдържание

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Използвани съкращения</b>                                | <b>4</b>  |
| <b>I. Въведение</b>   | <b>9</b>  |
| <b>II. Цел и задачи</b>                                     | <b>11</b> |
| <b>III. Материали и методи</b>                              | <b>12</b> |
| <b>IV. Резултати от собствени изследвания</b>               | <b>17</b> |
| <b>V. Обсъждане</b>   | <b>35</b> |
| <b>VI. Изводи</b>   | <b>37</b> |
| <b>VII. Заключение</b>                                      | <b>39</b> |
| <b>VIII. Приноси</b>  | <b>40</b> |
| <b>IX. Научни публикации свързани с дисертационния труд</b> | <b>41</b> |
| <b>X. Благодарност</b>                                      | <b>43</b> |
| <b>XI. Summary</b>  | <b>44</b> |

## Използвани съкращения

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>AEA</b>             | N-arachidonoylethanolamine   |
| <b>2-AG</b>            | 2-Arachidonoylglycerol   |
| <b>2-AGE</b>           | 2-Arachidonyl glyceryl ether   |
| <b>AIDS</b>            | Acquired immune deficiency syndrome (синдром на придобитата имунна недостатъчност) |
| <b>ALCL</b>            | Anaplastic large-cell lymphoma (анапластичен едроклетъчен лимфом)                  |
| <b>ALK</b>             | Anaplastic lymphoma kinase (киназа от анапластичен лимфом)                         |
| <b>AMPK</b>            | AMP-activated protein kinase (АМФ-активирана протеинкиназа)                        |
| <b>ATP</b>             | Adenosine triphosphate (аденозинтрифосфат-АТФ)                                     |
| <b>BAFFR</b>           | B-cell activating factor receptor (рецептор на В-клетъчен активиращ фактор)        |
| <b>BCL-2</b>           | B-cell lymphoma 2 (В-клетъчен лимфом 2)  |
| <b>CBCL</b>            | Cutaneous B-cell lymphoma (кожен В-клетъчен лимфом - КБКЛ)                         |
| <b>CBD</b>             | Cannabidiol (канабидиол)   |
| <b>CBG</b>             | Cannabigerol (канабигерол)   |
| <b>CBN</b>             | Cannabinol (канабинол)   |
| <b>CCR4</b>            | C-C chemokine receptor type 4  |
| <b>CD-</b>             | Cluster of differentiation-  |
| <b>CDK</b>             | Cyclin-dependent kinase (циклин-зависима киназа)                                   |
| <b>CLA</b>             | Cutaneous lymphocyte antigen (кожен лимфоиден антиген)                             |
| <b>CNS</b>             | Central nervous system (централна нервна система - ЦНС)                            |
| <b>CRM (EtOH)</b>      | Куркумин от стоков етанолен разтвор  |
| <b>CRM (P123)</b>      | Куркумин включен в Pluronic®P-123  |
| <b>CRM (P123/F127)</b> | Куркумин включен в Pluronic®P-123/Pluronic®F-127 (1:1, v/v)                        |
| <b>CRM (PLC)</b>       | Куркумин включен в mPEG-PCL  |
| <b>CSC</b>             | Cancer stem cell (ракова столова клетка)   |

|               |   |
|---------------|---|
| <b>CTCL</b>   | Cutaneous T-cell lymphoma (Кожен Т-клетъчен лимфом - КТКЛ)  |
| <b>DMSO</b>   | Dimethyl sulfoxide  |
| <b>DUB</b>    | Deubiquitinating enzyme (деубиквитиниращ ензим)   |
| <b>EBV</b>    | Epstein-Barr virus (вирус на Епщайн-Бар)  |
| <b>ECS</b>    | Ендоканабиноидна ситема   |
| <b>EGF</b>    | Epidermal growth factor (епидермален фактор на растеж)  |
| <b>ELISA</b>  | Enzyme-linked immunosorbent assay   |
| <b>EORTC</b>  | European Organisation for Research and Treatment of Cancer<br>(европейска организация за изследване и лечение на неоплазии) |
| <b>ErPC</b>   | Erucylphosphocholine  |
| <b>ErPC3</b>  | Erufosine   |
| <b>EU</b>     | European Union (европейски съюз-ЕС)   |
| <b>FBS</b>    | Fetal bovine serum  |
| <b>FNA</b>    | Fine needle aspiration (тънкоиглена биопсия)  |
| <b>FDA</b>    | Food and Drug Administration (администрация по храните и лекарствата, САЩ)  |
| <b>FISH</b>   | Fluorescence in situ hybridization (флуоресценция in situ хибридизация)   |
| <b>FOXO</b>   | Forkhead box O proteins   |
| <b>GIT</b>    | Gastrointestinal tract (стомашно-чревният тракт - СЧТ)  |
| <b>GSK-3</b>  | Glycogen synthase kinase 3  |
| <b>HePC</b>   | Hexadecylphosphocholine - Miltefosine   |
| <b>HIV</b>    | Human immunosuppressive virus (човешки имуннодефицитен вирус - ХИВ)   |
| <b>HRP</b>    | Horse radish peroxidase   |
| <b>ICAM-1</b> | Intercellular Adhesion Molecule 1   |
| <b>IFN-</b>   | Interferon-   |
| <b>IL-</b>    | Interleukin-  |
| <b>JAK</b>    | Janus kinases   |
| <b>LC</b>     | Langerhans cell   |
| <b>LPP</b>    | Large plaque parapsoriasis  |
| <b>MDM2</b>   | Murine double minute 2  |

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>MF</b>                      | Mycosis fungoides   |
| <b>MHC</b>                     | Major histocompatibility complex  |
| <b>mTOR</b>                    | Mammalian target of rapamycin   |
| <b>NADA</b>                    | N-Arachidonoyl dopamine   |
| <b>NEMO</b>                    | NF- $\kappa$ B Essential Modulator  |
| <b>NF-<math>\kappa</math>B</b> | Nuclear factor $\kappa$ B   |
| <b>NHL</b>                     | Non-Hodgkin's lymphoma  |
| <b>NK cell</b>                 | Natural killer cell   |
| <b>PBS</b>                     | Phosphate buffer saline   |
| <b>PCR</b>                     | Polymerase chain reaction   |
| <b>PI3K</b>                    | Phosphoinositide 3-kinase (PI 3-киназа)   |
| <b>PKB</b>                     | Protein Kinase B (протеинкиназа B, Akt)   |
| <b>PCL</b>                     | Primary Cutaneous Lymphoma (първичен кожен лимфом - ПКЛ)  |
| <b>PLC</b>                     | Phospholipase C, gamma 1  |
| <b>PP2A</b>                    | Protein phosphatase 2 (протеинфосфатаза 2A)   |
| <b>PTEN</b>                    | Phosphatase and tensin homolog (Хомолог на фосфатазата и тензина)                                   |
| <b>PUVA</b>                    | Psoralen and ultraviolet A (псорален плюс ултравиолетова А светлина)                                |
| <b>PUVB</b>                    | Psoralen and ultraviolet B (псорален плюс ултравиолетова В светлина)                                |
| <b>PVA</b>                     | Poikiloderma vasculare atrophicans  |
| <b>RANK</b>                    | Receptor activator of nuclear factor $\kappa$ B (рецепторен активатор за ядрения фактор $\kappa$ B) |
| <b>RAR</b>                     | Retinoic acid receptor  |
| <b>Rb</b>                      | Retinoblastoma protein  |
| <b>Rheb</b>                    | Ras homologue enriched in brain   |
| <b>RXR</b>                     | Retinoid X receptor   |
| <b>SPP</b>                     | Small plaque parapsoriasis  |
| <b>SS</b>                      | Sézary syndrome   |
| <b>STAT</b>                    | Signal transducer and activator of transcription  |
| <b>Th1</b>                     | Type 1 helper T cell  |
| <b>Th2</b>                     | Type 2 helper T cell  |

|              |   |
|--------------|---|
| <b>THC</b>   | Tetrahydrocannabinol  |
| <b>TMZ</b>   | Temozolomide  |
| <b>TNF-</b>  | Tumor necrosis factor- (тумор-некротичния фактор-)                                    |
| <b>Treg</b>  | Regulatory T cell   |
| <b>TSC1</b>  | Tuberous sclerosis 1  |
| <b>TSC2</b>  | Tuberous sclerosis 2  |
| <b>TSEBT</b> | Total skin electron beam (целотелесна електронно-емисионна терапия)                   |
| <b>UVA</b>   | Ultraviolet A   |
| <b>UVB</b>   | Ultraviolet B   |
| <b>WHO</b>   | World Health Organization (Световна здравна организация - СЗО)                        |
| <b>WT1</b>   | Wilms' tumor protein 1  |
| <b>XIAP</b>  | X linked inhibitor of apoptosis   |
| <b>MIC</b>   | Minimal inhibitory concentration (минимална инхибираща концентрация - МИК)            |
| <b>MBIC</b>  | Mean biofilm inhibitory concentration (средна биофилм-инхибираща концентрация – СБИК) |



## I. Въведение

Настоящият литературен обзор разглежда потенциала на канабиноидите, особено на фитоканабиноидите като канабидиол (CBD), канабигерол (CBG) и канабинол (CBN), в терапията на неоплазии, с особен фокус върху, терапевтично-резистентни тумори и тумори с възможност за локална терапия каквито са кожния Т-клетъчен лимфом (КТКЛ), карцинома на пикочния мехур и тройно-негативния карцином на гърдата.

В първата част на литературния обзор се проследява историята на фитотерапията и кратка история за канабиноидите. Описано е значението на канабиса (*Cannabis L.*) като лечебно растение, документирано още от второто хилядолетие пр. Хр., и неговото приложение заради лечебните и психоактивните му свойства. Разгледани са трите подтипа на канабиса — *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* и *Cannabis ruderalis*, както и предложеното обединение в един вид с множество хемотипове. Описани са ключовите събития в изолирането на основните фитоканабиноиди: CBN, CBD и Δ9-THC.

По нататък обзорът се фокусира върху ендоканабиноидната система (ECS), която е сравнително наскоро открита сигнална система, състояща се от канабиноидните рецептори CB1 и CB2, ендогенните им липидни лиганди (ендоканабиноиди) като анандамид (AEA) и 2-арахидоноилглицерол (2-AG), и свързаните с тях биосинтетични и разграждащи ензими. Разгледани са функциите на CB1 и CB2 рецепторите, техните локализации и физиологични роли. Подчертана е сложността на ECS и нейното участие в различни заболявания, включително неоплазии.

Обсъжда се ролята на ECS при тумори, като се акцентира върху промените в нивата на експресия и активността на системата при различни видове карциноми. Описано е, че повишената експресия на CB рецепторите и концентрацията на ендоканабиноиди е наблюдавана при много тумори, но това не винаги корелира с тъканта на произход на тумора. Разгледани са специфични примери за експресията на CB1 и CB2 при различни видове неоплазии и тяхната прогностична стойност.

Накрая на обзора са представени перспективите за използване на канабиноидите в комплексната терапия на злокачествени тумори. Описано е, че канабиноидите проявяват антипролиферативни, проапоптотични и антиангиогенни ефекти върху различни видове туморни клетки, както *in vitro*, така и *in vivo*. Разгледани са механизмите, чрез които канабиноидите индуцират апоптоза и автофагия, включително активация на серамидните

сигнални пътища, инхибиране на Akt/mTOR пътя и модулация на различни сигнални молекули като p8, TRIB3 и др.

Дискутирани са проблемите, свързани със системното прилагане на CBD, като ниската му и нестабилна бионаличност при орален прием на гладно поради липофилната му природа и силно изразения чернодробен метаболизъм при първо преминаване. Обсъдени са различни методи за подобряване на бионаличността, включително прием с богати на мазнини храни, използване на системи за доставка на базата на липиди, инхалиране и алтернативни методи на приложение като трансдермални пластири и назални спрейове.

Акцентът е поставен на използването на иновативни системи за доставяне на лекарства, базирани на полимерни носители и хидрогели. Описано е прилагането на полизахаридни хидрогели за контролирано освобождаване на хидрофобни биоактивни вещества като CBD. Разгледани са предимствата на тези системи, включително биосъвместимостта, биоразградимостта и възможността за модифициране на полимерните вериги за постигане на желаните фармакокинетични свойства.

Също така са разгледани задълбочено тумори, избрани като модели в настоящата работа, каквито са тройно-негативния карцином на гърдата, карцинома на пикочния мехур и кожния Т-клетъчен лимфом. Описани са характеристиките на тези тумори, предизвикателствата при тяхното лечение и необходимостта от нови терапевтични подходи. Подчертана е потенциалната роля на непсихоактивните канабиноиди в терапията на тези труднолечими неоплазии.

Основната хипотеза, произтичаща от литературния обзор, е че нискотоксичните фитоканабиноиди като CBD, CBG и CBN, както и екстракти, които ги съдържат, могат да бъдат включени в терапевтичните схеми на пациенти с тумори, подлежащи на локално третиране, особено чрез използването на иновативни лекарство-доставящи системи.

## II. Цел и задачи

### 1. Цел

Цел на настоящия дисертационен труд е да се проучат ефектите на чисти канабиноиди и на различни екстракти от *Cannabis sativa* върху клетъчни линии, произлизащи от различни терапевтично резистентни тумори в сравнителен аспект със същите, когато са включени в иновативни лекарство-доставящи системи.

### 2. Задачи

**(1)** Да се определи и да се сравни цитотоксичният ефект на CBD и канабидиол-съдържащи екстракти върху клетки от КТКЛ, карцином на гърда и пикочен мехур в чистата му (от етанолов стокв разтвор) форма, както и техният ефект, когато са поставени в различни лекарство-доставящи системи.

**(2)** Да се определи цитотоксичният ефект на CBG и канабигерол-съдържащи екстракти срещу същите клетъчни модели на малигнени заболявания.

**(3)** Да се проучи цитотоксичният ефект на CBN върху същите туморни клетъчни линии.

**(4)** Да се определят възможните терапевтично-полезни комбинации (адитивни и/или синергични) с участието на избрани канабиноиди и екстракти от индустриален коноп.

**(5)** Да се анализира на молекулярно ниво действието на CBD (чиста форма) върху сигнални молекули, участващи в процеса на индуцирана клетъчна смърт (апоптоза).

**(6)** Да се проследи скоростта на интернализация на CBD в различни туморни клетъчни линии като се приложи както в чистата му (от етанолов стокв разтвор) форма, така и включен в различни полимерни системи.

**(7)** Да се изследва CBD за потенциален антивирусен ефект при щам HCoV-229E.

### III. Материали и методи

Настоящият дисертационен труд има за цел да оцени ефектите на канабидиола (CBD) и свързаните с него канабиноиди върху клетъчни линии от кожен Т-клетъчен лимфом, преходно-клетъчен карцином на пикочния мехур и карцином на гърдата. Използвани са различни канабиноидни екстракти и чисти вещества, както и канабиноиди включени в иновативни лекарство-доставящи системи, за да се проучи тяхната цитотоксичност, антивирусна активност и потенциал за терапевтично приложение, особено чрез локална апликация.

#### Материали:

- **Природни вещества:**
  - **30% CBD екстракт от *Cannabis sativa* L. (0% THC):**
    - Произведен чрез екстракция със студен етанол.
    - Запазва по-широк набор от биоактивни съединения, включително терпени и флавоноиди.
  - **60% CBD екстракт от *Cannabis sativa* L. (0% THC):**
    - Произведен чрез екстракция с етанол и последваща дестилация.
    - Концентрирани канабиноиди с отстранени летливи съединения.
- **Чисти вещества:**
  - **Канабидиол (CBD):**
    - Получен от PBG.GLOBAL чрез суперкритична CO<sub>2</sub> екстракция.
    - Безцветно кристално вещество с чистота 99%.
  - **Канабинол (CBN):**
    - Закупен от Sigma-Aldrich (Германия).
    - Етанолов разтвор с концентрация 1 mg/ml.
  - **Канабидиол в наноемулсия (H<sub>2</sub>O-CBD):**
    - Закупен от Mile High Labs (САЩ).
    - Наноемулсия на CBD с концентрация 200 mg/ml във воден разтвор.

- **Канабидиол в полимерна лекарство-доставяща система (CBD-P):**
  - Използван чист CBD от PBG.GLOBAL за създаване на полимерната система.
- **Клетъчни линии:**
  - **HuT-78 (ATCC № TIB-161™):** кожен Т-клетъчен лимфом от пациент със синдром на Sézary.
  - **MJ (ATCC® CRL-8294™):** кожен Т-клетъчен лимфом (*Mycosis fungoides*).
  - **T-24 (ATCC® HTB-4™):** преходно-клетъчен карцином на пикочен мехур.
  - **CAL-29 (ACC 515):** преходно-клетъчен карцином на пикочния мехур.
  - **MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™):** карцином на гърдата.
  - **Lep:** клетъчна линия от човешки ембрионален бял дроб (клетъчна банка НЦЗПБ).
  - **CCL-1 (ATCC: CCL-1):** нормална миша фибробластна клетъчна линия.
  - **HCoV-229E:** човешки коронавирус щам 229E (Институт Робърт Кох, Германия).
- **Среди за клетъчно култивиране:**
  - **IMDM** за HuT-78 и MJ с добавени 20% FBS и 5% L-глутамин.
  - **RPMI-1640** за HH с добавени 10% FBS и 5% L-глутамин.
- **Материали за CBD-заредени полимерни мицели:**
  - **Poloxamer 407 (PEO<sub>101</sub>-b-PPO<sub>56</sub>-b-PEO<sub>101</sub>):** BASF, Германия.
  - **2-хидроксиетил целулоза (HEC):** Hercules Inc., САЩ.
  - **Поли(етилен гликол) диакрилат (PEGDA):** Sigma-Aldrich, Германия.
  - **N,N'-метиленбисакриламид (BAAm):** Sigma-Aldrich, Германия.
  - **Водороден пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):** Labimex Ltd., България.
  - **Етанол (96%):** Лабимекс ООД, България.
  - **CBD:** предоставен от PBG GLOBAL LTD., България.

**Методи:**

- **Клетъчно култивиране:**
  - Култивиране в инкубатор при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и максимална влажност.
  - Смяна на хранителната среда на всеки 2-3 дни в зависимост от клетъчната линия.
  - Поддържане на клетките в логаритмична фаза на растеж.
- **Приготвяне на среди за култивиране и замразяване:**
  - Добавяне на FBS и L-глутамин към базовите среди.
  - Инактивиране на FBS чрез загряване до 56°C за 30 минути.
  - Приготвяне на среда за замразяване с 90% FBS и 10% DMSO.
- **Замразяване и размразяване на клетъчни линии:**
  - Замразяване на клетките в криоепруветки с контролирано понижаване на температурата.
  - Размразяване във водна баня при 37°C и ресуспендиране в прясна среда.
- **Определяне автентичността на клетъчните линии:**
  - Използване на **Multiplex human Cell line Authentication Test (MCA)** от Multiplexion, Германия.
- **Изготвяне на растежни криви:**
  - Посяване на различни начални клетъчни гъстоти в 96-ямкови плаки.
  - Отчитане на клетъчната виталност на 0, 24, 48, 72 и 96 часа чрез МТТ тест.
- **Приготвяне на серия кратни падащи разреждания от изходни разтвори:**
  - Изготвяне на разреждания непосредствено преди третиране на клетките.

- Изчисляване на концентрациите, като се взема предвид крайното разреждане в ямките.
- **Третиране на клетките с канабиноиди:**
  - Третиране на клетките по време на логаритмична фаза на растеж.
  - Добавяне на 2  $\mu$ l от разтвора на канабиноида към 100  $\mu$ l клетъчна суспензия.
  - Инкубиране при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
- **Приготвяне и измерване на CBD-заредени полимерни мицели:**
  - **Методи за измерване:**
    - Динамично разсейване на светлината (DLS).
    - UV-Vis спектроскопия.
    - Реологични измервания.
    - Сканираща електронна микроскопия (SEM).
    - Широкоъгълна рентгенова дифракция (WAXD).
  - **Приготвяне на CBD-заредени полимерни мицели:**
    - Разтваряне на CBD и съполимера в етанол и вода.
    - Отстраняване на разтворителя чрез ротационно изпаряване.
  - **Синтез на нанокompatитни криогели:**
    - Добавяне на CBD-натоварен полимерен мицел към разтвор на HEC.
    - Замразяване при -20°C и UV-облъчване.
  - **Зареждане на CBD в чисти HEC криогелове:**
    - Накисване на лиофилизиран HEC криогел в етанолов разтвор на CBD.
  - **Експерименти с освобождаване на канабидиол:**
    - Провеждане на тестове за разтваряне при 35°C в ацетатен буфер.
    - Спектрофотометрично определяне на освободения CBD при 235 nm.
- **Оценка на клетъчна виталност чрез МТТ тест:**
  - Посяване на клетки в 6-ямкови плаки с плътност  $1 \times 10^5$  клетки/ml.

- Третиране с различни концентрации на CBD формулировки.
- Добавяне на МТТ разтвор и измерване на абсорбцията при 540 nm.
- **Флоуцитометричен анализ (Flow cytometry):**
  - **Анализ на клетъчния цикъл след пермеабилзация и оцветяване с пропидиев йодид (метод на Nicoletti):**
    - Фиксиране на клетките с 70% студен етанол.
    - Третиране с RNase и оцветяване с пропидиев йодид.
    - Анализ чрез флоуцитометрия.
- **Биоаналитично количествено определяне на CBD чрез HPLC:**
  - Използване на RP-8 колона при температура 30°C.
  - Мобилна фаза: ацетонитрил:вода (8:2 v/v).
  - Детекция при 220 nm и 240 nm.
  - Пробоподготовка чрез екстракция с метанол: хлороформ и декарбоксилиране.
- **Статистически анализ на данните:**
  - Използване на софтуери Microsoft Excel и GraphPad Prism.
  - Изчисляване на IC<sub>50</sub> и селективни индекси.
  - Статистически тестове за значимост на резултатите (Student's t-test).
- **Определяне на антивирусна активност:**
  - **Определяне на клетъчната жизнест:**
    - Микроскопско наблюдение на промените в морфологията на клетъчния монослой.
    - Колориметричен МТТ анализ по Mosmann:
  - **Заразяване на клетъчни култури с HCoV-229E:**
    - Инокулиране на клетките с вируса.
    - Оценка на цитопатичния ефект.
  - **Инхибиране на цитопатичния ефект и определяне на IC<sub>50</sub> и SI:**
    - Изчисляване на 50% инхибираща концентрация (IC<sub>50</sub>).
    - Изчисляване на селективния индекс (SI = CD<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>).

## IV. Резултати от собствени изследвания и обсъждане

### 1. Натоварване на наноразмерни мицели с CBD

Разработеният метод от проф. Петров за синтез на полизахаридни криогели чрез фотохимично omрежване в замразено състояние изисква използването на вода като замразяващ разтворител. Наличието на органични разтворители като етанол, метанол и др. може да възпрепятства, както редовния процес на криоструктуриране, така и реакцията на omрежване. Затова първата стъпка беше солубилизация на хидрофобния CBD във водна среда с помощта на блок-кополимерни мицели. PEO-b-PPO-b-PEO триблок съполимерите са търговски продукти (Pluronic, Poloxamers и др.), които са добре известни с високия си капацитет за разтваряне на хидрофобни лекарства.

PEO101-b-PPO56-b-PEO101 (означен по-нататък в текста като F127 за простота) беше избран за приготвяне на мицеларен разтвор на CBD във вода чрез прилагане на техниката на изпаряване на разтворителя.

Бяха достигнати крайни концентрации на полимер и CBD, съответно 30 и 10 g·L<sup>-1</sup>, съответстващи на 25 % зареждане с CBD. Бяха проведени DLS измервания на CBD-натоварените мицели, за да се определи мицеларният размер и разпределението му (Momekova D et al., 2020).

За направа на качествени нанокomпозитни криогелове с висок GF добив (Pencheva V et al., 2018), мицеларният разтвор беше смесван с воден разтвор на HEC, omрежващ агент BAAM (или PEGDA) и фотоинициатор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (фигура 1).



**Фигура 1.** Изображение на празни и заредени с канабидиол криогели.

Образуването на нанокomпозитен супер-макропорест криогел беше осъществено, като бяха използвани два omрежващи агента, BAAM и PEGDA, при едно и също съдържание (30 тегл.% спрямо HEC). Изсушените чрез замразяване криогелове, съдържащи CBD бяха леко жълтеникави, за разлика от белия чист HEC криогел (Фигура 1).

Всъщност може да се предположи, че чрез наикисване на предварително образуван НЕС криогел в етанолов разтвор на CBD и последващо изпаряване на разтворителя, по-голямата част от CBD е уловена от порите на гела. В макроскопичните пори поемането на течност, разтварянето и дифузията на CBD са бързи. За разлика от това, зареждането на CBD в мицеларни ядра, комбинирано с криогенната процедура, дава системи с CBD, вградени в стените на гела (полимерна матрица).

По този начин освобождаването от мицели и дифузията на лекарствените молекули в полярната среда на разтваряне се забавя. Вграждане на хидрофобно вещество в стените на криогела може да бъде постигнато само с водоразтворима форма на CBD, като например мицеларен разтвор. Освен това видът на омрежващите агенти, използвани при приготвянето на нанокompозитни криогелове, не повлиява поведението на освобождаване на активното вещество.

SEM потвърди нашето предположение, че натоварените с CBD полимерни мицели са хомогенно вградени в стените на криогела (полимерна матрица) (Momekova D et al., 2020).

Получените нанокompозитни криогелове бяха меки и устойчиви на разкъсване при внимателно боравене. Техните виско-еластични характеристики, модули за съхранение (Gj) и загуба (Gjj) бяха оценени чрез динамични реологични измервания в режим на честота на трептене (0.3–10 Hz).

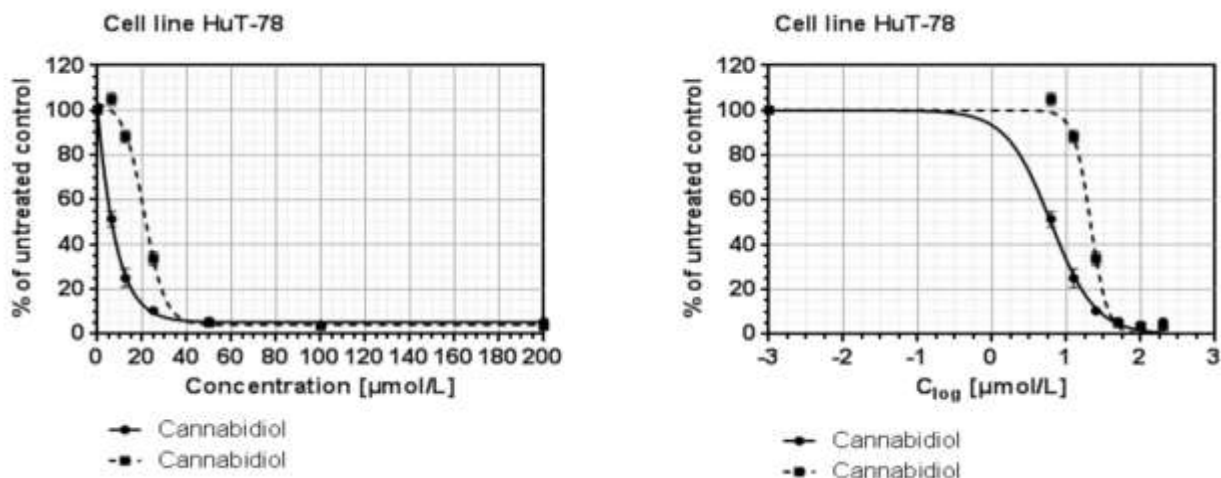
Определено, нанокompозитните НЕС криогели проявяват типични свойства за химически омрежени гелове и може да се направи заключение, че включването на CBD при дадената концентрация не променя механичната якост на носителя. Като цяло нанокompозитните криогели поемат значително количество вода, което в комбинация с биосъвместимостта на полимерите ги прави подходящи за приложение като иновативна лекарство-доставяща система.

## **2. Оценка на антипролиферативния ефект на тестваните канабиноиди чрез МТТ**

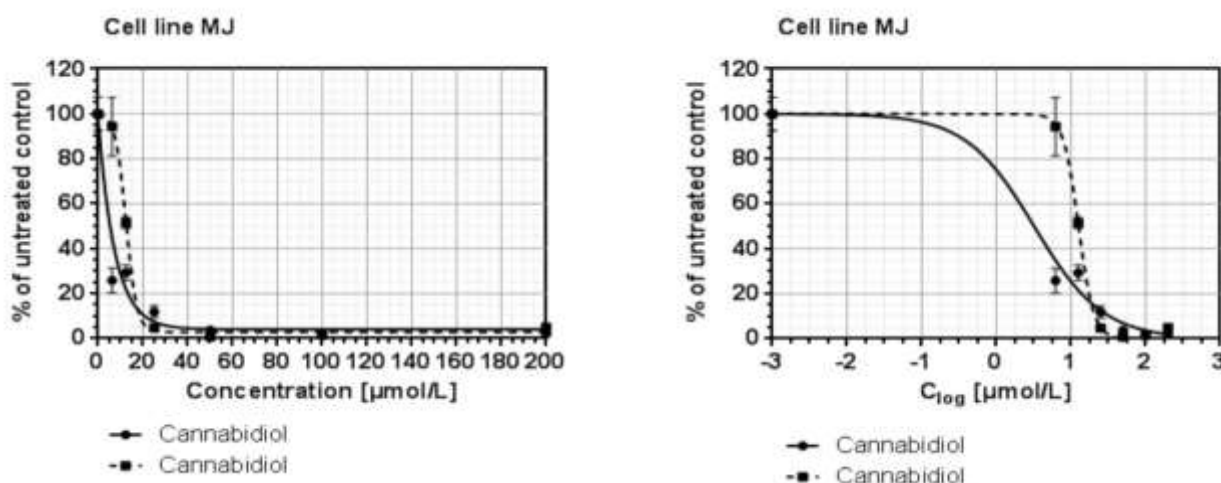
### *2.1. Антипролиферативна активност на чисти канабиноиди и на 30% и 60% CBD пълнен спектър растителни екстракти от канабис*

Всички концентрации бяха нормализирани до еднакво количество активна съставка - CBD. Установи се значителна разлика между тестваните екстракти в сравнение с чистият CBD. 30% CBD екстракт от *Cannabis sativa* L. без THC

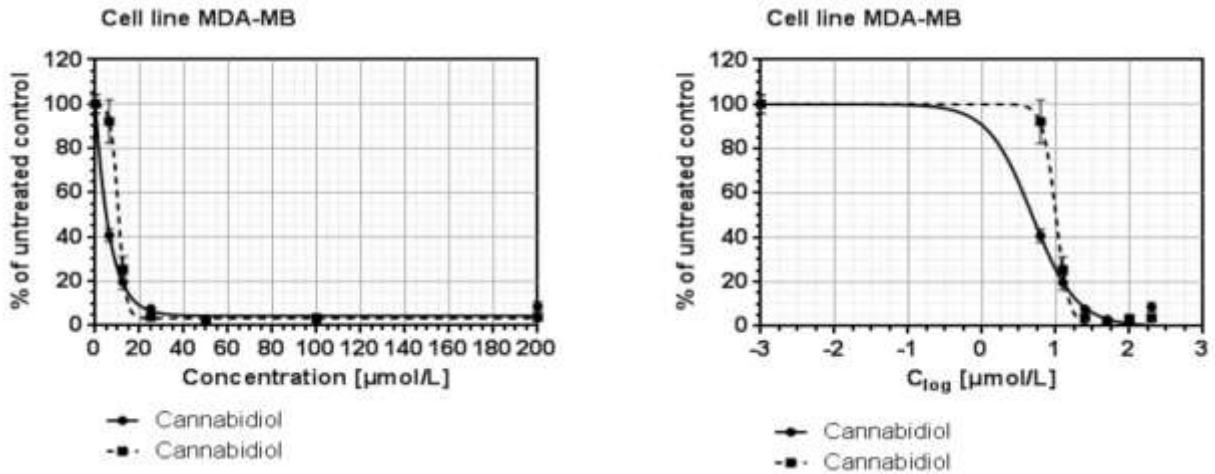
демонстрира по-силна антинеопластична ефикасност срещу HuT-78 ( $IC_{50}$  от 7.78  $\mu\text{mol/L}$ ) и MDA-MB-231 ( $IC_{50}$  от 5.31  $\mu\text{mol/L}$ ) туморни клетки в сравнение с с 60% CBD екстракт (Фигура 2).



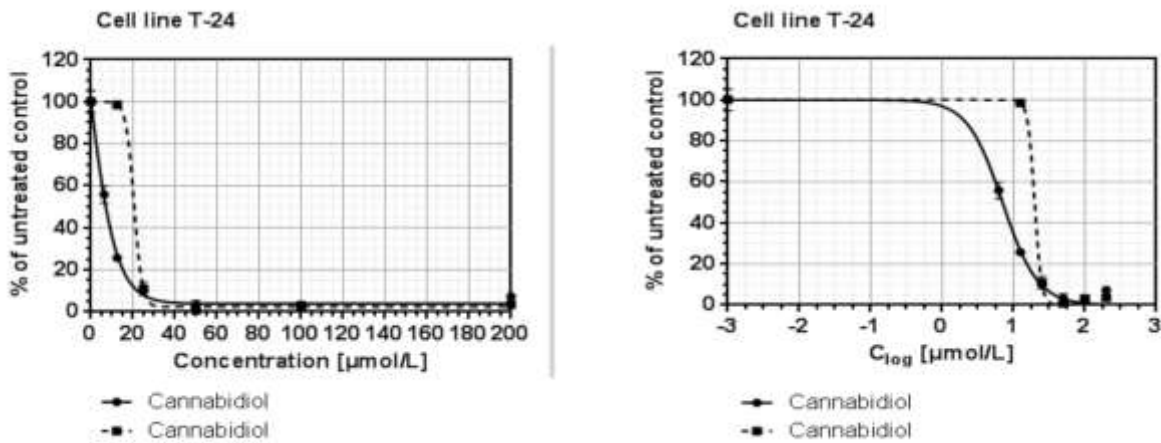
А. Чистият CBD демонстрира върху HuT-78 антипролиферативна активност с  $IC_{50}$  от 21.09  $\mu\text{mol/L}$ .



Б. Чистият CBD демонстрира върху клетки от MJ антипролиферативна активност с  $IC_{50}$  от 12.65  $\mu\text{mol/L}$ .



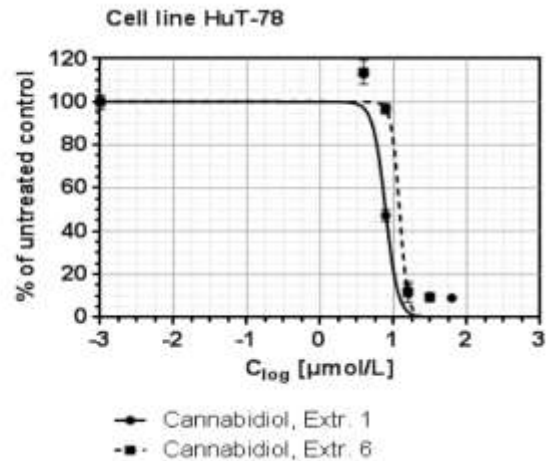
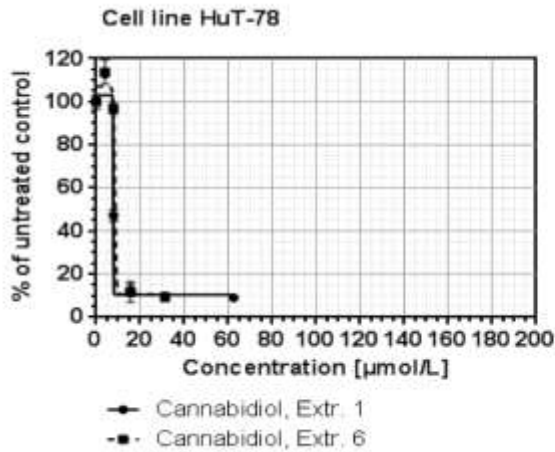
В. Чистият CBD проявява върху MDA-MB-231 клетки антипролиферативна активност с  $IC_{50}$  от  $10.07 \mu\text{mol/L}$ .



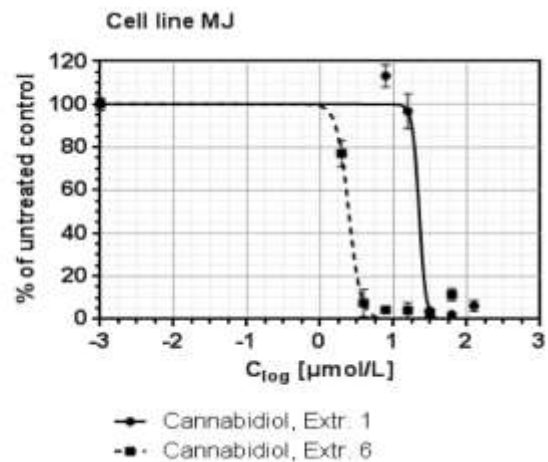
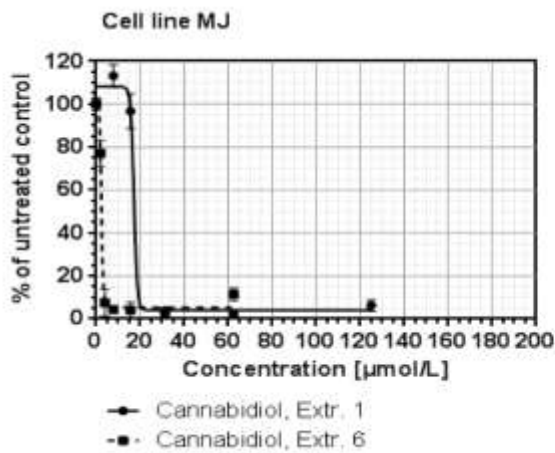
Г. Чистият CBD показва върху T-24 туморни клетки антипролиферативна активност с  $IC_{50}$  от  $19.89 \mu\text{mol/L}$ .

**Фигура 2.**  $IC_{50}$  на чист CBD върху туморни клетъчни линии: А) HuT-78; Б) MJ; В) MDA-MB-231; Г) T-24

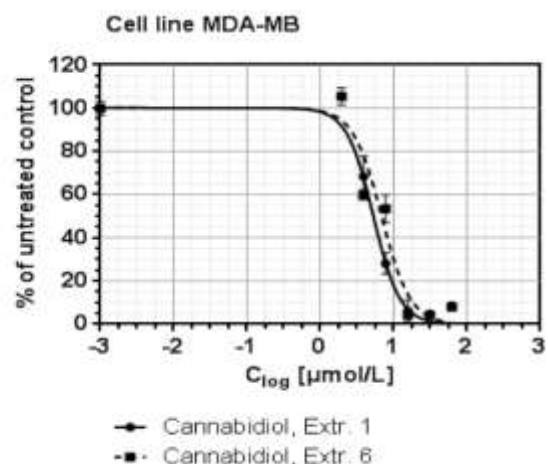
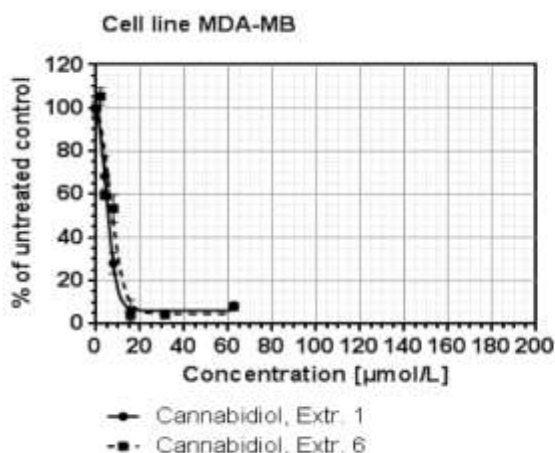
За разлика от тях, 60% CBD екстракт от *Cannabis sativa* L. без THC е по-активен при T-24 ( $IC_{50}$  от  $0.12 \mu\text{mol/L}$ ) и MJ клетките ( $IC_{50}$  от  $2.45 \mu\text{mol/L}$ ) (Фигура 3). Чистата субстанция CBD демонстрира по-слаба антипролиферативна активност при същите туморни клетъчни линии.



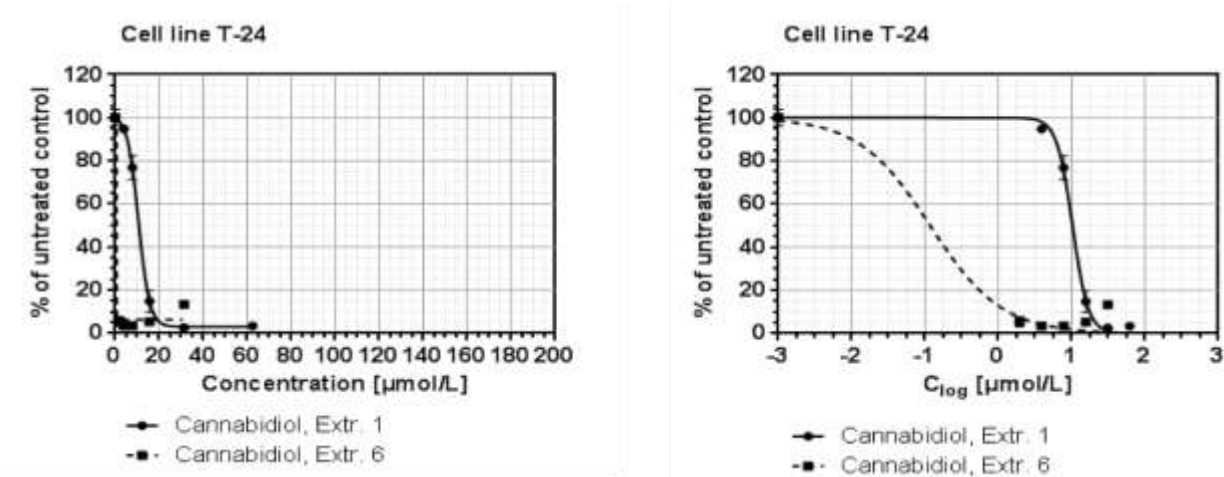
А. Антипролиферативна активност с  $IC_{50}$  на екстракти съдържащи CBD върху HuT-78. Extr.1 = 30 % CBD екстракт  $IC_{50} = 7.77 \mu\text{mol/L}$ ; Extr.6 = 60% CBD екстракт  $IC_{50} = 12.06 \mu\text{mol/L}$



Б. Антипролиферативна активност с  $IC_{50}$  на екстракти съдържащи CBD върху MJ. Extr.1 = 30 % CBD екстракт  $IC_{50} = 22.35 \mu\text{mol/L}$ ; Extr.6 = 60% CBD екстракт  $IC_{50} = 2.45 \mu\text{mol/L}$



В. Антипролиферативна активност с  $IC_{50}$  на екстракти съдържащи CBD върху MDA-MB-231 клетки. Extr.1 = 30 % CBD екстракт  $IC_{50} = 5.311 \mu\text{mol/L}$ ; Extr.6 = 60% CBD екстракт  $IC_{50} = 6.877 \mu\text{mol/L}$



Г. Антипролиферативна активност с  $IC_{50}$  на екстракти съдържащи CBD върху T-24 туморна линия. Extr.1 = 30 % CBD екстракт  $IC_{50} = 10.32 \mu\text{mol/L}$ ; Extr.6 = 60% CBD екстракт  $IC_{50} = 0.1181 \mu\text{mol/L}$

**Фигура 3.**  $IC_{50}$  на екстракти съдържащи 30 % и 60 % CBD върху туморни клетъчни линии: А) HuT-78; Б) MJ; В) MDA-MB-231; Г) T-24

Обобщено, беше установен антинеопластичен ефект на CBD срещу туморни клетки от клетъчни линии MJ (*Mycosis fungoides*) и HuT-78 (синдром на Sezary) от кожен Т-клетъчен лимфом, MDA-MB-231 (карцином на гърда), T-24 (карцином на пикочния мехур), Cal-29 (преходно-клетъчен карцином на пикочния мехур). Резултатите от направените експерименти показваха наличие на цитотоксичен ефект при прилагане на всички форми на CBD, като MJ клетъчната линия прояви по-висока чувствителност към CBD, в сравнение с другите третирани туморни клетки.

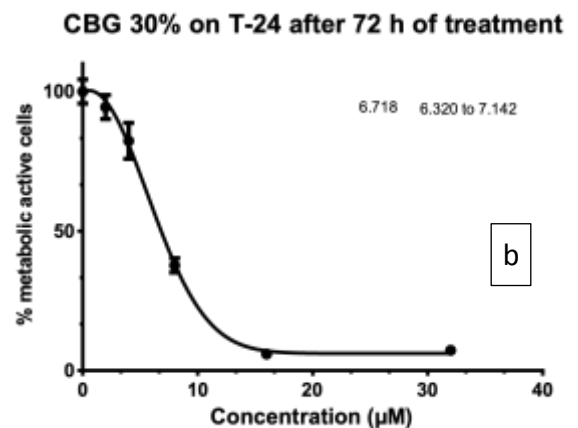
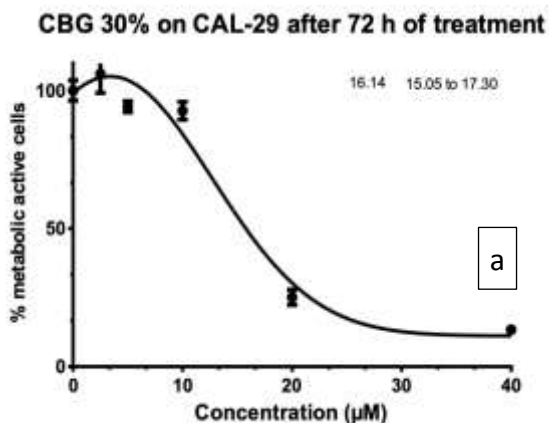
Важно е да се отбележи, че в условията на нашите експериментални *in vitro* модели, екстрактите от индустриален коноп с по-ниско процентно съдържание на канабидиол (60%-но съдържание) демонстрираха неочаквано висок цитотоксичен ефект. Това може би се дължи на вероятно синергично взаимодействие на канабидиола с други компоненти в екстракта (например канабигерол, терпени, флавоноиди и други). Този засилен ефект вероятно се дължи на „ефекта на антуража“, който играе ключова роля в цитотоксичността. Комбинацията от тези съединения изглежда не само засилва апоптотичните и антипролиферативни действия върху туморните клетки, но също така потенциално помага за преодоляване на лекарствената резистентност, която е често срещана при конвенционалните антинеопластични терапии.

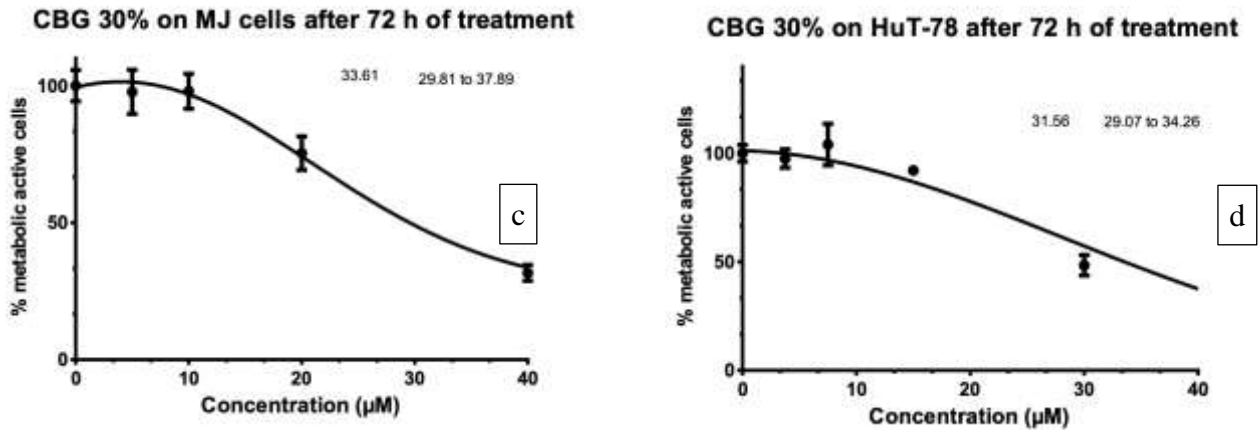
Въпреки това, тази повишена ефикасност на CBD екстрактите трябва да бъде балансирана спрямо техните профили на безопасност и токсичност, които се различават от тези на чистия канабидиол. Това налага по-задълбочени изследвания на фармакокинетиката, оптималните дози и начините на приложение на CBD екстрактите. Сложността на състава на екстракта на CBD поставя предизвикателства в стандартизацията и регулирането, подчертавайки необходимостта от клинични изпитвания за валидиране на тяхната ефикасност и безопасност в онкотерапията.

Демонстрираната значителна антипролиферативна активност на CBD към клетъчните линии от карцином на пикочен мехур, T-24 и Cal-29, показва потенциал за интравезикално прилагане (локално апликиране в пикочния мехур) при лечение на повърхностен кацином на пикочния мехур (преходно-клетъчен карцином) и за профилактика на рецидиви след трансуретрална резекция. Вероятно CBD може да се използва и в комбинация с други терапевтични продукти за борба с неоплазиите в така наречените полихимиотерапевтични режими.

## 2.2. Антипролиферативен ефект на 30 % канабигерол (CBG) екстракт в етанолов разтвор върху различни туморни клетъчни линии

Екстрактът от *Cannabis sativa* с 30% съдържание на CBG също демонстрира антипролиферативна активност с  $IC_{50}$  от 6.718 (6.320-7.142)  $\mu\text{mol/L}$  върху T-24 и с  $IC_{50}$  от 16.14 (15.06-17.30)  $\mu\text{mol/L}$  върху CAL-29. Същия 30% CBG екстракт показва значително по-слабо антипролиферативно действие на 72-рия час срещу клетъчните линии MJ с  $IC_{50}$  от 33.61 (29.81-37.89)  $\mu\text{mol/L}$  и с  $IC_{50}$  от 31.56 (29.07-34.26)  $\mu\text{mol/L}$  върху HuT-78 (фигура 4).

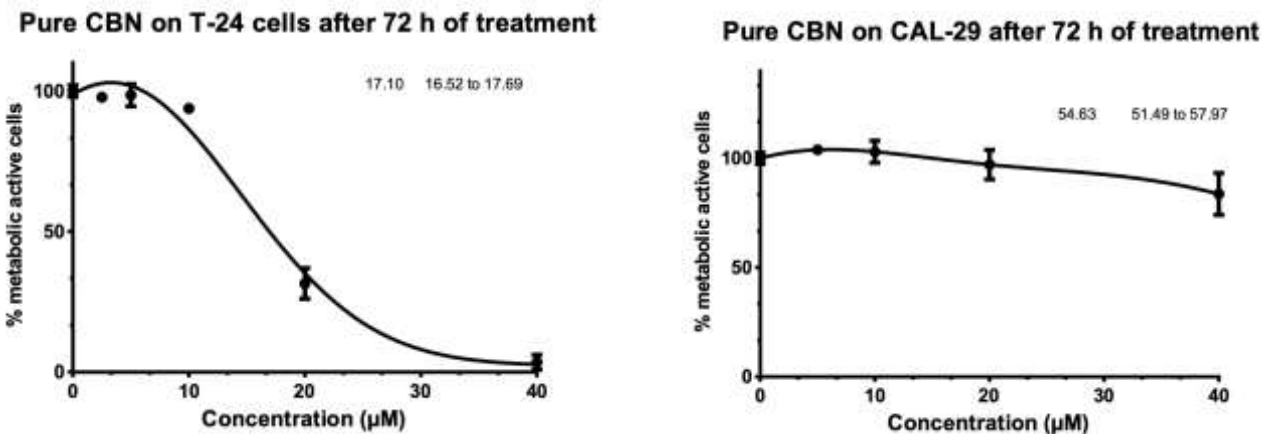




**Фигура 4.** Антипролиферативна активност на 72 час с IC<sub>50</sub> на екстракт съдържащи 30 % CBG върху: а) CAL-29; б) T-24; в) MJ д) Hu-78.

### 2.3. Антипролиферативен ефект на чист канабинол (CBN) екстракт в етанолов разтвор

Чистият канабинол (CBN) проявява значително по-добра антипролиферативна активност на 72 час с IC<sub>50</sub> от 17.10 (16.52-17.69) µmol/L към T-24 клетъчната линия в сравнение с CAL-29 от преходно-клетъчен карцином на пикочен мехур, където неговата IC<sub>50</sub> е 54.63 (51.49-57.97) µmol/L (фигура 5).

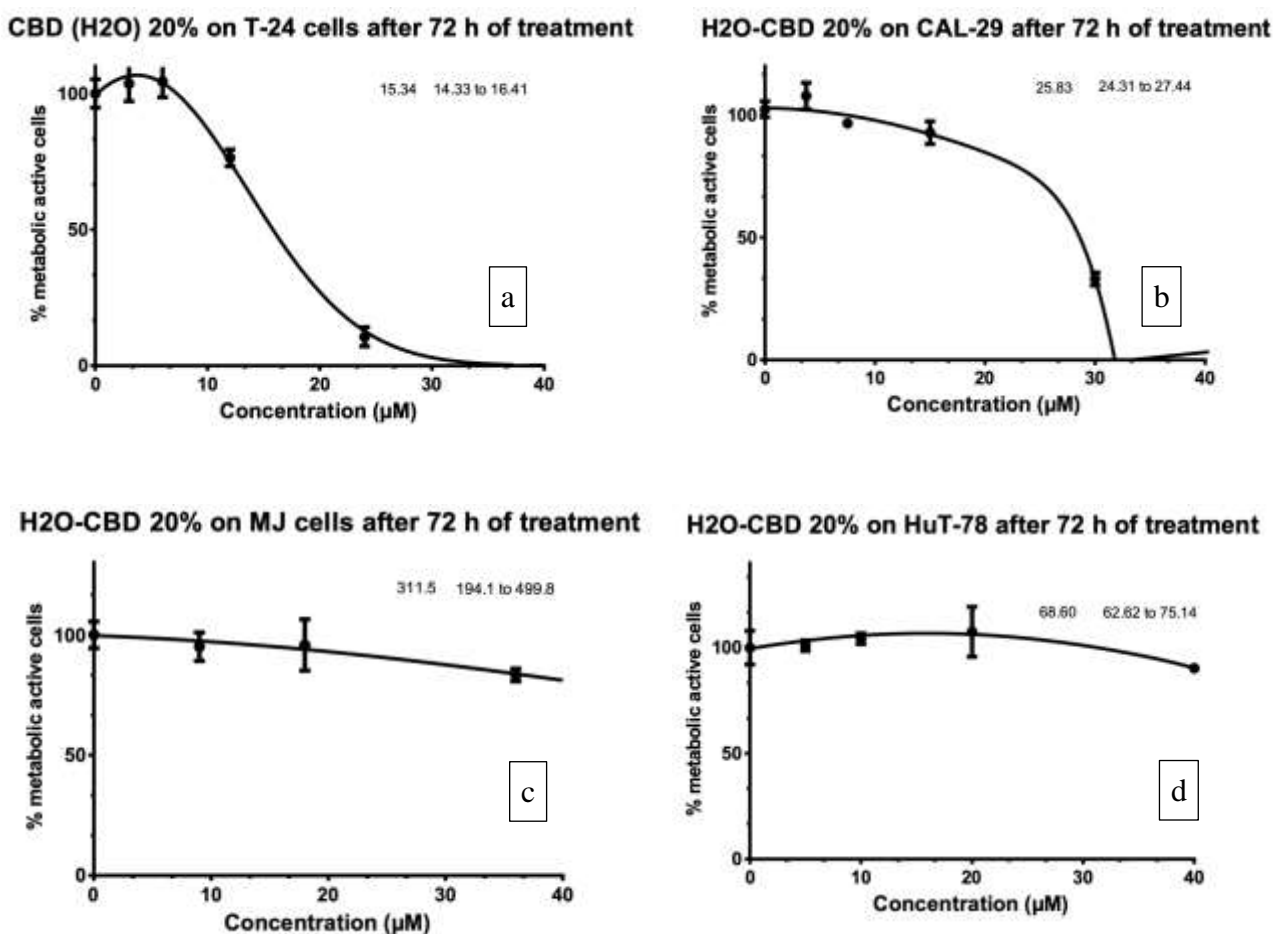


**Фигура 5.** Антипролиферативна активност на 72 час с IC<sub>50</sub> на екстракт съдържащ чист CBN върху туморни клетки от преходно-клетъчен карцином на пикочен мехур, съответно T-24 и CAL-29.

#### 2.4. Антипролиферативен ефект на CBD в нано-емулсия

Чиста субстанция CBD поставена в нано-емулсия демонстрира влошена антипролиферативна активност с  $IC_{50}$  от 15.34 (14.33-16.41)  $\mu\text{mol/L}$  срещу T-24 и с  $IC_{50}$  от 25.83 (24.31-27.44)  $\mu\text{mol/L}$  срещу CAL-29 в сравнение с чистата субстанция в етанолов разтвор.

При клетъчните линии MJ с  $IC_{50}$  от 68.60 (62.62-75.14)  $\mu\text{mol/L}$  и HuT-78 с  $IC_{50}$  от 311.50 (194.1-499.8)  $\mu\text{mol/L}$ , респективно, имаше значително влошена антипролиферативна активност след третиране с нано-емулсия съдържаща CBD (фигура 6).



**Фигура 6.** Антипролиферативна активност на нано-емулсия съдържаща CBD с  $IC_{50}$  върху туморни клетки от: а) T-24, б) CAL-29, в) HuT-78 и д) MJ клетъчни линии

#### 2.5. Антипролиферативен ефект на CBD в полимерни носители

Предимствата на нанокompatитния криогел-носител на CBD, в сравнение с чист HES носител, бяха демонстрирани чрез експерименти за освобождаване

(Momekova D et al., 2020). *In vitro* тестовете се проведоха в ацетатен буфер с pH 5.5, защото разработените криогелове са предназначени за потенциално дермално приложение, а pH на човешката кожа е около 5.5.

За да се докаже, че полимерните носители нямат присъща цитотоксичност, беше изследван инхибиращият ефект на празни криогелни системи върху пролиферацията на миши фибробластни клетки (CCL-1) (Фигура 7A).

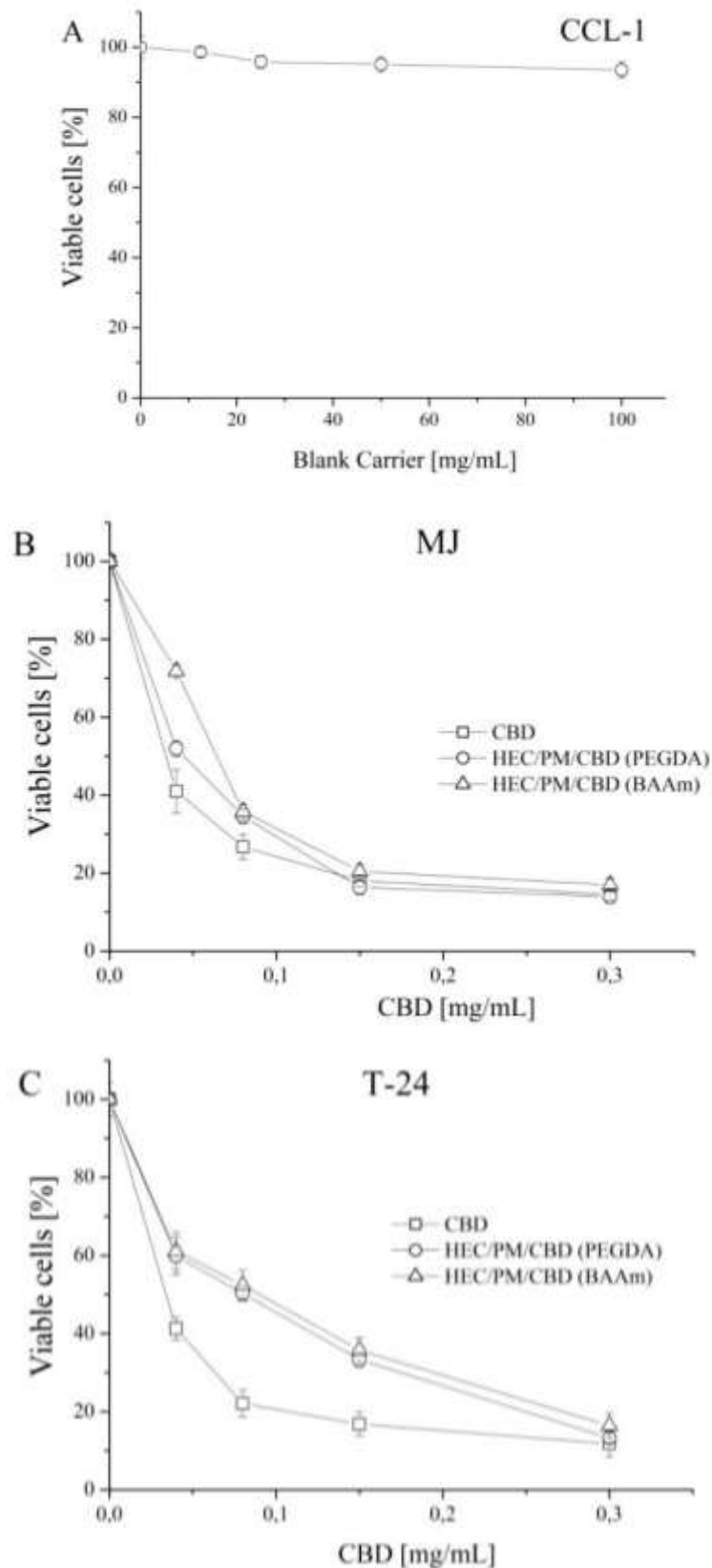
Във всички експерименти използвахме стандартен биотест за цитотоксичност, базиран на ензимното редуциране на жълтата тетразолиева сол МТТ до виолетов МТТ-формаза от митохондриалната сукцинатдеhidрогеназа в жизнеспособни клетки (Mosmann T, 1983) с леки модификации (Konstantinov S et al., 1999). Антинеопластичната активност беше оценена *in vitro* върху две човешки туморни клетъчни линии MJ (кожен Т-клетъчен лимфом) и T-24 (карцином на пикочен мехур).

Кривите концентрация-отговор са изобразени на Фигура 7B и C и получените от тях еквивалентни инхибиторни концентрации ( $IC_{50}$ ) са обобщени в Таблица 1.

**Таблица 1.** Еквивалентни ефективни концентрации ( $IC_{50}$ ) на свободен и включен в полимерен носител CBD за MJ и T-24 клетки.

| Sample             | $IC_{50}$<br>( $mg \cdot mL^{-1}$ ) |       |
|--------------------|-------------------------------------|-------|
|                    | MJ                                  | T-24  |
| CBD                | 0.033                               | 0.034 |
| HEC/PM/CBD (PEGDA) | 0.046                               | 0.071 |
| HEC/PM/CBD (BAAm)  | 0.058                               | 0.090 |

Ненатоварените криогелове са лишени от каквато и да е цитотоксичност, тъй като не се наблюдава потискане на жизнеността на третираните клетки (стойности в диапазона 94–98 %). След това беше проведено сравнително проучване относно антипролиферативната активност на свободния канабидиол и неговите нанокмпозитни криогелни съединения.

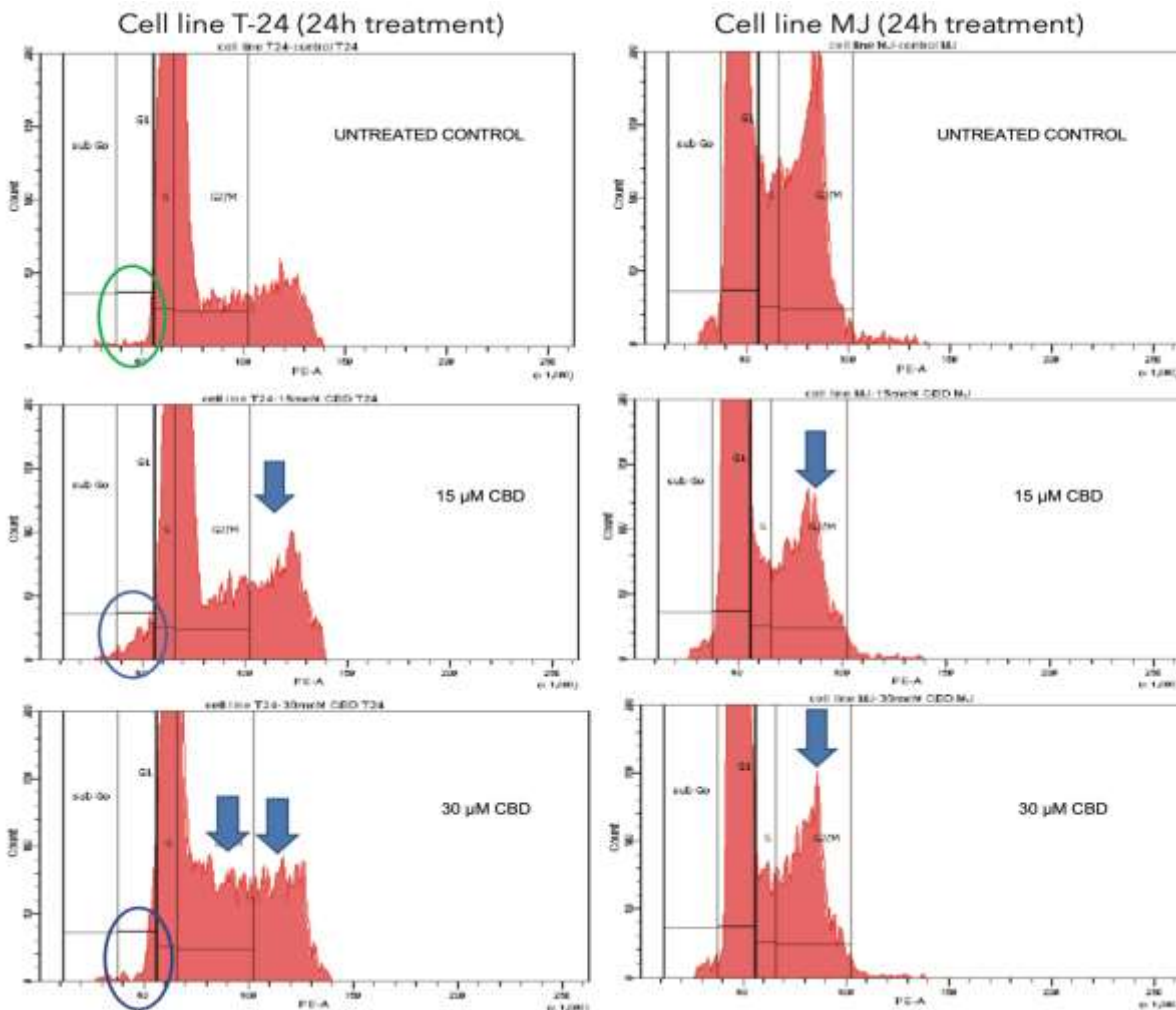


**Фигура 7.** Криви концентрация-отговор, определени чрез анализ на редукция на МТТ-багрило след 72 h непрекъсната експозиция при клетъчни линии от: А) миши фибробластни клетки (CCL-1); В) човешки кожен Т-клетъчен лимфоцит (MJ); С) карцином на пикочния мехур (T-24). Всяка точка от данни представлява средна аритметична стойност  $\pm$  стандартно отклонение от поне 12 независими експеримента.

Стойностите на  $IC_{50}$  на двете нанокompatни HEC/PM криогелни системи (синтезирани с PEAGA и BAAM) бяха установени по-високи от тези, получени за свободното лекарство (с идентична степен на модулация) в зависимост от типа туморни клетки. Въпреки това, нашите резултати категорично показват, че тестваните нанокompatни носители представляват добра платформа за ефективно локално доставяне на CBD, без да се компрометират неговите антинеопластични ефекти при локалното му приложение.

Биоанализът *in vitro* недвусмислено показва, че заредените системи са в състояние да освобождават CBD продължително време и допълнително да запазят антитуморните инхибиращи ефекти на естествения продукт в съответните *in vitro* модели на Mycosis fungoides (клетъчна линия MJ) и неинвазивен карцином на пикочния мехур (клетъчна линия T-24). Тези два неопластични модела са представители на важни туморни заболявания, чиято анатомична локализация и биологични характеристики позволяват регионална или локална терапия.

### 3. Флоуцитометрични данни след третиране със CBD



Фигура 8. Флоуцитометрия след третиране на туморни клетки T-24 и MJ с CBD

Клетките от карцином на пикочния мехур, T-24 реагират със значително увеличение на фракцията sub-G1. Има данни за G2/M арест с увеличаване на T-24 клетките в S-фаза. M1 клетките получени от Mycosis fungoides реагират със силно намаляване на броя на S, G2 и M-фаза при третиране със CBD. Увеличението на суб-G1 фракцията не е значително в M1 клетките и не повтаря модела на промени в T-24 клетките (Фигура 8).

#### **4. Резултати от изследваната противовирусната активност на CBD**

*4.1. Влияние на изпитвания 30% CBD/M/130720/3 екстракт върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия клетки*

Първият важен етап от проведените антивирусните експерименти включваше определяне на цитотоксичността на 30% CBD/M/130720/3 екстракт върху култивирани в лабораторни условия клетки от линия Lep. Преживяемостта беше отчетена 120 h след третирането, тъй като това е времеви интервал, за който може да се наблюдава съществена пролиферация на клетките и да се оцени директният токсичен ефект на изследваната субстанция, водещ до клетъчна смърт, което и съвпада с времето на репликация на HCoV-229E в клетъчни култури.

Изпитваният екстракт съдържащ 30% CBD/M/130720/3 беше приложен в концентрационен диапазон 0.001 – 20 µg/mL в продължение на 120 h. Нетретирани Lep клетки, чиято преживяемост бе приета за 100%, бяха използвани като отрицателна контрола. След провеждане на МТТ-тест бяха направени дозо-зависими криви на въздействието върху жизнеността на клетъчния монослой на приложения екстракт. Анализът при наблюдението на клетъчната морфология на клетките беше синхронизиран с МТТ-анализа на клетъчната преживяемост.

МТТ багрилото е водно-разтворима тетразолиева сол, придаваща жълтеникав цвят на разтвора. Поставено в хранителната среда на клетките, МТТ преминава в клетъчния цитозол, достига до митохондриите, където митохондриалните дехидрогенази откъсват тетразолиевия пръстен и превръщат разтворимата жълта сол в неразтворим във вода син формазанов продукт. Способ-

ността на клетките да редуцират МТТ е показател за митохондриалната цялост и активност, което се интерпретира като мярка за жизненост и/или численост на жизнеспособните клетки. Мъртвите клетки не участват в това превръщане, поради нефункциониране на митохондриите им. Количеството на трансформирания МТТ до неразтворими формазапови кристали е пропорционално на броя на живите клетки.

Получените резултати показаха, че като цяло преживяемостта на третираните монослойни клетки от линия Lер намалява под въздействие на изпитвания екстракт от 30% CBD/M/130720/3, като наблюдаваният ефект нараства право-пропорционално с увеличаване на концентрацията им. При най-ниските изследвани инкубационни концентрации (0.001 – 0.5 µg/mL) се наблюдаваше сравнително слабо инхибиране на преживяемостта (81.34 – 98.88 %), но при последващите нарастващи концентрации (от 5 µg/mL до 10 µg/mL) стойността на клетъчната преживяемост се понижава, като достига стойност близка до 50 % за тестваните канабиноидни екстракти.

Визуализирането на измененията в морфологията на клетъчния монослой след третиране е достъпен и надежден подход при първоначалното проучване на цитотоксичността на различни субстанции. Във връзка с това, паралелно с провеждането на МТТ-анализ, под инверторен светлинен микроскоп са проследени промените в морфологията на клетките, изложени на действието на 30% CBD/M/130720/3. Докато нетретираните контролни клетки бяха запазили своята нормална форма, половината от третираните клетки бяха окръглени и с намален обем, и бяха дезинтегрирани от монослоя при най-високите концентрации (15 – 20 µg/mL). Честа находка бяха клетки със силно уплътнени ядра, просветлена и вакуолизирана цитоплазма.

Понижаването на броя адхерентни живи клетки, както и окръглянето и намаляването на размера на клетките (Таблица 21) следват тенденцията, установена при МТТ анализа.

**Таблица 2.** Влияние на 30% CBD/M/130720/3 екстракт върху преживяемостта/пролиферативната активност на клетки от линия Ccr, отчетено чрез различни методи след 120 h на третиране

| Изследвани екстракти | Метод   | MNC<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | CD <sub>50</sub><br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|----------------------|---|-----------------------------|--|
| 30% CBD/M/130720/3   | Микроскопско наблюдение на промените в морфологията на клетъчния монослой | 1 $\pm$ 0.1                 | 10.0 $\pm$ 0.13                          |
|                      | МТТ тест  | 1 $\pm$ 0.12                | 12.5 $\pm$ 0.05                          |

## 4.2. Антивирусна активност

### 4.2.1 Тест за инхибиране на цитопатичния ефект

За изпитване на ефекта на изследвания 30% CBD/M/130720/3 екстракт върху репликацията на HCoV-229E бяха приложени концентрации в диапазона от 0.01  $\mu\text{g/mL}$  до 5  $\mu\text{g/mL}$  (MNC и близки до нея). От получените данни са построени дозо-зависими криви за определяне на инхибиторната концентрация, водеща до 50 % инхибиране на вирусния цитопатичен ефект (IC<sub>50</sub>).

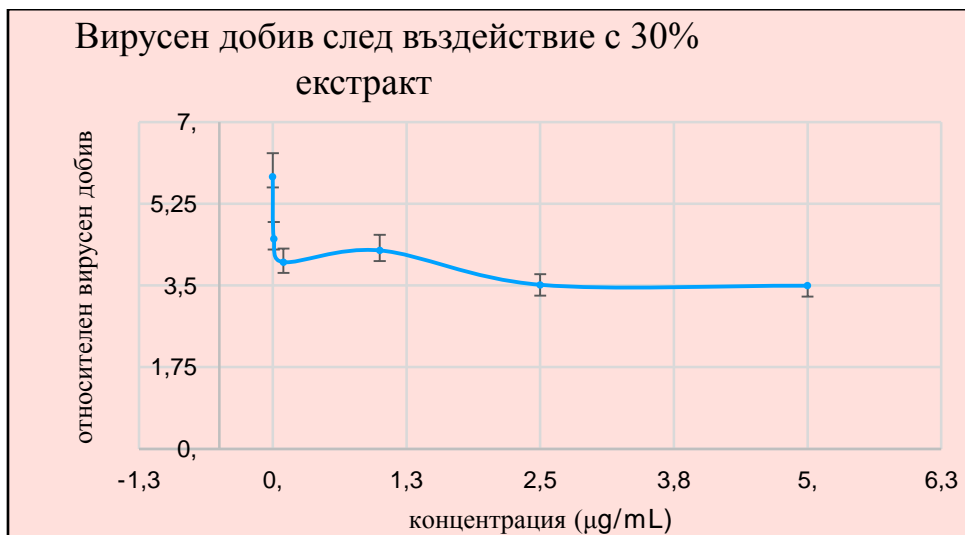
Първоначално, антивирусното действие на изследвания екстракт от 30% CBD/M/130720/3 беше оценено с тест за инхибиране на цитопатичния ефект. След заразяване на клетките с HCoV-229E цитопатичен ефект се разви след около 120 часа и се изразяваше в поява на окръглени клетки, дисеминирани неравномерно в клетъчния монослой, с тенденция към огнищност. Резултатите от проведените експерименти бяха оценени на база на сравнение с незаразени с вирус и без добавяне на екстракт клетки (клетъчна контрола), както и с клетки заразени с HCoV-229E, без добавяне на субстанция (вирусна контрола).

От направените експерименти, става ясно, че за разлика от неинфектираните MDCK клетки, заразени с HCoV-229E са променени по форма, струпани във вид на „острови“, изолирани една от друга и отделени от подложката върху която се култивират.

**4.2.2. Определяне на ефекта на изследвания екстракт 30% CBD/M/130720/3 върху инфекциозния вирусен добив. Определяне на инхибираща концентрация 50% (IC<sub>50</sub>) и селективен индекс (SI)**

Разликите в инфекциозните вирусни титри между опитните и контролните проби са изразени като  $\Delta\log$ . Въз основа на отчетените резултати са построени графики „доза–отговор“ и са определени минималните инхибиращи концентрации 50% (MIC<sub>50</sub>). За достоверен резултат при проведените изследвания се считат стойности на  $\Delta\log_{10} \geq 1$ .

От получените данни „доза – анти- HCoV-229E ефект“ се установява, че при самостоятелно прилагане на 30% CBD/M/130720/3 екстракт се инхибира репликацията на HCoV-229E вируса по дозо-зависим начин (фигура 9).



**Фигура 9.** Вирусен добив след въздействие с 30% CBD/M/130720/3 екстракт

Екстрактът 30% CBD/M/130720/3 ефективно инхибира добива на инфекциозно вирусно потомство, при което HCoV-229E в концентрационен диапазон 0.01 – 1 µg/mL. Приложен в MNC (1 µg/mL) той снижава вирусния добив с  $\Delta\log_{10}$  1.3, а неговата MIC<sub>50</sub> е 0.1 µg/mL (Таблица 3).

**Таблица 3.** Индивидуален ефект на екстракт съдържащ 30% CBD/M/130720/3 при отчитане на инфекциозния титър ( $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/0.2 mL)

| Вирусен щам | Концентрация (µg/mL) | Вирусен добив ( $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> )* | $\Delta\log_{10}$ |
|-------------|----------------------|---|-------------------|
| HCoV-229E   | 0                    | 5.833 ± 0.000                                     | -                 |
|             | 0.01                 | 4.500 ± 0.500                                     | 1.0               |
|             | 0.1                  | 4.000 ± 0.363                                     | 1.3               |
|             | 1                    | 4.251 ± 0.288                                     | 1.3               |
|             | 2.5                  | 3.515 ± 0.333                                     | 1.8               |
|             | 5                    | 3.495 ± 0.230                                     | 1.8               |

\*Данните са представени със средни стойности ± SEM

Изследването на въздействието на всяко потенциално активно антивирусно вещество винаги е свързано с определяне на биологичната активност на веществото върху репликацията на вируса (IC<sub>50</sub>), без да се интересуваме от механизма или мишената на този ефект.

IC<sub>50</sub> е концентрацията на изследваното вещество, която инхибира с 50% вирус-индуцирания цитопатичен ефект. Биологичната ефективност и селективност на тествания 30% CBD/M/130720/3 екстракт беше определена чрез селективния индекс (SI), който представлява съотношението между CD<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>.

Въз основа на експерименталните резултати бяха отчетени основните химиотерапевтични показатели IC<sub>50</sub> и SI на тествания екстракт 30% CBD/M/130720/3, които са представени в Таблица 13. Данните в Таблица 4 показват каква е преживяемостта (протекцията) на клетките след заразяване с HCoV-229E и третиране с екстракт 30% CBD/M/130720/3, приложени в максимална нетоксична концентрация (MNC).

**Таблица 4.** Анти-HCoV-229E активност на екстракт съдържащ 30% CBD/M/130720/3. Основни химиотерапевтични показатели - IC<sub>50</sub> и SI

| Изследвани екстракти | MNC (µg/mL) | CD <sub>50</sub> (µg/mL) | HCoV-229E                |     |                               |
|----------------------|-------------|--------------------------|--------------------------|-----|-------------------------------|
|                      |             |                          | IC <sub>50</sub> (µg/mL) | SI  | % протекция на клетките в MNC |
| 30% CBD/M/130720/3   | 1.0 ± 0.12  | 12.5 ± 0.05              | 0.1                      | 125 | 56%                           |

| Cell line | IC 50 (µmol/L) |         |         |
|-----------|----------------|---------|---------|
|           | 99% CBD        | 60% CBD | 30% CBD |
| T-24      | 19.89          | 0.12    | 10.32   |
| MJ        | 12.65          | 2.45    | 22.35   |
| MDA-MB    | 10.07          | 6.877   | 5.311   |
| HuT-78    | 21.09          | 12.06   | 7.774   |

На базата на получените резултати можем да предположим, че CBD би могъл да попречи на способността на вируса да се репликира или да навлезе в клетките гостоприемници, като по този начин намалява вирусния товар и облекчава тежестта на инфекцията. Механизмът му на действие обаче подлежи на бъдещи задълбочени проучвания.

## V. Обсъждане

От направените експерименти се установи, че както свободният CBD (приложен като етанолов разтвор), така и формули, които го съдържат, показват концентрация-зависима цитотоксичност. При по-ниски концентрации на съединението, ефектът на свободния CBD е по-изразен.

По-конкретно, данните от изследваната цитотоксичност показват, че 60% CBD екстрактът е по-мощен от 99 % чист CBD изолат в повечето тествани туморни клетъчни линии. Това предполага, че другите канабиноиди и терпени, присъстващи в 60% екстракт, могат да действат синергично с CBD, като подобряват нефовите антинеопластични ефекти. Наличието на терпени като  $\beta$ -caryophyllene, който е известен със своите противовъзпалителни и противотуморни свойства, проявяващи се чрез активиране на CB2 рецепторите (Scandiffio R, et al., 2020) би могло да доведе до установеният от нас усилен цитопатичен ефект.

60% CBD екстрактът показва по-добри резултати и по отношение на индуцирането на апоптоза и спирането на клетъчния цикъл. Значителното увеличение на суб-G0/G1 популацията, заедно със спирането на G2/M които установихме, както в T-24, така и в MJ туморните клетки, третирани с 60% CBD екстракт, предполага, че именно този екстракт може да бъде по-ефективен за предизвикване на апоптотична и митотична смърт при определени тумори.

Получените в настоящия труд резултати са в съответствие с направеното проучване върху меланомни клетки, където приложения THC активира тяхната цитотоксична автофагия и предизвиква апоптоза (Armstrong et al., 2015).

Важно е да се отбележи също, че 30 % CBD екстракт демонстрира по-висока ефективност върху клетъчната линия MDA-MB от карцином на гърдата, отколкото в другите линии. Можем да предположим, че именно комбинацията с второстепенни канабиноиди и други съединения, съдържащи се в 30% - ния екстракт, биха могли да действат чрез уникален механизъм върху туморните клетки MDA-MB, като евентуално модулират естрогенните рецепторни пътища или други специфични за този карцином сигнални пътища.

В резултат на проведените изследвания беше установено, че екстракти, богати на различни вторични канабиноиди, терпени и други вещества, показват подчертан цитотоксичен ефект върху определени тумори *in vitro*, което предполага видова специфичност в тяхната противотуморна активност. Тази променливост подчертава потенциала за персонализиран медицински подход при

лечението на тумори, където изборът на екстракт от CBD може да бъде съобразен с вида и генетичния профил на неоплазмите. Това налага изучаване и задълбочено разбиране на молекулярните взаимодействия между различните компоненти на CBD екстрактите и различните туморни клетки. Тази област на изследване, макар и в начален стадий, има голям потенциал за разработването на по-ефективни и таргетни противотуморни терапии, което налага обширни и подробни проучвания на специфичните ефекти на отделните компоненти на CBD екстракти в различни комбинации върху различни туморни линии.

Системно приложение на много антинеопластични средства крие риск от тежки нежелани лекарствени реакции. Понякога медикаментите имат ниска или липсваща орална бионалиност поради изразен first pass ефект, или поради висока липофилност и прием на гладно (както е при CBD). Затова възможността за локално прилагане на противотуморни медикаменти (на кожата или интратекално) представлява много добър вариант за лечение на някои неоплазии с минимален риск за токсичности.

Установено е, че колоидните системи като лекарствени форми притежават превъзходство в биоразпределението при доставяне на CBD в кожата при възпалителни кожни заболявания (Lapteva M, 2024). Според нас бъдещи детайлни изследвания за включване на иновативни локални продукти, съдържащи канабидиол към прилаганите терапевтични схеми в лечението на КТКЛ и особено при *Mycosis fungoides*, както и при карцином на пикочния мехур, са изключително перспективни и безопасни.

Получените резултати от изследване на антивирусната активност на различните формули съдържащи CBD са особено интригуващи и напълно съответстват с публикуваните данни за потискане SARS-CoV-2 репликацията от канабидиол (Chatow L et al., 2021).

В настоящата работа установихме също, че екстрактите с 30% и 60% CBD превъзхождат чистия CBD изолат при инхибиране на репликацията на HCoV-229E. Много добрата антивирусна активност на 30% CBD екстракт ( $IC_{50} = 3,515 \mu\text{g/mL}$ ) също би могла да се обясни с проявени антивирусни свойства на другите канабиноиди и терпени, присъстващи в този екстракт, които допълват действията на CBD.

Необходими са по-нататъчни изследвания, за да се идентифицират специфичните съединения, отговорни за тези засилени антипролиферативни и противовирусни ефекти на екстрактите съдържащи 30% и 60% CBD, и да се изследват потенциалните им клинични приложения при терапия на карциноми и вирусни инфекции.

## VI. Изводи

### 1. Цитотоксичност на всички форми на CBD

1.1. Всички изследвани съединения и екстракти проявяват концентрация-зависим цитотоксичен ефект срещу туморни клетки с произход от КТКЛ, карцином на пикочния мехур и гърдата.

1.2. Различни екстракти могат да имат различно влияние върху различни неопластични клетъчни линии.

1.3. **CBG** екстрактът демонстрира по-силна антипролиферативна активност върху клетъчните линии T-24 и CAL-29 от карцином на пикочния мехур и занижена активност върху MJ и HuT-78.

1.4. **CBN** има цитотоксично действие върху T-24 туморни клетки, но значително по-слабо действие върху CAL-29, вероятно поради разлика в генните мутации на двете линии.

1.5. Екстрактите от *Cannabis sativa L.* демонстрират по-силно цитотоксично влияние в сравнение с чистите вещества при нормализиране на общото количество CBD, като при по-ниски концентрации ефектът на свободния CBD е по-изразен.

1.6. Чист **CBD под формата на нано-емулсия** запазва антинеопластичния си ефект върху T-24, но значително влошава действието си върху HuT-78 и MJ, вероятно поради по-лоша интернализация. Макар водо-разтворимата форма на CBD да подобрява разпределението си в тялото, резултатите показват, че определени форми на нано-емулсия могат да влошат крайния антинеопластичен ефект.

1.7. Някои форми на CBD могат да имат антагонистичен ефект върху действието на активната субстанция.

1.8. Стойностите на IC50 на двете нанокмпозитни HEC/PM криогелни системи (синтезирани с PEAGA и BAAM) са по-високи от тези, получени за свободното лекарство (с идентична степен на модулация) в зависимост от типа клетки.

1.9. Бяха създадени иновативни лекарство-доставящи системи със забавено освобождаване, които позволяват *in situ* зареждане на активното вещество в HEC криогелни носители.

1.10. Криогелове, могат да бъдат потенциална терапевтична локална форма при пациенти с КТКЛ, както и пациенти с повтарящ се неинвазивен карцином на пикочния мехур чрез интравезикални форми на апликиране.

**2. CBD предизвиква G2/M арест при M1 клетки от КТКЛ.**

**3. CBD има антивирусно и вирусно-защитно действие**

**4. Създадените иновативни лекарство-доставящи системи със забавено освобождаване запазват антинеопластичната активност на CBD и позволяват неговото продължително локално доставяне.**

## VII. Заключение

CBD екстрактите съдържат палитра от различни класове съединения и тяхното взаимодействие с активното вещество CBD е област на нарастващ интерес в изследванията на канабиноидите. Фитоканабиноидите притежават сериозен терапевтичен потенциал в лечението на терапевтично резистентни тумори, като тройно негативния карцином на гърдата, както и с възможността за локална и интравезикална апликация. Експерименталните резултати показва комплементарност на механизмите на действие, свързана с усилване на ефектите на отделните вещества в екстрактите от фитоканабиноиди. Това би дало възможност за създаване на комбинации, които действат при по-ниски концентрации, редуциращи в максимална степен техните нежелани лекарствени реакции.

Едно бъдещо задълбочено фармакологично проучване, включително върху *in vivo* модели с цел самостоятелно или комбинирано приложение, е оправдано от клинична гледна точка поради добрата перспектива за въвеждане в практиката на иновативни подходи за лечение на неоплазии като, кожни Т-клетъчни лимфоми, преходно-клетъчен карцином на пикочен мехур и др. с незначителни нежелани реакции.

## VIII. Приноси

### 1. Приноси с оригинален характер

**А.** За първи път бяха сравнени цитотоксичните ефекти на различни CBD доминиращи екстракти от *Cannabis sativa L.* спрямо чисто вещество CBD върху клетъчни модели на терапевтично-резистентни тумори.

**Б.** За първи път бяха документирани антагонистични ефекти между веществата в някои видове CBD-доминиращи екстракти на *Cannabis sativa L.* сравнени с чист CBD.

**В.** За първи път беше тестван и доказан антипролиферативен ефект на CBD в различни полимерни носители с бавно освобождаване, подходящи за локална употреба при тумори.

### 2. Методични приноси

**А.** Беше разработен протокол, който позволява да се избегне интерференцията между екстракти от *Cannabis sativa L.* и фенолното червено при отчитането на резултати от МТТ-тест, и който същевременно съкращава времето за провеждане на експеримента.

**Б.** Беше разработен метод за натоварване на нано-мицели в полизахариден криогел.

**В.** Бяха произведени супер-макропорести криогели с относително висок GF добив (80 – 85%), високо поемане на вода и добри механични свойства. Благодарение на нашия иновативен метод на приготвяне, заредените с CBD мицели редовно се вграждат в полимерната матрица, докато активното вещество е в аморфно състояние. Носителите на нанокомпозитни криогели запазват антинеопластичната активност на CBD и позволяват неговото продължително локално, включително интравезикално доставяне.

### 3. Приноси, с потвърдителен характер

Потвърдени са данните в литературата за наличие на цитотоксичен ефект на CBD, CBG, CBN и натурални екстракти съдържащи CBD и CBG върху клетки с произход КТКЛ, карцином на гърда и пикочен мехур.

## IX. Научни публикации свързани с дисертационния труд

### • Публикации

1. **Ервин Иванов**, Жоржета Бочева, Терапевтичен потенциал на канабиноиди в онкологията, Наука Фармакология, Арбилис книжка 2 (2024)
2. Kamenova K, Momekova D, Grancharov G, Prancheva A, Toncheva-Moncheva N, **Ivanov E**, Konstantinov S, Petrov PD. In Situ Gelling Hydroxypropyl Cellulose Formulation Comprising Cannabidiol-Loaded Block Copolymer Micelles for Sustained Drug Delivery. *Int J Mol Sci* (2023); 24(22):16534. IF 4.9 (2022/23)
3. Lily Andonova, **Ervin Ivanov**, Ivanka Pencheva, Spiro Konstantinov (2021) Elaboration and Validation of HPLC/DAD Method for Quality Control of Products Containing Cannabidiol, *Current Pharmaceutical Analysis* 17(9):1218-1223, IF (2021): 0.743
4. Denitsa Momekova, **Ervin Ivanov**, Spiro Konstantinov, Filip Ublekov, Petar D Petrov, Nanocomposite Cryogel Carriers from 2-Hydroxyethyl Cellulose Network and Cannabidiol-Loaded Polymeric Micelles for Sustained Topical Delivery (2020), *Polymers* 12(5):1172, IF (2020): 4.329

### • Участия в международни научни форуми във връзка с дисертационния труд

1. **Ivanov E**, Hristova D, Trochopoulos A, Konstantinov SM, Zaharieva M, Berger MR. Comparison of the antineoplastic activity of THC free Cannabis sativa L extracts and cannabidiol (CBD). 7th International Conference and Exhibition on Pharmacology and Ethnopharmacology, March 27-28, 2019, Amsterdam, Netherlands
2. **Ervin Ivanov** , Dilyana Hristova , Antonios Trochopoulos , Maya Zaharieva , Margarita Genova, Spiro Konstantinov. Cannabidiol and hemp plant extracts inhibit the growth of human NHL cells, XXXVII World Congress of the International Society of Hematology, September 13-16, 2018, Vancouver, Canada
3. Kaloyan Kaloyanov, Antonios Trochopoulos, **Ervin Ivanov**, Maya Zaharieva, Ivanka Pencheva-El Tibi, Margarita Genova и Spiro Konstantinov. Постерна презентация на тема: Cannabidiol As Potential Drug for the Treatment of NHL (MM AND CTCL) concepts in Lymphoid Malignancies: Focus on CLL and Indolent Lymphoma, September 15-17, 2017, Mandelieu-la-Napoule, France
4. Spiro M Konstantinov, **Ervin M Ivanov**, Antonios G X Trochopoulos, Maya M Zaharieva, Theodora N Athanassova, Yana Ilieva, Gyuldzhan H Yakub, Milena G Ignatova, Iliya B Rashkov, Nevena E Manolova, D Momekova and Hristo M Najdenski **Antineoplastic**

**activity of cannabidiol containing products**, 4th European Biopharma Congress & 6th International Conference and Exhibition on Pharmacology and Ethnopharmacology November 09-11, 2017 Vienna, Austria

## Х. Благодарност

Изказвам дълбока благодарност на научния ми ръководител доц. д-р Жоржета Бочева, дм и научният ми консултант проф. д-р Спиро М. Константинов, дм, дфн, за подкрепата им не само чрез научната си експертиза, но също чрез добротата и търпението си. Проф. Петър Петров, дн заслужава също дълбоката ми признателност за предоставената възможност да бъда част от неговия екип и работа. Специални благодарности на гл. ас. Мая М. Захаријева, дф от Департамента по инфекциозна микробиология към Институт по микробиология, Българска академия на науките (БАН) за нейната постоянна и всеотдайна подкрепа от началото до края на научните ми изследвания.

Изключително съм благодарен на лаборант Теодора Атанасова за нейното безусловно съдействие при осъществяването на редица експерименти в лабораторията за експериментална химиотерапия при Фармацевтичния факултет и на проф. Красимира Йончева за приготвянето на наноразмерни системи, използвани в експерименталната ми работа.

Също така благодаря и на доц. Иванка Пенчева - Ел Тиби за помощта ѝ относно хроматографските анализи в изследванията.

В настоящия дисертационен труд са включени резултати от няколко проекта, финансирани от следните организации, на които също искам да благодаря:

- Немската служба за академичен обмен (DAAD),
- Договор с ДФНИ Т02/1 (12.12.2014 г.)
- Договор с ФНИ ДН 03/3 (16.12.2016 г.)
- ННП БиоАктивМед (Д01-217 от 30.11.2018г.)

Голяма признателност и благодарност към всички приятели и колеги, които срещнах през тези години и направиха това преживяване незабравимо, най-много на моите приятели Антониос Трохопулос, Люси, Роси и всички други, които не съм споменал.

## XI. SUMMARY

### “ANTI-TUMOR ACTIVITY OF PHYTOCANNABINOIDS ADMINISTERED AS SOLUTIONS AND INNOVATIVE DRUG DELIVERY SYSTEMS”

The aim of the research was to investigate the potential of phytocannabinoids, such as cannabidiol (CBD), cannabigerol (CBG), and cannabitol (CBN), to act as antitumor agents, particularly in resistant to conventional therapies cancers. It was tested cell lines from triple-negative breast cancer (MDA-MB-231), bladder carcinoma (CAL-29 and T-24), and cutaneous T-cell lymphoma (HuT-78 and MJ).

Using *in vitro* experiments, the research had revealed that the extracts of phytocannabinoids (30% and 60%) showed strong cytotoxic effects on the tested cancer cell lines through an ability to inhibit cancer cell proliferation, induce apoptosis, and block angiogenesis, which are essential for a tumor growth.

The study explored the cytotoxic effects of non-psychoactive cannabinoids loaded as solutions and in delivery systems, like polymer-based carriers and hydrogel. These innovative delivery systems were designed to enhance their bioavailability and therapeutic efficacy.

Additionally, as a result of the research it was found that extracts rich in various secondary cannabinoids, terpenes and other substances had demonstrated a marked synergistic antitumor effect, a concept known as „entourage effect.”

The findings support the need for further studies to explore the clinical applicability of these compounds, including dose optimization, delivery methods, and their potential roles in combination therapies.

Overall, this work highlights phytocannabinoids as valuable candidates for the development of innovative anti-tumor therapies, particularly for the tumors with possible local treatment, like cutaneous lymphomas or bladder cancer.