

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*

Д и с е р т а ц и я
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.

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. Захариева, 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.

"All we have to decide is what to do with the time that is given us." — J. R. R. Tolkien

Съдържание

Използвани съкращения

I. Литературен обзор

1. Фитотерапия и кратка история на фитоканабиноидите
2. Ендоканабиноидна система
 - 2.1 Кратък общ преглед
 - 2.2 Ендоканабиноидна система при тумори
3. Перспективи за приложение на канабиноиди при лечението на неоплазии
 - 3.1 Еволюция на канабиноидните рецептори при тумори
 - 3.2 Молекулярни механизми на канабиноидите в туморната прогресия
4. Проблеми при прилагане на канабидиол (CBD)
5. Иновативни лекарство-доставящи системи
6. Терапевтично резистентни тумори
 - 6.1 Терапевтични подходи в лечението на тройно негативен карцином на гърдата (TNBC)
 - 6.2 Терапевтични подходи в лечението на карцином на пикочния мехур
 - 6.3 Терапевтични подходи в лечението на първичен кожен Т-клетъчен лимфом
7. Основна хипотеза произтичаща от литературния обзор

II. Цел и задачи

1. Цел на дисертационният труд
2. Задачи

III. Материали и методи

1. Материали
 - 1.1. Чисти вещества
 - 1.2. Екстракти
 - 1.3. Използвани клетъчни линии
 - 1.4. Среди за клетъчно култивиране
2. Методи
 - 2.1. Клетъчно култивиране
 - 2.2. Приготвяне на среда за култивиране и замразяване
 - 2.3. Инактивиране на FBS
 - 2.4. Замразяване на клетъчни линии
 - 2.5. Размразяване на клетъчни линии с цел култивиране
 - 2.6. Смяна на хранителната среда на клетъчните култури
 - 2.7. Поддържане на клетките в логаритмична фаза на растеж
 - 2.8. Определяне автентичността на клетъчните линии с Multiplex human Cell line Authentication Test (MCA)
 - 2.9. Изготвяне на растежни криви
 - 2.10. Приготвяне на серия кратни падащи разреждания от изходен разтвор

- 2.11. Приготвяне на изходни разтвори на вещества за третиране на клетки
- 2.12. Третиране на клетките с цитостатик
- 2.13. Метод с тиазолиево синьо (МТТ-метод) за оценка на клетъчна виталност
- 2.14. Flow cytometry – поточна цитометрия след третиране с CBD
- 2.15. Биоаналитично количествено определяне на CBD чрез високо ефективен течен хроматографски (HPLC) метод
- 2.16. Методи за натоварване на наноразмерни мицели с CBD
- 2.17. Определяне на антивирусна активност на CBD екстракт
- 2.18. Статистически анализ на получените резултати

IV. Резултати от собствени изследвания и обсъждане

- 1. Натоварване на наноразмерни мицели с CBD**
- 2. Оценка на антипролиферативния ефект на тестваните съединения чрез МТТ**
 - 1.1. Антипролиферативна активност на канабидиол (CBD)
 - 1.2. Антипролиферативна активност на CBD-съдържащи екстракти
 - 1.5 Антипролиферативна активност на канабинол (CBN)
 - 1.4 Антипролиферативна активност на канабигерол (CBG)-съдържащи екстракти
 - 1.6 Антипролиферативна активност на CBD в наноемулсия
 - 1.7 Антипролиферативна активност на CBD в полимерна лекарство-доставяща система
- 3. Изследване на потенциален синергизъм при комбиниране на изследваните съединения**
 - 3.1. Тестване с МТТ метода на комбинации с цел търсене на синергични взаимодействия
 - 3.2. Проучване на клетъчно-молекулярните ефекти на най-перспективната комбинация
- 4. Сигнална трансдукция при самостоятелно приложение на изследваните съединения**
 - 4.1. Поточна цитометрия
- 5. Противовирусни свойства на изследваните съединения съдържащи CBD**

V. Изводи

- A. Цитотоксична активност на изследваните съединения
- B. Модулация на сигналната трансдукция в туморните клетки
- B. Антивирусна активност

VI. Заключение

VII. Приноси

- 1. Приноси с оригинален характер
- 2. Методичен принос
- 3. Приноси с потвърдителен характер

VIII. Библиография

Използвани съкращения

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

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

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

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

I. Литературен обзор

1. Фитотерапия и кратка история на канабиноидите

Използването на лекарствени растения в медицината може да се проследи още от праисторическите времена. Древните народи са използвали растения за лечение на различни заболявания, а някои народи дори са създали организирани системи, съдържащи списък на растенията заедно с техните лечебни свойства (Fabricant et al., 2001). В днешно време е установено, че лечебните действия на растенията произтичат от съдържащите се в тях активни вещества. Тези вещества са се развили в продължение на милиони години, притежавайки уникално химическо разнообразие и множество биологични ефекти. Първият успешен опит за химично изолиране на активни вещества от растение е направен в началото на 18 век, когато алкалоидите, кодеин и морфин са изолирани от сънотворният мак (*Papaver somniferum*). Това е поставило основата на метода за откриване на нови лекарствени продукти чрез изолиране на активни субстанции от растенията. Изолирането на различни вещества с непознати свойства става все по-осъществимо с напредването на технологиите и създаването на съвременни техники за разделяне.

Канабисът (*Cannabis L.*), документиран за първи път около второто хилядолетие пр. Хр., е бил широко известен от Близкия изток чак до Китай заради своите лечебни, и дори психоактивни свойства. Установени са 3 подтипа *Cannabis* - *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* Lam. и *Cannabis ruderalis* Janisch (McPartland JM., 2018). Понастоящем изследователите предлагат таксономичното класифициране на всички видове растения *Cannabis* да бъде обединено в един вид - *Cannabis sativa*, с множество хемотипове базирани на различията в химическата структура на растенията (Clarke RC & Merlin MD, 2016). Изследванията върху канабиса първоначално са започнати от учени, които са се интересували от неговите психоактивни свойства и поради тази причина фокусът на техните проучвания е бил да се определи кое негово вещество е отговорно за това. Така се установява, че има много уникални съединения в канабиса, с тясно свързани структури и физически свойства, наречени канабиноиди. С напредването на техниките за разделяне са били изолирани първите важни канабиноиди (ключови събития по-долу):

- Изолиране на първия растителен канабиноид (фитоканабиноид) канабинол (CBN) през 1899 г. (Wood et al., 1899) и изясняване на структурата му между 1932-1940 г. (Adams et al., 1941; Cahn et al., 1932).

- Изолиране на канабидиол (CBD) (Adams et al., 1941) през 1940 г. и изясняване на структурата му през 1963 г. (Mechoulam et al., 1963),
- Изолиране на делта-9-тетрахидроканабинол (Δ9-THC) и изясняване на структурата му през 1963 г. Δ9-THC е активното вещество, отговорно за психотропния ефект на канабиса (Gaoni & Mechoulam 1964).

През следващите години са били открити много други фитоканабиноиди (процес, който продължава и досега), но изолирането на споменатите по-горе привлича все повече внимание с техния медицински потенциал при различни състояния. Съдържанието на канабиноиди в продуктите от канабис може да варира значително въз основа на използвания сорт растения, техниките на отглеждане и вида на продукта (масло, хашиш, марихуана).

Фитоканабиноидите са група от 21-въглеродни или 22-въглеродни (в карбоксилирани форми) терпенови фенолни съединения, произведени от растенията канабис като вторични метаболити (Rock & Parker 2021; Thomas & ElSohly, 2016). Досега са изолирани и описани над 150 растителни канабиноида със съдържащи в най-високи концентрации: тетраhydroканабиолова киселина (THCA), канабидиолова киселина (CBDA), канабиолова киселина (CBNA), канабигеролова киселина (CBGA), канабихроменова киселина (CBCA) и канабинодиолова киселина (CBNDA) (Andre CM et al., 2016). CBDA е доминираща в индустриалния коноп (Aizpurua-Olaizola et al., 2016).

Едно предизвикателство, което все още предстои да бъде решено, е описанието на връзките между конкретен тип коноп (и специфични съотношения THC/CBD) и реакцията на тялото (както качествена, така иколичествени) по отношение на различни здравословни състояния.

2. Ендоканабиноидна система

2.1 Кратък общ преглед

Ендоканабиноидната система (ECS) е неотдавна открита сигнална система, състояща се от канабиноидните рецептори, CB1 и CB2; техните ендогенни липидни лиганди, ендоканабиноиди (eCBs), като N-арахидоноилетаноламин (анандамид, или AEA) и 2-арахидоноил-глицерол (2-AG), и свързаните с тях биосинтетични и разграждащи ензими (Rezende B et al., 2023). Канабиноидните рецептори CB1 и CB2 са G-протеин свързани рецептори (GPCRs). CB1

е бил открит благодарение на $\Delta 9$ -THC и идентифициран като основен подтип в мозъка, предимно в хипокампуса, базалните ганглии, церебелума и префронталния кортекс, където модулира множество физиологични функции, като емоциите, двигателната активност, познанието, паметта и апетита, ендокринни функции и др. Освен силно разпространени в централната нервна система (ЦНС) и с ниска до умерена експресия в периферията, CB1 рецепторите се наблюдават в съдовия ендотел, мастната тъкан, черния дроб и слезката, белите дробове, матката, тестисите, яйчниците и простата (Zou & Kumar, 2018). За разлика от CB1, CB2 рецепторите са силно експресирани в имунната система и участват в имунологичните функции, и ограничено разпространени в ЦНС, главно експресирани върху астроцитите и микроглията (Howlett et al., 2002; Van Sickle et al., 2005; Haspula & Clark, 2020). Активирането на всеки от канабиноидните рецептори води до инхибиране на аденилил циклазата, което от своя страна предизвиква намаляване на цитоплазмената концентрация на цикличен аденозин монофосфат (сAMP), затваряне на Ca^{2+} канали, отваряне на K^+ канали и стимулиране на протеин кинази, които играят ключова роля в множество сигнални пътища, включително в пътищата на митоген-активирана протеин киназа (MAPK), фосфоинозитид 3-киназа (PI3K) или циклооксигеназа-2 (COX-2) (Javid et al., 2016).

Ендогенните лиганди за канабиноидните рецептори са открити скоро след тяхното охарактеризиране. Двата основни и най-изследвани ендогенни лиганди, AEA и 2-AG, са производни на арахидоновата киселина, като се синтезират по-скоро в отговор на физиологични или патологични стимули, отколкото да се съхраняват във везикули (Sugiura et al., 2016; Mechoulam et al., 1995; Devane et al., 1992; Stella et al., 1997). Получени са от фосфолипидни прекурсори чрез активация зависима от активността на специфични фосфолипазни ензими (Piomelli et al., 2003). По-късно са открити редица други eCB лиганди, включително N-арахидоноилдопамин (NADA), N-арахидоноилглицеролетер (NAGE) и O-арахидоноилетаноламин (virodhamine) (Huang SM et al., 2001; De Petrocellis et al., 2009). Свърхпродукция на ендоканабиноиди, тригерирана от употреба на алкохол би могла да окаже влияние на функциите на сърдечно-съдовата система чрез CB1 сигнален път (Paloczi et al.; 2019).

AEA се свързва и с двата канабиноидни рецептора, като показва по-голям афинитет към CB1, отколкото към CB2. 2-AG, изолиран през 1995 г., се открива във високи концентрации в ЦНС и се свързва и към двата CB рецептора с висока ефикасност (Ezzili et al, 2010). AEA и 2-AG не споделят еднакви биосинтетични и метаболитни пътища. Различни пътища могат да доведат до синтез на AEA от фосфолипидния прекурсор N-арахидоноилфосфати-

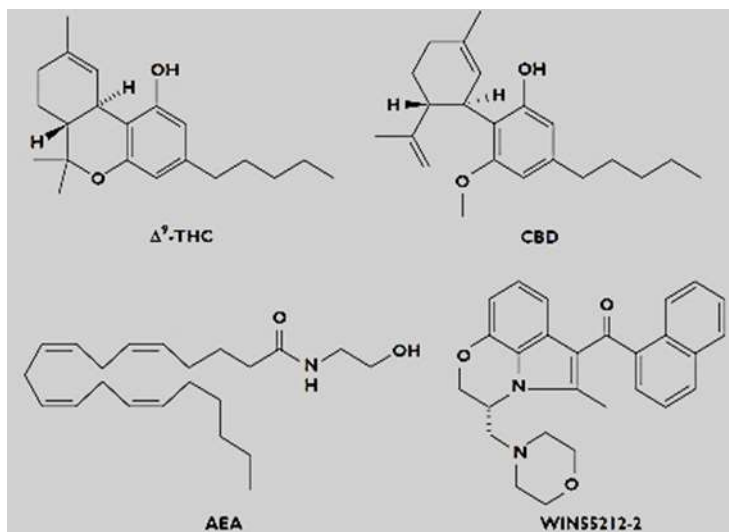
дилетаноламин, като най-важно е директното изменение, катализирано от N-ацилфосфатидилетаноламин-селективната фосфодиестераза. 2-AG се синтезира главно чрез активиране на фосфолипаза C и последващо производство на диацилглицерол, който се превръща в 2-AG чрез диацилглицерол липаза. След повторното си поглъщане AEA се инактивира от мембранно-свързана amidхидролаза на мастните киселини (FAAH) като се получава арахидонова киселина и етаноламин, докато 2-AG се метаболизира предимно от моноацилглицерол липаза, което води до образуването на арахидонова киселина и глицерол (Di Marzo et al., 2007). Обобщено, ензимите, които участват в синтеза и разграждането на ендоканабиноиди играят незаменима роля в клетъчната сигнализация (Ramer et al., 2019).

Както eCBs, така и екзогенните канабиноиди могат да взаимодействат и с други типове GPCRs – „сираци“, не-CB1/CB2 рецептори, каквито са GPR55 (Ryberg et al., 2007) и GPR18, открити в съдовете, мозъка и имунните клетки (Morales et al., 2017). GPR55 модулират имунните и възпалителни процеси. GPR18 се експресират в мозъчния ствол, хипоталамуса, тестисите, слезката и са локализираны по клетъчната мембрана и по макрофагите и микроглията, за да модулират по-нататъчната сигнализация (Senn et al., 2020). Също така, AEA може вътреклетъчно да активира потенциалния ванилоиден рецептор тип 1 (TRPV1), за разлика от 2-AG, който го активира много слабо (Ross et al., 2003). Активираният TRPV1 медирает усещането за болка и възпалителна термична хипералгезия, предизвикана от тъканно увреждане; играещи съществена роля при състояния на хронична болка (Thiel et al., 2018). Съществуват и данни, че двата основни eCB (AEA и 2-AG) активират PPAR- α и PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptors) нуклеарни рецептори и по този начин контролират експресията на гени, участващи в метаболизма и възпалителния отговор (Zou & Kumar, 2018; O'Sullivan et al., 2007; Pertwee et al., 2010).

Множествената склероза (MS) и други неврологични заболявания, увреждането на гръбначния мозък, остеопороза, невропатичните болки, различни неоплазии, атеросклероза, инсулт, инфаркт на миокарда, хипертония, глаукома, и метаболитен синдром са само някои от заболяванията, при които се наблюдават значителни промени в активността на ECS, като по този начин се проправя път за нови терапевтични възможности, насочени към възстановяване на нормалното ѝ функциониране (Pacher et al., 2006).

Понастоящем терминът „канабиноиди“ се отнася за различни хидрофобни съединения включващи ендоканабиноиди, фитоканабиноиди (Appendino et al., 2011), както и синтетични

съединения (JWH133, WIN55212-2, SR141716), които пряко или косвено взаимодействат с ендоканабиноидните рецептори (фигура 1).



Фигура 1. Химична структура на Δ^9 -тетрахидроканабинол (Δ^9 -THC), канабидиол (CBD), анандамид (AEA) и WIN55212-2.

Фармакологичното моделиране на ECS чрез прилагане на фито- или синтетични канабиноиди е обещаваща терапевтична стратегия в лечението на мускулната спастичност при MS и СПИН-асоцираната загуба на тегло, както и в лечението на невропатичната болка и подпомагането на палиетивните грижи (напр. стандартизиран екстракт nabiximols/Sativex[®] или синтетични nabilone/Cesamet[®] и dronabinol/Marinol[®]). Доказани са също синергични взаимодействия на канабиноиди с терпени и флавоноиди, произведени от *Cannabis*. Известно е, че терпените модулират фармакокинетиката на THC като повишават пропускливостта на кръвно-мозъчната бариера (BBB) и трансдермалната абсорбция на приложените вещества (Śledziński et al., 2020). Съотношението между терпеноиди и фитоканабиноиди може значително да подобри потенциалната медицинска терапия (Namdar et al., 2019). Вторичните метаболити могат да повлияят на афинитета на THC към CB1 рецептора и той да взаимодейства с невротрансмитерните рецептори, което предполага влияние върху психоактивните ефекти на канабиноидите. Флавоноидите също могат потенциално да повлияват на фармакокинетиката на THC чрез инхибиране на цитохром P450.

2.2 Ендоканабиноидна система при тумори

Промените в нивата на експресия и активността на ECS, наблюдаващи се при канцерогенеза, не формират последователни модели и варират значително при различните видове карциноми. В зависимост от засегнатата тъкан, ECS би могла съществено на участва в прогресията на туморите или в тяхната превенция, играейки ролята на терапевтичен прицел (Fraguas-Sánchez et al., 2018). Повишената експресия на CB рецептори и на концентрацията на eCBs е била наблюдавана при много тумори (карциноми на кожата, простатата и дебелото черво, хепатоцелуларни карциноми, ендометриален сарком, аденом на хипофизата, Ходжкинов лимфом и др.), но това не винаги корелира с експресията на канабиноидните рецептори в тъканта на произход на тумора (Pennant & Hinton, 2023).

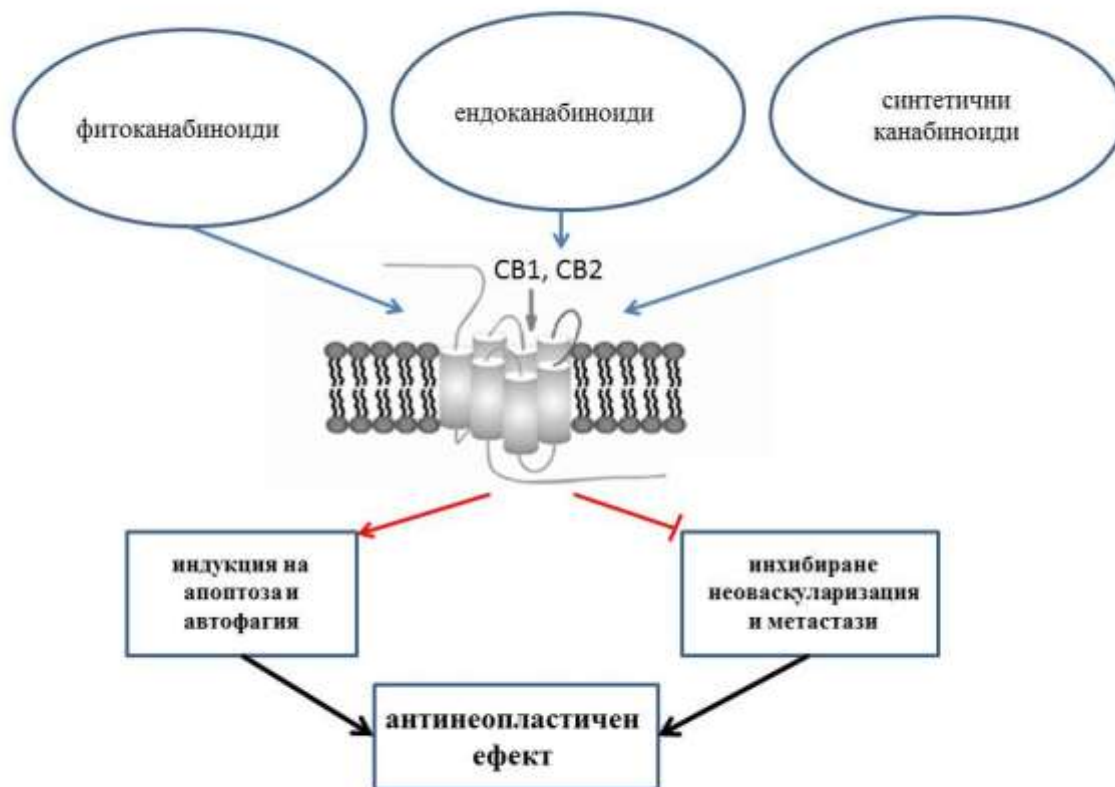
При карцином на простатата, млечната жлеза и панкреаса, повишените нива на CB2 съответстват на степента на малигненост на тумора. Увеличената експресия на CB2 при злокачествени тиреоидни лезии корелират също с наличието на метастази в лимфните възли и с по-висок риск от възобновяване на карцинома на щитовидната жлеза (Laezza et al., 2020). Освен това, CB2 е основният регулатор на ефектите на HER2 (рецептор на човешкия епидермален растежен фактор 2) онкогена и неговата свръхекспресия, които могат да доведат до повишена уязвимост към левкемия, индуцирана от вирусна инфекция (Pérez-Gómez E, et al., 2015). Нивото на експресия на CB2 рецептора има прогностична стойност при карциноми и неговата висока експресия се свързва с неблагоприятна прогноза за пациенти с HER2-положителен рак на гърдата и плоскоклетъчен карцином на главата и шията. Свръхекспресията на CB1 е свързана с лош клиничен резултат за пациентите с карцином на панкреаса, простатата, яйчниците и дебелото черво (Ramer et al., 2019). Висока експресия на CB1 рецептор също е открита в клетки от Ходжкинов лимфом. Knockout мишки с CB1/CB2 гена са показали значително намаляване на случаите на UV-индуцирани кожни карциноми (Zheng et al., 2008).

В човешки клетъчни линии от карцином на простатата (LNCaP, DU145, PC-3, CWR22Rv1) са били открити високи нива на експресия на CB1 и CB2 рецептори в сравнение неракови простатни клетки и PZ-HPV-7 клетки (Sarfaraz et al., 2005). GPR55 е намерен силно експресиран в клетъчни линии от лимфом на Ходжкин и клетки на неходжкинов лимфом (Pagano et al., 2021). Освен това, GPR55 рецепторът е силно експресиран в MDA-MB-231 клетки в сравнение с MCF-7 клетъчни линии от карцином на гърдата (Guindon & Hohmann, 2011).

Нивата на АЕА и 2-AG се откриват променени при много туморни тъкани, в сравнение със здравата тъкан. Така например, понижени нива на АЕА са установени при глиоми (Wu et al., 2012), докато други изследвания откриват повишаване на АЕА при глиобластоми и менингиоми (Petersen et al., 2005). При колоректален карцином и аденоматозни полипи пък са били открити по-високи нива и на двата основни eCBs (Ligresti et al., 2003). Друго изследване не установява повишаване на стойностите на АЕА при карцином на гърдата, за разлика от неговия прекурсор N-acylphosphatidylethanolamine, който е бил експресиран във високи нива (Gjerstorff et al., 2006).

3. Перспективи за приложение на канабиноиди при лечението на неоплазии

Понастоящем канабиноидите се използват при пациенти с неоплазии предимно за палиативно лечение на болката, загубата на мускулна маса или срещу повръщането, които често съпътстват туморите. Напоследък се наблюдава голям интерес в науката за изследване на противотуморния потенциал на канабиноидите. Има също значителен напредък в предклинични изследвания на канабиноиди върху неоплазии поради откриването на потенциална полза на тези съединения за прицелно унищожаване на малигнени клетки. Още през 1975 г. Munson и съавт. демонстрират, че прилагането на Δ^9 -THC, Δ^8 -THC и CBN подтиска растежа на туморни клетки от аденокарцином на белия дроб на Lewis при мишки, както *in vitro*, така и *in vivo* след пероралното им приложение (Munson et al., 1975). Интересът към противотуморните свойства на канабиноидите дори беше подновен след откриването на ECS и клонирането на специфичните канабиноидни рецептори. Оттогава е доказано, че някои канабиноиди проявяват антипролиферативни и проапоптотични ефекти при различни видове карциноми (на бял дроб, щитовидна жлеза, кожа, панкреас, матка, гърда, простата, колоректален карцином, лимфом и глиом), *in vitro* и *in vivo* (Bifulco et al., 2002, 2006, 2008; Blazquez et al., 2006; Carracedo et al., 2006; Cianchi et al., 2008; Galve-Roperh et al., 2000; Irrera N et al., 2021; Fraguas-Sánchez Al. et al., 2018; Sooda K et al., 2023). Нещо повече, в момента се разкриват нови антитуморогенни механизми на канабиноидите (фигура 2), показващи способността им да пречат на неоваскуларизацията на тумора, миграцията на малигнените клетки, адхезията, инвазията и метастазирането им (Pagano C et al., 2021; Freimuth N et al., 2010).



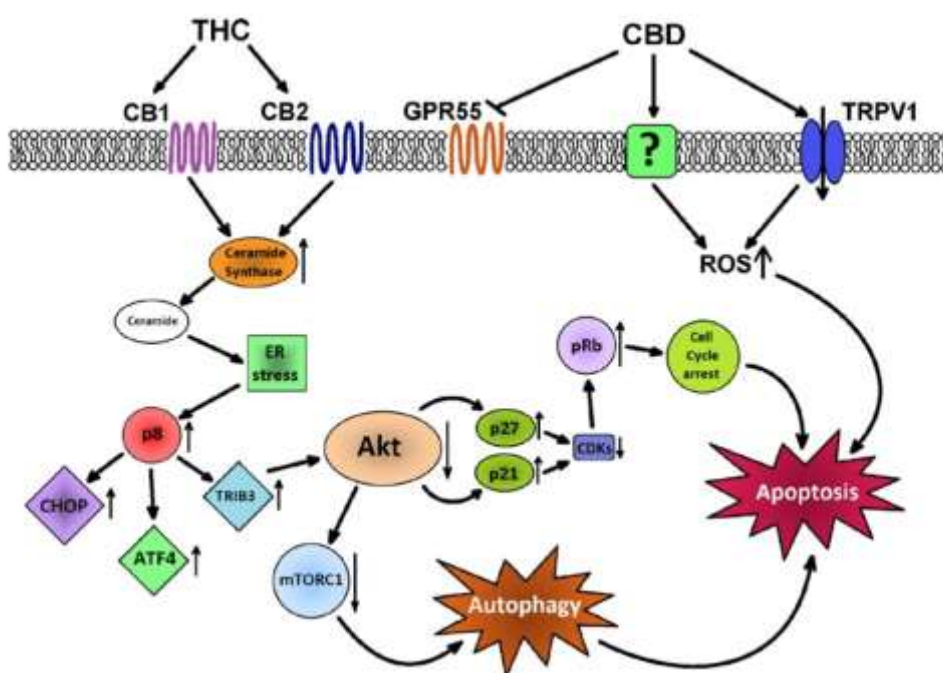
Фигура 2. Схематично представяне на антинеопластичния ефект на канабиноидите

eCBs модулират екстрацелуларната сигнал-регулирана киназа (ERK), p38 MAPK и серамидните пътища при глиоми и карциноми на гърдата, простата и ректума (Yang et al., 2019). AEA селективно индуцира ER стрес-медирана апоптоза при клетки от немеланомен рак на кожата (NMSC), които свръхекспресират COX-2. Вероятно, AEA проявява цитотоксични ефекти от новия простагландин, 15d-PGJ2-EA, който е синтезиран като следствие на метаболизма на AEA от COX-2. Освен това, апоптозата, индуцирана от AEA е също регулирана от оксидативния стрес, частично медиран от намаляване на нивата на общия глутатион. По този начин клетъчната смърт на NMSC туморни клетки вероятно се регулира от превръщането на AEA в 15d-PGJ2-EA, който намалява вътреклетъчните нива на глутатион, водещо до индуциране на оксидативен стрес, ER стрес и в крайна сметка до апоптоза (Garcia-Arencibia et al., 2019; Soliman & Van Dross, 2016).

Има доказателства, че агонистите на канабиноидните рецептори стимулират апоптоза на глиомни клетки чрез индуциране на *de novo* синтез на серамидни съединения – сфинголипиди, които имат проапоптотични свойства (Gómez del Pulgar et al., 2002). Натрупването на

серамиди активира сигналните пътища свързани с ER стрес чрез зависим от активирането на СВ рецепторите начин (Cinar et al., 2014). По подобен механизъм, CBD проявява цитотоксичност при карцином на панкреаса чрез свъхрегулация на серамид-синтаза 1 и ER стрес (Mangal et al., 2024).

Активирането на сигналния път, регулиран от p8 протеина, води до инхибиране на протеин киназа B (Akt) от TRIB3 (tribbles pseudokinase 3), което от своя страна потиска активността на таргета за рапамицин комплекс 1 (mTORC1) при бозайници, и като краен резултат се стига до автофагична клетъчна смърт (фигура 3) (Velasco et al., 2012).



Фигура 3. Схематично представяне на механизмите, отговорни за индуцирането на апоптоза от канабиноиди. CBD, канабидиол; THC, А9-тетрахидроканабинол; CB1, канабиноиден рецептор 1; CB2, канабиноиден рецептор 2; TRPV1, рецепторен потенциален канал подсемейство V член 1; GPR55, сирак G-протеин свързан рецептор 55; ROS, реактивни кислородни видове; ER, ендоплазмен ретикулум; p8, протеин p8 (ядрен протеин 1, NUPR1); CHOP, ССААТ/усилвател-свързващ протеин-хомоложен протеин; ATF4, активиращ транскрипционен фактор 4; TRIB3, трибъл псевдокиназа 3; Akt, протеин киназа B; mTORC1, мишена на рапамицин С1 при бозайници; p21, циклин-зависим киназен инхибитор 1; p27, циклин-зависим киназен инхибитор 1B; CDK, циклин-зависима киназа; pRb, протеин на ретинобластом.

Доказано е, че автофагията предхожда апоптозата в каскадата от процеси, свързани с клетъчна смърт, които се задействат от канабиноиди. Инхибирането на автофагията от прилаганите канабиноиди предотвратява индуцирането на апоптоза, докато инхибирането на апоптозата предотвратява клетъчната смърт, но не и автофагията. Взаимодействие на канабиноидите с СВ рецепторите може да предизвика автофагия *in vitro* при глиомни, меланомни и карциномни (от черен дроб, простата и панкреас) клетъчни линии (Armstrong et al., 2015; Salazar Met al., 2013; Vara et al., 2011).

Предложени са и други механизми, които допринасят за процеса на канабиноид-индуцирана клетъчна смърт в някои клетъчни линии. При хепатоцелуларен карцином, канабиноид-индуцирания ER стрес може да доведе до активиране на AMPK (аденозин монофосфат активирана протеин киназа) и калций/калмодулин-зависима протеин киназа киназа 2 (CAMKK2), което също се счита за фактор, водещ до автофагична клетъчна смърт (Armstrong et al., 2015).

При експерименти върху клетки от карцином на гърдата и меланомни клетки, канабиноид-индуцираното подтискане на Akt киназата води до активиране на p21 и p27 протеините, които от своя страна инхибират циклин-зависими кинази (CDK), водещо до фосфорилиране на ретинобластом протеина (RB1) и в крайна сметка до спиране на клетъчния цикъл и индуциране на апоптоза (Caffarel et al., 2006; Blázquez et al., 2006). Подобни резултати са получени и при клетки от карцином на простатата. Прилагането на канабиноида WIN 55,212-2 е довело до активиране на p27 протеина, инхибиране на CDK, и фосфорилиране на RB1, с подобно спиране на клетъчния цикъл и индуциране на апоптоза. При глиоми и карцином на простатата намаляването на активността на Akt би могло да инхибира фосфорилирането на Bcl-2-асоциирания промотор на смъртта (BAD) протеин, проапоптотичен член на B-клетъчната фамилия протеини на лимфом-2 (Bcl-2), което допълнително допринася за започване на апоптоза (Ellert-Miklaszewska Aet al., 2005). При колоректални карциномни клетъчни линии, THC чрез активиране на CB1 инхибира PI3K/Akt и RAS-MAPK/ERK сигнални пътища, а при човешки Jurkat левкемични T-Lym, THC инхибира ERK и Akt сигнализацията (Pagano et al., 2021). Има публикувани данни, че при лимфоидни клетки като Jurkat, третирането с канабидиол води до G2/M арест и понижени нива на фосфорилиране на mTOR, Akt и S6 сигнални протеини, свързани с оцеляването и клетъчният размер (Kalendaroglou N et al., 2017).

За канабиноидите с нисък афинитет към СВ рецепторите (т.е CBD) се предполага, че техният механизъм е свързан със стимулиране продукцията на свободни радикали, което води до клетъчна смърт чрез автофагия (фигура 3) (De Petrocellis et al., 2013; Shrivastava et al., 2011). Много изследвания до момента предполагат, че механизмът на действие на CBD и други непсихоактивни канабиноиди не е свързан с директното активиране на канабиноидните рецептори. Има изследвания, показващи ролята на взаимодействията на тези канабиноиди с други типове рецептори, като GPR55, TRPV1 или TRPM8 (преходен рецепторен потенциален катионен канал подсемейство М член 8). Например, доказано е, че противотуморния ефект на CBD и CBG е частично свързан с тяхната антагонистична активност към TRPM8 рецепторите (Borrelli F et al., 2014). Но от друга страна, при определени обстоятелства CBD може да индуцира апоптоза на туморни клетки, поне отчасти, чрез пряко или индиректно взаимодействие с CB2 рецептора (Ligresti A et al., 2006).

Отличителният белег на туморните клетки е способността им да се размножават, въпреки липсата на митогенни сигнали. Растежът на солидни тумори зависи от образуването на нови съдове. Затова, повлияването на неоангиогенезата е един от най-обещаващите терапевтични подходи срещу неоплазиите. В туморни клетки, канабиноидите могат да блокират активирането на пътя на съдовия ендотелен растежен фактор (VEGF), който е индуктор на ангиогенеза. По-специално, различни молекули от тази каскада, като главният лиганд VEGF и активните форми на основните му рецептори (VEGFR1 и VEGFR2) се потискат след прилагане на канабиноиди при кожни карциноми, глиоми и карциноми на щитовидната жлеза (Bifulco et al., 2007).

Има доказателства, че канабиноидите проявяват антинеопластични свойства и като инхибират миграцията и инвазивния капацитет на туморните клетки. Така, прилагането на канабиноиди намалява образуването на отдалечени тумори маси при животински модели и инхибира адхезията, миграцията и инвазивността на туморни клетки от глиоми и карциноми на гърдата, белия дроб и цервикалния канал в *in vitro* култури. Тези ефекти зависят, поне отчасти, от модулацията на извънклетъчните протеази (MMP-2) (Blázquez C, et al., 2008) и техните инхибитори, като тъканни инхибитори на матриксни металопротеинази 1 (TIMP-1) (Ramer et al., 2012). TIMP-1 е ключовият анти-инвазивен фактор при тумори. Наблюдавано е, че фармакологичното инхибиране на биосинтезата на серамид премахва антитуморния и антиангиогенния ефект на канабиноиди в глиомни ксенотрансплантати и намалява производство на VEGF от глиомни клетки *in vitro* и *in vivo*. Освен това, блокирането на

биосинтезата на серамид и премахването на р8 гена в същото изследване е доведено до предотвратяване на инхибирането на експресията на MMP-2, индуцирана от THC при инвазия на глиомни клетки (Blázquez et al., 2008).

Въпреки че Δ9-THC има най-мощен противотуморен потенциал, клиничната му употреба е ограничена поради нежеланите психоактивни ефекти. Поради тази причина интересът към непсихоактивните фитоканабиноиди, като CBD, значително се увеличава през последните години.

4. Проблеми свързани с прилагане на CBD

Нарастващата употреба на канабис за нерекреационни цели поражда необходимостта от стандартизирани и одобрени перорални лекарствени продукти от растението канабис. Оралният път на приложение на канабиноидите е най-удобен за пациентите, но има ниска и нестабилна резорбция (Ohlsson A et al., 1980). Липофилните съединения като THC и CBD са слабо разтворими във водната среда на стомашно-чревния тракт, което е необходимо за оптимално усвояване на лекарството. Освен това липофилността на тези молекули предизвиква силно изразен метаболизъм при първо преминаване през черния дроб (first pass effect). Такъв е случаят с THC, който претърпява екстензивен метаболизъм във фаза I, и CBD, който е податлив, както на окисление (фаза I), така и на глюкурониране (фаза II) (Chayasirisobhon S, 2020; Grotenhermen F, 2003; Huestis MA, 2007).

Системите за доставка на базата на липиди (под формата на нанолипосфери и матриксни желатинови пелети) се използват като платформа за орално приложение на фитоканабиноиди през последните две десетилетия (Atsmon J et al., 2018; Cherniakov I et al., 2017).

При изследване приемането на хиломикрони THC и CBD от различен произход е установено, че и за двете съединения приблизително 70% от дозата е свързана с тях (Zgair A et al., 2017; Franco V et al. 2020). Gershkovich и Hoffman през 2005 г. предлагат модел, свързващ процента на асоцииране с хиломикроните с процента на дозата, която претърпява лимфна абсорбция. Според този модел THC и CBD имат относително висок процент на асоцииране с лимфната абсорбция в сравнение с други липофилни лекарства. В крайна сметка около 20% от дозата може да бъде пренесена през лимфната система и да избегне екстензивният чернодробен метаболизъм, към който съединенията са склонни (Gershkovich P & Hoffman A, 2005).

Успешното доставяне на лекарството до предвидените прицелни места на действие зависи от множество фактори, включително физиологията на индивида и физико-химичните свойства на лекарството (разтворимост, стабилност, пропускливост и метаболизъм). Лошата бионаличност, която зависи от тези фактори обикновено води до недостатъчна терапевтична ефикасност и е по-вероятно да доведе до висока индивидуална вариабилност във фармакокинетичните параметри (Hellriegel ET et al., 1996). В този контекст, бионаличността на CBD варира значително в зависимост от мястото и начина на приложение (Huestis MA, 2007; Liu Z & Martin JH et al., 2018).

Коефициентът на разпределение масло/вода (Log P) описва предпочитание на лекарството, което съществува или във водната, или в маслената част на емулсията. Повисоките стойности на Log P означават, че по-голяма част от веществото ще бъде разпределено в маслената част на емулсията. Поради силно липофилната природа на CBD (Log P 6.3) (Odi et al., 2020), който е практически неразтворим във вода (Ladha KS et al., 2020) и на THC (Log P 9.44) (Thomas BF et al., 1990), те се предлагат най-често като маслена или алкохолна формула или в меки гел капсули, колоидални и липидни емулсии, сублингвални капки или като оромукозен спрей (Rebibo L et al., 2022).

Проучвания при хора във фаза I, изследващи пероралното и оромукозно доставяне на CBD и THC при еквимоларни концентрации, показват висока между/интра-индивидуална вариабилност (Stott CG et al, 2013; Guy G & Robson P, 2003).

Силно липофилните лекарства, доставени през устата като разтвор, могат да се утаят в стомашно-чревния тракт, което води до по-ниска скорост на резорбция от елиминирането им (Huestis MA, 2007). Оралната бионаличност на CBD се оценява на 6%, въпреки, че данните в тази област са оскъдни (Millar SA et al., 2018). Времето за достигане на пикова плазмена концентрация след перорално приложение е бавно (1–4 часа). Максималната концентрация (C_{max}), генерирана от перорално доставен 10 mg CBD, напръскан върху гранулирана лактоза и капсулиран в мека желатинова капсула, е 2.4 ng /ml CBD, а плазменният полуживот (t_{1/2}) на CBD се отчита на 1.4-10.9 часа след прилагането му като оромукозен спрей (Taylor L et al., 2018; Guy G & Robson P, 2003; Millar SA et al., 2018). Такива лекарствени продукти са: Epidiolex®, който се прилага орално като маслен разтвор и Sativex® (смес от THC и CBD) като оромукозен спрей. Оромукозният път на въвеждане на CBD заобикаля first-pass ефекта, наблюдаван при оралния път на приложение, както и осигурява по-бързо начало на

действието му. Въпреки това, Constantin Itin и сътр. предполагат, че значителна част от доставената чрез оралната мукоза доза може действително да се резорбира през стомашно-чревния тракт (Itin C et al., 2019). Авторите отбелязват също и, че фармакокинетиката на Sativex® е различна, когато се прилага на гладно, в сравнение с приложението му след хранене (както е при Epidiolex®). Това обаче не би трябвало да е така, тъй като фармакокинетичните показатели трябва да бъдат значително повлияни от храната, само когато лекарството се приема орално. Освен това, в проучванията на Guy и Robson, фармакокинетичните параметри на Sativex® са сходни при двата начина на прилагане - оромукозен и орален (Guy G & Robson P, 2003). Тези наблюдения са в съответствие с по-нататъшните изследвания на Itin и сътр., които демонстрират, че липофилните свойства на CBD водят до натрупването му в устната лигавица или до попадането му в стомашно-чревния тракт след поглъщане (Itin C et al., 2020). Въпреки това, авторите предполагат, че този метод на приложение все пак е приложим, ако има достатъчно време за контакт с лигавицата на устната кухина и начин да се предотврати измиването на лекарството от слюнката.

Приемането на CBD с богата на мазнини или висококалорична храна може потенциално да повиши оралната му бионаличност (Itin C et al., 2019). Изследвания върху здрави индивиди показват, че бионаличността се увеличава приблизително четири пъти, когато се консумира с храна в сравнение с прием на гладно. По подобен начин, пациенти с резистентна епилепсия имат значително повишение на бионаличността с 4 до 14 пъти, когато CBD се приема с храна, измерено чрез площта под кривата (AUC) и Cmax (Birnbaum AK et al., 2019; Stott CG et al., 2013; Taylor L et al., 2018). Този ефект може да се отдаде на образуването на мицели и хиломикрони, които могат да увеличат наличното количество вещество за лимфен транспорт (Porter CJ et al., 2007; Zgair A et al., 2016). Освен това храните с високо съдържание на мазнини могат да намалят функцията на ефлуксните транспортери на повърхността на чревните клетки и да предизвикат отделяне на жлъчка, което допълнително възпрепятства активността на транспортерите (Wu CY & Benet LZ, 2005; Ingels F et al., 2004).

Въпреки че, лимфният транспорт заобикаля черния дроб и системното кръвообращение, CBD приет орално все още е предмет на чернодробен метаболизъм при първото му преминаване. Проучване при здрави доброволци установи, че AUC на метаболита на CBD, 7-хидрокси-канабидиол (7-OH-CBD), е около 40% в сравнение с CBD, приет перорално, въпреки че участниците в това проучване са лекувани и с други лекарства, като Clobazam, валпроати и Stiripentol (Morrison G et al., 2019).

Нарушеният чернодробен метаболизъм е свързан с повишена бионаличност на CBD, което означава, че first-pass ефектът представлява значително предизвикателство за оптимизиране на усвояването на орално приемания CBD (Taylor et al., 2018).

Инхалирането на CBD чрез пушене или вапоризация може да реши някои от проблемите, свързани с неговото доставяне. След пушене на 20 mg диутериево-маркиран CBD, бионаличността му при петима участници е отчетена на $31 \pm 13\%$ (в диапазона от 11–45 %) (Ohlsson A et al., 1986). Пушенето осигурява бързо усвояване на CBD, като най-високите нива в кръвта са регистрирани в рамките на 3 минути след инхалация (110 ± 55 ng/mL). Друго наскоро направено изследване, което анализира фармакокинетиката на вапоризиран CBD (100 mg) при шест здрави мъже и шест здрави жени, показва средна C_{max} от 125.4 ng/mL \pm 95.2 при мъжете и 83.7 ng/mL \pm 8.8 при жените (Spindle TR et al., 2020). Това изследване също сравнява вапоризирания CBD с орално приетия в същата доза и установява, че вапоризацията довежда до около десеткратно увеличение на C_{max}. Въпреки че, вапоризацията подобрява бионаличността на CBD, значителните вариации в данните предполагат, че начинът, по който тялото обработва веществото може значително да варира между различните хора. Освен това разтворителите, необходими за направа на лекарствена форма подходяща за вапоризация, могат да дразнят дихателните пътища, което прави този начин на въвеждане на CBD неподходящ при пациенти с алергични белодробни заболявания.

Проучват се и няколко алтернативни метода на прием, които заобикалят храносмилателната система и first-pass ефекта, като трансдермални пластири, назален спрей и капки за очи (Cheng A, et al., 2024; Rebibo L et al., 2022; Bruni N et al., 2018).

Стабилността на CBD може да бъде засегната от фактори на околната среда като слънчева експозиция и повишена температура, които водят до неговото окисление и деградиране (Bini A et al., 2024; García-Valverde MT et al., 2022; Millar SA et al., 2020). В изследванията си, Carlo Mazzetti и неговият екип са проучили тринадесет комерсиални течности на CBD за електронни цигари и са установили, че излагането на светлина и престоя на стайна температура причинява 13% деградация за период от 30 дни. За сравнение, когато се поставяни на тъмно и при стайна температура, деградацията е била само 4%, което сочи значителната роля на светлината в разграждането на CBD при тези условия (Mazzetti C et al, 2020; Schwarzenberg A et al, 2022). Друго изследване показва, че пробите на CBD, съхранявани на тъмно при стайна температура за три месеца, са показали следи от примеси

на Δ^9 -THC и Δ^8 -THC (Jaidee W et al., 2022). Не е ясно обаче, дали различните формулировки променят стабилността на продуктите на CBD.

Друго проучване посочва, че CBD в масло от средно верижни триглицериди (MCT) не показва продукти от окисление на липиди, което предполага, че MCT маслото е по-устойчиво на оксидативно разграждане в сравнение с рапично или конопено масло. Нещо повече, наноемулсия базирана на дълговерижни триацилглицерид (LCT), е по-добра от аналога, базиран на MCT (Zheng H et al., 2022). Оксидативните реакции могат да доведат до липидна пероксидация, намаляване на концентрациите на канабиноиди и терпени. Съобщава се, че Epidiolex® (в сусамово масло и етанол) и Sativex (в безводен етанол, пропиленгликол и масло от мента) остават стабилни, съответно 56 и 48 дни след отварянето на опаковката (вижте указанията в официалния уебсайт).

5. Иновативни лекарство-доставящи системи

5.1. Полимерни носители

Полизахаридите са често използвани естествени полимери с ниска цена, които могат да бъдат модифицирани, за да отговарят на специфични нужди. По принцип, полизахаридите са нетоксични, биосъвместими и биоразградими и поради това са намерили широко приложение като компоненти в хранителни, биомедицински, фармацевтични и здравни продукти (Alvarez-Lorenzo C et al., 2013; van Dam JEG et al., 2017). Поради риск за околната среда нарастват усилията на академичните среди и промишлеността за замяна на естествените полимери със синтетични.

Атрактивно поле, предлагащо големи възможности за използване на полизахариди, е проектирането и производството на усъвършенствани системи за доставка на лекарства (Dragan ES & Dinu MV 2019; Barclay TG et al., 2019; Layek B & Mandal S, 2020). По-специално, наличието на много функционални групи в полизахаридни макромолекули позволява тяхното физическо или химично омрежване във водна среда и получаването на полимерни хидрогели. Всъщност, голямо разнообразие от полизахаридни хидрогели, вариращи от наноразмерни до макроскопични системи, са широко проучени като носители, както на хидрофилни, така и на липофилни биоактивни вещества. Например, гуарова гума сукцинат-натриеви алгинатни хидрогелни мъниста са подготвени специално за доставяне на лекарствата в дебелото черво (Seeli DS & Prabaharan M, 2016). Зърната притежават по-висока

степен на набъбване при рН 7.4, отколкото при рН 1.2 поради наличието на анионни групи в полимерните вериги. Набъбването, зависещо от рН, благоприятства по-изразеното освобождаване на Ibuprofen при рН 7.4, отколкото при рН 1.2. Maria Valentina Dinu et al. са използвали хидрогели на основата на хитозан, съдържащи клиноптилолит, за контролирано освобождаване на натриев Diclofenac и Indomethacin (Dinu MV et al., 2016). Установено е, че доставянето на лекарство се извършва предимно във фосфатен буферен разтвор (рН 7.4), в сравнение със симулирана стомашна течност (рН 1.2). Алгинатните/хитозановите хидрогели, съдържащи алгинатни гелоподобни микросфери, са разработени за доставяне на протеин (Xing L et al., 2019). Капсулирането на говежди серумен албумин в микросфери, вградени в хидрогела, води до значително по-ниска скорост на освобождаване от контролния хидрогел или само от микросфери. Трябва да се отбележи и че, значителен дял хидрогелни носители, особено макроскопични, притежават супер-макропореста морфология. Това не е изненадващо, защото огромните пори позволяват безпрепятствена дифузия на биоактивни молекули, когато те се освободят от матрицата. Предимството на супер-макропорестите хидрогели е илюстрирано от Im и Kim (Im P & Kim J, 2018). Същите автори са разработили системи за доставяне на макромащаб, отговарящи на близки инфрачервени лъчи (NIR) и базирани на алгинатен криогел с вградени златни нанороди (GNR) за точно контролирано освобождаване при поискване на химиотерапевтичното средство Mitoxantrone. Следователно, трансдукцията на NIR светлинна енергия към топлина се използва, за да предизвика бързо повишаване на температурата в дадена област, нарушавайки йонните връзки между полимерни и лекарствени молекули. В резултат на това, бързо освобождаване на медикамента може да се постигне при поискване.

Неотдавна публикувана от колектив на фармацевтичен факултет, София, статия демонстрира предимствата на нанокмпозитни супер-макропорести криогели, базирани на хидроксипропил целулоза (HPC) и стабилизирани полимерни ядро-обвивка мицели (SPM), за локално доставяне на хидрофобни лекарства като Curcumin (Pencheva V et al., 2018). В това проучване нанокмпозитните криогели първо се приготвят чрез фотохимично омрежване на HPC в присъствието на празен SPM при криогенни условия, а след това куркуминът се зарежда в носителите. Включването на хидрофобни мицеларни домейни в хидрогелната матрица се счита решаващо за ефективното разтваряне и продължителното освобождаване на куркумин.

CBD като непсихоактивен канабиноид привлича все по-голям интерес поради терапевтичният си потенциал за лечение на невропатична болка, възпаление, множествена склероза, поради антинеопластични свойства и др. (Seltzer ES et al, 2020; Voicu V et al, 2023). CBD обаче е липофилно съединение с незначителна стомашно-чревна резорбция, което предполага и относително ниска орална бионаличност (Grotenhermen F, 2003). Допуска се, че трансдермалното доставяне на CBD може да осигури по-високото му ниво в кръвта, тъй като се избягва first pass ефекта, срещан при перорално прилагани лекарства (Hammell DC et al., 2016). Освен това, трансдермалното приложение на CBD увеличава продължителността на лекарственото му действие в сравнение с всички други начини на приложение (Filipiuc SI et al., 2023; Grotenhermen F et al., 2004). Това е благоприятно за пациенти с хронична болка и други заболявания, изискващи продължително лечение. Други изследователи, като Paudel et al. оценяват и сравняват интраназалната и трансдермалната резорбция на CBD с и без подобрители като използват морски свинчета (Paudel KS et al., 2010). Те откриват, че CBD осигурява значителни плазмени нива след локално приложение под формата на гел при морски свинчета. Освен това, отчитайки факта, че концентрацията на CBD започва да намалява приблизително 6 часа след отстраняване на гела, авторите предполагат възможен депо-ефект на кожата. Те приписват това явление на липофилните свойства на CBD, които улесняват преминаването му през роговия слой на кожата, но затрудняват преминаването през хидрофилната дерма. За да се подобри трансдермалното доставяне на CBD, са разработени системи, съдържащи наноразмерни носители, каквито са етозомите (Lodzki M et al., 2003). Също така, проучвания за кожно биоразпределение показват превъзходството на колоидните системи при доставянето на CBD до епидермиса и горната и долна папиларна дерма, които са целевите места за лечение на някои дерматологични състояния (псориазис, атопичен дерматит и др.) (Lapteva M, 2024).

Затова, локалното приложение и трансдермалният и трансмукозен път на доставяне на CBD са обещаващи пътища на въвеждане, като все още се търсят най-успешните формулировки на базата на този канабиноид, целящи най-висока ефективност на продуктите.

6. Терапевтично резистентни тумори

6.1 Тройно-негативен карцином на гърдата

Тройно-негативният карцином на гърдата (TNBC) се нарича така, защото е отрицателен и за трите рецептора: естрогенния рецептор (ER), прогестероновия рецептор (PR) и хормоналния епидермален растежен фактор (EGF) рецептор-2/neu (HER-2) (Crown Jet al., 2012). Липсата на трите рецептора означава, че растежът на този тумор не се поддържа хормонално от естроген или прогестерон, или от наличието на изобилие от рецептори за EGF от типа HER-2. При много случаи лечението на карцином на гърдата се насочва към някой от тези три рецептора и се осъществява чрез хормонална терапия. Липсата на експресия на тези рецептори прави този вид карцином труден за лечение. По-ранните стадии на TNBC могат да реагират добре на химиотерапия, но тя не винаги е ефективна. TNBC обикновено се лекува комбинирано чрез хирургична резекция, лъчетерапия и химиотерапия (McCarthy N et al., 2012). Въпреки това, лечението не винаги е успешно и съществува голям риск от рецидив на карцинома след лечение.

Около 10-20% от случаите на карцином на гърдата в САЩ са тройно отрицателни. Този тип карцином по-често засяга жени на възраст между 40 и 50 години, особено афро-американки, латино-американки или жени с BRCA-1 генна мутация (Worlax HE et al., 2024; Amirikia KC et al., 2011). Типична мутация, която може да причини тройно негативен карцином на гърдата, е мутацията в туморния супресорен ген BRCA1. Генът BRCA1 играе роля във възстановяването на увредената двойно-верижна ДНК и контролирането на клетъчната пролиферация и диференциация. Жени с такава мутация имат повишен риск от развитие на рак на гърдата. Наличие на мутация обаче в BRCA1 гена не означава, че TNBC ще се развие, но увеличава риска. Освен това не всички жени, които развиват TNBC имат тази специфична мутация. Съществуват и други неизвестни фактори, които също допринасят за развитието на TNBC (Lindeman GJ & Visvader JE, 2011).

TNBC показва тенденция да бъде по-агресивен от други видове карциноми на гърдата и е по-вероятно да метастазира и рецидивира, обикновено с лоша прогноза, като процентът на петгодишна преживяемост обикновено при него е по-нисък. За да повишат процента на петгодишната преживяемост, изследователите се опитват да намерят таргетни терапии за TNBC. В момента се разработват три потенциални имунотерапии. Едната таргетна терапия е с

инхибитор на Poly-ADP-рибоза полимераза (PARP), който да предотврати възстановяването на ДНК на карциномните клетки от ензима PARP. PARP1 действа върху едноверижна ДНК, за да я възстанови, когато настъпят прекъсвания. Ако PARP1 е инхибирана, ще да има увеличаване на прекъсванията в ДНК. Другият таргет е BRCA1 генът, който е необходим за възстановяване на двойно-верижната ДНК. Клетките с нефункционален BRCA1 обаче няма да могат да възстановят ДНК. Така, чрез инхибиране на PARP1, клетките с BRCA1 дисфункция трябва да станат нестабилни и да претърпят апоптоза, оставяйки зад себе си нормалните клетки (McCarthy N et al, 2012). Потенциално това може да направи химиотерапията по-ефективна след апоптоза на туморните клетки. Разработват се и средства за инхибиране на ангиогенезата. Такива медикаменти, като Bevacizumab и Sunitinib, са създадени да инхибират ангиогенезата и клетъчния растеж. Освен това се разработват средства, насочени към EGFR, за да се предотврати свръхекспресията на EGFR протеина. Изобилието от EGFR ще ускори растежа на карцинома. Затова, прицелна терапия към EGFR потенциално ще възпрепятства растежа на туморните клетки (Yin L, et al., 2020).

Въпреки многообещаващата имунотерапия, все още липсва стандартизиран терапевтичен режим при TNBC. Това е причина да се насочим към клетъчни линии от този карцином в настоящата експериментална работа.

6.2 Карцином на пикочния мехур

Немускулно-инвазивният карцином на пикочния мехур (NMIBC: стадии pTa/pT1/pTis) се характеризира с висока честота на рецидиви и риск от прогресия до мускулно-инвазивно заболяване (MIBC: стадии pT2+) (Babjuk M et al., 2011). Поради това продължителното наблюдение остава основният подход в дългосрочното управление, а цистоскопията представя златният стандартен диагностичен метод в продължение на повече от 80 години. Цистоскопичният метод обаче е, както инвазивен за пациентите, така и скъп за здравната икономика. Затова от десетилетия се търсят неинвазивни биомаркери за диагностика на този тумор, които биха могли дори да подобрят чувствителността и специфичността на цистоскопията. Съвременните насоки обаче не препоръчват използването на туморни биомаркери при лечението на пациенти с карцином на пикочния мехур [www.nice.org.uk/guidance/ng2/chapter/1-recommendations#diagnosing-and-staging-bladder-cancer-2]. Въпреки това, цитологичното изследване на урината често се използва като допълнение към цистоскопията, и докато визуалното откриване на туморни клетки в урината

е много специфичен и високо чувствителен тест за карцином на пикочния мехур с високостепенна дисплазия, чувствителността за карциноми на пикочния мехур с ниска или умерена дисплазия е само 4–31 % (Lotan Y & Roehrborn CG, 2003; Bieri U et al., 2023). По този начин всеки нов биомаркер може да се счита за полезен, ако той е по-добър от цитологичното изследване на клетки в урината, т.е. би показал много висока специфичност и чувствителност както при ниско-, така и за високо-диференциран карцином на пикочния мехур.

Много класове биомолекули са изследвани като биомаркери при този карцином, но по-голямата част от проучванията в литературата са анализирали и измервали специфични протеини в урината като потенциални индикатори за този карцином. Повечето разтворими протеини могат да бъдат надеждно измерени с помощта на нескъпи имуно-аналитични тестове. Те могат да бъдат бързи и качествени, или количествени на базата на лабораторни изследвания, но и в двата случая комплексните тестове за панел от протеинови биомаркери (ако такъв панел е дефиниран) трябва да бъдат относително лесни за прилагане.

Протеините, които ще се измерват при проучвания на биомаркери се избират въз основа на предварителни познания за биологията на карцинома или на конкретния белтък, или въз основа на профилиране на гена експресия и протеомни анализи на тъкан от карцином на пикочния мехур, клетъчни линии или дори самата урина. В повечето случаи измерванията се извършват с помощта на валидиран анализ, базиран на антитела, какъвто е ензимно-свързаният имуносорбентен анализ (ELISA). Надеждността на такива методи зависи от специфичността на изследваните антитела. Някои видове анализи, които разчитат на специфичността на едно антитяло, могат да бъдат по-податливи на неточности, отколкото „сандвич анализите“ (тези, които разчитат на специфичността на двойка антитела). Въпреки това, в много проучвания за биомаркери на рак на пикочния мехур, подборът на пациенти е по-обезпокоителен от използвания анализ. Това ще рече, „представяват ли пациентите (и контролите), използвани в проучванията, популацията от пациенти, където тестът за съответен биомаркер би бил приложен в реалния свят?“. В идеалния случай при проучвания на биомаркери за поставяне на диагноза трябва да се включат пациенти със съмнение за карцином на пикочния мехур, напр. пациенти с хематурия. Въпреки това, в много изследвания на биомаркери се виждат пристрастия, въведени чрез обогатяване с висококачествени тестове или напреднало заболяване, което има вероятност да увеличи привидната чувствителност (% случаи са правилно диагностицирани) и включване на здрави

доброволци, което може да завиши привидната специфичност (% контроли са идентифицирани правилно), или използването на пациенти с големи първични тумори, когато целта е откриване на малки рецидивиращи тумори (van Rhijn BW et al., 2005).

Друга основна уловка при изследване на биомаркери за карцином на пикочния мехур е хематурията (Bryan RT et al., 2011). Тя е симптом и признак на този карцином, но не е биологичната му причина. По този начин всеки протеин, присъстващ в кръвта, може да служи за биомаркер в проучвания за контрол на случаите, при които хематурията не е съчетана, но няма да бъде специфичен за карцинома на пикочния мехур.

Изборът на уринни биомаркери при този карцином (Chou R et al., 2015; Tilki D et al., 2011) е съсредоточен върху тези, които са най-широко валидирани за откриване на заболяването, особено одобрените от FDA (NMP22, BTA, UroVysion, ImmuoCyt), но също така други, като MMP-9, които са били често измервани, но нямат клинична значимост, и може би шепа други „обещаващи кандидати“.

Проучването ми за използваните и описани в литературата биомаркери показва разнородност по отношение на изследваните популации. Случаите на карцином на пикочния мехур се различават по стадий и степен (което ние частично сме контролирали с нашите критерии за подбор, вижте по-долу), но също така са или първични или рецидивиращи тумори или комбинация от двете (или неопределени) в различни проучвания.

6.3. Кожен Т-клетъчен лимфом - КТКЛ

Кожен Т-клетъчен лимфом е термин, включващ група от редки лимфо-пролиферативни заболявания с Т-клетъчен произход, първично засягащи кожата. Дължи се на малигнена трансформация и пролиферация на Т-лимфоцитите (Т-Lym). Над 65 % от кожните лимфоми са Т-клетъчни.

Таблица 1. Класификация на първични кожни лимфоми

WHO-EORTC класификация на първични кожни лимфоми (2018)	Относителна честота (%)	5 г. преживяемост (%)
Кожни Т-клетъчни лимфоми		
Mycosis fungoides	39	88
Варианти на Mycosis fungoides (MF)		
▪ <i>Фоликулотропна MF</i>	5	75
▪ <i>Пейджетоидна ретикулоза</i>	<1	100
▪ <i>Грануломатозна отпусната кожа</i>	<1	100
Синдром на Cézary	2	36
Т-клетъчна левкемия / лимфом при възрастни	<1	няма данни
Първични кожни CD30⁺ Т-клетъчни лимфо-пролиферативни нарушения		
▪ <i>Първичен кожен анапластичен едроклетъчен лимфом</i>	8	95
▪ <i>Лимфоматоидна папулоза</i>	12	99
Подкожен Т-клетъчен лимфом, подобен на паникулит	1	87
Екстранодален НК/Т-клетъчен лимфом, назален тип	<1	16

Хронична активна EBV инфекция	<1	няма данни
-------------------------------	----	------------

Първични кожни Т-клетъчни лимфоми, редки подтипове

▪ Първичен кожен γ/δ Т-клетъчен лимфом	<1	11
--	----	----

▪ Първичен кожен $CD8^+$ агресивен епидермотропен цитотоксичен Т-клетъчен лимфом	<1	31
--	----	----

▪ Първичен кожен $CD4^+$ дребно-/средно-Т-клетъчен лимфом	6	100
---	---	-----

▪ Първичен кожен акрален $CD8^+$ Т-клетъчен лимфом	<1	100
--	----	-----

Първичен кожен периферен Т-клетъчен лимфом, неопределен по друг начин	2	15
---	---	----

Кожни В-клетъчни лимфоми

Първичен кожен в маргинална зона В-клетъчен лимфом	9	99
--	---	----

Първичен кожен лимфом на фоликуларните центрове	12	95
---	----	----

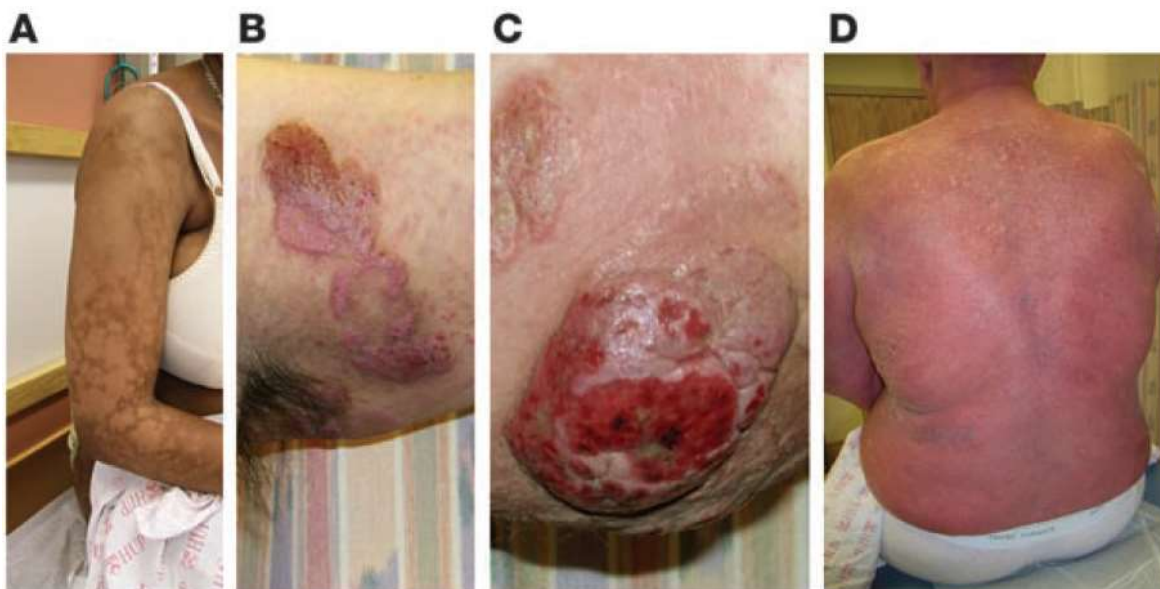
Първичен кожен дифузен едроклетъчен лимфом на краката	4	56
---	---	----

EBV+ мукокутанна язва	<1	100
-----------------------	----	-----

Интраваскуларен голям В-клетъчен лимфом	<1	72
---	----	----

Кожният Т-клетъчен лимфом включва Mycosis fungoides (MF), синдром на Sézary, първичен кожен анапластичен едроклетъчен лимфом и лимфоматоидна папулоза (доброкачествено заболяване) (Табл. 1) (Girardi M et al., 2004). Слабо малигният вариант, MF е най-честата и безболезнена форма (Фигура 4), следвана от синдром на Sézary (Duvic M, 2001). Към агресивните кожни Т-клетъчен лимфоми влизат синдром на Sézary, първичен

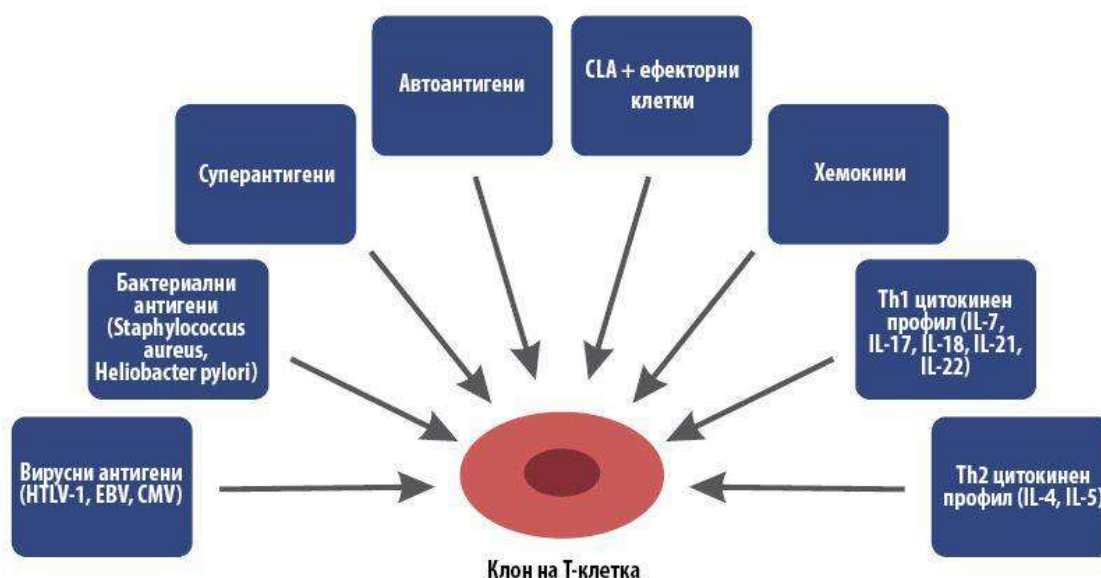
кожен НК/Т-клетъчен лимфом от назален тип, първичен кожен агресивен CD8⁺ Т-клетъчен лимфом, първичен γ/δ КТКЛ и първичен, неспадащ към изброените. Синдромът на Sézary представлява левкемичната форма на заболяването (> 1000 клетки на Sézary в ml кръв).



Фигура 4. Кожни лезии при MF и синдром на Sézary. (A) Хипопигментни макули при MF локализирани по ръката. Макулите могат да бъдат розови, червени, хипопигментни или хиперпигментни, и често с десквамация. (B) Изображение на две плаки на MF близо до аксилата. Лезиите при MF могат да имат пръстеновидна и гиратна конфигурация. (C) Туморна лезия на ръката. Туморите често се разязвяват. (D) Еритродермия при пациент със синдром на Sézary като повече от 80% от повърхността на тялото му е засегната от конфлуиращи еритемо- десквамирани макули (от Kim EJ et al., 2005).

Етиологията на първичните КТКЛ е слабо проучена. Предполага се, че кератиноцитите, локализирани в първичната кожна лезия, са ретровирусни резервоари. Лангерхансовите клетки (LCs) мигрират до този регион и се превръщат във вторични резервоари, които след това функционират като антиген-презентиращи клетки за вирусните антигени при срещата с CD4⁺ Т-клетки. Тези Т-Лym се струпват около LCs и формират микроабсцеси на Pautrier, които са патогномоничен хистологичен признак на ранния епидермотропен КТКЛ и са в основата на патогенезата на неопластичния процес (Kazakov DV et al., 2004). Това интраепидермално струпване на стимулирани и пролифериращи малигнени клетки адхезирали към дендритите на LCs показва наличието на динамичен обмен на сигнали между двата типа клетки. Клонално-стимулирани да пролиферират, новообразуваните Т-клетки стават податливи на трансформация от страна на живите вируси, намиращи се в LCs (представено на фигура 5).

Зрелите лимфомни клетки първоначално запазват способността си да адхезират към LCs и да отговарят селективно на вирусни антигени, представени от клас II на главния комплекс на тъканната съвместимост (MHC II) (Edelson RL, 2001). Установява се ко-експресия на т. нар. „skin homing molecules“, например кожен лимфоиден антиген (CLA) и C-C хемокин-рецептор тип 4, (CCR4) (Girardi M et al., 2004; Karenko L et al. 2007). В резултат на това се наблюдава клонална пролиферация на почти зрели $CD4^+/CD45RO^+$ T-Lym със заселване в кожата. CLA се свързва с E-селектина на венулния ендотел и улеснява туморните клетки да напуснат кръвта. CLA, MHCII и адхезионните интрацелуларни молекули-1 (ICAM-1) привличат лимфоцитите. MHCII взаимодейства с $CD4^+$ T-Lym, а ICAM-1 се свързва също с лимфоцитите. Настъпва промяна в експресията на цитокини и рецептори (Patil K, et al., 2022).



Фигура 5. Схематично представяне на етиологията на КТКЛ (адаптирано от Karin M, 2009)

Пациентите с КТКЛ показват голямо разнообразие от клонални и не-клонални хромозомни аберации, но специфични такива не са открити (Karenko L et al., 2007). Имунотипно, малигнените клетки при MF и синдром на Sézary обикновено са $CD2^+$, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD5^+$, $CD45RO^+$, $CD8^-$ и $CD30^-$, в 2/3 от случаите са $CD7^-$, а в редки случаи $CD3^+$, $CD4^-$ и $CD8^+$ (Gemmill R, 2006). Клетките на Sézary произлизат от T-helper 2 (Th2) и са $CD4^+$ и $CD45RO^+$. Отношението $CD4^+/CD8^+$ е по-голямо от 10. КТКЛ се характеризира с разрастване на регулаторни Т-клетки (Treg). При MF, малигнените клетки са зрели Th1 клетки (Girardi M et

al., 2004), докато при синдрома на Sézary са функционално от тип Th2 (Vasku JA et al., 2004). Лимфомите от групата с Th2 фенотип произвеждат IL-4, IL-5 и IL-6 и се инхибират се от IFN- α . (Patil K, et al., 2022). При КТКЛ се наблюдава хипергамаглобулинемия и еозинофилия. Инфилтратът при MF се състои от атипични T-Lym със свръхнагънати и плеоморфни ядра, които са малки и са смесени с еозинофили и плазмоцити. Членовете на STAT (signal transducer and activator of transcription) протеиновата фамилия са интрацелуларни транскрипционни фактори, които участват в контрола на клетъчния имунитет, пролиферацията, апоптозата и диференциацията. Нарушената регулация на STAT сигналния път е от съществено значение за патогенезата на КТКЛ и туморната прогресия (Netchiporouk E, 2014). Активират се предимно от мембранните рецептор-асоциирани Janus кинази (JAK). Дисрегулация на този сигнален път е често наблюдавана в първични тумори и води до засилена ангиогенеза, повишена преживяемост на туморите и имunosупресия. JAK3 се експресира в ядрото на малигнените T-Lym при КТКЛ (Vadivel SK, 2021). При него се наблюдава също и понижено ниво на STAT1, което е възможна причина за проявената резистентност към IFN. Пониженият отговор към IFN се свързва и със структурни вариации в гена, кодиращ FAS (TNF receptor superfamily member 6, CD95). Също така, транскрипционният фактор STAT3 може да се открива, наблюдава се и активиране на mTORC1 (Bargou RC et al., 1993).

При пациенти със синдром на Sézary често се наблюдава експресия на T-plastin и липса на някои или всички T-клетъчни антигени (CD2, CD3, CD4 и CD5). Цитотоксичен T-клетъчен отговор срещу туморните клетки контролира злокачественото заболяване до някаква степен, но Bcl-2-медираната апоптоза е слаба (Jones CL, 2012). Наблюдавани са аномалии на генно ниво или на ниво протеинова експресия или хиперметиране на промотъра на c-myc, p15 (CDKN2B) и p16 INK4a (CDKN2A). Това е доказателство за епигенетично заглушаване и се свързва предимно с прогресия на заболяването. Мутации или свръхекспресия на онкогена p53 са асоциирани с напреднал или трансформиран КТКЛ. P53 е установен често нефункционален в кожните лезии на пациенти със синдром на Sézary (Lamprecht B et al., 2012). В T-клетъчни линии от КТКЛ или кожни биопсии от parapsoriasis, както и в CD4⁺ лимфоцити от периферна кръв на пациенти е открито високо ниво на теломеразна активност и къси теломери. Типичен за КТКЛ е широкият спектър от хромозомни аберации. Възможни са както бройни, така и структурни аберации при всяка една хромозома. Бройни аберации, особено липсващи хромозоми са най-честата открита аномалия (da Silva Almeida AC et al.,

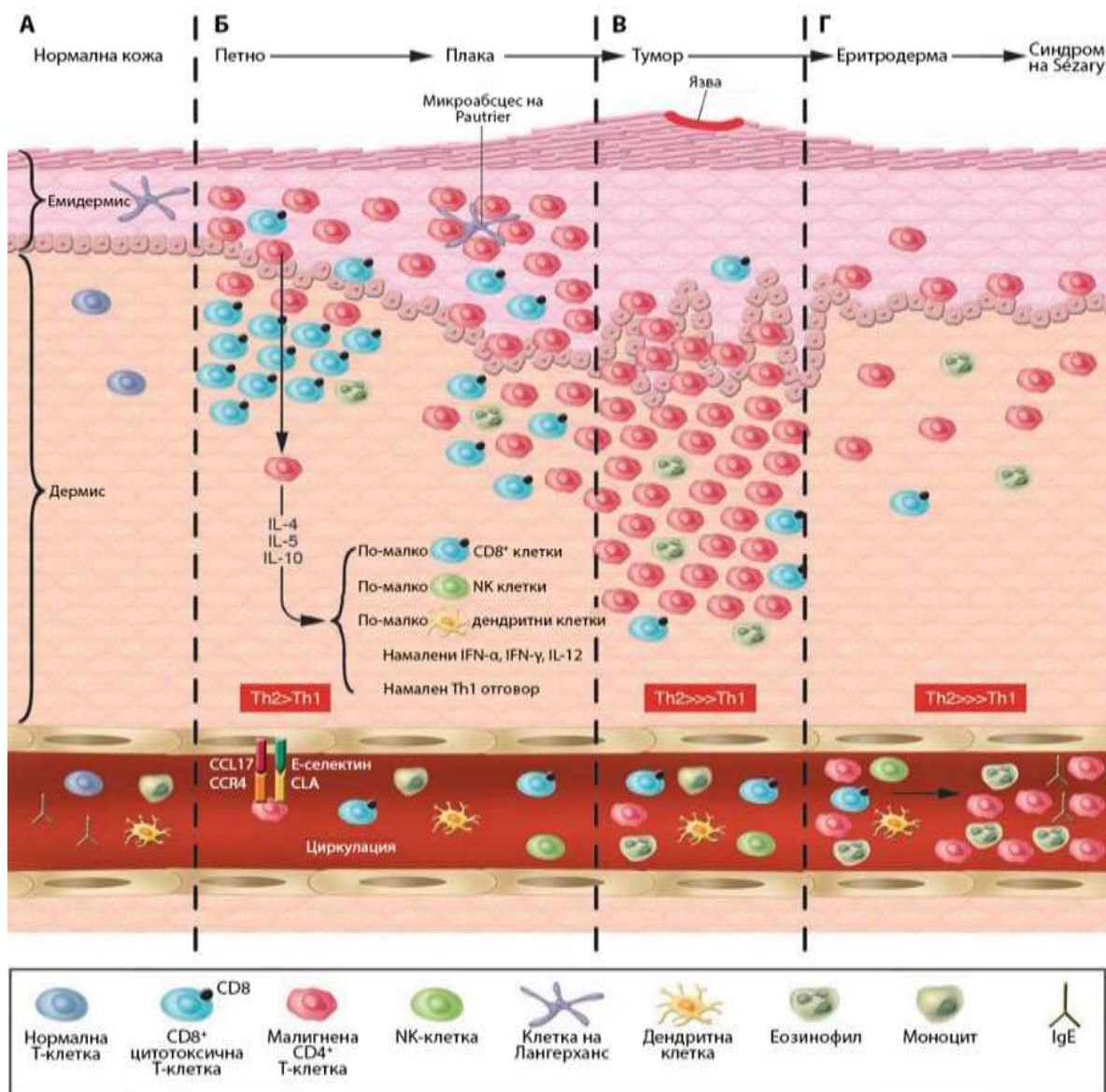
2015). Чрез FISH и имунохистохимия са наблюдавани промени в гените CCND1/BCL1 (11q13), отговорни за контрола на клетъчния цикъл, както и при техния регулатор Rb1 (13q14) (Avery J **et al.**, 2023). Rb тумор-супресорният път представлява една от най-често инактивираните сигнални оси при злокачествените заболявания. Най-общо Rb протеинът служи като транскрипционен репресор на E2F фамилията транскрипционни фактори. По този начин Rb ограничава експресията на транскрипционна програма, която включва ключови регулатори на прогресията на клетъчния цикъл (например циклин А и циклин-зависима киназа 2, CDK2), ДНК репликацията и митозата. Митогенни сигнали водят до активиране на CDK/cyclin комплекса, който фосфорилира Rb, облекчавайки латентната транскрипционна репресия и позволявайки прогресия на клетката през клетъчния цикъл. Обратно, множествените сигнални пътища, отговорни за клетъчния стрес инхибират прогресията на клетъчния цикъл като възпрепятстват фосфорилирането на Rb и осигуряват последващата поддръжка на транскрипционна репресия, предизвикана от Rb. По този начин контролът върху Rb/E2F сигналния път е във висока степен и директно отговорен за сигналните пътища, модулиращи активността на CDK/cyclin комплекса. Координацията на тези събития е критична за правилната регулация на клетъчната пролиферация и процеса на клетъчното делене. Като естествена последица се наблюдава дезинтеграция и нарушение в тези процеси при човешките тумори. Смята се, че Ras онкогенът повлиява клетъчната пролиферация чрез оста cyclin D1/Rb/E2F и е сред най-важните и добре охарактеризирани патологично активирани онкогени в човешкия организъм. c-Myc е друг задълбочено изучаван онкоген, който проявява мощен пролиферативен сигнал, кумулиращ в стимулация на E2F активността (Dean JL *et al.*, 2010).

Повечето случаи на MF/синдром на Sézary, особено в по-напреднал стадий, показват Th2-доминантна обкръжаваща цитокинова среда, характеризираща се с повишена продукция на IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13. През 2012г. van Kester и съавтори разкриват, че IL-32 се експресира при MF в туморният му стадий и в клетъчна линия MyLa (произход от пациент с MF), но не и при ранни етапи на MF, доброкачествени тумори и нормална кожа (van Kester MS *et al.*, 2012). При наличен туморен стадий на MF, атипични T-Lym в дермата експресират високи нива на IL-32. По-късно имунохистохимично и чрез РНК секвестриране е установено, че всъщност IL-32 е най-силно експресираният от всички интерлевкини при MF и подпомага оцеляването на злокачествените Т-клетки (Yu KK *et al.*, 2022). Този проинфламаторен цитокин, първоначално описан като транскрипт 4 на NK-клетките (natural killer cells), е

наблюдаван в активирани НК-клетки и в Т-клетки, и по-късно е наименован IL-32. За него се знае, че изпълнява физиологична роля в Т-клетъчната комуникация. IL-32 нормално се експресира в кератиноцити, фибробласти, активирани НК-клетки и Т-Lym, и се индуцира от различни инфекциозни агенти, като *Mycobacterium*, HIV и грипния вирус. Той участва също в системни възпалителни процеси на ревматоиден артрит, ХОББ и болест на Крон, но може да служи и като потенциален биомаркер и терапевтичен таргет в кожното възпаление (Wallimann A & Schenk M, 2023). IL-32 дозозависимо увеличава пролиферацията на MF- и Sézary-клетъчни линии *in vitro* (Suga H et al., 2014) и представлява потенциална терапевтична таргетна ниша в лечението на КТКЛ.

КТКЛ обикновено преминава през три важни стадия: първи, по време на който малигнените клетки могат да бъдат идентифицирани само в кожата, втори, през който те могат да бъдат открити посредством чувствителни техники в лимфните възли и кръвта, и трети, при който има системно засягане (фигура 6). MF започва най-често със сърбящи макули или плаки по торса, персистиращи няколко години или дори десетилетия преди да започне формиране на псориазиформени еритемо-сквамозни плаки. При пациентите със синдром на Sézary се наблюдава еритродермия, циркулиращи малигнени Т-клетки (клетки на Sézary) и тежък, влошаващ качеството на живот пруритус, с или без асоциирана лимфаденопатия (Jonak C et al., 2021). Най-общо, при КТКЛ могат да бъдат наблюдавани различни клинични картини, които отразяват прогресията на заболяването от макула към плака или тумор (Jawed SI et al., 2014). Целта на терапията е да се предотврати тази еволюция. Подобно на псориазиса е възможно да се наблюдава подобрене на кожните лезии при излагане на слънце.

Все по-често кожни заболявания, проявяващи се с петна и плаки се разглеждат като ранни форми на КТКЛ. В началния стадий на КТКЛ често липсват характерните хистологичните критерии, необходими за окончателна диагноза. Общата преживяемост на пациентите с MF е 68 % (5-годишна) и 17 % (30-годишна), докато пациентите със синдром на Sézary имат приблизителна 5-годишна преживяемост от 6 до 24 %. Развитието и прогресията на КТКЛ са свързани с изявена имунна дисрегулация и висок риск от инфекции, които са преобладаващата причина за смърт при тези пациенти (Scarlsbrick JJ et al., 2015).



Фигура 6. Кожна микросреда в прогресията на MF. (A) Нормална кожа, показваща резидуални клетки на Лангерханс в епидермиса и кожни Т-клетки в дермата и кръвообращението. (B) MF при стадият с петни и плаки, в които CD4⁺ злокачествени Т-Лум мигрират към епидермиса и се събират около клетките на Langerhans. При тези стадии в епидермалния и дермалния инфилтрат често има изобилие от CD8⁺ Т-Лум като част от имунния отговор на гостоприемника. (C) MF в туморен стадий, при който туморът обхваща дермата и хиподермата и се състои главно от злокачествени Т клетки и по-малко CD8⁺ Т-Лум. (D) Еритродермичен MF и синдром на Sézary с наличие на циркулиращи злокачествени Т-Лум, които изработват Th2 цитокини, влияещи на CD8⁺ Т-Лум, NK-клетките и броя и функциите на дендритните клетки, както и на имунния отговор на гостоприемника (адаптирано от Kim EJ et al., 2005).

6.3.1. Терапевтични подходи при КТКЛ

Бавната прогресия, широката вариабилност и окултното екстракутанно разпространение на КТКЛ прави труден избора на специфична терапия. При ограничено кожно разпространение, каквото се наблюдава в начална фаза на заболяването се предпочита локална терапия включваща Carmustine (BCNU), локални ретиноиди, X-receptor-селективен ретиноид (Bexarotene) или 5 % Imiquimod (Fujimura T et al., 2021; Scarisbrick JJ et al., 2013; Gopaluni S et al., 2008), систематизирани в таблица 2. Алкилиращият агент Mechlorethamine hydrochloride (Nitrogen mustard) също може да бъде ефективен при локално приложение (Lessin SR et al., 2013). Нещо повече, локалните алкилатори, Mechlorethamine и Carmustine, постигат ремисия в 60–80 % от случаите. Приложението на псоралени заедно с ултравиолетова А светлина (PUVA) или електронно-емисионно цялостно кожно облъчване (total skin electron beam irradiation, TSEBT) може също да подобри кожните лезии в ранна фаза на заболяването (Olsen EA et al., 2016; Hoppe RT et al., 2015). Наскоро е показано, че TSEBT с ниска доза (12 Gy) е ефективен лечебен вариант, тъй като терапевтичните резултати са повече от приемливи, комплайънсът на пациентите е отличен и токсичността е минимална. Фактът, че режимът може да се повтори безопасно, го прави по-привлекателен от стандартния режим с 36 Gy (Georgakopoulos I et al., 2019).

Пациенти с рефрактерен MF в ранна фаза или по-напреднало заболяване (фаза IIB или III) най-често получават само системна терапия или в комбинация с локална такава. При прогресия към туморен стадий се налага системна терапия за удължаване на преживяемостта. Инфекция е най-честата причина за смърт при пациентите с КТКЛ. Нормалният Т-клетъчен компонент се елиминира с прогресията на заболяването и се наблюдава имуносупресия, която не е по-различна от тази при пациенти с изявен СПИН.

Таблица 2. Терапевтичните режими на локална терапия при КТКЛ

Локална терапия при кожен Т-клетъчен лимфом
кожно-локализирани стадии:
локални кортикостероиди
локална химиотерапия - Mechlorethamine (nitrogen mustard)
локална лъчетерапия (ISRT) (8-12 Gy; 24-30 Gy при липса на лезии)
локални ретиноиди (Bexarotene, Tazarotene)
фототерапия (UVB, NB-UVB при рани лезии/тънки плаки; PUVA/UVA-1)
локален Imiquimod
кожно-генерализирани стадии:
локални кортикостероиди
локална химиотерапия - Mechlorethamine (nitrogen mustard)
фототерапия (UVB, NB-UVB, при ранни лезии/тънки плаки; PUVA/UVA-1)
TSEBT (12-36 Gy) - когато пациентът не реагира на гореспоменатите терапии

Лекарствени продукти, използвани за системна терапия и довели до значително подобрение в качеството на живот на пациенти с КТКЛ са представени в таблица 3 и включват: IFN- α , Bexarotene, ароматни ретиноиди (Etretinate, Isotretinoin), Forodesine и Denileukin diftitox (Morita A et al., 2022; Gilson D et al., 2019; Gosmann J, et al., 2023). Поддържащата терапия на КТКЛ се осъществява чрез локална терапия и кожни интервенции, фото- и радиотерапия.

Таблица 3. Терапевтичните режими на системна терапия при КТКЛ

Системна терапия при кожен Т-клетъчен лимфом
Категория А (SYST-CAT-A)
Ретиноиди: Bexarotene, all-trans retinoic acid, Isotretinoin [13-cis-retinoic acid], Acitretin
интерферони (IFN- α , IFN- γ)
HDAC-инхибитори (Vorinostat, Romidepsin)
екстракорпорална фотофереза
фототерапия (UVB, NB-UVB при рани лезии/тънки плаки; PUVA/UVA-1)
Methotrexate (≤ 100 mg всяка седмица)
Категория В (SYST-CAT B)
<i>Терапия от първа линия (азбучен ред):</i>
Brentuximab vedotin
Gemcitabine
Липозомален Doxorubicin
Pralatrexate (ниска доза)
<i>Терапия от втора линия:</i>
Chlorambucil
Pentostatin
Etoposide
Cyclophosphamide
Темозоломид
Methotrexate (> 100 mg всяка седмица)
Категория С (SYST-CAT C) (азбучен ред)
Brentuximab vedotin
Gemcitabine
липозомален Doxorubicin
Pralatrexate (ниска или стандартна доза)
Romidepsin

В напреднал стадий се прилагат глюкокортикоиди, IFNs, антитела-модификатори на биологичния отговор, фузионни токсини и системна химиотерапия с палиативна цел. Алкилиращи цитостатици и особено Carmustine дават пълни ремисии, но употребата им се ограничава поради свръхчувствителност (10%), костно-мозъчна супресия (30%) и вторични кожни тумори. Vexarotene е одобрен от Food and Drug Administration (FDA, САЩ) за лечение на КТКЛ във всички фази. Той взаимодейства с рецептора на ретиноевата киселина (RAR) и ретиноид X рецептор (RXR) като индуцира апоптоза (активиране на каспаза-3, разцепване на PARP). Vexarotene активира p53 чрез фосфорилиране при Ser15, което повлиява свързването на p53 към промотори на ареста на клетъчния цикъл, индуцира „up“-регулация на p73 и съответно модулира някои p53/p73 „downstream“ таргетни гени, като p21, Bax, survivin и cdc2 (Nieto-Rementeria N et al., 2009). Vexarotene потиска инхибитори на апоптозата (например survivin). Лечението с Vexarotene (300 mg/m²/ден) е добре поносимо и успешно при повече от 50% от пациентите. Може да се комбинира с фото(химио-) терапия (Morita A et al., 2022).

Обратимите нежелани реакции включват контактен дерматит, хипотироидизъм, суха кожа и повишени плазмени нива на холестерол и триглицериди. Denileukin diftitox (Ontak®) е антинеопластичен продукт, който по своята същност представлява рекомбинантен таргетен имунотоксин с биологична активност срещу неоплазми, експресиращи IL-2 рецептори (CD25), за които е и одобрен от FDA. След интернализация протеиновият синтез спира и се индуцира апоптоза. Vexarotene повишава CD25⁺ на Т-клетките и така усилва ефекта на Denileukin diftitox (Duvic M, 2000). През 1999 г. Ontak® е одобрен от FDA и за лечението на КТКЛ (Kaminetzky D & Hymes KB, 2008). Проучванията показват, че медикаментът води до регресия и стабилизиране на редица пациенти в IV стадий на КТКЛ, удължавайки продължителността на живот от 8 до повече от 12 месеца. Има обаче доказателства, които свързват употребата на Denileukin diftitox със загуба на зрение, което налага добавянето на така наречените „black box warning“ предупреждения.

Лечението на КТКЛ включва още Pentostatin, Cladribine, Fludarabine, Etoposide, Vincristine, Doxorubicin (липозомна форма), Gemcitabine, Peldisine и Forodesine (Kamijo H & Miyagaki T, 2021). Forodesine е мощен инхибитор на пурин-нуклеозид-фосфорилазата (purine nucleoside phosphorylase, PNP), който предизвиква вътреклетъчна акумулация на дезокси-гуанозин-трифосфат (dGTP) в Т- и В-Лym и последваща апоптоза. Forodesine е демонстрирал впечатляваща антитуморна активност при пациенти с КТКЛ по време на мултицентрово фаза II клинично изпитване (Maruyama D et al., 2019). Zanolimumab и SGN-30 реагират с CD4 и

CD30 и така водят до унищожаване на туморните клетки. Съществуват още много и разнообразни терапевтични средства, които биха могли да допринесат за подобряване лечението на КТКЛ. На таблици 4 обобщено е представен комбинираният терапевтичен режим при КТКЛ.

Таблица 4. Обобщена информация за комбинирани терапевтични режими

Комбинирана терапия	
локална+системна терапия	системна+системна терапия
фототерапия + ретиноид	ретиноид + IFN
фототерапия + IFN	фотофереза + ретиноид
фототерапия + фотофереза	фотофереза + IFN
TSEBT + фотофереза	фотофереза + IFN + ретиноид

7. Основна хипотеза, произтичаща от литературния обзор

Хипотезата на тази дисертация е че, нискотоксичните фитоканабиноиди като CBD, CBG, CBN както и екстракти, които ги съдържат, могат да се включат в терапевтичната схема на пациенти страдащи от тумори с възможност за 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 канабидиол (CBD) и канабидиол-съдържащи екстракти върху клетки от КТКЛ, карцином на гърда и пикочния мехур в чистата му (от етанолов стоков разтвор) форма, както и техният ефект, когато са поставени в различни лекарство-доставящи системи.

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

(3) Да се проучи цитотоксичният ефект на канабинол (CBN) срещу същите клетъчни туморни 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 стоков разтвор) форма, така и включен в различни полимерни системи.

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

III. Материали и методи

1. Материали

1.1. Природни вещества

1.1.1. Екстракти от Cannabis Sativa L. с високо съдържание на CBD и без наличие на THC

Използваните екстракти от Cannabis са произведени и предоставени от PBG.GLOBAL. Използвана е суровина от един и същ сорт индустриален коноп (*Cannabis Sativa L.*). И в двата екстракта THC се отстранява напълно с помощта на флаш хроматография.

- 30% CBD екстракт от Cannabis Sativa L. (0% THC) е произведен чрез екстракция със студен етанол. При тази студена екстракция растителният материал се накисва в етанол, който е бил охладен до -20°C или по-ниска, което помага за запазване на летливи терпени и канабиноиди, разграждащи се при по-високи температури. Крайният продукт преминава през минимална обработка и не се извършва дестилация за по-нататъшно концентриране на канабиноидите. В резултат на това 30% екстракт запазва по-широк набор от биоактивни съединения, включително по-високи концентрации на терпени (като линалол и мирцен) и флавоноиди.
- 60% CBD екстракт (0% THC) е произведен също чрез екстракция с етанол и последващо премахване на THC. След изпаряване на етанола под вакуум при ниски температури, суровият екстракт се подлага на частична дестилация за селективно отстраняване на летливи съединения, като терпени, и по-тежки смоли и други нелетливи вещества, като същевременно се концентрират канабиноидите. Газова хроматография-маспектрометрия (GC-MS) се използва за анализиране на крайния състав на екстракта, потвърждавайки концентрацията на CBD и наличието на други второстепенни канабиноиди и терпени. Полученият продукт представлява тъмно-кехлибарена вискозна смола (oleoresin).

Разтворител: Студен етанол

Съхранение: Сухата субстанция се съхраняваше при 4°C, а разтворът при -20°C, като и двете бяха в защитени от светлина опаковки.

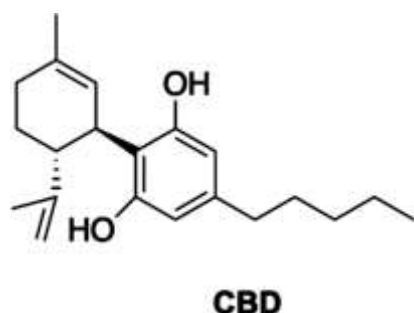
1.2. Чисти вещества

1.2.1. Канабидиол (CBD)

Използваният канабидиол (CBD) е получен също от фирма PBG.GLOBAL. Представява безцветно кристално вещество без мирис, с 99 % концентрация на CBD, като е получен с помощта на метод за екстракция на CO₂ суперкритична течност. CO₂ се подлага на свръхкритично състояние, което проявява свойства както на течност, така и на газ. Това позволява на CO₂ да действа като разтворител, селективно извличайки канабиноидите от растителния материал, без да използва химически разтворители като етанол или бутан. Тази техника е считана за един от най-ефективните и прецизни методи за извличане на канабиноиди без да се променя химическата им структура, особено за производство на изолати с висока чистота.

След екстракцията, суровото CBD-масло преминава през процес на зимуване, който включва разтваряне на екстракта в етанол и охлаждането му до температури под нулата (-20°C до -80°C). При този процес се утаят и отстранят нежеланите мазнини, восъци и липиди от екстракта. След зазимяване разтворът се филтрира, за да се отстранят тези примеси. После полученият продукт се пречиства с помощта на дестилация и хроматография (силициева или флаш хроматография), която изолира чистия CBD от други канабиноиди, терпени и растителни материали. Крайният CBD изолат има чистота над 99%, потвърдена чрез анализ с високоефективна течна хроматография (HPLC).

Химична структура:



Наименование по IUPAC: 2-[[1R,6R]-6-Isopropenyl-3-methylcyclohex-2-en-1-yl]-5-pentylbenzene-1,3-diol

Молекулна маса: 14.464 g/mol g·mol⁻¹

Молекулна формула: C₂₁H₃₀O₂

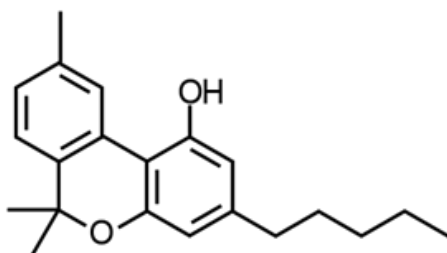
Разтворител: Етанол

Съхранение: Разтворът е съхраняван в хладилник при 4°C в защитени от светлина опаковки.

1.2.2. Канабинол (CBN)

Канабинолът (CBN) е закупен от Sigma-Aldrich (Germany) и представлява етанолов разтвор с концентрация на CBN 1 mg/ml.

Химична структура:



Наименование по IUPAC: 2-[[1R,6R]-6-Isopropenyl-3-methylcyclohex-2-en-1-yl]-5-pentylbenzene-1,3-diol

Молекулна маса: 14.464 g/mol g·mol⁻¹

Молекулна формула: C₂₁H₃₀O₂

Разтворител: Етанол

Съхранение: Разтворът се съхраняваше в хладилник при 4°C в защитени от светлина опаковки.

1.2.3. Канабидиол в нано-емулсия (H₂O-CBD)

CBD в нано-емулсия е закупен от Mile High Labs (USA). Представлява нано-емулсия на чисто вещество CBD в разтвор с концентрация на CBD 200 mg/ml.

Разтворител: Вода

Съхранение: Разтворът се съхраняваше в хладилник при 4°C в защитени от светлина опаковки.

1.2.4. Канабидиол в полимерна лекарство-доставяща система (CBD-P)

Беше използван чист CBD доставен от PBG.GLOBAL при създаването на полимерната лекарство-доставяща система.

Съхранение: Разтворът се съхраняваше в хладилник при 4°C в защитени от светлина опаковки.

1.3. Клетъчни линии

Експериментите на настоящата работа бяха проведени основно върху суспензионни клетъчни култури. Клетъчните линии бяха от пациенти с КТКЛ или получени като стандартни клетъчни линии от туморно-клетъчни банки. Всички използвани клетъчни линии бяха закупени от DSMZ - Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Немска банка от микроорганизми и клетъчни култури), Брауншвайг, Германия и ATCC - American Type Culture Collection, Манасас, Вирджиния, САЩ.

- **HuT-78** (ATCC № TIB-161™)

Клетъчен тип: кожен Т-клетъчен лимфом

Произход: Клетъчната линия е изолирана от периферна кръв на 50-годишен пациент със синдром на Sézary

Морфология: лимфобластоидна

Среда за култивиране: 80% IMDM + 20% термично инактивиран FBS или 90% RPMI-1640 + 10% термично инактивиран FBS

Среда за замразяване: 90% FBS + 10% DMSO

Условия на култивиране: 37°C, 5% CO₂

Време на удвояване: около 65 часа

Характерни особености: фенотип на зрели Т-хелперни клетки (експресират CD4), продуциращи IL-2 и TNF-α. Клетките имат рецептори за двата цитокина, като TNF-α играе ролята на автокринен растежен фактор.

- **T-24** (ATCC® HTB-4™)

Клетъчен тип: преходно-клетъчен карцином на пикочен мехур

Произход: Изолирани от 81 годишна жена. Левкоцитите и серумите от пациенти с преходно-клетъчен карцином са цитотоксични към T24 и сродни линии.

Морфология: клетките имат кръгла или неправилна форма, с дълги израстъци. Растат единично или на групи (кълъстери) в суспензия, заедно с големи единични яйцевидни клетки.

Среда за култивиране: 90% RPMI-1640 + 10% термично инактивиран FBS

Среда за замразяване: 90% FBS + 10% DMSO

Условия на култивиране: 37°C, 5% CO₂

Време на удвояване: приблизително 50-70 часа

Цитогенетика: сложен приблизително тетраплоиден кариотип с 3% полиплоидия; 86-104<4n>XXX;

Характерни особености: Клетките са CD3+ и CD4+ (положителни). Непосредствено след размразяване растат по-добре в 24-ямкови плаки, след което могат да бъдат трансфеирани в матрочета.

- **MJ** (ATCC CRL-8294™)

Клетъчен тип: кожен Т- клетъчен лимфом

Произход: изолиран от периферна кръв на 50-годишен мъж с КТКЛ в индолентна форма (Mycosis fungoides)

Морфология: лимфобластна

Среда за култивиране: 80% IMDM + 20% FBS

Среда за замразяване: 90% FBS + 10% DMSO

Условия на култивиране: 37°C, 5% CO₂

Време на удвояване: около 26 часа

Специални характеристики: имат IL-2 рецептор, секретират IL-2 и фактор, инхибиращ миграцията.

- **MDA-MB-231** (ATCC® HTB-26™)

Клетъчен тип: карцином на гърдата

Произход: Клетъчната линия е създадена през 1973 г. от плеврален излив на 51-годишна жена с карцином на гърдата след химиотерапия; описан като ER-отрицателен и туморогенен при голи мишки.

Морфология: епителни клетки растящи адхерентно като еднослойни, понякога образуващи вретеновидни удължения.

Среда за култивиране: 90% Leibovitz' L15 + 10% h.i. FBS

Инкубация: при 37°C, като създателите предлагат да се инкубират без газообразен обмен (капакът на колбата е затворен)

Удвояване на времето: около 25-30 часа

Съхранение: замразени със 70% среда, 20% FBS, 10% DMSO

Характерни особености: Клетките експресират рецептори за EGF и трансформиращият растежен фактор алфа (TGF алфа).

- **CAL-29** (ACC 515)

Клетъчен тип: преходно-клетъчен карцином на пикочния мехур

Произход: Клетъчната линия е създадена от първичната лезия на фатално инвазивен, метастатичен преходно-клетъчен карцином на пикочния мехур (степен IV, етап T2) от 80-годишна жена преди лечение.

Морфология: епителиоидни клетки, някои с вретеновидни удължения, които растат адхерентно в монослое

Среда за култивиране: 90% Dulbecco's MEM + 10% h.i. FBS

Подкултура: семена на около 1-2 x 10⁶ клетки / 80 cm² колба; разделена сливна култура 1:2 до 1:4 на всеки 3-6 дни, като се използва трипсин/EDTA

Инкубация: при 37 °C с 5% CO₂

Време за удвояване: около 50-60 часа

Реколта: максимална плътност от около 6,0 x 10⁶ клетки/80 cm² колба

Съхранение: замразени със 70% среда, 20% FBS, 10% DMSO

За изследване на антивирусна активност бяха използвани клетъчните линии:

- **Lep** (ембрионален бял дроб) (кл.банка НЦЗПБ)
- **CCL-1** (нормална миша фибробластна кл.линия) (ATCC: CCL-1)
- **HCoV-229E** (човешки коронавирус щам 229E) (Робърт Кох, Германия)

1.4. Среди за клетъчно култивиране

В зависимост от това, с коя субстанция бяха третирани клетките от една клетъчна линия, бяха използвани две различни форми на една среда. Клетките, третирани с куркумин (като положителна контрола), бяха култивирани в среда без фенолно червено (phenol red). Клетките, третирани с Erufosine, бяха култивирани в среда с фенолно червено. Причината за това е, че абсорбцията на фенолното червено се припокрива с тази на куркумин. Това припокриване може да доведе до неточни резултати.

За клетъчните линии HuT-78 и MJ са използвани :

- IMDM (1x) -REF(21980-032),LOT(1852716)-gibco+20%FBS*+5%L-Glutamine**
- IMDM (1x)-REF(21056-023),LOT(1929922)-gibco+20%FBS*+5%L-Glutamine**

За клетъчната линия HH са използвани:

- RPMI-1640 (1x)-REF(31870-025),LOT(1924313)-gibco+10%FBS*+5%L-Glutamine**
- RPMI-1640 (1x)-REF(11835-063),LOT(1945343)-gibco+10%FBS*+5%L-Glutamine**

**FBS Good Forte –Cat.No:P40-47500, Lot.No:P160706-PAN Biotech*

***L-Glutamine 200mM (100x)-REF(25030-024), LOT(1978288)-Gibco*

1.5. Материали използвани за CBD-заредени полимерни мицели:

PEO101-b-PPO56-b-PEO101 (Poloxamer 407, BASF, Германия), 2-хидроксиетил целулоза (1,3 KDa, Hercules Inc. Aqualon Division, Wilmington, DE, USA), поли (етилен гликол) диакрилат (PEGDA, 575 g·Mol⁻¹, Sigma-Aldrich, Дармщат, Германия), N, Nj-метиленбисакриламид (BAAm, Sigma-Aldrich, Дармщат, Германия), H₂O₂ (30 об% воден разтвор, Labimex Ltd., София, България), етанол (96%, Лабимекс ООД, България) и CBD (любезен дарен от PBG GLOBAL LTD., София, България) бяха използвани при получаване.

2. Методи

2.1. Клетъчно култивиране

Всички дейности, свързани с култивирането на клетки, изискваха абсолютна стерилност на използваните материали, разтвори и хранителни среди. Извършиха се в ламинарен бокс, осигуряващ постоянен поток на стерилен въздух чрез система от филтри. Всички съдове, съдържащи среди за култивиране, пипети и другите помощни материали се дезинфектираха с 70%-ен разтвор на етилов алкохол преди поставянето им в ламинарния бокс. Върховете за пипети и разтворите се използваха след предварително автоклавиране при температура 121°C. Култивирането на клетките се осъществи в инкубатор при температура 37°C, 5% CO₂ и максимална влажност на средата. Клетките в суспензионните култури се поддържаха в логаритмична фаза на растеж чрез смяна на хранителната среда на всеки 2-ри или 3-ти ден в зависимост от периода на удвояване на съответната клетъчна линия.

2.2. Приготвяне на среда за култивиране и замразяване

Със стерилна 60-ml пипета за еднократна употреба беше отнеман 55 ml от обема на готовата течна стерилна среда. Добавяше се 50 ml фетален говежди серум (FBS) до достигане на 10% крайна концентрация в средата. Добавяше се също 5 ml L-Glutamine с изходна концентрация 200 mM до достигане на 1% крайна концентрация в средата. Готовата среда за култивиране беше съхранява в хладилник при температура 4°C до 1 месец, като преди употреба хранителната среда се затопляше предварително във водна баня до 37 °C. Периодично се правеше тест за микробна контаминация на средата като около 5 ml от новопригответената среда се прехвърляше стерилно в матрак с площ 25 cm³ и се оставяше в инкубатора за наблюдение през следващите 3-4 дни. Средата за замразяване се приготвяше по аналогичен начин. Съставът ѝ включваше: 90% FBS и 10% DMSO като нужното количество се приготвяше непосредствено преди употреба.

2.3. Инактивиране на FBS

Феталният говежди серум (FBS - fetal bovine serum, FCS – fetal calf serum) беше доставян в замразено състояние от фирмата-производител и беше съхраняван до инактивиране на системата на комплемента при температура под -20 °C. За целта замразеният фетален серум беше оставян да се размрази бавно при температура 4°C за 1-2 дни или при стайна температура за един ден. Инактивираният серум беше порциониран (аликвотиран) при асептични условия и съхраняван при температура -20°C. Размразеният инактивиран и порциониран FBS беше съхраняван при температура 4 °C и използван до 1 месец.

2.4. Замразяване на клетъчни линии

Клетъчната суспензия беше оглеждана внимателно под фазово-контрастен микроскоп, за да се потвърди отсъствието на контаминация. С помощта на пипета клетъчната суспензия беше хомогенизирана. За преброяване на клетките в единица обем с помощта на хемоцитометър на Neubauer или Bürger беше взимано малко количество (8 - 10 µl) от клетъчната суспензия. За целта бяха използваха криоепруветки с вътрешен винт, в които клетъчната суспензия за замразяване беше центрофугирана за 5 минути при 1500 rpm на стайна температура. Надстоящата течност беше изсмуквана с вакуум-помпа и беше добавяна среда за замразяване до постигане на гъстота 3-5 x 10⁶ клетки/ml, като клетките се хомогенизираха. По 1 ml от така получената суспензия беше разпределян максимално бързо

във всяка криоепруветка. Епруветките се поставяха в кутия с риза от изопропанол и се оставяха на температура -80°C за 24 часа, където температурата спадаше постепенно с около $1^{\circ}\text{C}/\text{минута}$ до -80°C . След това криоепруветките се прехвърляха в газовата фаза на течния азот (при температура -136°) в контейнер за дълбоко замразяване на клетки, който беше съхраняван при температура -150°C .

2.5. Размразяване на клетъчни линии с цел култивиране

Между 3 и 5 ml готова хранителна среда беше поставяна в матрак за култивиране (площ 25 cm^2) и той беше инкубиран за 1 час при температура 37°C , 5% CO_2 и максимална влажност на средата. Размразяването на криоепруветката, съдържаща $3-5 \times 10^6$ замразени клетки (съхранявани при температура -80°C) се осъществяване на водна баня при 37°C до пълно размразяване на суспензията. Клетъчната суспензия се прехвърляше в центрофужна епруветка и към нея бавно се добавяше 5 ml хранителна среда. Клетките се центрофугираха за 5 минути при 1500 rpm на стайна температура. След изсмукване на супернатанта (надстоящата течност) с вакуум-помпа, утайката се ресуспендираше в 1 ml хранителна среда. Матракът се поставяше отново в инкубатора за 7 дни като към клетките се добавяше ежедневно по малко прясна хранителна среда.

2.6. Смяна на хранителната среда при клетъчни линии

Смяната на старата хранителна среда при използването в работата суспензионни клетъчни култури се извършваше на всеки 2 до 3 дни в зависимост от скоростта на удвояване на съответната клетъчна линия. Суспензионните клетъчни линии, използвани в тази дисертация, се посяваха за култивиране в нова хранителна среда при гъстота 0.3×10^6 клетки/ml. Клетките се преброяваха с хемоцитометър на Neubauer.

2.7. Поддържане на клетките в логаритмична фаза на растеж

На всеки 2-3 дни (в зависимост от характеристиките на клетъчната линия) от матраците се отстраняваше $2/3$ от обема на клетъчната суспензия и се прибавяше среда за култивиране, в количество равно или малко по-голямо от отстраненото.

2.8. Определяне автентичността на клетъчните линии с Multiplex human Cell line Authentication Test (MCA)

Определянето на автентичността на клетъчните линии се налага с оглед избягване на работа с контаминирани линии, несъответстващи на правилата за добра лабораторна практика, както и генерирането на неточни и подвеждащи научно-изследователски резултати. В рамките на дисертационния труд такава оценка на използваните клетъчни линии бе осъществена от немската компания Multiplexion (<http://www.multiplexion.de/en/>).

Проби, съдържащи ДНК от съответната клетъчна линия, се предаваха за последващо определяне на автентичността. По своята същност методът включваше:

- Идентифициране на човешки клетъчни линии чрез т.нар. SNP- (Single Nucleotide Polymorphism) профилиране.
- Пълната информация за генотипа беше сравнявана с референтна база данни (понастоящем тя се състои от 828 отличителни STR-профилирани автентични референтни клетъчни линии).
- Не беше наблюдавана крос-контаминация от друга човешка клетъчна линия.

2.9. Изготвяне на растежни криви

Растежни криви се изготвяха за всяка една от използваните клетъчни линии в началото на работния процес. Кривите показват растежа на дадената клетъчна линия и дават информация относно клетъчната плътност, при която дадена клетъчна линия нараства оптимално за периода от време, който експерименталната дейност изисква. За тяхното изготвяне, всяка клетъчна култура трябваше да се доведе до суспендиран вид с прясна среда. Избираха се няколко клетъчни гъстоти (минимум 5), които попадат в диапазона, посочен от банката за клетъчни линии, от която са закупени. Клетките се разпределяха в 5 броя 96-ямкови микротитърни плаки в обем по 0,1 ml/ямка, като за целта беше използвана полуавтоматична пипета Eppendorf. 5-те плаки съответстваха на 5 различни времеви интервала, в които ставаше отчитането на клетъчната виталност – 0 час, 24-ти час, 48-ми час, 72-ри час, 96 час. Във всяка плака отделях по 6 ямки (между 8 и 16) за клетъчна суспензия с еднаква гъстота. Също оставях 6 ямки (между 8 и 16) за празна проба, по която се определяше екстинкцията на чистия разтвор (без клетки) при спектрофотометричното измерване след обработка с МТТ. След инкубиране на клетките за период 0 ч., 24 ч., 48 ч., 72 ч., 96 ч., плаките се обработваха с МТТ и резултата се отчиташе спектрофото-

метрично. Бяха изготвени криви, показващи изменението на клетъчната виталност (съответстваща на брой клетки/ml) с времето за всяка наблюдавана изходна клетъчна гъстота и се направи избор на оптималната такава.

2.10. Приготвяне на серия кратни падащи разреждания от изходен разтвор

Разрежданията бяха направени непосредствено преди третиране на клетките, като бяха използвани няколко различни концентрации на едно вещество и всяка следваща концентрация беше 2 пъти по-малка от предходната.

При изчисляване на концентрацията на първия най-концентриран разтвор от серията, беше взето под внимание фактът, че към ямка със 100 μ l клетъчна суспензия трябва да се добави 2 μ l третиращ агент, което означава допълнително 51-кратно разреждане на концентрацията на изходния разтвор. Първият разтвор с най-висока концентрация беше приготвян чрез разреждане на аликвотна проба от изходния разтвор в хранителната среда. В епруветките предвидени за по-ниските концентрации беше накапвано първоначално само хранителната среда, която представляваше половината от крайния обем. От първия разтвор беше взиман обем, равен на обема на средата в следващата епруветка и беше прехвърлян в нея. Така беше получен разтвор на веществото с двойно по-малка концентрация. Тази процедура беше повтаря докато се приготви разтворът с най-ниска концентрация.

2.11. Третиране на клетките с цитостатик

Клетъчните линии бяха третирани с цитостатици през периода на експоненциалната фаза на растеж (т.нар. log-фаза), когато фракцията на дялящите се клетки и тяхната виталност е висока (обикновено 90-100%) и културата е в най-репродуктивния си период. Клетъчната суспензия, която беше доведена до необходимата гъстота (0.4×10^6 клетки/ml за НН, 0.3×10^6 клетки/ml за МJ съответно 0.2×10^6 клетки/ml за НuT-78) в прясна хранителна среда беше разпределяна в 96-ямкови микротитърни плаки в обем по 0,1 ml/ямка. След достигане на фаза на експоненциален растеж (24 часа), клетките бяха третирани с 2 μ l/ямка от разтвора на раличните канабиноиди. Плаките се оставяха в инкубатор при температура 37°C, 5% CO₂ и максимална влажност на средата до обработка с МТТ и отчитане на резултата. Третираните клетки се проверяваха редовно под фазово-контрастен микроскоп за наличие на контаминация.

2.12. Приготвяне и измерване на CBD-заредени полимерни мицели

2.12.1. Методи за измерване на CBD-заредени полимерни мицели

Измерванията на динамичното разсейване на светлината (DLS) бяха извършени на ZetasizerNanoBrook 90Plus Zeta (Brookhaven, NY, USA), оборудван с 35 mW червен диоден лазер, ($\lambda = 640 \text{ nm}$) при ъгъл на разсейване от 90° . UV-Vis спектрите бяха измерени с UV-1800 Shimadzu спектрофотометър (Shimadzu, Япония). Динамичните реологични измервания на криогелите бяха извършени с помощта на реометър HaakeRheoStress 600 (Thermo Scientific, Карлсруе, Германия) с паралелна плоча сензорна система (20 mm в диаметър) и регулатор на температурата на Пелтие при 25°C в режим на контролирана деформация (CD).

Модулите за динамично съхранение (Gj) и загуба (Gjj) бяха определени в честотния диапазон 0.3–10 Hz при постоянна деформация на срязване, $\gamma=0.005$, която беше в линейния вискоеластичен режим. Бяха проведени три опита от всеки тип криогел. Криогелите бяха замразени и изсушени чрез замразяване в сушилня Alpha1-2 Freeze (Martin Christ, Osterode am Harz, Германия) при -55°C и 0.02 mbar за 24 часа. Напречното сечение на криогелите беше изследвано с помощта на сканиращ електронен микроскоп JEOL JSM-5300 SEM (JEOL, Акишима, Япония), работещ при 20 kV. Преди наблюдение геловите образци бяха натрошени, фиксирани върху стъклен субстрат чрез лак и покрити със злато за 60 s.

Широкоъгълните рентгенови дифракционни сканирания (WAXD) бяха получени на Bruker D8 Advance ECO дифрактометър, работещ при 40 kV и 25 mA в геометрията на Bragg – Brentano с Ni-филтрирано Cu K α излъчване и детектор LynxEye-XE в диапазона 2θ от $5-55^\circ$, със скорост на сканиране $0,02^\circ \cdot \text{s}^{-1}$.

2.12.2. Приготвяне на CBD-заредени полимерни мицели

CBD (10 mg) и съполимер (30 mg) бяха разтваряни в 6 ml етанол и след това смесвани с 2 ml вода. Органичният разтворител и 1 ml вода бяха отстранявани от системите чрез ротационен изпарител при понижено налягане при 40°C , при което беше получен 1 ml воден разтвор на натоварен с CBD полимерен мицел (PM). Крайните концентрации заредените полимерни мицели съответстваха на 25 % зареждане със CBD (Momekova D et al., 2020).

2.12.3. Синтез на нанокмпозитни криогели

1 ml CBD-натоварен полимерен мицел (30 тегл. % по отношение на HEC) беше добавян към 8 ml воден разтвор на HEC (0.1 g) при постоянно разбъркване, за да се получи хомогенна

смес. H_2O_2 (0.02 ml, 30% тегл.% воден разтвор) и BAAm/PEGDA (30 mg; 30 тегл.% до HEC), разтворени в 1 ml дестилирана вода бяха добавяни с разбъркване на стайна температура. След това сместа беше изливана в осем тefлонови съда (2 cm в диаметър), образувайки слой с дебелина 2.5 mm. Съдовете бяха поставяни във фризер при -20°C за 2 часа и замразените проби бяха облъчвани с UV светлина с пълен спектър в продължение на 2 минути, използвайки UV оборудване Dymax 5000-EC (400 W метална халогенна лампа), с мощност на дозата от $5.7 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$.

Накрая криогелите бяха потапяни в дестилирана вода (0,5 L) и бяха екстрахирани за период от една седмица при стайна температура. Водата беше сменяна четири пъти за този период. Екстрахираните криогелове бяха претегляни след попиване на повърхността им с филтърна хартия. След това геловите бяха лиофилизирани и отново бяха претегляни. Определяше се степен на подуване (SD) както следва:

$$SD = \frac{w_2}{w_1}$$

където w_1 е теглото на лиофилизирана проба, w_2 е теглото на набъбналата проба.

Добивът на гелна фракция (GF) се определяше по уравнението:

$$GF [\%] = \frac{w_1}{w_0} \cdot 100$$

където w_0 е първоначалното тегло на HEC, w_1 е теглото на лиофилизирана проба.

Дадените стойности за всеки криогел са средно осем проби. Експерименталните грешки на добивите от GF и изчисленията на SD са в диапазона от 2% до 3%.

2.12.4. Зареждане на канабидол в чисти HEC криогелове

Леофилизиран чист HEC криогелен диск ($\sim 10 \text{ mg}$; получен без CBD и PM) беше накисван в 1 ml етанолов разтвор на CBD (1g/ml) и след това сушен на въздух при стайна температура.

2.12.5. Експерименти с освобождаване на канабидиол

Изпускането на CBD от чист НЕС и нанокомпозитни криогели НЕС/PM беше изследвано като функция на времето при 35°C. Тестовите за разтваряне се провеждат в 50 ml ацетатен буфер (pH 5.5) при постоянно разбъркване при 50 rpm. На предварително определени интервали от време, 2 ml от пробите бяха взимани от акцепторната фаза и количеството на освободения CBD беше оценявано спектрофотометрично при 235 nm. Средният кумулативен процент на освобождаване на CBD беше изчислявано на базата на стандартна крива.

За да се определи общото количество CBD на диск, дисковете бяха поставяни в 2 ml дестилирана вода за 10 минути и след беше добавян 8 ml 96% етанол. Дисковете бяха инкубирани за 2 часа на стайна температура. След инкубационния период количеството на извлечения CBD беше изчисляван въз основа на стандартна крива на CBD в етанол в концентрационен диапазон от 0.002 до 0.1 g · L⁻¹ ($y = 12.13751x - 0.11934$, $R_2 = 0.9992$).

2.13. МТТ-метод за оценка на клетъчна виталност

Клетъчната жизнеспособност след излагане на свободен CBD или неговите НЕС-базирани криогелни формулировки беше оценявана чрез МТТ анализ за редукция на багрилото. Биосъвместимостта на носителите беше тествана върху нормална миша фибробластна клетъчна линия (CCL-1).

Накратко, експоненциално растящите клетки бяха посявани в 6-ямкови плоскодънни плаки (3 ml/гнездо) с плътност 1×10^5 /ml MJ клетки (*Mycosis fungoides*) и T-24 клетки (карцином на пикочния мехур) и след 24 часа инкубация при 37°C, те бяха третирани с различни концентрации от тестваните формулировки на CBD в продължение на 72 часа. Клетките CCL-1 бяха посявани, както е описано по-горе, но вместо с CBD, те бяха третирани с различните концентрации на ненатоварен НЕС/PM криогел. За всяка концентрация беше използван набор от най-малко три гнезда. След периода на контакт 300 μ L разтвор на МТТ (10 mg/ml, в PBS) беше добавен към всяка ямка. След това микроплаките бяха инкубирани в продължение на 4 часа при 37°C и образуваните кристали МТТ-формазан бяха разтваряни чрез добавяне на 3 ml/гнездо 5% подкиселен с мравчена киселина изопропанол. Абсорбцията на МТТ-формазан беше записвана с помощта на четец на микроплаки LabeximLMR-1 на спектрофотометър (Anthos 2001, Anthos Labtec, Wels, Austria) при 540 nm, с референтен филтър 690 nm. Фракциите на клетъчната преживяемост бяха изчислени като

процент от нетретираната контрола. В допълнение, стойностите на IC50 бяха получени от кривите концентрация-отговор.

Количеството на виталните клетки (индекс на виталност) беше изчислено като съотношение между абсорбциите на пробите, третирани с различни концентрации и нетретираната контрола, изразено в проценти. Стандартното отклонение беше пресметнато за всяка приложена концентрация и за нетретираната контрола.

Получените опитни резултати са обработени чрез статистически методи с помощта на програмата Graph Pad Prism 6 и резултатите са представени графично с помощта на програма Microsoft Excel 2019.

2.14. Третиране на клетъчни линии с CBD и изследване чрез поточна цитометрия (Flow cytometry)

За провеждане на флоуцитометричен анализ са необходими по 10000 клетки на проба. Клетките в настоящата работа бяха зареждани в 6-ямкова плака с начална гъстота в диапазона $0.2-0.5 \times 10^6$ клетки/ml, съответстваща на избраната клетъчна гъстота за всяка клетъчна линия. Във всяка ямка бяха разпределяни по 5 ml от тази клетъчна суспензия и плаката беше оставяна за 24 часа в инкубатор при стандартни условия. След това клетките бяха третирани с предвидените цитостатици, като концентрациите на изходните разтвори бяха изчислявани така, че на ямка да не се добавят повече от 10 - 15 μ l от съответния изходен разтвор. Флоуцитометричният анализ беше проведен непосредствено след изтичане на времето за инкубиране на клетъчната линия с приложения цитостатик.

2.14.1. Анализ на клетъчния цикъл след пермеабилзация и оцветяване на ДНК с пропидиев йодид, известен още като метод на Nicoletti

Клетките бяха третирани с канабиноиди и инкубирани. След това те бяха центрофугирани при 1500 rpm за 5 минути и супернатантата беше отстранена. Клетките от всяка проба бяха ресуспендирани в 1ml PBS, центрофугирани и отново ресуспендирани в 0.5 ml PBS до получаването на клетъчна суспензия, съдържаща единични клетки. Към всяка проба беше добавян по 4.5 ml ледено студен 70%-ен етилов алкохол за фиксиране/пермеабилзиране на клетките, които бяха инкубирани при 4°C през нощта. На

следващия ден клетките бяха центрофугирани при 3000 rpm за 5 минути и ресуспендирани в PBS (5ml). След преброяване на клетките от различните клетъчни линии беше взет обем, съдържащ необходимия клетъчен брой. Клетъчната суспензия беше центрофугирана и клетките бяха ресуспендирани в PBS, съдържащ RNase (концентрация 1 mg/ml), като беше спазено правилото 300000 клетки да се ресуспендират в 150 µl PBS. Пробите след това бяха инкубирани за 30 минути при 37°C. Към всяка проба беше добавян по още 150 µl PBS, съдържащ Propidium iodide (PI) до достигане на крайна концентрация на PI 50 µg/ml. Така приготвените проби бяха съхранявани на тъмно на стайна температура за 30 минути преди FACS анализа.

2.15. Биоаналитично количествено определяне на CBD чрез високоефективен течен хроматографски (HPLC) метод

Използваният метод е валидиран за анализ на общото съдържание на THC (THC + THCOOH) в растителния канабис след екстракция с метанол/хлороформ и последващо декарбоксилиране. Валидирането обхващаше целия процес, от подготовката на пробата до HPLC анализа.

Тип колона: 250x4mm RP-8 (5 µm); предварителна колона 4x4mm RP-8 (5 µm).

Температура на колоната: 30°C

Мобилна фаза: ацетонитрил: вода (8:2 v/v), изократичен, време на спиране 8 минути

Поток: 1 ml/min

Откриване: Фотодиодна клетка (PDA), 220 nm и 240 nm

Инжекция: 10 µl

Ред на елуиране: CBD, CBN, THC, THCA (ако декарбоксилирането не се извършва или е непълно).

Пробо-подготовката беше извършена с 500 mg сух и хомогенизиран растителен канабис, който беше екстрахиран с 5 ml метанол: хлороформ (9:1 v/v) по следната процедура: 10 секунди във вихър, 15 минути ултразвукова баня, отново завихряне след 5, 10 и 15 минути, след това центрофугиране.

200 µl от горния екстракт беше прехвърлен в съд за дериватизация. Разтворителят беше изпаряван под азотен газ до сухо. Пробата беше декарбоксилирана за 15 минути при 210°C. Остатъкът беше разтварян в 200 µl метанол: хлороформ (9:1 v/v). Горният разтвор за декарбоксилиране беше разреждан с метанол с коефициент 100 (на два етапа, всеки 100 µl + 900 µl) и след това използван за анализ. За по-ниско съдържание на CBD (<0.5 %) е достатъчен коефициент на разреждане 10 вместо 100.

Калибрирането е представено в таблица 6:

Основен разтвор: Стандартен разтвор 1 mg (-) - CBD/ml метанол

Разреждане 1: 100 µl (изходен разтвор) + 900 µl метанол = 0.1 mg CBD/ml метанол

Разреждане 2: 100 µl (разреждане 1) + 900 µl метанол = 0.01 mg CBD/ml метанол

За качествена идентификация времето на задържане, както и DAD спектърът на канабиноида трябва да съвпадат. Изчисляването на количествените резултати беше извършено при дължини на вълните 220 и 240 nm (таблица 7).

Таблица 6. Калибриране при HPLC

<i>No.</i>	<i>Concentration (mg/ml)</i>	<i>STD (vol. of standard)</i>	<i>Methanol (vol. of methanol)</i>
1	0.001	10 µl 0.01 mg/ml	90 µl
2	0.005	50 µl 0.01 mg/ml	50 µl
3	0.01	10 µl 0.1 mg/ml	90 µl
4	0.05	50 µl 0.1 mg/ml	50 µl
5	0.1	100 µl 0.1 mg/ml	0 µl

Таблица 7. HPLC анализ на екстракт от растителен канабис

<i>Substance</i>	<i>Retention time (min)*</i>	<i>Relative retention time*</i>
Cannabidiol	4.9	0.69
Cannabinol	6.0	0.85
(-)-Δ ⁹ -THC	7.1	1.00
(-)-Δ ⁹ -THC acid	7.4	1.04

* Извършва се на 250-4mm LiChrospher® 60 RP-select B (5µm) с предварително колона 4-4 LiChrospher® 60 RP-select B (5µm)

2.16. Статистически анализ на получените резултати

Всички експерименти в настоящия дисертационен труд бяха проведени в 3 повторения. Статистическата обработка на данните беше извършена с помощта на програмните продукти Microsoft Excel и GraphPad Prizm за PC, като концентрациите IC₅₀ бяха калкулирани използвайки програмата GraphPad Prism 6. Всички данни от МТТ-теста бяха анализирани и по отношение на тяхната статистическа достоверност. При сравняване на статистическата значимост на различията между данните за експерименталните и съответните контролни групи е използван **Student t-test** при $p \leq 0.0001$, $p \leq 0.001$ и $p \leq 0.05$, зададени като критерии за сигнификантност и включени в компютърната програма за построяване на графики и статистическа обработка на цифрови данни "GraphPad Prizm". Използван е „non-linear regression curve fitting model Log (inhibitor) versus normalized response/ Variable Slope“: където X е логаритъм от дозата (концентрацията), Y – нормализиран отговор, намаляващ от 100% до 0% с увеличаване на X, Log IC₅₀ е в същите логаритмични единици като X, наклон на кривата, няма мерни единици.

Значимостта на различията между данните е анализирана използвайки **Student's t-test** (* $p < 0.05$). Също така, средната абсорбция (A_m) и ефектът (F_a) на всяка концентрация, нетретираните контроли и празния разтвор, както и стандартните отклонения (SD) бяха изчислени с помощта на софтуера GraphPad Prism. Стойностите на A_m бяха представени като фракции от нетретирана контрола (A_m), а стойностите на F_a бяха изчислени както следва:

$$F_a = 1 - A_m$$

3. Определяне на антивирусна активност на изследваните съединения

За тестване на потенциална антивирусна активност на канабиноидите беше използван човешки коронавирус щам 229E (HCoV-229E). Щамът беше предоставен за експериментална работа от вирусологичната банка на Института Робърт Кох, Германия. Като моделна система в проведените изпитвания беше използвана монослойна клетъчна линия от човешки ембрионален бял дроб Lер, която е от клетъчната банка на НРЛ „Клетъчни култури, рикетсии и онкогенни вируси“ НЦЗПБ, гр. София.

Lер-клетките бяха култивирани в хранителна среда DMEM, с добавени към нея термо-инактивиран 10 % FBS, 1 % натриев пируват (Sigma-Aldrich, Germany) и антибиотици (Penicillin

(100 U/ml), Streptomycin sulphate (100 µg/ml) (растежна среда). Клетъчната култура беше инкубирана на 37°C при 5% CO₂ и наличие на необходимата влажност на въздуха. Пасирането на Lep клетките беше извършено 1:3 – 1:5 с плътност около 2 X10⁵ клетки/ml, след което те бяха ресуспендирани неколkokратно и разляти в 25 cm² матраци за клетъчно култивиране (Orange Scientific, Belgium). Преди инокулиране на клетките с HCoV-229E, монослоят беше промит трикратно с фосфатно-солеви буфер (PBS) с pH 7.4 за 1–2 минути и разтворът беше отстранен. Всички експерименти бяха проведени по време на експоненциалната фаза на растежа на клетките.

Вирусната суспензия беше култивирана в поддържаща хранителна среда DMEM, съдържаща 2% FBS. Инфекциозният вирусен титър беше отчетен по два метода:

- 1) Метод на крайните разреждания на Reed and Muench, който се изразява като TCID₅₀ (50% Tissue Culture Infectious Dose) (реципрочното разреждане на вируса, при което 50% от клетъчната култура е инфектирана)
- 2) Колориметричен МТТ метод. След трикратно замразяване и размразяване, полученият вирус-съдържащ материал беше центрофугиран (2500 rpm/min, 15 min при 4°C), аликвотиран и замразен на -80°C.

За определяне на анти-HCoV-229E действие на изследвания 30% CBD/M/130720/3 екстракт бяха използвани концентрации около и близки до минималните ефективни (0.01 – 5 µg/mL). Пробите за отчитане на извънклетъчния вирус бяха титрирани в 24-часов монослой Lep в 96-ямкови плаки, с отчитане на инфекциозен вирусен титър в log₁₀, по метода на крайните разреждания на Reed & Muench.

3.1 Определяне на клетъчната жизнест

За оценка на относителната клетъчна преживяемост и пролиферация на тестваните екстракти бяха използвани два метода:

3.1.1. Микроскопско наблюдение на промените в морфологията на клетъчния монослой

Клетъчният монослой беше наблюдаван на всеки 24 часа под инверторен светлинен микроскоп за типична цитопатология, отразяваща токсичен ефект в третираните клетки. Анализът при наблюдението на клетъчната морфология на клетките от линия Lep беше синхронизиран с МТТ анализа на клетъчната преживяемост.

3.1.2. Колориметричен МТТ анализ по Mosmann (с малки модификации)

След преброяване на клетките и ресуспендиране в растежна хранителна среда, суплементирана с 2 % FBS, клетъчната суспензия с концентрация 5×10^4 клетки/ямка беше разсята в стерилни 96-ямкови плаки (Orange Scientific, Belgium) (по 0.2 ml/ямка). Поради експериментално получени данни, че в крайните редове и колони се наблюдава намаляване на обема при по-дълготрайно култивиране, в тях не бяха посявани клетки. Там беше накапвана само хранителна среда без FBS. Когато клетъчният монослой достигнеше около 70-80 % конfluентност (обикновено след 24 часа), надстоящата течност беше отдекантирана и бяха прибавяни по 0.1 ml поддържаща хранителна среда и по 0.1 ml от предварително приготвените разреждания от всеки екстракт в концентрационен диапазон 0.001–20 µg/mL. С всяко едно разреждане от екстрактите бяха накапани минимум по 3 ямки. В няколко ямки беше накапана само хранителна среда без вещество (по 0.2 ml), която служеше за клетъчна контрола. Тъй като използваният обем екстракт (с дадена концентрация) при накапване в ямката е разреден два пъти, реалната концентрацията на всяко добавено разреждане беше два пъти по-ниска от предварително приготвената. Така обработените плаки бяха инкубирани на 37°C в продължение на 72 часа. В края на третия ден във всяка ямка (без крайните редове и колони) беше накапан по 0.02 ml работен разтвор на МТТ (с изходна концентрация 0.05 mg/ml), след което плаките бяха инкубирани на 37°C в продължение на 3 часа. Хранителната среда с разтвореното в нея МТТ след инкубацията беше отстранена и беше добавен 0.2 ml от лизиращия разтвор, съдържащ етанол:DMSO (v:v). Така обработена плаката беше отчитана спектрофотометрично при $\lambda = 540 \text{ nm}$ с помощта на ELISA reader (Bio-Tek Instruments, Germany).

Клетъчната преживяемост беше определена като % на живите клетки в ямките, третирани с различни концентрации от изследваните екстракти, в сравнение с контролните нетретирани клетки. За целта беше използвана следната формула:

$$\% \text{ клетъчна преживяемост} = \frac{\text{Оптическа плътност}_{\text{третираните}}}{\text{Оптическа плътност}_{\text{клетъчна контрола}}} \times 100$$

Стойностите на максимална нетоксична концентрация (MNC) и 50% цитотоксична концентрация (CD_{50}) на растителните CBD екстракти спрямо Lер клетъчна линия бяха

изчислени въз основа на построената крива доза/клетъчна преживяемост с помощта на GraphPad Prism софтуер (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

CD₅₀ се дефинира като концентрацията на изследвания екстракт, при която 50% от клетките умират в резултат на токсичното действие на субстанцията.

Максимална нетоксична концентрация (MNC) е най-високата концентрация на изследвания екстракт, която не предизвиква увреждане или смърт на третираните клетки. Двете величини в експериментите са изразени в mg/ml.

3.2 Заразяване на клетъчни култури с HCoV-229E

3.2.1. Определяне на инфекциозен вирусен титър чрез метод на крайните разреждания на Reed-Muench

Непосредствено преди работа бяха приготвяни десетократни логаритмични разреждания на човешки коронавирус щам 229E (HCoV-229E) в поддържаща хранителна среда DMEM, съдържаща 2% FBS, 1% антибиотичен разтвор (100 U/ml Penicillin G sodium и 100 µg/ml Streptomycin sulphate). Когато клетъчният монослой достигне 70–80 % конfluентност (концентрация 5×10^3 клетки/ямка, обикновено след 24 h), хранителната среда в ямките беше отстранявана. Клетъчният монослой беше заразяван с приготвените вирусни разреждания в обем 0.1 ml, като с всяко едно вирусно разреждане бяха заразявани по 4 ямки. Вирусът беше абсорбиран за 1 час в термостат при температура 33°C, след което към всяка ямка беше добавяна по 0.1 ml поддържаща хранителна среда.

За контрола служеха четири ямки, в които имаше неинфектирани клетки. При поява на цитопатичен ефект (поява на окръглени клетки, дисеминирани неравномерно в клетъчния монослой, с тенденция към огнищност) се изчакваше до развитието на 50–75 % от клетъчния монослой (++/+++), или докато той спре да прогресира.

Вирусният инфекциозен титър се изразява като TCID₅₀ (50% Tissue Culture Infectious Dose), което представлява реципрочното разреждане на вируса, при което 50 % от клетъчната култура е инфектирана. Наличието или липсата на вирусен цитопатичен ефект беше определяно по следната формула:

$T = (\log \text{ от разреждането, при което \% заразени е над } 50\%) + (\text{фактор на пропорционалност} \times \log \text{ от фактора на разреждане}).$

Фактор на пропорционалност = $[(\% \text{ заразени над } 50\%) - 50\%] / [(\% \text{ заразени над } 50\%) - (\% \text{ заразени под } 50\%)].$

3.2.2. Инхибиране на цитопатичния ефект. Определяне на 50% инхибираща концентрация (IC_{50}) и селективен индекс (SI)

Антивирусното действие на CBD беше определяно чрез разработения от Mosmann MTT тест за определяне на клетъчната преживяемост, модифициран от Shigeta S. за бърз скрининг на съединения с противогрипно действие. Определянето на клетъчната жизнестойност на заразени с вирус и третирани с екстракт Lер клетки чрез MTT тест, е показателно за антивирусно действие на тествания екстракт.

Двадесет и четири часови монослойни култури от Lер клетки, посяти в 96-ямкови плаки (с гъстота 5×10^3 клетки/ямка) бяха инокулирани с десетократни логаритмични разреждания на съответните вирусни щамове, започвайки от 10^{-1} до 10^{-6} , включително, като с всяко разреждане бяха заразявани по 4 ямки. Обемът на инокулума вирусна суспензия/ямка беше 0.1 ml, при работна доза 100 TCID₅₀. Вирусът беше адсорбиран за 1 час в термостат при температура 33°C, след което към всяка ямка беше добавена по 0.1 ml поддържаща хранителна среда. След изтичане на времето за вирусната адсорбция плаката беше обработвана както следва:

- Клетъчна контрола (незаразени с вирус и нетретирани клетки) – към ямките определени за клетъчна контрола беше налива поддържаща хранителна среда.
- Вирусна контрола (заразени с вирус и нетретирани клетки) – към ямките определени за вирусна контрола беше налива по 0.1 ml поддържаща хранителна среда.
- Третирани инфектирани клетки (заразени с вирус и третирани с различни разреждания на CBD клетки) – в ямки беше налива по 0.1 ml от предварително приготвените разреждания на CBD.

Клетъчните култури бяха инкубирани в термостат на 33°C и 5% CO₂ и наблюдавани ежедневно под светлинен микроскоп за развитие на цитопатичен ефект. Ефектът от въздействието на CBD беше отчетен след инфектирането (*p.i.*). Инфекциозният титър беше изчисляван по метода на Reed и Muench. След отчитане на резултатите под микроскоп,

средата беше отливана, а плаките промиватни еднократно с по 0.2 ml/ямка PBS (pH = 7.2), след което преживяемостта на клетките беше определя чрез МТТ теста, както е описан по-горе.

Активността на тестваните екстракти беше изчислена като % протекция и се определи по формулата:

$$\% \text{ Цитопатичен ефект} = \frac{(OD_B - OD_{KB})}{(OD_{KCl} - OD_{KB})} \times 100, \text{ където:}$$

OD_B – Оптична плътност на заразените и третирани с екстракт клетки

OD_{KB} – Оптична плътност на заразените с вирус клетки (вирусна контрола)

OD_{KCl} – Оптична плътност на незаразени и не третирани клетки (клетъчна контрола)

Изчисленията бяха извършени с помощта на програмите: *GraphPad Prizm* software version 8.00 за Windows, *La Jolla California USA* и *Origin 6.1TM*.

50% инхибираща концентрация (IC_{50}) (концентрацията на CBD, която инхибира с 50% вирус-индуцирания цитопатичен ефект), се определи директно от кривата “доза–отговор”. Въз основа на съотношение от CD_{50} и IC_{50} беше изчислен селективния индекс ($SI = CD_{50}/IC_{50}$).

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 омрежване в замразено състояние изисква използването на вода като замразяващ разтворител (Petrov P et al, 2006). Наличието на органични разтворители като етанол, метанол и др. може да възпрепятства, както редовния процес на криоструктуриране, така и реакцията на омрежване (Petrov P et al., 2009). 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 (Kabanov AV et al., 2002).

По-специално, PEO101-b-PPO56-b-PEO101 (популярен под търговските наименования Poloxamer 407, Pluronic F127 и др.) се предлага като фармацевтичен продукт и се използва за разтваряне на активни вещества във фармацевтични формули (Dumortier G et al., 2006). Поради тази причина 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⁻¹, 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 нанокompозитни криогелове с висок GF добив (Pencheva V et al., 2018), мицеларният разтвор беше смесван с воден разтвор на HEC, омрежващ агент BAAm (или PEGDA) и фотоинициатор H₂O₂ (фигура 7).



Фигура 7. Изображение на празни и заредени с канабидиол криогели .

Образуването на нанокмпозитен супер-макропорест криогел беше осъществено, като бяха използвани два омрежващи агента, ВААм и PEGDA, при едно и също съдържание (30 тегл.% спрямо НЕС). Геловите, получени с ВААм, показват малко по-висок добив на гел фракция (GF) от тези с PEGDA (Таблица 8). Вероятната причина е съществуването на по-реактивни крайни групи на единица маса, тъй като ВААм има по-ниска моларна маса от PEGDA. Изсушените чрез замразяване криогелове, съдържащи CBD бяха леко жълтеникави, за разлика от белия чист НЕС криогел (Фигура 7).

Таблица 8. Добив на гел фракция и степен на набъбване на криогелове, получени чрез UV-облъчване на замразени водни системи, съдържащи НЕС (1 тегл.%), ВААм или PEGDA (0,3 тегл. %), PM (0; 0,3 тегл. %) и CBD (0; 0,1 тегл.%).

Прекурсори	Добив на гел фракция (%)	SD
НЕС/ВААм/PM/CBD	84 ± 3	50 ± 2
НЕС/PEGDA/PM/CBD	80 ± 2	54 ± 2
НЕС/ВААм/PM	90 ± 3	40 ± 1
НЕС/PEGDA/PM	87 ± 3	49 ± 2

Беше установено, че наличието на CBD в реакционната смес до известна степен пречи на процеса на омрежване. Чрез поддържане на концентрацията му до 10% от масата на НЕС, могат да се получат гелове с относително висок добив (80–85 %).

От практическа гледна точка малкият спад на GF добива на заредени с CBD криогелове в сравнение с празни е незначителен, тъй като геловите са компактни, еластични и лесни за работа. На пръв поглед поведението на набъбващите криогели във вода също предполага известна разлика в плътността на полимерната мрежа, получена в присъствието/отсъствието на CBD (Таблица 8). Обикновено по-плътните мрежи набъбват по-малко в течности.

Всъщност може да се предположи, че чрез на кисване 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. Трябва да се отбележи, че стратегията за вграждане на хидрофобно вещество в стените на криогела чрез описаната процедура може да бъде постигната само с водоразтворима форма на CBD като например мицеларен разтвор. Освен това видът на омрежващите агенти, използвани при приготвянето на нанокompatитни 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).

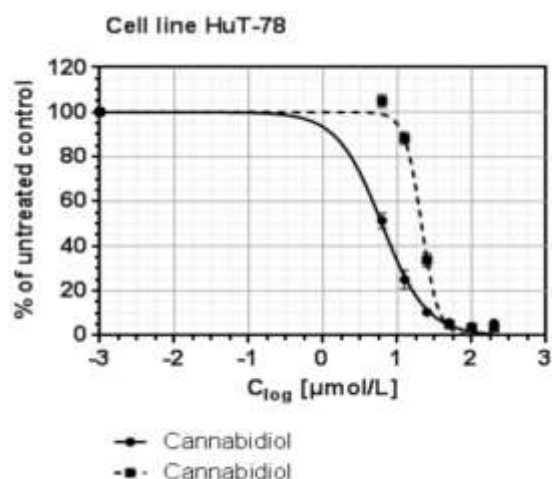
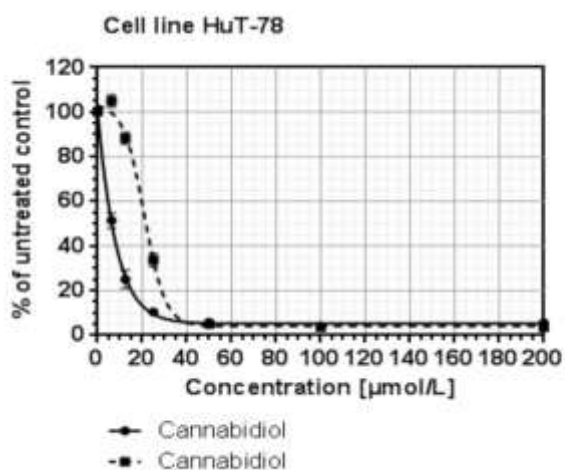
Получените нанокompatитни криогелове бяха меки и устойчиви на разкъсване при внимателно боравене. Техните виско-еластични характеристики, модули за съхранение (Gj) и загуба (Gjj) бяха оценени чрез динамични реологични измервания в режим на честота на трептене (0.3–10 Hz) (Momekova D et al., 2020).

Определено, нанокompatитните HEC 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 нанокompatитните криогели поемат значително количество вода, което в комбинация с биосъвместимостта на полимерите ги прави подходящи за приложение като иновативна лекарство-доставяща система.

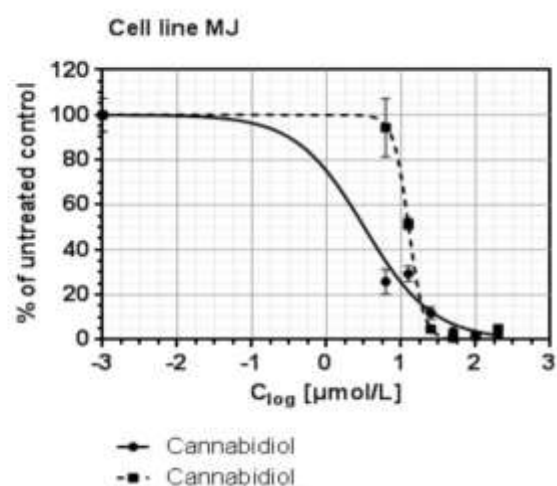
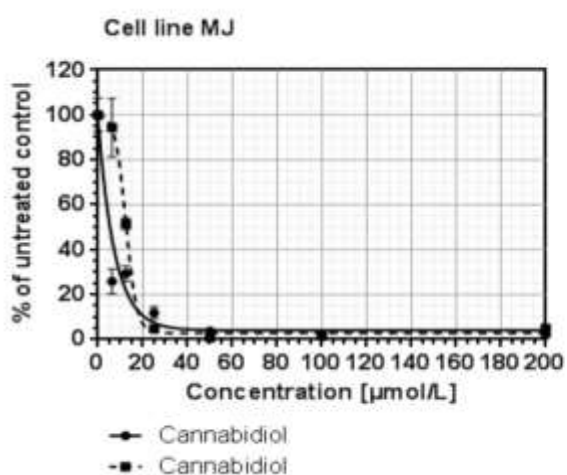
2. Оценка на антипролиферативния ефект на тестваните канабиноиди чрез МТТ

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

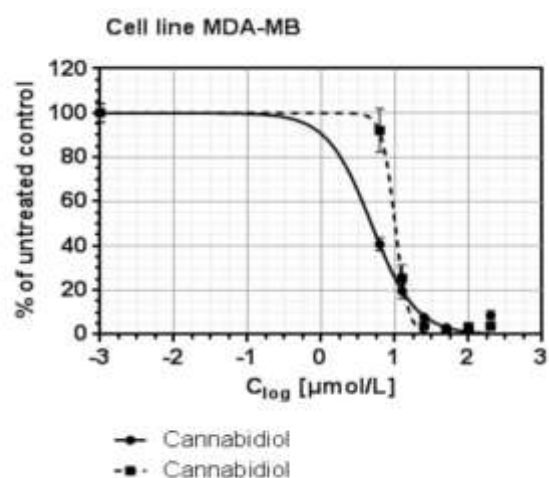
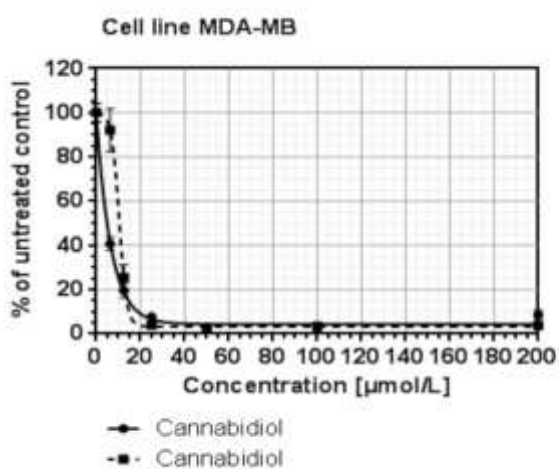
Всички концентрации бяха нормализирани до еднакво количество активна съставка - CBD. Установи се значителна разлика между тестваните екстракти в сравнение с чистият CBD. 30 % CBD екстракт от *Cannabis sativa* L. без THC демонстрира по-силна антинеопластична ефикасност срещу HuT-78 (IC₅₀ от 7.78 µmol/L) и MDA-MB-231 (IC₅₀ от 5.31 µmol/L) туморни клетки в сравнение с с 60% CBD екстракт (Фигура 8).



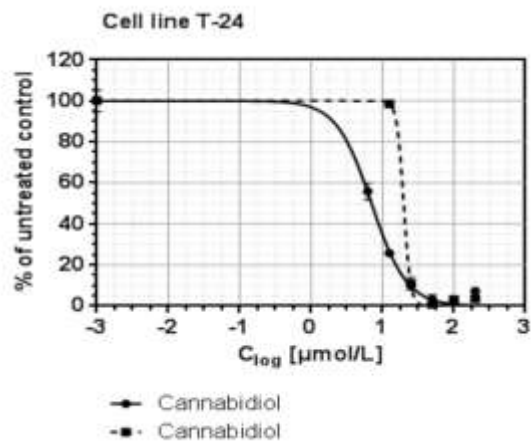
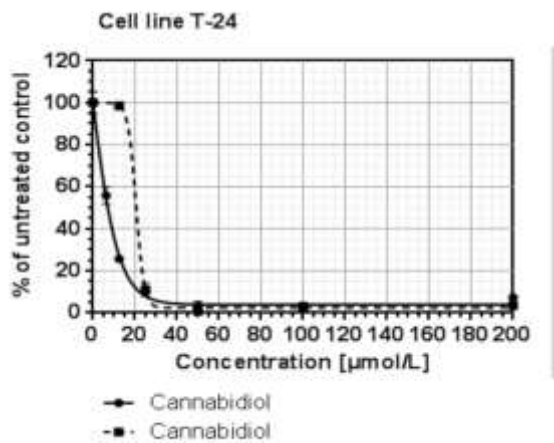
А. Чистият CBD демонстрира върху HuT-78 антипролиферативна активност с IC_{50} от 21.09 $\mu\text{mol/L}$.



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



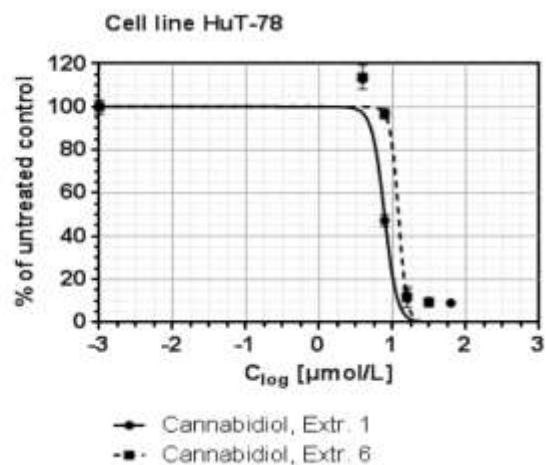
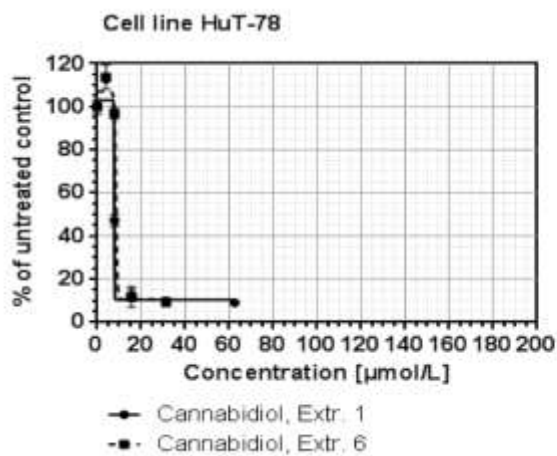
В. Чистият CBD проявява върху MDA-MB-231 клетки антипролиферативна активност с IC_{50} от 10.07 $\mu\text{mol/L}$.



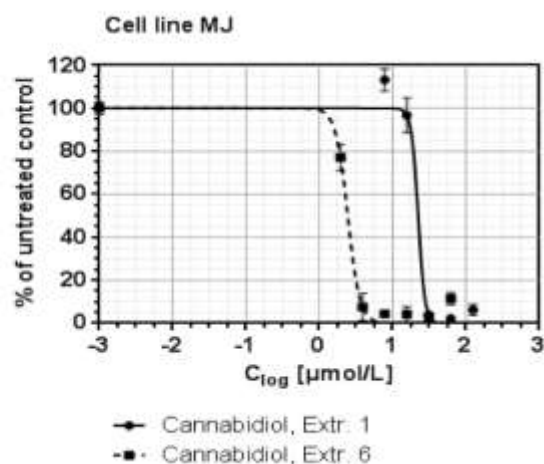
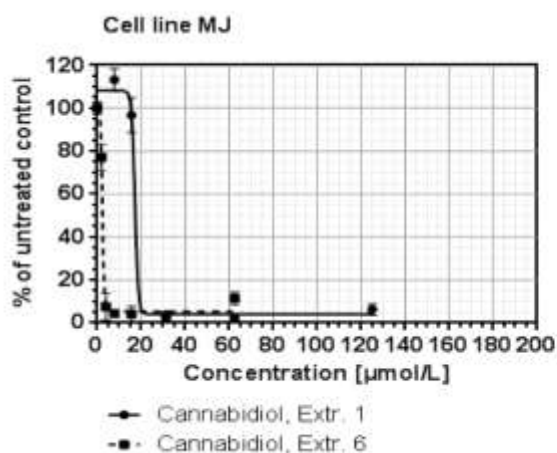
Г. Чистият CBD показва върху T-24 туморни клетки антипролиферативна активност с IC_{50} от $19.89 \mu\text{mol/L}$.

Фигура 8. IC_{50} на чист CBD върху туморни клетъчни линии: А) HuT-78; Б) MJ; В) MDA-MB-231; Г) T-24

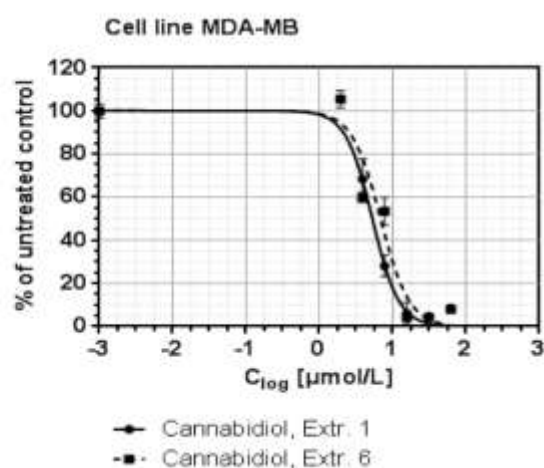
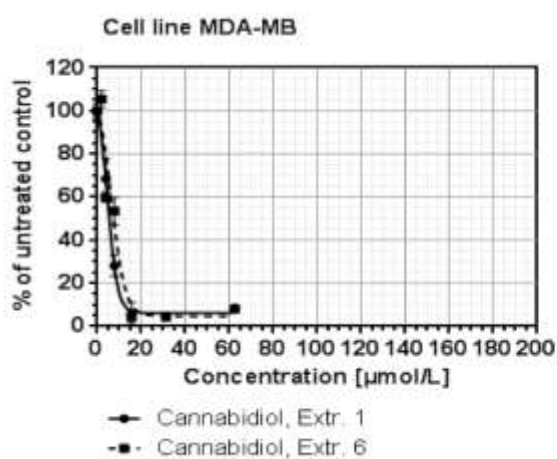
За разлика от тях, 60% CBD екстракт от *Cannabis sativa* L. без THC е по-активен при T-24 (IC_{50} от $0.12 \mu\text{mol/L}$) и MJ клетките (IC_{50} от $2.45 \mu\text{mol/L}$) (Фигура 9). Чистата субстанция CBD демонстрира по-слаба антипролиферативна активност при същите туморни клетъчни линии.



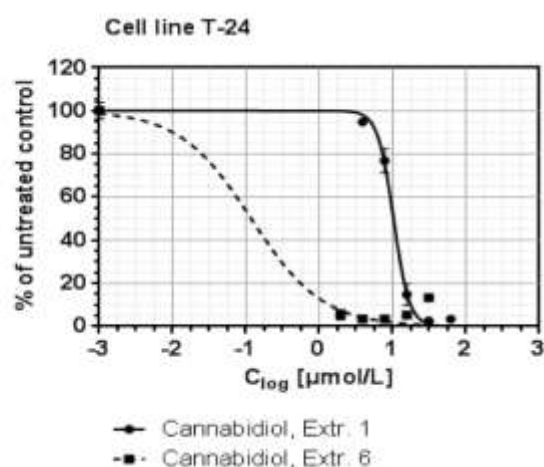
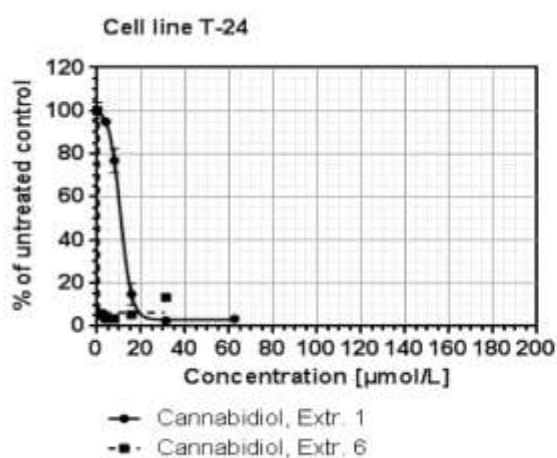
А. Антипролиферативна активност с IC_{50} на екстракти съдържащи CBD върху HuT-78. Extr.1 = 30 % CBD екстракт $IC_{50} = 7.77 \mu\text{mol/L}$; Extr.6 = 60% CBD екстракт $IC_{50} = 12.06 \mu\text{mol/L}$



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 9. 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 антинеопластичент 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.

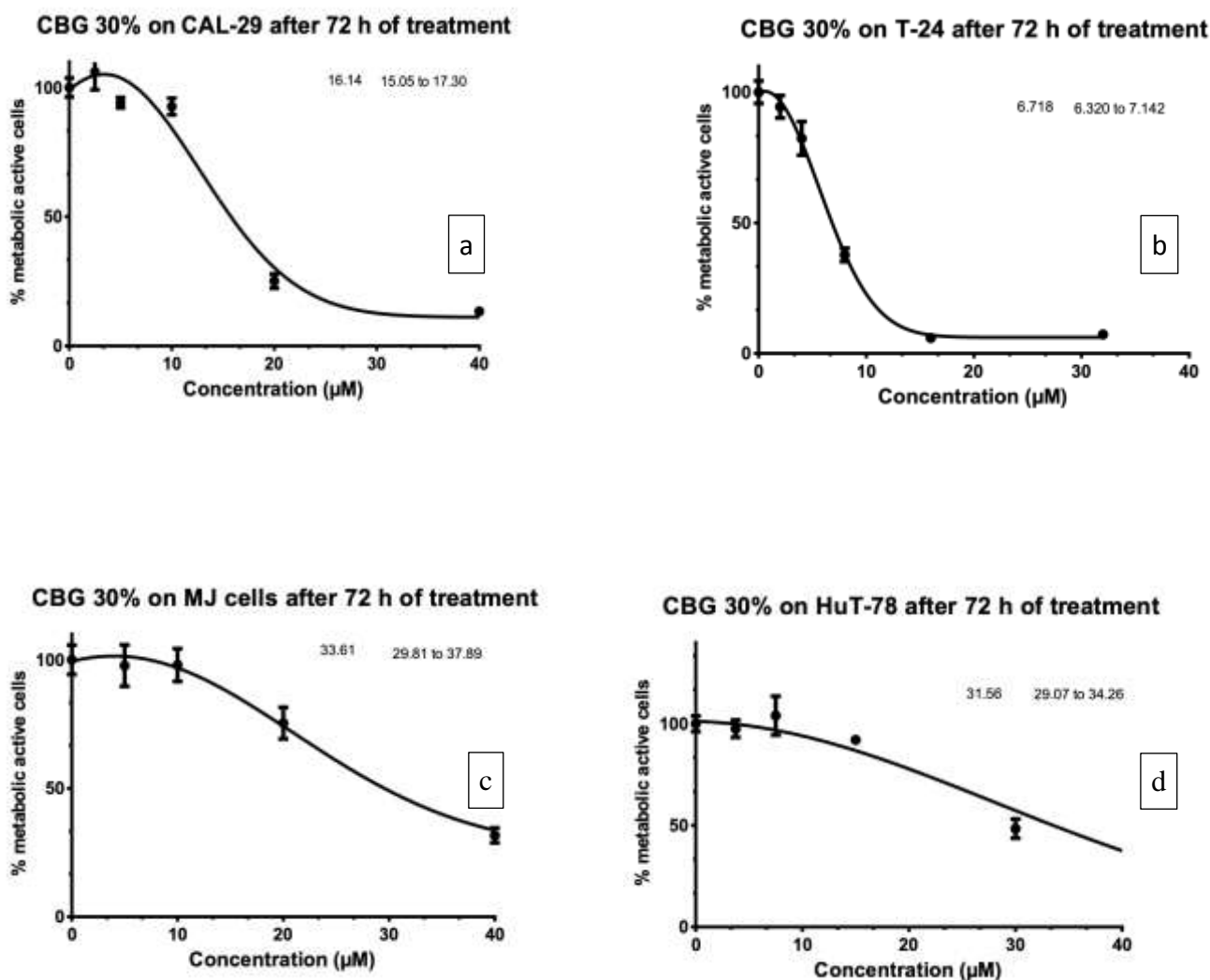
Важно е да се отбележи, че в условията на нашите експериментални *in vitro* модели, екстрактите от индустриален коноп с по-ниско процентно съдържание на канабидиол (60 %-но съдържание) демонстрираха неочаквано висок цитотоксичен ефект. Това може би се дължи на вероятно синергично взаимодействие на канабидиола 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

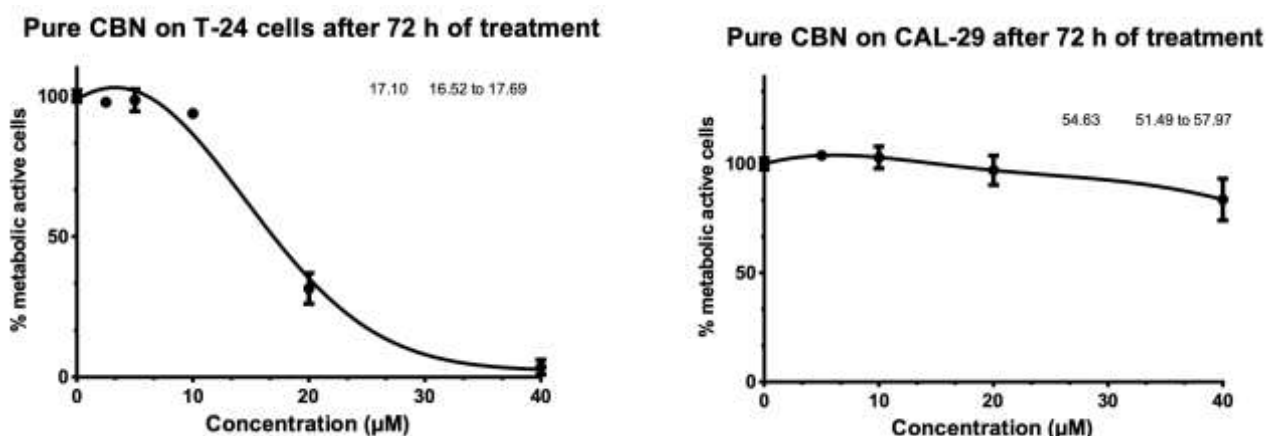
Екстрактът от *Cannabis sativa* с 30% съдържание на CBG също демонстрира антипролиферативна активност с IC_{50} от 6.718 (6.320-7.142) $\mu\text{mol/L}$ върху T-24 и с IC_{50} от 16.14 (15.06-17.30) $\mu\text{mol/L}$ върху CAL-29. Същия 30% CBG екстракт показва значително по-слабо антипролиферативно 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 10).



Фигура 10. Антипролиферативна активност на 72 час с IC_{50} на екстракт съдържащи 30 % CBG върху: a) CAL-29; b) T-24; c) MJ d) 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_{50} от 17.10 (16.52-17.69) $\mu\text{mol/L}$ към T-24 клетъчната линия в сравнение с CAL-29 от преходно-клетъчен карцином на пикочен мехур, където неговата IC_{50} е 54.63 (51.49-57.97) $\mu\text{mol/L}$ (фигура 11).



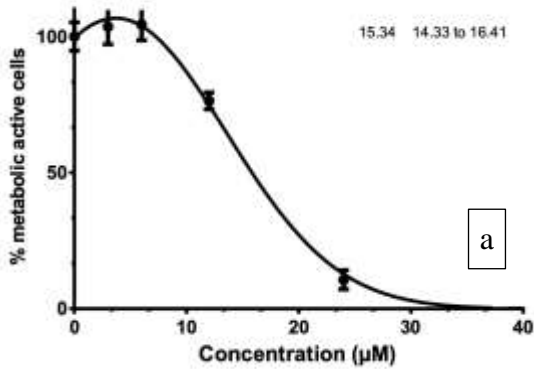
Фигура 11. Антипролиферативна активност на 72 час с IC_{50} на екстракт съдържащ чист CBN върху туморни клетки от преходно-клетъчен карцином на пикочен мехур, съответно T-24 и CAL-29.

2.4. Антипролиферативен ефект на CBD в нано-емулсия

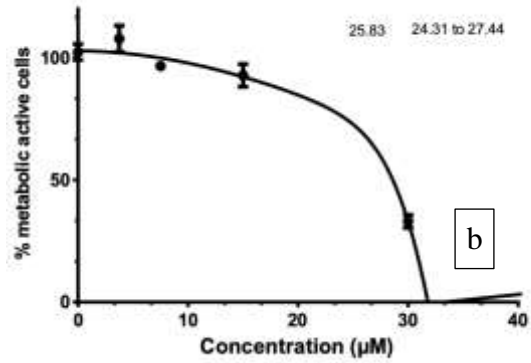
Чиста субстанция CBD поставена в нано-емулсия демонстрира влошена антипролиферативна активност с IC_{50} от 15.34 (14.33-16.41) $\mu\text{mol/L}$ срещу T-24 и с IC_{50} от 25.83 (24.31-27.44) $\mu\text{mol/L}$ срещу CAL-29 в сравнение с чистата субстанция в етанолов разтвор.

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 12).

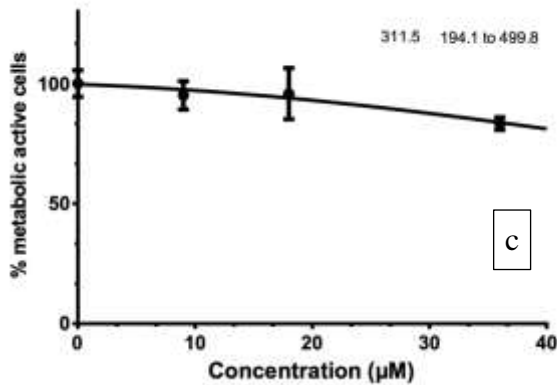
CBD (H₂O) 20% on T-24 cells after 72 h of treatment



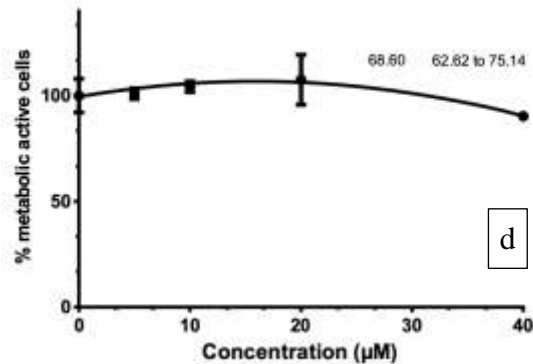
H₂O-CBD 20% on CAL-29 after 72 h of treatment



H₂O-CBD 20% on MJ cells after 72 h of treatment



H₂O-CBD 20% on HuT-78 after 72 h of treatment



Фигура 12. Антипролиферативна активност на nano-емулсия съдържаща CBD с IC₅₀ върху туморни клетки от: а) T-24, б) CAL-29, в) HuT-78 и г) MJ клетъчни линии

2.5. Антипролиферативен ефект на CBD в полимерни носители

Предимствата на нанокомполитния 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 13A).

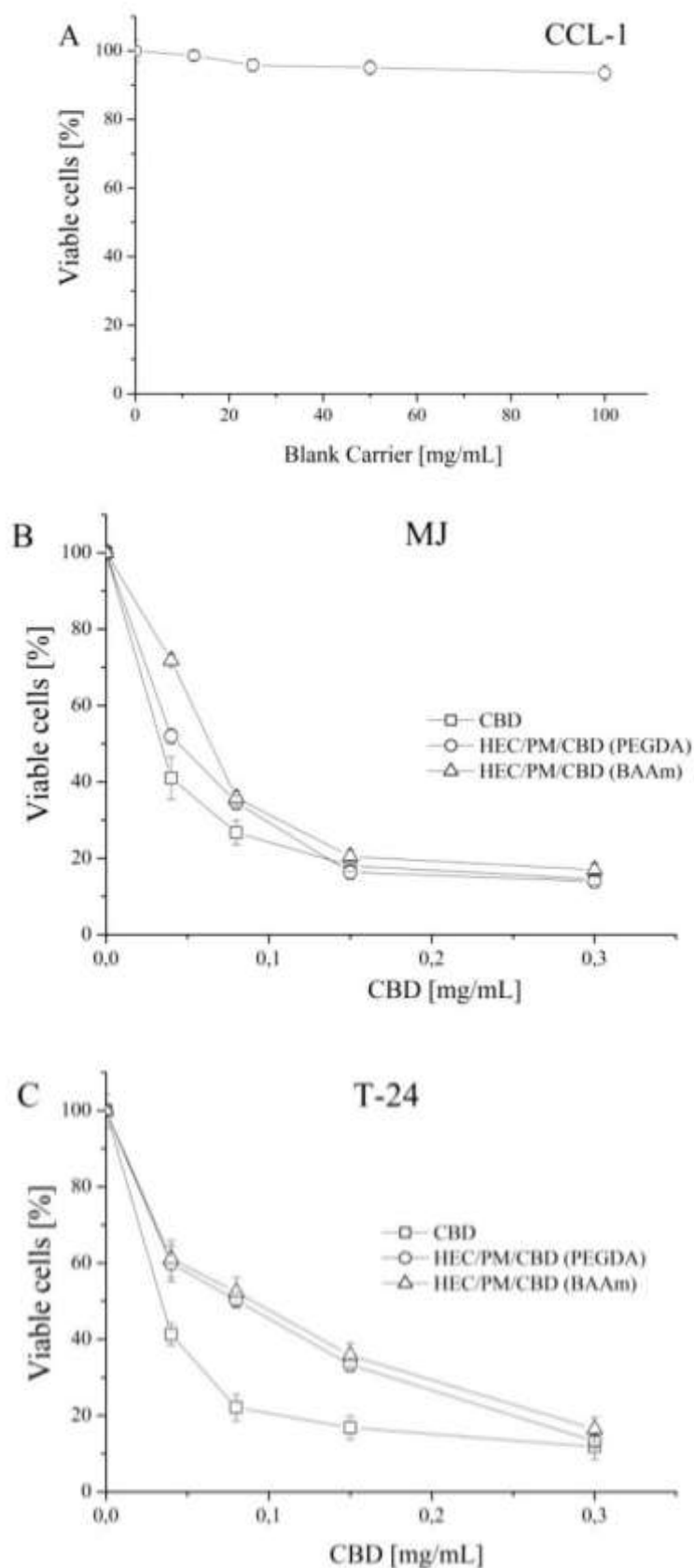
Във всички експерименти използвахме стандартен биотест за цитотоксичност, базиран на ензимното редуциране на жълтата тетразолиева сол МТТ до виолетов МТТ-формаза от митохондриалната сукцинатдеhidрогеназа в жизнеспособни клетки (Mosmann T, 1983) с леки модификации (Konstantinov S et al., 1999). Антинеопластичната 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 13В и С и получените от тях еквивалентни инхибиторни концентрации (IC_{50}) са обобщени в Таблица 9.

Таблица 9. Еквивалентни ефективни концентрации (IC_{50}) на свободен и включен в полимерен носител CBD за MJ и T-24 клетки.

Sample	IC_{50} ($mg \cdot mL^{-1}$)	
	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 13. 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 нанокomпозитни 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 нанокomпозитни 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.

2.6. Антипролиферативен ефект при комбинации от изследваните съединения с куркумин

На базата на подходите за активно планиране на експериментите с две лекарства бяха постигнати редица нови положителни резултати. Изследванията могат да бъдат продължени с още рационални комбинации (Таблица 10).

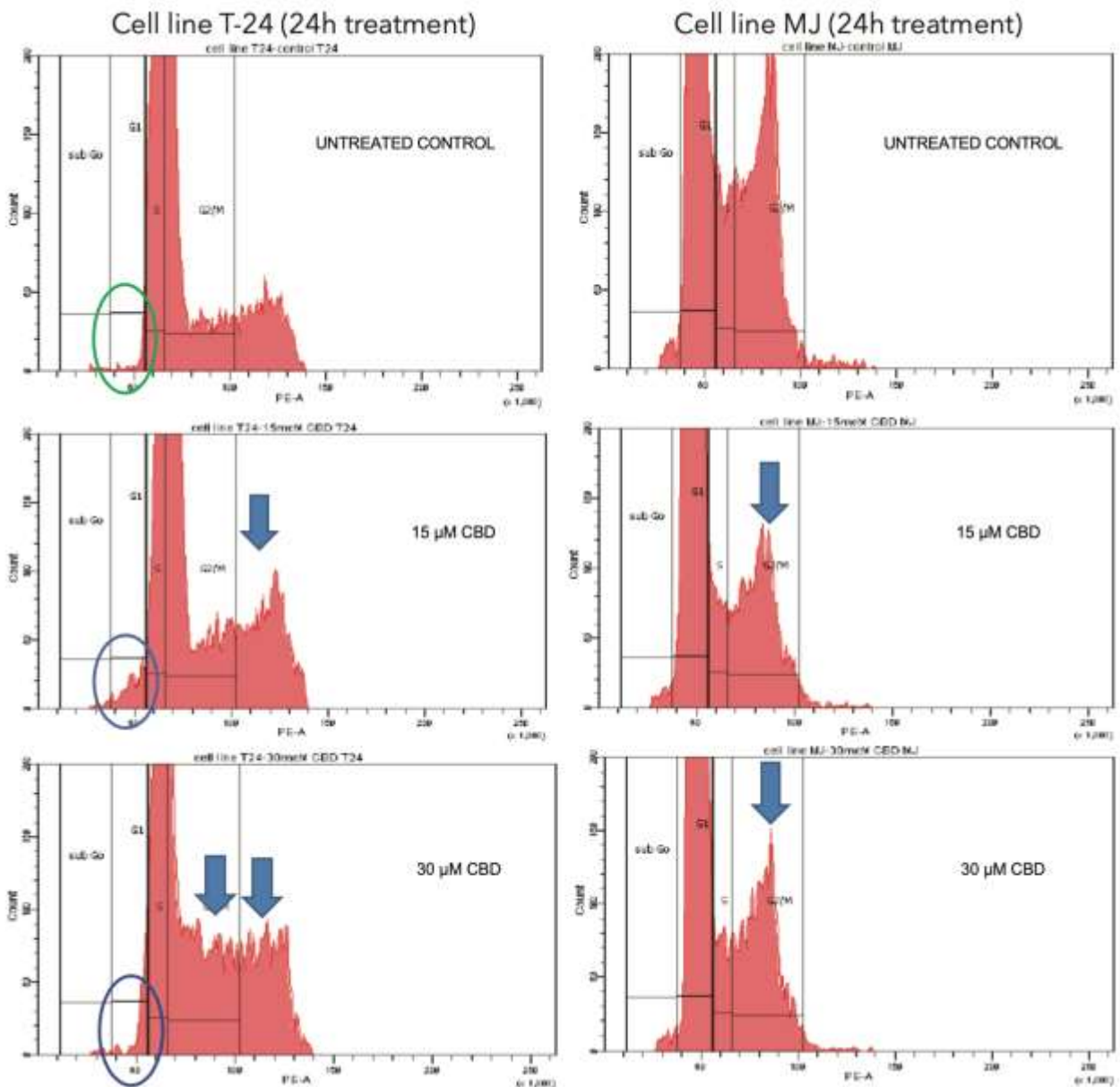
Таблица 10. Планиране на комбинации при константно съотношение между използваните субстанции 1 и 2 за клетъчна линия MJ

		Субстанция 1					
		0	0.25X (IC ₅₀) ₁	0.5X (IC ₅₀) ₁	1X (IC ₅₀) ₁	2X (IC ₅₀) ₁	4X (IC ₅₀) ₁
Субстанция 2	0	Контрол (f _a) ₀	1.5	3	6	12	24
	0.25X (IC ₅₀) ₂	3.75	(f _a) _{1/2}				
	0.5X (IC ₅₀) ₂	7.5		(f _a) _{1/2}			
	1X (IC ₅₀) ₂	15			(f _a) _{1/2}		
	2X (IC ₅₀) ₂	30				(f _a) _{1/2}	
	4X (IC ₅₀) ₂	60					(f _a) _{1/2}

Легенда: f_a – ефект от комбинацията, равен на 1 минус нормализирания инхибиращ ефект, представен като фракция от нетретираната контрола.

3. Флоуцитометрични данни след третиране със 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. MJ 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 MJ клетките и не повтаря модела на промени в T-24 клетките (Фигура 14).



Фигура 14. Флоуцитометрия след третиране на туморни клетки T-24 и MJ с CBD

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 времевият 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 Lер 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. Способността 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 формазанови кристали е пропорционално на броя на живите клетки.

Получените резултати показаха, че като цяло преживяемостта на третирания 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 нетретирани контролни клетки бяха запазили своята нормална форма, половината от третирани 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 11) следват тенденцията, установена при МТТ анализа.

Таблица 11. Влияние на 30% CBD/M/130720/3 екстракт върху преживяемостта/пролиферативната активност на клетки от линия Lep, отчетено чрез различни методи след 120 h на третиране

Изследвани екстракти	Метод	MNC (µg/mL)	CD ₅₀ (µg/mL)
30% CBD/M/130720/3	Микроскопско наблюдение на промените в морфологията на клетъчния монослой	1 ± 0.1	10.0 ± 0.13
	МТТ тест	1 ± 0.12	12.5 ± 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 µg/mL до 5 µg/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 (IC₅₀).

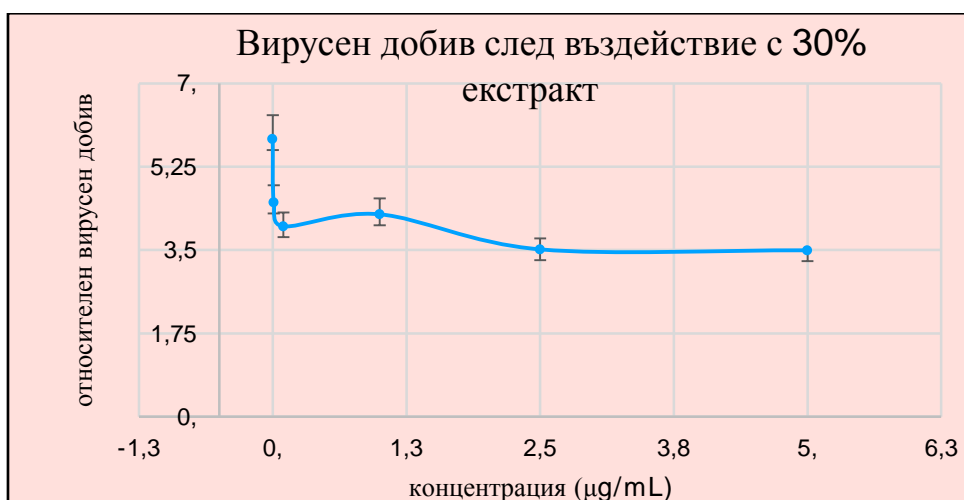
Първоначално, антивирусното действие на изследвания екстракт от 30% CBD/M/130720/3 беше оценено с тест за инхибиране на цитопатичния ефект. След заразяване на клетките с HCoV-229E цитопатичен ефект се разви след около 120 часа и се изразяваше в поява на окръглени клетки, дисеминирани неравномерно в клетъчния моно-слой, 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, заразените 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% (IC₅₀) 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% (MIC₅₀). 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 15).



Фигура 15. 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 MIC₅₀ е 0.1 µg/mL (Таблица 12).

Таблица 12. Индивидуален ефект на екстракт съдържащ 30% CBD/M/130720/3 при отчитане на инфекциозния титър (\log_{10} TCID₅₀/0.2 mL)

Вирусен щам	Концентрация (µg/mL)	Вирусен добив (\log_{10} TCID ₅₀)*	$\Delta\log_{10}$
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_{50}), без да се интересуваме от механизма или мишената на този ефект.

IC_{50} 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_{50}/IC_{50} .

Въз основа на експерименталните резултати бяха отчетени основните химиотерапевтични показатели IC_{50} и SI на тествания екстракт 30% CBD/M/130720/3, които са представени в Таблица 13. Данните в Таблица 13 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 13. Анти-HCoV-229E активност на екстракт съдържащ 30% CBD/M/130720/3. Основни химиотерапевтични показатели - IC_{50} и SI

Изследвани екстракти	MNC ($\mu\text{g/mL}$)	CD_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	HCoV-229E		
			IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	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 ($\mu\text{mol/L}$)		
	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 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 β -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 нанокompatитни HES/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 HES 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 MJ клетки от КТКЛ.

3. CBD има антивирусно и вирусозащитно 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 показаха 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 концен-

трации, 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 нано-композитни 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. Библиография

Adams R. Marihuana. Harvey Lectures. 37 168–197: 1941–1942.

Aizpurua-Olaizola O, Soydaner U, Öztürk E, Schibano D, Simsir Y, Navarro P, Etxebarria N, Usobiaga A. Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of Cannabis sativa Plants from Different Chemotypes. J Nat Prod; 79(2):324-331, 2016.

Alvarez-Lorenzo C, Blanco-Fernandez B, Puga AM, Concheiro A. Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery. Adv Drug Deliv Rev; 65(9):1148-1171, 2013.

Andre CM, Hausman JF, Guerriero G. Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. Front Plant Sci; 67:19, 2016.

Amirikia KC, Mills P, Bush J, Newman LA. Higher population-based incidence rates of triple-negative breast cancer among young African-American women: Implications for breast cancer screening recommendations. Cancer; 117(12):2747-2753, 2011.

Armstrong JL, Hill DS, McKee CS, Hernandez-Tiedra S, Lorente M, Lopez-Valero I, Eleni Anagnostou M, Babatunde F, Corazzari M, Redfern CPF, Velasco G, Lovat PE. Exploiting cannabinoid-induced cytotoxic autophagy to drive melanoma cell death. J Invest Dermatol; 135(6):1629-1637, 2015.

Atsmon J, Heffetz D, Deutsch L, Deutsch F, Sacks H. Single-Dose Pharmacokinetics of Oral Cannabidiol Following Administration of PTL101: A New Formulation Based on Gelatin Matrix Pellets Technology. Clin Pharmacol Drug Dev; 7(7):751-758, 2018.

Appendino G, Chianese G, Tagliatela-Scafati O. Cannabinoids: occurrence and medicinal chemistry. Curr Med Chem; 18(7):1085-1099, 2011.

Avery J, Kim SR, Cheng W, Foss F, Girardi M. FISH Panel for Leukemic Cutaneous T-Cell Lymphoma: Extended Patient Cohort Correlation with Blood Involvement and Clinical Outcomes. JID Innov; 3(5):100212, 2023.

Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, *et al.* European Association of Urology (EAU). EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update. Eur Urol; 59(6):997-1008, 2011.

Barclay TG, Day CM, Petrovsky N, Garg S. Review of polysaccharide particle-based functional drug delivery. Carbohydr Polym; 221:94-112, 2019.

Bargou RC, Mapara MY, Zugck C, Daniel PT, Pawlita M, Döhner H, Dörken B. Characterization of a novel Hodgkin cell line, HD-MyZ, with myelomonocytic features mimicking Hodgkin's disease in severe combined immunodeficient mice. *J Exp Med*; 177(5):1257-1268, 1993.

Blázquez C, Carracedo A, Salazar M, Lorente M, Egia A, González-Feria L, Haro A, Velasco G, Guzmán M. Down-regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in gliomas: a new marker of cannabinoid antitumoral activity? *Neuropharmacology*; 54(1):235-243, 2008.

Blázquez C, Carracedo A, Barrado L, *et al.* Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *FASEB J*; 20(14):2633-2635, 2006.

Bieri U, Kranzbühler B, Wettstein MS, *et al.* Limited Value of Bladder Wash Cytology During Follow-Up of Patients With Non-muscle Invasive Bladder Cancer. *Cureus* 2023; 15(6):e40283, 2023.

Bifulco M, Malfitano AM, Pisanti S, Laezza C. Endocannabinoids in endocrine and related tumours. *Endocr Relat Cancer*; 15(2):391-408, 2008.

Bifulco M, Laezza C, Gazerro P, Pentimalli F. Endocannabinoids as emerging suppressors of angiogenesis and tumor invasion (review). *Oncol Rep*; 17(4):813-816, 2007.

Bifulco M, Laezza C, Pisanti S, Gazerro P. Cannabinoids and cancer: pros and cons of an antitumour strategy. *Br J Pharmacol*; 148(2):123-135, 2006.

Bifulco M, Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system in cancer therapy: a call for further research. *Nat Med*; 8(6):547-550, 2002.

Bini A, Salerno S, Protti S, Pollastro F, Profumo A, Morini L, Merli D. Photodegradation of cannabidiol (CBD) and Δ^9 -THC in cannabis plant material. *Photochem Photobiol Sci*; 23(7):1239-1249, 2024.

Birnbaum AK, Karanam A, Marino SE, *et al.* Food effect on pharmacokinetics of cannabidiol oral capsules in adult patients with refractory epilepsy. *Epilepsia*; 60(8):1586-1592, 2019.

Borrelli F, Pagano E, Romano B, Panzera S, Maiello F, Coppola D, De Petrocellis L, Buono L, Orlando P, Izzo AA. Colon carcinogenesis is inhibited by the TRPM8 antagonist cannabigerol, a Cannabis-derived non-psychoactive cannabinoid. *Carcinogenesis*; 35(12):2787-2797, 2014.

Bryan RT, Wei W, Shimwell NJ, *et al.* Assessment of high-throughput high-resolution MALDI-TOF-MS of urinary peptides for the detection of muscle-invasive bladder cancer. *Proteomics Clin Appl*; 5(9-10):493-503, 2011.

Bruni N, Della Pepa C, Oliaro-Bosso S, *et al.* Cannabinoid Delivery Systems for Pain and Inflammation Treatment. *Molecule*; 23(10):2478, 2018.

Caffarel MM, Sarrió D, Palacios J, Guzmán M, Sánchez C. Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation. *Cancer Res*; 66(13):6615-6621, 2006.

Cahn RS. Cannabis indica resin. Part III. The constitution of Cannabinol. *J Chem Soc*; 1342–1353, 1932.

Carracedo A, Gironella M, Lorente M, *et al.* Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes. *Cancer Res*; 66(13):6748-6755, 2006.

Chatow L, Nudel A, Neshher I, Hayo Hemo D, Rozenberg P, Voropaev H, *et al.* Evaluation of the Activity of Terpenes and Cannabidiol Against Human Coronavirus E229. *Life Basel Switz*; 11:290, 2021.

Chazotte B. Labeling nuclear DNA with hoechst 33342. *Cold Spring Harb Protoc*; 2011(1):pdb.prot5557, 2011.

Chayasirisobhon S. Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of Cannabis. *Perm J*; 25:1-3, 2020.

Cheng A, Zhang S, Meng F, Xing M, Liu H, Yang G, Gao Y. Nanosuspension-Loaded Dissolving Microneedle Patches for Enhanced Transdermal Delivery of a Highly Lipophilic Cannabidiol. *Int J Nanomedicine*; 19:4061-4079, 2024.

Cherniakov I, Izgelov D, Barasch D, *et al.* Piperine-pro-nanolipospheres as a novel oral delivery system of cannabinoids: Pharmacokinetic evaluation in healthy volunteers in comparison to buccal spray administration. *J Control Release*; 266:1-7, 2017.

Chou R, Gore JL, Buckley D, *et al.* Urinary Biomarkers for Diagnosis of Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med*; 163(12):922-931, 2015.

Cianchi F, Papucci L, Schiavone N, *et al.*. Cannabinoid receptor activation induces apoptosis through tumor necrosis factor alpha-mediated ceramide de novo synthesis in colon cancer cells. *Clin Cancer Res*; 14(23):7691-7700, 2008.

Cinar R, Godlewski G, Liu J, Tam J, Jourdan T, Mukhopadhyay B, Harvey-White J, Kunos G. Hepatic cannabinoid-1 receptors mediate diet-induced insulin resistance by increasing de novo synthesis of long-chain ceramides. *Hepatology*; 59(1):143-153, 2014.

Clarke RC, Merlin MD. Cannabis taxonomy: the 'sativa' vs. 'indica' debate. *HerbalGram*; 110:44-49, 2016.

Crown J, O'Shaughnessy J, Gullo G. Emerging targeted therapies in triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*; 23 Suppl 6:vi56-65, 2012.

da Silva Almeida AC, Abate F, Khiabani H, *et al.* The mutational landscape of cutaneous T cell lymphoma and Sézary syndrome. *Nat Gene*; 47(12):1465-1470, 2015.

Dean JL, McClendon AK, Stengel KR, Knudsen ES. Modeling the effect of the RB tumor suppressor on disease progression: dependence on oncogene network and cellular context. *Oncogene*; 29(1):68-80, 2010.

De Petrocellis L, Di Marzo V. An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*; 23(1):1-15, 2009.

De Petrocellis L, Ligresti A, Schiano Moriello A, Iappelli M, Verde R, Stott CG, Cristino L, Orlando P, Di Marzo V. Non-THC cannabinoids inhibit prostate carcinoma growth in vitro and in vivo: pro-apoptotic effects and underlying mechanisms. *Br J Pharmacol*; 168(1):79-102, 2013.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, *et al.* Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science (New York, NY)*; 258:1946-1949, 1992.

Di Marzo V, Petrosino S. Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol*; 18(2):129-140, 2007.

Dinu MV, Cocarta AI, Dragan ES. Synthesis, characterization and drug release properties of 3D chitosan/clinoptilolite biocomposite cryogels. *Carbohydr Polym*; 153:203-211, 2016.

Dragan ES, Dinu MV. Polysaccharides constructed hydrogels as vehicles for proteins and peptides. A review. *Carbohydr Polym*; 225:115210, 2019.

Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res*; 23(12):2709-2728, 2006.

Duvic M. Current treatment of Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Dermatol Online J*; 7(1):3, 2001.

Duvic M. Bexarotene and DAB(389)IL-2 (denileukin diftitox, ONTAK) in treatment of cutaneous T-cell lymphomas: algorithms. *Clin Lymphoma*; 1 Suppl 1:S51-5, 2000.

Edelson RL. Cutaneous T cell lymphoma: the helping hand of dendritic cells. *Ann N Y Acad Sci*; 941:1-11, 2001.

Ellert-Miklaszewska A, Kaminska B, Konarska L. Cannabinoids down-regulate PI3K/Akt and Erk signalling pathways and activate proapoptotic function of Bad protein. *Cell Signal*; 17(1):25-37, 2005.

EUCAST. Antimicrobial Wild Type Distributions of Microorganisms, 2016, Available at: <http://mic.eucast.org/Eucast2/>

Ezzili C, Otrubova K, Boger DL. Fatty acid amide signaling molecules. *Bioorg Med Chem Lett*; 20(20):5959-5968, 2010.

Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect*; 109 Suppl 1: 69-75, 2001.

Filipiuc SI, Neagu AN, Uritu CM, *et al*. The Skin and Natural Cannabinoids-Topical and Transdermal Applications. *Pharmaceuticals (Basel)*; 16(7):1049, 2023.

Franco V, Gershkovich P, Perucca E, Bialer M. The Interplay Between Liver First-Pass Effect and Lymphatic Absorption of Cannabidiol and Its Implications for Cannabidiol Oral Formulations. *Clin Pharmacokinet*; 59(12):1493-1500, 2020.

Fraguas-Sánchez AI, Martín-Sabroso C, Torres-Suárez AI. Insights into the effects of the endocannabinoid system in cancer: a review. *Br J Pharmacol*; 175(13):2566-2580, 2018.

Freimuth N, Ramer R, Hinz B. Antitumorigenic effects of cannabinoids beyond apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther*; 332(2):336-344, 2010.

Fujimura T, Amagai R, Kambayashi Y, Aiba S. Topical and Systemic Formulation Options for Cutaneous T Cell Lymphomas. *Pharmaceutics*; 13(2):200, 2021.

Galve-Roperh I, Sánchez C, Cortés ML, *et al.* Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med*; 6(3):313-319, 2000.

Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc*; 86:1646-1647, 1964.

Garcia-Arencibia M, Molina-Holgado E, Molina-Holgado F. Effect of endocannabinoid signalling on cell fate: life, death, differentiation and proliferation of brain cells. *Br J Pharmacol*; 176(10):1361-1369, 2019.

García-Valverde MT, Sánchez-Carnerero Callado C, Díaz-Liñán MC, Sánchez de Medina V, Hidalgo-García J, Nadal X, Hanuš L, Ferreiro-Vera C. Effect of temperature in the degradation of cannabinoids: From a brief residence in the gas chromatography inlet port to a longer period in thermal treatments. *Front Chem*; 10:1038729, 2022.

Gemmill R. Cutaneous T-cell lymphoma. *Semin Oncol Nurs*; 22(2):90-96, 2006.

Georgakopoulos I, Papadavid E, Platoni K, *et al.* Clinical application of Total Skin Electron Beam (TSEB) therapy for the management of T cell cutaneous lymphomas. The evolving role of low dose (12 Gy) treatment schedule. *Clin Transl Radiat Oncol*; 15:26-30, 2018.

Gershkovich P, Hoffman A. Uptake of lipophilic drugs by plasma derived isolated chylomicrons: linear correlation with intestinal lymphatic bioavailability. *Eur J Pharm Sci*; 26(5):394-404, 2005.

Gilson D, Whittaker SJ, Child FJ, *et al.* British Association of Dermatologists and U.K. Cutaneous Lymphoma Group guidelines for the management of primary cutaneous lymphomas 2018. *Br J Dermatol*; 180(3):496-526, 2019.

Girardi M, Heald PW, Wilson LD. The pathogenesis of mycosis fungoides. *N Engl J Med*; 350(19):1978-1988, 2004.

Gjerstorff MF, Benoit VM, Laenkholm AV, Nielsen O, Johansen LE, Ditzel HJ. Identification of genes with altered expression in medullary breast cancer vs. ductal breast cancer and normal breast epithelia. *Int J Oncol*; 28(6):1327-1335, 2006.

Gómez del Pulgar T, Velasco G, Sánchez C, Haro A, Guzmán M. De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. *Biochem J*; 363(Pt 1):183-188, 2002.

Gopaluni S, Perzova R, Abbott L, *et al.* CD8+ cutaneous T-cell lymphoma successfully treated with bexarotene: a case report and review of the literature. *Am J Hematol*; 83(9):744-776, 2008.

Gosmann J, Stadler R, Quint KD, *et al.* Use of Pegylated Interferon Alpha-2a in Cutaneous T-cell Lymphoma: A Retrospective Case Collection. *Acta Derm Venereol*; 103:adv10306, 2023.

Grotenhermen F. Pharmacology of cannabinoids. *Neuro Endocrinol Lett*; 25(1-2):14-23, 2004.

Grotenhermen F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokinet*; 42(4):327-360, 2003.

Grossman AB, Burgin DJ, Rice KC. Quantification of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation by Crystal Violet and Confocal Microscopy. *Methods Mol Biol*; 2341:69-78, 2021.

Guindon J, Hohmann AG. The endocannabinoid system and cancer: therapeutic implication. *Br J Pharmacol*; 163(7):1447-1463, 2011.

Guy G, Robson P. A Phase I, double blind, three-way crossover study to assess the pharmacokinetic profile of cannabis based medicine extract (CBME) administered sublingually in variant cannabinoid ratios in normal healthy male volunteers (GWPK02125). *J Cannabis Ther*, 3: 121–152, 2003.

Hammell DC, Zhang LP, Ma F, *et al.* Transdermal cannabidiol reduces inflammation and pain-related behaviours in a rat model of arthritis. *Eur J Pain*; 20(6):936-948, 2016.

Haspula D, Clark MA. Cannabinoid Receptors: An Update on Cell Signaling, Pathophysiological Roles and Therapeutic Opportunities in Neurological, Cardiovascular, and Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci*; 21(20):7693, 2020.

Hellriegel ET, Bjornsson TD, Hauck WW. Interpatient variability in bioavailability is related to the extent of absorption: implications for bioavailability and bioequivalence studies. *Clin Pharmacol Ther*; 60(6):601-607, 1996.

Hoppe RT, Harrison C, Tavallae M, *et al.* Low-dose total skin electron beam therapy as an effective modality to reduce disease burden in patients with mycosis fungoides: results of a pooled analysis from 3 phase-II clinical trials. *J Am Acad Dermatol*; 72(2):286-92, 2015.

Howlett AC. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*; 68-69:619-631, 2002.

Huang SM, Bisogno T, Petros TJ, *et al.* Identification of a new class of molecules, the arachidonyl amino acids, and characterization of one member that inhibits pain. *J Biol Chem*; 276(46):42639-44, 2001.

Huestis MA. Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chem Biodivers*; 4(8):1770-1804, 2007.

Im P, Kim J. On-Demand Macroscale Delivery System Based on a Macroporous Cryogel with a High Drug Loading Capacity for Enhanced Cancer Therapy. *ACS Biomater Sci Eng*; 4(10):3498-3505, 2018.

Ingels F, Beck B, Oth M, Augustijns P. Effect of simulated intestinal fluid on drug permeability estimation across Caco-2 monolayers. *Int J Pharm*; 274(1-2):221-232, 2004.

Irrera N, Bitto A, Sant'Antonio E, Lauro R, Musolino C, Allegra A. Pros and Cons of the Cannabinoid System in Cancer: Focus on Hematological Malignancies. *Molecules*; 26(13):3866, 2021.

ISO 20776–1:2006. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices – Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.

Itin C, Barasch D, Domb AJ, Hoffman A. Prolonged oral transmucosal delivery of highly lipophilic drug cannabidiol. *Int J Pharm*; 581:119276, 2020.

Itin C, Domb AJ, Hoffman A. A meta-opinion: cannabinoids delivered to oral mucosa by a spray for systemic absorption are rather ingested into gastro-intestinal tract: the influences of fed / fasting states. *Expert Opin Drug Deliv*; 16(10):1031-1035, 2019.

Jaidee W, Siridechakorn I, Nessopa S, Wisuitiprot V, Chaiwangrach N, Ingkaninan K, Waranuch N. Kinetics of CBD, Δ^9 -THC Degradation and Cannabinol Formation in Cannabis Resin at Various Temperature and pH Conditions. *Cannabis Cannabinoid Res*; 7(4):537-547, 2022.

Javid FA, Phillips RM, Afshinjavid S, Verde R, Ligresti A. Cannabinoid pharmacology in cancer research: A new hope for cancer patients? *Eur J Pharmacol*; 775:1-14, 2016.

Jawed SI, Myskowski PL, Horwitz S, Moskowitz A, Querfeld C. Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): part I. Diagnosis: clinical and histopathologic features and new molecular and biologic markers. *J Am Acad Dermatol*; 70(2):205.e1-16; quiz 221-2, 2014.

Jonak C, Tittes J, Brunner PM, Guenova E. Mycosis fungoides and Sézary syndrome. *J Dtsch Dermatol Ges*; 19(9):1307-1334, 2021.

Jones CL, Ferreira S, McKenzie RC, *et al.* Regulation of T-plastin expression by promoter hypomethylation in primary cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol*; 132(8):2042-2049, 2012.

Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release*; 82(2-3):189-212, 2002.

Kalenderoglou N, Macpherson T, Wright KL. Cannabidiol Reduces Leukemic Cell Size - But Is It Important? *Front Pharmacol*; 8:144, 2017.

Kamijo H, Miyagaki T. Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: Updates and Review of Current Therapy. *Curr Treat Options in Oncol*, 22(2):10, 2021.

Kaminetzky D, Hymes KB. Denileukin diftitox for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Biologics*; 2(4):717-724, 2008.

Karenko L, Hahtola S, Ranki A. Molecular cytogenetics in the study of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL). *Cytogenet Genome Res*; 118(2-4):353-361, 2007.

Kazakov DV, Burg G, Kempf W. Clinicopathological spectrum of mycosis fungoides. *J Eur Acad Dermatol Venereol*; 18(4):397-415, 2004.

Kim EJ, Hess S, Richardson SK, *et al.* Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Clin Invest*; 115(4):798-812, 2005.

Konstantinov S, Eibl H, Berge M. BCR-ABL influences the antileukaemic efficacy of alkylphosphocholines. *Br J Haematol*; 107:365–374, 1999.

Kwiecinski JM, Jacobsson G, Horswill AR, *et al.* Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* clinical isolates correlates with the infection type. *Infect Dis (Lond)*; 51(6):446-451, 2019.

Ladha KS, Ajrawat P, Yang Y, Clarke H. Understanding the Medical Chemistry of the Cannabis Plant is Critical to Guiding Real World Clinical Evidence. *Molecules*; 25(18):4042, 2020.

Laezza C, Pagano C, Navarra G, Pastorino O, Proto MC, Fiore D, Piscopo C, Gazzero P, Bifulco M. The Endocannabinoid System: A Target for Cancer Treatment. *Int J Mol Sci*; 21(3):747, 2020.

Lamprecht B, Kreher S, Möbs M, *et al.* The tumour suppressor p53 is frequently nonfunctional in Sézary syndrome. *Br J Dermatol*; 167(2):240-246, 2012.

Lapteva M, Faro Barros J, Kalia YN. Cutaneous Delivery and Biodistribution of Cannabidiol in Human Skin after Topical Application of Colloidal Formulations. *Pharmaceutics*; 16(2):202, 2024.

Layek B, Mandal S. Natural polysaccharides for controlled delivery of oral therapeutics: a recent update. *Carbohydr Polym*; 230:115617, 2020.

Lessin SR, Duvic M, Guitart J, *et al.* Topical chemotherapy in cutaneous T-cell lymphoma: positive results of a randomized, controlled, multicenter trial testing the efficacy and safety of a novel mechlorethamine, 0.02%, gel in mycosis fungoides. *JAMA Dermatol*; 149(1):25-32, 2013.

Ligresti A, Bisogno T, Matias I, De Petrocellis L, Cascio MG, Cosenza V, D'argenio G, Scaglione G, Bifulco M, Sorrentini I, Di Marzo V. Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth. *Gastroenterology*; 125(3):677-687, 2003.

Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K, Matias I, Pisanti S, De Petrocellis L, Laezza C, Portella G, Bifulco M, Di Marzo V. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther*; 318(3):1375-1387, 2006.

Lindeman GJ, Visvader JE. Cell fate takes a slug in BRCA1-associated breast cancer. *Breast Cancer Res*; 13(2):306, 2011.

Liu Z, Martin JH. Gaps in predicting clinical doses for cannabinoids therapy: Overview of issues for pharmacokinetics and pharmacodynamics modelling. *Br J Clin Pharmacol*; 84(11):2483-2487, 2018.

Lodzki M, Godin B, Rakou L, *et al.* Cannabidiol-transdermal delivery and anti-inflammatory effect in a murine model. *J Control Release*; 93(3):377-387, 2003.

Lotan Y, Roehrborn CG. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology*; 61(1):109-118, 2003.

Lozinsky VI, Okay O. Basic Principles of Cryotropic Gelation. In: Okay, O. (eds) *Polymeric Cryogels*. *Advances in Polymer Science*; 263:49-101, Springer, Cham, 2014.

Mangal N, Reebye V, Habib N, Sodergren MH. Cannabidiol's cytotoxicity in pancreatic cancer is induced via an upregulation of ceramide synthase 1 and ER stress. *J Cannabis Res*; 6(1):22, 2024.

- Maruyama D**, Tsukasaki K, Uchida T, *et al.* Multicenter phase 1/2 study of forodesine in patients with relapsed peripheral T cell lymphoma. *Ann Hematol*; 98(1):131-142, 2019.
- Mazzetti C**, Ferri E, Pozzi M, Labra M. Quantification of the content of cannabinoil in commercially available e-liquids and studies on their thermal and photo-stability. *Sci Rep*; 10(1):3697, 2020.
- McCarthy N**, Mitchell G, Bilous M, Wilcken N, Lindeman GJ. Triple-negative breast cancer: making the most of a misnomer. *Asia Pac J Clin Oncol*; 8(2):145-155, 2012.
- McPartland JM**. *Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species*. *Cannabis Cannabinoid Res*; 3(1):203-212, 2018.
- McPartland JM**, Norris RW, Kilpatrick CW. Coevolution between cannabinoid receptors and endocannabinoid ligands. *Gene*; 397(1-2):126-135, 2007.
- Mechoulam R**, Shvo Y. Hashish. I. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron*; 19:2073-2078, 1963.
- Mechoulam R**, Ben-Shabat S, Hanus L, *et al.* Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*; 50:83-90, 1995.
- Millar SA**, Maguire RF, Yates AS, O'Sullivan SE. Towards Better Delivery of Cannabidiol (CBD). *Pharmaceuticals (Basel)*; 13(9):219, 2020.
- Millar SA**, Stone NL, Yates AS, O'Sullivan SE. A Systematic Review on the Pharmacokinetics of Cannabidiol in Humans. *Front Pharmacol*; 9:1365, 2018.
- Momekova D**, Ivanov E, Konstantinov S, *et al.* Nanocomposite Cryogel Carriers from 2-Hydroxyethyl Cellulose Network and Cannabidiol-Loaded Polymeric Micelles for Sustained Topical Delivery. *Polymers (Basel)*; 12(5):1172, 2020.
- Morales P**, Reggio PH. An Update on Non-CB₁, Non-CB₂ Cannabinoid Related G-Protein-Coupled Receptors. *Cannabis Cannabinoid Res*; 2(1):265-273, 2017.
- Morita A**, Tateishi C, Ikumi K, *et al.* Comparison of the Efficacy and Safety of Bexarotene and Photo(Chemo)Therapy Combination Therapy and Bexarotene Monotherapy for Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Dermatol Ther (Heidelb)*; 12(3):615-629, 2022.
- Morrison G**, Crockett J, Blakey G, Sommerville K. A Phase 1, Open-Label, Pharmacokinetic Trial to Investigate Possible Drug-Drug Interactions Between Clobazam, Stiripentol, or Valproate and Cannabidiol in Healthy Subjects. *Clin Pharmacol Drug Dev*; 8(8):1009-1031, 2019.

- Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*; 65(1-2):55-63, 1983.
- Munson AE,** Harris LS, Friedman MA, Dewey WL, Carchman RA. Antineoplastic activity of cannabinoids. *J Natl Cancer Inst*; 55(3):597-602, 1975.
- Namdar D,** Voet H, Ajjampura V, Nadarajan S, Mayzlish-Gati E, Mazuz M, Shalev N, Koltai H. Terpenoids and Phytocannabinoids Co-Produced in *Cannabis Sativa* Strains Show Specific Interaction for Cell Cytotoxic Activity. *Molecules*; 24(17):3031, 2019.
- Naicker PR,** Karayem K, Hoek KG, *et al.* Biofilm formation in invasive *Staphylococcus aureus* isolates is associated with the clonal lineage. *Microb Pathog*; 90:41-49, 2016.
- Netchiporouk E,** Litvinov IV, Moreau L, *et al.* Deregulation in STAT signaling is important for cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) pathogenesis and cancer progression. *Cell Cycle*; 13(21):3331-3335, 2014.
- Nieto-Rementería N,** Pérez-Yarza G, Boyano MD, *et al.* Bexarotene activates the p53/p73 pathway in human cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Dermatol*; 160(3):519-526, 2009.
- Ohlsson A,** Lindgren JE, Andersson S *et al.* Single-dose kinetics of deuterium-labelled cannabidiol in man after smoking and intravenous administration. *Biomed Environ Mass Spect*; 13(2): 77-83, 1986.
- Odi R,** Bibi D, Wager T, Bialer M. A perspective on the physicochemical and biopharmaceutic properties of marketed antiseizure drugs-From phenobarbital to cenobamate and beyond. *Epilepsia*; 61(8):1543-1552, 2020.
- Ohlsson A,** Widman M, Carlsson S, Ryman T, Strid C. Plasma and brain levels of delta 6-THC and seven monooxygenated metabolites correlated to the cataleptic effect in the mouse. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*;47(4):308-317, 1980
- Olsen EA,** Hodak E, Anderson T, *et al.* Guidelines for phototherapy of mycosis fungoides and Sézary syndrome: A consensus statement of the United States Cutaneous Lymphoma Consortium. *J Am Acad Dermatol*; 74(1):27-58, 2016.
- O'Sullivan SE.** Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol*; 152(5):576-582, 2007.

Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*; 58(3):389-462, 2006.

Pagano C, Navarra G, Coppola L, Bifulco M, Laezza C. Molecular Mechanism of Cannabinoids in Cancer Progression. *Int J Mol Sci*; 22(7):3680, 2021.

Paloczi J, Matyas C, Cinar R, Varga ZV, Hasko G, Schindler TH, Kunos G, Pacher P. Alcohol Binge-Induced Cardiovascular Dysfunction Involves Endocannabinoid-CB1-R Signaling. *JACC Basic Transl Sci*; 4(5):625-637, 2019.

Patil K, Kuttikrishnan S, Khan AQ, Ahmad F, Alam M, Buddenkotte J, Ahmad A, Steinhoff M, Uddin S. Molecular pathogenesis of Cutaneous T cell Lymphoma: Role of chemokines, cytokines, and dysregulated signaling pathways. *Semin Cancer Biol*; 86(Pt 3):382-399, 2022.

Paudel KS, Hammell DC, Agu RU, Valiveti S, Stinchcomb AL. Cannabidiol bioavailability after nasal and transdermal application: effect of permeation enhancers. *Drug Dev Ind Pharm*; 36(9):1088-1097, 2010.

Pencheva V, Margaritova E, Borinarova M, Slavkova M, Momekova D, Petrov PD. A novel approach for fabricating nanocomposite materials by embedding stabilized core-shell micelles into polysaccharide cryogel matrix. *Carbohydr Polym*; 183:165-172, 2018.

Pennant NM, Hinton CV. The evolution of cannabinoid receptors in cancer. *WIREs Mech Dis*; 15(4):e1602, 2023.

Pérez-Gómez E, Andradas C, Blasco-Benito S, Caffarel MM, García-Taboada E, Villa-Morales M, et al. Role of cannabinoid receptor CB2 in HER2 pro-oncogenic signaling in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*; 107(6):dju077, 2015.

Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol Rev*; 62(4):588-631, 2010.

Petersen G, Moesgaard B, Schmid PC, Schmid HH, Broholm H, Kosteljanetz M, Hansen HS. Endocannabinoid metabolism in human glioblastomas and meningiomas compared to human non-tumour brain tissue. *J Neurochem*; 93(2):299-309, 2005.

Petrov P, Petrova E, Tsvetanov CB. UV-assisted synthesis of super-macroporous polymer hydrogels. *Polymer*; 50(5): 1118-1123, 2009.

Petrov P, Petrova E, Stamenova R, *et al.* Cryogels of cellulose derivatives prepared via UV irradiation of moderately frozen systems. *Polymer*; 47(19):6481-6484, 2006.

Piechota M, Kot B, Frankowska-Maciejewska A, Gruzewska A, Woźniak-Kosek A. Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains from Hospitalized Patients in Poland. *Biomed Res Int*; 2018:4657396, 2018.

Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*; 4(11):873-884, 2003.

Porter CJ, Trevaskis NL, Charman WN. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nat Rev Drug Discov*; 6(3):231-248, 2007.

Ramer R, Schwarz R, Hinz B. Modulation of the Endocannabinoid System as a Potential Anticancer Strategy. *Front Pharmacol*; 10:430, 2019.

Ramer R, Bublitz K, Freimuth N, Merkord J, Rohde H, Haustein M, Borchert P, Schmuhl E, Linnebacher M, Hinz B. Cannabidiol inhibits lung cancer cell invasion and metastasis via intercellular adhesion molecule-1. *FASEB J*; 26(4):1535-1548, 2012.

Rebibo L, Frušić-Zlotkin M, Ofri R, Nassar T, Benita S. The dose-dependent effect of a stabilized cannabidiol nanoemulsion on ocular surface inflammation and intraocular pressure. *Int J Pharm*; 617:121627, 2022.

Rezende B, Alencar AKN, de Bem GF, Fontes-Dantas FL, Montes GC. Endocannabinoid System: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Pharmaceuticals (Basel)*; 16(2):148, 2023.

Rock EM, Parker LA. Constituents of Cannabis Sativa. *Adv Exp Med Biol*; 1264:1-13, 2021.

Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol*; 140(5):790-801, 2003.

Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, *et al.* The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*; 152(7):1092-101, 2007.

Salazar M, Lorente M, García-Taboada E, Hernández-Tiedra S, Davila D, Francis SE, Guzmán M, Kiss-Toth E, Velasco G. The pseudokinase tribbles homologue-3 plays a crucial role in cannabinoid anticancer action. *Biochim Biophys Acta*; 1831(10):1573-1578, 2013.

Sarfaraz S, Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H. Cannabinoid receptor as a novel target for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res*; 65(5):1635-1641, 2005.

Scandiffio R, Geddo F, Cottone E, Querio G, Antoniotti S, Gallo MP, Maffei ME, Bovolin P. Protective Effects of (*E*)- β -Caryophyllene (BCP) in Chronic Inflammation. *Nutrients*; 12(11):3273.

Scarisbrick JJ, Prince HM, Vermeer MH, *et al.* Cutaneous Lymphoma International Consortium Study of Outcome in Advanced Stages of Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: Effect of Specific Prognostic Markers on Survival and Development of a Prognostic Model. *J Clin Oncol*; 33(32):3766-3773, 2015.

Scarisbrick JJ, Morris S, Azurdia R, *et al.* U.K. consensus statement on safe clinical prescribing of bexarotene for patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Dermatol*; 168(1):192-200, 2013.

Schwarzenberg A, Carpenter H, Wright C, Bayazeid O, Brokl M. Characterizing the degradation of cannabidiol in an e-liquid formulation. *Sci Rep*; 12(1):20058, 2022.

Seeli DS, Prabakaran M. Guar gum succinate as a carrier for colon-specific drug delivery. *Int J Biol Macromol*; 84:10-15, 2016.

Seltzer ES, Watters AK, MacKenzie D, *et al.* Cannabidiol (CBD) as a Promising Anti-Cancer Drug. *Cancers*; 12:3203, 2020.

Shrivastava A, Kuzontkoski PM, Gropman JE, Prasad A. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Mol Cancer Ther*; 10(7):1161-1172, 2011.

Senn L, Cannazza G, Biagini G. Receptors and Channels Possibly Mediating the Effects of Phytocannabinoids on Seizures and Epilepsy. *Pharmaceuticals (Basel)*; 13(8):174, 2020.

Śledziński P, Nowak-Terpiłowska A, Zeyland J. Cannabinoids in Medicine: Cancer, Immunity, and Microbial Diseases. *Int J Mol Sci*; 22(1):263, 2020.

Soliman E, Van Dross R. Anandamide-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis are mediated by oxidative stress in non-melanoma skin cancer: Receptor-independent endocannabinoid signaling. *Mol Carcinog*; 55(11):1807-1821, 2016.

Sooda K, Allison SJ, Javid FA. Investigation of the cytotoxicity induced by cannabinoids on human ovarian carcinoma cells. *Pharmacol Res Perspect*; 11(6):e01152, 2023.

Spindle TR, Cone EJ, Kuntz D, *et al.* Urinary Pharmacokinetic Profile of Cannabinoids Following Administration of Vaporized and Oral Cannabidiol and Vaporized CBD-Dominant Cannabis. *J Anal Toxicol*; 44(2):109-125, 2020.

Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*; 388(6644):773-778, 1997.

Stepanović S, Vuković D, Hola V, *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*; 115(8):891-899, 2007.

Stott CG, White L, Wright S, Wilbraham D, Guy GW. A phase I study to assess the single and multiple dose pharmacokinetics of THC/CBD oromucosal spray. *Eur J Clin Pharmacol*; 69(5):1135-1147, 2013.

Stoyneva V, Momekova D, Kostova B, Petrov P. Stimuli sensitive super-macroporous cryogels based on photo-crosslinked 2-hydroxyethylcellulose and chitosan. *Carbohydr Polym*; 99:825-830, 2014.

Suga H, Sugaya M, Miyagaki T, *et al.* The role of IL-32 in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol*; 134(5):1428-1435, 2014.

Sugiura T, Kishimoto S, Oka S and Gokoh M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Progress in lipid research*; 45: 405-446, 2006.

Taylor L, Gidal B, Blakey G, Tayo B, Morrison G. A Phase I, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single Ascending Dose, Multiple Dose, and Food Effect Trial of the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of Highly Purified Cannabidiol in Healthy Subjects. *CNS Drugs*; 32(11):1053-1067, 2018. Erratum in: *CNS Drugs*; 33(4):397, 2019.

Thiel G, Lesch A, Rubil S, Backes TM, Rössler OG. Regulation of Gene Transcription Following Stimulation of Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Int Rev Cell Mol Biol*; 335:167-189, 2018.

Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, *et al.* Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol*; 150(5):613-623, 2007.

Thomas BF, ElSohly MA. Biosynthesis and Pharmacology of Phytocannabinoids and Related Chemical Constituents. In *The Analytical Chemistry of Cannabis*; Elsevier (Amsterdam, The Netherlands); 27–41, 2016.

Thomas BF, Compton DR, Martin BR. Characterization of the lipophilicity of natural and synthetic analogs of delta 9-tetrahydrocannabinol and its relationship to pharmacological potency. *J Pharmacol Exp Ther*; 255(2):624-630, 1990.

Tilki D, Burger M, Dalbagni G, *et al.* Urine markers for detection and surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*; 60(3):484-492, 2011.

Vadivel CK, Gluud M, Torres-Rusillo S, *et al.* JAK3 Is Expressed in the Nucleus of Malignant T Cells in Cutaneous T Cell Lymphoma (CTCL). *Cancers (Basel)*; 13(2):280, 2021.

van Dam JEG, van den Broek LAM, Boeriu CG. Polysaccharides in Human Health Care. *Nat Prod Commun*; 12(6): 821-830, 2017.

van Kester MS, Borg MK, Zoutman WH, *et al.* A meta-analysis of gene expression data identifies a molecular signature characteristic for tumor-stage mycosis fungoides. *J Invest Dermatol*; 132(8):2050-2059, 2012.

van Rhijn BW, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol*; 47(6):736-748, 2005.

van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, *et al.* Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*; 310:329-332, 2005.

Vara D, Salazar M, Olea-Herrero N, Guzmán M, Velasco G, Díaz-Laviada I. Anti-tumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: role of AMPK-dependent activation of autophagy. *Cell Death Differ*; 18(7):1099-1111, 2011.

Vasku JA, Vasku A, Goldbergova M, Vasku V. Heterozygote AG variant of -596 A/G IL-6 gene polymorphism is a marker for cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Clin Immunol*; 113(3):256-260, 2004.

Velasco G, Sánchez C, Guzmán M. Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nat Rev Cancer*; 12(6):436-444, 2012.

Voicu V, Brehar FM, Toader C, *et al.* Cannabinoids in Medicine: A Multifaceted Exploration of Types, Therapeutic Applications, and Emerging Opportunities in Neurodegenerative Diseases and Cancer Therapy. *Biomolecules*; 13(9):1388, 2023.

Wallimann A, Schenk M. IL-32 as a potential biomarker and therapeutic target in skin inflammation. *Front Immunol*; 14:1264236, 2023.

Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res*; 22(1):11-23, 2005.

Wu X, Han L, Zhang X, Li L, Jiang C, Qiu Y, Huang R, Xie B, Lin Z, Ren J, Fu J. Alteration of endocannabinoid system in human gliomas. *J Neurochem*; 120(5):842-849, 2012.

Wood TB, Spivey WTN, Easterfield TH. Cannabinol. Part I. *J Chem Soc*, 75: 20–36, 1899.

Worix HE, Thomas SM, Plichta JK, Rosenberger LH, Botty van den Bruele A, Chiba A, Hwang ES, DiNome ML. Racial/Ethnic Disparities in Pathologic Complete Response and Overall Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer Treated With Neoadjuvant Chemotherapy. *J Clin Oncol*; 42(14):1635-1645, 2024.

Xing L, Sun J, Tan H, Yuan G, *et al.* Covalently polysaccharide-based alginate/chitosan hydrogel embedded alginate microspheres for BSA encapsulation and soft tissue engineering. *Int J Biol Macromol*; 127:340-348, 2019.

Yang J, Tian Y, Zheng R, Li L, Qiu F. Endocannabinoid system and the expression of endogenous ceramides in human hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*; 18(2):1530-1538, 2019.

Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res*; 22(1):61, 2020.

Yu KK, Smith NP, Essien SV, *et al.* IL-32 Supports the Survival of Malignant T Cells in Cutaneous T-cell Lymphoma. *J Invest Dermatol*; 142(8):2285-2288.e2, 2022.

Zheng D, Bode AM, Zhao Q, Cho YY, Zhu F, Ma WY, Dong Z. The cannabinoid receptors are required for ultraviolet-induced inflammation and skin cancer development. *Cancer Res*; 68(10):3992-3998, 2008.

Zheng H, Chen B, Rao J. Nutraceutical potential of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) extracts: physicochemical stability and bioaccessibility of cannabidiol (CBD) nanoemulsions. *Food Funct*; 13(8):4502-4512, 2022.

Zgair A, Lee JB, Wong JCM, *et al.* Oral administration of cannabis with lipids leads to high levels of cannabinoids in the intestinal lymphatic system and prominent immunomodulation. *Sci Rep*; 7(1):14542, 2017.

Zgair A, Wong JC, Lee JB, *et al*, Constantinescu CS, Fischer PM, Gershkovich P. Dietary fats and pharmaceutical lipid excipients increase systemic exposure to orally administered cannabis and cannabis-based medicines. *Am J Transl Res*; 8(8):3448-3459, 2016.

Zou S, Kumar U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci*; 19(3):833, 2018.