

Mladi za napredek Maribora 2019

36. srečanje

# VLOGA KANABINOIDOV PRI POTEKU IN ZDRAVLJENJU GLIOBLASTOMA

RAZISKOVALNO PODROČJE: ZDRAVSTVO

RAZISKOVALNA NALOGA

Avtor: EVA STRUC, ANEMARIE HRAŠ

Mentor: TANJA BAGAR IN KATJA HOLNTHANER ZOREC, METKA NOVAK

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Število točk: 144

Mesto: 4

Priznanje: srebrno

Maribor, februar 2019

Mladi za napredek Maribora 2019

36. srečanje

# VLOGA KANABINOIDOV PRI POTEKU IN ZDRAVLJENJU GLIOBLASTOMA

RAZISKOVALNO PODROČJE: ZDRAVSTVO

RAZISKOVALNA NALOGA

Maribor, februar 2019

# Vsebina

1. UVOD.....	8
1.1 Izhodišče raziskovalnega problema.....	8
1.2 Cilji raziskave in hipoteza.....	8
2. MOŽGANSKI TUMORJI .....	10
2.1 O možganih .....	10
2.2 Možganski tumorji .....	10
2.3 Tipi primarnih možganskih tumorjev .....	11
2.4 Dejavniki tveganja.....	12
2.5 Simptomi bolezni .....	12
2.6 Diagnostika in zdravljenje .....	13
3. MOŽGANSKI RAK / GLIOBLASTOM .....	14
4. KONOPLJA IN KANABINOIDI .....	16
4.1 Konoplja in njena zgodovina .....	16
4.2 Kanabinoidi in endokanabinoidni sistem.....	16
4.3 Kanabinoidni receptorji in njihova vloga .....	18
4.4 Povezava z glioblastomom .....	19
4.5 Varnostni profil .....	20
4.6 Kanabinoidi v onkologiji in medicini.....	20
4.6.1 Siptomatsko zdravljenje .....	21
4.6.2 Protitumorsko zdravljenje .....	22
5. KAJ JE ŽE RAZISKANO? .....	23
6. KAKO JE V TUJINI IN V SLOVENIJI?.....	25
6.1 Tujina.....	25
6.2 Slovenija .....	25
6.2.1 Zakonodaja .....	25

6.2.2	Dostopnost.....	26
7.	PRAKTIČNI DEL.....	27
7.1	Metodologija.....	27
7.1.2	Imunohistokemija in imunocitokemija.....	27
1.	Deparafinizacija in rehidracija parafinskih rezin.....	27
7.2	Rezultati.....	30
7.3	Interpretacija rezultatov.....	33
8.	ZAKLJUČEK.....	35
9.	DRUŽBENA ODGOVORNOST.....	36
10.	VIRI.....	37

## **Kazalo tabel**

Tabela 1: Kvantifikacija izražanja receptorjev CB1 in CB2 na GB celicah.....	31
Tabela 2: Kvantifikacija izražanja receptorjev CB1 in CB2 na GB tkivnih rezinah .....	32

## **Kazalo slik**

Slika 1: Prikaz priprave celične GB linije iz vzorca tumorja bolnika .....	27
Slika 2: Izražanje receptorjev CB1 in CB2 na GB celic.....	30
Slika 3: Izražanje receptorjev CB1 in CB2 na GB tkivnih rezinah.....	32

## **POVZETEK**

Glioblastom je eden izmed najsmrtonosnejših možganskih malignomov pri človeku. Zdravljenje obsega operativni poseg, obsevanje in kemoterapijo. Zdravljenje ne preprečuje napredovanja in ponovitve raka, zato se v medicini uporabljajo novi pristopi, med katerimi se najbolj v ospredju naravne substance (npr. kanabinoidi) kot dopolnilna terapija h klasičnemu načinu zdravljenja. Do učinkov kanabinoidov pride šele ob vezavi na CB1 in CB2 receptor, zato se v raziskovalni nalogi osredotočava predvsem na to, kako so CB1 in CB2 receptorji izraženi pri različnih bolnikih in kako bi ta podatek lahko pomagal pri sami uporabi kanabinoidnih substanc kot dopolnilnem zdravljenju k že obstoječim, klasičnim načinom zdravljenja. Da bi videli kako se kanabinoidni receptorji izražajo pri bolnikih z glioblastomom, sva uporabili metodi imunohistokemijo in imunocitokemijo. Jedra tumorskih celic so obarvana modro, izraženi CB1 in CB2 receptorji pa so se obarvali rjavo. S tem sva potrdili hipotezo, da se CB1 in CB2 v tumorskih celicah izražajo, a z različno intenzivnostjo. Različna intenzivnost izražanja CB1 in CB2 receptorjev potrди, da je glioblastom heterogena bolezen, kar pomeni, da bi zdravljenje s kanabinoidi moralo biti zasnovano za vsakega bolnika posebej.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujeva se najini mentorici, da je prevzela mentorstvo nad to nalogo in naju z določeno temo seznanila. Radi bi se zahvalili tudi njenim sodelavcem in Nacionalnemu Inštitutu za Biologijo (NIB), Ljubljana, da so nama razkazali laboratorij in nama predstavili delo z rakavimi celicami. Zahvaljujeva se tudi najini šolski mentorici.

# 1. UVOD

## 1.1 Izhodišče raziskovalnega problema

Možganski tumor glioblastom (angl. Glioblastoma; GBM) je najpogostejši in naj agresivnejši ter terapevtsko neodziven primarni možganski tumor pri človeku. Bolniki s to obliko raka imajo kratko preživetje, povprečna življenjska doba ob zdravljenju je približno eno leto. Pogostost bolezni je 3 do 5 pacientov na 100 000 ljudi. Zdravljenje obsega operativni poseg, obsevanje in kemoterapijo, ki pa ne preprečuje napredovanja in ponovitve same bolezni. Zato je potreba po novih učinkovitejših tarčnih metodah zdravljenja je pri tej bolezni velika. Eden novih pristopov je tudi uporaba naravnih substanc, kot so kanabinoidi, terpeni, flavonoidi in fenolne substance kot dodatna terapija k že obstoječim, klasičnim načinom zdravljenja.

Pri uporabi kanabinoidov je že iz predhodnih študij razvidno, da imajo marsikatere izmed substanc pozitiven vpliv na apoptozo, angiogenezo, migracijo in invazijo glioblastomskih celic. Obstaja veliko primerov, ki opisujejo zdravljenje možganskega raka in drugih tumorjev z izvlečki konoplje (običajno jih predstavljajo bolniki sami ali njihovi sorodniki), vendar so ti rezultati slabo znanstveno dokumentirani. Potrebne so zanesljivejše študije in klinične raziskave na širši populaciji bolnikov s točno določenimi kanabinoidnimi preparati in jasno zasnovanimi ter kontroliranimi cilji njihovih učinkov. Takšen pristop bi bil personaliziran, zasnovan za vsakega bolnika posebej, saj je glioblastom močno heterogena bolezen (raznolika glede na izražanje določenih označevalcev) in bi bilo kot prvo potrebno pri vsakem bolniku preveriti, v kolikšni meri so kanabinoidni receptorji CB1 in CB2, preko katerih kanabinoidne substance vstopajo v celico, prisotni, kar bi nakazalo na smiselnost uporabe točno določenih kanabinoidnih preparatov.

## 1.2 Cilji raziskave in hipoteza

Glioblastom (GBM) je v večini primerov odziven na konvencionalne oblike zdravljenja kot so operativna odstranitev, obsevanje in kemoterapija. Glioblastomska masa se zmanjša in v večini primerov navidezno (makroskopsko) izgine, a se vedno ponovi v še agresivnejši obliki, ki je mnogo manj ali celo nedovzeta za zdravljenje. Kanabinoidi v onkologiji in medicini nasploh kažejo velik terapevtski potencial, nujne pa so zanesljivejše pred-klinične in klinične raziskave na širši populaciji bolnikov s točno določenimi kanabinoidnimi preparati in opredeljenimi cilji njihovih učinkov.



Namen predlagane študije je razumeti kako so kanabinoidni receptorji izraženi pri različnih pacientih in kako bi ta podatek pomagal pri uporabi kanabinoidnih substanc kot dopolnilnem zdravljenju k že obstoječim, klasičnim načinom zdravljenja. Najina hipoteza je, da se CB1 in CB2 v tumorskih celicah izražajo, a z različno intenzivnostjo.

Glavni cilj raziskave je določitev vsebnosti receptorjev CB1 in CB2 na večjem številu tumorskih vzorcev pacientov in na tumorskih celicah bolnikov, ki jih vzgojimo v laboratoriju (*in vitro*).

**Posamezni cilji:**

-Določitev in analiza vsebnosti receptorjev CB1 in CB2 na parafinskih rezinah 5 bolnikov.

-Razumevanje vzpostavitve tumorskih celičnih linij pacientov ter določitev vsebnosti receptorjev CB1 in CB2 na 3 tumorskih celičnih linijah.

-Razumeti vpliv različno izraženih receptorjev CB1 in CB2 na tumorskih vzorcih ter povezati ta podatek z uporabo različnih kanabinoidnih preparatov pri poteku in zdravljenju glioblastoma.

## **2. MOŽGANSKI TUMORJI**

Možgani so najpomembnejši in najboljčutljivejši del človeškega telesa. Tako kot kjer koli v telesu lahko tudi v možganih vznikne tumorska rast. Možganski tumorji sodijo med redke rake. Po podatkih Registra raka RS je v Sloveniji leta 2018 zaradi tega zbolelo 182 ljudi, v nekoliko manjši meri obolevajo ženske kot moški; med njimi so tudi otroci. (Skoblar, 2017, str. 10)

### **2.1 O možganih**

Možgani skupaj s hrbtenjačo tvorijo centralni živčni sistem in so obenem tudi nadzorno središče le-tega. Možgani nadzorujejo naše občutke, sluh, voh, vid, dihanje, srčni utrip, osebnost, koordinacijo gibov, prav tako posredujejo tudi pri izločanju hormonov. Zgrajeni so iz podpornega tkiva in živčnih celic (nevronov) in se nadaljujejo v hrbtenjačo. Možgani so sestavljeni iz možganskega debla, velikih in malih možganov. Možgansko deblo se nadaljuje v hrbtenjačo. Mali možgani se nahajajo v zatilnem delu. Veliki možgani so razdeljeni na dve polobli (hemisferi), ki sta med seboj povezani. Možgane in hrbtenjačo obdaja cerebrospinalna tekočina ali likvor (bistra, brezbarvna tekočina, ki obliva možgane). (Skoblar, 2017, str. 10)

### **2.2 Možganski tumorji**

Možganski tumorji predstavljajo raznovrstno skupino bolezni. Delimo jih v dve veliki skupini:

–primarni možganski tumorji, ki nastanejo primarno v možganovini (podporno in žlahtno tkivo možganov),

–sekundarni možganski tumorji, ki so se razširili na možgane iz drugih delov telesa, zaradi drugega primarnega tumorja. So veliko bolj pogosti kot primarni možganski tumorji. V 20–40 % se pojavijo pri ljudeh, ki se že zdravijo zaradi raka. V redkih primerih so lahko sekundarni možganski tumorji (metastaze) prvi simptom rakave bolezni iz drugih delov telesa. Najbolj pogosti so sekundarni možganski tumorji zaradi pljučnega raka, raka dojke, melanoma, raka ledvic in raka na črevesju.

Primarne možganske tumorje delimo v dve skupini:

1. benigni možganski tumorji (rastejo počasi; tumorske celice so zelo podobne normalnim celicam, vendar lahko napredujejo v maligno obliko),

2. maligni možganski tumorji (rastejo hitro in hitro prizadenejo zdravo možganovino; v malignem tumorju nastajajo maligne tumorske krvne žile, v centru tumorja se pogosto najdejo mrtve tumorske celice).

Razdelitev primarnih možganskih tumorjev se pogosto nanaša na stopnjo agresivnosti možganskih tumorjev. Največkrat je v uporabi sistem stopnjevanja Svetovne zdravstvene organizacije, SZO (ang. World Health Organisation; WHO), ki možganske tumorje deli na štiri stopnje:

Stopnja 1 – tumorji rastejo počasi; tumorske celice so zelo podobne normalnim celicam.

Stopnja 2 – počasi rastoči tumorji, tumorske celice kažejo malo nepravilnosti, vendar lahko napredujejo v maligno obliko.

Stopnja 3 – že po definiciji je to maligni tumor, celice hitro rastejo in naglo prizadenejo zdravo možganovino.

Stopnja 4 – najbolj maligni tumorji; celice se hitro delijo, nastajajo maligne tumorske krvne žile, v centru tumorja se pogosto najdejo mrtve (nekrotične) tumorske celice.

Primarni možganski tumorji so najpogosteje kombinacija različnih komponent, vendar najbolj maligna komponenta tumorja določa tumorsko stopnjo oz. gradus tumorja. Možganski tumorji se lahko sčasoma spremenijo iz nižje v višjo stopnjo. (Skoblar, 2017, str. 10)

### **2.3 Tipi primarnih možganskih tumorjev**

Obstaja več kot 120 različnih tipov možganskih tumorjev. Najpogostejši so:

1. Meningeomi – nastanejo iz možganskih ovojnic. Predstavljajo kar 38 % vseh primarnih možganskih tumorjev. Najpogosteje zbolijo ženske, predvsem v starostni dobi 40- 60 let. Večinoma so benigne narave.

2. Gliomi – predstavljajo 25 % vseh primarnih možganskih tumorjev in kar 75 % vseh malignih možganskih tumorjev. Nastanejo iz podpornih možganskih celic: astrocitov, oligodendrocitov ali celic ependima. To so:

– Pilocitni astroцитom – benigni tumor, ki zelo počasi raste.

– Difuzni astroцитom – benigni tumor, ki raste počasi, a lahko s časom postane malignen.

– Anaplastični astrocitom – maligni možganski tumor, ki zahteva takojšnje onkološko zdravljenje.

– Glioblastom – najbolj malignen, hitro rastoč možganski tumor, ki predstavlja 15 % vseh primarnih možganskih tumorjev, in zahteva kompleksno onkološko zdravljenje; kljub zdravljenju se skoraj vedno ponovi.

– Oligodendogliomi – predstavljajo 4 % vseh primarnih možganskih tumorjev in 10–15 % vseh gliomov; lahko so nižje ali višje stopnje malignosti in imajo boljšo prognozo kot astrocitni tumorji.

– Ependimomi – nastanejo iz ependimalnih celic, predstavljajo 2–3 % vseh primarnih možganskih tumorjev. To je 6. najpogostejši možganski tumor v otroštvu.

3. Meduloblastomi – nahajajo se v malih možganih in so zelo pogosti pri otrocih.

4. Redkejši tumorji so še: akustični nevrinom, hondrosarkom, hordom, kraniofaringiom in limfomi. (Skoblar, 2017, str. 11)

## **2.4 Dejavniki tveganja**

Raziskovanih je bilo že veliko različnih dejavnikov, vendar je dokazana le povezava med izpostavljenostjo ionizirajočemu sevanju in povečani verjetnosti za nastanek možganskih tumorjev. Ni pa dokazane trdne povezave med uporabo mobilnih telefonov in nastankom možganskih tumorjev.

Pri možganskih tumorjih se najdejo pogoste genske okvare, ki niso dedne ali prisotne ob rojstvu. Do njih pride zaradi kopičenja poškodb skozi življenje. Sicer pa obstaja nekaj redkih genskih sindromov, pri katerih je pogostnost nastanka možganskih tumorjev večja.

Učinkovitega presejalnega testa za zgodnje odkrivanje možganskih tumorjev ni. (Skoblar, 2017, str. 11)

## **2.5 Simptomi bolezni**

Najbolj pogoste lokacije tumorja in z njo povezani simptomi so naslednji:

–Tumorji frontalnega (čelnega) režnja se manifestirajo s pomočjo težav s koncentracijo, z brezvoljnostjo in s spremembo osebnosti.

- Tumorji parietalnega (temenskega) režnja se manifestirajo s težavami govora; moteno je razumevanje in izražanje.
- Tumorji temporalnega (senčnega) režnja se manifestirajo s spremembami v obnašanju, težavami s spominom, halucinacijami.
- Tumorji okcipitalnega (zatilenega) režnja se manifestirajo z različnimi oblikami izgube vida.
- Tumorji možganskega debla se manifestirajo s slabostjo, nestabilno hojo, težavami s požiranjem in govorom.
- Tumorji v malih možganih se manifestirajo s tremorjem (tresavica), nestabilno hojo in nekoordiniranimi gibi.
- Znaki možganskega tumorja so: glavobol, bruhanje, lahko tudi epileptični napad. (Skoblar, 2017, str. 11)

## **2.6 Diagnostika in zdravljenje**

Pri sumu na možganski tumor je potrebno opraviti nevroradiološko diagnostiko. Najpogosteje se najprej opravi računalniška tomografija (CT) glave, nato pa še magnetna resonanca (MR) glave. Obe preiskavi se opravita s kontrastnim sredstvom, da se tumor bolj jasno vidi. Vrsta možganskega tumorja se lahko opredeli že z opravljeno magnetno resonanco, in sicer, ali gre za primarni ali sekundarni tumor. V večini primerov se že na temelju radiološke diagnostike opredeli tumor kot nizko ali visoko malignen, vendar je za natančno diagnozo potrebna patohistološka potrditev po pridobitvi vzorca.

Žal v diagnostiki možganskih tumorjev ni možnosti določanja tumorskih markerjev iz vzorca krvi.

Načini zdravljenja možganskih tumorjev so: kirurgija, radioterapija, sistemska terapija, podporna terapija. (Skoblar, 2017, str. 12)

### 3. MOŽGANSKI RAK / GLIOBLASTOM

Možgansko tkivo je sestavljeno iz dveh glavnih tipov celic, in sicer iz nevronov, ki opravljajo obdelavo in prenos informacij, ter celic glia, katerih naloga je vzdrževanje in preskrba nevronov. Celice glia delimo na oligodendrocite, ependimske celice, celice mikroglia ter astrocite. Astroцитom četrte stopnje (napredni tumor) je klasificiran kot multiformni glioblastom (GBM).

Glioblastom je redka oblika tumorja in je eden izmed najsmrtonosnejših malignomov. Običajno se pojavlja v čelnem in senčnem možganskem režnju in predstavlja najpogostejšo obliko malignega možganskega tumorja pri odraslih. Pojavnost GB znaša 3,2 novo diagnosticiranih primerov letno na 100 000 prebivalcev. (Panjan in Štrukelj, 2014, 354)

GBM nastane zaradi inaktivacije tumorskih supresorskih genov in aktivacije onkogeneze, kar povzroči spremenjeno transkripcijo proteinov, vključenih v celično homeostazo, regulacijo celičnega cikla ter interakcije z ostalimi celicami centralnega živčnega sistema. Prevalenca je višja v starostni skupini nad 65 let in narašča (v 70 letih 20. stoletja je bilo 5,1 bolnikov na 100 000 ljudi in v 90 letih 10,6 na 100 000). Bolniki z diagnosticiranim glioblastomom se soočajo s slabo prognozo, saj kljub agresivnemu zdravljenju pričakovana življenjska doba znaša med 12 in 15 mesecev, za starejše od 65 let pa redko nad 5 mesecev. Več kot pet let po diagnozi glioblastoma preživi samo približno 3 % bolnikov. Leta 2015 je v Sloveniji 180 ljudi zbolelo za glioblastomom. (Zadnik V, Primic Žakelj M. SLORA)

Na preživetje vplivajo naslednji dejavniki: starost (mlajši bolniki imajo boljšo napoved), histološka diagnoza tumorja (maligni astroцитom ima daljše preživetje kot glioblastom) in stanje telesne kondicije bolnika ob diagnosticiranju bolezni (bolniki z boljšim splošnim stanjem imajo daljše preživetje. (Alexander in Cloughesy, 2017, 2402)

Glioblastom je prav tako eden izmed najzahtevnejših malignomov za zdravljenje. Zgodnje odkrivanje GBM ni na voljo. Trenutno predstavlja magnetno resonančno slikanje najbolj občutljivo orodje za zaznavanje GBM, vendar je s prvo zaznavo GBM, tumor že v napredovalem stanju. Povprečno trajanje znakov GBM pred operacijo znaša 5,4 meseca. Prva izbira klasičnega zdravljenja GBM je kirurški poseg, ki bolezensko stanje le redko ozdravi. Lokacija tumorja v občutljivem možganskem tkivu namreč onemogoča poseg brez poškodb zdravega tkiva, popolno odstranitev pa dodatno otežuje nejasna meja med zdravim in rakastim tkivom. Operaciji običajno sledi radioterapija in nato kemoterapija.

Za namen genskega zdravljenja so razvili številne strategije, ki vključujejo vnos t.i. samomorilnih genov, aktivacijo imunskega sistema ali onkolize ter popravilo dednine. Metode so različno učinkovite in raziskane, za transfekcijo pa uporabljajo predvsem virusne vektorje, redkeje liposome ali nanodelce, veliko pa obetajo še matične celice. (Panjan in Štrukelj, 2014, 354)

## **4. KONOPLJA IN KANABINOIDI**

### **4.1 Konoplja in njena zgodovina**

Konoplja (znanstveno ime *Cannabis sativa*) je dvodomna rastlina. Obstajajo 3 podvrste konoplje, in sicer: navadna ali industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L. subsp. *Sativa*), indijska konoplja (*Cannabis sativa* L. subsp. *Indica*) in *Cannabis ruderalis*. V konopli se nahaja skupina substanc, ki se imenujejo kanabinoidi.

Najstarejši dokazi uporabe konoplje v tradicionalni medicini segajo skoraj 5000 let nazaj. Uporabljale so jo civilizacije v Aziji, na Bližnjem vzhodu pa tudi stari Rimljani in Grki. Uporabljali so jo za blaženje bolečin, za bolezni živčevja, dihal, prebavil, sečil, za blaženje tesnobe. Učinkovin v konoplji še niso poznali in njeno delovanje je bilo nepojasnjeno. Sledila je klasifikacija konoplje kot nevarnega mamila, kar je drastično otežilo raziskovanje njenih učinkov in prehod v uradno medicino. Kljub temu so se izvajale manjše raziskave o njenih zdravilnih učinkih.

Leta 1964 je izraelski kemik Raphael Mechoulan izoliral kanabinoid THC iz konoplje, pojasnil njegovo kemijsko strukturo in ga tudi v laboratoriju sintetiziral. To je predstavljalo prelomnico v razumevanju delovanja konoplje; spodbudilo je nadaljnje raziskave in spremembe v zakonodaji. Od preloma tisočletja s pridobivanjem novih znanj o kliničnih koristih ter s spreminjanjem zakonodaje konoplja in kanabinoidi dobivajo mesto v uradni medicini. V onkologiji imajo kanabinoidi dve potencialni vlogi; kot zdravilo za zdravljenje simptomov ter kot proti-tumorsko zdravilo. Kanabinoidi lajšajo več simptomov napredovale maligne bolezni in tako izboljšajo kakovost življenja. Na simptome vplivajo preko delovanja na centralni živčni sistem in z modulacijo kroničnega systemskega vnetja, ki je pomemben element napredovale maligne bolezni. (Červek, 2017, str.34)

### **4.2 Kanabinoidi in endokanabinoidni sistem**

Kanabinoidi so snovi, ki se vežejo na kanabinoidne receptorje in preko te vezave povzročajo svoje učinke. Kanabinoidi spadajo med terpenofenole in jih uvrščamo med lipide, kar pomeni, da so topni v maščobah.

Kanabinoidi se ne nahajajo le v konoplji. Glede na njihov izvor jih razdelimo v tri skupine:

– endokanabinoide, ki nastajajo v telesih vretenčarjev, tudi človeka,



- fitokanabinoide, ki so prisotni v rastlinah (konoplji, ameriškem slamniku, vinski rutici),
- sintezne kanabinoide, ki jih umetno proizvedemo v laboratoriju. (Bagar T., Kanabinoidi)

Konoplja vsebuje več kot 100 različnih fitokanabinoidov in druge aktivne substance (terpene in flavoide). Najbolj raziskani kanabinoidi v konoplji so  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol (THC), kanabidiol (CBD), kanabigerol (CBG), kanabinol (CBN) in kanabidivarin (CBDV). Najpomembnejša in najbolj raziskana kanabinoida v konoplji sta THC in CBD. Ostali kanabinoidi so prisotni v veliko manjših količinah in so manj raziskani. (Červek, 2016, str. 3)

$\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol (THC) je psihoaktivni kanabinoid v konoplji. Veže se na receptorje CB1, ki so prisotni predvsem v centralnem živčevju. Aktivacija teh receptorjev povzroča omamo oz. »zadetost«. Zaradi zdravstvenih učinkov je dolga leta raziskovan in že nekaj let na razpolago tudi sintezni analog, ki pa ni tako varen in učinkovit kot naravna učinkovina (na trgu v Sloveniji je mogoče dobiti Dronabinol v obliki peroralnih kapljic). THC deluje na receptorje v določenih možganskih centrih (za spomin, koordinacijo, bolečino). Njegovi učinki so blaženje bolečine, slabosti in siljenja na bruhanje; povečuje apetit, uravnava motnje spanja. (Grošelj, Oražem in Kovač, 2018, str. 9)

Kanabidiol (CBD) je eden izmed številnih kanabinoidov v konoplji, ki ni psihoaktiven. Blaži psihotropne učinke THC (prek inhibicije centralnih CB1 receptorjev), ker pa ni psihoaktiven, ob tem ne povzroča omame, ampak lajša občutke strahu in vznemirjenosti. CBD ima antipsihotični, antidepresivni in protibolečinski učinek. Učinkuje pa tudi na receptorje CB2, zlasti na perifernem živčevju in celicah imunskega sistema. Je zelo močan antioksidant (močnejši kot vitamina E in C). V zadnjih letih je to najbolj intenzivno proučevan kanabinoid, saj kaže izjemen potencial pri različnih obolenjih kot so epilepsija, rak, diabetes, alzheimerjeva bolezen... (Červek, 2016, str. 3)

Fitokanabinoidi (so rastlinski kanabinoidi, ki so po kemijski strukturi tako podobni endokanabinoidom, da v našem telesu aktivirajo iste receptorje) v konoplji so predstavljali osnovo za odkritje človeškega endokanabinoidnega sistema v 80. letih prejšnjega stoletja. Endokanabinoidni sistem je prisoten praktično v vseh človeških organskih sistemih in sodeluje pri upravljanju raznolikih procesov v celotnem organizmu. Vpliva na srčnožilni, hormonski in prebavni sistem, presnovne procese, pa tudi na tumorsko tkivo pri onkoloških boleznih. Njegova glavna vloga pa je predvsem preprečevanje prekomernega stresnega odziva na telesne in psihične poškodbe, in s tem vzdrževanje homeostaze. Njegovi sestavni deli so

endokanabinoidi in endokanabinoidni receptorji (CB1 in CB2) s presnovnimi encimi. (Červek, 2016, str. 3)

Endokanabinoidi so človeku lastni kanabinoidi. Naše telo jih proizvaja v živčnih celicah in služijo kot signalne molekule. Vsaka celica našega telesa ima kanabinoidne receptorje, zaznava koncentracijo kanabinoidov v svoji okolici, ter se na te spremembe odziva. V nekaterih delih možganov so kanabinoidni receptorji zelo gosto nameščeni ( tam je teh receptorjev celo največ), kar pomeni, da so naši možgani zelo občutljivi oz. zelo dobro naravnani na zaznavanje sprememb v koncentraciji kanabinoidov. Kanabinoidi vplivajo praktično na vsak proces v našem telesu, denimo na koordinacijo, oploditev, dojenje, razvoj, imunost, učenje, plodnost, metabolizem, izločanje hormonov, krvožilni sistem, delovanje trebušne slinavke...(Bagar T., Kanabinoidi)

#### **4.3 Kanabinoidni receptorji in njihova vloga**

Kanabinoidi učinkuje le takrat, ko se vežejo na receptorje tipa 1 in 2 (CB1 in CB2), na vaniloidne receptorje 1, na s proteinom G sklopljene receptorje 55 in nekatere jedrne receptorje, aktivirane s peroksisomskim proliferatorjem. Prvi dokaz za obstoj kanabinoidnih receptorjev je bila ugotovitev, da THC zavira encim adenilat-ciklazo. Prvi kanabinoidni receptor CB1 so klonirali leta 1990 iz podganjih možganov, drugi kanabinoidni receptor CB2 pa leta 1993 iz človeških celic promielocitne levkemije HL60. V telesu se na kanabinoidne receptorje fiziološko vežejo endokanabinoidi (glavna predstavnika sta anandamid in 2-arahidonilglicerol). Na iste receptorje kot delni agonisti delujejo fitokanabinoidi, ki jih v konoplji najdemo več kot 100 različnih vrst. (Ferjan, Kržan, idr., 2015, str.458)

Receptor CB1:

Receptorje CB1 izražajo celice osrednjega živčevja, najdemo pa jih tudi na celicah številnih tkiv drugje po telesu. Večinoma se nahajajo v možganih in vplivajo na njihovo delovanje. Izraženi so predvsem v hipokampusu, kortikalnih področjih velikih možganov, malih možganih in bazalnih ganglijih. Ta porazdelitev receptorjev CB1 v možganih se dobro ujema z znanimi farmakodinamičnimi učinki kanabinoidov na spomin, kognitivne sposobnosti, bolečino in gibanje. V možganskem deblu, podaljšani hrbtenjači in talamusu je nizka gostota receptorjev CB1. Kar pa pomeni, da kanabinoidi ne povzročajo smrtno nevarnih učinkov na vitalne fiziološke funkcije v primerih zaužitja izjemno visokih odmerkov kanabinoidov. Receptor CB1 se izraža tudi zunaj osrednjega živčevja, in sicer v modih, presinaptično na

simpatičnih živčnih končičih, črevesju, jetrih, v nadledvični žlezi, srcu, žilnem endotelu, pljučih, prostati, kostnem mozgu, priželjcu in vranici. (Ferjan, Kržan, idr., 2015, str.458)

Receptor CB2:

Receptorji CB2 so v primerjavi z receptorji CB1 izraženi predvsem na imunskih celicah in sodelujejo proti vnetnemu odzivu imunskega sistema. Veliko receptorjev CB2 je izraženih na limfocitih B in celicah naravnih ubijalkah. Receptorje CB2 so odkrili tudi v velikih možganih in v možganskem deblu. Poleg modulacije bolečine igrajo pomembno vlogo tudi pri delovanju imunskega sistema in vnetnih procesih. Na različnih živalskih modelih, kot so npr. modeli taktilne in toplotne alodinije ter mehanske in toplotne hiperalgezije, so pokazali, da aktivacija receptorjev CB2 zmanjšuje nocicepcijo. Prav tako imajo vlogo pri moduliranju nevropatske bolečine. (Ferjan, Kržan, idr., 2015, str.458)

#### **4.4 Povezava z glioblastomom**

Kanabinoidi imajo protitumorsko aktivnost v razmerah *in vitro* in pri živalskih modelih, ker lahko povzročijo smrt celice, inhibirajo rast tumorskih celic in preprečujejo invazivnost. Kanabinoidi prav tako povečajo privzem citostatikov (temozolomida) v tumorske celice glioblastoma. Zanimivo pa je, da ne povzročajo celične smrti zdravih astrocitov v neposredni bližini tumorja (farmakologija kanabinoidov) Nasploh so bili protitumorski učinki kanabinoidov najbolj preučevani na celicah gliomov. Edini objavljeni sistematični pregled literature iz leta 2013 je zajel 35 študij, od tega 16 *in vivo* in eno klinično. (Ferjan, Kržan, idr., 2015, str.459)

Mehanizem protitumorskega učinkovanja kanabinoidov je zaviranje angiogeneze. Na celicah nemelanomskega kožnega raka so pokazali, da aktivacija kanabinoidnih receptorjev malignih celic zmanjša izražanje proangiogenih mediatorjev, kot je npr. vaskularni endotelijski rastni dejavnik (VEGF). Podobno velja tudi za gliome. Z zmanjšanjem izražanja matriksnih metaloproteinaz 2 (MMP2) se zmanjšata tudi opažena sposobnost adhezije in invazivnost gliomskih ter nekaterih drugih tumorskih celic v celičnih kulturah. (Grošelj, Oražem in Kovač, 2018, str. 9)

Dokazano je, da ima tumorsko tkivo pri nekaterih vrstah raka (gliomi, rak dojke, rak prostate, rak debelega črevesa in danke itd.) velikokrat čezmerno izražene receptorje CB1 in CB2, več

kot zdrava tkiva. To pomeni, da imajo kanabinoidi veliko razpoložljivih prijemašč v rakavih tkivih in s tem omogočeno delovanje.

Do učinkov kanabinoidov pri malignih boleznih prihaja po treh glavnih poteh, in sicer prek delovanja na CŽS, na celice imunskega sistema, neposredno na tumorske celice. (Červek, 2016, str. 81)

#### **4.5 Varnostni profil**

Raziskave o varnosti kanabinoidov se večinoma osredotočajo na THC:

**-Neželeni učinki:** Akutni zapleti so odvisni od odmerka in načeloma izzvenijo v 1–3 dneh. Neželeni učinki so: pretirana sedacija ali euforija, strah, spremenjene zaznave, depresija, halucinacije, izguba kontrole, rdeče oči, suha usta, neželeni gibi, šibkost, nejasen govor, povišan utrip, znižan krvni tlak, slabost, glavobol.

Pri večjih odmerkih se večja intenzivnost neželenih učinkov. V primerih akutnih zapletov s THC, lahko uporabimo odmerke čistega CBD za odpravo stranskih učinkov THC.

**-Toksičnost:** Smrtni odmerek THC je ocenjen na 30 mg/kg telesne teže, kar za nekaj stokrat presega terapevtske odmerke.

**-Kontraindikacije:** Uporabo psihoaktivnih kanabinoidov (THC) povezujemo z možnim poslabšanjem psihotičnih stanj. Prav tako THC vpliva na frekvenco srčnega utripa in krvni pritisk. Tako odsvetujemo uporabo THC pri ljudeh s psihozami in pri srcnih bolnikih. Oba učinka se zmanjšata ob sočasni uporabi CBD.

Zaradi raziskav, ki kažejo vpliv na razvoj možganov, je uporaba psihoaktivnih kanabinoidov (npr. THC) pri otrocih in mladostnikih kontraindicirana, kar ne velja za kanabinoide, ki nimajo psihoaktivnih učinkov (npr. CBD).

**-Zasvojenost:** Pri rednih uporabnikih je možnost za razvoj odvisnosti ocenjena na 9 % (pri tobaku 32 %, alkoholu 15 %, heroinu 23 %, kokainu 17 %). (Červek, 2016, str. 83)

#### **4.6 Kanabinoidi v onkologiji in medicini**

Kanabinoidi imajo potencial za zdravljenje težav v številnih vejah medicine. Študije kažejo na zdravilni učinek pri nevrodegenerativnih obolenjih (multipla skleroza, ALS, diskinezija), pri

nevropsihiatričnih motnjah (Alzheimerjeva bolezen, motnje spanja, depresija, anksioznost) in epilepsiji.

Kanabinoide v onkologiji uporabljamo za zdravljenje simptomov napredovale rakave bolezni, raziskave pa kažejo na možnost njene uporabe kot protitumorskega zdravila. (Červek, 2017, str. 35)

#### **4.6.1 Siptomatsko zdravljenje**

Napredovala maligna bolezen je neozdravljiva. Cilj oskrbe v tem stadiju bolezni je boljša kakovost bolnikovega življenja glede na dane možnosti, kar se doseže z optimalnim obvladovanjem prisotnih simptomov. Simptomi napredovale bolezni se ne pojavljajo izolirano, temveč v skupinah (angl. clusters) in so v medsebojni odvisnosti. Kanabinoidi na simptome vplivajo preko delovanja na centralni živčni sistem in z modulacijo vnetnega odziva. Lajšajo naslednje simptome napredovale maligne bolezni: kronično rakavo bolečino, motnje prehranjevanja (izgubo apetita, telesne teže), slabost, bruhanje, motnje spanja, nevropsihološke motnje: žalost, strah, vznemirjenost, tesnobo, eksistencialno trpljenje, ki ga povzročajo številne izgube (samostojnosti, upanja, prihodnosti) ter splošno oslabelost oz. šibkost. (Červek, 2017, str. 36)

Zdravila na osnovi kanabinoidov niso zdravila prve izbire; predpisujejo se bolnikom s težje obvladljivimi simptomi ali več simptomi hkrati. Uporablja se jih kot dodatek klasičnim zdravilom (angl. add-on therapy), če je simptom nezadovoljivo obvladan, ali ob pojavu nesprejemljivih neželenih učinkov klasičnih zdravil. (Červek, 2017, str. 36)

Z dopolnilnim zdravljenjem povečamo učinek protibolečinskih zdravil, pospeševalcev apetita in zdravil proti slabosti/bruhanju. V nekaterih primerih tako zmanjšamo potreben odmerek in posledično jakost neželenih učinkov klasičnih zdravil, na primer morfija. (Červek, 2017, str. 36)

V medicinski praksi se danes največ uporablja zdravila s kombinacijo fitokanabinoidov THC in CBD, ali pa integralni rastlinski pripravek konoplje (medicinska konoplja). Optimalni dnevni odmerek kanabinoidov za posameznega bolnika se praviloma določi s postopno individualno titracijo odmerka (zelo velik razpon, maksimalni odmerek: THC/CBD - 37,5 mg/dnevno). Nadzor nad bolnikom je potreben za stalno ugotavljanje sprejemljivosti odmerka in možnosti njegove spremembe ter za ugotavljanje učinkovitosti.

Z dopolnilnim zdravljenjem izkoriščamo dokazano povezano (sinergistično) delovanje kanabinoidov z analgetiki, antiemetiki in pospeševalci apetita. Pri izbiri kanabinoidnega zdravila pa izkoriščamo medsebojno pozitivno povezavo med kanabinoidi za povečanje zdravilnega učinka in manjših neželenih učinkov. (Červek, 2017, str. 36)

#### **4.6.2 Protitumorsko zdravljenje**

Raziskave so pokazale, da ima tumorsko tkivo pri nekaterih vrstah raka (gliomi, rak dojke, rak prostate, rak debelega črevesa in danke itd.) velikokrat čezmerno izražene receptorje CB1 in CB2, več kot zdrava tkiva. Raziskave *in vitro* in na živalih kažejo, da aktivacija kanabinoidnih receptorjev na tumorskih celicah s kanabinoidi lahko zaustavlja tumorsko rast: povzroči propad rakavih celic, preprečuje razraščanje novih žil za preskrbo tumorskega tkiva in zmanjšuje sposobnost širjenja rakavih celic na druge organe. (Červek, 2017, str. 36)

Za uporabo kanabinoidov kot protitumorskega zdravila je trenutno še premalo podatkov, a na tem področju poteka veliko raziskav, tudi kliničnih, ki nakazujejo možno bodočo vlogo kanabinoidnih receptorjev, kot ene od tarč za kombinirano sistemsko zdravljenje raka. Nikakor ne smemo pričakovati, da bodo kanabinoidi zdravili vse vrste raka. Zaradi izjemno različne sestave celic med različnimi vrstami raka, med posameznimi tumorji, ter celo znotraj posameznega tumorja, tudi kanabinoidi, tako kot vsa druga sistemska onkološka zdravila, ne bodo delovali na vse vrste raka in ne pri vseh bolnikih. Verjetno bodo kanabinoidi del kombinacije zdravil le za določene vrste raka, kot je to standard pri onkoloških boleznih. (Červek, 2017, str. 36)

## 5. KAJ JE ŽE RAZISKANO?

Na področju protitumorskega zdravljenja so bile opravljene obetavne predklinične raziskave, ki kažejo na kanabinoidne receptorje na tumorskih celicah kot možne nove tarče za zdravljenje raka. Do sedaj je bilo izvedenih še premalo kliničnih raziskav za uvedbo v klinično prakso. Za enkrat se kanabinoidi načeloma uporabljajo samo za paliativno zdravljenje na nekaterih terciarnih ustanovah, med njimi na Onkološkem inštitutu. (Červek, 2016, str. 80)

Znanje zdravnikov in ostalih zdravstvenih delavcev o endokanabinoidnem sistemu in kanabinoidih je še vedno pomanjkljivo. Tema je površno pokrita ali celo odsotna v programih medicinskih in zdravstvenih fakultet. Prav tako na to temo ni nobenega sistematičnega izobraževanja. V anketi, izvedeni med zdravstvenimi delavci 2015 jih je več kot 90 % odgovorilo, da na tem področju potrebujejo več znanja. Zdravniki so zato v dobronamerni zaskrbljenosti glede možne nevarnosti neželenih učinkov zadržani do predpisovanja kanabinoidnih zdravil. Posamezni zdravniki tudi menijo, da je uvajanje kanabinoidnih zdravil nepotrebno, ker so na voljo druga, prav tako učinkovita zdravila. Pri tem so spregledani neželeni učinki teh zdravil, ki so velikokrat veliko hujši kot pri kanabinoidih. (Červek, 2016, str. 80)

Profesor biokemije in molekularne biologije, Manuel Guzman, je z sodelavci objavil prvo tovrstno klinično študijo. Bolnikom z možganskim tumorjem glioblastomom, ki so že bili klasično zdravljeni (operacija, obsevanje in kemoterapija), so ob ponovitvi bolezni takoj po operaciji intrakranialno (intratumorsko) dovajali THC. Njihova primarna ugotovitev je bila, da je intrakranialno dovajanje THC varno. Pri dveh bolnikih je bila na magnetnoresonančnem slikanju vidna upočasnjena tumorska rast. Vseh devet bolnikov, vključenih v študijo, pa je umrlo v prvem letu (srednje preživetje 24 tednov) po aplikaciji THC. Kontrolne skupine študija ni imela, je pa opisano preživetje povsem enako preživetju bolnikov s to boleznijo, ki so klasično zdravljeni.

Trenutno potekata tudi dve klinični študiji na bolnikih z napredovalimi tumorji. V prvo so vključeni bolniki z napredovalimi karcinomi pankreasa in jeter. Zdravljeni so s standardno kemoterapijo, dodan pa je deksanabinol. Namen je ugotoviti varni odmerek deksanabinola, ki se lahko kombinira s kemoterapijo, in morebitno protitumorsko delovanje. V drugi študiji pa bolnikom z napredovalimi solidnimi raki, kjer ob progresu ni več možno nobeno standardno

zdravljenje, dajejo čisti CBD. Namen študije je pokazati morebitno protitumorsko delovanje.  
(Grošelj, Oražem in Kovač, 2018, str. 10)



## **6. KAKO JE V TUJINI IN V SLOVENIJI?**

### **6.1 Tujina**

Skupaj s širjenjem novih znanj o konoplji in njenih pozitivnih in negativnih učinkih se eksponentno večja število držav, ki dovoljuje uporabo kanabinoidov in medicinske konoplje v medicini. Vodilni na tem področju so trenutno v Izraelu in na Nizozemskem, izredno hitro pa se razvija tudi uporaba v ZDA, kar bo verjetno imelo pomemben vpliv na razvoj v drugih državah zahodnega sveta (npr. Kanada).

Enega najbolj razvitih sistemov za predpisovanje medicinske konoplje in posledično največ izkušenj imajo v Izraelu. Tam imajo dovoljenje za predpisovanje medicinske konoplje posebej pooblaščen zdravniki, konopljo pa izdajajo licencirani pridelovalci, ki za različne indikacije pridelujejo različne sorte z različnimi, znanimi vsebnostmi THC in CBD. (Červek, 2016, str. 84)

### **6.2 Slovenija**

#### **6.2.1 Zakonodaja**

V Sloveniji je bila konoplja razvrščena na seznam rastlin in snovi, ki so zelo nevarne za zdravje in se ne uporabljajo v medicini. Z uredbo o razvrstitvi prepovedanih drog, ki je bila sprejeta na Vladi RS dne 19. 6. 2014, je bil THC razvrščen iz prve skupine prepovedanih drog v drugo skupino, zaradi česar je bilo izdano dovoljenje za uporabo zdravil na osnovi psihoaktivnih sinteznih kanabinoidov (THC). Nepsihostimulativni, periferno delujoči CBD ne sodi v skupino prepovedanih učinkovin, zato je pri njegovi uporabi treba upoštevati zakonodajo s področja drugih zdravil. S prenovljeno uredbo o razvrstitvi prepovedanih drog (marec 2016) je bilo izdano dovoljenje za uporabo konopljinih kanabinoidov (fitokanabinoidov) in decembra 2016 še dovoljenje za uporabo nekaterih delov rastline konoplje v medicinske namene. V zdravniških krogih sprememba uredbe ni bila posebno odmevna: dosegljivi niso nobeni napotki, kdo natančno lahko predpisuje zdravila s kanabinoidi. (Červek, 2017, str. 7)

## 6.2.2 Dostopnost

V Sloveniji sta na voljo sintezna kanabinoida CBD in THC (izdajata se v lekarnah na zdravniški recept). Obe zdravili se predpisujeta v obliki magistralnega recepta, kot peroralne kapljice. Industrijskega ali magistralnega zdravila z izvlečki konopljinih kanabinoidov trenutno nimamo na voljo (so v postopku dostopnosti). Prav tako je v procesu dostopnosti medicinska konoplja. (Červek, 2017, str. 7)

Zaradi nedostopnosti kanabinoidov in napačnih informacij o učinkih konoplje je v zadnjih letih velik porast bolnikov, ki za zdravljenje bodisi pridobivajo izdelke iz konoplje od različnih zdravilcev bodisi jih pridobivajo sami. Kanabinoide jemljejo v upanju, da bodo ti delovali protitumorsko. Taki pripravki imajo neznane vrednosti kanabinoidov; njihova vsebnost lahko izredno niha. Taki uporabi lahko delno pripišemo tudi porast zastrupitev s THC v Sloveniji. Poleg tega pridelava teh pripravkov ni nadzorovana, vsebujejo lahko tudi nevarne snovi (pesticide, plesni). Za tovrstno samozdravljenje se ljudje odločijo tudi na podlagi rezultatov številnih predkliničnih študij, kjer so na celičnih kulturah in živalskih modelih opisovali protitumorske učinke. Bolniki lahko na spletu, poleg podatkov o predkliničnih raziskavah, pridobijo tudi številne laične razlage in zavajajoča pričevanja o dobrih protitumorskih učinkih. (Červek, 2017, str. 7)

Stvari se na tem področju sicer vedno hitreje izboljšujejo, kar se kaže kot rast objav strokovnih in poljudnih člankov o kanabinoidih, števila predavanj in posvetov in kot ustanavljanje odborov in organizacij, ki se ukvarjajo s to tematiko. (Červek, 2016, str. 85)

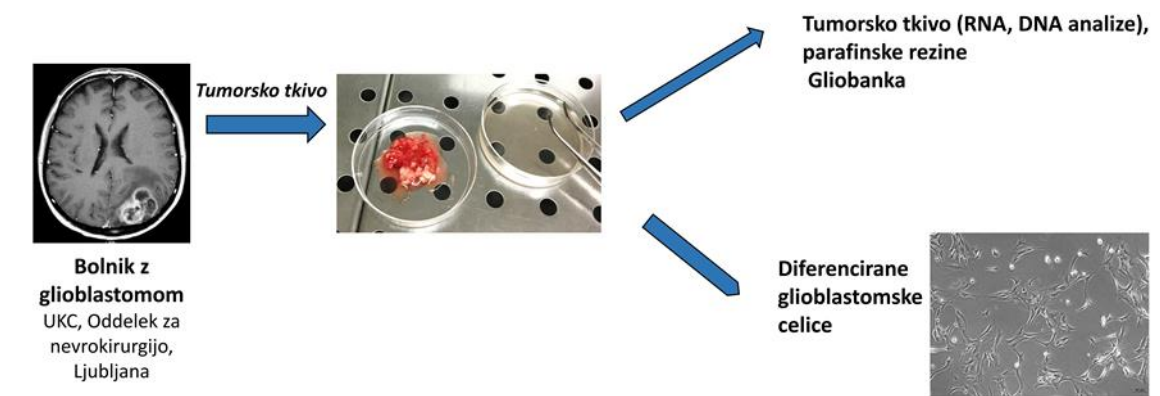
## 7. PRAKTIČNI DEL

### 7.1 Metodologija

#### 7.1.2 Imunohistokemija in imunocitokemija

Z imunohistokemijo in imunocitokemijo smo preverili vsebnost CB1 in CB2 na glioblastomskih tkivnih rezinah oz. fikviranih glioblastomskih celicah na proteinskem nivoju. Parafinske tkivne rezine na stekelcih so bile pripravljene na Inštitutu za patologijo, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani po njihovem standardnem postopku.

Imunocitokemija se izvaja tako kot imunohistokemija brez deparafinizacije in vzpostavitve antigenov ter blokiranja endogenih peroksidaz.



Slika 1: Prikaz priprave celične GB linije iz vzorca tumorja bolnika (Vir: NIB)

#### 1. Deparafinizacija in rehidracija parafinskih rezin

Ker so tkivne rezine na stekelcih vpete v parafin, smo najprej tkiva deparafinizirali s ksilenom, saj parafin preprečuje dostop protiteles do epitopov. Stekelca smo v digestoriju potopili v kadičke z raztopinami po naslednjem vrstnem redu:

- Ksilen (3 min)
- Ksilen (3 min)
- Absolutni etanol (3 min)
- 96 % etanol (3 min)
- 70 % etanol (3 min)
- Destilirana voda (3 min)

Od tu naprej se stekelca niso smela več posušiti, saj bi to vplivalo na povečanje nespecifične vezave protiteles in ozadje.

## 2. Vzpostavitev antigenov

Stekelca s čašo smo potopili v vnaprej pripravljen citratni pufer in kuhali v pufu 30 min. Med kuhanjem se zaradi izparevanja nivo pufera niža, zato ga moramo dodajati, da so stekelca ves čas pokrita s tekočino. Čašo s pufrom smo nato ohladili na sobni temperaturi (približno 20 min). Stekelca smo vzeli iz pufera in jih dali stresati v dH<sub>2</sub>O za 5 min na sobni T.

## 3. Blokiranje aktivnosti endogenih peroksidaz

V tem koraku blokiramo vse endogene peroksidaze, ki se nahajajo v celicah, saj bi sicer te reagirale s DAB substratom in bi tako dobili lažno pozitivne rezultate. Stekelca smo inkubirali 30 min pri sobni T v predhodno pripravljene 3% raztopini H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/metanol ter jih nato dvakrat spirali na stresalniku v PBS po 5 minut na sobni T.

## 4. Blokiranje nespecifične vezave protiteles

Stekelca smo previdno obrisali z brisačko in okoli tkiva s DAKO flomastrom označili lokacijo tkiva. DAKO flomaster je hidrofoben in preprečuje, da bi se v nadaljevanju tekočinska zmes razlila izven območja tkiva. Prav tako je tudi lahko rakotvoren, zato z njim delamo v digestoriju. Na tem koraku smo tudi začeli imunocitokemijo, zato smo na stekelca s celicami čvrsto pritrdili nalepko z luknjicami. Na stekelca smo nato nanegli pufer za blokado, in sicer 200 µL na tkivo in 50 µL v vsako luknjico na celicah ter inkubirali 1h pri sobni T. Pufer za blokado vsebuje serum, ki je enakega izvora, kot sekundarno protitelo. Serumski proteini se namreč vežejo na endogene imunoglobuline in tako preprečijo, da bi se v nadaljevanju gor vezala sekundarna protitelesa in dala lažne pozitivne rezultate. Po inkubaciji smo stekelca potresli ob brisačko, da gre pufer za blokado stran, oz. iz luknjic na celicah ven odpipetirali pufer.

## 5. Inkubacija s primarnimi protitelesi

Tako na tkivu, kot tudi na celicah nas je zanimala prisotnost CB1 in CB2 receptorja. Kunčje primarno protitelo proti CB1 (komercialno ime Rantes, Abcam ab23703) smo redčili s pufrom za redčenje protiteles 1:200, kunčje primarno protitelo proti CB2 (Abcam ab45941) pa smo redčili 1:500. Na tkivno rezino smo nanegli 200 µL redčenega primarnega protitelesa, oz. 50

$\mu\text{L}$  v posamezno luknjico na celicah. Za negativno kontrolo na celicah smo dali v luknjico pufer za redčenje protiteles. Inkubacija je potekala čez noč na  $4^{\circ}\text{C}$  v komori za ohranjanje vlažnosti. Naslednji dan smo stekelca dvakrat po 5 min spirali v PBS na stresanju in sobni T. Na stekelcih s celicami pa smo s pipeto trikrat spirali vsako luknjico s PBS.

#### **6. Inkubacija s sekundarnimi protitelesi**

Stekelca smo obrisali okoli tkiva in dodali sekundarno protitelo. Za CB1 in CB2 smo uporabili kozje proti kunčje (Promega W401B) sekundarno protitelo. Oba protitelesa sta konjugirana s hrenovo peroksidazo, redčili pa smo ju 1:200 s pufrom za redčenje protiteles. Na stekelca s tkivnimi rezinami smo dali  $200\ \mu\text{L}$ , na stekelcih s celicami pa smo v luknjice dali  $50\ \mu\text{L}$  sekundarnega protitelesa. Sledila je enourna inkubacija v komori za ohranjanje vlažnosti pri sobni T. Po inkubaciji smo stekelca dvakrat po 5 min spirali v PBS na stresanju in sobni T. Na stekelcih s celicami pa smo s pipeto trikrat spirali vsako luknjico s PBS.

#### **7. Barvanje rezin z DAB substrat testom**

Stekelca smo obrisali z brisačko okoli tkiva in dodali  $200\ \mu\text{L}$  raztopine DAB na tkivno rezino in  $50\ \mu\text{L}$  v luknjico na stekelcu s celicami. 1x raztopino DAB smo pripravili iz DAB substrata in DAB kromogena v razmerju 1:20. DAB raztopina je namreč substrat za hrenovo peroksidazo, ki se nahaja na sekundarnem protitelesu, zato se po encimski reakciji produkt obarva rjavo (DAB oksidira). Po 10 min inkubaciji pri sobni T, smo iz stekelca s celicami odstranili nalepko in skupaj s tkivnimi rezinami dvakrat po 5 min spirali v destilirani vodi na stresanju in pri sobni T.

#### **8. Barvanje jeder s hematoksilinom**

Stekelca smo obrisali z brisačko okoli tkiva, oz. celic in nanесли raztopino hematoksilina, redčeno s PBS v razmerju 1:1. Hematoksilin obarva jedra modro. Inkubirali smo 1 min pri sobni T, nato pa stekelca spirali pod tekočo vodo 5x in jih nazadnje še potopili v destilirano vodo za 10 min.

#### **9. Dehidracija in priprava stekelc za mikroskopsko analizo**

Stekelca smo potopili v redčine alkohola v obratnem vrstnem redu, kot pri rehidraciji, v vsako po 3 min in zaključili z dvema raztopinama ksilena, v vsaki po 2 min. Stekelca smo obrisali z brisačko in nanj kanili 1-2 kapljici vklopnega medija ProLong Gold antifade reagent

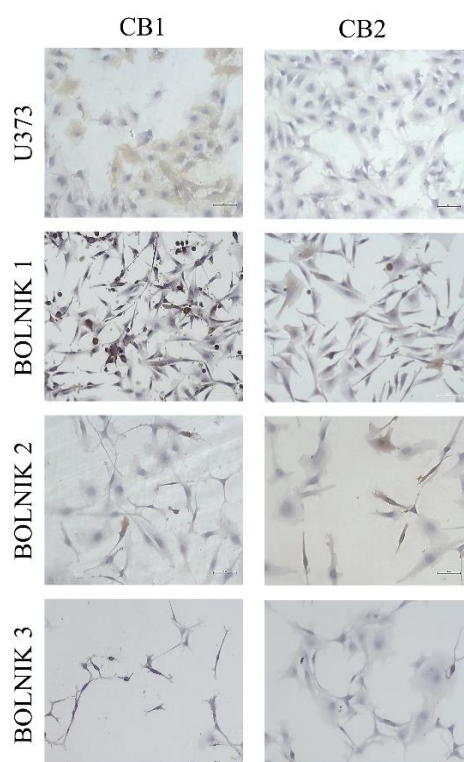
(Invitrogen), ter čez medij položili krovno stekelce. Stekelca smo nato sušili čez noč v digestoriju, shranili na sobni T in na fluorescentnem invertnem mikroskopu pri 10x in 20x povečavi analizirali proteinsko izražanje CB1 in CB2 na tkivnih rezinah in celicah.

## 7.2 Rezultati

1. Izražanje receptorjev CB1 in CB2 na diferenciranih glioblastomskih tumorskih celicah izoliranih iz bolnikov.

Preverili smo izražanje receptorjev CB1 in CB2 na proteinskem nivoju na diferenciranih glioblastomskih tumorskih celicah, ki smo jih vzgojili iz tumorskih vzorcev bolnikov ter celic že ustaljene linije U373.

Rjava barva predstavlja prisotnost receptorjev CB1 in CB2. Pri vseh bolnikih ter U373, razen pri bolniku 3, smo potrdili izražanje receptorjev CB1 in CB2. Pri bolniku 3 nismo detektirali izražanja receptorjev. Izražanje receptorjev CB2 smo videli v nekoliko manjšem obsegu pri U373 ter v visokem izražanju pri bolniku 1.



**Slika 2: Izražanje receptorjev CB1 in CB2 na GB celicah (Vir: NIB)**

Celice, fiksirane s 4% PFA, slikane z invertnim mikroskopom pri 20x povečavi. Receptorja CB1 in CB2 sta označena z rjavo barvo, jedra celic so označena z modro barvo).

**Tabela 1: Kvantifikacija izražanja receptorjev CB1 in CB2 na GB celicah**

<b>BOLNIK</b>	<b>CB1</b>	<b>CB2</b>
U373	+	-
BOLNIK 1	+	++
BOLNIK 2	+	+
BOLNIK 3	-	-

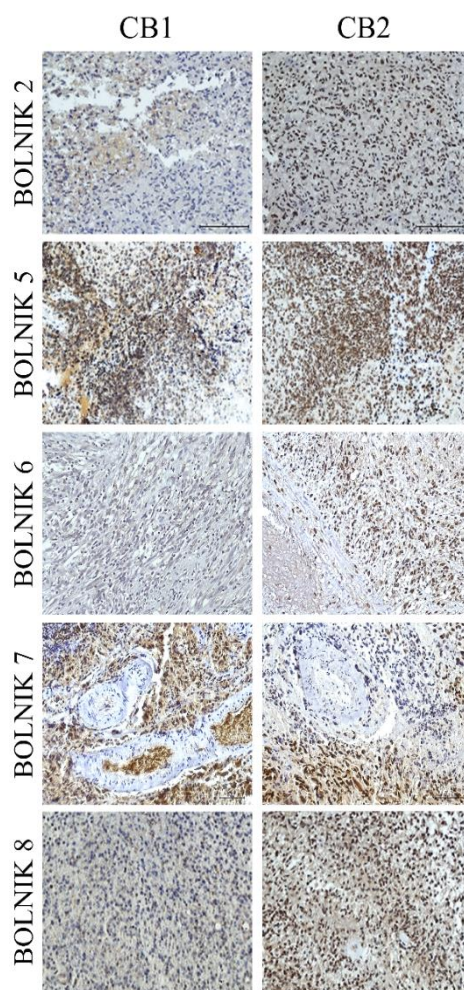
Iz preglednice 1 je razvidno, da so se receptorji CB1 in CB2 izraženi pri bolniku 1, kot tudi pri bolniku 2. Pri bolniku 1 je CB2 izražen srednje visoko, kar prikazuje večja obarvanost. Pri bolniku 3 receptorji CB1 in CB2 niso izraženi. Medtem, ko je pri U373 nizko izražen samo CB1. CB2 ni izražen.

2. Izražanje receptorjev CB1 in CB2 na parafinskih glioblastomskih tumorskih rezinah bolnikov.

Izražanje receptorjev smo preverili tudi na parafinskih rezinah tumorjev bolnikov, ki so jih pripravili na UKC, Oddelku za Patologijo. Teh rezin od vseh pacientov nismo dobili in smo tako preverili receptorje le na tumorjih nekaterih bolnikov. Patolog je določil tri parametre opazovanja obarvanja; intenziteto barvanja, % pozitivno obarvanih celic in lokalizacijo receptorjev.

Na tkivu bolnika 2 smo pri receptorju CB1 opazili najmanjšo intenziteto obarvanja, le 1% pozitivnih celic ter lokalizacijo receptorjev v citoplazmi. Tudi pri receptorju CB2 je bila intenziteta obarvanja manjša vendar je bil delež pozitivnih celic 80-90%, lokalizacija receptorja CB2 pa je bila jedrna. Pri bolniku 5 je bilo obarvanje za receptor CB1 srednje, pozitivnih celic je bilo 20-30%. Receptor se je tudi v tem tkivu nahajal v citoplazmi. Intenziteta obarvanja je bila tudi pri receptorju CB2 srednja z nad 90% obarvanih celic ter lokalizacijo receptorja v jedru. Tkivo bolnika 6 je bilo pri receptorju CB1 negativno, nismo opazili prisotnosti barvila, pri receptorju CB2 pa je bila intenziteta obarvanja srednja z 90% pozitivnih celic in lokalizacijo v jedru ter v citoplazmi. Tkivo bolnika 7 je bilo v primeru receptorja CB1 najmanj do srednje intenzivno obarvano, delež pozitivnih celic je bil 80%, lokalizacija receptorjev pa je bila poleg citoplazemske tudi jedrna. Pri receptorju CB2 je bila intenziteta srednja, delež pozitivnih celic 70%, lokalizacija receptorja pa spet jedrna ter citoplazemska. Tkivo bolnika 8 je pri receptorju CB1 podobno bolniku 2, intenziteta obarvanja je najmanjša, obarvan je le 1% celic, receptorji pa se nahajajo v citoplazmi ter v

jedru. Pri CB2 pa je bila intenziteta obarvanja srednja, opaženih je bilo 20% pozitivnih celic in lokalizacija receptorja jedrna ter citoplazemska.



**Slika 3: Izražanje receptorjev CB1 in CB2 na GB tkivnih rezinah (Vir: NIB)**

Glioblastomske parafinske sekcije tkiv bolnikov, slikane z invertnim mikroskopom pri 20x povečavi. CB1 in CB2 sta označena z rjavo barvo, jedra celic so obarvana modro.

**Tabela 2: Kvantifikacija izražanja receptorjev CB1 in CB2 na GB tkivnih rezinah**

	CB1			CB2		
	Intenziteta barvanja	Pozitivne celice (%)	Lokalizacija	Intenziteta barvanja	Pozitivne celice (%)	Lokalizacija
<b>BOLNIK 2</b>	1+	1	C	1	80-90	j
<b>BOLNIK 5</b>	2	20-30	C	2	>90	j
<b>BOLNIK 6</b>	-	-	-	2+	90	j, c
<b>BOLNIK 7</b>	1-2	80	j,c	2+	70	j, c
<b>BOLNIK 8</b>	1	1	j,c	2	20	j, c



### 7.3 Interpretacija rezultatov

V sklopu raziskovalne naloge sva opazovali diferencirane glioblastomske celice izolirane iz 3 bolnikov in parafinske glioblastomske tumorske rezine 5 bolnikov. V kar sedmih primerih bolnikov je bil izražen vsaj eden izmed receptorjev CB1 ali CB2, kar pomeni, da samo pri enem bolniku ni bilo izražanja receptorja CB1 ali CB2 (ni bilo prisotne rjave barve). Pri šestih bolnikih smo opazili izražanje CB1, medtem ko smo pri sedmih bolnikih opazili izražanje CB2. Pri bolnikih (GBM tkivne rezine), pri katerih je bil izražen CB1, je bila intenzivnost obarvanja (intenzivnost rjave barve) najmanjša (2 primera), srednja (1 primer), in pri bolniku 7 nekaj med najmanjšo in srednjo intenzivnostjo. Pri bolnikih (GBM tkivne rezine) je moč opaziti, da se receptor CB2 intenzivneje izraža (rjava barva je intenzivnejša). Pri kar štirih primerih (od petih) je izražanje CB2 srednje, v enem primeru pa je najmanjša intenzivnost barvanja. Iz preglednice 2. (GBM tkivne rezine) lahko opazimo, da je rjava barva intenzivnejša, saj je tudi pozitivnih celic (v katerih je receptor izražen) v štirih od petih primerov višji od 70% (v 3 primerih je bilo izražanje receptorja v 90% celic). V enem primeru se je receptor izražal samo pri 20% celic, kar pa je še vedno več, kot pri dveh primerih, kjer se je CB1 izražal samo pri 1% celic. CB1 se je pri bolniku 5 izrazil v 20-30% celic in pri bolniku 7 v 80% celicah. Iz preglednice je razvidno, da se receptor CB2 ne samo pogosteje izraža v GBM celicah, ampak je intenziteta barvanja, zaradi visokega izražanja v celicah (70% in več), intenzivnejša, kot receptor CB1. Tudi iz preglednice 1 je moč opaziti, da se je pri bolniku 1, CB2 bolj izražen (++), kot pa CB1. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko rečemo, da je v glioblastomskih vzorcih, ki smo jih analizirali, CB2 receptor bolj pomemben.

Potrdili smo hipotezo raziskovalne naloge, ki daje v ospredje razumevanje kako so kanabinoidni receptorji izraženi pri različnih pacientih. Rezultati nam kažejo, da je izražanje receptorjev heterogeno in da je to zelo pomemben podatek pri razumevanju samega učinka kanabinoidov pri dopolnilnem zdravljenju bolnikov z glioblastomom. Pri analiziranih bolnikih, bi lahko uporabili kanabinoide. Glede na intenzivnost izražanja receptorjev, lahko samo domnevamo, pri katerem bolniku bi kanabinoidi bolj učinkovali, vendar so za gotovost te trditve potrebne pred-klinične študije, kjer bi te glioblastomske celice tretirali s kanbinoidi in gledali odziv le teh (viabilnost celic). Ni namreč nujno, da večja inteziteta izražanja receptorjev pomeni tudi večjo učinkovitost kanabinoidov.

Prav zaradi tega, da to ne bi bilo samo teoretično sklepanje na malem številu bolnikov (osmih bolnikov), bi bilo potrebno, da bi potekale pred-klinične in klinične raziskave na širši

populaciji bolnikov s točno določenimi kanabinoidnimi preparati in opredeljenimi cilji njihovih učinkov. Same pred-klinične študije so namreč na vzorcih bolnikov etično podprte z dovoljenjem Komisije za medicinsko etiko s številko odobritve 0120-190/2018/4.

## 8. ZAKLJUČEK

Kanabinoidi si vedno hitreje vtirajo pot v uradno medicino, a morajo zato premagovati stigmo nevarnega, neučinkovitega mamila, ki je nastala v več desetletjih obravnave v kontekstu rekreativne uporabe. Za uporabo kanabinoidov kot protitumorskega zdravila je še premalo dokazov. Res pa je, da so bile klinične študije v preteklosti navadno slabše zasnovane in izvajane na zelo majhnem številu bolnikov. Vsekakor pa vsaj v Sloveniji zanimanje laične javnosti in potencialnih uporabnikov močno prehiteva stroko. Ob tem je največja nevarnost za bolnika v tem, da slednji zaradi samozdravljenja odlaša z onkološkim zdravljenjem, morebitno poslabša delovanje onkološke terapije, si s prekomernim jemanjem povzroči druge neželene učinke ter z dragim nakupom nereguliranih (nečistih) učinkovin (hašišovo olje, smole...) močno obremeni svoje finančno stanje. Ključno je v prihodnosti zagotoviti, da bo bolnik od svojega zdravnika in drugih zdravstvenih delavcev lahko dobil z dokazi podprte podatke o kanabinoidih, saj se v nasprotnem obračajo k potencialno škodljivemu samozdravljenju, manjša pa se zaupanje v uradno medicino. Tudi, če se bo v kliničnih študijah izkazalo, da imajo kanabinoidi protitumorski učinek, to ne bo čarobno zdravilo, temveč bo terapevtski učinek viden zgolj pri določenih vrstah raka oz. v kombinaciji z nekaterimi drugimi zdravili. Še prej bo s pomočjo kliničnih študij treba ugotoviti, kateri kanabinoidi ali njihove kombinacije so najučinkovitejše. Njihova uporaba pa bo nato predpisana sočasno s konvencionalnim onkološkim zdravljenjem v skrbno določenem odmerku.

## 9. DRUŽBENA ODGOVORNOST

Z raziskovalnim delom smo kot raziskovalci odgovorni da je našo delo vestno, zanesljivo, v skladu z etičnimi načeli in da se zavedamo da bodo naši rezultati imeli vpliv na ljudi na družbo kot celoto in jih ne bomo zlorabljali oz. uporabili v škodo ljudem.

Najina raziskovalna naloga obravnava problem odpornosti glioblastoma na standardno terapijo (obsevanje, kemoterapija), kar ima za posledico ponovitev tumorja in zgodnjo smrt bolnikov. Potrebna je uvedba novih terapij, ki upoštevajo kompleksnost glioblastoma in zahtevajo poglobljeno razumevanje osnovne biologije te bolezni. Ni presenetljivo, da se prav ta rak največ proučuje glede učinka kanabinoidov, predvsem v živalskih modelih (*in vivo*). Mehanizmi delovanja in možne načine protitumorskega delovanja pa najbolj učinkovito raziskujemo na tumorskih celicah bolnikov, ki jih vzgojimo v laboratoriju (*in vitro*).

Kanabinoidi v onkologiji in medicini nasploh kažejo velik terapevtski potencial, nujne pa so tako nadaljnje pred-klinične in klinične raziskave, ki bodo dobra osnova za nadaljnje inovativne pristope k uspešnem ciljanju glioblastomskih rakavih celic.

## 10. VIRI

1. Alexander B. M. in Cloughesy T. F. Adult Glioblastoma. 2017, št. 21, str. 2402.
2. Bagar T., Kanabinoidi (online). Citirano 1.2.2019. Dostopno na naslovu: <http://www.institut-icanna.com/>
3. Červek, J.A. Smernice za zdravljenje s kanabinoidi in klinična pot zdravljenja s kanabinoidi. 2016, str. 1-8.
4. Červek J. A. Uporaba kanabinoidov v onkologiji. 2016, str. 80 – 86.
5. Ferjan I., Kržan M. in drugi: Farmakologija kanabinoidov. 2015, str. 456 – 460.
6. Grošelj B., Oražem M., Kovač V. Učinkovitost kanabinoidov pri zdravljenju raka – mit ali resnica? 2018, št.1, str. 8 - 10.
7. Panjan P., Štrukelj B. Razvoj genskega zdravljenja pri glioblastomu. 2014, str. 354 – 356.
8. Pirc M. V. Okno: Glasilo društva onkoloških bolnikov Slovenije. 2017, št.1, 10 – 12 in 34 – 36.
9. Zadnik V, Primic Žakelj M. SLORA: Slovenija in rak. Epidemiologija in register raka. Onkološki inštitut Ljubljana. (online). Citirano 1.2.2019. Dostopno na <http://www.slora.si/>