

Ekstrakcija kanabidiola s hidrofobnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima i učinci u uvjetima in vitro na stanične linije

Češi, Martin

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:341843>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Martin Češi

**EKSTRAKCIJA KANABIDIOLA S
HIDROFOBNIM
NISKOTEMPERATUNIM
EUTETIČKIM OTAPALIMA I
UČINCI U UVJETIMA *in vitro* NA
STANIČNE LINIJE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Marka Obranovića i na Institutu za medicinsko istraživanje i medicinu rada pod komentorstvom dr. sc. Andreje Jurič, znan. sur, Institut za medicinsko istraživanje i medicinu rada.

Ovo istraživanje provedeno je u okviru projekta „Razvoj inovativnog postupka proizvodnje CBD ulja iz cvijeta industrijske konoplje i novih visokotehnoloških proizvoda - ekstrakata iz organskih poljoprivrednih sirovina“ (KK.01.2.1.02.0140) koji je sufinanciran sredstvima Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj. Nositelj projekta – Moje sunce d.o.o., Osijek, voditelj suradnje na PBF-u, doc.dr.sc. Marko Obranović. Program: Ulaganje u znanost i inovacije; Operativni program Konkurentnost i kohezija 2014. - 2020.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Marku Obranoviću i komentorici dr. sc. Andreji Jurič na omogućavanju i pomoći u stvaranju ovoga rada. Također zahvaljujem svima iz Instituta za medicinska istraživanje i medicinu rada bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć.

Također, zahvalio bih svojoj obitelji koja mi je pružila podršku tijekom akademskog putovanja i mogućnost da se ono privede kraju.

Najviše zahvaljujem svojoj djevojci Karolini na emocionalnoj podršci, razumijevanju, razgovorima, na velikom strpljenju i savjetima u svakom trenutku, Antonu na prijateljskoj podršci i vremenu provedenom u ispitnim periodima i Tei, Edini i Elvisu na pomoći tijekom studija i ugodnom društvu na fakultetu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ulja i masti

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

Ekstrakcija kanabidiola s hidrofobnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima i učinci u uvjetima
in vitro na stanične linije

Martin Češi, univ. bacc. ing. techn. aliment, 0058211473

Sažetak:

Ekstrakcija kanabinoida, primarno kanabidiola (CBD), iz industrijske konoplje je relativno nova grana industrije i ostavlja dovoljno prostora za inovacije i optimiranje procesa. Standardni procesi uključuju primjenu etanola i drugih organskih otapala te superkritičnog CO₂. Kao alternativa ovim postupcima ispitana je mogućnost primjene lipofilnih eutektičkih otapala (DES). U radu su napravljena preliminarna laboratorijska istraživanja i optimiranje procesa na odabranom DES-u uz varijacije omjera suhe tvari i otapala, vremena ekstrakcije te temperature. Udio ekstrahiranih ukupnih kanabinoida, CBD i kanabinola (CBN) određen je putem tekućinske kromatografije dok je udio nepoželjnih klorofila u ekstraktu određen spektrofotometrijski. Provedeni su toksikološki testovi *in vitro* na staničnim linijama, koji pokazuju povoljne učinke na stanično preživljenje. Time je dokazano da ekstrakt CBD-a u hidrofobnom DES-u ima značajan potencijal za daljna istraživanja i moguću primjenu u prehrambenoj industriji, farmciji i kozmetici.

Ključne riječi: *Konoplja, CBD, hidrofobni DES, komet-test, MTS*

Rad sadrži: 79 stranica, 17 slika, 22 tablica, 115 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Marko Obranović

Komentor: dr. sc. Andreja Jurič, znan. sur., Jedinica za toksikologiju - Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković
2. doc. dr. sc. Marko Obranović
3. dr. sc. Nevenka Kopjar, znan. savj. (tr. zv.), IMI
4. prof. dr. sc. Sandra Albino

Datum obrane: 20. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Oil and Fat Technology
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology
Graduate university study programme: Food Engineering

Extraction of cannabidiol with hydrophobic low-temperature eutectic solvents and effects in vitro on cell lines

Martin Češi, univ. bacc. ing. techn. aliment, 0058211473

Abstract:

The extraction of cannabinoids, primarily cannabidiol (CBD), from industrial hemp is a relatively new branch of the industry and leaves plenty of room for innovation and optimization of the process. Standard processes include the use of ethanol and other organic solvents and supercritical CO₂. As an alternative to these procedures, the possibility of using lipophilic eutectic solvents (DES) was examined. In the paper, preliminary laboratory research and optimization of the process on the selected DES were carried out with variations in the ratio of dry matter and solvent, extraction time and temperature. The proportion of extracted total cannabinoids, CBD and cannabinol (CBN) was determined by liquid chromatography, while the proportion of undesirable chlorophylls in the extract was determined spectrophotometrically. In vitro toxicological tests were performed on cell lines, which show favorable effects on cell survival and genome stability. This proved that CBD extract in hydrophobic DES has significant potential for further research and possible application in the food industry, pharmacy and cosmetics.

Keywords: *Hemp, CBD, hydrophobic DES, comet-test, MTS test*

Thesis contains: 79 pages, 17 figures, 22 tables, 115 references, 00 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD Assistant professor Marko Obranović

Co-mentor: PhD Andreja Jurič, *Research Associate* (IMI)

Reviewers:

1. Ivana Radojčić Redovniković, PhD Full professor
2. Marko Obranović, PhD Assistant professor
3. Nevenka Kopjar, PhD, Scientific Adviser (with tenure), IMI
4. Sandra Albino, PhD, Full professor

Thesis defended: September 20th, 2022

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KONOPLJA.....	2
2.2. KANABINOIDI.....	4
2.3. KANABIDIOL (CBD) ULJE	5
2.4. EKSTRAKCIJA.....	6
2.5. NISKOTEMPERATURNA EUTETIČKA OTAPALA (DES).....	8
2.6. DEKARBOKSILACIJA	9
2.7. HPLC	10
2.8. KLOOROFIL.....	11
2.9. KULTURE STANICA.....	12
2.10. TESTOVI TOKSIČNOSTI NA STANIČNOJ RAZINI.....	14
2.10.1. MTS TEST.....	14
2.11. TESTOVI ZA PROCJENU ŠTETNIH UČINAKA KEMIJSKIH SPOJEVA NA RAZINI DNA.....	14
2.11.1.KOMET-TEST	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. CILJEVI.....	17
3.2. HIPOTEZE	18
3.3. MATERIJALI.....	18
3.4. KEMIKALIJE.....	18
3.5. METODE.....	22
3.5.1. DEKARBOKSILACIJA UZORKA KONOPLJE	22
3.5.2. PRIPREMA DES-A ZA MEHANIČKU EKSTRAKCIJU	22
3.5.3. PRELIMINARNA EKSTRAKCIJA S DES-OM I KONTROLNAEKSTRAKCIJA S ETANOLOM	22
3.5.4.SPEKTROFOTOMETRIJA.....	24
3.5.5.ANALIZA HPLC-OM.....	24
3.5.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	27
3.5.7. POSTAVLJANJE EKSPERIMENTALNOG MODELA ZA TESTIRANJE UČINAKA U UVJETIMA <i>IN VITRO</i>	27
3.5.7. TESTOVI ZA PROCJENU TOKSIČNIH UČINAKA NA RAZINI STANICA	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	34
4.1. PRELIMINARNE EKSTRAKCIJE	34

4.2. KONCETRACIJA KLOOROFILA A I B I OSTALIH KANABINOIDA	35
4.3. HPLC ANALIZA.....	35
4.4. OPTIMIRANJE EKSTRAKCIJE	38
4.5. PREŽIVLJENJE STANICA – MTS TEST	40
4.6. KOMET-TEST	41
4.6.1. Razine primarnih oštećenja DNA u HepG2 stanicama	41
4.6.2. Razine primarnih oštećenja DNA u 1321N1 stanicama.....	47
4.6.3. Razine primarnih oštećenja DNA u HaCaT stanicama	53
5. ZAKLJUČAK	65
6. LITERATURA	66

1. UVOD

Konoplja (*Cannabis sativa* L.) biljka je podrijetlom iz Azije koja ima povijesnu primjenu u prehrani, tekstilu i medicini. U drugoj polovici 20.st. stavljena je izvan zakona zbog Δ^9 -tetrahidrokanabinola (THC) koji ima velika psihoaktivna svojstva te se zbog njega neke podvrste ove biljke koriste kao sredstvo zlouporabe (Attard i sur., 2018). U biljci *Cannabis sativa* L., uz THC, najzastupljeniji fitokanabinoid je kanabidiol (CBD). On postaje tema brojnih istraživanja jer može imati povoljniju aktivnost u usporedbi s psihoaktivnim THC-om. Navodi se da se proizvodi koji sadrže CBD mogu koristiti u ublažavanju brojnih medicinskih dijagnoza, bez psihoaktivnih nuspojava (Bonaccorso i sur., 2019). Provedena su brojna istraživanja koja su procjenjivala učinak CBD-a u nizu psihopatoloških stanja, kronične boli i neuroloških poremećaja (Grotenhermen, 2005; Russo, 2011; Citti i sur., 2017). Na tržištu se CBD pojavljuje u obliku smole ili ulja koji se dobivaju različitim ekstrakcijskim metodama. S obzirom na to da su tradiciionalne ekstrakcijske metode skupe i pritom se koriste otapala koja u većoj primjeni mogu biti toksična za konzumenta i nisu ekološki prihvatljiva (Hara i Radin, 1978; Ashafa i sur., 2012; Křížek i sur., 2018), dolazi do potražnje za alternativnim metodama. Također, u postupcima ekstrakcije koriste se visoke temeperature koje mogu razgraditi željene spojeve i smanjiti njihovu koncentraciju. Upravo zato, niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES) postaju tema brojnih istraživanja u novim pristupima ekstrakciji koja dokazuju da zbog jedinstvenih svojstava kao što su gustoća, viskoznost, kiselost ili bazičnost, polaritet i hlapljivost, a zbog dobre sposobnosti ekstrakcije različitih analita mogu biti potencijalno rješenje za zamjenu tradicionalnih otapala (van Osch i sur., 2019). Cilj ovoga rada bio je ispitati sposobnost ekstrakcije CBD-a u hidrofobnim DES-ovima jer se pregledom literature ustanovilo da je ta tema nedovoljno istražena, a dosadašnja istraživanja upućuju na mogućnost pripreme netoksičnih ekstrakata uz zadovoljavanje svih standarda zelene kemije (Makoš i sur., 2020). Nadalje, u ovom radu ispitani su učinci DES-a i CBD-a na humanim staničnim linijama jetre (HepG2), živčanih stanica (1321N1) i stanica kože (HaCaT), u svrhu procjene toksičnosti ekstrakta CBD-a u hidrofobnom DES-u na ljudski organizam i radi određivanja potencijalne dodatne primjene u medicini i kozmetici, ali i za zaključivanje potrebe uklanjanja ekstrakcijskog otapala.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KONOPLJA

Konoplja je jednogodišnja kritosjemenjača iz porodice Cannabinaceae i roda *Cannabis* L., podrijetlom iz Indije i Kine. Taksonomski se u rod *Cannabis* svrstavaju tri različite vrste. To su *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* i *Cannabis ruderalis*, ali se prihvaća i klasifikacija *Cannabis sativa* kao monotipične vrste s tri podvrste: *Cannabis sativa* subsp. *sativa* (industrijska konoplja, slika 1), *Cannabis sativa* subsp. *indica* (indijska konoplja), *Cannabis sativa* subsp. *ruderalis* i četiri varijeteta: *Cannabis sativa* L. subsp. *sativa* var. *sativa*, *Cannabis sativa* L. subsp. *sativa* var. *spontanea*, *Cannabis sativa* L. subsp. *indica* var. *indica* i *Cannabis sativa* L. subsp. *indica* var. *kafiristanica*. Tijekom povijesti se koristila u prehrambene i ljekovite, ali i tekstilne svrhe. U biljci je identificirano više od stotine bioaktivnih spojeva kao što su fenoli, proteini, masne kiseline, terpeni, kanabionodi, esteri, steroli, aldehidi, laktoni, pigmenti itd., a najveći izvori tih komponenata su list, cvijet i sjeme (Cerino i sur., 2021).



Slika 1. Industrijska konoplja - *Cannabis sativa* L. subsp. *sativa* (Plants of the World Online, 2017)

Cannabis sativa L. (Slika 1) daje male plodove, botanički definirane kao orašice ili ahenije (engl. *achenes*), iako se oni obično nazivaju "sjemenke" koje mogu biti različite veličine ovisno o sorti. Pravo sjeme je zatvoreno u perikarpu koji predstavlja zaštitnu ljusku. Većina sjemena sastoji se od zametka, uglavnom od dva kotiledona (embrionalni listovi) bogatih uljima, odnosno višestruko nezasićenim masnim kiselinama te proteinima i ugljikohidratima koji predstavljaju hranu biljci tijekom klijanja. Ima ugodan orašasti okus i važan je izvor esencijalnih aminokiselina, masnih kiselina, mineralnih tvari, vitamina i vlakana, a klice

konoplje bogat su izvor antioksidansa (Rupasinghe i sur., 2020; Cerino i sur., 2021). U sjemenu se nalaze bioaktivne komponente kao što su terpeni i kanabinoidi u tragovima koje mogu pridonijeti iznenađujućim blagotvornim učincima sjemenki konoplje. Višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA) čine oko 80 % ukupnih masnih kiselina, uključujući linolnu, α -linolensku i γ -linolensku kiselinu te nude najbolji omjer omega-6 prema omega-3 PUFA, što je optimalno za ishranu, i zbog toga su izuzetno povoljne za proizvodnju jestivog ulja.

Ulje konoplje ekstrahira se iz sjemenki biljke industrijske konoplje postupkom hladnog prešanja. Hladno prešano ulje sjemenki konoplje može poslužiti i kao prehrambeni izvor prirodnih antioksidansa, poput γ -tokoferola i vitamina E koji doprinose prevenciji bolesti i promicanju zdravlja (Cittia i sur., 2017). Stoga je prisutnost antioksidansa jamstvo hladno prešanog ulja, a time i kemijske stabilnosti protiv oksidacijske užeglosti i relativno kratkog roka trajanja. Koncentracije kanabinoida među različitim vrstama ulja mogu vrlo varirati. Dopuštene sorte *Cannabis sativa* L., koje se mogu koristiti u Europi za proizvodnju, su one koje sadrže dopuštene razine THC-a, odnosno ne više od 0,2 %. Kao rezultat toga kontaminacija THC-om u ulju sjemenki konoplje općenito je niska i ne prelazi granicu od 5 mg/kg. Također, sjemenke konoplje ne sadrže kanabinoide, ali njihov kontakt sa smolom koju luče epidermalne žlijezde smještene na cvjetovima i lišću, koji imaju najveći sadržaj kanabinoida, može uzrokovati prisutnost kanabinoida u ulju konoplje (Citti i sur., 2017).

Indijska konoplja najšire je konzumirana i najpopularnija biljka na svijetu. Ona je rekreacijski i medicinski botanički lijek zbog svojih psihoaktivnih svojstva, a konzumira se najčešće pušenjem osušenih cvjetova i listova biljke ili u obliku smole (hašiš, ulje hašiša). Pravni status biljke značajno se razlikuje od države do države te je zbog njezine raširene uporabe i nedovoljno definiranih pravnih regulativa došlo do značajnog povećanja broja istraživanja u forenzičkim laboratorijima (Wang i sur., 2016). Problematičan je spoj u biljci psihoaktivni Δ^9 -tetrahidrokanabinol (THC) te je zbog toga ilegalan posjed, proizvodnja i konzumacija biljke sa sadržajem THC-a većim od 0,2 % (Zakon, NN 39/19), primjerice u državama članicama Europske unije. S druge strane, za dobivanje proizvoda od industrijske konoplje mogu se koristiti različite metode ekstrakcije kao što su: mehanička ekstrakcija, Soxhletova metoda, ekstrakcija vrućom vodom (hidroliza), ekstrakcija tekućina-tekuća, superkritična ekstrakcija pomoću CO₂ (SC-CO₂), ekstrakcija potpomognuta enzimima, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima ili ultrazvukom (Valizadehderakhshan i sur., 2021).

2.2. KANABINOIDI

Kanabinoidi (CB) spojevi su iz skupine terpenofenolnih spojeva s dvadeset jednim ugljikovim atomom (Raharjo i Verpoorte, 2004). Najviše su zastupljeni u ženskim cvjetovima i lišću konoplje, a manje u ostalim dijelovima biljke, dok ih sjeme biljke ne sadrži (Ameri, 1999). Kemijski sastav konoplje uvelike je određen genetikom, ali na njega također utječe uzgoj, žetva, sušenje i drugi čimbenici tijekom proizvodnje (Foster i sur., 2019). Kanabinoidi su lipofilni i apsorbiraju se, odnosno vežu se na specifične membranske receptore (Ameri, 1999; Izzo i sur., 2009; Foster i sur., 2019). U ljudskom organizmu djeluju kao endogeni agonisti kanabinoidnih receptora, a dva su glavna spoja iz te skupine N-arahidonoiletanolamid (AEA) i 2-arahidonoilglicerol (2-AG). Ti receptori raspoređeni su u središnjem živčanom sustavu i mnogim perifernim tkivima, uključujući imunološki sustav, reproduktivni sustav, gastrointestinalni trakt, simpatičke ganglije, endokrine žlijezde, arterije, pluća i srce (Izzo i sur., 2009). Svojstva agonista kanabinoidnih receptora, koja su od terapijskog interesa, uključuju analgeziju, opuštanje mišića, imunosupresiju, protuupalno, antialergijsko djelovanje, poboljšanje raspoloženja, stimulaciju apetita, antiemezu, snižavanje intraokularnog tlaka, bronhodilataciju, neuroprotektivna i antineoplastična djelovanja. U novije vrijeme provode se klinička istraživanja za njihovu učinkovitost kod kronične boli i neuroloških poremećaja (Grotenhermen, 2005). Antagonisti CB receptora istražuju se s ciljem upotrebe u liječenju pretilosti i ovisnosti o nikotinu. Dodatni predloženi su za liječenje ovisnosti o alkoholu i heroinu, shizofrenije, sniženog krvnog tlaka, Parkinsonove bolesti i oštećenja pamćenja kod Alzheimerove bolesti (Grotenhermen, 2005; Citti i sur., 2017) pa tako i kod raznih psihopatoloških stanja kao što su psihoza, anksioznost, poremećaji raspoloženja, poremećaji u prehrani, opsesivno-kompulzivni poremećaji, posttraumatski stres (PTSP) i drugi psihijatrijski poremećaji (Bonaccorso i sur., 2019). Kanabinoidi se dijele na sintetske i fitokanabinoide. Sintetski kanabinoidi sadrže stotinjak spojeva i podijeljeni su u šest skupina. Fitokanabinoidi specifični su za konoplju i sadrže više od 110 spojeva podijeljenih u 11 skupina (Scheau i sur., 2020), a glavni predstavnici ove skupine kanabinoida su: Δ^9 -tetrahidrokanabinol (THC), kanabidiol (CBD), kanabigerol (CBG), kanabinol (CBN) i kanabikromen (CBC) (Russo, 2011). Kanabigerol (CBG) relativno je nepoznat nepsihoaktivni fitokanabinoid s analgetskim, antiproliferativnim i antibakterijskim djelovanjem, kao i antikancerogenim svojstvima i sposobnošću snižavanja intraokularnog tlaka. Sve više razmatra kao potencijalna mogućnost za liječenje glaukoma, upalnih bolesti crijeva i raka debelog crijeva (Moreno i sur., 2020). Relativno je sporedna komponenta, ali postoje određeni kemotipovi konoplje razvijeni s mogućnosti izražavanja 100 % svog sadržaja određenog kanabinoida. Kanabinol (CBN)

pojavljuje se u relativno malim količinama u svježem biljnom materijalu jer je proizvod oksidacije THC-a i obično se smatra kemijskim markerom za loše ili dugotrajne uvjete skladištenja (Russo, 2011; Moreno i sur., 2020).

2.3. KANABIDIOL (CBD) ULJE

Kanabidiol (CBD) ulje je koncentrirani ekstrakt dobiven iz cvjetova, stabljika i lišća te otopljen u jestivom ulju kao što su suncokretovo, konopljino ili maslinovo ulje (Hazenkamp, 2018). Ovo je ulje postalo izuzetno popularan proizvod u industriji medicinskih i prehrambenih proizvoda jer može biti korisno u liječenju određenih stanja bez brige o psihoaktivnim učincima ili učincima povezanima s korištenjem indijske konoplje (Marić, 2020). Sorte *Cannabis sativa* L., koje se koriste za proizvodnju sjemena s niskom razinom THC-a, općenito sadrže visoku koncentraciju CBD-a koji u odnosu na THC ne izaziva psihotropne aktivnosti, stoga je jedan od najviše proučavanih kanabinoida s dokazanom protuupalnom, antiepileptičkom, analgetskom, neuroprotektivnom, antipsihotičnom i antikonvulzivnom djelotvornošću (Citti i sur., 2017). Osim toga, djeluje i kao snažan antioksidans. Njihova koncentracija ovisi i o sorti i o postupku pročišćavanja sirovog biljnog materijala. Američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drugs Administration*, FDA) 2018. godine odobrila je korištenje CBD-a u čistom obliku (trgovačkog imena Epidiolex) koji se koristi za liječenje rijetkih oblika epilepsije i koji je odobren od strane Europske agencije za lijekove (engl. *European Medical Agency*, EMA) (Cerino i sur., 2021). CBD ulje dobiva se ekstrakcijom iz cvjetova, stabljike i lišća konoplje. Prema literaturnim podacima razlikujemo dvije metode ekstrakcije CBD ulja iz konoplje (Ramirez i sur., 2018; De Vita i sur., 2020). Prva je konvencionalna metoda u kojoj se ekstrakcija provodi organskim otapalima, poput etanola i etil-acetata. Ona uključuje maceraciju biljnog materijala u organskom otapalu što znači da se ekstrakt koncentrira uklanjanjem otapala pod sniženim tlakom. Spojevi u biljci izloženi su kombiniranom učinku topline i kiseline i mogu se kemijski modificirati. Upravo zato, jedan od nedostataka ove konvencionalne metode povezan je s termolabilnošću ekstrahiranih spojeva, a to znači da se njihove kemijske strukture mijenjaju zbog visokih temperatura. Ova vrsta ekstrakcije može se poboljšati uporabom ultrazvučnih ili mikrovalnih tehnika za povećanje prinosa (Mason i sur., 2011; Valizadehderakhshan i sur., 2021). Druge inovativne metode su, primjerice ekstrakcija superkričnom tekućinom (engl. *Supercritical Fluid Extraction*, SFE), koje podrazumijevaju korištenje otapala pod tlakom. Ugljični dioksid (CO₂) koristi se najčešće kao superkrično otapalo unatoč njegovoj neučinkovitosti u otapanju polarnih spojeva. Koristi se zbog niske cijene, netoksičnosti, nezapaljivosti, relativne kemijske

inertnosti i formiranja na niskoj temperaturi (31 °C) i zbog prikladnosti za termolabilne bioaktivne spojeve (Valizadehderakhshan i sur. 2021). Za postizanje topljivosti polarnih tvari potrebno je dodati otapalo ili modifikator koji bi se trebali potpuno miješati u superkritičnom CO₂. Topljivost ovisi o gustoći superkritičnog CO₂ i raste s povećanjem tlaka. Male razlike tlaka imaju značajan utjecaj na gustoću u uvjetima blizu kritične točke. Dok povećanje tlaka povećava gustoću, povećanje temperature obično je smanjuje, a tlak pare i topljivost povećavaju se. Optimizacijom ovih parametara, dobiveni kombinirani učinci daju bolje rezultate za SFE od drugih metoda (Attard i sur., 2018; Ramirez i sur., 2018). No, sama ekstrakcija sa superkritičnim CO₂ pokazuje srednji do nizak potencijal ekstrakcije topljivosti kanabinoida i terpena u odnosu na etanol čiji je raspon topljivosti veći. Također, sam proces zahtijeva velike troškove opreme i diskutabilne je sigurnosti pa se zbog toga traže alternativne metode ekstrakcije (Valizadehderakhshan i sur., 2021). Poslije ekstrakcije, često je potrebno određenim procesima ukloniti otapalo iz ekstrakta, a iz razloga što su mnoge druge biljne komponente koekstrahirane sa željenim kanabinoidima prisutnim u biljnom materijalu, oni se ponekad uklanjaju tretmanom poznatim kao „vinterizacija“. Stavljanjem ekstrakta u zamrzivač (od -20 do -80 °C) na 24 do 48 sati, komponente s višim talištem, poput voskova, triglicerida i klorofila, taložit će se, nakon čega se mogu ukloniti filtracijom ili centrifugiranjem. Ovakav tretman može značajno poboljšati okus i boju konačnog proizvoda (Hazenkamp, 2018). Proizvodi za konzumaciju CBD-a pojavljuju se u obliku ulja ili smole. Najvažnija razlika leži u koncentraciji CBD-a. Ulje najčešće sadrži 5 – 10 % CBD-a, a smola 20 – 80 % CBD-a (Vutropedija, 2021).

2.4. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je proces separacije u kojem se izdvajaju određene tvari iz čvrste ili tekuće faze prikladnim otapalom u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od drugih komponenata smjese (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Dijeli se, s obzirom na agregatna stanja triju faza, na: ekstrakciju čvrsto-tekuće, ekstrakciju tekuće-tekuće i ekstrakciju plinovito-tekuće. Temelji se na principu molekulske difuzije pri čemu otopina dolazi u kontakt s čistim otapalom ili otopinom niže koncentracije, zbog čega otopljeni tvar prelazi s područja više koncentracije na područje niže koncentracije sve dok ne dođe do izjednačavanja koncentracija (Herceg, 2011). Idealno otapalo ne smije reagirati s tvari koja se ekstrahira, mora biti otporno na više temperature, kisik i svjetlost, mora biti sigurno za upotrebu, a to znači da ne smije biti zapaljivo i štetno za ljude te mora biti ekološki prihvatljivo. Biraju se što jeftinija otapala i ona koja su pogodna za lako uklanjanje, reciklažu i ponovnu upotrebu. Tradicionalna otapala koja se

koriste u procesu ekstrakcije su etanol, metanol, aceton, etil-acetat i heksan (Drmić i Režek Jambak, 2010). Proces difuzije se opisuje Fickovim zakonom [1]:

$$dS = -D * F * \frac{dc}{dx} * d$$

[1]

gdje;

S označava količinu difundirane tvari (kg ili kmol),

D konstantu difuzije ili difuzivnost (m²/s),

F površinu difuzije (m²),

c molarnu koncentraciju (kmol/m³),

z vrijeme trajanja difuzije (s)

x duljina puta difuzije (m).

Ekstrakcija se odvija u tri osnovne faze, a to su miješanje ekstrakcijske sirovine i otapala u jednom ili više stupnjeva, zatim zadržavanje određeno vrijeme, koje je prethodno izračunato, i na kraju odvajane otapala ako je potrebno. U drugoj fazi dolazi do prijenosa mase topljive tvari iz ekstrakcijske sirovine u otapalo. Prijenos se odvija tako da se željena tvar otapa u otapalu, nakon čega ekstrakt kreće iz unutrašnjosti ekstrakcijske sirovine na površinu i, posljedično, željena tvar raspršuje se po cijelom volumenu otapala. Vrijeme ekstrakcije smanjuje se i sam proces pospješuje se tako što se ekstrakcijska sirovina usitnjava da bi se povećala dodirna površina između sirovine i otapala. Također, poželjno je provoditi ekstrakciju pri temperaturama višim do 100 °C da bi se smanjila viskoznost otapala kojem se analogno tome povećava protok i omogućuje lakše prodiranje slojevima krutih čestica (Herceg, 2011). Dodatno povećanje prinosa ekstrakcije dobiva se uporabom ultrazvučnih ili mikrovalnim tehnika. Povećanjem temperature može doći do razgradnje željenih tvari i do nastajanja nekih neželjenih spojeva. Iz toga se razloga istražuju nove metode koje bi pratile trend minimalno procesirane hrane i smanjilo korištenje visokih temperatura (Ramirez i sur., 2018). Nadalje, poželjno je smanjiti potrebu za odvajanjem otapala i tako smanjiti cijenu i vrijeme trajanja procesa ekstrakcije pa se zbog toga u novije vrijeme sve više istražuje ekstrakcija uz pomoć novih „zelenih otapala“, kao što su niskotemperaturna eutektička otapala (DES).

2.5. NISKOTEMPERATURNA EUTETIČKA OTAPALA (DES)

DES-ovi su ionska otapala definirana kao eutektička mješavina tekućih ili čvrstih komponenti koje miješanjem daju tekućinu čija je značajno svojstvo da joj je točka tališta niža od točke ledišta tih pojedinačnih komponenti. Mogu biti hidrofilna i hidrofobna. Uvrštena su u zelena otapala zajedno sa superkričnim tekućinama, ionskim tekućinama i vodom (Mišan i sur., 2019). Nisu u pravom smislu riječi ionske tekućine jer u strukturi ne sadrže ione, već dvije ili tri komponente međusobno povezane vodikovim vezama (Radošević i sur., 2016). Ključne komponente otapala su donori vodikovih veza, kao što su aminokiseline, organske kiseline, amidi, šećeri ili šećerni alkoholi i akceptori vodikovih veza koji su najčešće organske soli (Mbous i sur., 2017). DES-ovi su počeli privlačiti pažnju u „zelenoj kemiji“ jer se aktivno traže nova otapala kao zamjena za uobičajena organska otapala koja mogu biti toksična i imaju visoku hlapljivost, što dovodi do isparavanja hlapljivih organskih spojeva u atmosferu. Također, potrebno ih je često uklanjati određenim procesima iz proizvoda, što podrazumijeva dodatne troškove u proizvodnji u kojoj se primjenjuju.

Uvođenjem novih otapala, industrijski procesi čine se sigurnijima i održivijima i proizvode se „čisto označeni proizvodi“ koje potrošači zahtijevaju (Mišan i sur., 2019). Između ostaloga, alternativna otapala, koja su ovom slučaju DES-ovi, imaju povoljnija svojstva kao što su niska hlapljivost, toplinska i kemijska stabilnost, mogućnost podešavanja, nedostatak zapaljivosti, širok polaritet, nizak tlak pare, visoka topljivost i pristupačnost zbog jeftinijih cijena početnih komponentata. Dodatna prednost je ta, u odnosu na uobičajena organska otapala, da su početne komponente biorazgradive i netoksične (Paiva i sur., 2014). Upravo zbog tih svojstava, DES-ovi imaju široku mogućnost primjene u različitim područjima kao što su: procesi biotransformacije, procesi proizvodnje biodizela (proces pripreme – engl. *upstream* i proces obrade – engl. *downstream*), ekstrakcija različitih bioaktivnih tvari, transport i topljivost lijekova te nanotehnologija (Mišan i sur., 2019, Mbous i sur., 2017).

Brojna istraživanja provedena su već na hidrofilnim DES-ovima i konstatirano je da njihova hidrofilnost ograničava njihovu praktičnu primjenu samo na polarne spojeve, a to je glavni nedostatak takvih otapala. Hidrofobnim DES-ovima počinje se tek tražiti primjena u proizvodnji. U posljednjih nekoliko godina, hidrofobni DES-ovi pojavili su se kao alternativni ekstrakcijski mediji sposobni za ekstrakciju nepolarnih organskih i anorganskih molekula iz vodenog medija, kao i zbog nedostatka otapala koji zahtijevaju hidrofobne medije. Koncept hidrofobnog DES-a (HDES) uveli su van Osch i suradnici (2015) kada su kombinirali različite kvaternarne amonijeve soli s dekanskom kiselinom. Provedeno je istraživanje gdje je primijenjen hidrofobni DES za ekstrakciju u vodi netopivih hlapljivih organskih spojeva.

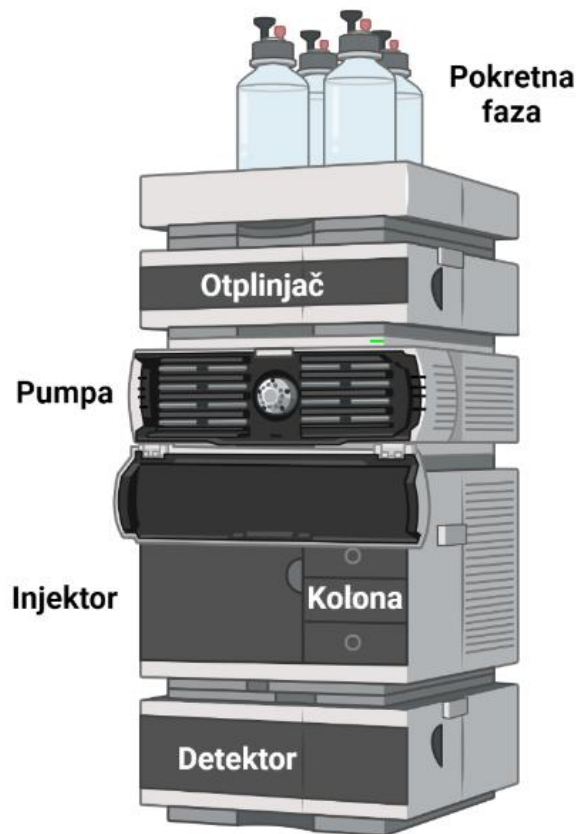
Rezultati su pokazali visok prinos i visoku učinkovitost ekstrakcije. Nadalje, dokazali su da je HDES na bazi mentola s octenom kiselinom (1:1) pokazao učinkovitiju ekstrakciju fitokanabinoida od tradicionalnih otapala poput metanola i etanola. Od tada su u tijeku aktivna istraživanja koja se provode u svrhu pronalaska kako se hidrofobni DES-ovi sintetiziraju te mogućnost njihove primjene u različitim područjima kemije i farmacije. Za proizvodnju HDES-ova koriste se jeftine, prirodne i obnovljive sirovine, a proizvodi se tako da se dvije komponente miješaju u određenim masenim omjerima nakon čega slijedi zagrijavanje, miješanje i/ili vrtložno miješanje (Dwamena, 2019). Unatoč brojnim prednostima HDES-a u ekstrakciji, neka od značajnijih ograničenja ovih otapala visoka su viskoznost, zamućenost, poteškoće u odvajanju faza tijekom ekstrakcije tekućine-tekućine i utjecaj na samu analizu (van Osch i sur., 2015). Testirano je 507 kombinacija čvrstih komponenti i to je rezultiralo identifikacijom 17 novih hidrofobnih DES-ova. Također, uvedena su četiri kriterija za procjenu održivosti ovih hidrofobnih DES-ova sa stajališta kemijskog inženjerstva. Ovi kriteriji uključuju viskoznost nižu od 100 mPas, razliku u gustoći između DES-a i vode od najmanje 50 kg/m³ pri miješanju, nizak prijenos DES-a u vodenu fazu te neznatna promjena pH vrijednosti (van Osch i sur., 2019).

2.6. DEKARBOKSILACIJA

Dekarboksilacija je kemijski proces u kojem dolazi do uklanjanja karboksilne skupine iz nekog spoja pri čemu dolazi do oslobađanja CO₂. Predstavlja važan korak u izolaciji glavnih komponenata u konoplji, a može se vršiti u biljnom ekstraktu ili samoj biljci u obliku suhog ili svježeg uzorka. Dekarboksilacija se može provoditi prije ili poslije ekstrakcije. Svježi uzorci konoplje u svom sastavu pretežito sadrže kanabinoide, poput THC-a, CBD-a, CBG-a i sl., u obliku karboksilnih kiselina i njihovih derivata (Giroud, 2002), no u takvom obliku oni su nestabilni te se lako dekarboksiliraju. Tada prelaze u stabilniji neutralni oblik, što nije posljedica djelovanja enzima, već jednostavne kemijske reakcije ili, točnije, razgradnje katalizirane toplinom. Također, smatra se da kanabinoide lakše prolaze hemato encefalnu barijeru krvno-moždanu barijeru kad su u neutralnom obliku (Moreno i sur., 2020). Brzina procesa dekarboksilacije ovisi o različitim čimbenicima, kao što su zagrijavanje iznad 120 °C, starenje biljke i djelovanje svjetla (Foster i sur., 2019). Uglavnom smatra se da što je viša temperatura, to je proces brži. Pretvorba se također odvija na sobnoj temperaturi, ali je puno sporija (Citti i sur., 2017). U rekreativnoj konzumaciji kanabisa dekarboksilacija se postiže pušenjem, parom ili pečenjem (Moreno i sur., 2020).

2.7. HPLC

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) kromatografska je tehnika koja se koristi se za odjeljivanje, identifikaciju i kvantifikaciju polarnih i nepolarnih spojeva u farmaceutskoj, biokemijskoj, forenzičkoj, kliničkoj praksi i industriji. Osnovni dijelovi HPLC uređaja su: spremnik za otapala pokretne faze, pumpa, injektor, po mogućnosti predkolona, kolona za odjeljivanje i detektor (slika 2). To je tehnika koja se standardno primjenjuje u analitičkoj kemiji (Luterotti, 2015). Ona osigurava veliku količinu podataka tijekom analitičkih mjerenja. Iako je svestrana tehnika odvajanja sa širokim rasponom primjene, proces je iznimno kompleksan zbog velikog broja varijabli koje je potrebno pravilno prilagoditi prije svakog pojedinačnog pokretanja. Optimiranje HPLC metoda složen je proces s obzirom na činjenicu da se nekoliko varijabli [pH pokretne faze (engl. *mobile phase*), koncentracija pufera, brzina protoka, temperatura, valna duljina detektora i dr.] moraju istodobno kontrolirati u postizanju željenog odvajanja, a otapala koja služe kao pokretna faza moraju biti visoke čistoće (Sahu i sur., 2017). Nosač nepokretne faze (engl. *stationary phase*) najčešće je silikagel. U kontekstu mjerenja kanabionoida, HPLC nudi dobru alternativu plinskoj kromatografiji (engl. *Gas Chromatography*, GC) jer djelovanjem visoke temperature dolazi do dekarboksilacije kanabinoida u njihove neutralne oblike. Upravo zato, često se primjenjuje HPLC u kombinaciji s detektorom vidljivog i ultraljubičastog zračenja (UV-VIS), detektor s nizom fotodioda (engl. *Diode-Array Detection*, DAD) ili detektorom s spektrometrijom masa (engl. *Mass Spectrometry*, MS) u kombinaciji s elektrosprej ionizacijom (engl. *Electrospray Ionization*, ESI) za analizu kanabinoida u konoplji (Brighenti i sur., 2017).



Slika 2. Shematski prikaz tekućinskog kromatografa. (Napravljeno pomoću BioRender.com)

2.8. KLOROFIL

Klorofil je pigment fotoautotrofnih organizama koji omogućuje proces fotosinteze pri kojem apsorbira sunčevu svjetlost te sintetizira ugljikohidrate i kisik iz CO_2 i vode (May, 2000). U pročišćenom ulju djeluje kao fotosenzibilizator za stvaranje singletnog kisika pod utjecajem svjetla. Eksperimentima je dokazano da je singletni kisik uglavnom odgovoran za fotooksidaciju ulja koje sadrži klorofil. Zbog toga je potrebno u konačnim proizvodima industrije ulja i masti imati što manje klorofila i pakirati proizvode u tamne boce. U industriji ulja i masti, udio klorofila u proizvodima smanjuje se procesom bjeljenja, ukoliko je to moguće (Fakourelis i sur., 1987; Li i sur., 2016). Spektrofotometrijsko određivanje klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida zasniva se na principu da svaki fotosintetski pigment ima svoj jedinstveni apsorpcijski spektar s apsorpcijskim maksimumima pri određenim valnim duljinama. Klorofili najbolje apsorbiraju svjetlost u plavom i crvenom dijelu vidljivog spektra pri čemu su apsorpcijski maksimumi za klorofil a u plavom (430 nm) i crvenom dijelu spektra (660 nm), a apsorpcijski maksimumi za klorofil b se nalaze između dvaju maksimuma klorofila a, na oko 450 i 640 nm (Abou-Arab i sur., 2010; Barba i sur., 2015).

2.9. KULTURE STANICA

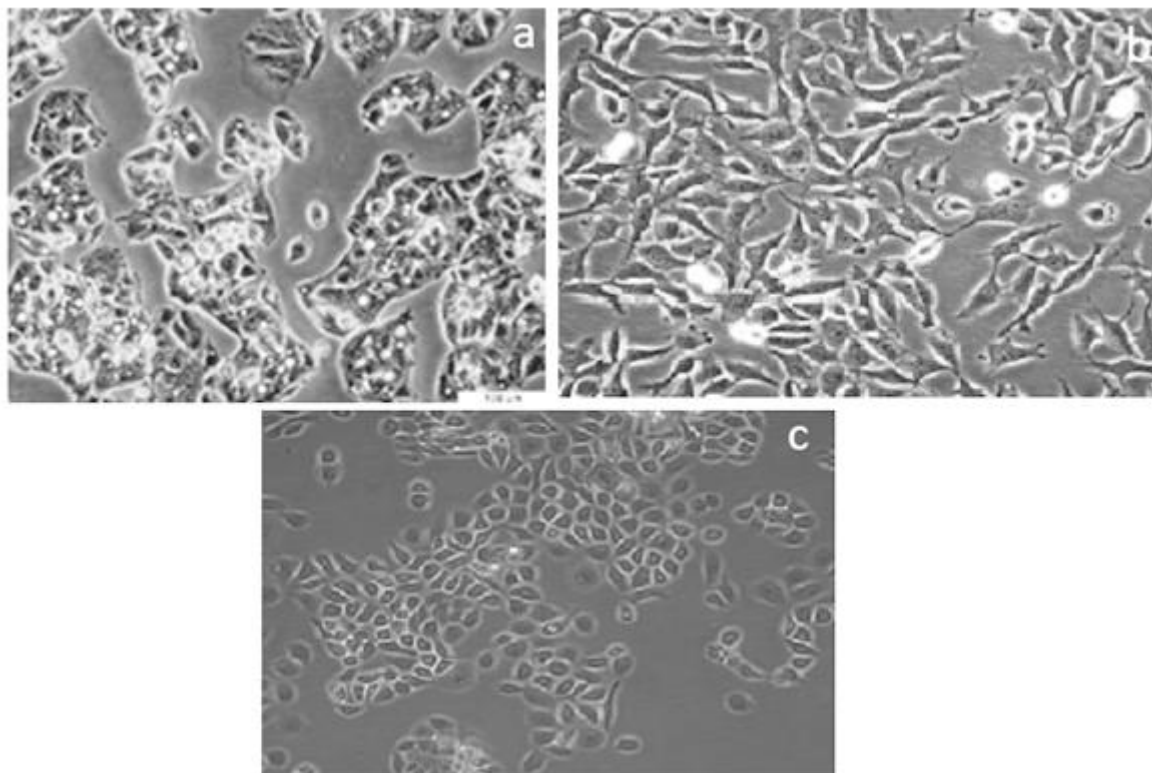
Stanične kulture uspostavljaju se od stanica koje su uklonjene iz tkiva (ljudskog, životinjskog ili biljnog) i potom se uzgajaju u kontroliranim uvjetima, izvan njihovog prirodnog okruženja. Dok se normalne stanice obično dijele ograničeni broj puta prije nego što izgube sposobnost proliferacije, neke stanične linije postaju besmrtni uslijed procesa transformacije (može se dogoditi spontano ili biti kemijski ili virusno inducirana). Kada konačna stanična linija prođe transformaciju i stekne sposobnost neograničene diobe, postaje kontinuirana stanična linija (Thermo Fisher Scientific, 2022). Stanične linije su pogodni modeli za proučavanja fizioloških i biokemijskih procesa, a također se koriste za utvrđivanje učinaka nepoznatih kemijskih spojeva s potencijalno toksičnim djelovanjem. U staničnim kulturama uzgajaju se različiti tipovi stanica kao što su tumorske stanice, stanice srčanog i koštanog tkiva, fibroblasti i mnoge druge. One imaju sposobnost rasta i umnožavanja sve dok su im osigurani optimalni uvjeti i hrana (Ban i Osmak, 1996; Verhoeckx i sur., 2015). Uvjeti uzgoja stanica uvelike variraju, ali se njihova umjetna okolina uvijek sastoji od odgovarajućeg hranjivog medija koji sadrži esencijalne hranjive tvari (aminokiseline, ugljikohidrate, vitamine, minerale), čimbenike rasta, hormone, plinove (O₂, CO₂), te regulirano fizikalno-kemijsko okruženje (pH, osmotski tlak, temperatura) (Thermo Fisher Scientific, 2022).

HepG2 stanična linija tumorska je stanična linija koja je izolirana iz tkiva jetre petnaestogodišnjeg mladića koji je bolovao od hepatocelularnog karcinoma. Ove stanice ključne su u provođenju *in vitro* testova zbog dobre metaboličke aktivnosti i zbog dobre morfološke i funkcionalne diferencijacije (ECACC, 2017). HepG2 je prva humana tumorska stanična linija jetre koja je zamijenila „zlatni standard“, tj. model humanih hepatocita za ispitivanja metabolizma ksenobiotika i citotoksičnosti tvari (Gerets i sur., 2012). Također, u primjeni je kao prvi korak u istraživanju agenasa koji imaju potencijalno protutumorsko djelovanje (Mersch-Sundermann i sur., 2004; Batra i Sharma, 2013).

1321N1 stanična linija je tumorska stanična linija ljudskog astrocitoma izvedena iz stanične linije 1181N1 koja je pak izvedena iz U-118MG linije izolirane iz humanog zloćudnog tumora glioma. Tijekom rasta u kulturi te stanice stvaraju tipičnu neuronsku morfologiju, tj. međusobno se povezuju kako se gustoća stanica povećava. Ova stanična linija izražava površinske receptore koji služe za regulaciju stanične migracije zbog čega se u kombinacijama s linijama izvedenim iz glioma koriste u istraživanjima neuroloških bolesti, učinaka neurotrofnih čimbenika, transmembranskog transporta, prijenosa lijekova i degenerativnih bolesti, kao što je Alzheimerova bolest (ECACC, 1980).

HaCaT stanična je linija dugovječna, netumorogena, spontano besmrtna linija ljudskih keratinocita koji se mogu diferencirati u uvjetima *in vitro* (Colombo, 2017). Za razliku od izvornih stanica ljudske kože, zahvalnije su pri istraživanju jer ne zahtijevaju dodatni hranidbeni sloj ili faktore rasta prilikom uzgoja, ima duži životni vijek u kulturi i manje mijenja svojstva prilikom diferencijacije zbog čega je pogodna za istraživanja jer omogućuje standardizaciju *in vitro* eksperimenata. Koristi se u istraživanjima imunoloških i upalnih odgovora na određene agense zbog svojstva stanica kože da se kontinuirano obnavljaju i upravljaju dinamičkim odnosima između tijela i okoline čime aktivno sudjeluju u obrani domaćina (Colombo, 2017).

Morfološke značajke staničnih linija HepG2, 1321N1 i HaCaT promatranih pod svjetlosnim mikroskopom prikazane su na slici 3.



Slika 3. Mikroskopska fotografija HepG2 stanične kulture (ECACC, 2017) (a), 1321N1 stanične linije (ECACC, 1980) (b), te HaCaT stanične linije (CLS, 2022) (c)

2.10. TESTOVI TOKSIČNOSTI NA STANIČNOJ RAZINI

Testovi toksičnosti provode se zbog potrebe za određivanjem preživljena stanica i citotoksičnih učinaka nakon izloženosti stanica različitim agensima. Preživljenje stanica određuje broj živih stanica u određenoj populaciji, a mjerenje količine proliferirajućih stanica koristi se kao vitalni pokazatelj za preživljavanje ili smrt stanice kao odgovor na neke lijekove ili kemijske agense. Suprotan od pojma preživljenja je pojam citotoksičnost koji opisuje broj mrtvih stanica u određenoj populaciji (Adan i sur., 2016). Postoje različite klasifikacije testova citotoksičnosti i preživljenja stanica koji su razvrstani prema vrstama mjerenja krajnjih točaka. To su: testovi isključenja boje poput tripanskog modrila (engl. *Trypan blue*), eozina, Kongo crvenila (engl. *Congo red*), eritrozina B; kolorimetrijske metode poput MTT, MTS, XTT, WST-1, WST-8, LDH, SRB, NRU i bojenje stanica bojom kristal-ljubičasto; fluorometrijske metode kao što su alamar modro i CFDA-AM; te luminometrijske metode koje su ATP test i test preživljenja u realnom vremenu (Aslanturk, 2018).

2.10.1. MTS TEST

MTS test omogućuje brzu procjenu preživljenja stanica izloženih testiranim spojevima. MTS [3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol] ili Owenov reagens žute je boje koja se pod djelovanjem staničnih enzima reducira u obojani formazanski produkt koji je smeđe-ljubičaste boje i topljiv je u hranjivom mediju. Proces je potaknut ili redukcijom ili oksidacijom NADPH i/ili NADH dehidrogenazama u metabolički aktivnim stanicama i prijenosom elektrona uz pomoć reagensa za prijenos elektrona kao što je fenazin metosulfat (engl. *phenazine methosulfate*, PMS). Porast koncentracije formazanskog produkta, koji je proporcionalan broju metabolički aktivnih stanica, prati se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 490 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (Wang i sur., 2010; Kamiloglu i sur., 2020; Jurič i sur., 2021).

2.11. TESTOVI ZA PROCJENU ŠTETNIH UČINAKA KEMIJSKIH SPOJEVA NA RAZINI DNA

2.11.1. KOMET-TEST

Komet-test ili mikroelektroforeza pojedinačnih stanica u gelu agaroze (engl. *comet assay/single cell gel electrophoresis*) molekularno-biološka je metoda koja omogućuje otkrivanje primarnih oštećenja molekule DNA nastalih pod utjecajem različitih ksenobiotika. Metoda je dobila naziv po izgledu obrasca oštećene DNA koji obojen specifičnim bojama i promatran pod fluorescencijskim mikroskopom ima izgled nebeskog tijela „kometa“ (Azqueta i Collins, 2013; Liao i sur., 2009; Olive i Banáth, 2006; Collins, 2004; Tice i sur., 2000; Singh i sur., 1988). Od kasnih 1980-ih

godina kada je otkrivena pa sve do danas, ta je metoda našla široku primjenu u različitim područjima biologije, toksikologije i biomonitoringa populacija. Glavne prednosti komet-testa su mogućnost procjene oštećenja DNA na razini pojedinačne stanice, čime se osigurava visoka statistička značajnost pri obradi podataka. Za analizu je dovoljna vrlo mala količina uzorka, ima visoku osjetljivost za otkrivanje oštećenja u molekuli DNA te se u ovoj metodi može koristiti bilo koja vrsta eukariotskih stanica u uvjetima *in vitro* i *in vivo* (Kumaravel i sur., 2009). Stalnim usavršavanjem i kombiniranjem s drugim srodnim metodama, osjetljivost komet-testa dodatno se proširuje, kao i područja njegove primjene. Time sve više raste i značaj ove metode u regulatornoj toksikologiji (Azqueta i sur., 2011). Za izradu preparata potrebne su vrlo male količine stanica koje moraju imati jezgru. To znači da se za analizu mogu primjerice koristiti uzorci krvi, suspenzije stanica, stanične kulture ili uzorci različitih tkiva koji se prethodno mehanički ili enzimski obrade zbog oslobađanja pojedinačnih stanica. Metoda se zasniva na uklapanju pojedinačnih stanica u mikrogel agaroze. Nakon polimerizacije agaroze, koja se nanosi na brušena predmetna stakalca, stanice ostaju „zarobljene“ u toj podlozi. Tako pripremljeni mikrogelovi obrade se otopinom za lizu koja sadrži visoke koncentracije etilendiamintetraoctene kiselina (EDTA) i deterdženata (Triton X-100 i natrijevlauril sulfat). Tijekom postupka lize razara se citoplazma i membranske strukture stanice i ispiru se iz gela. U prisutnosti visokih koncentracija NaCl-a uklanjaju se histoni iz DNA te naposljetku ukupna jezgrina DNA ostaje fiksirana na mjestu gdje je bila uklopljena cjelovita stanica (Azqueta i sur., 2011; Azqueta i Collins, 2013). U sljedećem koraku, mikrogelovi se obrađuju puferom za denaturaciju. Standardna inačica komet-testa, koja je se najviše primjenjuje, uključuje denaturaciju DNA alkalnim puferom čija je pH vrijednost veća od 13. Budući da je molekula DNA vrlo osjetljiva na djelovanje lužina, nakon obrade puferom za denaturaciju, narušavaju se viši stupnjevi njene strukturne organizacije jer negativno nabijeni ioni OH⁻ uklanjaju vodikove ione iz parova baza u molekuli DNA, dovodeći do razdvajanja lanaca (Collins, 2004). Sljedeći korak uključuje izlaganje denaturirane DNA djelovanju električnog polja u procesu elektroforeze koja se provodi u istome puferu kao i denaturacija. Premda je negativno nabijena molekula, glavina jezgrine DNA zbog velike molekularne mase tijekom elektroforeze ne može putovati kroz pore mikrogela agaroze. Međutim, ukoliko je u molekuli DNA bilo prisutno neko oštećenje, na takvim će se mjestima nakon denaturacije osloboditi relaksirane petlje DNA različite veličine koje su povučene pod utjecajem električnog polja i mogu putovati porama gela prema anodi (Azqueta i Collins, 2013). Obrazac njihova putovanja mikrogelom može se prikazati nakon bojenja specifičnim fluorescencijskim bojama koje se vežu na molekulu DNA. Za to se najčešće se koristi etidijev bromid (Rojas i sur., 1999; Liao i sur., 2009) koji nakon pobuđivanja ultraljubičastim svjetlom emitira narančasto-crveno obojenje. To se može otkriti promatranjem

pod fluorescencijskim mikroskopom. Pomoću komet-testa mogu se utvrditi razlike u razinama oštećenja DNA u pojedinačnim stanicama jer su veličina i izgled kometa uvjetovani brojem i dužinom oslobođenih petlja koje su tijekom elektroforeze izvučene iz glavne jezgrine DNA i otputovale na određenu udaljenost od nje. Njihov je broj izravno ovisan o broju lomova u molekuli DNA, što znači da su lomovi i relaksirane petlje u DNA i postotak DNA u repu kometa proporcionalne veličine (Collins i sur., 1997; Azqueta i Collins, 2013). Mjerenje kometa može se provoditi pomoću računalnih programa za analizu slike ili ručnim svrstavanjem kometa prema izgledu u nekoliko kategorija oštećenja (Kumaravel i sur., 2009). Pri mjerenju pomoću računalnog programa, preparat se promatra pod epifluorescencijskim mikroskopom koji je preko kamere visoke rezolucije povezan s računalom. Klikom miša na izabrani komet program istovremeno mjeri niz parametara od kojih je najvažniji postotak DNA (%DNA) u repu, tj. intenzitet repa (Møller i sur., 2020). On označava postotak DNA koja je migrirala u rep kometa, a izražava se u odnosu na ukupnu količinu DNA u kometu. Taj parametar najpouzdaniji je i u najboljoj korelaciji sa stupnjem oštećenja DNA, a posebno s količinom nastalih lomova. Sljedeći po važnosti je parametar dužine repa kometa koji se odnosi na najveću udaljenost na koju su tijekom elektroforeze otputovale izvučene petlje DNA. Mjeri se od sredine glave kometa ili od ruba glave i izražava u mikrometrima (Kumaravel i sur., 2009). Izmjereni podaci u računalu se automatski pohranjuju u obliku tablica u programu Microsoft Excel, te se na njima primjenom odgovarajućih programa provode daljnje matematičke i statističke obrade. Mnogi istraživački laboratoriji nemaju materijalnih sredstava za nabavu računalne mjerne opreme pa preparate analiziraju ručno. Pritom se pojedinačni kometi, koji fluoresciraju u vidnom polju mikroskopa, razvrstavaju u jednu od 5 klasa: od 0 (bez repa) do 4 (gotovo čitava DNA prisutna je u repu). Ta metoda sporija je od računalnog mjerenja, ali je jednostavna i daje pouzdane rezultate (Collins, 2004). Osnovna izvedba komet-testa zasniva se na primjeni alkalne denaturacije, a omogućuje specifično otkrivanje jednolančanih lomova i mjesta osjetljivih na lužine. To su dijelovi molekule DNA s kojih su uslijed oštećenja otpale purinske ili pirimidinske baze. Omogućuje se praćenje popravka stanične DNA i otkrivanje stanica u apoptozu i nekrozi. Također moguće je i otkrivanje dvolančanih lomova (Fairbairn i sur., 1995; Collins i sur., 1997; Rojas i sur., 1999; Olive, 1999). Različite modifikacije alkalne tehnike omogućuju otkrivanje križnog povezivanja između DNA, odnosno DNA i proteina (Tice i sur., 2000; Collins, 2004). Primarna oštećenja izmjerena primjenom komet-testa nastaju izravnim utjecajem genotoksičnog agensa ili su posljedica nepotpunog popravka DNA isijecanjem baza. Međutim, visokoj razini primarnih oštećenja DNA značajno doprinosi i oksidacijski stres prouzročen u stanici djelovanjem reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) koje nastaju i spontano ili pod utjecajem genotoksičnih agensa (Collins, 2009).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. CILJEVI

Na temelju dostupne literature i podataka o poznatim farmakološkim proizvodima koji sadrže CBD ekstrahiran pomoću etanola, prvi je cilj optimizirati ekstrakciju u laboratorijskim i pogonskim uvjetima te predložiti pokusni model za testiranje biokompatibilnosti ispitivanog DES-a i procijeniti biološke učinke DES-a na tri stanične linije u uvjetima *in vitro* (HepG2, 1321N1 i HaCaT). Ove stanične linije odabrane su zbog svojih bitnih svojstava. To su: (a) metabolizam u stanicama jetre koji može pojačati štetne učinke testiranih uzoraka; (b) CBD i njemu srodni spojevi specifično se vežu na receptore živčanih stanica; (c) raste proizvodnja različitih kozmetičkih pripravaka s CBD-om koji se nanose na kožu. Primjenom MTS testa nakon izlaganja DES-u tijekom 24 h procijenit će se preživljenje staničnih linija. Razine primarnih oštećenja DNA u stanicama HepG2, 1321N1 i HaCaT koje će biti tijekom 24 h izložene utjecaju ispitivane otopine DES-a procijenit će se primjenom komet-testa u alkalnim uvjetima.

Primjenom istih testova za utvrđivanje preživljenja stanica i procjenu razina primarnih oštećenja DNA nakon izlaganja ekstraktu tijekom 24 h, procijenit će se biološki učinci ekstrakta CBD-a u ispitivanom DES-u na stanične linije HepG2, 1321N1 i HaCaT.

Nakon provedbe navedenih analiza očekuje se dobivanje novih saznanja o učinkovitosti i mogućnostima primjene DES-a u postupcima ekstrakcije CBD-a iz biljnog materijala i različitih otpadnih materijala iz proizvodnje i prerade industrijske konoplje. Budući da je DES korišten u ovim pokusima do sada potpuno neistražen i ne postoje podaci o njegovim mogućim biološkim učincima u uvjetima *in vitro*, očekuje se dobivanje korisnih preliminarnih podataka pomoću kojih će se moći planirati buduća istraživanja bioloških učinaka na drugim staničnim modelima i općenito na drugim pokusnim modelima. Nadalje, rezultati o biokompatibilnosti ekstrakta CBD-a u DES-u mogli bi povećati postojeća znanja o biološkim učincima CBD-a, ali i dobiti praktičnu primjenu za daljnji razvoj otapala sličnih ispitivanom DES-u i njihovu primjenjivost u izradi farmakoloških pripravaka s CBD-om.

3.2. HIPOTEZE

Na osnovi do sada poznatih podataka o uspješnosti ekstrakcije kanabidiola (CBD) iz biljnog materijala i različitih otpadnih materijala iz proizvodnje i prerade industrijske konoplje; prednostima i nedostacima tradicionalnih otapala koja se primjenjuju u postupcima ekstrakcije; saznanjima o hidrofobnim DES-ovima koji su predmet ispitivanja i primjenjivani u ovom radu, postavljaju se **Hipoteze (H1, H2, H3)**:

H1: ova vrste pripreme otopine DES-a pokazat će visoku učinkovitost pri ekstrakciji CBD-a iz otpadnog materijala nastalog preradom industrijske konoplje i osigurati dobre prinose ovog spoja u odnosu na ekstrakte napravljene ekstrakcijom etanolom.

Referirajući se na činjenice da otapala korištena za ekstrakciju bioaktivnih spojeva mogu uzrokovati neželjene biološke učinke, čime se umanjuje iskoristivost i povoljna bioaktivnost dobivenih ekstrakata u proizvodnji različitih farmakološki aktivnih pripravaka i uzevši u obzir da je ispitivani DES kombinacija dviju sastavnica za koje u primjeni nisu dokazana štetni učinci, postavlja se hipoteza 2:

H2: pripremljena otopina DES-a pokazat će visoku biokompatibilnost sa staničnim linijama u uvjetima *in vitro*.

Pozivajući se na literaturne podatke, koji upućuju na niz blagotvornih učinaka CBD-a do sada opisanih na različitim razinama, počevši od staničnih linija, tkiva i organa do razine organizma laboratorijskih životinja i čovjeka, postavlja se hipoteza 3:

H3: ekstrakt CBD-a u ispitivanom DES-u pokazat će visoku biokompatibilnost sa staničnim linijama u uvjetima *in vitro*.

3.3. MATERIJALI

Uzorak

Za izradu ovog rada korišteno je osušeno i prethodno dekarboksilirano lišće industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*)

3.4. KEMIKALIJE

Priprema DES-a i ekstrakcija CBD

- etanol (96 %), Kemika (Hrvatska)
- DES 1
- DES 2
- destilirana voda

MTS test

- gotovi reagensi za MTS test (CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, G3580-82) ili CellTiter 96[®] AQueous MTS Reagent Powder (Promega, G1112) i PMS (Phenazine methosulfat (Sigma-Aldrich., SAD)
- fetalni goveđi serum, (Gibco Life Technologies, SAD)
- otopina neesencijalnih aminokiselina (engl. *Non-essential Amino Acid Solution*), Sigma-Aldrich (SAD)
- Tripsin-EDTA, Sigma-Aldrich (SAD)
- otopina antibiotika (penicilin i streptomycin), Sigma-Aldrich (SAD) minimalni esencijalni medij (MEM), Sigma-Aldrich (SAD)
- Dulbeccov minimalni esencijalni medij (DMEM), Sigma-Aldrich (SAD)
- staurosporin, Sigma-Aldrich (SAD)

Komet-test

- natrijev klorid (NaCl), Kemika (Hrvatska)
- natrijev hidroksid (NaOH), Kemika (Hrvatska)
- dimetil-sulfoksid (DMSO), Kemika (Hrvatska)
- vodikov peroksid (H₂O₂), Kemika (Hrvatska)
- 6,7 mM fosfatni pufer (PO₄) (engl. *Phosphate Buffered Saline*, PBS). Lonza (Švicarska) fetalni goveđi serum (engl. *Fetal Bovine Serum*), Gibco (SAD)
- otopina neesencijalnih aminokiselina (engl. *Non-essential Amino Acid Solution*), Sigma-Aldrich (SAD)
- otopina EDTA-tripsina (0,02 % EDTA; 0,25 % tripsin), Gibco (SAD)
- otopina antibiotika (penicilin i streptomycin), Sigma-Aldrich (SAD)
- minimalni esencijalni medij (MEM), Sigma-Aldrich (SAD)
- Dulbeccov minimalni esencijalni medij (DMEM), Sigma-Aldrich (SAD)
- agaroz normalnog tališta (engl. *Normal Melting Point*, NMP), Sigma-Aldrich (SAD)
- dinatrij-etilendiamintetraoctena kiselina (Na₂EDTA), Sigma-Aldrich (SAD)
- trisaminometane (tris-HCl), Sigma-Aldrich (SAD)
- Na-laurilsarkozinat, Sigma-Aldrich (SAD)
- triton X-100, Sigma-Aldrich (SAD)
- etidijev bromid, Sigma-Aldrich (SAD)

Aparatura i pribor

Dekarboksilacija uzorka konoplje

- laboratorijski sušionik (INKO, Hrvatska)
- plitka limena posuda
- tehnička vaga (WLC 2/A2/C/2), RADWAG (Poljska)
- aluminijska folija
- staklena čaša (500 mL)

Priprema DES-a za mehaničku ekstrakciju

- tehnička vaga WLC 2/A2/C/2, RADWAG, Poljska)
- Erlenmayerova tikvica (100 mL)
- tresilica s termoregulatorom (Thermo Mixer C, Eppendorf[®], Njemačka)
- metalna žlica

Ekstrakcija CBD-a DES-om i ekstrakcija etanolom za kontrolnu skupinu

- analitička vaga (Analytical plus, Ohaus, SAD)
- boca štrcaljka
- epruvete (50 mL)
- metalna žlica
- stakleno laboratorijsko posuđe: boca za odsisavanje (500 mL), laboratorijska čaša (600 mL), menzura (500 mL), stakleni štapić, tikvica s okruglim dnom (500 mL)
- tehnička vaga WLC 2/A2/C/2, RADWAG Poljska)
- centrifuga ROTINA 380, Hettich) (Njemačka)
- tresilica s termoregulacijom Thermo Mixer C, Eppendorf[®], Njemačka)
- mikrofilteri, Eppendorf[®], Njemačka)
- plastične šprice (2 mL), Eppendorf[®] (Njemačka)

Analiza HPLC-om

- analitička vaga, (Analytical plus, Ohaus, SAD)
- HPLC posude za uzorke s čepovima (engl. *vials*)
- kapaljka
- laboratorijska čaša
- odmjerna tikvica (10 mL)

- špatula
- tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti 1260 Infinity (Agilent Technologies, SAD)
- kolona HPLC, 1260 Infinity (Agilent Technologies, SAD)

Spektrofotometrija

- kivete (1 mL), Eppendorf[®], Njemačka)
- spektrofotometar UV-1600PC, (VWR SAD)
- mikropipete, Eppendorf[®] (Njemačka)
- staklene epruvete i stalak za epruvete
- staklena čaša (50 mL)

MTS test

- čitač mikrotitarskih pločica Infinite M200PRO Tecan Austrija GmbH (Austrija)
- laboratorijska vaga, Sartorius (Njemačka)
- laminar za sterilni rad sa staničnim kulturama LFVP 12 (Iskra PIO, Slovenija)
- bočice za uzgoj staničnih kultura - Tissue culture flask 25 cm² Eppendorf[®] (Njemačka)
- termostat za stanične kulture HeraCell Vios 250i, Thermo Scientific (SAD)
- sterilne jednokratne, pojedinačno pakirane plastične pipete (10 mL), Eppendorf[®] (Njemačka)
- mikrotitarske pločice s 96 jažica, Thermo Fisher Scientific (SAD)

Analiza metodom komet-testa

- laboratorijska vaga, Sartorius (Njemačka)
- termostat za stanične kulture HeraCell Vios 250i, Thermo Scientific (SAD)
- mikroskop za stanične kulture Primo Veert, Zeiss (Njemačka)
- laminar za sterilni rad sa staničnim kulturama LFVP 12, Iskra PIO (Slovenija)
- laboratorijska centrifuga Rotofix 32, Hettich (Njemačka)
- vodena kupelj, INKOLAB (Hrvatska)
- kadica za horizontalnu elektroforezu, SCIE-PLAS (Velika Britanija)
- izvor struje/napona (*power supply*) za elektroforezu Power Pac HC TM, BIO-RAD (SAD)
- epifluorescencijski mikroskop Olympus BX51, Olympus (Japan)
- računalni program za analizu slike Comet Assay IV[™] software, Instem-Perceptive Instruments Ltd. (Velika Britanija)

- brušena mikroskopska stakla, Surgipath, Leica (SAD)
- sterilne jednokratne, pojedinačno pakirane plastične pipete (10 mL), Eppendorf[®] (Njemačka) bočice za uzgoj staničnih kultura - Tissue culture flask 25 cm² Eppendorf[®] (Njemačka)

3.5. METODE

3.5.1. DEKARBOKSILACIJA UZORKA KONOPLJE

Proces dekarboksilacije je proveden prema radu Moreno i sur. (2020) gdje se prvo u čašu na tehničkoj vagi odvagalo 50 g uzorka osušenog lišća industrijske konoplje. Nakon toga odvagano lišće konoplje prebačeno je u limenu posudu, ravnomjerno raspoređeno po dnu te prekriveno aluminijskom folijom. Uzorak je prebačen u laboratorijski sušionik na 120 °C u trajanju od 30 minuta. Poslije toga, posuda s uzorkom izvađena je iz sušionika te ohlađena do sobne temperature.

3.5.2. PRIPREMA DES-A ZA MEHANIČKU EKSTRAKCIJU

DES za ekstrakciju bio je pripremljen tako da se u Erlenmayerovu tikvicu na tehničkoj vagi odvaži kruta sastavnica DES 1 i tekuća sastavnica DES 2 u masenom omjeru 1:3. Nakon toga je tikvica stavljena u tresilicu na 50 °C, 20 minuta.

3.5.3. PRELIMINARNA EKSTRAKCIJA S DES-OM I KONTROLNA EKSTRAKCIJA S ETANOLOM

Uzorci za ekstrakciju CBD-a u otopini DES-a pripremljeni su tako da su u 3 epruvete dodani uzorak konoplje i DES u omjerima 1:5, 1:10 i 1:15. U četvrtu epruvetu dodani su etanol i uzorak konoplje u omjeru 1:7,5 (kontrolna otopina). Provedena je ekstrakcija na tresilici pri 130 okretaja/min 20 minuta na 25 °C (tablica 1). Nakon toga je provedena filtracija uporabom 0,45 µm-filtera. Nakon svake ekstrakcije epruvete su stavljene u centrifugu da bi se bolje razdvojio talog i olakšala filtracija. Centrifugiranje je trajalo 10 minuta pri 5000 rpm. Uzorci su analizirani na uporabom tekućinske kromatografije (HPLC/DAD). Omjer 1:5 dao je najveću iskoristivost, no bilo je previše teško odvojiti ekstrakt od krutog taloga u laboratorijskim uvjetima i zato je za daljnje preliminarno testiranje bio odabran drugi uzorak omjera 1:10. Nadalje u 6 epruveta dodani su uzorak konoplje i DES u omjeru 1:10 i u dvije dodatne epruvete dodani su etanol i uzorak konoplje u omjeru 1:7,5 (kontrolne otopine). Provedene su ekstrakcije uzoraka na temperaturama i vremenima što je prikazano u tablici 2 na tresilici pri 130 okretaja/min. Nakon toga je provedena filtracija uporabom 0,45 µm-filtera. Uzorci su

analizirani na uporabom tekućinske kromatografije (HPLC/DAD). Nakon svake ekstrakcije epruvete su stavljene u centrifugu da bi se bolje razdvojio talog i olakšala filtracija. Centrifugiranje je trajalo 10 minuta pri 5000 *rpm*. Zbog potencijala za industrijsku proizvodnju, provedena je treća preliminarna ekstrakcija. Uzorci za ekstrakciju bili su pripremljeni tako da je u 13 epruveta dodano 2 g prethodno dekarboksilirane konoplje. U jednu je dodano 15 mL etanola kao otapala (kontrolna otopina), a u ostale je dodan DES u omjerima od 1:4 do 1:8, tj. volumeni DES-a na 2 g konoplje kako je prikazano u tablici 3. Ekstrakcija je provedeno pomoću tresilice pri 130 okretaja/min. u vremenskim periodima prikazanim u tablici 3 pri 25 °C. Nakon svake ekstrakcije epruvete su stavljene u centrifugu da bi se bolje razdvojio talog i olakšala filtracija. Centrifugiranje je trajalo 10 minuta pri 5000 *rpm*. Nakon toga je provedena filtracija uporabom 0,45 µm-filtera. Uzorci su analizirani na uporabom tekućinske kromatografije (HPLC/DAD).

Tablica 1. Prelimnarna ekstrakcija za određivanje optimalnog omjera konoplje i DES-a

Uzorak	Omjer konoplje i DES-a	Vrijeme ekstrakcije (min)	Temperatura (°C)
1	1:5	20	25
2	1:10	20	25
3	1:15	20	25
K	1:7,5	20	25

Tablica 2. Prelimnarna ekstrakcija za određivanje optimalnog vremena i temperature provođenja ekstrakcije

Uzorak	Omjer Konoplje i DES-a	Vrijeme ekstrakcije (min)	Temperatura (°C)
1	1:10	20	25
2	1:10	40	25
3	1:10	60	25
4	1:10	20	50
5	1:10	40	50
6	1:10	60	50
K	1:7,5	60	25
K	1:7,5	60	50

Tablica 3. Podaci za omjere DES-a i ekstrakta te kontrolni uzorak (central composite design)

Uzorak	Masa konoplje (g)	Volumen DES-a (mL)	Vrijeme ekstrakcije (min)	Temperatura ekstrakcije (°C)
1	2,04	12	0,86	25
2	2,01	8	25	25
3	2,07	17,66	15	25
4	2,01	16	5	25
5	2,03	12	15	25
6	2,04	6,35	15	25
7	2,05	8	5	25
8	2,06	12	15	25
9	2,07	12	15	25
10	2,03	16	25	25
11	2,04	12	15	25
12	2,07	12	15	25
13	2,06	12	29,13	25
K	2,08	15	15	25

3.5.4.SPEKTROFOTOMETRIJA

Nakon centrifugiranja uzorci su razrijeđeni deset puta. Kao slijepa proba koristio se etanol i DES, a apsorbancije slijepa probe oduzete su od apsorbancije uzorak. Mjerene su aposrbancije pri valnim duljinama od 470 nm, 649 nm i 664 nm. Pomoću formule i izmjerenih apsorbancija, u Microsoft Excelu izračunate su koncentracije klorofila a [2], klorofila b [3]i karotenoida [4].

$$C_a (\mu\text{g/mL}) = 13,36 A_{664} - 5,19 A_{649} \quad [2]$$

$$C_b (\mu\text{g/mL}) = 27,43 A_{649} - 8,12 A_{664} \quad [3]$$

$$C (x+c) (\mu\text{g/mL}) = (1000 A_{470} - 2,13 C_a - 97,63 C_b) / 209 \quad [4]$$

A = apsorbancija (mjerena pri valnim duljinama od 470 nm, 649 nm i 664 nm)

C_a = koncentracija klorofila a

C_b = koncentracija klorofila b

C (x+c) = koncentracija karotenoida (ksantofili + karoteni)

3.5.5.ANALIZA HPLC-OM

Nakon centrifugiranja uzorka, ekstrakti su filtrirani uporabom 0,45 µm-filtera te je provedena analiza nanai HPLC/DAD instrumentu. Određen je CBD kao ciljani spoj i CBN koji je proizvod oksidacije THC-a i marker za loše ili dugotrajne uvjete skladištenja (Moreno i sur., 2020). Injektirano je 2,5 µL uzorka te su provedena dva paralelna mjerenja. Analiza je

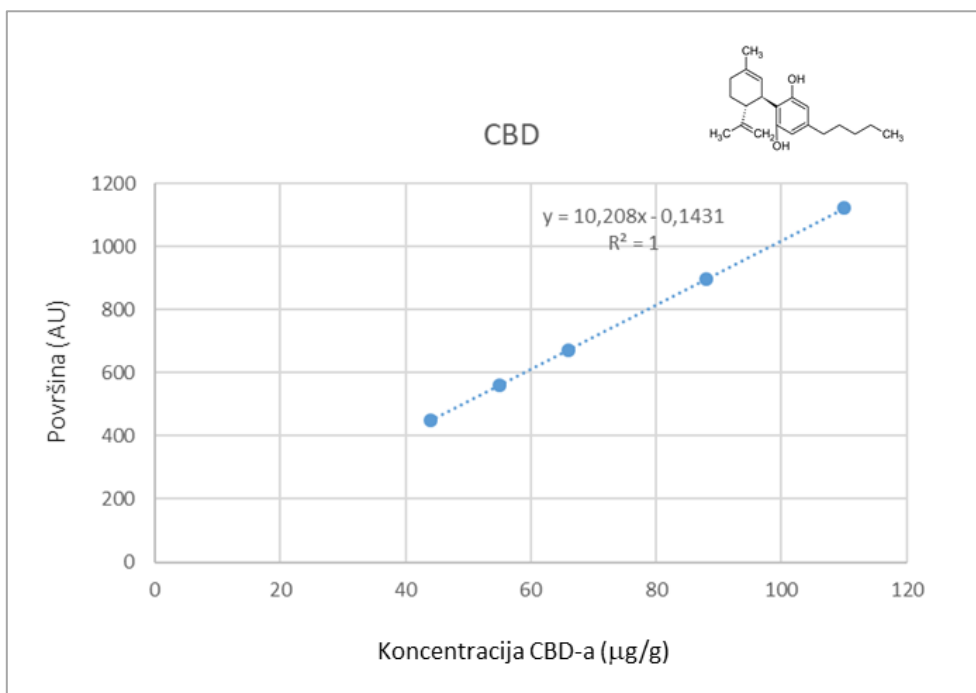
provedena kromatografijom obrnutih faza na C18 koloni (4,6 × 250 mm) termostatoranoj na 40 °C, pri čemu su kao pokretne faze korištene 0,1 %-tna (v/v) otopina mravlje kiseline u vodi (pokretna faza A) i 0,1 %-tna (v/v) otopina mravlje kiseline u acetonitrilu (pokretna faza B) u različitim omjerima. Eluiranje analita provedeno je gradijentno pri protoku od 1 mL/min, tijekom 46 min, a CBD i CBN su detektirani DAD detektorom pri valnoj duljini od 228 nm prema režimu elucije prikazanom u tablici 4.

Tablica 4. Prikaz dinamike gradijentne elucije CBD-a i CBN-a koja se primjenila na tekućinskom kromatografu (HPLC/DAD)

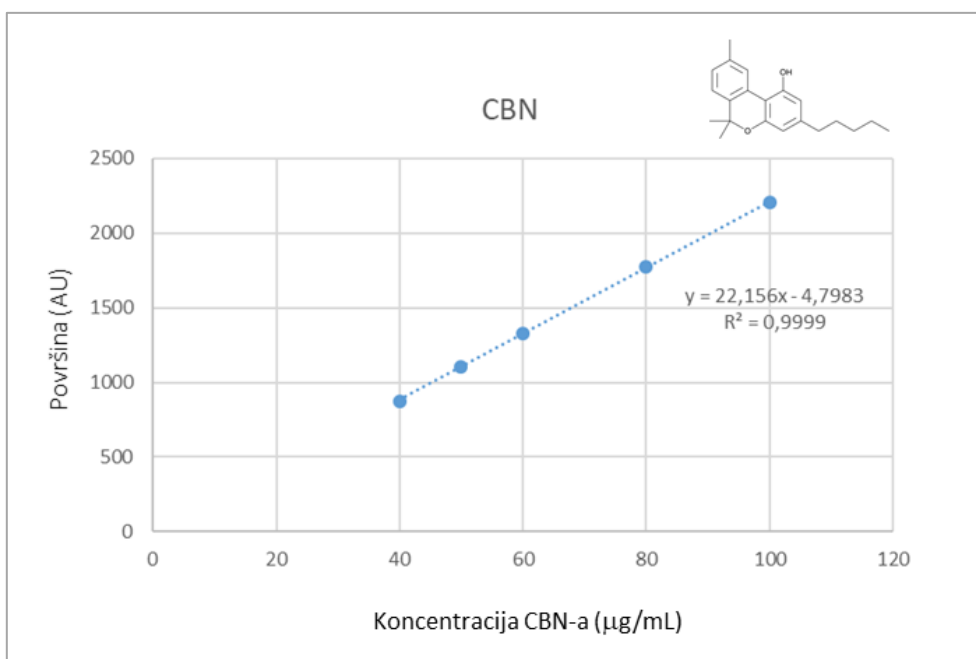
Vrijeme (min)	Volumni udio otapala A (%)	Volumni udio otapala B (%)	Protok (mL/min)
0	70	30	1
1	70	30	1
3	50	50	1
4	50	50	1
45	20	80	1
46	20	80	1

Identifikacija CBD-a i CBN-a provedena je usporedbom vremena zadržavanja i UV spektra pikova u uzorcima s analitičkim standardima CBD-a i CBN-a. Kvantifikacija CBD-a i CBN-a u uzorcima provedena je pomoću baždarnog pravca koji se dobiva propuštanjem poznatih koncentracija CBD-a i CBN-a.

Baždarni dijagrami za određivanje koncentracije CBD-a i CBN-a u uzorcima prikazani su na slikama 4 i 5.



Slika 4. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije CBD-a u uzorcima



Slika 5. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije CBN-a u uzorcima

3.5.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Plan eksperimenta napravljen je pomoću Design Expert 11 (StatEase, Minneapolis, USA, god 2022). Metoda odzivne površine (*engl. response surface methodology*) je primjenjena kako bi se optimirao process ekstrakcije kanabidiola (CBD) i ukupnih kanabinoida uz pomoć DES-a. Izračun optimalne formulacije proveden je metodom poželjnosti prema pet kriterija: maksimalni udio CBD-a i ukupnih kanabinoida te minimalni udio CBN-a, klorofila a i klorofila b. Udjelu CBD-a dat je faktor značajnosti 5 dok je ostalim istraživanim kriterijima dat faktor značajnosti 3.

3.5.7. POSTAVLJANJE EKSPERIMENTALNOG MODELA ZA TESTIRANJE UČINAKA U UVJETIMA *IN VITRO*

Za procjenu učinaka DES-a na staničnim linijama postavljen je eksperimentalni model na osnovu usporedbe s registriranim proizvodom koji sadrži CBD. Izabran je lijek Epidiolex® koji se koristi u liječenju epilepsija. Ovaj lijek primjenjuje se u obliku oralne otopine koja sadrži 100 mg/mL CBD. Jedan mL oralne otopine sadrži: 100 mg CBD i pomoćne tvari: bezvodni etanol (79 mg), rafinirano sezamovo ulje (736 mg), benzilni alkohol (0,0003 mg), sukralozu (E955) i okus jagode (EMA, 2022; JPI, 2022). Prema uputama proizvođača, preporučena početna doza lijeka je 2,5 mg/kg dvaput dnevno (5 mg/kg/dan) tijekom jednog tjedna. Nakon toga dozu lijeka treba povećati na dozu održavanja od 5 mg/kg dvaput dnevno (10 mg/kg/dan). Najviša preporučena doza lijeka je 10 mg/kg dvaput dnevno (20 mg/kg/dan).

Na osnovi tih podataka izračunati su volumeni otapala koji se dnevno unose u organizam pri uzimanju terapijskih doza lijeka (tablica 5). Da bi se odredilo koji se volumeni DES-a moraju testirati, krenulo se od pretpostavke da je isti sastav lijeka, samo je CBD otopljen u DES-u, umjesto u etanolu. To će dati dovoljno prostora za donošenje zaključaka o sigurnosti primjene DES-a pokaže li se da pri testiranim količinama otapala nema značajnih učinaka. .

Najprije su izračunati volumeni otapala koji se unose u organizam primjenom dnevnih doza lijeka u njegove tri ranije navedene doze. Polazišni podaci za izračunavanje bili su: masa odrasle osobe: ~ 70 kg i maseni udio od 100 mg/kg.

Tablica 5. Izračun volumena otapala koji se dnevno unose u organizam pri uzimanju terapijskih doza lijeka.

Podaci	Početna doza	Doza održavanja	Najviša preporučena doza
Pojedinačna doza	2,5 mg/kg/dan	5,0 mg/kg/dan	10,0 mg/kg/dan
Učestalost uzimanja	2× dnevno	2× dnevno	2× dnevno
Dnevna doza	5,0 mg/kg	10,0 mg/kg	20,0 mg/kg
Količina lijeka u pojedinačnoj dozi	175 mg	350 mg	700 mg
Ukupan dnevni unos lijeka	350 mg	700 mg	1400 mg
Volumen otapala u jednoj dozi	1,75 mL	3,50 mL	7,00 mL
Ukupni dnevni volumen otapala	3,50 mL	7,00 mL	14,00 mL

Dobivene ukupne dnevne volumene otapala, uz pretpostavku da je to otapalo DES koji je testiran, ekstrapolira se na sustav za testiranje u uvjetima *in vitro* – kulturu stanica u hranjivom mediju.

U plastičnim bočicama (slika 6) nalazi se odgovarajuća stanična kultura (HepG2, 1321N1 i HaCaT) u ukupnom volumenu od 10 mL hranjivog medija.



Slika 6. Prikaz staničnih kultura uzgajanih u plastičnim bočicama s hranjivim medijem.

Testirani volumeni DES-a te ekstrakta CBD-a u DES-u korišteni u pokusu izračunati su uzevši u obzir težinu odrasle osobe od 70 kg i ukupni volumen stanične kulture od 10 mL, kao što je prikazano u tablici 6.

Tablica 6. Izračun volumena otapala DES-a ili ekstrakta CBD-a u DES-u koji treba dodati u odgovarajući hranjivi medij za staničnu kulturu kako bi se provelo testiranje.

Podaci	Početa doza	Doza održavanja	Najviša preporučena doza
Ukupni dnevni volumen otapala koji se unosi na 70 kg (\cong 70000 mL)	3,50 mL	7,00 mL	14,00 mL
3,5 mL ~ 70000 mL X mL ~ 10 mL (ukupni volumen stanične kulture)	$X = (3,5 \text{ mL} \times 10 \text{ mL}) / 70000 \text{ mL}$	$X = (7 \text{ mL} \times 10 \text{ mL}) / 70000 \text{ mL}$	$X = (14 \text{ mL} \times 10 \text{ mL}) / 70000 \text{ mL}$
Volumen DES-a ili ekstrakta CBD-a u DES-u za testiranje koji treba dodati u odgovarajući hranjivi medij za staničnu kulturu do ukupnog volumena od 10 mL	0,0005 mL = 0,5 μ L	0,001 mL = 1,0 μ L	0,002 mL = 2,0 μ L
Oznaka u pokusu	V1	V2	V3

3.5.7. TESTOVI ZA PROCJENU TOKSIČNIH UČINAKA NA RAZINI STANICA

Uzgoj staničnih kultura

U pokusu su korištene stanične linije HepG2, 1321N1 i HaCaT.

Uzgoj stanične linije HepG2 proveden je u hranjivom mediju MEM - minimalni esencijalni medij obogaćenom s 10 % fetalnog goveđeg seruma, 1 % otopine neesencijalnih aminokiselina i 1 % otopine antibiotika (penicilin i streptomycin).

Uzgoj staničnih linija 1321N i HaCaT proveden je u hranjivom mediju DMEM – Dulbeccov minimalni esencijalni medij obogaćenom s 10 % fetalnog goveđeg seruma i 1 % otopine antibiotika (penicilin i streptomycin).

Sve stanice su korištene za pokus 48 h nakon presađivanja odnosno kad je postignuta subkonfluentna kultura.

MTS test

Postupak MTS testa proveden je u skladu s metodom opisanom u redu Zandona i sur. (2020).

Stanične kulture korištene za MTS test pripremljene su nasađivanjem 100 μ L suspenzije stanica iz matičnih kultura u prozirne mikrotitarske pločice s 96 jažica. Nakon toga pločice se stavljene u inkubator 24 sata pri 37 °C, u vlažnoj atmosferi s 5 % CO₂ da bi se postignula subkonfluentna kultura. Idućeg dana uklonjen je medij sa stanica, a stanice su tretirane

prethodno pripremljenim otopinama DES-a u hranjivom mediju, odnosno ekstrakta CBD-a u DES-u (tablica 4) u trajanju 24 h pri 37 °C, u vlažnoj atmosferi s 5 % CO₂. Kao negativna kontrola, korišten je uzgojni medij. Kao pozitivna kontrola korišten je staurosporin u koncentraciji 3 μmol/L. Nakon završetka inkubiranja, uklonjene su otopine kojima su tretirane stanice te su stanice isprane puferom PBS (100 μL) kako bi se uklonili ostaci testiranih uzoraka. U svaku jažicu je dodano 120 μL MTS+PMS reagensa te su stanice ponovno inkubirane pri 37 °C, u vlažnoj atmosferi s 5 % CO₂ u trajanju 1 – 4 sata, ovisno o brzini razvijanja žuto-ljubičaste boje. Na kraju je izmjerena apsorbancija na 492 nm na mikrotitarskom čitaču pločica te je iz brojčanih podataka određen broj preživjelih stanica. Svi pokusi ponovljeni su najmanje tri puta, a mjerenja su provedena na šest neovisnih replika po uzorku. Rezultati su prikazani kao postotak preživjelih stanica u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.

Komet-test

Tretman stanica

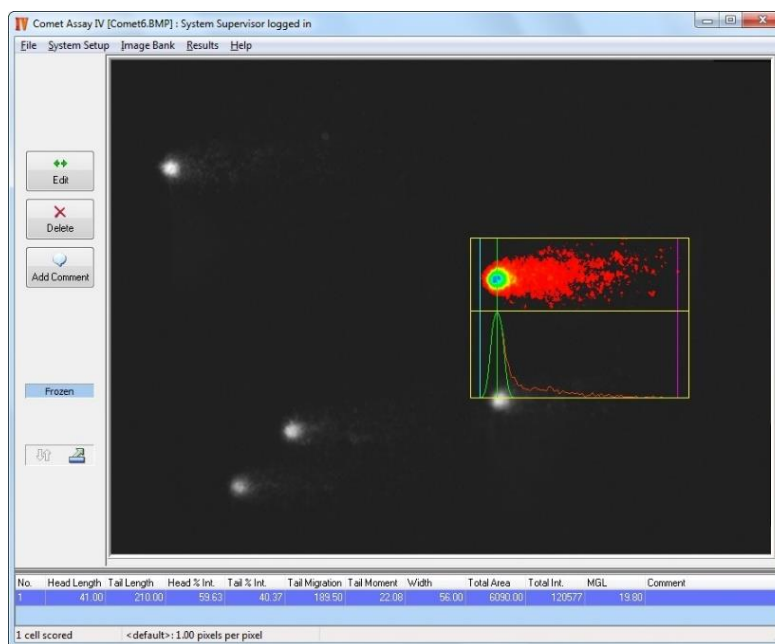
Stanice su najprije izložene testiranom uzorku DES-a te uzorku ekstrakta CBD-a u DES-u na sljedeći način: u vremenskoj točki 0 u prethodno uzgojene stanične kulture HepG2, 1321N1 i HaCaT stanica dodan je odgovarajući hranjivi medij te uzorak DES-a (ili ekstrakta CBD-a u DES-u) u tri različita volumena: 0,5 μL, 1,0 μL i 2,0 μL, pri čemu je ukupni volumen hranjivog medija tijekom testiranja iznosio 10 mL (tablica 4). Tako pripremljene stanične kulture tijekom sljedeća 24 h inkubirane su pri 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5 % CO₂. Po isteku 24 h, iz bočica s kulturama stanica uklonjen je hranjivi medij s testiranim otopinama. Stanice su kratko isprane s po 2 mL svježeg hranjivog medija i na njih je dodana otopina tripsin-EDTA, te su par minuta inkubirane pri 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5 % CO₂. Pod utjecajem tripsina stanice se odljepljuju s podloge i odvajaju. Zatim je u svaku kulturu dodano 1 mL odgovarajućeg svježeg medija i stanice su u sterilnim uvjetima višekратно resuspendirane te su dobivene suspenzije prebačene u epruvete. Neposredno prije uporabe za izradu mikrogelova za komet-test, stanice su oborene centrifugiranjem (3 minute na 800 okr./min) i koncentrirane u 500 μL odgovarajućeg medija. Pokusi su ponovljeni barem tri puta, a sva su mjerenja provedena na šest neovisnih replika.

Postupci u komet-testu

U pokusu je primijenjena inačica komet-testa u alkalnim uvjetima prema protokolu koji su predložili Singh i sur. (1988) uz manje modifikacije, kako slijedi. Za izradu mikrogelova korištena su brušena predmetna stakalca. Mikrogelovi su pripremljeni pomoću dvije vrste agaroze: agaroze normalnog tališta (NMP) i agaroze niskogtališta (LMP). Budući da su obje u praškastom obliku, agaroze su prije uporabe izvagane te resuspendirane u fosfatnom puferu (PBS) i otopljene zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici. Nakon otapanja, 0,5 %-tna LMP-agarozna držana je u vodenoj kupelji na 37 °C, dok je 0,6 %-tna NMP-agarozna odmah korištena za izradu prvog sloja mikrogelova. Postupak je uključivao odmjeravanje 300 µL 0,6 %-tne NMP agaroze i njeno nakapavanje na brušeno predmetno stakalce. Nakon pokrivanja pokrovnim staklom gel je ostavljen na hladnoj podlozi 10-ak minuta radi polimerizacije. Zatim je pokrovno stakalce uklonjeno i na agarozu je stavljen drugi sloj od 100 µL 0,5 %-tne LMP agaroze pomiješane sa tretiranim stanicama (po svakom gelu korišteno je 18 µL stanične suspenzije). Nakon 10-minutne polimerizacije na hladnoj podlozi sloj mikrogela prekriven je sa 100 µL 0,5 %-tne LMP agaroze koja se polimerizirala 10 minuta. Koristeći uzorak netretiranih kontrolnih stanica pripremljeni su preparati za pozitivnu kontrolu. Oni su inkubirani s 50 µL vodene otopine H₂O₂ (30 µmol/L) u trajanju od 10 minuta na ledu (Jurić i sur., 2021), nakon čega su kratko isprani destiliranom vodom. Daljnji postupci za sve mikrogelove bili su isti. Po završetku polimerizacije, pripremljeni preparati su uronjeni u otopinu za lizu. Otopina (pufer) za lizu (pH = 10) pripremljena je neposredno prije upotrebe iz matične otopine za lizu. Ona se priprema unaprijed u većem volumenu i razrjeđuje se prema potrebi. Za pripremu matične otopine potrebno je otopiti 146,6 g NaCl, 37,3 g Na₂EDTA i 1,2 g Tris-HCl u 100 mL vode. Zatim se pomoću 10 M NaOH pH podesi na 10 i u tu se otopinu dodaje 10 g Na-laurilsarkozinata. Ukupni volumen mora biti 890 mL. Matična otopina čuva se u tamnoj boci na sobnoj temperaturi i neposredno prije uporabe se pomiješa s 10 %-tnom otopinom DMSO i deterdžentom Triton X-100, u omjeru 89 mL matične otopine za lizu + 10 mL 10 %-tne otopine DMSO + 1 mL Tritona X-100. Dobivenih 100 mL potrebno je za obradu 10 mikrogelova, a potrebne se količine odrede ovisno o broju preparata. Preparati u puferu za lizu držani 1 h na 4 °C, zaštićeni od svjetla. Nakon lize, preparati su složeni u kadicu za horizontalnu elektroforezu i držani 20 minuta u puferu za denaturaciju (pH > 13). Puferu za denaturaciju pripremljen je neposredno prije uporabe miješanjem destilirane vode (965 mL) s 10 M NaOH (30 mL) i 200 mM Na₂EDTA (5 mL). Elektroforeza je provedena u istom puferu kao i denaturacija, pri jakosti struje od 300 mA i naponu od 25 V, a trajala je 20 minuta. Nakon elektroforeze, preparati su isprani tri puta po 5 minuta u neutralnom puferu (0,4 M Tris-HCl, pH = 7,5). Za pripremu 0,4 M Tris-HCl

48,5 g Tris-a otopljeno je u destiliranoj vodi, te je pH s HCl podešen na 7,5. Neutralizirani preparati su prije bojenja čivani na 4 °C. Za bojenje je korišten etidijev bromid (20 µg/mL). Boja (100 µL) nakapana je na gel te je nakon 10 minuta provedena analiza i mjerenje.

Za mikroskopsku analizu preparata korišten je epifluorescencijski mikroskop koji je preko kamere visoke rezolucije povezan s računalom. Mjerenja su provedena pomoću programa za analizu slike Comet Assay IV™. Primjer mjerenja prikazan je na slici 7.



Slika 7. Primjer mjerenja kometa pomoću računalnog programa za analizu slike Comet Assay IV™. Klikom miša na svaki pojedinačni komet istovremeno je izmjereno više parametara koji upućuju na stupanj oštećenja DNA. Podaci mjerenja pohranjeni su u dokumente programa Microsoft Excel.

Provedeno je šest neovisnih mjerenja nasumičnim izborom po 100 pojedinačnih kometa u svakome uzorku, čime je ukupni broj pregledanih kometa po svakoj pokusnoj skupini iznosio 600. Kao glavni parametar za procjenu oštećenja izabran je postotak DNA u repu kometa (%DNA). Dobiveni podaci mjerenja obrađeni su primjenom deskriptivne statistike, pri čemu je za svaki uzorak izračunata srednja vrijednost, medijan, standardna devijacija i standardna pogreška, te raspon izmjerenih vrijednosti (min.-maks.) za parametar %DNA. Rezultati su prikazani grafički s pomoću histograma ili tzv. *Box-Whisker* grafikona. Daljnja statistička obrada podataka mjerenja provedena je na logaritamski transformiranim podacima (da bi se postigla normalna raspodjela), primjenom testa analize varijance (ANOVA) uz *post-hoc* Tukeyjev test. Statistička značajnost razlika između pokusnih skupina određena je na razini od 5 % ($p < 0,05$). Za statističke obrade

podataka korišten je računalni program Statistica software – Data Science Workbench, version 14.
(License No. 14.0.0.15; TIBCO Software Inc. 2020; Palo Alto, CA, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U svrhu pronalazanja optimalnih parametara za ekstrakciju CBD-a u DES, u ovome su istraživanju provedene preliminarne ekstrakcije (tablica 7 i 8), spektrofotometrijska analiza ekstrakta (tablica 9) i HPLC metoda (tablica 10) na ekstraktima. Nadalje, provode se testovi toksičnosti na ekstraktima iz optimalne ekstrakcije CBD-a u DES. MTS testom određuje se stanično preživljenje kultura stanica u prisutnosti ekstrakta (slika 10). Komet test proveden je da bi se odredila primarna oštećenja na DNA u stanicama s jezgrom u prisutnosti ekstrakta (slika 11, 12, 13, 14, 15 i 16). Na temelju provedenih eksperimenata slijede grafički i tablični prikazi te opisi dobivenih rezultata istraživanja.

4.1. PRELIMINARNE EKSTRAKCIJE

Preliminarnim ekstrakcijama dobivene su koncentracije CBD-a u ekstraktima. Od ispitanih omjera najveću koncentraciju i najveći prinos ima omjer 1:5 u usporedbi s kontrolnim skupinom, no za daljna testiranja je odabran uzorak 1:10 jer je nepraktično i teško bilo odvojiti ekstrakt od krutog taloga u laboratorijskim uvjetima u uzorku 1:5 (tablica 7). Nadalje, dobivene su veće koncentracije CBD-a pri sobnoj temperaturi nego pri povišenoj temperaturi i veće su koncentracije približnih iznosa bile nakon 20 i 40 minuta pri čemu se te vrijednosti bile približne kontrolnoj skupini (tablica 8).

Tablica 7. Rezultati preliminarne ekstrakcije za određivanje optimalnog omjera konoplje i DES-a

Uzorak	Omjer konoplje i DES-a	mg/g uzorka	% uzorka (biljke)
1	1:5	4,27	0,43
2	1:10	2,73	0,27
3	1:15	2,5	0,25
K	1:7,5	3,92	0,39

Tablica 8. Rezultati preliminarne ekstrakcije za određivanje optimalnog vremena i temperature

Uzorak	Omjer Konoplje i DES-a	CBD mg/g uzorka	% CBD uzorka (biljke)
1	1:10	7,01	0,7
2	1:10	8,56	0,86
3	1:10	4,57	0,46
4	1:10	3,24	0,32
5	1:10	3,15	0,32
6	1:10	5,54	0,55
K	1:7,5	9,28	0,93
K	1:7,5	8,85	0,88

4.2. KONCETRACIJA KLOOROFILA A I B I OSTALIH KANABINOIDA

Prema formulama navedenim u poglavlju Materijal i metode te izmjerenim vrijednostima apsorbancija uzoraka ekstrakta CBD-a u DES-u i kontrolnog uzorka ekstrakta CBD-a u etanolu, izračunate su vrijednosti koncentracija klorofila a i b i ostalih karotenoida u uzorcima. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 9, zajedno s vrijednostima apsorbancija. S obzirom da su zbog osjetljivosti spektrofotometra uzorci bili razrijeđeni deset puta, iznosi koncentracija u tablici 9. su prilikom računa pomnoženi s deset, što znači da spomenute vrijednosti predstavljaju koncentracije u početnim uzorcima.

4.3. HPLC ANALIZA

U tablici 10 prikazane su površine pikova dobivene testiranih uzoraka za CBD (vrijeme zadržavanja 31,18 minuta) i CBN (vrijeme zadržavanja 37,60 minuta) . Iz površina pikova o iz baždarnog pravca dobiveni sumaseni udjeli CBD-a i CBN-a u uzorcima industrijske konoplje (tablica 10)

Tablica 9. Koncentracije klorofila a i b te karotenoida izmjerene u uzorcima primjenom spektrofotometrije

GD - granica detekcije

Uzorak	Masa konoplje (g)	Volumen DES-a (mL)	Razrjeđenje Ca (µg/mL)	Razrjeđenje Cb (µg/mL)	Razrjeđenje C(x+c)(µg/mL)
1	2,036	12	< GD	77,869	< GD
2	2,016	8	48,84	16,196	< GD
3	2,07	17,66	7,39	2,789	< GD
4	2,011	16	14,42	1,919	< GD
5	2,028	12	29,99	0,222	5,8654
6	2,036	6,35	67,53	40,522	< GD
7	2,047	8	44,01	11,123	< GD
8	2,059	12	32,611	3,241	< GD
9	2,069	12	27,162	2,669	< GD
10	2,029	16	27,094	< GD	23,5
11	2,039	12	31,861	3,454	< GD
12	2,073	12	31,794	1,31	1,2526
13	2,062	12	27,942	2,923	< GD
K	2,08	15	21,885	3,692	< GD

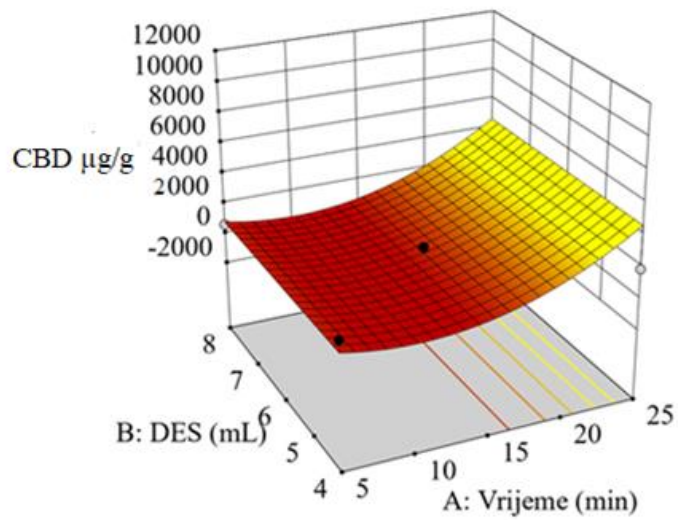
Tablica 10. Maseni udjeli CBD-a i CBN-a u ekstraktima industrijske konoplje

Uzorak	CBD µg/g uzorka	CBD mg/g uzorka	% CBD u uzorku (biljke)	CBN µg/g uzorka	CBN mg/g uzorka	% CBN u uzorku (biljke)
1	655,88	0,66	0,07	62,77	0,06	0,0063
2	7480,26	7,48	0,75	81,01	0,08	0,0081
3	4176,22	4,18	0,42	50,61	0,05	0,0051
4	4889,27	4,89	0,49	58,67	0,06	0,0059
5	6871,25	6,87	0,69	83,28	0,08	0,0083
6	6832,97	6,83	0,68	75,71	0,08	0,0076
7	6166,35	6,16	0,62	75,74	0,08	0,0076
8	6755,58	6,75	0,68	82,26	0,08	0,0082
9	6544,4	6,54	0,65	78,92	0,08	0,0079
10	6510,99	6,51	0,65	78,92	0,08	0,0079
11	6686,35	6,69	0,66	79,03	0,08	0,0079
12	6679,16	6,68	0,66	82,35	0,08	0,0082
13	66465,89	66,47	6,64	11,14	0,01	0,0011
K	5702,77	5,7	0,57	71,57	0,07	0,0072

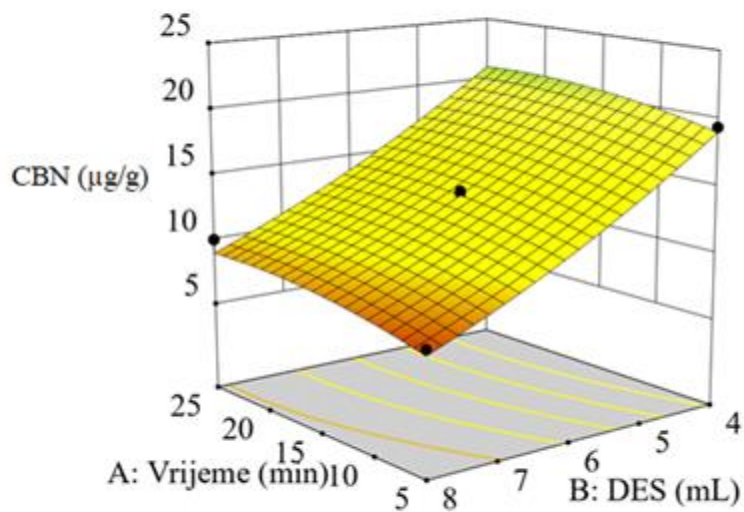
Na osnovi preliminarnih rezultata odlučeno je da će se za procjena učinaka u uvjetima *in vitro* koristiti uzorak CBD-a u DES-u koji ima omjer suhog biljnog uzorka i DES-a 1:8. Odabran je zbog toga što je iz rezultata sprektrofotometrije on imao najbolji omjer i malu količinu prisutnih klorofila i karotenoida ($C_a = 14,42 \mu\text{g/mL}$; $C_b = 1,91 \mu\text{g/mL}$; $C_{(x+c)} < \text{GD}$ zanemarivo mala), te iz rezultata HPLC-a da ima najbolji omjer ekstrahiranog CBD-a i CBN-a, pri čemu je CBD-a trebalo što više (CBD = 4,89 mg/g konoplje), a CBN-a što manje (CBN = 0,06 mg/g konoplje).

4.4. OPTIMIRANJE EKSTRAKCIJE

Iz grafova ovisnosti vremena, volumena i koncentracije (slika 8 i slika 9), dobivenim nakon statističke obrade podataka dobivenih spektrometrijom i HPLC-om, primjećuje se da volumen DES-a ne utječe znatno na povišenje ili sniženje koncentracije CBD-a, ali je proporcionalna s koncentracijom CBN-a. Vrijeme trajanja ekstrakcije utječe tako da je proporcionalno s koncentracijom CBD-a i ne utječe na povišenje ili sniženje koncentracije CBN-a. Tim rezultatima se opisuje da uvjeti pri kojima ekstrakcija optimalna, tj. u kojoj je u konačnom produktu udio CBD-a i ukupnih kanabinoida maksimalan te udio CBN-a, klorofila a i klorofila b minimalan, su vrijeme ekstrakcije od 25 minuta, omjer uzorka i otapala od 1:79 do 1:8 i temperatura 25 °C (faktor poželjnosti = 0,63)



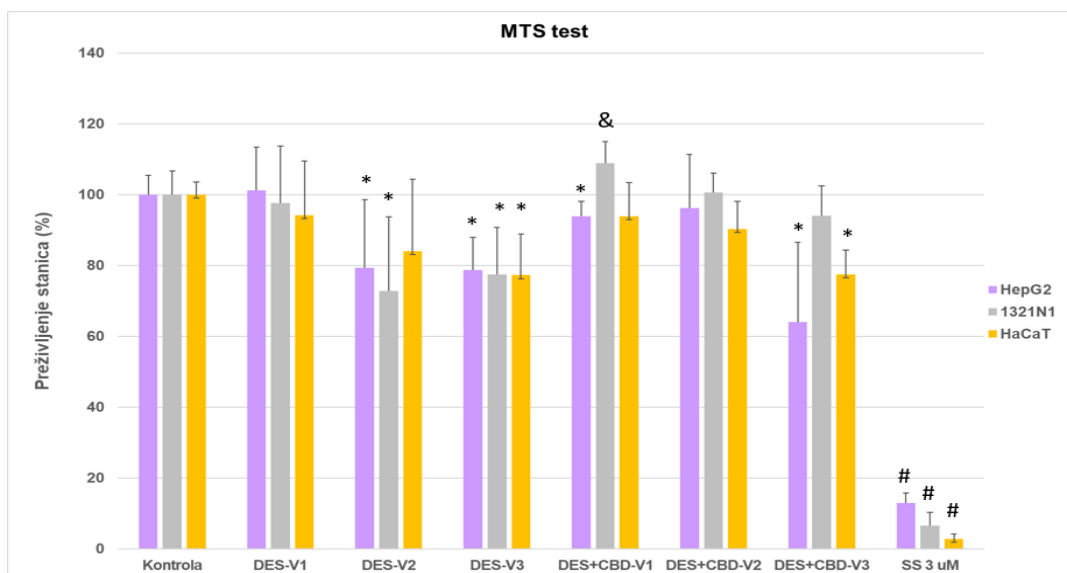
Slika 8. Graf ovisnosti koncentracije CBD-a, vremena provođenja ekstrakcije i volumena DES-a



Slika 9. Graf ovisnosti koncentracije CBN-a, vremena provođenja ekstrakcije i volumena DES-a

4.5. PREŽIVLJENJE STANICA – MTS TEST

Preživljenje stanica nakon izloženosti stanica DES-u tijekom 24 h, odnosno ekstraktu CBD-a u DES-u, procijenjena je primjenom MTS testa. Prema dobivenim vrijednostima izračunat je postotak preživljenja tretiranih stanica u odnosu na negativnu kontrolu. Rezultati su prikazani na slici 10.



Slika 10. Rezultati MTS testa koji upućuju na preživljenje stanica nakon izlaganja DES-u i ekstraktu CBD-a u DES-u tijekom 24 h.

Rezultati su prikazani u obliku srednjih vrijednosti \pm standardna devijacija šest neovisnih mjerenja po svakome uzorku.

Statistička značajnost testirana je pomoću t-testa. * - značajan pad u odnosu na odgovarajuću kontrolu ($p < 0,05$); & - značajan porast u odnosu na odgovarajuću kontrolu ($p < 0,05$); # - značajan pad u odnosu na sve ostale uzorce ($p < 0,05$).

Najveća smrtnost stanica utvrđena je u uzorcima pozitivne kontrola koje su bile izložene poznatom induktoru apoptoze, staurosporinu. Dobivene vrijednosti u sve tri stanične linije statistički značajno odstupaju prema svim ostalim uzorcima (oznaka na slici 10).

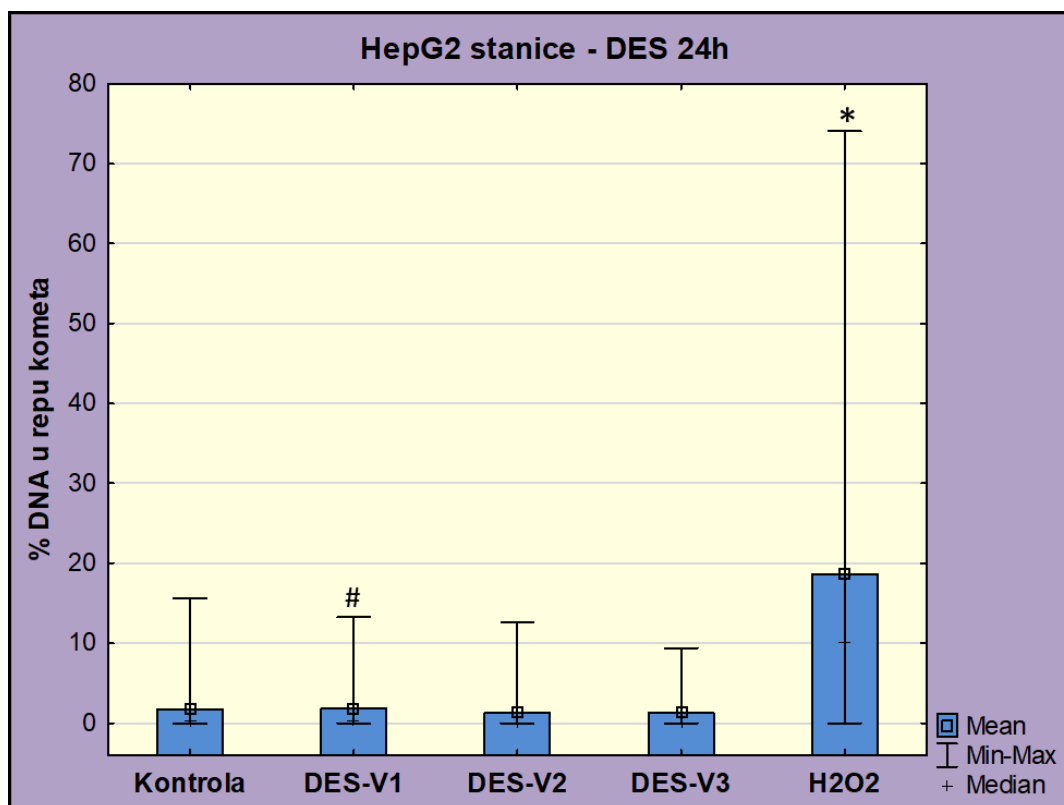
Nakon izlaganja DES-u, statistički značajno smanjenje postotka preživljenih stanica uočeno je u svim staničnim linijama pri najvišem testiranom volumenu DES-a i u linijama HepG2 i 1321N1 pri srednjem testiranom volumenu (oznake * na slici 10). Najniži testirani volumen DES-a nije izazvao statistički značajne citotoksične učinke. Nakon izlaganja HepG2 stanica ekstraktu CBD-a u DES-u statistički značajan pad preživljenja stanica u odnosu na kontrolu uočen je pri najvišem i srednjem testiranom volumenu (oznaka * na slici 10). U pokusu s 1321N1 stanicama nijedan od testiranih volumena DES-a nije pokazao statistički značajan citotoksičan učinak u odnosu na kontrolu. Najniži testirani volumen čak je potaknuo bolje preživljenje stanica u odnosu na kontrolu (oznaka & na slici 10). Nakon izlaganja HaCaT stanica

ekstraktu CBD-a u DES-u statistički značajan pad preživljenja stanica u odnosu na kontrolu uočen je samo pri najvišem testiranom volumenu (oznaka * na slici 10).

4.6. KOMET-TEST

4.6.1. Razine primarnih oštećenja DNA u HepG2 stanicama

Rezultati mjerenja razina primarnih oštećenja DNA u HepG2 stanicama u pokusu provedenom s ciljem procjene mogućih genotoksičnih učinaka DES-a prikazani su na slici 11 i u tablici 11.



Slika 11. Rezultati mjerenja razina primarnih oštećenja DNA u HepG2 stanicama izloženim ispitivanom DES-u u tri različita volumena (V1 = 0,5 μ L; V2 = 1,0 μ L; V3 = 2,0 μ L) tijekom 24 h, utvrđeni primjenom komet-testa u alkalnim uvjetima.

Mjerenja su usporedo provedena na uzorcima netretirane kontrole te pozitivne kontrole (10-minutno izlaganje stanica 30 μ mol/L H₂O₂).

U svakom je uzorku izmjereno ukupno 600 nasumično izabranih kometa.

Statistička značajnost testirana je primjenom testa analize varijance i *post-hoc* Tukey-evog HSD testa. * - statistički značajno viša vrijednost u odnosu na sve ostale uzorke; # - statistički značajno viša vrijednost u odnosu na uzorak DES-V2.

Oznake: Mean – srednja vrijednost; Min-Max – raspon izmjerenih vrijednosti; Median – medijan

Tablica 11. Detaljan prikaz brojčanih vrijednosti dobivenih mjerenjem razina primarnih oštećenja DNA u HepG2 stanicama izloženim ispitivanom ekstraktu CBD-a u DES-u u tri različita volumena (V1 = 0,5 µL; V2 = 1,0 µL; V3 = 2,0 µL) tijekom 24 h. Mjerenja su usporedo provedena na uzorcima netretirane kontrole te pozitivne kontrole (10-minutno izlaganje stanica 30 µmol/L H₂O₂).

HepG2 stanice					
% DNA u repu kometa – DES 24 h	Kontrola	V1	V2	V3	H₂O₂
Srednja vrijednost	1,69	1,83	1,25	1,30	18,67
SE	0,12	0,12	0,10	0,09	0,85
SD	2,98	2,86	2,33	2,13	20,79
Medijan	0,20	0,19	0,04	0,09	10,05
Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Maksimum	15,64	13,24	12,62	9,40	74,05

Napomena: U svakom je uzorku izmjereno ukupno 600 nasumično izabranih kometa, a dobiveni podaci obrađeni su primjenom deskriptivne statistike.

Kontrola i pozitivna kontrola

HepG2 stanice u kontrolnim uzorcima imale su nisku razinu primarnih oštećenja DNA: vrijednost medijana za parametar postotka DNA u repu kometa iznosila je 0,20 %, a srednja vrijednost ± standardna devijacija (te standardna pogreška) u tom uzorku iznosila je 1,69 ± 2,98 (0,12) %. Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u kontrolnim uzorcima utvrđen je raspon od 0 do 15,64 % DNA u repu kometa (tablica 11).

Zbog provjere pouzdanosti primijenjenog testa, usporedno su mjerene razine oštećenja DNA u stanicama izloženim poznatom genotoksičnom spoju, vodikovom peroksidu koji je predstavljao pozitivnu kontrolu. U pokusu je korištena koncentracija 30 µM, a stanice su djelovanju vodikovog peroksida bile izložene 10 minuta. Primjenom komet-testa u tom je uzorku utvrđena visoka razina primarnih oštećenja DNA koja potvrđuje osjetljivost ove metode. Vrijednost medijana za parametar % DNA u repu kometa iznosila je 10,05 %, a srednja vrijednost ± standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila je 18,67 ± 20,79 (0,85)%. Raspon pojedinačnih izmjerenih vrijednosti za 600 nasumično odabranih kometa iznosio je 0 - 74,05 % DNA u repu kometa (tablica 11).

Izlaganje HepG2 stanica ispitivanom DES-u tijekom 24 h

Iz prikaza na slici 10 i u tablici 12 vidljivo je kako sve pokusne skupine HepG2 stanica izložene DES-u imaju niske razine primarnih oštećenja DNA.

Za uzorak tretiran s najnižim volumenom DES-a (0,5 µL) vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 0,19 %, a srednja vrijednost ± standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila je $1,83 \pm 2,86$ (0,12)%. Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u ovoj pokusnoj skupini utvrđen je raspon od 0,00 do 13,24 % DNA u repu kometa.

U uzorku tretiranom dvostruko većim volumenom DES-a (1,0 µL) vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 0,04 %, dok je srednja vrijednost ± standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila $1,25 \pm 2,33$ (0,10) %. Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u ovoj pokusnoj skupini utvrđen je raspon od 0 do 12,62 % DNA u repu kometa.

U uzorku tretiranom najvećim volumenom DES-a (2,0 µL) vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 0,09 %, dok je srednja vrijednost ± standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila $1,30 \pm 2,13$ (0,09) %. Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u ovoj pokusnoj skupini utvrđen je raspon od 0,00 do 9,40 % DNA u repu kometa.

Statistička značajnost rezultata provjerena je pomoću testa analize varijance uz primjenu *post-hoc* Tukey-evog testa. Detaljni rezultati koji se odnose na statističku analizu prikazani su u tablici 12.

Tablica 12. Rezultati statističke analize provedene primjenom testa analize varijance i *post-hoc* Tukey-evog HSD testa.
Brojevi u tablici predstavljaju izračunate p-vrijednosti.

Skupine	Kontrola	DES-V1 (0,5 µL)	DES-V2 (1,0 µL)	DES-V3 (2,0 µL)	Pozitivna kontrola
Kontrola		0,866	0,226	0,664	<0,001
DES-V1 (0,5 µL)			0,019	0,138	<0,001
DES-V2 (1,0 µL)				0,947	<0,001
DES-V3 (2,0 µL)					<0,001

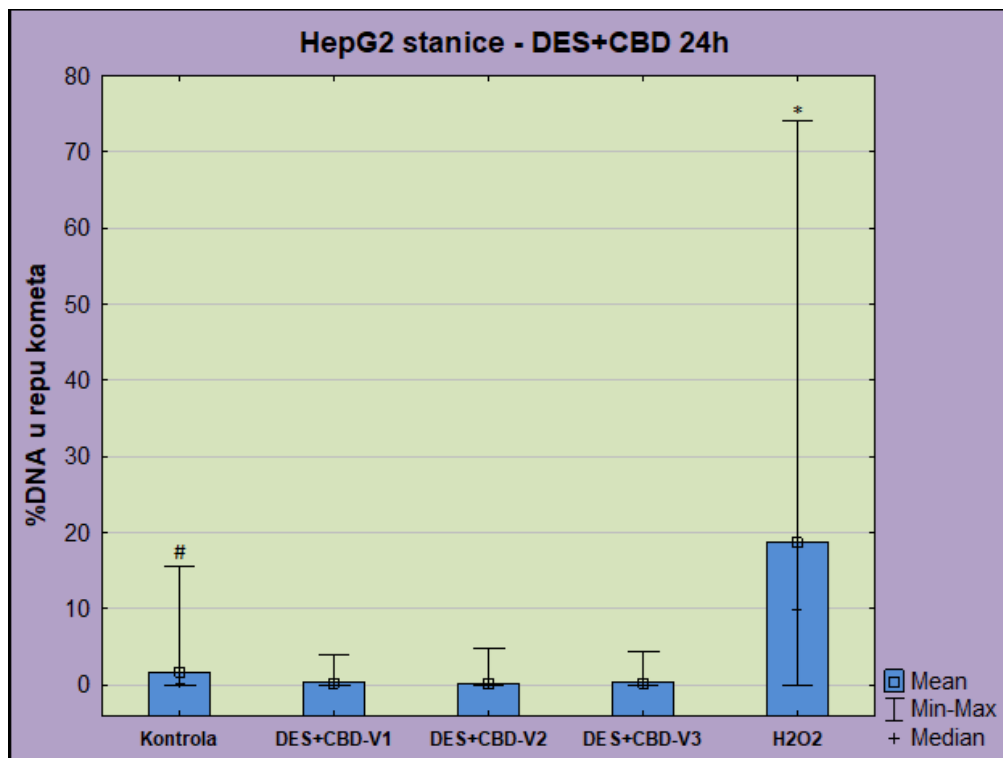
Napomena: p-vrijednosti označene crvenom bojom su statistički značajne.

Najvažniji zaključak koji proizlazi iz statističke obrade podataka jest da izlaganje HepG2 stanica ispitivanom DES-u tijekom 24 h nije dovelo do statistički značajnih odstupanja vrijednosti %DNA u repu kometa u odnosu na netretiranu kontrolu. Uzorak pozitivne kontrole

zbog najviše razine oštećenja DNA statistički značajno je odstupao u odnosu na sve ostale pokusne skupine. Utvrđena je i statistički značajna razlika između uzoraka koji su bili tretirani s najnižim volumenom V1 (0,5 μ L) i dvostruko većim volumenom DES-a V2 (1,0 μ L), a ona je uvjetovana razlikama u medijanima i srednjim vrijednostima (0,19 % vs. 0,04 %, odnosno 1,83 vs. 1,25 %).

Izlaganje HepG2 stanica ispitivanom ekstraktu CBD-a u DES-u tijekom 24 h

Rezultati mjerenja razina primarnih oštećenja DNA u HepG2 stanicama izloženim ispitivanom ekstraktu CBD-a u DES-u tijekom 24 h utvrđeni primjenom komet-testa u alkalnim uvjetima prikazani su na slici 12 i u tablici 13.



Slika 12. Rezultati mjerenja razina primarnih oštećenja DNA u HepG2 stanicama izloženim ispitivanom ekstraktu CBD-a u DES-u u tri različita volumena (V1 = 0,5 μ L; V2 = 1,0 μ L; V3 = 2,0 μ L) tijekom 24 h, utvrđeni primjenom komet-testa u alkalnim uvjetima.

Mjerenja su usporedo provedena na uzorcima netretirane kontrole te pozitivne kontrole (10-minutno izlaganje stanica 30 μ mol/L H₂O₂).

U svakom je uzorku izmjereno ukupno 600 nasumično izabranih kometa.

Statistička značajnost testirana je primjenom testa analize varijance i *post-hoc* Tukey-evog HSD testa. * - statistički značajno viša vrijednost u odnosu na sve ostale uzorke; # - statistički značajno viša vrijednost u odnosu na sve uzorke izložene ekstraktu CBD-a u DES-u.

Oznake: Mean – srednja vrijednost; Min-Max – raspon izmjerenih vrijednosti; Median – medijan

Tablica 13. Detaljan prikaz brojčanih vrijednosti dobivenih mjerenjem razina primarnih oštećenja DNA u HepG2 stanicama izloženim ispitivanom ekstraktu CBD-a u DES-u u tri različita volumena (V1 = 0,5 µL; V2 = 1,0 µL; V3 = 2,0 µL) tijekom 24 h. Mjerenja su usporedo provedena na uzorcima netretirane kontrole te pozitivne kontrole (10-minutno izlaganje stanica 30 µmol/L H₂O₂).

HepG2 stanice					
% DNA u repu kometa – DES+CBD 24 h	Kontrola	V1	V2	V3	H ₂ O ₂
Srednja vrijednost	1,69	0,25	0,24	0,27	18,67
SE	0,12	0,03	0,03	0,03	0,85
SD	2,98	0,66	0,66	0,66	20,79
Medijan	0,20	0,00	0,00	0,01	10,05
Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Maksimum	15,64	4,98	4,79	4,36	74,05

Napomena: U svakom je uzorku izmjereno ukupno 600 nasumično izabranih kometa, a dobiveni podaci obrađeni su primjenom deskriptivne statistike.

Iz spomenutih prikaza vidljivo je kako sve pokusne skupine HepG2 stanica izložene ekstraktu CBD-a u DES-u imaju niske razine primarnih oštećenja DNA.

Za uzorak tretiran s najnižim volumenom ekstrakta CBD-a u DES-u (0,5 µL) vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 0 %, a srednja vrijednost ± standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila je 0,25 ± 0,66 (0,03) %. Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u ovoj pokusnoj skupini utvrđen je raspon 0– 4,98 % DNA u repu kometa.

U uzorku tretiranom dvostruko većim volumenom ekstrakta CBD-a u DES-u (1,0 µL) vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 0 %, dok je srednja vrijednost ± standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila 0,24 ± 0,66 (0,03) %. Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u ovoj pokusnoj skupini utvrđen je raspon 0,00 – 4,79 % DNA u repu kometa.

U uzorku tretiranom najvećim volumenom ekstrakta CBD-a u DES-u (2,0 µL) vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 0,01 %, dok je srednja vrijednost ± standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila 0,27 ± 0,66 (0,09) %.

Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u ovoj pokusnoj skupini utvrđen je raspon 0 – do 4,36 % DNA u repu kometa.

Statistička značajnost rezultata provjerena je pomoću testa analize varijance uz primjenu *post-hoc* Tukey-evog testa. Detaljni rezultati koji se odnose na statističku analizu prikazani su u tablici 14.

Tablica 14. Rezultati statističke analize provedene primjenom testa analize varijance i *post-hoc* Tukey-evog HSD testa.
Brojevi u tablici predstavljaju izračunate p-vrijednosti.

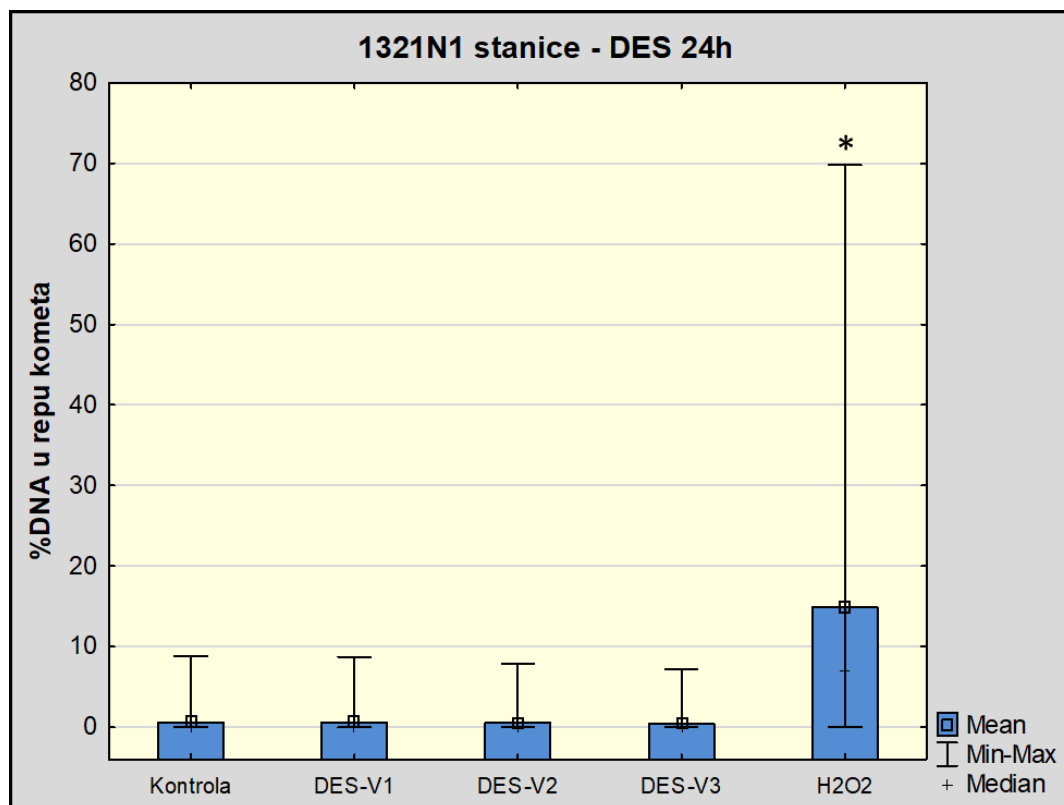
Skupine	Kontrola	CBD+DES-V1 (0,5 µL)	CBD+DES-V2 (1,0 µL)	CBD+DES-V3 (2,0 µL)	Pozitivna kontrola
Kontrola		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CBD+DES-V1 (0,5 µL)			0,991	1,000	<0,001
CBD+DES-V2 (1,0 µL)				0,998	<0,001
CBD+DES-V3 (2,0 µL)					<0,001

Napomena: p-vrijednosti označene crvenom bojom su statistički značajne.

Najvažniji zaključak koji proizlazi iz statističke obrade podataka jest da je izlaganje HepG2 stanica ispitivanom ekstraktu CBD-a u DES-u tijekom 24 h uzrokovalo statistički značajno smanjenje vrijednosti %DNA u repu kometa u odnosu na netretiranu kontrolu. Uzorak pozitivne kontrole zbog najviše razine oštećenja DNA statistički je značajno odstupao u odnosu na sve ostale pokusne skupine. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između uzoraka koji su bili tretirani s različitim volumenima ispitivanog ekstrakta.

4.6.2. Razine primarnih oštećenja DNA u 1321N1 stanicama

Rezultati mjerenja razina primarnih oštećenja DNA u 1321N1 stanicama u pokusu provedenom s ciljem procjene mogućih genotoksičnih učinaka DES-a prikazani su na slici 13 i u tablici 15.



Slika 13. Rezultati mjerenja razina primarnih oštećenja DNA u 1321N1 stanicama izloženim ispitivanom DES-u u tri različita volumena (V1 = 0,5 μ L; V2 = 1,0 μ L; V3 = 2,0 μ L) tijekom 24 h, utvrđeni primjenom komet-testa u alkalnim uvjetima.

Mjerenja su usporedo provedena na uzorcima netretirane kontrole te pozitivne kontrole (10-minutno izlaganje stanica 30 μ mol/L H₂O₂).

U svakom je uzorku izmjereno ukupno 600 nasumično izabranih kometa.

Statistička značajnost testirana je primjenom testa analize varijance i *post-hoc* Tukey-evog HSD testa. * - statistički značajno viša vrijednost u odnosu na sve ostale uzorke.

Oznake: Mean – srednja vrijednost; Min-Max – raspon izmjerenih vrijednosti; Median – medijan

Tablica 15. Detaljan prikaz brojčanih vrijednosti dobivenih mjerenjem razina primarnih oštećenja DNA u 1321N1 stanicama izloženim ispitivanom DES-u u tri različita volumena (V1 = 0,5 µL; V2 = 1,0 µL; V3 = 2,0 µL) tijekom 24 h. Mjerenja su usporedo provedena na uzorcima netretirane kontrole te pozitivne kontrole (10-minutno izlaganje stanica 30 µmol/L H₂O₂).

1321N1 stanice					
% DNA u repu kometa – DES 24 h	Kontrola	V1	V2	V3	H ₂ O ₂
Srednja vrijednost	0,58	0,58	0,58	0,43	14,85
SE	0,05	0,05	0,05	0,04	0,75
SD	1,21	1,16	1,23	1,01	18,40
Medijan	0,04	0,03	0,01	0,02	7,16
Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Maksimum	8,87	8,73	7,86	7,18	69,79

Napomena: U svakom je uzorku izmjereno ukupno 600 nasumično izabranih kometa, a dobiveni podaci obrađeni su primjenom deskriptivne statistike.

Kontrola i pozitivna kontrola

1321N1 stanice u kontrolnim uzorcima imale su nisku razinu primarnih oštećenja DNA: vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 0,04 % , a srednja vrijednost ± standardna devijacija (te standardna pogreška) u tom uzorku iznosila je 0,58 ± 1,21 (0,05) %. Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u kontrolnim uzorcima utvrđen je raspon 0–8,87 % DNA u repu kometa.

Zbog provjere pouzdanosti primijenjenog testa uspoređno su mjerene razine oštećenja DNA u stanicama izloženim poznatom genotoksičnom spoju, vodikovom peroksidu koji je predstavljao pozitivnu kontrolu. U pokusu je korištena koncentracija 30 µol/L, a stanice su bile izložene djelovanju vodikovog peroksida 10 minuta. Primjenom komet-testa u tom je uzorku utvrđena visoka razina primarnih oštećenja DNA koja potvrđuje osjetljivost ove metode. Vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 7,16 % , a srednja vrijednost ± standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila je 14,85 ± 18,40 (0,75) %. Raspon pojedinačnih izmjerenih vrijednosti za 600 nasumično odabranih kometa iznosio je 0, – 69,79 % DNA u repu kometa.

Izlaganje 1321N1 stanica ispitivanom DES-u tijekom 24 h

Iz prikaza na slici 10 i u tablici 14 vidljivo je kako sve pokusne skupine 1321N1 stanica izložene DES-u imaju niske razine primarnih oštećenja DNA.

Za uzorak tretiran s najnižim volumenom DES-a (0,5 μ L) vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 0,03 %, a srednja vrijednost \pm standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila je $0,58 \pm 1,16$ (0,05) %. Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u ovoj pokusnoj skupini utvrđen je raspon 0 – 8,73 % DNA u repu kometa.

U uzorku tretiranom dvostruko većim volumenom DES-a (1,0 μ L) vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 0,01 %, dok je srednja vrijednost \pm standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila $0,58 \pm 1,23$ (0,05) %. Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u ovoj pokusnoj skupini utvrđen je raspon 0 – 7,86 % DNA u repu kometa.

U uzorku tretiranom najvećim volumenom DES-a (2,0 μ L) vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 0,02 %, dok je srednja vrijednost \pm standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila $0,43 \pm 1,01$ (0,09) %. Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u ovoj pokusnoj skupini utvrđen je raspon 0 – 7,18 % DNA u repu kometa.

Statistička značajnost rezultata provjerena je pomoću testa analize varijance uz primjenu *post-hoc* Tukey-evog testa. Detaljni rezultati koji se odnose na statističku analizu prikazani su u tablici 16.

Tablica 16. Rezultati statističke analize provedene primjenom testa analize varijance i *post-hoc* Tukey-evog HSD testa.

Brojevi u tablici predstavljaju izračunate p-vrijednosti.

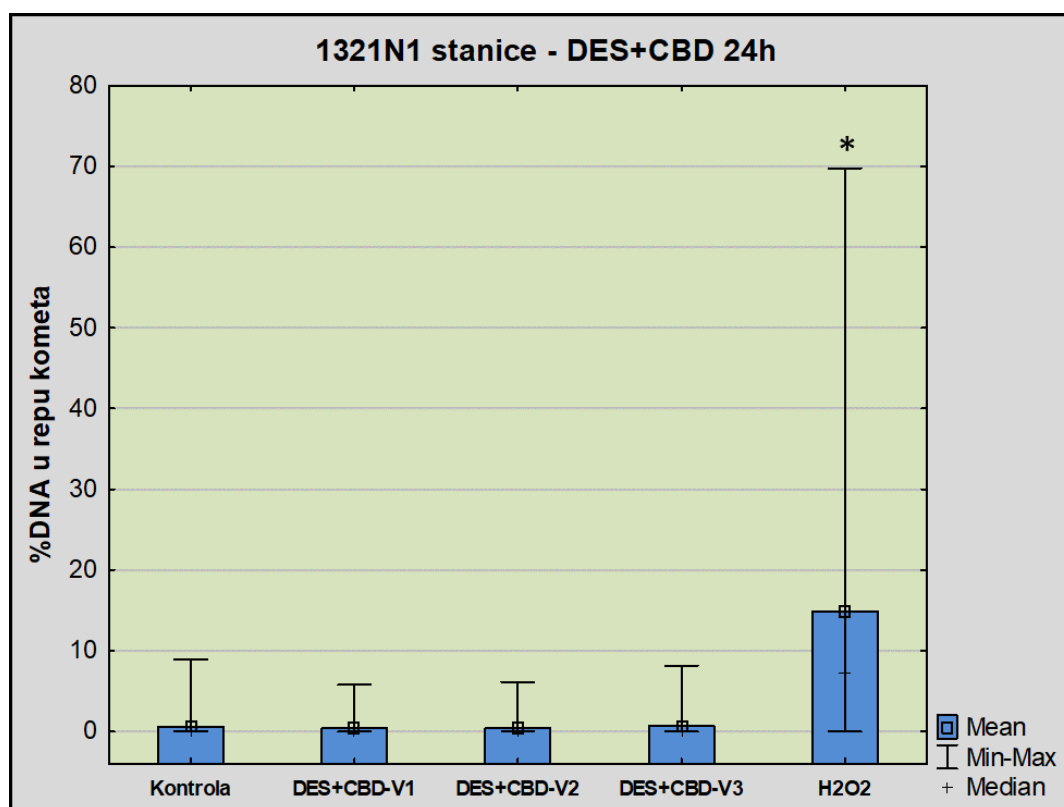
Skupine	Kontrola	DES-V1 (0,5 μ L)	DES-V2 (1,0 μ L)	DES-V3 (2,0 μ L)	Pozitivna kontrola
Kontrola		1,000	1,000	0,662	<0,001
DES-V1 (0,5 μ L)			1,000	0,613	<0,001
DES-V2 (1,0 μ L)				0,740	<0,001
DES-V3 (2,0 μ L)					<0,001

Napomena: p-vrijednosti označene crvenom bojom su statistički značajne.

Najvažniji zaključak koji proizlazi iz statističke obrade podataka jest da izlaganje 1321N1 stanica ispitivanom DES-u tijekom 24 h nije dovelo do statistički značajnih odstupanja vrijednosti %DNA u repu kometa u odnosu na netretiranu kontrolu. Uzorak pozitivne kontrole zbog najviše razine oštećenja DNA statistički značajno je odstupao u odnosu na sve ostale pokusne skupine. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između uzoraka koji su bili tretirani s različitim volumenima ispitivanog DES-a.

Izlaganje 1321N1 stanica ispitivanom ekstraktu CBD-a u DES-u tijekom 24 h

Rezultati mjerenja razina primarnih oštećenja DNA u 1321N1 stanicama izloženih ispitivanom ekstraktu CBD-a u DES-u tijekom 24 h utvrđeni primjenom komet-testa u alkalnim uvjetima prikazani su na slici 14 i u tablici 17.



Slika 14. Rezultati mjerenja razina primarnih oštećenja DNA u 1321N1 stanicama izloženim ispitivanom ekstraktu CBD-a u DES-u u tri različita volumena (V1 = 0,5 μ L; V2 = 1,0 μ L; V3 = 2,0 μ L) tijekom 24 h, utvrđeni primjenom komet-testa u alkalnim uvjetima.

Mjerenja su usporedo provedena na uzorcima netretirane kontrole te pozitivne kontrole (10-minutno izlaganje stanica 30 μ mol/L H₂O₂).

U svakom je uzorku izmjereno ukupno 600 nasumično izabranih kometa.

Statistička značajnost testirana je primjenom testa analize varijance i *post-hoc* Tukey-evog HSD testa. * - statistički značajno viša vrijednost u odnosu na sve ostale uzorke.

Oznake: Mean – srednja vrijednost; Min-Max – raspon izmjerenih vrijednosti; Median – medijan

Tablica 17. Detaljan prikaz brožanih vrijednosti dobivenih mjerenjem razina primarnih oštećenja DNA u 1321N1 stanicama izloženim ispitivanom ekstraktu CBD-a u DES-u u tri različita volumena (V1 = 0,5 µL; V2 = 1,0 µL; V3 = 2,0 µL) tijekom 24 h. Mjerenja su usporedo provedena na uzorcima netretirane kontrole te pozitivne kontrole (10-minutno izlaganje stanica 30 µmol/L H₂O₂).

1321N1 stanice					
% DNA u repu kometa – DES+CBD 24 h	Kontrola	V1	V2	V3	H ₂ O ₂
Srednja vrijednost	0,58	0,39	0,41	0,65	14,85
SE	0,05	0,04	0,04	0,05	0,75
SD	1,21	0,87	0,97	1,30	18,40
Medijan	0,04	0,01	0,01	0,02	7,16
Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Maksimum	8,87	5,77	6,15	8,16	69,79

Napomena: U svakom je uzorku izmjereno ukupno 600 nasumično izabranih kometa, a dobiveni podaci obrađeni su primjenom deskriptivne statistike.

Iz spomenutih prikaza vidljivo je kako sve pokusne skupine 1321N1 stanica izložene ekstraktu CBD-a u DES-u imaju niske razine primarnih oštećenja DNA.

Za uzorak tretiran s najnižim volumenom ekstrakta CBD-a u DES-u (0,5 µL) vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 0,01 %, a srednja vrijednost ± standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila je 0,39 ± 0,87 (0,04)%. Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u ovoj pokusnoj skupini utvrđen je raspon 0 – 5,77 % DNA u repu kometa.

U uzorku tretiranom dvostruko većim volumenom ekstrakta CBD-a u DES-u (1,0 µL) vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 0,01 %, a srednja vrijednost ± standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila je 0,41 ± 0,97 (0,04) %. Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u ovoj pokusnoj skupini utvrđen je raspon 0 – 6,15 % DNA u repu kometa.

U uzorku tretiranom najvećim volumenom ekstrakta CBD-a u DES-u (2,0 µL) vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 0,02 %, dok je srednja vrijednost ± standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila $0,65 \pm 1,30$ (0,05) %. Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u ovoj pokusnoj skupini utvrđen je raspon 0 – 8,16 % DNA u repu kometa.

Statistička značajnost rezultata provjerena je pomoću testa analize varijance uz primjenu *post-hoc* Tukey-evog testa. Detaljni rezultati koji se odnose na statističku analizu prikazani su u tablici 18.

Tablica 18. Rezultati statističke analize primjenom testa analize varijance i *post-hoc* Tukey-evog HSD testa.
Brojevi u tablici predstavljaju izračunate p-vrijednosti.

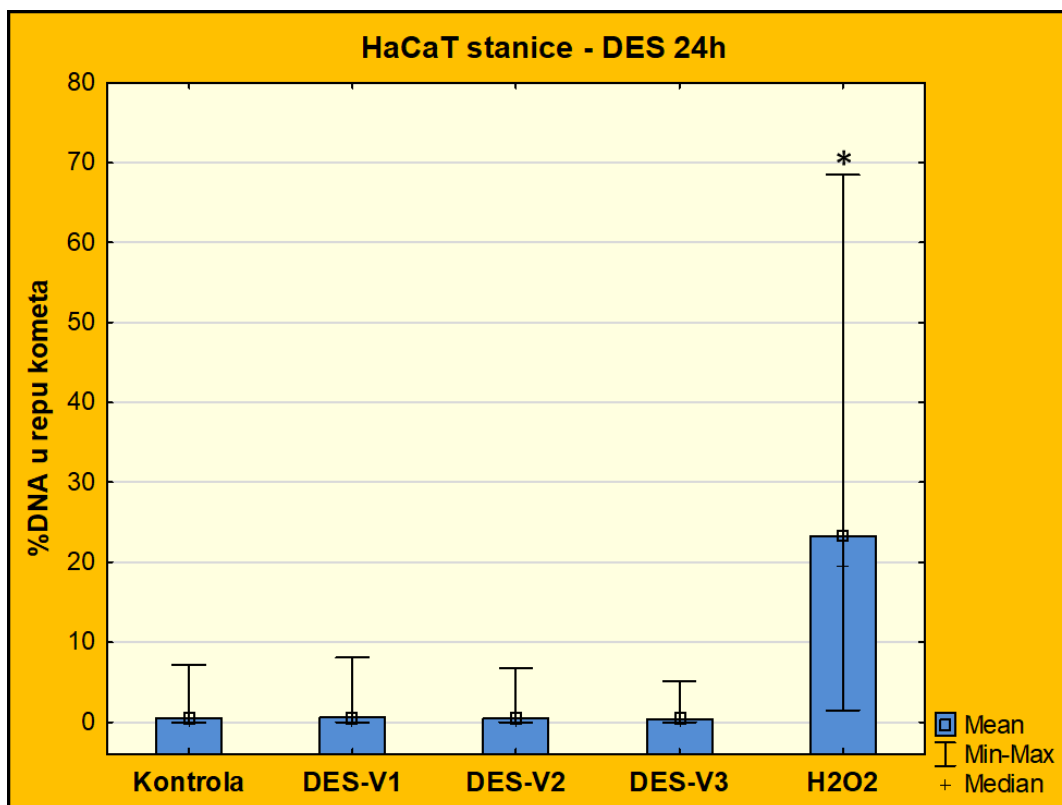
Skupine	Kontrola	CBD+DES-V1 (0,5 µL)	CBD+DES-V2 (1,0 µL)	CBD+DES-V3 (2,0 µL)	Pozitivna kontrola
Kontrola		0,472	0,505	0,979	<0,001
CBD+DES-V1 (0,5 µL)			1,000	0,174	<0,001
CBD+DES-V2 (1,0 µL)				0,193	<0,001
CBD+DES-V3 (2,0 µL)					<0,001

Napomena: p-vrijednosti označene crvenom bojom su statistički značajne.

Najvažniji zaključak koji proizlazi iz statističke obrade podataka jest da izlaganje 1321N1 stanica ispitivanom ekstraktu CBD u DES-u tijekom 24 h nije uzrokovalo statistički značajno smanjenje vrijednosti %DNA u repu kometa u odnosu na netretiranu kontrolu. Uzorak pozitivne kontrole zbog najviše razine oštećenja DNA statistički značajno je odstupao u odnosu na sve ostale pokusne skupine. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između uzoraka koji su bili tretirani s različitim volumenima ispitivanog ekstrakta.

4.6.3. Razine primarnih oštećenja DNA u HaCaT stanicama

Rezultati mjerenja razina primarnih oštećenja DNA u HaCaT stanicama u pokusu provedenom s ciljem procjene mogućih genotoksičnih učinaka DES-a prikazani su na slici 15 i u tablici 19.



Slika 15. Rezultati mjerenja razina primarnih oštećenja DNA u HaCaT stanicama izloženim ispitivanom DES-u u tri različita volumena (V1 = 0,5 μ L; V2 = 1,0 μ L; V3 = 2,0 μ L) tijekom 24 h, utvrđeni primjenom komet-testa u alkalnim uvjetima.

Mjerenja su usporedo provedena na uzorcima netretirane kontrole te pozitivne kontrole (10-minutno izlaganje stanica 30 μ mol/L H₂O₂).

U svakom je uzorku izmjereno ukupno 600 nasumično izabranih kometa.

Statistička značajnost testirana je primjenom testa analize varijance i *post-hoc* Tukey-evog HSD testa. * - statistički značajno viša vrijednost u odnosu na sve ostale uzorke.

Oznake: Mean – srednja vrijednost; Min-Max – raspon izmjerenih vrijednosti; Median – medijan

Tablica 19. Detaljan prikaz brojčanih vrijednosti dobivenih mjerenjem razina primarnih oštećenja DNA u HaCaT stanicama izloženim ispitivanom DES-u u tri različita volumena (V1 = 0,5 µL; V2 = 1,0 µL; V3 = 2,0 µL) tijekom 24 h. Mjerenja su usporedo provedena na uzorcima netretirane kontrole te pozitivne kontrole (10-minutno izlaganje stanica 30 µmol/L H₂O₂).

HaCaT stanice					
% DNA u repu kometa – DES 24 h	Kontrola	V1	V2	V3	H ₂ O ₂
Srednja vrijednost	0,51	0,56	0,47	0,39	23,27
SE	0,04	0,05	0,04	0,03	0,69
SD	1,06	1,15	0,97	0,85	16,96
Medijan	0,02	0,03	0,03	0,01	19,45
Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	1,49
Maksimum	7,12	8,07	6,72	5,11	68,51

Napomena: U svakom je uzorku izmjereno ukupno 600 nasumično izabranih kometa, a dobiveni podaci obrađeni su primjenom deskriptivne statistike.

Kontrola i pozitivna kontrola

HaCaT stanice u kontrolnim uzorcima imale su nisku razinu primarnih oštećenja DNA: vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 0,02 %, a srednja vrijednost ± standardna devijacija (te standardna pogreška) u tom uzorku iznosila je 0,51 ± 1,06 (0,04)%. Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u kontrolnim uzorcima utvrđen je raspon 0 – 7,12 % DNA u repu kometa.

Zbog provjere pouzdanosti primijenjenog testa, usporedno su mjerene razine oštećenja DNA u stanicama izloženim poznatom genotoksičnom spoju, vodikovom peroksidu, koji je predstavljao pozitivnu kontrolu. U pokusu je korištena koncentracija 30 µmol/L, a stanice su djelovanju vodikovog peroksida bile izložene 10 minuta. Primjenom komet-testa u tom je uzorku utvrđena visoka razina primarnih oštećenja DNA koja potvrđuje osjetljivost ove metode. Vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 19,45 %, a srednja vrijednost ± standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila je 23,27 ± 16,96 (0,69) %. Raspon pojedinačnih izmjerenih vrijednosti za 600 nasumično odabranih kometa iznosio je 1,49 – 68,51 % DNA u repu kometa.

Izlaganje HaCaT stanica ispitivanom DES-u tijekom 24 h

Rezultati mjerenja razina primarnih oštećenja DNA u HaCaT stanicama izloženih ispitivanom DES-u tijekom 24 h utvrđeni primjenom komet-testa u alkalnim uvjetima prikazani su na slici 15 i u tablici 19.

Iz spomenutih prikaza vidljivo je kako sve pokusne skupine HaCaT stanica izložene DES-u imaju niske razine primarnih oštećenja DNA.

Za uzorak tretiran s najnižim volumenom DES-a (0,5 µL) vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 0,03 %, a srednja vrijednost ± standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila je $0,56 \pm 1,15$ (0,05) %. Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u ovoj pokusnoj skupini utvrđen je raspon 0 – 8,07 % DNA u repu kometa.

U uzorku tretiranom dvostruko većim volumenom DES-a (1,0 µL) vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 0,03 %, dok je srednja vrijednost ± standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila $0,47 \pm 0,97$ (0,04) %. Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u ovoj pokusnoj skupini utvrđen je raspon 0 – 6,72 % DNA u repu kometa.

U uzorku tretiranom najvećim volumenom DES-a (2,0 µL) vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 0,01 %, dok je srednja vrijednost ± standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila $0,39 \pm 0,85$ (0,03) %. Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u ovoj pokusnoj skupini utvrđen je raspon 0 – 5,11 % DNA u repu kometa.

Statistička značajnost rezultata provjerena je pomoću testa analize varijance uz primjenu *post-hoc* Tukey-evog testa. Detaljni rezultati koji se odnose na statističku analizu prikazani su u tablici 20.

Tablica 20. Rezultati statističke analize primjenom testa analize varijance i *post-hoc* Tukey-evog HSD testa.
Brojevi u tablici predstavljaju izračunate p-vrijednosti.

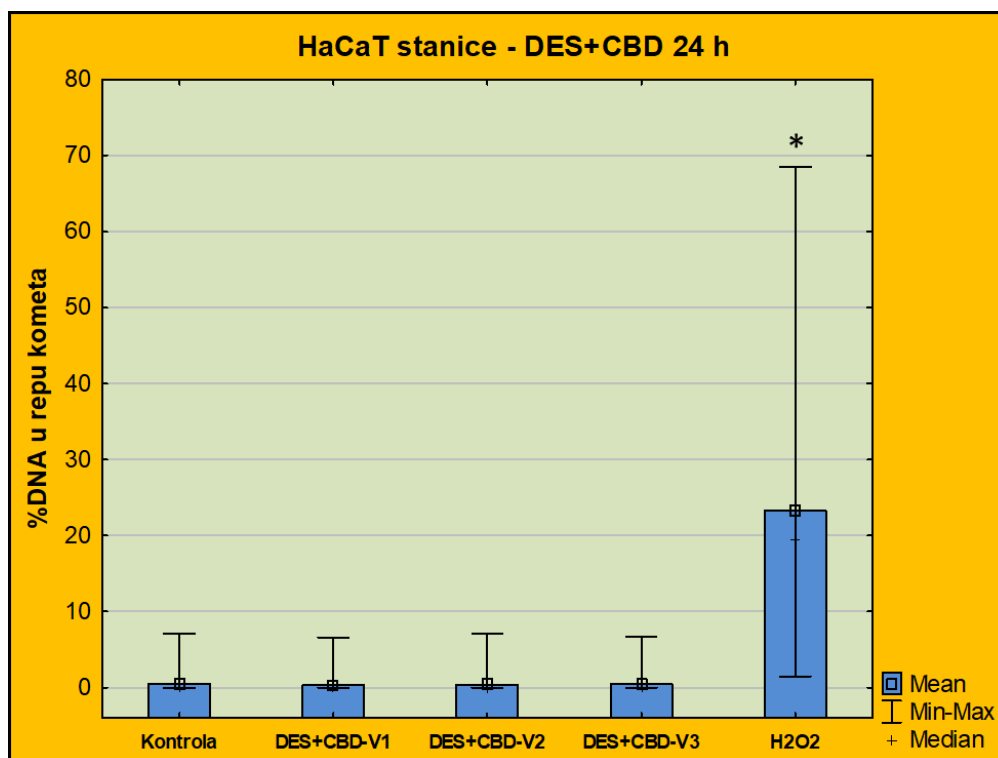
Skupine	Kontrola	DES-V1 (0,5 µL)	DES-V2 (1,0 µL)	DES-V3 (2,0 µL)	Pozitivna kontrola
Kontrola		0,975	0,996	0,714	<0,001
DES-V1 (0,5 µL)			0,866	0,336	<0,001
DES-V2 (1,0 µL)				0,901	<0,001
DES-V3 (2,0 µL)					<0,001

Napomena: p-vrijednosti označene crvenom bojom su statistički značajne.

Najvažniji zaključak koji proizlazi iz statističke obrade podataka jest da izlaganje HaCaT stanica ispitivanom DES-u tijekom 24 h nije dovelo do statistički značajnih odstupanja vrijednosti %DNA u repu kometa u odnosu na netretiranu kontrolu. Uzorak pozitivne kontrole zbog najviše razine oštećenja DNA statistički je značajno odstupao u odnosu na sve ostale pokusne skupine. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između uzoraka koji su bili tretirani s različitim volumenima ispitivanog DES-a.

Izlaganje HaCaT stanica ispitivanom ekstraktu CBD-a u DES-u tijekom 24 h

Rezultati mjerenja razina primarnih oštećenja DNA u HaCaT stanicama izloženih ispitivanom DES-u tijekom 24 h utvrđeni primjenom komet-testa u alkalnim uvjetima prikazani su na slici 16 i u tablici 21.



Slika 16. Rezultati mjerenja razina primarnih oštećenja DNA u HaCaT stanicama izloženim ispitivanom ekstraktu CBD-a u DES-u u tri različita volumena (V1 = 0,5 μ L; V2 = 1,0 μ L; V3 = 2,0 μ L) tijekom 24 h, utvrđeni primjenom komet-testa u alkalnim uvjetima.

Mjerenja su usporedo provedena na uzorcima netretirane kontrole te pozitivne kontrole (10-minutno izlaganje stanica 30 μ mol/L H₂O₂).

U svakom je uzorku izmjereno ukupno 600 nasumično izabranih kometa. Statistička značajnost testirana je primjenom testa analize varijance i *post-hoc* Tukey-evog HSD testa. * - statistički značajno viša vrijednost u odnosu na sve ostale uzorke.

Oznake: Mean – srednja vrijednost; Min-Max – raspon izmjerenih vrijednosti; Median – medijan

Tablica 21. Detaljan prikaz brojčanih vrijednosti dobivenih mjerenjem razina primarnih oštećenja DNA u HaCaT stanicama izloženim ispitivanom ekstraktu CBD-a u DES-u u tri različita volumena (V1 = 0,5 µL; V2 = 1,0 µL; V3 = 2,0 µL) tijekom 24 h. Mjerenja su usporedo provedena na uzorcima netretirane kontrole te pozitivne kontrole (10-minutno izlaganje stanica 30 µmol/L H₂O₂).

HaCaT stanice					
% DNA u repu kometa – DES+CBD 24h	Kontrola	V1	V2	V3	H ₂ O ₂
Srednja vrijednost	0,51	0,33	0,41	0,41	23,27
SE	0,04	0,04	0,04	0,04	0,69
SD	1,06	0,88	0,97	1,00	16,96
Medijan	0,02	0,00	0,01	0,01	19,45
Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	1,49
Maksimum	7,12	6,60	7,12	6,72	68,51

Napomena: U svakom je uzorku izmjereno ukupno 600 nasumično izabranih kometa, a dobiveni podaci obrađeni su primjenom deskriptivne statistike.

Iz navedenih prikaza vidljivo je kako sve pokusne skupine HaCaT stanica izložene ekstraktu CBD-a u DES-u imaju niske razine primarnih oštećenja DNA.

Za uzorak tretiran s najnižim volumenom ekstrakta CBD-a u DES-u (0,5 µL) vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 0 %, a srednja vrijednost ± standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila je 0,33 ± 0,88 (0,04) %. Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u ovoj pokusnoj skupini utvrđen je raspon 0 – 6,60 % DNA u repu kometa.

U uzorku tretiranom dvostruko većim volumenom ekstrakta CBD-a u DES-u (1,0 µL) vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 0,01 %, dok je srednja vrijednost ± standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila 0,41 ± 0,97 (0,04) %. Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u ovoj pokusnoj skupini utvrđen je raspon od 0 – 7,12 % DNA u repu kometa.

U uzorku tretiranom najvećim volumenom ekstrakta CBD-a u DES-u (2,0 µL) vrijednost medijana za parametar %DNA u repu kometa iznosila je 0,01 %, dok je srednja vrijednost ± standardna devijacija (kao i standardna pogreška) u tom uzorku iznosila 0,41 ± 1,00 (0,04) %.

Mjerenjem 600 pojedinačnih kometa u ovoj pokusnoj skupini utvrđen je raspon 0 – 6,72 % DNA u repu kometa.

Statistička značajnost rezultata provjerena je pomoću testa analize varijance uz primjenu *post-hoc* Tukey-evog testa. Detaljni rezultati koji se odnose na statističku analizu prikazani su u tablici 22.

Tablica 22. Rezultati statističke analize primjenom testa analize varijance i *post-hoc* Tukey-evog HSD testa.
Brojevi u tablici predstavljaju izračunate p-vrijednosti.

Skupine	Kontrola	CBD+DES-V1 (0,5 µL)	CBD+DES-V2 (1,0 µL)	CBD+DES-V3 (2,0 µL)	Pozitivna kontrola
Kontrola		0,149	0,706	0,709	<0,001
CBD+DES-V1 (0,5 µL)			0,851	0,849	<0,001
CBD+DES-V2 (1,0 µL)				1,000	<0,001
CBD+DES-V3 (2,0 µL)					<0,001

Napomena: p-vrijednosti označene crvenom bojom su statistički značajne.

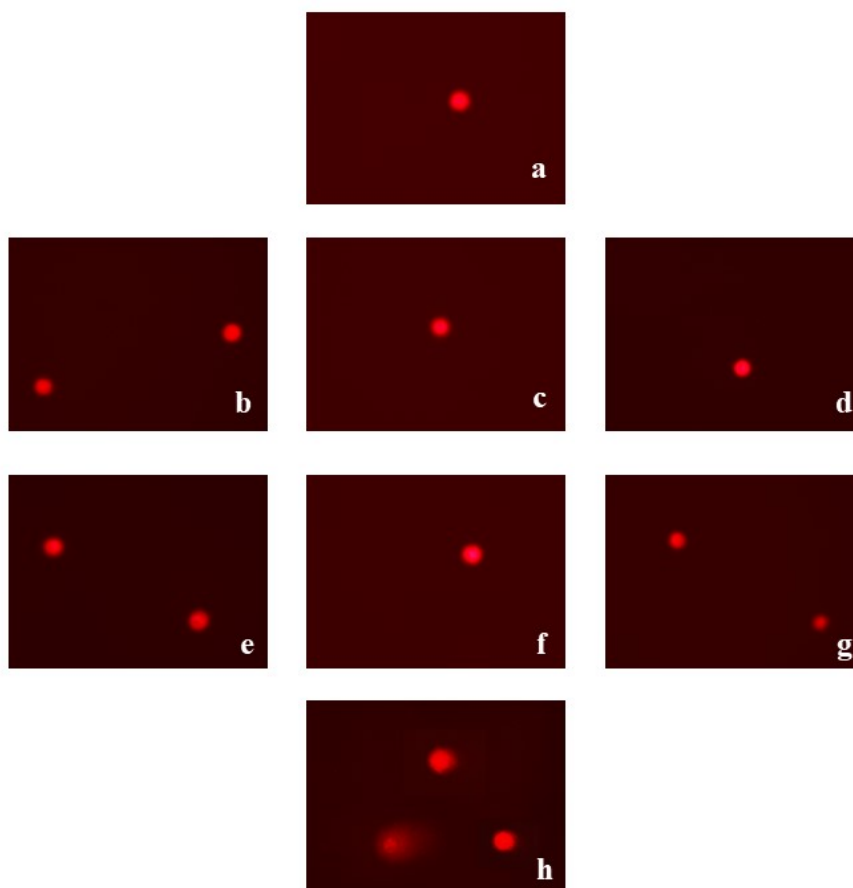
Najvažniji zaključak koji proizlazi iz statističke obrade podataka jest da je izlaganje HaCaT stanica ispitivanom ekstraktu CBD-a u DES-u tijekom 24 h uzrokovalo statistički značajno smanjenje vrijednosti %DNA u repu kometa u odnosu na netretiranu kontrolu. Uzorak pozitivne kontrole zbog najviše razine oštećenja DNA statistički je značajno odstupao u odnosu na sve ostale pokusne skupine. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između uzoraka koji su bili tretirani s različitim volumenima ispitivanog ekstrakta.

Da se detaljnije pojašnjavaju razlike u stupnju oštećenja DNA utvrđenom u staničnim kulturama HepG2, 1321N1 i HaCaT izloženim ispitivanom DES-u te ekstraktu CBD-a u DES-u prema kontrolama, u nastavku su priložene fotografije kometa.

Na slici 17. prikazane su fotomikrografije obrisa kometa obojenih etidijevim bromidom i promatranih pod fluorescencijskim mikroskopom Olympus BX51 (povećanje 200×) nakon provedene mikrogel-elektroforeze u alkalnim uvjetima (komet-test). Iz njih je vidljivo kako nakon izlaganja stanica ispitivanom DES-u tijekom 24 h (b-d), te ekstraktu CBD-a u DES-u (e-g) nije nastupilo značajno narušavanje integriteta molekule DNA niti u jednoj vrsti stanica u odnosu na kontrolu (a). Visoki stupanj oštećenja DNA utvrđen je u uzorku pozitivne kontrole, u kojem su uočeni kometi različitih dužina repa (h). Takav rezultat potvrđuje osjetljivost

metode jer vodikov peroksid, koji je korišten kao pozitivna kontrola, izaziva brojna oštećenja u molekuli DNA koja se mogu osjetljivo detektirati primjenom alkalne inačice komet-testa.

U cjelini uzevši, priložene fotomikrografije potvrđuju ranije komentirane rezultate i brojčane podatke dobivene mjerenjima koje govore u prilog niskog potencijala za oštećenje DNA ispitivanog DES-a kao i pretežito zaštitnih učinaka CBD-a.



Slika 17. Fotomikrografije obrisa kometa obojenih etidijevim bromidom i promatranih pod fluorescencijskim mikroskopom Olympus BX51 (povećanje 200×) nakon provedene mikrogel-elektroforeze u alkalnim uvjetima (komet-test). (a) kontrola HaCaT stanice (bez tretmana); (b) HaCaT stanice tretirane 24 h s najnižim volumenom DES-a (V1, 0,5 μ L); (c) HepG2 stanice tretirane 24 h s V2 DES-a (1,0 μ L); (d) HaCaT stanice tretirane 24 h s V3 DES-a (2,0 μ L); (e) HaCaT stanice tretirane 24 h s V1 CBD+DES; (f) 1321N1 stanice tretirane 24 h s V2 CBD+DES; (g) HepG2 stanice tretirane 24 h s V3 CBD+DES; (h) pozitivna kontrola HaCaT stanice (30 μ mol/L vodikov peroksid, 10 min). Snimljeno pomoću računalnog sustava za mjerenje kometa Comet Assay IV™ software te uređeno u grafičkom programu IrfanView primjenom odgovarajućih filtera za boju kako bi se prikazao stvarni izgled obojenja vidljiv pod mikroskopom.

Razvoj proizvoda koji sadrže bioaktivne spojeve zahtijeva različite sigurnosne provjere njihovih sastojaka da bi se spriječili mogući neželjeni učinci na zdravlje potrošača. Budući da se postojeće tehnologije proizvodnje zasnivaju na poznatim i provjerenim postupcima, razvoj i poboljšanje značajki nekog proizvoda može uključivati i različite modifikacije i primjene novih potencijalno učinkovitijih ili kvalitetnijih sastojaka o čijim mogućim štetnim ili povoljnim biološkim učincima još nema dovoljno podataka. Otapala imaju vrlo važnu ulogu u postupcima ekstrakcije i ona općenito ne bi smjela interferirati s biološkom aktivnosti spoja od interesa, niti utjecati na njegove moguće toksične učinke (Le Hegarat i sur., 2020), ali poznato je da neka otapala ipak mogu utjecati na toksičnost ekstrakata (Yao i sur., 2019). Primjerice, etanol se zbog dobrih kemijskih svojstava koristi u mnogim postupcima ekstrakcija spojeva, poput CBD-a te kao otapalo u proizvodnji lijekova, a poznato je da njegove visoke koncentracije mogu imati štetne učinke na organizam i/ili stanice (Jamalzadeh i sur., 2016; Nguyen i sur., 2020, Kar i sur., 2021). Stoga je opravdano razvijati tehnološke postupke u kojima se etanol zamjenjuje nekim drugim, podjednako učinkovitim, a manje štetnim i biokompatibilnijim otapalom. U tom smislu sve više raste značaj primjene DES-ova kao potencijalno učinkovitih otapala (Xue i sur., 2020).

Koncentracije biološki aktivnih spojeva poput CBD-a u biljnom materijalu često su vrlo niske i da bi se dobila što veća količina spoja od interesa, potrebno je koristiti što učinkovitije i jeftinije ekstrakcijske metode. Optimalna metoda trebala bi biti ponovljiva, ekološki prihvatljiva i nezahtjevna za izvođenje u smislu vremena potrebnog za provedbu i analizu. Nadalje, pri odabiru ekstrakcijske metode važno je imati na umu i termolabilnost aktivnih molekula, stoga temperaturu i druge parametre treba optimizirati. Danas je razvijeno mnogo ekstrakcijskih strategija koje se razlikuju u smislu metodologije, vremena potrebnog za analizu, temperature, tlaka i otapala, koje se također koriste u kombinaciji s drugim tehnikama da bi se povećale količine ekstrakata. Međutim, kao posljedica razlika u ekstrakcijskim procesima moguće su razlike u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu ekstrakata dobivenih iz iste biljke. U novije vrijeme sve veću pozornost privlače nepolarni DES-ovi, koji bi se zbog svojih svojstava, mogli primijeniti kao zamjenska otapala za neke od standardnih otapala koja se koriste u postupcima ekstrakcije i također spadaju u „zelena otapala“ (Mišan i sur., 2019). U ovom radu je bilo potrebno ispitati sposobnost ekstrakcije CBD-a u novoj kombinaciji dvaju DES-ova uz pomoć tresilice, na sobnoj temperaturi. Pri tome je bilo potrebno pronaći optimalan omjer DES-a kao ekstrakcijskog otpala i čistog prethodno dekarboksiliranog biljnog

materijala u kojem će se iz biljnog materijala izvući što više CBD-a, a da se pri tome ekstrahira što manje neželjenih spojeva, kao što su klorofili i ostali karoteni. Klorofil u pročišćenom ulju djeluje kao fotosenzibilizator jer stvara singletni kisik u prisutnosti svjetla. U radu Fakourelisa i sur. (1987) izjavljeno je da su eksperimenti jasno pokazali da je singletni kisik uglavnom odgovoran za fotooksidaciju ulja koje sadrži klorofil, kao i da su učinci klorofila na oksidaciju lipida velika briga znanstvenika koji se bave hranom (Foote i Denny, 1968; Foote i sur., 1970; Endo i sur., 1984) te se u nekim situacijama nastoji ukloniti. Nadalje, da bi se utvrdilo koji omjer otapala i biljnog materijala daje najbolju iskoristivost bilo je potrebno odrediti koncentraciju ekstrahiranog CBD-a Ciolino i sur., 2017; Hädener i sur., 2019). Iz rezultata preliminarnih istraživanja dobivenih tekućinskom kromatografijom s DAD detektorom (HPLC DAD) može se zaključiti da je omjer konoplje i DES-a za optimalnu ekstrakciju u laboratorijskim uvjetima je 1:10 jer daje dovoljnu uravnoteženost praktičnosti odvajanja ekstrakta od krutog taloga i konačne koncentracije u uzorku. Nadalje je optimalni prinos ekstrakcije bio pri sobnoj temperaturi nakon 20 minuta provođenja ekstrakcije. Uspkos tome što je bila veća koncentracija pri 40 minuta provođenja ekstrakcije, važno je napomenuti da to dvostruko veće vrijeme provođenja nije znatno povećalo prinos u konačnom produktu. Što se tiče preliminarnih rezultata i statističke obrade tih rezultata za potencijalnu industrijsku proizvodnju, dobivenih spektrometrijskom metodom te tekućinskom kromatografijom s DAD detektorom (HPLC DAD), može se zaključiti da uvjeti pri kojima ekstrakcija optimalna, tj. u kojoj je u konačnom produktu udio CBD-a i ukupnih kanabinoida maksimalan te udio CBN-a, klorofila a i klorofila b minimalan, su vrijeme ekstrakcije od 25 minuta, omjer uzorka i otapala od 1:7,9 do 1:8 i temperatura od 25 °C (Faktor poželjnosti = 0,63). Osim toga, u usporedbi s kontrolnim uzorkom ekstrahiranim u etanolu, odabrani uzorak ima manji udio klorofila i CBN-a kao i zanemarivo manji udio CBD-a. Takav uzorak je pokazao kvantitativnu optimalnost i zbog toga je bio odabran za ispitivanje toksičnih učinaka u uvjetima *in vitro* da bi se odredilo šteti li takav uzorak zdravlju ljudskog organizma. Za toksikološke procjene u okviru ovog istraživanja izabrani su jednostavni testovi na razini stanica koji predstavljaju prvi korak u procjeni mogućih rizika od izloženosti nedovoljno proučenih kemijskih spojeva.

Premda su u novije vrijeme provedena brojna ispitivanja učinaka različitih DES-ova i srodnih otapala na staničnim modelima (Hayyan i sur., 2015; Radošević i sur., 2018; Macário i sur., 2019; Varela Zaroni i sur., 2019; Jung i sur., 2021; Rodríguez-Juan i sur., 2021, Pedro i sur., 2022), toksikološki profil hidrofobnih DES-ova korištenog za ekstrakciju CBD-a u ovom istraživanju potpuno je neistražen i nepoznat jer je riječ o novoj i originalnoj smjesi dviju

sastavnica koje miješanjem daju učinkoviti DES. Zato je trebalo osmisлити i provesti njegova preliminarna biološka, tj. toksikološka ispitivanja. Pitanje je bilo uzrokuje li izloženost stanica u uvjetima *in vitro* toj novoj vrsti DES-a citotoksični učinak te izaziva li značajna oštećenja na razini molekule DNA. Moguće citotoksične i genotoksične učinke povezane s izloženošću DES-u i ekstraktu CBD-a u tom DES-u procijenjivali smo na tri stanične linije pomoću MTS testa i komet-testa. Za procjenu biokompatibilnosti novodizajniranog DES-a izabrane su stanične linije koje se razlikuju po podrijetlu, a time i specifičnim značajkama važnim za testiranje. Budući da su ove stanične linije u određenoj mjeri zadržale svojstva tkiva iz kojih potječu, pretpostavlja se da će se njihovi odgovori na primijenjene tretmane razlikovati, čime će se dobiti potpunija slika o mogućim toksičnim učincima. Pri izboru staničnih modela važnu ulogu ima njihova sposobnost za metaboliziranje kemikalija. U tom smislu, model HepG2 stanica u vrlo je širokoj primjeni za provođenje testiranja biološki aktivnih spojeva čija se djelotvornost može mijenjati uslijed metaboličke transformacije (Žunec i sur., 2016). Uspješno je primijenjen i u testiranjima toksičnosti različitih otapala (Hasspieler i sur., 2006). 1321N1 stanice izabrane su jer su podrijetlom iz živčanog tkiva, koje je ciljno tkivo za djelovanje CBD-a, dok je stanična linija HaCaT u širokoj primjeni kao model za stanice kože, a takav model važan je zbog moguće primjene CBD-a u različitim kozmetičkim proizvodima koji se nanose na kožu. Prednost testiranja na staničnim modelima je da su takve studije jednostavne, jeftine za izvođenje, daju značajnu količinu informacija, mogu se provoditi u kontroliranim uvjetima, ponovljive su i mogu razjasniti brojne mehanizme stanične toksičnosti. Rezultati dobiveni testiranjem u uvjetima *in vitro* mogu biti indirektni pokazatelj mogućih učinaka u uvjetima *in vivo* i primjenu u realne situacije. Metode koje su primijenjene u ovome istraživanju pokazale su se vrlo uspješnim u prethodnim studijama na istim staničnim modelima. Kao što je spomenuto, MTS test se može koristiti za procjenu citotoksičnosti nepoznatih spojeva i smjesa (Kamiloglu i sur., 2020). Zasniva se na praćenju aktivnosti mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze u metaboličkim aktivnim stanicama (Jurič i sur., 2021) i do sada je uspješno korišten u različitim istraživanjima s istim vrstama stanica (Wang i sur., 2009; Nair i sur., 2014; Abdul Rahman i sur., 2014; Chaudhry i sur., 2021). Za procjenu stupnja oštećenja DNA primijenjena je alkalna inačica komet-testa koji osjetljivo otkriva široku paletu oštećenja molekule DNA, a osobito jednonančane lomove u molekuli DNA i lomove na mjestima osjetljivim na djelovanje lužina (Collins, 2004). Ista se metoda također do sada pokazala uspješnom na staničnim linijama koje su bile predmet ovog istraživanja (Valentin-Severin i sur., 2003; Wischermann i sur., 2007; Lawal i Ellis, 2010; Žunec i sur., 2016).

U ovome istraživanju utvrđeno je da izlaganje testiranom DES-u tijekom 24 h utječe na preživljenje stanica tek nakon primjene dva viša volumena i to u 1321N1 stanicama izraženije od ostale dvije vrste stanica. No, prisutnost CBD-a u istim volumenima DES-a imala je većinom povoljan učinak na stanično preživljenje. Važno je naglasiti kako ni otapalo ni ekstrakt nisu izazvali značajna odstupanja u razini primarnih oštećenja DNA u odnosu na kontrolne uzorke. Uzevši u cjelini, ovi rezultati upućuju da, iako oba testirana uzorka u pojedinim pokusnim skupinama pokazuju slaba citotoksična svojstva, oni značajno ne narušavaju integritet DNA u izloženim stanicama. Budući da je ovo preliminarno boistraživanje za procjenu biokompatibilnosti novog DES-a u uvjetima *in vitro*, ne može se dati jednoznačan odgovor na pitanje zašto je nastupilo smanjeno preživljenje stanica zato što u postojećoj literaturi nema objavljenih sličnih podataka. Međutim, s obzirom da su sastavnice DES-a masne kiseline, koje imaju potencijal međudjelovati sa staničnim lipidima, može se pretpostaviti da ispitano otapalo vjerojatno utječe na cjelovitost i funkcionalnost stanične membrane. Nakon ulaska u stanicu, ono može djelovati i na organele koje posjeduju vlastite membrane, primjerice mitohondrije. U literaturi je vrlo dobro dokumentirano da narušavanje funkcije mitohondrija može izazvati staničnu smrt (Lemasters i sur., 1999; Ott i sur., 2007; Maharajan i sur., 2014). Nepostojanje mjerljivih štetnih učinaka na razini DNA, unatoč utvrđenoj niskoj citotoksičnosti može se pripisati vrlo malim testiranim volumenima DES-a te pretpostavci da sastavnice testiranog DES-a nisu reaktivne prema molekuli DNA (Traul i sur., 2000; Johny i sur., 2009; Ruiz-Rico i sur., 2015). Važno je istaknuti da dobiveni rezultati upućuju kako ekstrakt CBD-a u DES-u pridonosi porastu preživljenja 1321N1 stanica te općenito povoljno utječe na smanjenje stupnja oštećenja DNA u svim istraženim staničnim linijama. Takav bi se učinak mogao pripisati zaštitnom, odnosno antioksidacijskom djelovanju CBD-a koje je dokumentirano u literaturi (Petrosino i sur., 2018; Baswan i sur., 2020). Poznato je da sve stanice, bez obzira jesu li bile tretirane ili ne, zbog prirode samih postupaka, koji se tijekom pokusa na njima provode, mogu doživjeti određenu razinu stresa koji se odražava na vrijednosti oba ovdje primijenjenih testova. Usprkos tome, moguće je da su uzorci tretirani ekstraktom imali niže vrijednosti oštećenja DNA od kontrole zato što se tijekom izlaganja u trajanju 24 h pod utjecajem CBD-a u stanici mogu aktivirati različiti zaštitni sustavi koji nisu bili aktivni u netretiranim stanicama.

Zaključno, dobiveni rezultati su obećavajući i daju podatke o sigurnosti primjene testiranog DES-a u okvirima primijenjenih staničnih modela. Također, ova zapažanja mogu se smatrati početnima i potrebno je daljnje istražiti sigurnosni i toksikološki profil drugih i sličnih

kombinacija otapala. Buduća se istraživanja trebaju nastaviti primjenom šireg raspona testova da bi se dobila detaljnija saznanja o mehanizmima njegovog djelovanja na ciljnim mjestima u stanici i mogućim učincima nakon dugotrajnije primjene. S obzirom na to da neki kemijski spojevi mogu biti ne-genotoksični kancerogeni (Hernandez, 2009; Nohmi, 2018), važno je utvrditi posljedice dugotrajnije izloženosti novome otapalu i isključiti njegove moguće učinke nakon duljih vremena izlaganja. Budući da su u ovom eksperimentu korištene tri kontinuirane stanične linije, nastavak istraživanja mogao bi ići u smjeru korištenja različitih drugih staničnih linija, ali i primarnih stanica kao što su limfociti iz periferne krvi. Primjenom limfocita iz periferne krvi trebalo bi dodatno potvrditi za sada uočene zanemarive učinke na razini DNA s pomoću testa kromosomskih aberacija i mikronukleus-testa koji su specifični za taj stanični model, a priznati su od strane međunarodnih regulatornih tijela u području toksikologije (OECD 2016a; OECD 2016b).

5. ZAKLJUČAK

1. Ovim je istraživanjem dobiven ekstrakt CBD-a u hidrofobnom DES-u koji je u usporedbi s kontrolnim uzorkom CBD-a ekstrahiranim u etanolu, pokazao potencijal za istraživanje moguće buduće primjene u medicini i kozmetici. Provođenjem preliminarnih ispitivanja i primjenom tekućinske kromatografije s DAD detektorom pokazano je da optimalna ekstrakcija u laboratorijskim uvjetima provodi s omjerom 1:10 suhog biljnog uzorka i smjese DES-a od dviju hidrofobnih sastavnica te da se provodi 20 minuta na 25 °C jer se dobiva koncentracija CBD-a približno kao i u kontrolnom uzorku.

2. Primjenom spektrofotometrijske metode kao i tekućinske kromatografije s DAD detektorom te statističkom obradom rezultata pokazano je da da uvjeti optimalne ekstrakcije, u kojoj je u konačnom produktu udio CBD-a i ukupnih kanabinoida maksimalan te udio CBN-a, klorofila a i klorofila b minimalan, su vrijeme ekstrakcije od 25 minuta, omjer uzorka i otapala od 1:7,9 do 1:8 i temperatura od 25 °C (faktor poželjnosti = 0,63).

3. Dokazano je da DES utječe na preživljenje stanica tek nakon primjene dva viša volumena i to izraženije kod 1321N1 stanicama u odnosu na ostale dvije vrste stanica /HepG2 i HaCaT). Nadalje, isti volumeni CBD-a u DES-u imali su većinom povoljan učinak na staničnu vijabilnost.

4. Komet-testom dokazano je da isti volumeni čistog DES-a i ekstrakta CBD-a u DES-u ne izazivaju značajna odstupanja u razini primarnih oštećenja DNA u odnosu na kontrolu. Zaključno, ekstrakt CBD-a u ovoj kombinaciji dviju sastavnica koje miješanjem daju učinkoviti DES pokazuje značajan potencijal za daljnja istraživanja i buduću primjenu u kozmetici i medicini.

6. LITERATURA

Abdul Rahman A, Jamal AR, Harun R, Mohd Mokhtar N, Wan Ngah WZ (2014) Gamma-tocotrienol and hydroxy-chavicol synergistically inhibits growth and induces apoptosis of human glioma cells. *BMC Complement Altern Med* **14**, 213. DOI: 10.1186/1472-6882-14-213

Abou-Arab AE, Abou-Arab AA, Abu-Salem MF (2010) Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* bertonii plant. *Afr. J. Food Sci* **4**, 269-281.

Adan A, Kiraz Y, Baran, Y. (2016) Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Curr. Pharm. Biotechnol* **17**, 1213-1221. doi:10.2174/1389201017666160808160513

Ameri A (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobio* **58**, 315-348.

Ashafa AO, Orekoya LO, Yakubu MT (2012). Toxicity profile of ethanolic extract of *Azadirachta indica* stem bark in male Wistar rats. *Asian Pac. J. Trop. Biomed* **2**, 811-817. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60234-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60234-2)

Aslanturk ÖS (2018) *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: Principles, advantages, and disadvantages. U: Larramendy M.L. i Soloneski S., urednici. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. Intech Open Limited: London, UK; Volume 1, 1-17. ISBN 978-1-78923-419-0. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.719231>

Attard TM, Bainier C, Reinaud M, Lanot A, McQueen-Mason SJ, Hunt AJ (2018). Utilisation of supercritical fluids for the effective extraction of waxes and Cannabidiol (CBD) from hemp wastes. *Ind. Crops Prod* **112**, 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.045>

Azqueta A, Shaposhnikov S, Collins A (2011) DNA repair measured by the comet assay. U: Kruman, I., urednik. *DNA Repair*; Intech Open Limited: London, UK; Volume 1, pp. 615-636. ISBN 978-953-307-697-3. DOI: 10.5772/22504

Azqueta A, Collins AR (2013) The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch. Toxicol* **87**, 949-968.

Ban J, Osmak M (1996) Načela proliferacije tumora. Urednici: Turić M, Kolarić K, Eljuga D, urednici. Klinička onkologija, Nakladni zavod Globus, Zagreb, str. 37-55.

Barba JF, Grimi N, Vorobiev E (2015) Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *J. Food Eng* **149**, 222-228. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.10.028>

Batra P, Sharma AK (2013) Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech* **3**, 439-459. DOI: 10.1007/s13205-013-0117-5

Baswan SM, Klosner AE, Glynn K, Rajgopal A, Malik K, Yim S, Stern N. (2020). Therapeutic potential of cannabidiol (CBD) for skin health and disorders. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol* **13**, 927-942. <https://doi.org/10.2147/CCID.S286411>

Bonaccorso S, Ricciardi A, Zangani C, Chiappini S, Schifano F (2019). Cannabidiol (CBD) use in psychiatric disorders: A systematic review. *Neurotoxicology* **74**, 282-298. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.08.002>

Brighenti V, Pellati F, Steinbach M, Marana D, Benvenuti S (2017) Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type *Cannabis sativa* L. (hemp). *J. Pharm. Biomed. Anal* **143**, 228-236. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.049>

CLS (2022) Cell Lines Service: HaCaT cell pellet - 1 million cells. <<https://cls.shop/HaCaT/300493-main-product>>. Pristupljeno 3. srpnja 2022.

Cerino P, Buonerba C, Cannazza G, D'Auria J, Ottoni E, Fulgione A i sur. (2021) A review of hemp as food and nutritional supplement. *Cannabis Cannabinoid Res.* **6**, 19-27. DOI: 10.1089/can.2020.0001

Chaudhry GE, Sohimi N, Mohamad H, Zafar MN, Ahmed A, Sung YY i sur. (2021). *Xylocarpus Moluccensis* induces cytotoxicity in human hepatocellular carcinoma HepG2 cell

line via activation of the extrinsic pathway. *Asian Pac. J. Cancer Prev* **22(S1)**, 17-24. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.S1.17>

Ciolino LA, Ranieri L, Taylor AM (2017) Commercial cannabis consumer products part 2: HPLC-DAD quantitative analysis of Cannabis cannabinoids. *Forensic Sci. Int* **289**, 438-447. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.05.033>

Citti C, Pacchetti B, Vandelli MA, Forni F, Cannazza G (2017) Analysis of cannabinoids in commercial hemp seed oil and decarboxylation kinetics studies of cannabidiolic acid (CBDA). *J. Pharm. Biomed. Analysis* **149**, 532-540. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.11.044>

Collins AR, Dobson VL, Dusinská M, Kennedy G, Stětina R (1997) The comet assay: what can it really tell us? *Mutat. Res* **375**, 183-193. DOI: 10.1016/s0027-5107(97)00013-4

Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol* **26**, 249-261. DOI: 10.1385/1-59259-179-5:163

Collins AR (2009) Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat. Re* **681**, 24-32. DOI: 10.1016/j.mrrev.2007.10.002

Colombo I, Sangiovanni E, Maggio R, Mattozzi C, Zava S, Corbett Y i sur. (2017) HaCaT Cells as a reliable *in vitro* differentiation model to dissect the inflammatory/repair response of human keratinocytes. *Mediators Inflamm.* 2017:7435621. DOI: 10.1155/2017/7435621

De Vita D, Madia VN, Tudino V, Saccoliti F, De Leo A, Messori A i sur. (2020). Comparison of different methods for the extraction of cannabinoids from cannabis. *Natural Prod. Res* **34**, 2952-2958. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1601194>

Design Expert 11 (2022.) Minneapolis, USA,
<https://www.statease.com/software/design-expert/>, Pristupljeno 5. rujna 2022.

Drmić H, Režek Jambrak A (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol* **2**, 22-33.

Dwamena AK (2019) Recent advances in hydrophobic Deep Eutectic Solvents for extraction. *Separations* **6(1)**, 9. <https://doi.org/10.3390/separations6010009>

ECACC (1980) European Collection of Authenticated Cell Culture. Cell line profile: 1321N1 <<https://www.culturecollections.org.uk/media/125051/1321n1-cell-line-profile.pdf>>.

Pristupljeno 3. srpnja 2022.

ECACC (2017) European Collection of Authenticated Cell Culture. Cell line profile: Hep-G2 <<https://www.culturecollections.org.uk/media/134737/hep-g2-cell-line-profile.pdf>>.

Pristupljeno 3. srpnja 2022.

Europska agencija za lijekove, EMA (2022) <https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/epidyolex-epar-product-information_hr.pdf> Pristupljeno 4. svibnja 2022.

Endo Y, Usuki R, Kaneda T (1984). Prooxidant activities of chlorophylls and their decomposition products on the photooxidation of methyl linoleate. *J. Am. Oil Chem. Soc* **61**, 781-784.

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res* **339**, 37-59. DOI: 10.1016/0165-1110(94)00013-3

Fakourelis N, Lee EC, Min DB (1987) Effects of chlorophyll and beta carotene on the oxidation stability of olive oil. *J. Food Sci* **52**, 234-235. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb14018.x>

Foote CS, Denny RW (1968) Chemistry of singlet oxygen quenching by p-carotene. *J. Am. Chem. Soc* **90**: 6233-6235.

Foote CS, Chang YC, Denny RW (1970) Carotenoid quenching parallels biological protection. *J. Am. Chem. Soc* **92**, 5216-5218.

Foster B, Abramovici H, Harris C (2019) Cannabis and cannabinoids: kinetics and interactions. *Am. J. Med* **132**, 1266-1270. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.05.017>

Gerets HH, Tilmant K, Gerin B, Chanteux H, Deplechin BO, Dhalluin S, Atienzar FA (2012) Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol. Toxicol* **28**, 69-87. DOI: 10.1007/s10565-011-9208-4

Giroud C (2002) Analysis of cannabinoids in hemp plants. *Chimia* **56**, 80-83. DOI: [10.2533/000942902777680702](https://doi.org/10.2533/000942902777680702)

Grotenhermen F (2005) Cannabinoids. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **4**, 507-530. <https://doi.org/10.2174/156800705774322111>

Hädener M, König S, Weinmann W (2019) Quantitative determination of CBD and THC and their acid precursors in confiscated cannabis samples by HPLC-DAD. *Forensic Sci. Int* **299**, 142-150. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.03.046>

Marić I (2020) Ulja od konoplje i CBD - glavna razlika, Herbal Therapy d.o.o, <<https://www.herbal-therapy.hr/ulja-od-konoplje-i-cbd-ulja-glavna-razlika/>>. Pristupljeno 21. svibnja 2022.

Hara A, Radin NS (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem* **90**, 420-426. DOI: 10.1016/0003-2697(78)90046-5

Hasspieler B, Haffner D, Stelljes M, Adeli K (2006) Toxicological assessment of industrial solvents using human cell bioassays: assessment of short-term cytotoxicity and long-term genotoxicity potential. *Toxicol. Ind. Health* **22**, 301-315. DOI: 10.1177/0748233706070312

Hayyan M, Looi CY, Hayyan A, Wong WF, Hashim MA (2015) *In vitro* and *in vivo* toxicity profiling of ammonium-based Deep Eutectic Solvents. *PLoS ONE* **10(2)**:e0117934. DOI:10.1371/journal.pone.0117934

Hazenkamp A (2018) The trouble with CBD oil. *Med. Cannabis Cannabinoids* **1**, 165-72. <https://doi.org/10.1159/000489287>

Herceg Z (2011) *Procesi u prehrambenoj industriji*. Zagreb, Plejada d.o.o., 98-101.

Hernandez L G, van Steeg H, Luijten M, van Benthem J. (2009) Mechanisms of non-genotoxic carcinogens and importance of a weight of evidence approach. *Mutat. Res. / Rev. Mutat. Res* **682**, 94-109. DOI:10.1016/j.mrrev.2009.07.002

Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Mavzo V, Mechoulam R (2009) Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol. Sci* **30**, 515 -527.

Jamalzadeh L, Ghafoori H, Sariri R, Rabuti H, Nasirzade J, Hasani H i sur (2016) Cytotoxic effects of some common organic solvents on MCF-7, RAW-264.7 and human umbilical vein endothelial cells. *Avicenna J. Med. Biochem.* <https://doi.org/10.17795/ajmb-33453>

JPI (2022) **Jazz Pharmaceuticals Inc.** (Epidiolex® - cannabidiol. <<https://www.epidiolex.com>> Pristupljeno 4. svibnja 2022.

Johny AK, Baskaran SA, Charles AS, Amalaradjou MA, Darre MJ, Khan MI i sur. (2009) Prophylactic supplementation of caprylic acid in feed reduces *Salmonella enteritidis* colonization in commercial broiler chicks. *J. Food Prot* **72**, 722-727.

Jung D, Back Jung J, Kang S, Li K, Hwang I, Hoon Jeong J i sur.(2021) Toxicometabolomics study of a deep eutectic solvent comprising choline chloride and urea suggests *in vivo* toxicity involving oxidative stress and ammonia stress. *Green Chem* **23**, 1300-1311. <https://doi.org/10.1039/D0GC03927F>

Jurič A, Zandona A, Lovaković B, Rašić D, Pizent A, Kozina G i sur. (2021) Cytotoxic, genotoxic, and oxidative stress-related effects of lysergic acid diethylamide (LSD) and phencyclidine (PCP) in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Arh. Hig. Rada Toksikol* **72**, 333-342. <https://doi.org/10.2478/aiht-2021-72-3604>

Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E (2020) Guidelines for cell viability assays. *Food Front* **1**, 332-349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>

Kar N, Gupta D, Bellare J (2021). Ethanol affects fibroblast behavior differentially at low and high doses: A comprehensive, dose-response evaluation. *Toxicol. Re* **8**, 1054-1066. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.05.007>

Křížek T, Bursová M, Horsley R, Kuchař M, Tůma P, Čabala R i sur. (2018) Menthol-based hydrophobic deep eutectic solvents: Towards greener and efficient extraction of phytocannabinoids. *J. Cleaner Prod* **193**, 391-396. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.05.080>

Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP, Jha AN (2009) Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol. Toxicol* **25**, 53-64. <https://doi.org/10.1007/s10565-007-9043-9>

Lawal AO, Ellis E (2010). Differential sensitivity and responsiveness of three human cell lines HepG2, 1321N1 and HEK 293 to cadmium. *J. Toxicol. Sci* **35**, 465-478. <https://doi.org/10.2131/jts.35.465>

Lemasters JJ, Qian T, Bradham CA, Brenner DA, Cascio WE, i sur. (1999). Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J. Bioenerget. Biomembranes* **31**, 305-319. <https://doi.org/10.1023/a:1005419617371>

Le Hegarat L, Huet S, Pasquier E, Charles S (2020) Impact of solvents on the *in vitro* genotoxicity of TMPTA in human HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro* **69**:105003. DOI: 10.1016/j.tiv.2020.105003

Li T, Xu J, Wu H, Wang G, Dai S, Fan J i sur. (2016) A saponification method for chlorophyll removal from microalgae biomass as oil feedstock. *Mar. Drugs* **14**, 162. <https://doi.org/10.3390/md14090162>

Liao W, McNutt MA, Zhu WG (2009) The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* **48**, 46-53. DOI: 10.1016/j.ymeth.2009.02.016

Luterotti S (2015) Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. <http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm> Pristupljeno 10. lipnja 2022.

Macário IPE, Oliveira H, Menezes AC, Ventura SPM, Pereira JL, Gonçalves AMM i sur. (2019) Cytotoxicity profiling of deep eutectic solvents to human skin cells. *Sci. Re* **9**, 3932. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39910-y>

Maharjan S, Oku M, Tsuda M, Hoseki J, Sakai Y (2014). Mitochondrial impairment triggers cytosolic oxidative stress and cell death following proteasome inhibition. *Sci. Rep* **4**, 5896. <https://doi.org/10.1038/srep05896>

Makoś P, Słupek E, Gębicki J (2020) Hydrophobic deep eutectic solvents in microextraction techniques - A review. *Microchem. J* **152**, 104384, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104384>

Mason JT, Chemat F, Vinatoru M (2011) The extraction of natural products using ultrasound or microwaves. *Curr. Org. Chem* **15**, 237-247. <https://dx.doi.org/10.2174/138527211793979871>

May P (2000) Molecule of the month. <10.6084/m9.figshare.5245597> Pristupljeno 10. lipnja 2022.

Mbous YP, Hayyan M, Hayyan A, Wong WF, Hashim MA, Looi CY (2017) Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering-Promises and challenges. *Biotechnol. Adv* **35**, 105-134. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.006

Mersch-Sundermann, V., Knasmüller, S., Wu, X.J., Darroudi, F., Kassie, F. (2004) Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology* **198**, 329-340. DOI: 10.1016/j.tox.2004.02.008

Mišan A, Nađpal J, Stupar A, Pojić M, Mandić A, Verpoorte R i sur. (2019) The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr* **60**, 2564-2592. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1650717>

Møller P, Azqueta A, Boutet-Robinet E, Koppen G, Bonassi S, Milić M i sur. (2020) Minimum information for reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet

assay procedures and results. *Nat. Proto* **15**, 3817-3826. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0398-1>

Moreno T, Dyer P, Tallon S (2020) Cannabinoid decarboxylation: A comparative kinetic study. *Ind. Eng. Chem. Res* **59**,46,20307-20315. DOI: 10.1021/acs.iecr.0c03791

Nair SV, Hettihewa M, Rupasinghe HP (2014). Apoptotic and inhibitory effects on cell proliferation of hepatocellular carcinoma HepG2 cells by methanol leaf extract of *Costus speciosus*. *Biomed. Res. Int* 2014: 637098. <https://doi.org/10.1155/2014/637098>

Nguyen ST, Nguyen HT, Truong KD (2020) Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines. *Biomed. Res. Ther* **7**, 3855-3859. DOI:10.15419/bmrat.v7i7.614

Nohmi T (2018). Thresholds of genotoxic and non-genotoxic carcinogens. *Toxicol. Res* **34**, 281-290. <https://doi.org/10.5487/TR.2018.34.4.281>

OECD, b (2016) OECD guideline for the testing of chemicals. *In Vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test. <<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264649en.pdf?expires=1657714505&id=id&acname=guest&checksum=FC472D68824E1A13C7195EDF5B45FEB9>> Pristupljeno 5. srpnja 2022.

OECD, b (2016) Test No. 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test. <<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264861en.pdf?expires=1657714476&id=id&acname=guest&checksum=3E12DA838FFBA7393DBFB12282728E5E>> Pristupljeno 5. srpnja 2022.

Olive PL (1999) DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol* **75**, 395-405. DOI: 10.1080/095530099140311

Olive PL, Banáth JP (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc* 1(1), 23-29. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.5>

Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B (2007) Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **12**, 913-922. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2>

Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Duarte ARC (2014) Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century. *ACS Sustain. Chem. Eng* **2**, 1063-1071. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>

Pedro SN, Gomes ATP, Oskoei P, Oliveira H, Almeida A, Freire MG i sur. (2022) Boosting antibiotics performance by new formulations with Deep Eutectic Solvents. *Int. J. Pharm* **616**, 121566. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121566>.

Petrosino S, Verde R, Vaia M, Allarà M, Iuvone T, Di Marzo V (2018). Anti-inflammatory properties of cannabidiol, a nonpsychotropic cannabinoid, in experimental allergic contact dermatitis. *J. Pharmacol. Exp. Ther* **365**, 652-663. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.244368>

Radošević K, Čanak I, Panić M, Cvjetko Bubalo M, Frece J, Gaurina Srček i sur. (2018) Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. *Environ. Sci. Pollut. Res* **25**, 14188-14196. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1669-z>

Radošević K, Železnjak J, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I, Slivac I, Gaurina Srček V (2016) Comparative *in vitro* study of cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents toward fish cell line. *Ecotoxicol. Environ. Saf* **131**, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.05.005>

Raharjo T, Verpoorte R (2004) Methods for the analysis of cannabinoids in biological materials: a review. *Phytochem. Anal* **15**, 79-94. <https://doi.org/10.1002/pca.753>

Ramirez CL, Fanovich MA, Churio MS (2018) Cannabinoids: Extraction methods, analysis, and physicochemical characterization. *Stud. Nat. Prod. Chem* **61**, 143-169. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64183-0.00004-X>

Rodríguez-Juan E, López S, Abia R, Muriana FJG, Fernández-Bolaños J, García-Borrego A (2021) Antimicrobial activity on phytopathogenic bacteria and yeast, cytotoxicity and

solubilizing capacity of deep eutectic solvents. *J. Mol. Liq* **337**, 116343.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116343>

Rojas E, Lopez MC, Valverde M (1999) Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl* **722**, 225-254. DOI: 10.1016/s0378-4347(98)00313-2

Royal Botanical Garden (2017) Plants of the World online.
<<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:306087-2#image-gallery>> Pristupljeno 1. srpnja 2022.

Ruiz Rico M, Fuentes López C; Pérez-Esteve É, Jiménez Belenguer AI, Quiles Chuliá MD, Marcos Martínez MD i sur. (2015) Bactericidal activity of caprylic acid entrapped in mesoporous silica nanoparticles. *Food Control* **56**, 77-85.
DOI:10.1016/j.foodcont.2015.03.016

Rupasinghe H, Davis A, Kumar SK, Murray B, Zheljzkov VD (2020). Industrial hemp (*Cannabis sativa* subsp. *sativa*) as an emerging source for value-added functional food ingredients and nutraceuticals. *Molecules* **25**, 4078.
<https://doi.org/10.3390/molecules25184078>

Russo EB (2011) Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Brit. J. Pharmacol* **163**, 1344–1364. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x>

Scheau C, Badarau I, Mihai L, Scheau A, Costache DO, Constantin C i sur.(2020) Cannabinoids in the pathophysiology of skin inflammation. *Molecules* **25**, 652-675. DOI: 10.3390/molecules25030652

Sahu PK, Rao RN, Cecchi T, Swain S, Patro CS, Panda J (2017) An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *J. Pharm. Biomed. Anal* **147**, 590-611.
<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jpba.2017.05.006>

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res* **175**, 184-191. DOI: 10.1016/0014-4827(88)90265-0

Thermo Fisher Scientific (2022) Introduction to Cell Culture. <<https://www.thermofisher.com/hr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>>. Pristupljeno 5. srpnja 2022.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H i sur. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen* **35**, 206-221. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J)

Traul KA, Driedger A, Ingle DL, Nakhasi D (2000) Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. *Food Chem. Toxicol* **38**, 79-98. DOI: 10.1016/s0278-6915(99)00106-4

van Osch DJ, Zubeir LF, van den Bruinhorst A, Rocha MA, Kroon MC (2015) Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants. *Green Chem* **17**, 4518-4521. DOI: 10.1039/c5gc01451d

van Osch DJ, Carin HJ, Dietz T, van Spronsen J, Kroon MC, Gallucci F i sur. (2019) A search for natural hydrophobic deep eutectic solvents based on natural components. *ACS Sustainable Chem. Eng* **7**, 2933-2942. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b03520>

Valentin-Severin I, Le Hegarat L, Lhuguenot JC, Le Bon A M, Chagnon MC (2003). Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutat. Res* **536**, 79–90. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00031-7](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00031-7)

Valizadehderakhshan M, Shahbazi A, Kazem-Rostami M, Todd MS, Bhowmik A, Wang L (2021) Extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. (Hemp) – Review **11**, 384. <https://doi.org/10.3390/agriculture11050384>

Varela Zanoni B, Brasil Romão G, Andrade RS, Barretto Cicarelli RM, Trovatti E, Galdorfini Chiari-Andrè B i sur. (2019) Cytotoxic effect of protic ionic liquids in HepG2 and HaCat human cells: *in vitro* and *in silico* studies. *Toxicol. Res* **8**, 447-458. <https://doi.org/10.1039/C8TX00338F>

Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A i sur. (2015) The Impact of Food Bioactives on Health: *In vitro* and *ex vivo* models. Springer, London, Ujedinjeno Kraljevstvo. DOI: 10.1007/978-3-319-16104-4

Vutropedija (2021) CBD smola: Kako se koristi, djelovanje i proizvodnja. <<https://vutropedija.com/cbd-smola>> Pristupljeno 9. lipnja 2022.

Wang P, Henning SM, Heber D (2010) Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One* **16**, 5(4):e10202. DOI: 10.1371/journal.pone.0010202

Wang M, Wang Y H, Avula B, Radwan MM, Wanas A, van Antwerp J i sur. (2016) Decarboxylation study of acidic cannabinoids: a novel approach using Ultra-High-Performance Supercritical Fluid Chromatography/Photodiode Array-Mass Spectrometry. *Cannabis Cannabinoid Res* 1;1(1):262-271. DOI: 10.1089/can.2016.0020

Wischermann K, Boukamp P, Schmezer P (2007) Improved alkaline comet assay protocol for adherent HaCaT keratinocytes to study UVA-induced DNA damage. *Mutat. Res. / Genet. Toxicol. Environ. Mutagen* **630**, 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.02.009>

Xue H, Tan J, Li Q, Tang J, Cai X. (2020) Ultrasound-assisted Deep Eutectic Solvent extraction of anthocyanins from blueberry wine residues: optimization, identification, and HepG2 antitumor activity. *Molecules* 25(22):5456. <https://doi.org/10.3390/molecules25225456>

Yao M, Xuan L, Li-Xiu H, An-Zhi W (2019) Extraction solvent affects the antioxidant, antimicrobial, cholinesterase and HepG2 human hepatocellular carcinoma cell inhibitory

activities of *Zanthoxylum bungeanum* pericarps and the major chemical components. *Ind. Crops Pro.* **142**, 111872; <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111872>

Zakon o suzbijanju zlouporabe droga (2019), *Narodne novine* **39**, Zagreb

Zandona A, Katalinić M, Šinko G, Radman Kastelic A, Primožič I, Kovarik Z (2020) Targeting organophosphorus compounds poisoning by novel quinuclidine-3 oximes: development of butyrylcholinesterase-based bioscavengers. *Arch. Toxicol* **94**, 3157-3171. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02811-5>

Žunec S, Kašuba V, Pavičić I, Marjanović AM, Tariba B, Milić M i sur. (2016) Assessment of oxidative stress responses and the cytotoxic and genotoxic potential of the herbicide tembotrione in HepG2 cells. *Food Chem. Toxicol* **94**, 64-74. DOI: 10.1016/j.fct.2016.05.019

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Martin Češi izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis