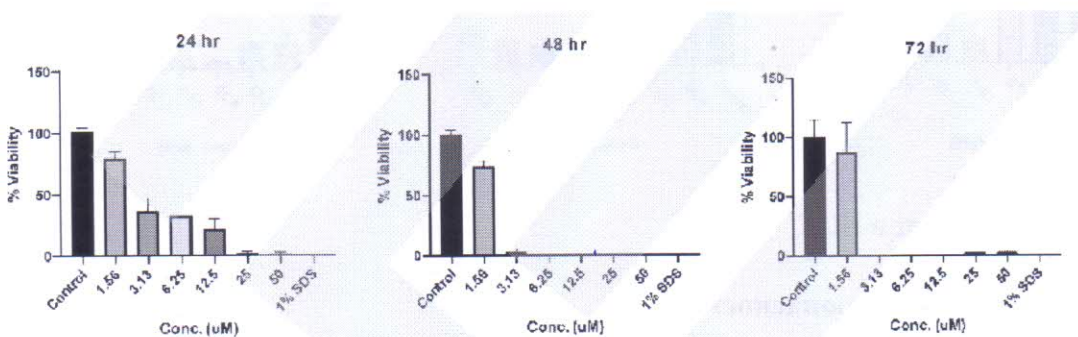


## Цитотоксична оценка на хидрогениран CBD (H4CBD) в първични човешки клетки

Хидрогенираният канабидиол (H4CBD), използван в предклинични инвитро проучвания, е синтезиран в лаборатории *Colorado Chromatography* (Паркър, Колорадо). Изследването е проведено в лаборатории *Charles River* в Кливланд, Охайо. Първични нормални човешки белодробни фибробласти (НЧБФ), първични човешки невронни стволови клетки (НСК) и първични човешки хепатоцити бяха култивирани и изложени на H4CBD. Освен това бе проведен (hERG) тест, за да се определи ефектът по отношение на сърдечните аритмии.

### Цитотоксичност

**Анализ на клетъчната жизнеспособност с помощта на нормални първични човешки белодробни фибробласти:** Анализът на клетъчната жизнеспособност се използва за измерване на клетъчната метаболитна активност като индикатор за клетъчна жизнеспособност, пролиферация и цитотоксичност. Луминесцентният тест за клетъчна жизнеспособност *CellTiter-Glo®* е хомогенен метод за определяне на броя на жизнеспособните клетки в културата въз основа на количественото определяне на наличния аденозинтрифосфат (АТФ) – индикатор за метаболитно активни клетки. Хидрогенираният канабидиол (H4CBD) беше сравнен с отрицателна контрола (1% ДМСО) и положителна контрола (1% натриев додецил сулфат в среда), тестван при крайна концентрация, варираща от 1.56 до 50  $\mu\text{M}$ . Хидрогенираният канабидиол (H4CBD) във всички степени на концентрация за 24 часа показва по-добра жизнеспособност на клетките в сравнение с положителната контрола. Значителна цитотоксичност обаче се наблюдава при степени на концентрация над 1,56  $\mu\text{M}$  и почти пълна загуба на жизнеспособност на клетките при по-висока концентрация и повишено време на излагане – 48 и 72 часа, както е показано във Фигура 1.

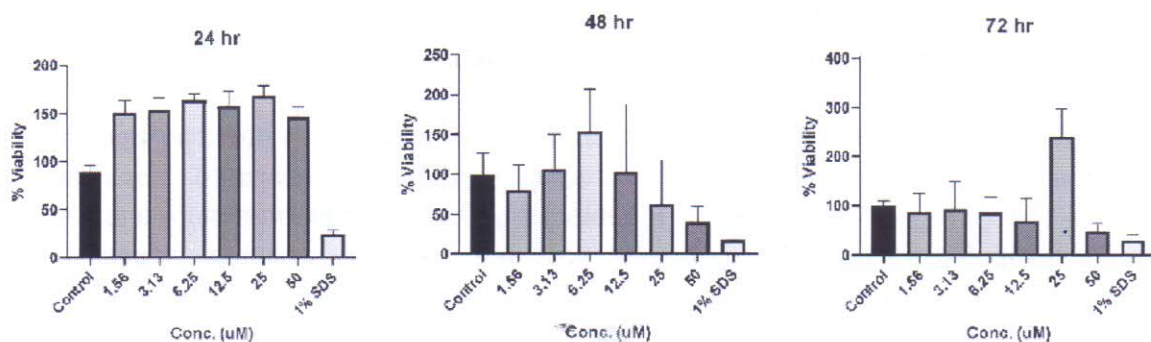


Фигура 1: Цитотоксичност в НЧБФ

**Анализ на клетъчната жизнеспособност с помощта на човешки хепатоцити:** Подобно на процедурата с белодробните фибробласти, бе използван високочувствителният на АТФ луминесцентен тест за клетъчна жизнеспособност *CellTiter-Glo®* за определяне на потенциала за инвитро чернодробна токсичност на хидрогенирания канабидиол (H4CBD). Хидрогенираният канабидиол (H4CBD) не показва значителен спад в жизнеспособността на клетките. Данните сочат, че H4CBD дава по-добър и по-благоприятен резултат от положителната контрола (1% натриев додецил сулфат в среда), както е изложено във Фигура

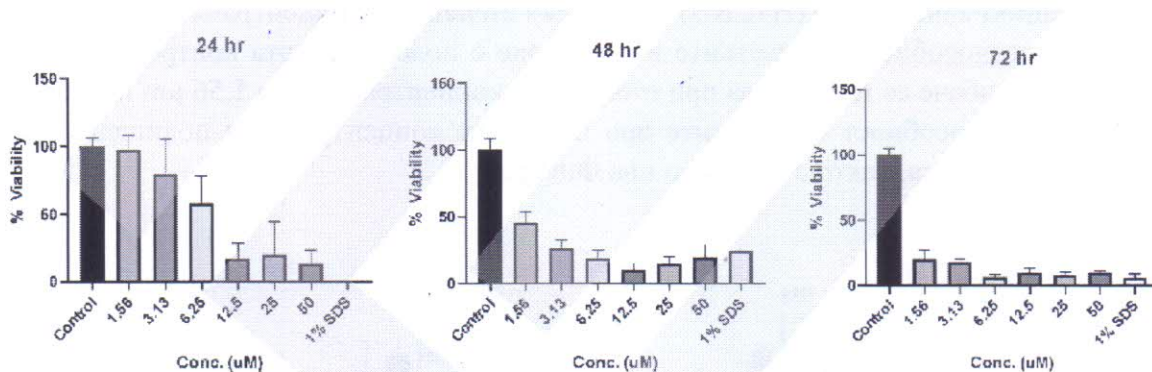


2. Резултатите показват, че няма статистически значим спад в жизнеспособността на хепатоцитите.



Фигура 2: Цитотоксичност в хепатоцити

**Анализ на клетъчната жизнеспособност с помощта на първични човешки невронни стволови клетки (НСК):** Подобно на процедурата с белодробните фибробласти и човешките хепатоцити, бе използван високочувствителният на АТФ луминесцентен тест за клетъчна жизнеспособност *CellTiter-Glo®* за определяне на потенциала на инвитро първични човешки невронни стволови клетки (НСК) в хидрогениран канабидиол (Н4CBD). Хидрогениран канабидиол (Н4CBD) показва по-добри резултати във всички концентрации в сравнение с положителната контрола (1% натриев додецил сулфат в среда) за 24 часа. Загуба на клетъчна жизнеспособност се наблюдава при концентрация от 6,25  $\mu\text{M}$  и по-висока за 24 часа. За 48 и 72 часа се наблюдава сериозна загуба на клетъчна жизнеспособност.



Фигура 3: Цитотоксичност в НСК

### Инвитро тест за сърдечна безопасност

**Оценка на действието на hERG с помощта на patch clamp анализ.** През цялия процес на разработка на лекарства един от най-честите нежелани странични ефекти, водещи до неуспех, са сърдечните аритмии. Този неуспех е свързан най-вече с възможността на лекарството да инхибира сърдечния калиев канал hERG. Потискането на действието на hERG причинява удължаване на QT интервала, което води до потенциално фатална камерна тахиаритмия, наречена *Torsade de Pointes*. За оценка на очакваните сърдечно-съдови ефекти, ранна оценка на hERG токсичността се препоръчва от регулаторните агенции като Американската агенция по храните и лекарствата (FDA) и Европейската агенция по лекарствата (EMA).

Handwritten signature and official stamp of the National Center for Drug Research and Development (Национален център за изследвания и разработка на лекарства).

Ефектът на хидрогенирания канабидиол (Н4CBD) върху клонирани калиеви канали hERG (кодирани от ген KCNH2 и изразени в клетки HEK293) бе изследван с помощта на *QPatch II*® (*Sophion Bioscience A/S*, Дания) – автоматична паралелна *patch clamp* система. Хидрогениран канабидиол (Н4CBD) бе изложен на hERG при 0,0625, 0,125, 0,625, 1,25, 6,25, 12,5, 25 и 50  $\mu\text{M}$  ( $n \geq 3$ ). Продължителността на излагане на всяка степен на концентрация на тестваното вещество бе минимум три (3) минути. Данните от положителната контрола потвърдиха чувствителността на тестовите системи към инхибиране на йонния канал.

Резултатите показват, че хидрогенираният канабидиол (Н4CBD) не блокира кодиращите hERG канали, изразени в клетки HEK293, до над 1.25  $\mu\text{M}$ . За да се определи дали Н4CBD засяга други канали, бяха проведени анализи Cav1.2 и Nav1.5. Резултатите показаха, че Н4CBD инхибира калциевите Cav1.2 и натриевите Nav1.5 канали по същия начин както калиевите канали hERG, както е показано в таблици 1-3. Ефектът на деполяризация и реполяризация чрез тези канали води до нетно нулево инхибиране.

**Таблица 1: Влияние на Н4CBD върху йонния канал hERG**

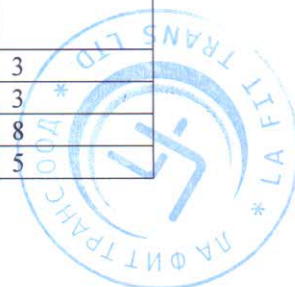
Тествано вещество	IC50 ( $\mu\text{M}$ )	Концентрация ( $\mu\text{M}$ )	% инхибиране на hERG	Стандартно отклонение	Стандартна грешка	n
Н4CBD	<6.25	0.0625	7.1	4.3	1.6	7
		0.125	15.5	7.0	4.0	3
		0.625	38.0	5.9	3.4	3
		1.25	64.7	9.7	3.4	8
		6.25	100.0	0.3	0.1	9
		12.5	99.6	1.0	0.3	9
		25	100.0	0.2	0.1	5
		50	98.1	3.7	1.6	5
Цизаприд (положителна контрола)		0.05	66.5	2.2	1.1	4

**Таблица 2: Влияние на Н4CBD върху йонния канал Cav1.2**

Тествано вещество	IC50 ( $\mu\text{M}$ )	Концентрация ( $\mu\text{M}$ )	% инхибиране на Cav1.2	Стандартно отклонение	Стандартна грешка	n
Н4CBD	<6.25	0.0625	3.0	3.9	2.2	3
		0.125	8.4	5.8	3.4	3
		0.625	24.4	3.5	2.0	3
		1.25	36.7	7.3	3.0	6
		6.25	97.1	2.8	1.4	4
		12.5	97.8	3.1	1.3	6

**Таблица 3: Влияние на Н4CBD върху йонния канал Nav1.5**

Тествано вещество	IC50 ( $\mu\text{M}$ )	Концентрация ( $\mu\text{M}$ )	% инхибиране на Nav1.5	Стандартно отклонение	Стандартна грешка	n
Н4CBD	<6.25	0.0625	5.0	3.7	2.1	3
		0.125	1.7	1.9	1.1	3
		0.625	20.7	6.9	2.4	8
		1.25	27.8	7.5	3.3	5





		6.25	70.0	8.8	3.6	6
--	--	------	------	-----	-----	---

## Заклучение

Хидрогенираният канабидиол (H4CBD), синтезиран от лаборатория *Colorado Chromatography*, показва, че не е цитотоксичен при анализ на клетъчната жизнеспособност на човешки хепатоцити. Показва по-добри резултати от положителната контрола по отношение на клетъчната жизнеспособност в НЧБФ и НСК. Продължителното излагане и увеличаването на концентрацията доведе до значителна и в някои случаи пълна загуба на клетъчна жизнеспособност. Анализите на hERG, Cav1.2 и Nav1.5 показаха, че H4CBD инхибира по еднакъв начин трите йонни канала. При еднакво инхибиране, деполяризация и реполяризация, дава нетен нулев потенциал. Това показва, че H4CBD не дава проблеми по отношение на сърдечната безопасност.

*Долуподписаната Мариела Василева Боянова удостоверявам верността на извършения от мен превод от английски на български език на приложения документ. Преводът се състои от 4 (четири) страници.*

*Преводач: Мариела Василева Боянова*

