

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky

**Využití mikrosatelitů (simple sequence repeat, SSR) pro studium genotypové variability ilegálně pěstovaného *Cannabis sativa* var. *indica* pro forenzní použití**

Microsatellites (simple sequence repeat, SSR) as a tool for detecting genotypic variability of illegal cultivation of the *Cannabis sativa* var. *indica* in forensic examination

**Bakalářská práce**

Autor: **Ilona Vaculíková**

B1101 – Matematika, Matematika - Biologie

Vedoucí práce: **RNDr. Radim J. Vašut, Ph.D**

Prezenční

Olomouc, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího práce.  
Uvedla jsem všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpala, do seznamu literatury.

V Olomouci dne

.....

Ilona Vaculíková

## **Poděkování**

Mé velké poděkování patří RNDr. Radimu J. Vašutovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, ochotu a čas při zpracování této práce. Chtěla bych také poděkovat své rodině, přátelům a blízkým za podporu.

## **Bibliografická identifikace**

**Jméno a příjmení autora:** Ilona Vaculíková

**Název práce:** Využití mikrosatelitů (simple sequence repeat, SSR) pro studium genotypové variability ilegálně pěstovaného *Cannabis sativa* var. *indica* pro forenzní použití

**Typ práce:** bakalářská

**Pracoviště:** Katedra botaniky PŘF UP

**Vedoucí práce:** RNDr. Radim J. Vašut, Ph.D.

**Rok obhajoby práce:** 2018

### **Abstrakt**

Tato bakalářská práce se zabývá druhem *Cannabis sativa* a využitím mikrosatelitů pro studium genotypové variability ilegálně pěstovaného *Cannabis sativa* var. *indica* pro forenzní použití. V první části práce je zpracovaná literární rešerše, která zahrnuje taxonomickou charakteristiku, využití konopí, léčivé účinky, obsahové látky, trestní problematiku atd. Druhý celek je věnován praktické části, do které patří extrakce DNA, molekulární markery, PCR reakce, gelová elektroforéza a fragmentační analýza. Analýzy jsme prováděli na usušených listech konopí, anebo na již vyextrahovaných vzorcích konopné DNA ze zátahů Policie České republiky. Ověřovali jsme, zdali publikované primery fungují i v našich laboratorních podmínkách.

**Klíčová slova:** konopí, marihuana, mikrosatelity, PCR

**Počet stran:** 45

**Počet příloh:** 2

**Jazyk:** český

## **Bibliographic identification**

**Author's first name and surname:** Ilona Vaculíková

**Title of thesis:** Microsatellites (simple sequence repeat, SSR) as a tool for detecting genotypic variability of illegal cultivation of the *Cannabis sativa* var. *indica* in forensic examination

**Type of thesis:** Bachelor's diploma thesis

**Department:** Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc

**Supervisor:** RNDr. Radim J. Vašut, Ph.D.

**The year of presentation:** 2018

### **Abstract**

This bachelor thesis concerns with *Cannabis sativa* taxon and microsatellites as a tool for detecting genotypic variability of illegal cultivation of the *Cannabis sativa* var. *indica* in forensic examination. In the first part of the thesis there is prepared a literary research which includes taxonomic characteristics, use of cannabis, healing effects, content substances, criminal problems etc. The second part is dedicated to the practical part, which includes the extraction of DNA, molecular markers, PCR, gel electrophoresis and fragmentation analysis. Analyzes were performed on *cannabis* dry leaves or already dispatched DNA samples from hemp seizures of the Police of the Czech Republic. We verified that the published primers work well in our lab conditions.

**Keywords:** cannabis, marijuana, microsatellites, PCR

**Number of pages:** 45

**Number of appendices:** 2

**Language:** Czech

# Obsah

1. Úvod.....	9
1.1. Cíle práce.....	9
1.2. Taxonomická charakteristika <i>Cannabis sativa</i> .....	9
1.3. Využití konopí.....	9
1.3.1. Historie používání člověkem.....	10
1.3.2. Současné používání různými etniky .....	10
1.4. Léčivé účinky a působení na lidský organismus .....	11
1.5. Obsahové látky .....	13
1.6. Endokanabinoidní systém.....	16
1.7. Distribuce a ukládání THC.....	16
1.8. Zdravotní souvislosti s užíváním drog.....	17
1.9. Trestní problematika konopí .....	18
1.9.1. Zákony .....	18
1.9.2. Zneužívání drog v České republice.....	19
2. Metodika .....	21
2.1. Povolení k práci s ilegálním materiálem .....	21
2.2. Rostlinný materiál .....	21
2.3. Molekulární analýzy .....	22
2.3.1. Extrakce DNA z usušených listů konopí setého ( <i>Cannabis sativa</i> L.).....	22
2.3.2. Molekulární markery .....	23
2.3.3. PCR reakce .....	24
2.3.4. Gelová elektroforéza .....	26
2.3.5. Fragmentační analýza .....	27
3. Výsledky .....	29
3.1. Extrakce DNA.....	29
3.2. Test anelingové teploty gradientem.....	31
3.3. Gelová elektroforéza gradientu.....	32
3.4. Fragmentační analýza.....	34
4. Didaktická analýza odborného tématu.....	35
5. Diskuse .....	36
5.1. Extrakce DNA.....	36
5.2. Test anelingové teploty gradientem.....	36
5.3. Gelová elektroforéza gradientu.....	36
5.4. Fragmentační analýza.....	36

6. Závěr.....	38
7. Literatura.....	39
8. Přílohy .....	44

# 1. Úvod

Konopí seté (*Cannabis sativa L.*) je zajímavá rostlina jak z historického, tak i moderního pohledu. Druh je člověkem využíván od pravěku, v moderní době je rostlina používána v průmyslu, medicíně, kosmetice, ale novodobou společností je spíše chápána a také zneužívána jako psychotropní droga. V mnoha zemích je proto pěstování a přechovávání konopí zakázáno, nebo upraveno striktními zákony.

Boj s ilegálním pěstováním je o to těžší, jelikož neexistuje jednoznačná metoda, která by určila, zdali jsou si vzorky z různých míst genotypově podobné. Tímto způsobem by se daly provázat sítě distributorů, což je cílem mnohých laboratoří po celém světě. Možným řešením by mohlo být využití molekulárních markerů pro porovnání pěstovaných klonů, případně jejich identifikaci. V některých zemích, jako je např. Spolková republika Německo, byly úspěšně použity tzv. mikrosatelity.

## 1.1. Cíle práce

Nedovolená konzumace a pěstování konopí je v dnešní době ožehavým tématem. Navzdory jeho širokému využití, především kvůli intoxikačním vlastnostem je pěstování a přechovávání rostliny zakázáno v mnoha zemích. Nicméně i zákonem povolené pěstování konopí pro vlákno, oleje nebo léčiva, může znamenat bezpečnostní problém, jakožto zástěrku pro ilegální drogový obchod, nebo poskytovat prostor pro krádež takto pěstovaných rostlin, posléze prodávaných jako drogy. Dalším problémem může být kontaminace rostlin takto pěstovaných pylem z druhů pěstovaných jako drogy (Howard et al. 2008).

Cílem této bakalářské práce bylo získat obecný přehled o problematice zneužívání konopí v Česku. V praktické části bylo cílem testovat molekulární markery, tzv. mikrosatelity, které byly v minulosti úspěšně použity pro genotypovou diferenciaci konopí s vysokým obsahem THC v sousedních státech, především Německu. Cílem práce bylo testování možného použití podobné primerové kombinace na materiálů pocházejícího z českých pěstíren.



## 1.2. Taxonomická charakteristika *Cannabis sativa*

Konopí seté (*Cannabis sativa* L.) je jednoletá dvoudomá dvouděložná rostlina z čeledi konopovité - *Cannabaceae* (Byng et al. 2016). Slovo *cannabis* vzniklo složením dvou slov *canna*, což v latině znamená třtina nebo rákos (Dupal 2010) a *bis* pochází pravděpodobně z hebrejského výrazu *bosm* a znamená aromatický (Booth 2004). Předpokládaný původ druhu je ve střední a západní Asii a Indii, v ČR je druh nepůvodní (José 2016, Moudrý & Stražil 1996). Rostlina dosahuje výšky od 0,3 do 5,0 m, kvete od července do srpna. Samčí květy vytváří ve vrchní části stonku latovité květenství, samičí květy tvoří okvětí ve tvaru kápě, v úžlabí listů, kde je nalezneme v hustém, olistěném lichoklasu po 1-2. Plodem jsou 3-5 mm dlouhé nažky (Schönfelder & Schönfelder 2010).

V obecné rovině jsou známy tři taxony konopí, které bývají hodnoceny na úrovni variety až samostatného druhu (Honzík et al. 2012, José 2016). Základní členění je dle obsahu psychoaktivních látek kanabinolů, především tetrahydrokanabinolu (delta-9-tetrahydrokanabinol, THC). Rostliny s nízkým obsahem THC, které planě rostou v teplejších oblastech střední a východní Evropy a Ruska se označují jako *Cannabis ruderalis* JANISCH. (konopí rumištní). Jedná se o jednoletý plevel, který také vzácně zplaňuje v ČR. Taxon byl objeven a popsán Dmitrijem E. Janiševskim v roce 1924 (Ruman 2014).

Rostliny s vysokým obsahem THC jsou označovány jako *Cannabis sativa* L. (konopí seté). Jedná se o rostliny statného vzrůstu (uvádí se až 3,5 metru). Rostliny s velmi vysokým obsahem THC a výraznou produkcí pryskyřice bývají tradičně označovány jako *Cannabis indica* LAM. Taxonomie skupiny *Cannabis sativa* je komplikovanější a současné studie ukazují, že se jedná pravděpodobně o jediný druh, který je možné rozdělit na 2 poddruhy, tj. *Cannabis sativa* subsp. *sativa* (tj. rostliny s nízkým obsahem THC) a *Cannabis sativa* subsp. *indica* (tj. rostliny s vysokým obsahem THC), přičemž *C. ruderalis* není rozlišován jako samostatný taxon, ale představuje selekci *C. sativa* subsp. *sativa* a jeho křížence (McPartland & Guy 2017). Pro forenzní praxi tak zůstává podstatné to, že je rozlišován taxon s nízkým obsahem THC (*Cannabis sativa* s. str.) a taxon s vysokým obsahem THC (označován jako *Cannabis sativa* var. *indica*, resp. nověji jako *C. sativa* subsp. *indica*).

## 1.3. Využití konopí

Konopí je jednou z nejzajímavějších rostlin jak z hlediska historie, tak i současnosti. Historie využití konopí člověkem je obsáhlá a zahrnuje léčebné obřady, šamanské rituály, výrobu provazů, textilií atd. Mnoho z historie zůstalo zachováno, mnohé se stalo předmětem výzkumu. Avšak bohužel se této rostliny začalo zneužívat díky svým psychotropním vlastnostem.

### 1.3.1. Historie používání člověkem

U Dogonů, což je etnikum žijící na útesu Bandiagara v Mali, se traduje legenda o mimozemšťanech, kteří sestoupili na zem a dali obyvatelům velkolepé informace z oblasti biologie a matematiky. Těmto mimozemšťanům začali říkat Nommo neboli „Páni vod“. Právě oni totiž Dogonům z jejich Psí hvězdy přinesli konopí, které se pak užívalo při oslavách po celý rok (Ruman 2014).

Z období paleolitu se dochovaly první zmínky o šamanismu. Šamani pro vyvolání stavu transu využívali odpradávná různé psychoaktivní drogy, k nimž patřilo i konopí. Právě díky šamanům se objevily farmakologicky účinné rostliny (Rätsch 1998). Příkladem může být Nepál. V Nepálu šamani uctívají boha Šivu („král konopí“; Storl 1988), který objevil dle pověsti konopí a vysadil ho v Himálaji. Šaman, který je pověřený Šivou, může pomocí kouření konopí vytvořit velmi účinnou medicínu, popřípadě po vypití konopného mléka upadnout do transu, díky čemuž může uskutečnit léčebný rituál (Gruber 1991).

Fyzické důkazy využití konopí člověkem pocházejí z archeologických nálezů. Nejstarší nálezy pocházejí z dob raných zemědělců. Na neolitickém nalezišti v durynském Eisenbergu (Německo) byla nalezena konopná semínka spolu se zbytky keramiky, která byla datována cca 5500 let př. Kr. Podobně byla nalézána konopná semínka na dalších neolitických nalezištích ve Švýcarsku, Rakousku a Rumunsku (Renfrew 1973). Konopné produkty se již před 3500 lety kouřily v Bavorsku, což dokazují nálezy zbytků hliněných dýmek v hrobkách (Probst 1996).

Pro čínské obyvatelstvo bylo konopí obzvláště užitečné, jeho vlákna využívali k výrobě provazů, sítí a textilií (Rätsch 1998), nehledě na to, že se díky pěstování konopí objevil papír, který byl v severní Číně první na světě (Li 1974). K zahánění zlých duchů, kteří přinášeli nemoci se využívalo zdřevnatělých stonků konopí, do kterých se vyřezával had, vinoucí se kolem žezla (Rätsch 1998).

Pro Taoisty bylo konopí spolu s omějem a náprstníkem jednou z nejdůležitějších přísad do „elixíru nesmrtelnosti“ (Cooper 1984).

Sušené plody konopí se používaly v tradiční japonské medicíně, pod názvy: Mašinin, Kamanin nebo Taimanin. Mašinin byl užíván především pro své hydratační účinky (Namba 1980). V Japonsku se využívalo i konopné pryskyřice, která tišila bolest, popřípadě uvedla pacienta do medicínské hypnózy (Kimura et al. 1978).

### 1.3.2. Současné používání různými etniky

Konopí seté má velké využití. Z vlákna se vyrábí papír, stavební izolace, lisované termoplastické dílce pro automobilový průmysl a další věci. Díky trvanlivosti, prodyšnosti a tepelně izolačním vlastnostem konopí je textilní produkce předmětem výzkumu. Těchto kvalit lze využít jak v klasické výrobě, tak i při produkci speciálních textilií, či netextilních výrobků. Konopné semeno se začíná

uplatňovat v chemickém a potravinářském průmyslu (Tošovská & Buchtová 2010). Produkci konopí setého od roku 2005 do roku 2010 v hektarech ukazuje **Tab. 1**.

**Tab. 1:** Pěstování konopí setého v zemích EU od roku 2005 do roku 2010, zdroj: Informace Komise EU pro len a konopí

Země	Osevní plocha v ha				
	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10
Belgie	0	0	0	0	0
Česká republika	158	1 086	1 530	518	142
Dánsko	39	1	44	0	58
Německo	1 985	1 233	824	896	1 197
Estonsko	-	0	0	0	0
Španělsko	853	3	0	0	0
Francie	9 315	7 303	8 800	6 187	11 326
Itálie	157	236	404	263	0
Litva	-	0	0	5	136
Lotyšsko	-	0	0	0	0
Maďarsko	277	198	0	0	0
Nizozemsko	49	16	118	274	886
Rakousko	342	546	500	52	40
Polsko	129	762	1 081	987	452
Portugalsko	0	0	0	0	0
Slovensko	0	0	0	0	0
Finsko	0	75	5	0	0
Slovinsko	0	0	0	0	0
Velká Británie	1 274	1 671	0	1 362	307
Švédsko	0	0	820	0	0
Rumunsko	-	-	73	0	0
<b>Celkem</b>	<b>14 577</b>	<b>13 130</b>	<b>14 199</b>	<b>10 544</b>	<b>14 544</b>

„V Japonsku se z kůry stvolů vytváří vlákna pro konopné plátno, z vnitřního dřeva stvolů se vyrábí uhlí pro kapesní ohřívače a práškové uhlí pro výrobu střelného prachu. Konopný olej se získává lisováním semen a užívá se k barvení, utěšňování apod.“ (Kimura et al. 1978).

V Nepálu se pomocí přípravků z konopí léčí téměř většina onemocnění (Singh et al. 1979) dále se v horských oblastech semena nakládají, aby se dala používat celý rok. Konopný olej lisovaný ze semen se používá pro pečení (Malla et al. 1982).

#### 1.4. Léčivé účinky a působení na lidský organismus

Konopí je využíváno v léčitelství již více než 6000 let (Rätsch 1998). „Skutečnost je taková, že konopí lze užívat pro léčebné účely a může uškodit, pokud ho neužíváme inteligentním způsobem.“ (Backes

2016) Ke kouření a pro léčebné účinky, se využívají převážně samičí rostliny, jelikož v jejich květu je největší množství THC (José 2016). Kromě pryskyřice sušených listů a květů, se k léčbě dá využít i mladá rostlina. V její čerstvě vymačkané šťávě nalezneme vitamíny (A, B, C, E) a minerály a je výborná pro své detoxikační účinky. Při bolesti kloubů se doporučuje přiložit obklad s konopným kořenem. Na podporu imunity, proti trávicím obtížím, ekzémům, hyperaktivitě či artritidě je výborný konopný olej, který je obsažen v semenech a neobsahuje žádné omamné látky (Ruman 2014).

Konopí je zajímavé také z lékařského hlediska, a právě proto je častým předmětem výzkumu. Surový extrakt konopí obsahuje látku, která má antibakteriální účinky na gram pozitivní mikroorganismy, konkrétně vykazoval baktericidní účinky na *Staphylococcus aureus*. Aktivní látkou v tomto případě byla kyselina kanabidiolová (Krejčí & Šantavý 1955, Kabelík et al. 1955).

Podle Watt & Karl (2017) je cannabidiol (CBD) potenciální multifunkční léčebná možnost pro boj s Alzheimerovou chorobou, a to vzhledem ke svým *in vitro* neuroprotektivním, protizánětlivým a antioxidačním vlastnostem. CBD totiž dokáže snížit reaktivní gliózu, neurozánětlivou odezvu a podporovat neurogenезi. Velmi důležitým faktem je i to, že CBD dokáže zvrátit a zabraňuje vzniku kognitivních deficitů u modelů hlodavců. CBD navíc může antagonizovat psychoaktivní účinky THC, což dokazuje kombinovaná terapie CBD a THC.

Dále CBD uvolňuje křeče, potlačuje nevolnost a působí eliminačně na nádorové buňky (José 2016). Působení cannabidiolu v lidském těle shrnuje tabulka (**Tab. 2**).

**Tab. 2:** Působení cannabidiolu (CBD) v lidském těle. Převzato a upraveno z (Ruman. M, 2014).

část těla	účinky
mozek	antipsychotický, antidepressivní, proti úzkostem, antioxidační, neuroprotektivní
žaludek	antiemetický, regulace chuti k jídlu
ruce	působí proti bolesti při revmatické artritidě
oči	snižuje nitrooční tlak při zeleném zákalu
srdce	chrání před kornatěním tepen a ischemickou chorobou srdeční
střeva	působí proti křečím a zánětům
nohy	stimuluje růst kostí a posiluje kosti zasažené osteoporózou

Zatím se zdá, že endokanabinoidy pomáhají udržovat homeostázi, vyrovnáváním nerovnováh způsobených nemocemi či poraněními. Další hypotézou je to, že obsah endokanabinoidů v krvi může být zodpovědný za práh bolesti v různých částech těla. Díky tomu by mohly pomoci při léčbě fibromyalgie, roztroušené sklerózy, neuropatické bolesti či zánětu (Backes 2016).

Ve světě se již běžně užívají přípravky na bázi konopí – v konkrétním případě agonisté cannabinoidních receptorů – tzv. dronabinol, registrovaný v USA jako Marinol, nebo nabilon, na trhu dostupný jako Cesamet (prodáváný firmou Eli Lilly a Co.). Slouží jako léčiva pro zvýšení chuti k jídlu u pacientů s rakovinou léčenými cytostatiky a potlačení zvracení. Přípravek Sativex (GW Pharmaceuticals plc.) je ústní sprej skládající se ze směsi cannabidiolu a THC, který se užívá u roztroušené sklerózy nebo k potlačení neuropatických bolestí (Miovský et al. 2008).

V lékařské praxi se již také využívá přípravek Acomplia (SanofiAventis), který obsahuje rimonabant, fungující jako antagonist cannabinoidních receptorů. Užívá se k léčbě kardiovaskulárních rizikových faktorů u diabetes a obezity (Miovský et al. 2008).

## 1.5. Obsahové látky

Obsahové látky konopí mají pro člověka velký význam. Přestože studium těchto látek u konopí není jednoduché, je poměrně dobře objasněno (Lehmann 1995). Z 533 zjištěných látek (ElSohly & Slade 2005) jsou společensky nejvýznamnější psychoaktivní látky, které mají obecně 4 složky. Ty se vyskytují především v pryskyřici, která je nejvíce produkována v květenstvích samičích rostlin, v menší míře je pak nerovnoměrně přítomna v pletivu dalších částí rostlin (stonek, listy, semena atp.) (Rätsch 1998)

Těmito čtyřmi základními složkami, které způsobují psychoaktivní účinky konopí (Murphy & Bartke 1992, Rätsch 1998), jsou:

- **cannabinoidy** – v konopí lze najít více než 100 cannabinoidních sloučenin (Miovský et al. 2008)
- **delta-9-tetrahydrocannabinol (THC)** – trans-THC je psychoaktivní, kdežto cis-THC není (Smith & Kempfert 1977)
- **cannabidiol (CBD)**
- **cannabinol (CBN)**.

Bylo také objeveno dalších 60 sloučenin cannabinoidů s žádnými nebo mírnými psychoaktivními účinky (Rätsch 1998). Látková přeměna cannabinoidů probíhá převážně v játrech a v menším množství též v plicích (Miovský et al. 2008).

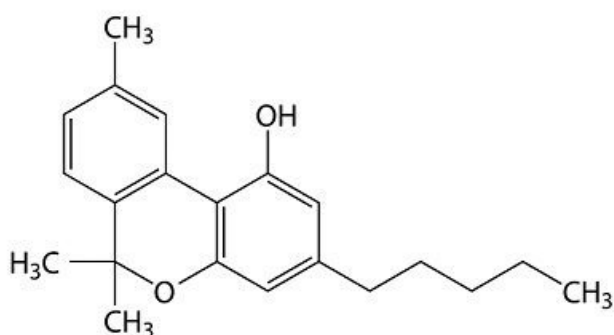
V pryskyřici lze najít mnoho éterických olejů – caryophyllen, humulen, farnesen, selinen, phellanren, limonen), cukry, flavonoidy, alkaloidy (cholin, trigonellin, piperidin, betain, prolin, neurin,

hordenin, cannabistatin) a také chlorofyl, které ale nemají žádný efekt na psychoaktivní účinky konopí (Rätsch 1998).

Další důležitá potenciálně léčebná izolovaná kanabinoidní látka byl cannabigerol (Gaoni et al. 1964). Jedná se o třetí nejčastější cannabinoid, který se nachází v konopí, má analgetické vlastnosti a není psychoaktivní (Backes 2016). Studie z roku 2012 (Bowles et al. 2012) prováděná na myších ukazuje pozitivní léčebné účinky v případě syndromu dráždivého tračníku (IBS, Irritable Bowel Syndrome), který je u lidí neléčitelný. Vzápětí byl izolován i cannabinoid cannabichromen (Claussen et al. 1966, Gaoni & Mechoulam 1966) nebo i cannabicyclol (Crombie & Ponsford 1968).

V roce 1896 se poprvé podařilo identifikovat aktivní látku z pryskyřice konopí indického britským vědcům (Wood et al., 1896, 1899) a nazvali ji cannabinol. Zjistili, že sumární vzorec **CBN (Obr. 1)** je  $C_{21}H_{26}O_2$ . Dalším významným pilířem ve výzkumu cannabinolu byla jeho izolace. Ta se povedla spolu s publikací správné struktury CBN Cahnovi (Cahn 1932). Nicméně nebylo ještě zcela jasné, kde se nachází hydroxylová a n-pentylová skupina, o to se o několik let později postarala Toddova a Adamsova skupina, které nezávisle na sobě syntetizovaly cannabinol, který byl shodný s izolovaným cannabinolem z konopí. Díky tomu už chyběl pouze krok k odhalení aktivní složky marihuany – THC (Mioviský et al. 2008).

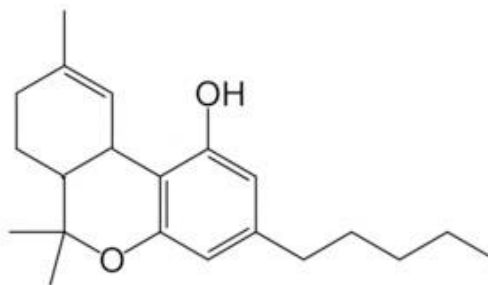
CBN vzniká degradací THC. Pokud se rostlina špatně vysuší, nebo je nesprávně uskladněna, může dojít k nárůstu CBN na úkor THC (José 2016).



**Obr. 1** - Strukturní vzorec cannabinolu - (převzato ze stránky: <https://elixinol.com>)

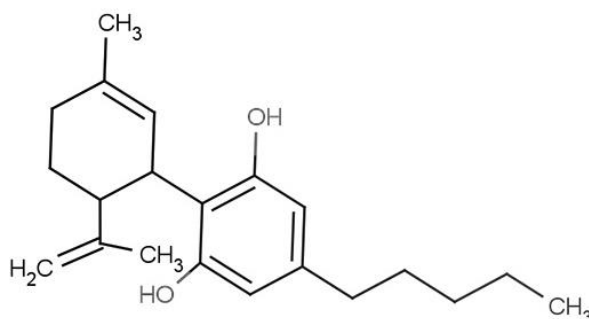
**THC (Obr. 2)** bylo poprvé synteticky vyrobeno a popsáno až v roce 1964 o izolaci se postarali Mechoulam, Gaoni na Weizmannově institutu věd v Rehovotu v Izraeli. Má mnoho účinků, stimuluje organismus, podporuje zvýšení chuti k jídlu, snižuje krevní tlak, pomáhá od bolesti, působí relaxačně a euforizačně (Rätsch 1998). Účinky THC se liší v závislosti na přijatém množství. V malých dávkách způsobuje dobrou náladu, avšak ve větším množství může zapříčinit halucinace, zhoršit motorickou koordinaci, omezit pozornost a poškodit funkci paměti. Při dlouhodobém užívání konopí s vyšší dávkou THC, může dojít k nenávratnému poškození psychického stavu. Největší množství THC obsahuje

pryskyřice a samičí květenství, naopak nejméně ho obsahují kořeny, podprůměrné a nízké množství THC nalezneme i v listech, samčích květech a stoncích (José 2016).



**Obr. 2** – Strukturní vzorec delta-9- tetrahydrocannabinol – (převzato ze stránky: <https://medicalmarijuana.procon.org>)

**CBD (Obr. 3)** neboli cannabidiol má sedativní a analgetické účinky a není psychoaktivní (José 2016). Zmírňuje také úzkost, která může být vyvolána THC, potlačuje zároveň zapomnětlivost, která bývá navozena mírnými dávkami THC (Backes 2016).



**Obr. 3** – Strukturní vzorec cannabidiolu – (převzato ze stránky: <https://www.cbdoilhemp.com>)

Poměr THC a CBD se v růstovém cyklu rostliny liší, pokud je rostlina nezralá či přezralá, převládá v rostlině CBD. Pro největší výtěžnost THC je proto nejlepší sklízet konopí, když je zralé (José 2016).

Za zmínku také stojí kyselina tetrahydrocannabinolová – THCA, která se dekarboxyluje na THC při teplotě 200-210 °C. Až 50 % THCA se mění na THC v průběhu kouření (McGilveray 2005). Velmi zajímavým faktem přitom je, že u rostlin pěstovaných v teplých oblastech obsahuje konopí v poměru 2:1 více THCA, než THC a v chladných oblastech je tento poměr dokonce 17:1 (Hanus et al. 1975, Pitts et al. 1992). To by poukazovalo na mnohem nižší vypovídací hodnotu v případě posuzování konopí pouze podle obsahu THC (Miovský et al. 2008).

## 1.6. Endokanabinoidní systém

Účinné látky obsažené v konopí musí zákonitě reagovat s nějakými receptory v lidském těle, aby mohly vyvolat odezvu, ať už v podobě psychotropního, či léčebného účinku.

Až koncem 80. století došlo k popsání prvních kanabinoidních receptorů (Backes 2016). Tyto specifické receptory a jejich soubor endokanabinoidů vytváří složitý systém regulačních mechanismů, který nazýváme endokanabinoidní systém (Miovský et al. 2008). Je přítomen u všech složitějších živočichů, počínaje rybami. Podílí se na podpoře různých procesů v organismu od trávení, chuti k jídlu, přes paměť, imunitní odpověď, bolest, až po ochranu nervových tkání (Backes 2016).

Na endokanabinoidním systému se nacházejí 2 subtypy CB1 a CB2. Tyto receptory putují přes imunitní a centrální nervovou soustavu do celého těla (Backes 2016). Dle výzkumů jsou v těle ještě minimálně 3 další kanabinoidní receptory, které pracují zároveň s CB1 a CB2 (Robson 2001).

Receptor CB1 se vyskytuje na nervových zakončeních v různých oblastech mozku. Díky tomuto receptoru mozek vykonává řadu funkcí – rozhodování, emoce, učení a paměť, regulace bolesti, stresu, úzkosti a spoustu dalších. Nevyskytuje se však až tak často v mozkovém kmenu (zajišťuje dýchání a krevní oběh), díky čemuž nelze umřít na předávkování konopím, avšak psychoaktivní účinky konopí jsou způsobené aktivací tohoto receptoru. Na druhou stranu, receptor CB2 můžeme najít převážně v periferních tkáních (hladké svalstvo střeva, varlata atp.) a na buňkách imunitního systému (monocyty, granulocyty atp.), odkud řídí výrobu cytokinů a zajišťuje tak imunitní odpověď organismu (Miovský et al. 2008, Backes 2016).

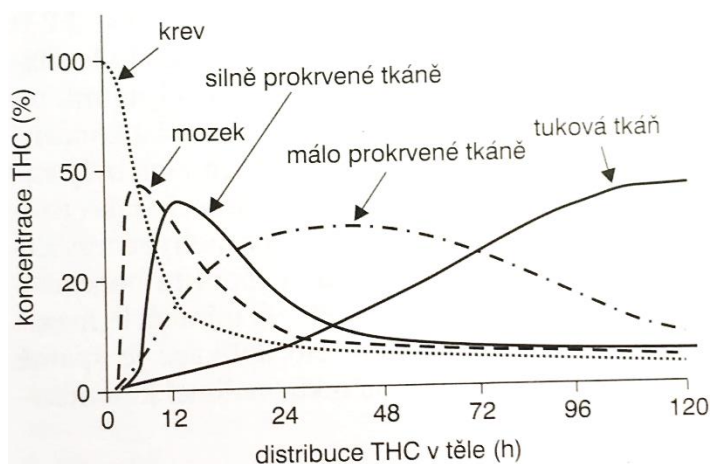
Spolu s objevem receptorů se vědci posléze zabývali i látkami, které se na ně vážou. Anandamid neboli arachidonyl etanolamid, byla první objevená sloučenina, vyskytující se u obratlovců včetně člověka, vážající se na kanabinoidní receptory (Miovský et al. 2008). V 90. letech se také objevily endokanabinoidy a 2-AG. Vzhledem k faktu, že se jedná o tuky, které nejsou ředitelné vodou a nemohou se tudíž efektivně pohybovat po těle, působí lokálně. Působí na neurony a plní tím funkci primárního posla, tedy díky nim mezi sebou neurony komunikují skrz uvolňování neuronových přenašečů (Backes 2016).

## 1.7. Distribuce a ukládání THC

THC se ukládá a distribuuje v různých tkáních a orgánech. THC se po průchodu do krve velmi pevně váže na plazmatické bílkoviny. Uvádí se, že kolem 60 % je vázáno na plazmatické lipoproteiny, 28 % se váže na albumin a 9 % na červené krvinky a pouze okolo 3 % THC je v plazmě ve formě volné frakce (Miovský et al. 2008). Cannabinoidy rychle prostupují tkáněmi díky své snadné rozpustnosti v tucích. Dobře prokrvené tkáně obsahují vysoké hodnoty cannabinoidů během chvíle od podání, naopak ve špatně prokrvených tkáních (tuková tkáň) jsou vysoké koncentrace těchto látek detekované v delším



časovém horizontu. Vzhledem k této vlastnosti se THC metabolity v tukové tkáni vyskytují dlouhou dobu a postupně se z ní vyplavují do krve a moči (Kreuz & Axelrod 1973). Názornou ukázkou distribuce THC do tkání v hodinách po injekčním podání znázorňuje graf, viz **Obr. 4**.



**Obr. 4** - Distribuce THC do tkání v hodinách po injekčním podání, převzato z Miovský, M. et al., 2008

### 1.8. Zdravotní souvislosti s užíváním drog

Konzumace drog obecně nese pro své uživatele velká zdravotní rizika. S konzumací konopí, které je považováno za tzv. měkkou drogu, jsou často spojeným problémem psychické a afektivní poruchy a onemocnění. Jsou to méně frekventované důsledky, které však patří mezi nejhůře léčitelné a zároveň jsou nejnebezpečnější, co se delšího časového horizontu týče (Mioviský et al. 2008). Je nutno podotknout, že uživatelé drog často drogy kombinují a výsledný psychický stav může být vyvolán kombinací dvou a více drog. Duševním onemocněním spojeným s konzumací návykové látky (alkohol sedativum, konopné drogy, ...) dle odhadů trpí 30-50 % evropských psychicky nemocných lidí (EMCDDA 2004).

Podle Ústavu zdravotnických informací a statistiky (ÚZIS; Anonym 2003) bylo v ČR v r. 2001 hospitalizováno s druhou diagnózou z oblasti psychických poruch 226 pacientů. Nejčastěji se mezi těmito poruchami objevují poruchy osobnosti či neurotické a stresové poruchy, dále pak afektivní poruchy, schizofrenie nebo poruchy příjmu potravy či poruchy chování u dětí. V ojedinělých případech se může dostavit i mentální retardace.

Epidemiologické studie potvrzují zjištění ÚZIS a ukazují, že konopné drogy v největší míře spouští psychotické poruchy, poruchy nálady a osobnosti a úzkostné poruchy (Holmwood 2003). Mezi nejčastěji uváděné (Mioviský et al. 2008) neuropsychické nežádoucí účinky konopných drog lze uvést úzkost a paniku (zvláště u nezkušených uživatelů), paranoiu, zmatenost, depersonalizaci, derealizaci,

agresivitu, halucinace, iluzi, kognitivní poruchy, zvláště pozornosti a paměti, zhoršení psychometrických funkcí, zvýšené riziko provokace psychóz u predisponovaných osob.

Často probíraným tématem, v souvislosti s užíváním konopí, je schizofrenie. Způsobuje požití marihuany schizofrenii? Na tuto otázku zatím neexistuje jednoznačná odpověď. V současné době není možné říci, že by tato možnost byla dostatečně prokázána. Miovský et al. (2008) uvádí, že většina uživatelů konopných drog schizofrenii neonemocní, ale užíváním těchto drog se riziko zvyšuje řádově 2-3×. Dle zahraničních studií, konopné drogy užívají častěji schizofrenici než lidé netrpící touto nemocí. Vyplývá to např. ze studie Robinse & Regiera (1991), ve které autoři uvádí, že u 50 % lidí trpících schizofrenií se projevovaly i poruchy spojené s užíváním drog, a naopak dle Rieger et al. (1990) u lidí netrpících schizofrenií bylo toto procento jen 17 %. Každodenní uživatelé konopných drog mají oproti uživatelům, kteří tyto drogy denně neužívali, 2,4× častěji psychotické příznaky (Tien & Anthony 1990, Hall & Degenhardt 2000, van Os et al. 2002). Jiný výzkum (Chopra & Smith 1974) ukázal, že velcí uživatelé konopných drog (denně po dobu 60 týdnů), mohou mít problém s rozvojem psychózy.

Dle studií z USA a Nového Zélandu, mají uživatelé konopí vyšší riziko spáchání sebevraždy. Toto riziko se pohybuje mezi 7-16 % v případě USA a 16 % v případě Nového Zélandu (Dhossche et al. 2001, Field et al. 2001).

## 1.9. Trestní problematika konopí

### 1.9.1. Zákony

Podle zákona č. 40/2009 Sb. § 284 o přechovávání omamné látky a jedu odstavce 1, „Kdo neoprávněně pro vlastní potřebu přechovává v množství větším než malém omamnou látku konopí, pryskyřici z konopí nebo psychotropní látku obsahující jakýkoli tetrahydrokanabinol, izomer nebo jeho stereochemickou variantu (THC), bude potrestán odnětím svobody až na jeden rok, zákazem činnosti nebo propadnutím věci.“ Ostatní odstavce pojednávají o ostatních omamných a psychotropních látkách a o vyšších trestech.

Zákon č. 40/2009 Sb. § 285, o nedovoleném pěstování rostlin obsahujících omamnou nebo psychotropní látku, zaštiťuje neoprávněné pěstování konopí pro vlastní potřebu v množství větším než malém. Při porušení může následovat trest odnětím svobody až na šest měsíců, peněžitý trest nebo propadnutí věci. V České republice je tedy neoprávněné přechovávání a pěstování většího než malého množství konopí ilegální.

Výňatek ze zákona č. 167/1998 Sb. § 24, o konopí, koka a máku setém také zakazuje: „pěstovat druhy a odrůdy rostliny konopí (rod *Cannabis*), které mohou obsahovat více než 0,3 % látek ze skupiny tetrahydrokanabinolů, s výjimkou pěstování na základě licence udělené podle tohoto zákona; zákaz se nevztahuje na pěstování odrůd rostliny konopí (rod *Cannabis*) pro výzkumné účely, pro šlechtění

nových odrůd a pro zachování genetické rozmanitosti vědeckými a výzkumnými pracovišti zřízenými zákonem nebo státem vymezené v povolení k zacházení, s výjimkou pěstování na základě licence udělené podle tohoto zákona.“

Co se pěstování konopí týče dle § 24a: „Pěstovat konopí pro léčebné použití může jen taková právnická nebo podnikající fyzická osoba, které byla k této činnosti udělena licence Státním ústavem pro kontrolu léčiv. Držitel licence může pěstování konopí pro léčebné použití zahájit, jen pokud má uděleno povolení k zacházení s návykovými látkami a přípravky.“

Dne 17.10.2015 nabyla účinnosti vyhláška č. 236/2015 Sb., o stanovení podmínek pro předepisování, přípravu, distribuci, výdej a používání individuálně připravovaných léčivých přípravků s obsahem konopí pro léčebné použití, která nahradila vyhlášku č. 221/2013 Sb. Hlavními změnami ve vyhlášce bylo navýšení měsíčního limitu pacientovi předepsaného konopí ze 30 g na 180 g a zvýšení povolené hodnoty THC až na 21 % a CBD na 19 %.

### 1.9.2. Zneužívání drog v České republice

Oblast výzkumu a drogové scény se až do roku 1989 téměř neprolínala. Výzkumy prováděné do tohoto roku nebyly zaměřeny na chování drogové scény, nebyly uskutečněny odpovídajícími metodami ani publikovány v recenzovaných odborných časopisech. Navíc došlo k tomu, že se popis části drogové scény generalizoval na popis celé drogové scény (Miovský et al. 2008).

Na nejvyšším postu žebříčku o nejužívanější drogu v ČR se již dlouho drží konopné látky. Alespoň jednu zkušenost s marihuanou má v průměru 25 % české populace. Častější zkušenosti s drogami mají ve většině případů muži (Zábranský et al. 2002, Mravčík et al. 2003-2017). Podle výroční zprávy z roku 2006 (Mravčík et al. 2007) bylo dle provedených studií v dospělé populaci ČR přibližně 2,6 % pravidelných konzumentů konopných látek, tj. cca 190 000 osob užívajících konopné látky nejméně jednou týdně.

V roce 2007 se v rámci studie ESPAD zjišťovala celoživotní prevalence užití konopných látek v krajích ČR. Množství zkušeností s konopnými drogami mezi jednotlivými kraji se značně liší, nejhůře je na tom Ústecký kraj, nejlépe jsou na tom pak kraje Vysočina, Jihočeský a Moravskoslezský (**Obr. 5**) (Mravčík et al. 2008).



**Obr. 5** – Celoživotní prevalence užívání konopných látek podle krajů ČR ve studii ESPAD 2007, v % - (převzato z Mravčík et al. 2007)

Za zmínku také stojí výsledky evaluace komunitního programu o.s. Prev-Centrum, dle výsledků mají děti v 5. třídě (11 let) zanedbatelné zkušenosti s konopnými látkami – asi 1,6 % z nich je vyzkoušelo. Horší je situace u žáků, od 7. třídy (13 let) je patrný nárůst až na 13,3 %, alarmující je však výsledek u žáků 9. třídy, kde konopné látky vyzkoušelo 36,1 % (Miovská et al. 2008).

Jedna ze studií, která byla prováděna kvalitativními metodami spolupracovala přímo se zástupci poskytovatelů služeb v oblasti drog. Poskytovatelé služeb uváděli, že uživatelé marihuany velmi často užívají i jiné drogy, nejčastěji pervitin. Poskytovatelé služeb hádají, že má zkušenost s marihuanou cca 80 % studentů středních škol (Miovský et al. 2008).

V posledních několika letech se situace se zneužíváním drog v ČR stabilizovala, stále ale pokračuje trend v užívání marihuany, jakožto nejoblíbenější drogy, a navíc je stále oblíbená mezi mladými lidmi ve věku od 15 do 34 let. Podle Národního výzkumu, prováděného v roce 2016 (Mravčík et al. 2016), je pro vzorek 1017 lidí ve věku od 15 do 34 let celoživotní prevalence užívání konopných látek 43,8 %. Prevalence u stejného vzorku lidí za posledních 12 měsíců je 19,4 % a za posledních 30 dnů 11,1 %. Cena marihuany se za posledních 5 let pohybuje mezi 180–190 Kč za 1 g drogy (Mravčík et al. 2017).

## 2. Metodika

### 2.1. Povolení k práci s ilegálním materiálem

Laboratorní analýzy v rámci řešené bakalářské práce zahrnují práci s konopím s vysokým obsahem THC. Volné nakládání s takovým materiálem není ze zákona možné. Práci s tímto materiálem bylo možné realizovat díky **Povolení k zacházení s návykovými látkami a přípravky** podle § 8 zákona č. 167/1998 Sb., číslo 86/2016 ze dne 3.8.2016 udělené Ministerstvem zdravotnictví (viz **příloha a**)).

### 2.2. Rostlinný materiál

Pro analýzy jsme užili vzorků *Cannabis sativa* var. *indica*, které byly získány ve spolupráci s Kriminologickým ústavem v Praze (resp. ve spolupráci Policií České republiky dále jen PČR). Vzorky pocházely z ilegálních pěstíren konopí na území severní Moravy.

Vzorky byly vysušeny a rozděleny do oddílů po 5, 10, 12 nebo 28 kusech (**Obr. 6**) do igelitových ZIP-lock sáčků se silikagelem. Tyto materiály pro forenzní analýzy se odebírají náhodně, vždy 10-15 rostlin z různých řad v pěstírně a zároveň nesousedící rostliny. Zde odebrané rostliny putují na Kriminologický ústav v Praze (dále jen KÚP), kde se z květů pomocí plynové chromatografie stanovuje obsah THC. Poté byly vzorky označeny následovně: FM 16.1 – 16.10; FM 18.1 – 18.10; FM 19.1 – 19.12; FM 20.1 – 20.10; FM 21.1 – 21.10; FM 22.1 – 22.10; BR 1.1 – 1.5; BR 2.1 – 2.5 a KUP H1 – H28. K extrakci DNA bylo nejvhodnější využít cca 20 mg sušených listů, kvůli výtěžnosti. Nicméně některé vzorky obsahovaly i méně než 5 mg, přičemž u těchto vzorků byla nižší výtěžnost DNA. Přesné hmotnosti a koncentrace DNA využitých vzorků jsou shrnuty v **Tab.3**.



**Obr. 6** - Ukázka skladování vysušených vzorků ze zátahů, které byly rozděleny do oddílů

Pracovali jsme i s dalšími 30 vzorky, pro které jsme získali již extrahovanou DNA (ve spolupráci s KÚP). Pro extrakci se používaly vzorky o hmotnosti 30 mg. Byly z Frýdku-Místku, ze 3 pěstíren, kde se v každé odebralo 10 rostlinných vzorků. Přičemž koncentrace DNA byla měřena pomocí Qubitu. Vzorky nesly označení: FM 1.1 – 1.10; FM 2.1 – 2.10; FM 3.1 – 3.10. Shrnutí jednotlivých vzorků a jejich koncentrace jsou uvedeny v **Tab. 3**.

**Tab. 3** - Seznam 30 vzorků poskytnutých od PČR

vzorek	koncentrace DNA (ng/μl)	vzorek	koncentrace DNA (ng/μl)	vzorek	koncentrace DNA (ng/μl)
FM 1.1	6,48	FM 2.1	27,4	FM 3.1	0,47
FM 1.2	5,74	FM 2.2	2,06	FM 3.2	1
FM 1.3	9,02	FM 2.3	5,42	FM 3.3	4,3
FM 1.4	8,82	FM 2.4	16,2	FM 3.4	3,02
FM 1.5	1,39	FM 2.5	23,6	FM 3.5	3,6
FM 1.6	1,07	FM 2.6	24,2	FM 3.6	4,3
FM 1.7	1,64	FM 2.7	19,4	FM 3.7	9,22
FM 1.8	3,66	FM 2.8	15	FM 3.8	9,98
FM 1.9	3,94	FM 2.9	37	FM 3.9	1,38
FM 1.10	3,34	FM 2.10	1,02	FM 3.10	5,98

## 2.3. Molekulární analýzy

### 2.3.1. Extrakce DNA z usušených listů konopí setého (*Cannabis sativa* L.)

K extrakci jsme využili sady pro extrakci DNA DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) a postupovali jsme podle předepsaného protokolu. Před začátkem je důležité mít na paměti následující věci:

- Provést všechny odstředovací kroky při pokojové teplotě (15-25 °C).
- Pokud je potřeba, rozpustit sraženiny v Bufferu AP1 a AW1 koncentrátech.
- Přidat ethanol do Bufferů AW1 a AW2 koncentrátů.
- Předehřát vodní lázeň nebo zahřívací blok na 65 °C.

Nejprve jsme si vybrané vzorky zvážili, aby měly do 20 mg váhy (pokud by se pracovalo s nevysušenými pletivy, váha vzorků by neměla přesáhnout 100 mg). V následujícím kroku se vzorky přenesly do 2000 μl mikrozkuvek s kónickým dnem, jelikož se musí nechat rozdrtit. Před vložením do přístroje od společnosti Retsch MM 301 dáme do každého vzorku stejné množství kuliček – aby byly vzorky vyvážené. Přístroj jsme nechali drtit vzorky 2 minuty o frekvenci 30 Hz. Po vytažení z drtiče jsme vzorky setřepali a přidali 400 μl pufru AP1 a 4 μl RNase A. Dále se směsi v mikrozkuvkách promíchaly

a inkubovaly po dobu 10 minut při 65 °C o rychlosti 300 Hz. Posléze jsme přidali 130 µl pufru P3, promíchali a nechali inkubovat 5 minut na ledu. Doporučeným krokem, který jsme nevynechali, bylo odstředění lyzátu po dobu 5 minut o rychlosti 13200 rpm. Lyzát jsme napipetovali do QIA shredder spin column umístěné ve 2 ml sběrné mikrozkuhavce, pak jsme odstředovali 2 minuty o rychlosti 13200 rpm. V následujícím kroku jsme přenesli tekutinu do nové mikrozkuhavky (museli jsme dávat pozor na usazeniny na stěně) a přidali 1,5 násobek pufru AW 1 a zamíchali pomocí pipety – v našem případě činil objem tekutiny 300 µl a přidávali jsme 450 µl pufru AW1. 650 µl směsi jsme přenesli do DNeasy Mini spin column umístěné ve 2 ml sběrné mikrozkuhavce, odstředovali jsme po dobu 1 minuty při rychlosti 8200 rpm. Vyřadili jsme proteklou tekutinu a opakovali krok se zbývající směsí vzorku.

Dále jsme přemístili spin column do nové 2 ml mikrozkuhavky a přidali 500 µl pufru AW2, centrifugovali jsme minutu o rychlosti 8200 rpm, odstranili jsme proteklou tekutinu. Přidali jsme dalších 500 µl pufru AW2 a centrifugovali dvě minuty při rychlosti 13200 rpm. (Pozn. museli jsme opatrně vysunout spin column tak, aby se nedotkl proteklého roztoku). Přesunuli jsme spin column do nové 1,5 ml nebo 2 ml mikrozkuhavky a přidali 100 µl pufru AE pro vymytí. Po dobu 5 minut jsme nechali tekutinu odstát při pokojové teplotě a poté centrifugovali po dobu jedné minuty při rychlosti 8200 rpm. Znovu jsme přidali 100 µl pufru AE, 5 minut nechali odstát při pokojové teplotě a minutu odstředovali při rychlosti 8200 rpm.

### 2.3.2. Molekulární markery

Při reakcích jsme užili již dříve publikované molekulární markery (Alghanim & Almirall 2003) (**Tab. 4**). Zároveň jsme vycházeli z nepublikovaných zkušeností německých kriminalistů (Christina Staginus, LKA Mainz, osobní sdělení).

**Tab. 4** - Přehled molekulárních markerů

název primerů		anelingová teplota (°C)	sekvence (5' - 3')	barva	velikost PCR produktu
<b>E07 CANN1</b>	R	47,8	GTG GTA GCC AGG TAT AGG TAG	D2	105-111
	F	44,9	CAA ATG CCA CAC CAC CTT C		
<b>D02 CANN1</b>	R	45,9	AGA AAT CCA AGG TCC TGA TGG	D3	105-111
	F	45,9	GGT TGG GAT GTT GTT GTT GTG		
<b>ANUCS 501</b>	R	43,1	AGA GAT CAA GAA ATT GAG ATT CC	D4	80-95
	F	44,4	AGC AAT AAT GGA GTG AGT GAA C		

název primerů		anelingová teplota (°C)	sekvence (5' - 3')	barva	velikost PCR produktu
<b>ANUCS 302</b>	R	39,3	ATG GTT GAT GTT TTG ATG GT	D4	140-173
	F	42,0	AAC ATA AAC ACC AAC AAC TGC		
<b>C11 CANN1</b>	R	42,8	TGA ATT GGT TAC GAT GGC G	D2	150-175
	F	46,3	GTG GTG GTG ATG ATG ATA ATG		
<b>B02 CANN2</b>	R	42,8	TGT TTT CTT CAC TGC ACC C	D3	163-172
	F	43,9	CAA CCA AAT GAG AAT GCA ACC		
<b>ANUCS 308</b>	R	40,0	TGG TGC AGG TTT ATA CAA TTT	D2	177-203
	F	41,3	AGA TGG TGT TGG GTA TCT TT		
<b>ANUCS 305</b>	R	42,0	AAA GTT GGT CTG AGA AGC AAT	D4	141-162
	F	42,0	AAA GTT GGT CTG AGA AGC AAT		
<b>B01 CANN1</b>	R	46,3	CCA TAG CAT TAT CCC ACT CAA G	D4	323-339
	F	43,9	TGG AGT CAA ATG AAA GGG AAC		
<b>B05 CANN1</b>	R	47,8	CCC CAA TCT CAA TCT CAA CCC	D2	235-244
	F	44,9	TTG ATG GTG GTG AAA CGG C		
<b>H06 CANN2</b>	R	44,9	ACG TGA GTG ATG ACA CGA G	D3	266-273
	F	44,9	TGG TTT CAG TGG TCC TCT C		
<b>ANUCS 301</b>	R	41,3	TAA CAA AGT TTC GTG AGG GT	D4	209-261
	F	39,3	ATA TGG TTG AAA TCC ATT GC		

### 2.3.3. PCR reakce

PCR neboli polymerázová řetězová reakce je reakce, při které se rychle a snadno za pomoci replikace zmnoží úsek DNA. Na princip PCR reakce poprvé přišel Saiki, RK. spolu s kolektivem autorů, který popsali v publikaci Enzymatic Amplification of  $\beta$ -globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. PCR jsme prováděli na přístroji PTC-200 DNA Engine Cycler. Využívali jsem tří různých PCR mixů. PCR mix 1 (**Tab. 5**), PCR mix 2 (**Tab. 6**) a PCR mix 3 (**Tab. 7**) byly vytvořeny na základě domluvy s vedoucím práce Dr. R. J. Vašutem.



**Tab. 5** - PCR mix 1 pro 1 vzorek o celkovém množství 10  $\mu$ l

	<b>Množství pro 1 vzorek (<math>\mu</math>l)</b>
<b>pufr</b>	2
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	0,5
<b>forward primer (1mM)</b>	0,5
<b>reverse primer (1mM)</b>	0,5
<b>polymeráza</b>	0,05
<b>dNTPs</b>	0,2
<b>DNA</b>	1
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	5,25

**Tab. 6** - PCR mix 2 pro 1 vzorek o celkovém množství 10  $\mu$ l

	<b>Množství pro 1 vzorek (<math>\mu</math>l)</b>
<b>pufr</b>	1
<b>forward primer (1mM)</b>	0,5
<b>reverse primer (1mM)</b>	0,5
<b>polymeráza</b>	0,05
<b>dNTPs</b>	0,8
<b>DNA</b>	2
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	5,15

**Tab. 7** - PCR mix 3 pro 1 vzorek o celkovém množství 10  $\mu$ l

<b>Taka Ra</b>	<b>Množství pro 1 vzorek (<math>\mu</math>l)</b>
<b>pufr</b>	1
<b>forward primer (1mM)</b>	0,5
<b>reverse primer (1mM)</b>	0,5
<b>polymeráza</b>	0,05
<b>dNTPs</b>	0,8
<b>DNA</b>	1
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	6,15

Pro ověření optimálních podmínek pro PCR reakci jsme potřebovali zjistit, za jaké anelingové teploty běží reakce s danými primery nejlépe (**viz kapitola 3.2**). Poté jsme již PCR reakce prováděli programem CAN\*GEN, který obsahoval následující kroky:

1. krok 95°	3 minuty
2. krok 95°	0,5 minuty
3. krok 52°	45 sekund
4. krok 72°	30 sekund
5. krok zpět na krok 2	30x opakovat
6. krok 72°	10 minut
7. krok 10°	do konce

Pro PCR mix 3 byla reakce prováděna pomocí programu CAN\*TKR s těmito kroky:

1. krok 94°	0,5 minuty
2. krok 94°	0,5 minuty
3. krok 52°	0,5 minuty
4. krok 72°	1 minutu
5. krok zpět na krok 2	29x opakovat
6. krok 72°	1 minutu
7. krok 10°	do konce

Zdali PCR reakce proběhla jsem ověřovala pomocí gelové elektroforézy na agarózovém gelu (**viz kapitola 2.3.4**).

#### 2.3.4. Gelová elektroforéza

Agarózový gel je směs agarózy a vody. Tento způsob kontroly, se provádí především proto, aby se zjistilo, zdali proběhla PCR reakce.

Do 45 ml vody se přidá 0,45 g agarózy a necháme vzniklou látku rozehrát v mikrovlnné troubě. Mezi rozehříváním si nachystáme vaničku s mřížkou, ve které bude gel schnout. Po asi 2 minutách vznikne rosolovitá látka, do které přimícháme barvičku – v našem případě 1 µl ELGO GEL RED. Následně tekutinu vlijeme do předpřipravené vaničky s mřížkou, aby byla rovnoměrně rozprostřena a necháme 45 minut až hodinu schnout.

Pokud je po hodině gel ztuhlý, můžeme opatrně vysunout mřížku a ponořit vaničku s gelem do elektrolytu. Je nutné, aby byly všechny jamky rovnoměrně zalité elektrolytem. Do jednotlivých jamek pak vkládáme jednotlivé PCR produkty. Přístroj poté nastavíme na napětí 300 V na dobu 15 minut, přitom hlídáme, aby nám jednotlivé produkty „neutekly“ z gelu. Průběh PCR reakce vyčteme z gelu pod UV světlem.

### 2.3.5. Fragmentační analýza

Fragmentační analýzu, tj. zjištění velikosti PCR produktů jsme prováděli na přístroji Beckman Coulter Genetic Analyser. Postup přípravy vzorků, separačního gelů a průběh analýzy byl proveden podle doporučeného protokolu a s pomocí kolegy zodpovědného za provoz přístroje (Dr. M. Kitner).

Produkty PCR reakcí byly smíchány (byly vytvořeny tzv. multiplexy) s ohledem na předpokládanou délku amplifikovaných PCR produktů. To znamená PCR produkty různých délek (tj. svými délkami se nepřekrývající) byly nabarveny stejným fluorescenčním barvivem, naopak PCR produkty, u kterých hypoteticky hrozil překryv jejich délek byly označeny odlišnými barvivy.

Značení PCR produktu bylo provedeno barvami WellRED (WellRED labelling dyes; Sigma Aldrich), jmenovitě barvy označované jako D2 (excitační maximum 750 nm), D3 (excitační maximum 685 nm) a D4 (excitační maximum 650 nm).

Cílem tohoto testování bylo ověřit možnost tzv. multiplexování a zároveň pokusit nalézt detekční schopnost přístroje pro fragmentační analýzu, proto jsme použili vzorky s nižší a vyšší koncentrací DNA.

Vzorky byly nakombinovány po 3 podle následujícího klíče:

1.1 a) - B05, D02, E07 . . . nižší koncentrace DNA

2.9 a) - B05, D02, E07 . . . nižší koncentrace DNA

3.3 a) - B05, D02, E07 . . . nižší koncentrace DNA

1.1 b) - B05, D02, E07 . . . vyšší koncentrace DNA

2.9 b) - B05, D02, E07 . . . vyšší koncentrace DNA

3.3 b) - B05, D02, E07 . . . vyšší koncentrace DNA

1.1 c) – 301, 302, 305 . . . nejnovější – neověřeno na agarovém gelu

2.9 c) – 301, 302, 305 . . . nejnovější – neověřeno na agarovém gelu

### 3. Výsledky

#### 3.1. Extrakce DNA

Z daných vzorků jsem vyextrahovala pomocí DNeasy Plant Mini Kitu množství DNA o koncentracích uvedených v následujících tabulkách (**Tab. 8–12**). Koncentrace DNA se zjišťovaly pomocí přístroje NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Nejnižší naměřená hodnota koncentrace DNA byla 4,7 ng/μl, naopak nejvyšší dosáhla hodnoty 64,1 ng/μl. Průměrné hodnoty a medián koncentrace DNA viz **Tab. 13**.

**Tab. 8–12** - Soubor tabulek vzorků, jejich hmotností a koncentrací.

vzorky	hmotnost (mg)	koncentrace DNA (ng/μl)	vzorky	hmotnost (mg)	koncentrace DNA (ng/μl)
FM 16.1	9	9,9	FM 18.1	20	26,6
FM 16.2	20	20,9	FM 18.2	17	19,9
FM 16.3	10	26,7	FM 18.3	20	40,9
FM 16.4	13	22,7	FM 18.4	18	12,9
FM 16.5	6,6	8,8	FM 18.5	21	36,5
FM 16.6	7,7	16,7	FM 18.6	20	11,1
FM 16.7	8	10,6	FM 18.7	21	27,1
FM 16.8	14	20,8	FM 18.8	20	47,3
FM 16.9	14	11,5	FM 18.9	20	20,6
FM 16.10	18	20,9	FM 18.10	20	34

vzorky	hmotnost (mg)	koncentrace DNA (ng/μl)	vzorky	hmotnost (mg)	koncentrace DNA (ng/μl)
FM 20.1	20	18,7	FM 21.1	20	38,4
FM 20.2	20	21,4	FM 21.2	20	32,7
FM 20.3	20	27,2	FM 21.3	20	25,5
FM 20.4	20	16,4	FM 21.4	20	60,7
FM 20.5	19	18,4	FM 21.5	20	12,5
FM 20.6	20	24,4	FM 21.6	20	27
FM 20.7	20	19,2	FM 21.7	20	20,7
FM 20.8	20	30	FM 21.8	20	13,3

<b>vzorky</b>	<b>hmotnost (mg)</b>	<b>koncentrace DNA (ng/μl)</b>	<b>vzorky</b>	<b>hmotnost (mg)</b>	<b>koncentrace DNA (ng/μl)</b>
<b>FM 20.9</b>	18	33,5	<b>FM 21.9</b>	20	21,4
<b>FM 20.10</b>	20	22,5	<b>FM 21.10</b>	21	31,3

<b>vzorky</b>	<b>hmotnost (mg)</b>	<b>koncentrace DNA (ng/μl)</b>	<b>vzorky</b>	<b>hmotnost (mg)</b>	<b>koncentrace DNA (ng/μl)</b>
<b>FM 22.1</b>	20	64,1	<b>BR 1.1</b>	20	12,7
<b>FM 22.2</b>	20	27,3	<b>BR 1.2</b>	20	13,2
<b>FM 22.3</b>	20	26,9	<b>BR 1.3</b>	20	15,8
<b>FM 22.4</b>	20	29	<b>BR 1.4</b>	20	10,7
<b>FM 22.5</b>	20	39,1	<b>BR 1.5</b>	20	11,1
<b>FM 22.6</b>	20	25,1	<b>BR 2.1</b>	20	8,2
<b>FM 22.7</b>	20	30,2	<b>BR 2.2</b>	18	9,3
<b>FM 22.8</b>	20	26,2	<b>BR 2.3</b>	20	8,3
<b>FM 22.9</b>	20	27,3	<b>BR 2.4</b>	20	11,4
<b>FM 22.10</b>	20	27,3	<b>BR 2.5</b>	20	13,8

<b>vzorky</b>	<b>hmotnost (mg)</b>	<b>koncentrace DNA (ng/μl)</b>
<b>FM 19.1</b>	20	21,9
<b>FM 19.2</b>	20	14,3
<b>FM 19.3</b>	19	17,3
<b>FM 19.4</b>	20	24,2
<b>FM 19.5</b>	20	16,1
<b>FM 19.6</b>	20	11,1
<b>FM 19.7</b>	19,8	12,1
<b>FM 19.8</b>	19,9	14,7
<b>FM 19.9</b>	20	12,4
<b>FM 19.10</b>	20	17,4
<b>FM 19.11</b>	20	14,7
<b>FM 19.12</b>	20	11

vzorky	hmotnost (mg)	koncentrace DNA (ng/μl)	vzorky	hmotnost (mg)	koncentrace DNA (ng/μl)
KUP - H1	6	6,6	KUP - H15	7,2	8,4
KUP - H2	9	8,6	KUP - H16	9,5	10,2
KUP - H3	4,6	9,1	KUP - H17	8,6	9,4
KUP - H4	5	7,7	KUP - H18	7,6	7,5
KUP - H5	7,6	9,2	KUP - H19	6,6	12,6
KUP - H6	15,5	7,8	KUP - H20	5,7	14,5
KUP - H7	5	5,9	KUP - H21	5,3	6,4
KUP - H8	9,4	12,5	KUP - H22	8,1	10
KUP - H9	14,2	8,2	KUP - H23	4,1	5,6
KUP - H10	6,3	6,5	KUP - H24	8,3	5,7
KUP - H11	6,5	9,8	KUP - H25	3	6,2
KUP - H12	5,7	6	KUP - H26	4,4	4,9
KUP - H13	2,8	7,2	KUP - H27	5,4	4,7
KUP - H14	2,6	6,7	KUP - H28	4,2	5,7

Pozn.: Zvýrazněné vzorky nemají dostatečnou koncentraci, a proto se při dalším používání neředily

**Tab. 13** - Průměrné hodnoty a medián koncentrace DNA

vzorky	průměr	medián
FM 16	16,95	18,75
FM 18	27,69	26,85
FM 19	15,6	14,7
FM 20	23,17	21,95
FM 21	28,35	26,25
FM 22	32,25	27,3
BR	11,45	11,25
KUP-H	7,99	7,6

### 3.2. Test anelingové teploty gradientem

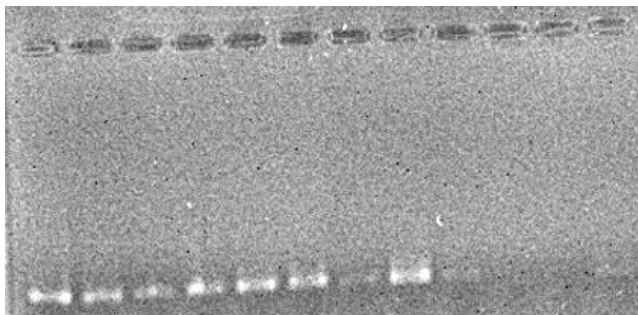
Pro ověření optimálních podmínek pro PCR reakci jsme potřebovali zjistit, jestli v literatuře publikované hodnoty anelingové teploty budou vhodné pro reakce v našich laboratorních podmínkách. Vycházeli jsme také z hodnot, které byly použity v německé forenzní laboratoři LKA Mainz

(Christina Staginus, osobní sdělení). Proto jsme nastavili na přístroji MJ Research PTC - 200 teplotní spektrum pro jednotlivé vzorky v rozmezí 50 až 65 °C (kde v **Tab. 14** odpovídá č. 1 – 50 °C a č. 12 – 60 °C). Vytvořili jsme si vlastní program CANN\*GR, jehož algoritmus se skládal z následujících kroků:

1. krok 95°	3 minuty
2. krok 95°	0,5 minuty
3. krok 50 - 65°	45 sekund
4. krok 72°	30 sekund
5. krok zpět na krok 2	30x opakovat
6. krok 72°	10 minut
7. krok 10°	do konce

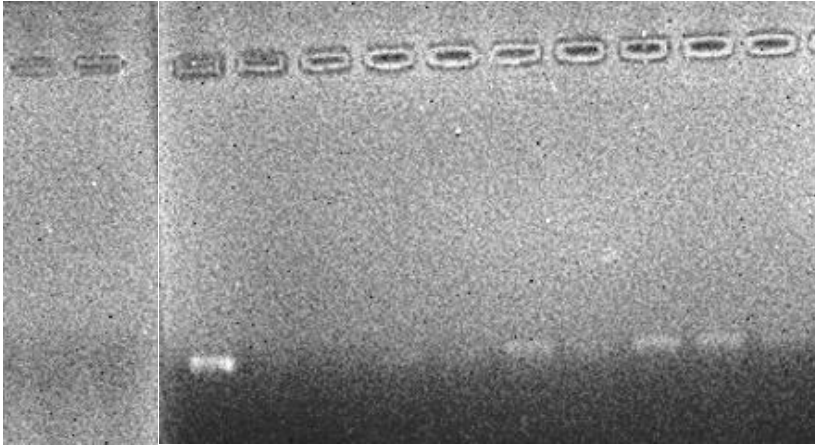
### 3.3. Gelová elektroforéza gradientu

Abychom ověřili, že reakce proběhly (správně), dané vzorky jsme aplikovali na agarózový gel. Vyfocené fotografie agarózových gelů jsem uspořádala podle řádků, pro ukázkou – řádek B (**Obr. 7**), řádek C (**Obr. 8**) a řádek D (**Obr. 9**). Výsledky jsou poté přehledně sepsány v tabulce (**Tab. 14**).

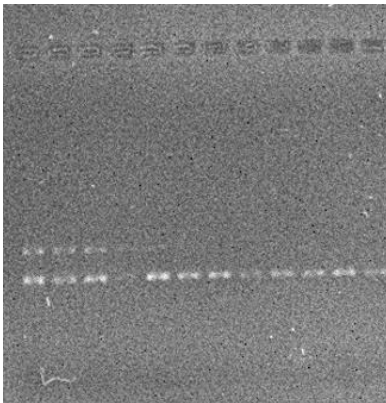


**Obr. 7** - Řádek B – E07 – vzorek 10.10





**Obr. 8** - Řádek C – E07 – vzorek 11.1



**Obr. 9** - Řada D – D02 – vzorek 4.1

**Tab. 14** Vyhodnocení teplotního gradientu 96 vzorků *Cannabis sp.* – vysvětlivky:

- ✓ - hezky viditelné
- (±) – lze něco rozpoznat
- (\\) – nelze nic rozpoznat

primer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	vzorky
A - E07	\	\	✓	✓	✓	±	±	\	\	\	±	\	4.1
B - E07	✓	✓	✓	✓	✓	✓	±	✓	±	\	\	±	10.10
C - E07	\	\	✓	\	\	±	±	±	±	±	±	±	11.1
D - D02	✓	✓	✓	±	✓	✓	✓	±	✓	✓	✓	±	4.1
E - D02	\	\	\	✓	✓	✓	\	✓	\	\	✓	✓	10.10
F - D02	✓	✓	✓	\	\	\	✓	\	\	±	±	±	11.1
G - B05	✓	✓	\	✓	\	\	\	\	✓	✓	✓	✓	4.1
H - B05	✓	✓	✓	✓	✓	\	\	✓	✓	✓	\	✓	11.1

### 3.4. Fragmentační analýza

Fragmentační analýza na přístroji Beckman Coulter Genetic Analyser (dále zkráceně sekvenátor) nebyla úspěšná jen pro vzorky 2.9 c) a 3.3 a). Ostatní reakce byly více či méně úspěšné, nejlépe proběhly vizualizace fragmentů (dle předpokladu) u PCR produktů, které proběhly s normální koncentrací DNA. Pro vzorky, kde byla testována velmi nízká koncentrace DNA nebyla fragmentační analýza úspěšná.

Byly zjištěny přesné velikosti amplifikovaných PCR produktů, ty jsou shrnuty v tabulce **Tab. 15**.

Ukázka, jak vypadá výsledná podoba fragmentační analýzy na sekvenátoru zobrazuje **příloha b)**.

**Tab. 15** - Velikosti amplifikovaných PCR produktů

	primer	barvivo	alely [bp]
<b>1.1 a)</b>	B05	D2	245
	E07	D2	113
	D02	D3	112, 115
<b>2.9 a)</b>	B05	D2	243, 249
	E07	D2	110, 113
	D02	D3	113, 118
<b>1.1 b)</b>	B05	D2	245, 251
	E07	D2	112
	D02	D3	112, 115
<b>3.3 b)</b>	B05	D2	242, 247
	E07	D2	109, 112
	D02	D3	112, 115

## 4. Didaktická analýza odborného tématu

V posledních letech se velmi často mluví až o velmi vysokém počtu uživatelů konopí/marihuany mezi dětmi a mladými lidmi obecně. Podle Národního výzkumu, prováděného v roce 2016, je pro vzorek 1017 lidí ve věku od 15 do 34 let celoživotní prevalence užívání konopných látek 43,8 %. Prevalence u stejného vzorku lidí za posledních 12 měsíců je 19,4 % a za posledních 30 dnů 11,1 %. V každé škole se přitom setkáváme s poučením o drogové problematice. Jsou za tímto problémem nedostatečná antidrogová politika na školách nebo je problém přímo ve zvědavých studentech?

Pro modelové zpracování didaktické části mé práce jsem si vybrala studenty gymnázií. Podle rámcového vzdělávacího programu by se studenti gymnázií měli bavit o drogách během Výchovy ke zdraví, konkrétně během studia kapitoly „Změny v životě člověka a jejich reflexe“ v rámci podkapitoly péče o reprodukční zdraví.

V rámci studia Výchovy ke zdraví by bylo dobrým řešením udělat projektový týden s názvem „Boj s drogami“, během kterého by se každý den věnovala pozornost jedné konkrétní droze.

### Den zaměřený na konopí/marihuanu

- rozbor učiva
  - komunikace se studenty – zjištění, co vše vědí a co ne
  - seznámení se s konopím a marihuanou – obecné informace o rostlině
  - chemická stránka
  - účinky drogy na organismus
  - rizika spojená s užíváním konopí
- výukové cíle
  - seznámení s konopím nejen jako drogou, ale také jako plodinou;
  - pochopení studentů, jak zacházet s touto rostlinou
  - pochopení studentů, proč by se měli chránit před drogami
- metody
  - komplexní – projektová výuka
- forma výuky
  - kombinovaná forma výuky
- praktický výstup
  - žáci zhotoví krátkou seminární práci na téma využití konopí

## 5. Diskuse

### 5.1. Extrakce DNA

Při extrakci DNA jsme vždy neměli nejlepší výtěžek. Hodnoty extrahované DNA se pohybovaly v rozmezí od 4,7 ng/μl po 64,1 ng/μl. Bohužel nízké hodnoty koncentrace nebyly pouze ojedinělé, u vzorků KUP – H jsme naměřili nejnižší koncentrace DNA – průměr 7,99 ng/μl. To může svědčit o nesprávném odebrání nebo nevhodném zacházení se vzorky, tj. degradaci v důsledku špatného sušení vzorků.

### 5.2. Test anelingové teploty gradientem

Gradientovým testem annealingové teploty jsme zjistili, že PCR reakce nejlépe probíhají s primery E07, D02 a B05 pro teplotu 52°C. Proto jsme pro tyto vybrané primery u následujících PCR reakcí v programech ve 3. kroku používali teplotu 52°C.

### 5.3. Gelová elektroforéza gradientu

Agarový gel gradientu potvrdil, že PCR reakce ve všech případech proběhla, avšak dle snímků lze vidět, že průběh není ideální. Mezery mezi PCR produkty ukazují na nějaký faktor, nejpravděpodobněji „lidský“ – pravděpodobně chyba při pipetování. Lze si toho povšimnout na řadách B, D a především G. Obecně však můžeme říct, že PCR proběhla a tyto primery jsou obecně v našich laboratorních podmínkách dobře použitelné.

### 5.4. Fragmentační analýza

Fragmentační analýza potvrdila vhodnost a použitelnost pro stanovení velikosti amplifikovaných PCR produktů pro testované markery (tj. primerové kombinace za použití značených primerů). Potvrdila předpokládaný fakt, že nízké koncentrace DNA při PCR reakci vedou k nízké koncentraci amplifikovaných produktů, které způsobují chyby při fragmentační analýze (buď absence detekovaných produktů nebo nejednoznačná detekce, tj. nízké tzv. peaky). Hezké separace si můžeme povšimnout v případě prvního a druhého řádku v **Příloze b**), kdy nám PCR produkty vyskočily nad žebřík a lze je tak snadno odečíst z grafu. Naopak ve třetím a čtvrtém řádku si můžeme povšimnout hodnot nižších než žebřík samotný. To ukazuje na nedostatečnou koncentraci DNA. V případě prvního řádku grafu, konkrétně u primerů B05 a E07 (barva D2 – černá) můžeme vidět jeden peak, což ukazuje na homozygotní rostlinu. Naopak v případě druhého řádku u primerů B05 a E07 (opět D2) vidíme 2 peaky vedle sebe, což značí heterozygotní rostlinu.

Námi zkoušené laboratorní metody se ukázaly jako vhodné pro použití se vzorky konopí. Primery E07, D02 a B05 nám při PCR reakcích běžely, což se ukázalo při následné kontrole na agarózovém gelu.

Fragmentační analýza se také osvědčila, obzvlášť u vysokých koncentrací. Proto je tyto laboratorní metody možné uplatnit při spolupráci s KÚP a aplikovat je na vzorcích z pěstíren.

## 6. Závěr

Psaní této bakalářské práce bylo pro mě od začátku do konce výzvou. Nejen, že jsem pronikla do problematiky konopí v podobě psaní literární rešerše, ale zároveň jsem si rozšířila obzory prací v laboratoři, což bylo pro mě jakožto studentku učitelské dvoukombinace úplnou novinkou.

První – teoretická část práce obsahuje literární přehled, který jednak popisuje taxonomickou charakteristiku, využití, léčivé účinky a obsahové látky, ale také trestní problematiku, druhá – praktická část se zabývá popisem rostlinného materiálu, extrakcí DNA, PCR reakcemi, gelovou elektroforézou a fragmentační analýzou. Poslední část práce se zabývá výsledky, didaktickou analýzou daného tématu a diskusí.

Námi odzkoušené laboratorní metody se zdají být vhodné pro budoucí využití ve forenzní praxi, ale naleznou se zde i úskalí, se kterými je nutno počítat. Hlavním problémem mohou být špatně odebrané vzorky, popřípadě špatně vysušené vzorky, díky čemuž přicházíme o výtěžek extrahované DNA. Dalším limitujícím faktorem je sám člověk. Mé laboratorní začátky nesly jako důsledek drobnější nepřesnosti; i běžná rutinní laboratorní práce vyžaduje určitou praxi, kterou lze získat opakováním.

## 7. Literatura

- Alghanim H. J., Almirall J. R. (2003): Development of microsatellite markers in *Cannabis sativa* for DNA typing and genetic relatedness analyses. - *Anal Bioanal Chem*; 376(8):1225-33.
- Anonym (2003): on-line publikace: [www.uzis.cz]. - Ústav zdravotnických informací a statistiky, Praha.
- Backes M. (2016): *Konopná lékárna, Využití léčivého konopí v praxi.* – Fontána. ISBN 978-80-7336-823-4.
- Booth M. (2004): *Konopí: dějiny.* – BB art, Praha. 1., vyd. v českém jazyce. ISBN 80-7341-348-5.
- Bowles D.W. et al. (2012): The Intersection between Cannabis and Cancer in the United States. - *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 83, č. 1, 2012, s. 1-10.
- Byng J. W., Chase M. W., Christenhusz M. J. M., Fay M. F., Judd W. S., Mabberley D. J., Sennikov A. N., Soltis D. E., Soltis P. S. & Stevens P. F. (The Angiosperm Phylogeny Group) (2016): An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. - *Botanical Journal of the Linnean Society* 181: 1–20. doi: 10.1111/boj.12385.
- Claussen U. et al. (1966): Zur chemischen klassifizierung von pflanzen XXXI. Haschisch X. Cannabichromen, ein neuer haschisch-inhalts-stoff – *Tetrahedron letters*; 22(4): 1477-1479.
- Cooper J. C. (1984): *Chinese Alchemy.* - Wellingborough, Northamptonshire: The Aquarian Press.
- Crombie L., Ponsford R. (1968): Hashish components. Photochemical production of cannabicyclol from cannabichromene. - *Tetrahedron Letters*; (55): 5771-2.
- Dhossche D. M., Rich C. L., Isacson G. (2001): Psychoactive substances in suicides. Comparison of toxicologic findings in two samples. - *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*; 22(3): 239-243.
- Dupal L. (2010): *Kniha o marihuaně.* - Maťa, Praha. 3., dopl. vyd. ISBN 978-80-7287-136-0.
- ElSohly M. A., Slade D. (2005): Chemical constituents of marihuana: The complex mixture of natural cannabinoids. - *Life Sciences*, 539-548.
- EMCDDA (2004): *Komorbidity: užívání drog a duševní poruchy.* Drug in Focus, - 14. Lisabon: EMCDDA. ISSN 1681-5157.
- Field T., Diego M., Sanders C. E. (2001): Adolescent suicidal ideation. - *Adolescence*; 36 (142), 241-248.

Gaoni Y., Mechoulam R. (1966): Cannabichromene, a new active principle in hashish. - Chemical Communications; 0, 20-21.

Gaoni Y., Mechoulam R. (1964): Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. - Proceedings of the Chemical Society of London; 86(8): 1646-1647.

Gruber U. (1991): Nepal. – Prestel, München. ISBN 9783791311210.

Hall W., Degenhardt L. (2000): Cannabis use and psychosis: a review of clinical and epidemiological evidence. Australian and New Zealand Journal of Psychiatry; 34(1): 26-34.

Hanuš L., Yoshida T., Krejčí, Z. (1975): Production of delta-9-tetrahydrocannabinol from hemp cultivated in climatic conditions of Czechoslovakia. - Acta Universitatis Palackianae Olomucensis, Facultatis Medicae.

Holmwood C. (2003): Comorbidity of Mental Disorders and Substance Use. A Brief Guide for the Primary Care Clinician. - Adelaide: Commonwealth Department of Health and Ageing. ISBN 1-74186-773-8.

Honzík R., Bjelková M., Muňoz J., Váňa V. (2012): Pěstování konopí setého *Cannabis sativa L.* pro výrobu bioplynu. Metodika pro praxi. - Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Howard C., Gilmore S., Robertson J. & Peakall R. (2008): Application of new DNA markers for forensic examination of *Cannabis sativa* seizures - Developmental validation of protocols and a genetic database. - Monograph Series No. 29. National Drug Law Enforcement Research Fund (NDLERF), Hobart TAS, Australia.

Chopra G. S., Smith H.W. (1974): Psychotic reactions following cannabis use in East Indians. - Archives of General Psychiatry; 30(1): 24-27.

McPartland J. M. & Guy W. G. (2017): Models of *Cannabis* Taxonomy, Cultural Bias, and Conflicts between Scientific and Vernacular Names. – Bot. Rev; 83: 327–381.

José M. (2016): Jak pěstovat outdoor aneb konopí na zahrádce. - Nava s. r. o., Plzeň. ISBN 978-80-260-1435-5.

Kabelík J., Krejčí Z., Šantavý F. (1960): Cannabis as a medicament. - Bulletin on Narcotics; 12: 5-23.

Kimura K. & Takeatsu K. (1978): Medicinal Plants of Japan. - Hoikusha Publishing Co., Osaka.



- Krejčí Z. & Šantavý F. (1955): Isolace dalších látek z listů indického konopí *Cannabis sativa* L. - Acta Universitatis Palackianae Olomucensis.
- Kreuz D.S., Axelrod J. (1973): Delta-9-THC: Localization in body fat. – Science; 179(4071): 391-3.
- Lehmann T. (1995): Chemische Profilierung von *Cannabis sativa* L. - Dissertation, Bern.
- Li H. (1974): The Origin and Use of Cannabis in Eastern Asia: Linguistic-cultural Implications. - Economic Botany; 28: 293-301.
- Malla S. B. et al. (1982): Wild Edible Plants of Nepal. - Ministry of Forests, Kathamandu.
- McGilveray J. (2005): Pharmacokinetics of cannabinoids. - Pain Research and Management; 10 (Suppl. A): 15A - 22A.
- Miovská L., Miovský M. & Václavková B. (2008): Přehled hlavních výsledků kvaziexperimentální evaluační studie komunitního programu primární prevence. - Centrum adiktologie PK 1. LF UK v Praze, o.s. PrevCentrum Praha, Praha.
- Mioviský M. et al. (2008): Konopí a konopné drogy: Adiktologické kompendium. - Grada Publishing, a.s., Praha.
- Moudrý J., Stražil Z. (1996): Alternativní plodiny. - JU ZF České Budějovice.
- Mravčík V. et al. (2003-2017): Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2002-2016. [Annual Report on Drug Situation 2002-2016 – Czech Republic]. - Úřad vlády České republiky, Praha.
- Murphy L., Bartke A. (1992): Marijuana/Cannabinoids: Neurobiology and Neurophysiology. - CRC Press, Boca Raton.
- Tošovská M., Buchtová I. (2010): Len a konopí 2010. Situační a výhledová zpráva. - MZe ČR, Praha.
- Namba T. (1980): Coloured Illustrations of Waken-Yaku. - Hoikusha Publishing Co., Osaka.
- Ruman, M. (2014): *Cannabis* konopí Průvodce světem univerzální rostliny. - Malý princ, Praha. ISBN 978-80-87754-13-9.
- Pitts J.E., Neal J. D., Gough T. A. (1992): Some features of Cannabis plants grown in the United Kingdom from seeds of known origin. - Journal of Pharmacy and Pharmacology
- Probst E. (1996): Deutschland in der Bronzezeit. - C. Bertelsmann, München.

Rätsch Ch. (1998): Marihuana jako lék. Etnomedicína, užívání a recepty na léčení konopím. - Fontána, Olomouc. ISBN 978-80-7336-703-9.

Regier D. A., Farmer M.E., Rae D.S. et al. (1990): Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse: Results from the Epidemiologic Catchment Area (ECA) study. - Journal of American Medical Association; 264: 2511-2518.

Renfrew J. M. (1973): Paleoethnobotany: The Prehistoric Food Plants of the Near East and Europe. - Columbia University Press, New York.

Robins L. N., Regier D. A. et al. (1991): Psychiatric disorders in America: The Epidemiological Catchment Area study. - The Free Press, New York.

Robson P. (2001): Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids. - British Journal of Psychiatry; 178: 107-15.

Schönfelder I., Schönfelder P. (2010): Léčivé rostliny. Přeložila Jana JINDROVÁ. Praha: Ottovo nakladatelství, 2010. Ottův průvodce přírodou. ISBN 978-80-7360-588-9.

Singh M. P. et al. (1979): Medical Plants of Nepal - Retrospects and Prospects. - Economic Botany; 33(2): 193.

Smith R. M., Kempfert K. D. (1977): Delta1-3,4-cis-Tetrahydrocannabinol in *Cannabis sativa*, - Phytochemistry; 16: 1088-1089.

Storl W. D. (1988): Feuer und Asche – Dunkel und Licht: Shiva – Urbild des Menschen. - Buer, Freiburg im Breisgau.

Tien A. Y., Anthony J. C. (1990): Epidemiological analysis of alcohol and drug use as risk factors for psychotic experiences. - Journal of Nervous and Mental Disease; 178: 473-480.

Van Os J., Bak M., Hanssen M. et al. (2002): Cannabis use and psychosis: a longitudinal population-based study. - American Journal of Epidemiology; 156(4): 319-327.

Watt G. & Karl T. (2017): In vivo Evidence for Therapeutic Properties of Cannabidiol (CBD) for Alzheimer's Disease. Front Pharmacol; 8: 20.

Zábranský T., Radimecký J., Mravčík V., Gajdošíková H., Petroš O., Korčíšová B., Miovský M., Vopravil J., Csémy L., Kuda A. (2002): Výroční zpráva o stavu ve věcech v České republice v r. 2001 (Annual

Report on Drug Situation 2001 – Czech Republic). - Národní monitorovací středisko pro drogy a drogové závislosti & EMCDDA, Praha & Lisabon.

## 8. Přílohy

### Příloha a) Rozhodnutí o povolení k zacházení

#### MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ

P.O. BOX 81, Palackého nám. 4, 128 01 Praha 2  
Tel.: +420-224 972 705, +420-224 916 020  
Fax: +420-224 915 979  
e-mail: opl@mzcr.cz

Č.j.: 23849/2016-8/OPL ze dne 19.7.2016  
STEJNOPIS 1  
Dne: 3.8.2016  
Počet stran celkem:



Ministerstvo zdravotnictví jako správní orgán příslušný k rozhodnutí o vydání povolení k zacházení s návykovými látkami a přípravky podle § 8 zákona č. 167/1998 Sb., o návykových látkách a o změně některých dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, vydává toto

## ROZHODNUTÍ o povolení k zacházení

číslo 86 / 2016.

Na základě komplexního posouzení žádosti ze dne 19.07.2016 se vydává pro

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Křížkovského 8, 771 47 Olomouc, IČO 61989592,**

povolení k zacházení podle § 4 zákona č. 167/1998 Sb.,  
o návykových látkách a o změně některých dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů,  
v dále stanoveném rozsahu.

Rozdělovník: stejnopis 1 Účastník řízení:  
originál Ministerstvo zdravotnictví  
Strana: 1

pro: Univerzita Palackého v Olomouci  
Křížkovského 8, 771 47 Olomouc, IČO 61989592,  
Rozhodnutí č.: 86 / 2016

**Příloha b)** Zobrazení grafické analýzy testovaných vzorků, D2 (černě), D3 (zeleně) a D4 (modře) jsou jednotlivé barvy molekulárních markerů.

