

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Antimikrobiální potenciál konopného extraktu
enkapsulovaného do vybraných anorganických nosičů**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Jonáš Kycil

**Obor studia : Kvalita potravin a zpracování zemědělských
produktů**

Vedoucí práce: Ing. Anežka Kosmáková Janatová, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Antimikrobiální potenciál konopného extraktu enkapsulovaného do vybraných anorganických nanonosičů" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21.4.2024

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Anežce Kosmákové Janatové, Ph.D., nejen jako vedoucí mé práce za trpělivost, ochotu a cenné rady při zpracování mé diplomové práce, dále bych chtěl poděkovat Ing. Tomášovi Skalovi za jeho hodnotné rady, trpělivost a pomoc při práci v laboratoři a zpracování diplomové práce.

Antimikrobiální potenciál konopného extraktu enkapsulovaného do vybraných anorganických nosičů

Souhrn

V posledních letech se dostává konopí a jeho terapeutické využití stále častěji do povědomí a diskuzí mnoha vědeckých prací. Studie ukazují, že účinné látky konopí (zejména kanabinoidy a terpeny) mají velký léčebný potenciál u mnoha onemocnění. V literární rešerši byly shrnuty základní poznatky o konopí a biologicky aktivních látkách, dále také o využití enkapsulace rostlinných biologicky aktivních látek do anorganických nanonosičů a jejich další využití v oblasti medicíny.

Tato práce byla zaměřena na vyhodnocení antimikrobiální aktivity konopného extraktu enkapsulovaného do anorganických nanonosičů. Extrakt konopí z kultivaru Chocolepe byl enkapsulován do dvou nanonosičů a to do nanojílu v hmotnostním poměru (nanojíl:konopí) 1:1 a 2:1. V případě MCM-41 byl poměr 1:1, a následně byla provedena jejich charakteristika. Antimikrobiální aktivita byla hodnocena metodou minimální inhibiční koncentrace (MIC) udávající hodnotu, při kterém je růst inhibován o 80 % ve srovnání s kontrolou růstu. Stupeň inhibice bakteriálního růstu byl hodnocen po 24 hodinách, u plísní po pěti dnech. Dále byl testován cytotoxický efekt na lidských buňkách kůže

Charakterizace připravených částic potvrdila jejich nanovelikost. Dále bylo zjištěno, že nejcitlivějšími bakteriemi při použití jílu jako nanomateriálu byly kmeny *S. epidermis* ($MIC_{80} = 16\text{--}128 \mu\text{g/ml}$). Pozitivní vliv enkapsulace konopného extraktu do jílu se projevila téměř u všech testovaných kmenů bakterií. V případě dermatofytů se hodnota MIC_{80} ve většině případech snížila o polovinu, u kmene *Trichophyton rubrum* dokonce o osminásobek. MCM-41 u plísní prokázalo výrazně lepší výsledky než u bakterií. Nejcitlivějším kmenem plísní byl *Epidermophyton floccosum*, koncentrace MIC_{80} se po enkapsulaci konopného extraktu snížila o polovinu oproti použití pouhého nanomateriálu ($64 \mu\text{g/ml}$). Nejvyšší snížení koncentrace MIC_{80} jsme zaznamenali u kmenů *Arthoderma insingulare* a *Nannizzia gypsea*, kde použití samotného nanomateriálu neprokázalo žádnou antifungální aktivitu, po enkapsulaci konopného extraktu se prokázala antifungální aktivita ($MIC_{80} = 512 \mu\text{g/ml}$).

Nanomateriály dále prokázaly relativně nízkou hodnotu cytotoxicity na lidských keratinocytech oproti samotným konopným extraktům.

Enkapsulace konopného extraktu do nanomateriálu by mohla nabídnout vhodnou doplňkovou léčbu při léčbě některých kožních onemocnění způsobených patogenními mikroorganismy. Dále by mohlo dojít ke zlepšení topické aplikace a zvýšení biodostupnosti biologicky aktivních látek konopí.

Klíčová slova: konopí, extrakt, nanomateriál, antimikrobiální aktivita, kožní onemocnění

Antimicrobial potential of cannabis extract encapsulated in selected inorganic nanocarriers

Summary

In recent years, cannabis and its therapeutic use have increasingly come to the attention and discussion of many scientific works. Studies show that the active substances of cannabis (especially cannabinoids and terpenes) have great therapeutic potential for many diseases. The literature search summarized basic knowledge about cannabis and biologically active substances, as well as the use of encapsulation of plant biologically active substances in inorganic nanocarriers and their further use in the field of medicine.

This work was focused on evaluating the antimicrobial activity of cannabis extract encapsulated in inorganic nanocarriers. Cannabis extract from the Chocolope cultivar was encapsulated in 2 nanocarriers, namely in nanoclay in a mass ratio (nanoclay:cannabis) of 1:1 and 2:1. In the case of MCM-41, the ratio was 1:1, and their characterization was subsequently performed. Antimicrobial activity was evaluated by the minimum inhibitory concentration (MIC) method indicating the value at which growth is inhibited by 80 % compared to the growth control. The degree of inhibition of bacterial growth was evaluated after 24 hours, for fungi after 5 days. Furthermore, the cytotoxic effect on human skin cells was tested

Characterization of the prepared particles confirmed their nanosize. Furthermore, it was found that the most sensitive bacteria when using clay as a nanomaterial were strains of *S. epidermis* ($MIC_{80} = 16\text{--}128 \mu\text{g/ml}$). The positive effect of the encapsulation of cannabis extract in clay was manifested in almost all tested strains of bacteria. In the case of dermatophytes, the MIC_{80} value was reduced by half in most cases, in the case of *Trichophyton rubrum* even by eight times. MCM-41 performed significantly better in fungi than in bacteria. The most sensitive fungal strain was *Epidermophyton floccosum*, the MIC_{80} concentration was reduced by half after encapsulation of the cannabis extract compared to the use of only nanomaterial ($64 \mu\text{g/ml}$). We recorded the highest MIC_{80} concentration reduction in *Arthoderma insingulare* and *Nannizzia gypsea* strains, where the use of the nanomaterial alone did not show any antifungal activity, after encapsulation of the cannabis extract, antifungal activity was demonstrated ($MIC_{80} = 512 \mu\text{g/ml}$).

Furthermore, the nanomaterials showed a relatively low value of cytotoxicity on human keratinocytes compared to cannabis extracts alone.

The encapsulation of cannabis extract into a nanomaterial could offer a suitable complementary treatment in the treatment of some skin diseases caused by pathogenic microorganisms. Furthermore, there could be an improvement in topical application and an increase in the bioavailability of the biologically active substances of cannabis.

Keywords: cannabis, extract, nanomaterial, antimicrobial activity, skin diseases

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3	Literární rešerše.....	11
3.1	Historie	11
3.2	Popis rostliny	12
3.2.1	Pěstování konopí	13
3.2.2	Outdoor pěstování	14
3.2.3	Indoor pěstování	15
3.3	Biologicky aktivní látky	16
3.3.1	Silice	16
3.3.2	Kanabinoidy.....	17
3.3.2.1	Delta-9-tetrahydrokanabinol (Δ^9 -THC).....	18
3.3.2.2	Kanabidiol (CBD)	18
3.3.2.3	Kanabigerol (CBG).....	19
3.3.3	Terpeny	19
3.3.4	Myrcen	20
3.3.4.1	Limonen	20
3.3.4.2	β -Karyofylen	21
3.3.5	Ostatní látky	21
3.4	Konopí a jeho účinky	21
3.4.1	Endokanabinoidní systém (ES)	22
3.4.2	Dermatologické onemocnění	23
3.4.3	Potenciál léčebného konopí	25
3.4.4	Dostupné formy léčebného konopí.....	26
3.4.5	Konopné extrakty	26
3.5	Kožní mikroflóra.....	27
3.5.1	Bakterie	27
3.5.2	Plísně	28
3.6	Nanomateriály	29
3.6.1	Nanočástice	29
3.6.2	MCM-41.....	29
3.6.3	Nanojíl (bentonit)	30
3.6.4	Enkapsulace.....	30
3.7	Legislativa konopí.....	31
3.7.1	Legislativa v ČR	32

4	Metodika	33
4.1	Použité chemikálie	33
4.2	Charakteristika konopného extraktu	33
4.2.1	Kanabinoidy.....	34
4.2.2	Terpeny	35
4.3	Příprava nanočástic.....	35
4.3.1	Jíl	35
4.3.2	MCM-41.....	35
4.4	Charakterizace nanočástic.....	36
4.4.1	Velikost částic a zeta potenciál	36
4.4.2	Transmisní elektronová mikroskopie (TEM).....	36
4.4.3	Termogravimetrie	36
4.5	Antimikrobiální aktivita	37
4.5.1	Testované mikroorganismy.....	37
4.5.2	Mikrodiluční metoda.....	37
4.5.2.1	MIC ₈₀ bakterie	38
4.5.2.2	MIC ₈₀ plísně	38
4.6	Cytotoxicita.....	38
4.6.1	Kultivace.....	38
4.6.2	Test životaschopnosti.....	38
4.7	Vyhodnocení dat.....	39
5	Výsledky	40
5.1	Charakterizace konopného extraktu.....	40
5.2	Charakteristika nanočástic	41
5.2.1	Velikost částic a zeta potenciál	41
5.2.2	Transmisní elektronová mikroskopie (TEM).....	46
5.2.3	Termogravimetrie	47
5.3	Antimikrobiální aktivita	47
5.3.1	Bakterie.....	47
5.3.2	Plísně.....	47
5.4	Cytotoxicita.....	49
6	Diskuze	50
7	Závěr.....	52
8	Literatura	53

1 Úvod

Konopí (*Cannabis sativa* L.) se řadí mezi jednu z nejstarších kulturních plodin na světě. Pro své léčebné účinky se používá již po tisíciletí. V posledních letech se zájem o léčebný potenciál konopí zvýšil a probíhá mnoho výzkumů, které zkoumají jeho účinnost při léčbě široké škály onemocnění, například v rámci léčby kožních onemocnění, výzkumy potvrzují jeho antimikrobiální aktivitu.

Infekční kožní choroby představují celosvětové zdravotní riziko a stále častěji se stávají rezistentní vůči běžně používaným antibiotikům. V tomto kontextu se hledají nové antimikrobiální látky s širokým spektrem účinku a nízkým výskytem rezistence. Potenciál konopí jakožto doplňkové nebo přímo hlavní léčby, se poslední roky intenzivně testuje na široké škále onemocnění. Jednou skupinou z těch, kde lékařské studie a pozorování vykazují pozitivní závěry, jsou kožní onemocnění.

Konopný extrakt obsahuje celou řadu bioaktivních sloučenin, zejména kanabinoidů, terpenů, které vykazují antimikrobiální aktivitu proti široké škále bakterií, plísní a virů. Kanabinoidy, jako je kanabidol (CBD) a tetrahydrokanabinol (THC), vykazují protizánětlivé, analgetické a antioxidační vlastnosti, které mohou přispívat k jejich antimikrobiálnímu účinku. Terpeny, jako je například β -karyofylen prokazují dle studií antibakteriální a antimykotickou aktivitu. Jedním z hlavních omezení konopného extraktu je jeho špatná rozpustnost ve vodě a náchylnost k chemické degradaci a biologické inaktivaci, což ovlivňuje jeho stabilitu a účinnost. Jednou z perspektivních strategií pro překonání těchto technických problémů je enkapsulace konopného extraktu do nanomateriálů, které ochrání extrakt před vnějšími vlivy a umožní jeho cílené uvolňování na pokožku.

Vzhledem k širokému využití konopí v medicíně, zejména extraktů z konopí s vysokým obsahem THC a CBD, které obsahují další biologicky aktivní látky, by mohlo být jejich kombinování s enkapsulací do nanonosičů velmi perspektivním přístupem při léčbě kožních onemocnění.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cíl práce:

Cílem práce bylo připravit, charakterizovat a otestovat antibakteriální a antimykotickou aktivitu konopného extraktu enkapsulovaného do vybraných anorganických nanonosičů na bázi křemíku proti patogenním mikroorganismům kůže.

Hypotézy práce:

- 1) Konopný extrakt je možné enkapsulovat do křemičitého nanonosiče
- 2) Enkapsulovaný extrakt má stejnou nebo vyšší antimikrobiální aktivitu než extrakt samotný

3 Literární rešerše

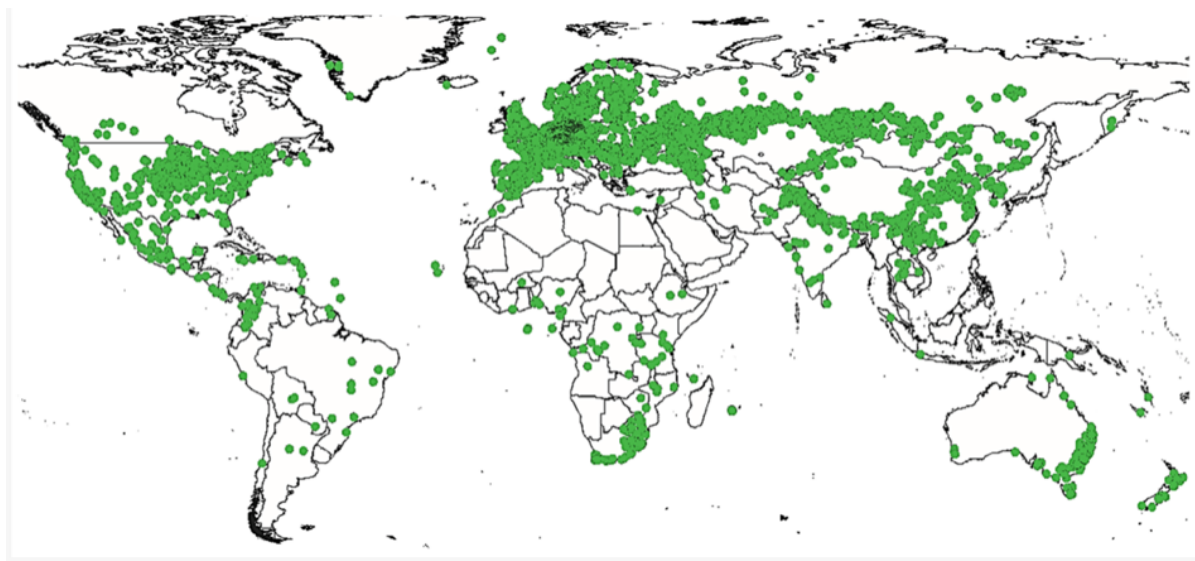
3.1 Historie

Konopí se řadí mezi jednu z nejstarších kulturních plodin na světě. Pro své léčebné účinky se používá již po tisíciletí. Jeden z prvních doložených dokumentů o léčebném účinku pochází z období 2800 př.n.l. z lékopisu císaře Šen–nunga. V roce 2000 skupina archeologů provádějící vykopávání hrobek Jang–čaj objevila zachovalý vzorek rostliny, ve kterém se po dalších analýzách potvrdila přítomnost tetrahydrokanabinolu (THC). Jedná se o nejstarší fyzický důkaz farmakologicky aktivního konopí (Pain, 2015). Tradiční Japonská medicína, která vychází z čínského lékopisu považovala přípravky na bázi konopí jako mírné projímadlo, ale zároveň jako léčebný prostředek proti střevním parazitům a kožním patologickým onemocněním, dále jako lék tlumící bolesti hlavy, nespavost, kašle a astmatu (Pisanti & Bifulco, 2019). Konopí se dále šířilo po střední Asii prostřednictvím Hedvábné stezky spojující Čínu s Íránem. Řecký historik Hérodotos napsal, že kočovní Skythové ovládající území Sibíře až po východní Evropu si stavěli stany a pomocí žhavých kamenů vdechovali konopné výpary (Lawler, 2019).

Vědecká historie konopí začíná v 19.století, kdy irský lékař William Brooke O'Shaughnessy působící v Indii, kde prováděl svoje experimenty po návratu zpět do Evropy začal šířit mezi lékařskou komunitu svoje poznatky o farmakologických a toxikologických účincích konopí (MacGillivray, 2017). Druhá polovina 19. století se vyznačovala nárůstem využití konopí v medicíně, toto období je označováno jako zlatá éra konopí. V této době začal přibývat počet publikací jak v Evropě, tak ve Spojených státech. Na trhu se začaly objevovat různé přípravky jako tinktury, pilulky nebo extrakty, které byly předepisovány zejména pro své analgetické a protizánětlivé účinky (Franhauser, 2002).

V průběhu 20. století čelilo užívání konopí několika překážkám, zejména ve Spojených státech. Tato následná opatření zahrnovala zákon o dani z marihuany z roku 1937. Zákon o dani z marihuany z roku 1937 představoval významný zlom v regulaci konopí, ukládající omezení a daně na jeho užívání. Následné odstranění konopí z amerického lékopisu dále upevnilo právní omezení jeho léčebného užití. Jednotná úmluva o omamných látkách z roku 1961, globální smlouva, zařadila konopí do přísných kontrolních opatření, zarovnávajíc ho s výrazně regulovanými látkami jako je heroin. Tyto legislativní kroky nejen formovaly právní prostředí kolem konopí, ale také ovlivnily veřejné vnímání a přístup k této rostlině. Historický vývoj regulací konopí odráží složitou interakci mezi společenskými postoji, politickými agendami a rozvíjejícím se vědeckým poznáním vlastností a účinků této rostliny (Crocq, 2020). Léčebné konopí zažívá v posledních letech nový zlatý věk. Téma léčivého konopí má velký význam pro veřejné zdraví, v budoucnu by mohlo konopí nahradit nebo alespoň doplnit užívání opiátů, díky své schopnosti tlumit bolesti. Klíčovým hráčem v oblasti lékařského konopí je kanabidiol (CBD), který má terapeutické využití bez vedlejších psychoaktivních účinků. V roce 2018 byl Epidiolex jako první lék na bázi kanabidiolu schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv. Historie nám sděluje a učí nás o farmakologickém potenciálu konopí, nyní musíme investovat úsilí a čas do informativního výzkumu, shromáždit výsledky

a přesvědčivé vědecké důkazy o jeho léčebných ale i negativních účincích (Pisanti & Bifulco, 2019).



Obrázek č. 1: Geografické rozložení distribuce konopí (Hourfane et al., 2023)

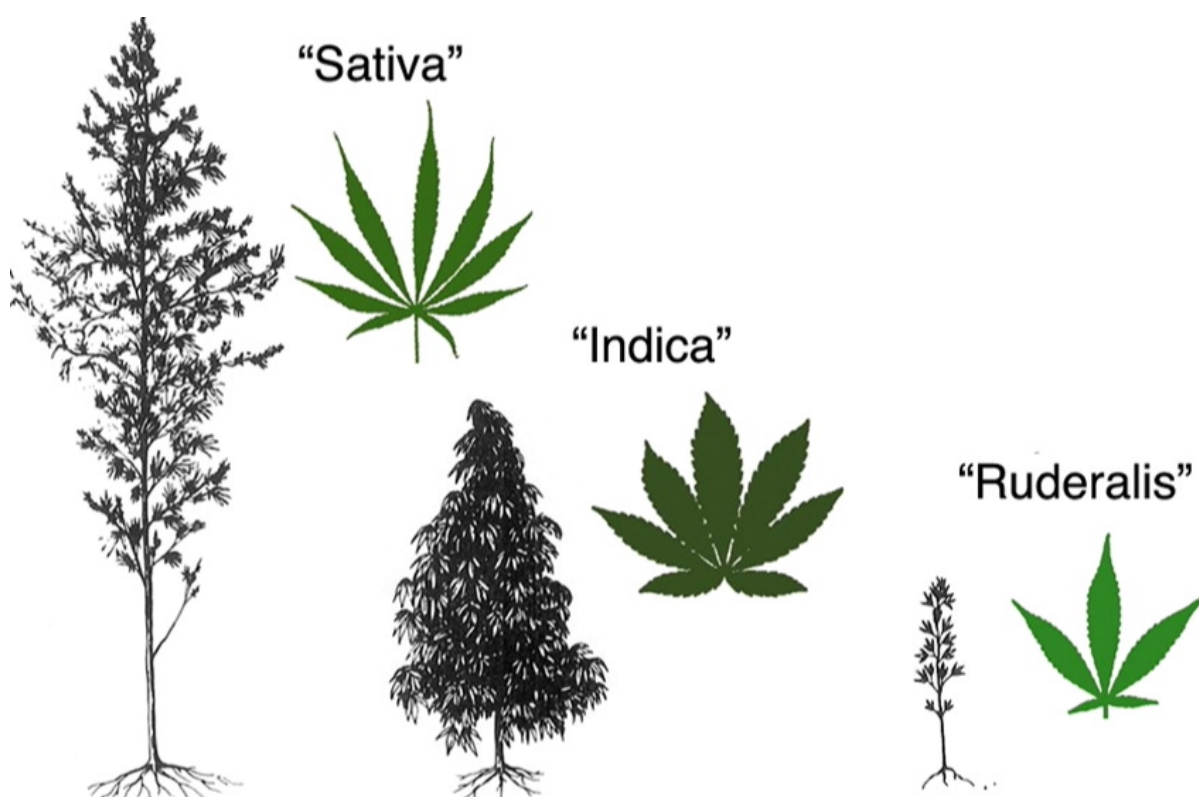
3.2 Popis rostliny

Carolus Linnæus, známý také jako Carl von Linné (1707–1778), byl průkopníkem v oblasti klasifikace živých organismů do tříd a podtříd. Jeho snahou bylo vytvořit jednotný mezinárodní systém pro identifikaci jakéhokoli živého organismu na základě jeho morfologických charakteristik. Tento systém pracuje s rody a druhy, které jsou známy pod pojmem „binomická nomenklatura“. V roce 1753 Carl von Linné poprvé zmínil slovo *Cannabis*. Toto slovo je odvozeno z latinského *canna*, což znamená „rákos“, a *bis*, což znamená „dvakrát“, což symbolizuje „rákos s dvěma pohlavími“ (Pollio, 2016).

C. Sativa je dvoudomá, jednoletá kvetoucí rostlina dosahující výšky až pět metrů. Rostlina se po tisíciletí využívala na výrobu vláken, oleje a také jako přísada do potravin. Obsahuje řadu významných látek jako jsou kanabinoidy, terpenoidy, flavonoidy, alkaloidy a další. Stonky jsou hranaté, brázdité, rozvětvené a uvnitř duté. Kořeny jsou adventivní (vyrůstají ze spodní části stonku nebo orgánů stonkového původu–oddenky), nerozlišené na hlavní a postranní. V kyprých půdách kořeny dosahují délky až 2,5 metru a jsou rozvětvené po povrchu, obvykle dosahují okolo 30–60 cm hloubky, ve velmi vlhkých půdách jsou více rozvětvené. Listy jsou 6–11 cm dlouhé a 2–15 mm široké s vroubkovanými okraji (Frag & Kayser, 2017).

Konopí se dělí na tři druhy–*Cannabis sativa*, *Cannabis indica* a *Cannabis ruderalis*, v tomto ohledu však panují značné neshody (Hillig & Mahlberg, 2004). *Cannabis sativa*, známá také jako konopí, je nejběžnějším poddruhem na západě (Amerika), který se vyznačuje vysokou, štíhlou rostlinnou strukturou. Jedná se o fotoperiodickou rostlinu, které kvete v závislosti na délce dne. Tato rostlina je známá svou schopností dosahovat výšek až pět metrů

nebo dokonce více, často s mnoha větvemi, což jí dodává robustní a vznešený vzhled. *C. indica* na druhé straně je charakterizována svou listnatější povahou ve srovnání s *C. sativa*. Je obvykle kratší, s hustším množstvím listů a pupenů, což jí propůjčuje keřovitý vzhled. Tato odrůda konopí typicky dorůstá do výšky okolo 1,2 metrů a má kompaktní strukturu větví, což ji odlišuje od svého příbuzného *C. sativa*. *C. ruderalis*, pocházející z jižního Ruska, je dalším zajímavým poddruhem konopí. Tato odrůda obsahuje minimální množství psychoaktivní látky THC a je známá svou schopností samonakvétání. To znamená, že květy se objevují po dosažení pohlavní zralosti rostliny nezávisle na světelné expozici. *C. ruderalis* se často využívá při šlechtění hybridních odrůd konopí, aby tyto hybridy zdědily samonakvétací charakteristiku. Tato odrůda se dobře adaptuje na nižší teploty než *C. sativa* a obvykle nedosahuje výšky přesahující metr, přičemž má tendenci být nerozvětvená a kompaktní ve svém růstu (Gloss, 2015).



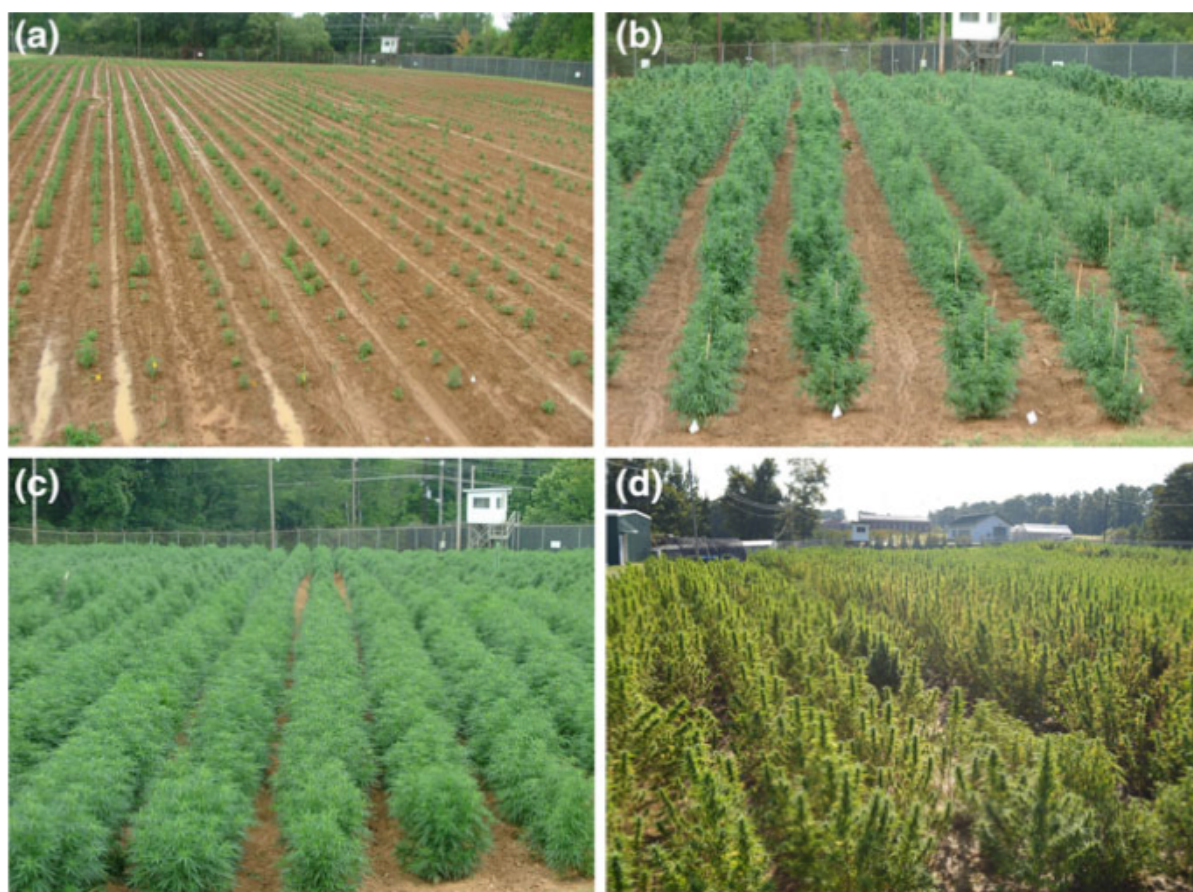
Obrázek č. 2: Druhy konopí (McPartland, 2018)

3.2.1 Pěstování konopí

Pěstování konopí, ať už pro rekreační nebo medicínské účely, zažívá vzestup popularity. Způsob pěstování hraje klíčovou roli v kvalitě a výnosu rostliny, a také v dopadu na životní prostředí. Konopí lze pěstovat tradiční metodou venkovního pěstování nebo pěstováním v uzavřených systémech (Zheng et al., 2021). Rostliny konopí nemají specifické nároky na půdu, nejdůležitějším faktorem z hlediska půdy je její hodnota pH. Ideální pH půdy se pohybuje od mírně zásadité až neutrální půdy. Kyselé půdy se mohou před setím vápnit. Celková výtěžnost a léčebný potenciál rostliny jsou nejvíce závislé na termínu setí, hnojení a abiotických faktorech (Žuk–Gołaszewska et al., 2018).

3.2.2 Outdoor pěstování

Venkovní pěstování je původní metoda pěstování konopí, která je závislá na abiotických faktorech jako je sluneční svit, srážky a dále je náchylná na škůdce (Chandra et al., 2017). Rostlina konopí se může množit ze semen a životní cyklus je dokončen během 4–6 měsíců v závislosti na době výsadby a odrůdě. Může dosáhnout výšky až pět metrů. Její vegetační období trvá 4–6 měsíců. Hermafroditní odrůdy této rostliny byly vyšlechtěny pro průmyslovou produkci konopí, což umožňuje jednodušší plodiny. Proces klíčení rostlin obvykle trvá 3–7 dní. Fáze sazenice je dokončena během 2–3 měsíců. Později se rostlina vyznačuje zvýšenou biomasou a celkovým růstem při dlouhém denním svitu (vegetativní růst), kdy je snadné rozpoznat mužské a ženské pohlaví. Reprodukční fáze konopí začíná později v létě, kdy je rostlina vystavena krátkým denním délkám (méně světla za den než tmě) 12–14 hodin nebo méně, v závislosti na zeměpisné šířce a genetickém původu. Tato metoda se často používá pro kultivaci konopí určeného pro konopné vlákno nebo semena s obsahem THC nižším než 0,2 % (Frag & Kayser, 2017).



Obrázek č. 3: Systém outdoor pěstování (Chandra et al., 2017), a–c vegetativní fáze, d fáze květu

3.2.3 Indoor pěstování

Pro producenta léčebného konopí je důležitá nepřetržitost a stálost produkce konkrétních kanabinoidů a terpenů. Stále více producentů přesouvá svou produkci do vnitřních prostor. V uzavřených a kontrolovaných prostorech je možné nastavit teplotu, vlhkost, intenzitu světla, světelné spektrum a koncentraci CO₂ v prostředí (Magagnini et al., 2018). V uzavřených systémech pěstování konopí běžně dochází díky zavlažování a odpařování vody rostlinami ke kumulaci vlhkosti, proto musí být prostory pro udržení ideálních podmínek vybaveny systémy cirkulace vzduchu a odvětrávání nebo i odvlhčování. Konopí vyžaduje vysokou vlhkost ve fázi sazenic, vyžadují pravidelný postřik listů vodou, aby se udržela vysoká vlhkost jejich mikroklimatu (75 %). Během vegetativní fáze a kvetoucí fáze se vlhkost pohybuje mezi 55–60 % (Chandra et al., 2017). Jedním z nejdůležitějších růstových faktorů konopí je světlo. Fotoperioda, kvalita a intenzita světla hrají důležitou roli ve vegetační a kvetoucí fázi. Pěstování uvnitř také zlepšuje ochranu proti škůdcům a chrání rostlinu před možnými nepříznivými podmínkami, které hrozí při venkovním pěstování. Indoor produkce je velice efektivní, produkce může probíhat celý rok, což znamená, že za jeden rok dokážeme dosáhnout až šesti sklizní za rok. Na druhou stranu je produkce konopí v uzavřených systémech energeticky náročná, kvůli vysoké spotřebě energie (Magagnini et al., 2018).



Obrázek č. 4: Systém indoor pěstování (Frag & Kayser, 2017)

3.3 Biologicky aktivní látky

Konopí je rostlina bohatá na biologicky aktivní látky, které mohou mít různé účinky na lidské tělo. Obsahuje přes 600 různých látek, z nichž nejvýznamnějšími jsou kanabinoidy a terpeny (Bonini et al., 2018). Přestože historie užívání a pěstování konopí sahá alespoň 6000 let zpět, naše současné znalosti o farmakologických vlastnostech této rostliny jsou založeny na výzkumech, které se začaly provádět až ke konci devatenáctého století. První izolovanou sloučeninou v čisté formě z konopné rostliny byl kannabinol (Wood et al., 1899). Původně se chybně předpokládalo, že tato látka je hlavní aktivní složkou rostliny zodpovědnou za její psychoaktivní účinky (Mechoulam & Hanuš, 2000). Následující objevenou sloučeninou byl kanabidiol (CBD) vědci Mechoulama a Shvo (Mechoulam & Shvo, 1963). V roce 1964 pak Gaoni a Mechoulam izolovali další klíčovou aktivní látku, delta-9-tetrahydrokanabinol (Δ -9-THC) (Gaoni & Mechoulam, 1964). Biologicky aktivní látky aromatických a léčivých rostlin jsou poměrně nestabilní látky se silným zápachem, jsou málo rozpustné ve vodě a během zpracování a skladování mohou rychle degradovat. Tuto vlastnost můžeme omezit technologií enkapsulace, která nabízí ochranu, řízené a cílené uvolňování zapouzdřených biologicky aktivních látek (Vinceković et al., 2021).

3.3.1 Silice

Silice jsou komplexní směsi těkavých organických látek biosyntetizovanými živými organismy. Silice jsou extrahovány z jejich matrice pomocí metod lisování, destilace nebo extrakce. Rostliny produkují tyto látky pro obranu, signalizaci nebo jako produkt svého sekundárního metabolismu, tudíž představují důležitý zdroj obnovitelných produktů. Mezi známé čeledi bohaté na silice patří *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Cupressaceae*.

V rostlinách mohou být silice syntetizovány v jakékoli části rostliny (listy, stonky, plody, kůra, pupeny), následně jsou uchovávány v sekrečních buňkách, v kanálcích nebo dutinách a nebo ve žláznatých trichomech (Hüsnü et al., 2007). Trichomy produkují pryskyřici bohatou především na kanabinoidy ve formě kyseliny tetrahydrokanabinolové (THCA) a kyseliny kanabidiolové (CBDA) (Dalli et al., 2023).

Složení konopných silic (chemický profil) a výtěžnost extrakce může ovlivnit několik faktorů, jako je genotyp, způsob kvetení, technika pěstování, hustota rostlin, stadium vývoje při sklizni, zpracování materiálu a podmínky skladování, a také zvolená metoda extrakce a extrakční rozpouštědlo (Pieracci et al., 2021).



Obrázek č. 5: Trichomy na listech konopí (Potter, 2014)

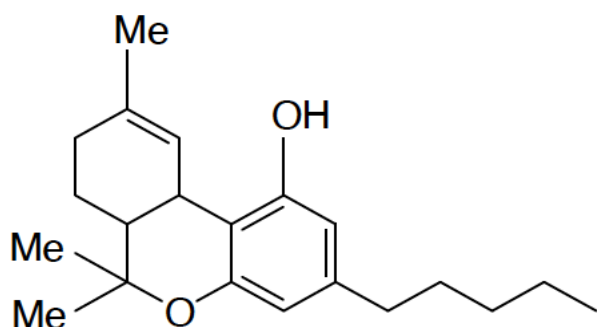
3.3.2 Kanabinoidy

Kanabinoidy jsou skupina látek vyskytující se pouze v rostlinách konopí. Hromadí se především v dutině trichomů (Farag & Kayser, 2017). Představují nejstudovanější skupinu sloučenin konopí a to především díky široké škále jejich farmaceutických účinků na člověka, včetně psychotropních aktivit. S ohledem na literární údaje je rovněž zdůrazňován terapeutický význam některých terpenů a fenolových skupin (Andre et al., 2016). Bylo identifikováno téměř dvě stě kanabinoidů a naprostá většina z nich pochází z *C sativa*. Mezi ty nejhlavnější patří: delta-9-tetrahydrokanabinol ($\Delta 9$ -THC), typ kanabigerol (CBG), typ kanabinol (CBN), typ kanabichromen (CBC), typ kanabitriol (CBT), typ kanabidiol (CBD), delta-8-tetrahydrokanabinol ($\Delta 8$ -THC) typ, kanabielsoin (CBE) typ, kanabicyklol (CBL) typ, kanabinodiol (CBND) (Mnekin & Ripoll, 2021). Kyselina kanabigerolu (CBG), kyselina kanabigerolová (CBGA), je společným prekurzorem kyseliny tetrahydrokanabinolové (THCA), kyseliny kanabidiolové (CBDA) a kyseliny kanabichromenové (CBCA) (Chandra et al., 2017).

První informace o antimikrobiální aktivitě pochází z 50. let 20. století. Pokusy v tomto období probíhaly ještě předtím, než byla dobře známá fytochemie konopí, tudíž baktericidní účinek nebylo možné připsat konkrétní složce konopí (Karas et al., 2020). Toho bylo dosaženo v roce 1976, kdy bylo zjištěno, že delta-9-tetrahydrokanabinol ($\Delta 9$ -THC) a CBD jsou bakteriostatické až baktericidní vůči bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* a *S. faecalis* (van Klingereren & ten Ham, 1976).

3.3.2.1 Delta-9-tetrahydrokanabinol (Δ^9 -THC)

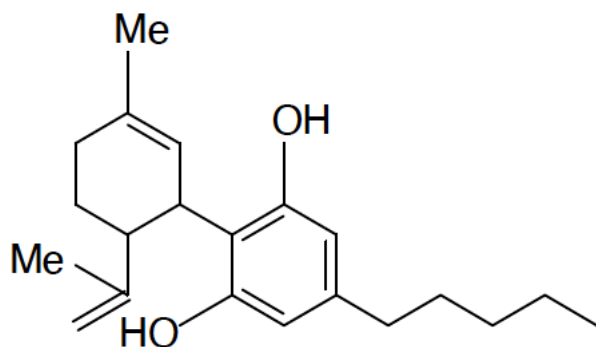
Delta-9-tetrahydrokanabinol (Δ^9 -THC) se řadí mezi hlavní a nejvýznamnější biologicky aktivní účinnou látku konopí, odhaduje se, že THC je z 60–70 % zdrojem psychoaktivních účinků konopí. Jeho výskyt se pohybuje od stopového množství až po hodnotu 95 %, záleží na podmínkách pěstování a odrůdě konopí (Appendino et al., 2008). Izolaci čistého Δ^9 -trans-tetrahydrokanabinolu z hexanového extraktu hašiše pomocí sloupcové chromatografie popsali Goani a Mecholum v roce 1964 (Radwan et al., 2021).



Obrázek č. 6: Strukturální vzorec THC (Milfortová, 2010)

3.3.2.2 Kanabidiol (CBD)

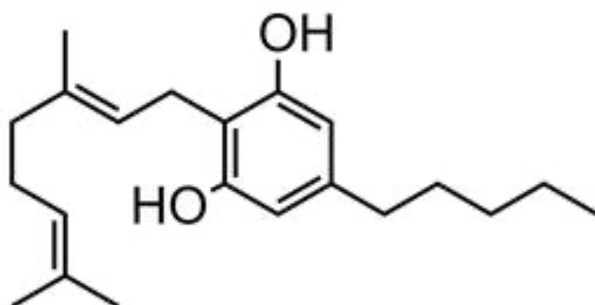
CBD neboli kanabidiol, je látkou přítomnou v různých kultivarech konopí v širokém rozmezí koncentrací od stopových hodnot až po vysoké hodnoty kolem 95 %. Jedním z klíčových rozdílů mezi CBD a THC je absence psychoaktivních účinků u CBD, což vedlo k považování této látky za inaktivní kanabinoid. Nicméně výzkumy ukazují, že CBD má významné sedativní, analgetické a antipsychotické účinky, což z něj činí atraktivního kandidáta pro léčbu neurodegenerativních onemocnění. Studie se zaměřují na potenciál CBD při léčbě různých neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova choroba a Parkinsonova choroba. CBD prokázal schopnost snižovat bolest, zmírňovat křeče, zlepšovat spánek a chuť k jídlu u pacientů trpících těmito onemocněními (Milfortová, 2010).



Obrázek č. 7: Strukturální vzorec CBD (Milfortová, 2010)

3.3.2.3 Kanabigerol (CBG)

Kanabigerol, respektive jeho kyselina CBGA je prvním kanabinoidem, který v rostlinách konopí vzniká, během zrání se mění na THCA, CBDA a další. CBG nepůsobí psychoaktivně, má silné protizánětlivé účinky, dále je spojováno s léčbou chronických bolestí nebo psychických problémů (Calapai et al., 2022).



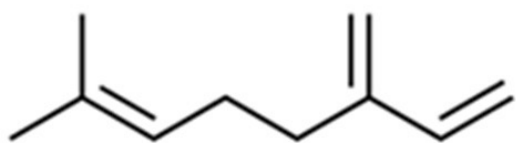
Obrázek č. 8: Strukturní vzorec CBG (Calapai et al., 2022)

3.3.3 Terpeny

Terpeny jsou organické aromatické látky sloučeniny, které se nachází ve všech formách konopí a dodávají rostlině její typickou vůni. Spolu s kanabinoidy mají terpeny doprovodný až synergický účinek (Russo, 2011). Dále mohou terpeny zvyšovat terapeutické účinky. Terpeny se vyskytují v pryskyřici, kterou rostlina ukládá zejména v trichomech. V rostlině konopí se běžně vyskytují různé druhy terpenů, kterými jsou například monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny a triterpeny. Terpeny se staly jedním ze způsobů, jak se rostliny mohou bránit před predátory. Vědci v konopí objevili přibližně dvě stě různých terpenů. Každý jednotlivý druh marihuany má své jedinečné typy a kombinace terpenů v různých koncentracích. Množství a typ terpenů vytvořené konopím závisí na různých faktorech, jako je půda, podnebí, druh hnojiva, věk rostliny, ale i na několika dalších okolnostech. Terpeny jsou účinné až od koncentrace 0,05 %, což znamená, že i velmi malé množství terpenů může mít významný účinek na lidské tělo (Sommano et al., 2020).

3.3.4 Myrcen

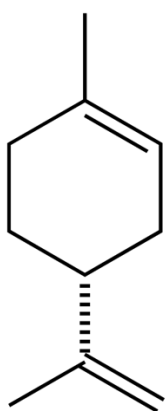
Myrcen je monoterpen hojně zastoupený v rostlinách, zejména v esenciálních olejích konopí, ale například i v chmelu nebo citrusových plodech. Je využíván jako přísada při výrobě potravin a nápojů. Myrcen se významně podílí na konopném aroma, odrůdy s vysokým obsahem myrcenu (>0,5 %) jsou spojovány se spíše sedativními účinky konopí. Mezi biologické aktivity myrcenu patří analgetické účinky, které pomáhají zmírňovat bolest, sedativní účinky, které působí uklidňujícím způsobem, antidiabetické účinky, které mohou být prospěšné při regulaci hladiny cukru v krvi, antioxidační účinky, které chrání buňky před poškozením volnými radikály, protizánětlivé účinky, které mohou pomoci snižovat záněty, antibakteriální účinky, které bojují proti bakteriálním infekcím, a protinádorové účinky, které mohou přispívat k potlačení růstu nádorových buněk (Surendran et al., 2021).



Obrázek č. 9: Strukturní vzorec myrcenu (Surendran et al., 2021)

3.3.4.1 Limonen

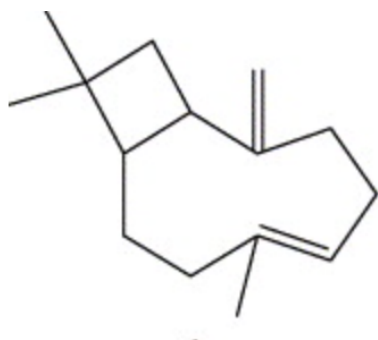
Limonen je monoterpen s chemoterapeutickými účinky a nízkou toxicitou. Nachází se v konopné pryskyřici, je typický vůní, která připomíná vůni citrusových plodů. Limonen lze vnímat jako léčivo, díky jeho antifungálním, antibakteriálním a antikarcinogenním vlastnostem (Paduch et al., 2007). Limonen se řadí mezi jedny z nejběžnějších terpenů vyskytujících se v přírodě, hojně se nachází v esenciálních olejích různých rostlin (citron, černý pepř, pomeranč). Představuje vysokou perspektivu využití v antibakteriální a potravinářské konzervaci, díky své baktericidní aktivitě proti bakteriím rodu *Aspergillus*, *Pseudomonas* a *Staphylococcus* (Han et al., 2019).



Obrázek č. 10: Strukturní vzorec limonenu (Paduch et al., 2007)

3.3.4.2 β -Karyofylen

Beta-karyofylen je seskviterpen, těkavá sloučenina, která je obsažena ve velkém množství bylin a koření, například v černém pepři. Jeho kořeněná vůně je využívána jako vonná chemikálie, dále má protizánětlivé a antifungální vlastnosti (Sköld et al., 2006). Sloučenina β -karyofylen má silné antioxidační účinky, dále vykazuje antimikrobiální aktivitu vůči gram pozitivním bakteriím (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Listeria*), dále vykazuje aktivitu proti houbám rodu *Aspergillus* a je schopná inhibovat růst a rozmnožování těchto patogenů (Dahham et al., 2015).



Obrázek č. 11: Strukturní vzorec β -karyofylenu (Sköld et al., 2006)

3.3.5 Ostatní látky

Z rostlin konopí bylo doposud izolováno a následně popsáno přibližně čtyři sta nekanabinoidních látek. K minoritním látkám vyskytujících se v konopí můžeme zařadit některé alkaloidy typické pro konopí jako je anhydrokanabisativin a kanabisativin (Radwan et al., 2021). Do této kategorie můžeme zařadit i flavonoidy kanflavin A a kanflavin B s poměrně silnou antimikrobiální aktivitou (Radwan et al., 2008).

3.4 Konopí a jeho účinky

Konopí má potenciální terapeutické a léčivé vlastnosti, které souvisejí zejména s THC a CBD. Postoj ke konopí se v posledních letech vyvíjí, například ve Spojených státech se legalizace léčebného a rekreačního užívání rozšiřuje na úrovni jednotlivých států. V Kanadě a Uruguayi se rozšiřuje na celostátní úrovni. V důsledku toho roste spotřeba konopných produktů, a to hlavně mezi mladšími uživateli. Chápání bezpečnosti a účinnosti konopí je omezeno desítkami let celosvětové illegality (Page et al., 2020).

Nežádoucí účinky lze zmírnit a předejít kontrolováním dávky pomocí vaporizérů. Účinky konopí závisí na dávce, způsobu podání a předchozích zkušenostech uživatele, po požití nastupují obvykle do 30–60 minut a trvají 1–2 hodiny (Hall & Degenhardt, 2009). Je důležité zmínit, že přes zvyšující se zájem o léčebné konopí je potřeba informovat o jeho potenciálním nebezpečí. Není překvapující, že konzumace konopí negativně ovlivňuje kognitivní a psychomotorické schopnosti. Účinky jsou podobné efektům alkoholu a benzodiazepinů a zahrnují zpomalení reakční doby, nekoordinovanost pohybu, specifické potíže

s krátkodobou pamětí, problémy se soustředěním a zejména zhoršení komplexních úloh, které vyžadují delší pozornost a soustředěnost. Tyto účinky závisí na dávce, ale mohou se projevit i po relativně malých dávkách (5–10 mg THC v jointu), a to i u zkušených uživatelů konopí. Byly prokázány v mnoha studiích pomocí široké škály neurokognitivních a psychomotorických testů. Tyto účinky jsou aditivní s účinky jiných látek, které potlačují centrální nervový systém (Ashton, 2001).

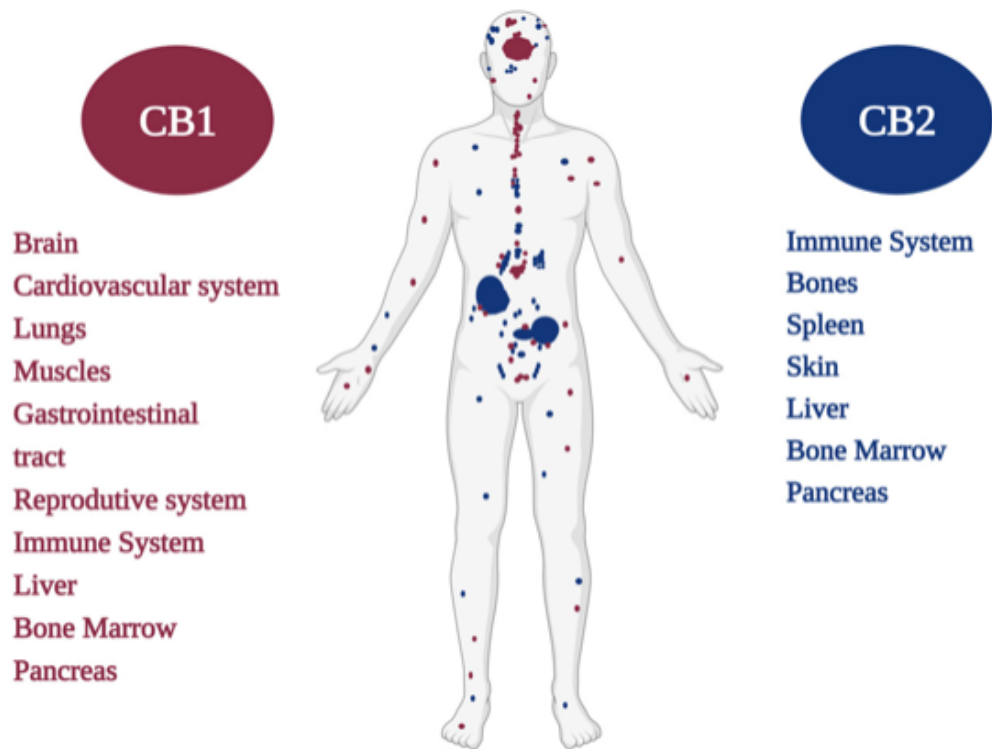
Krátkodobé účinky jako ospalost nebo ztráta krátkodobé paměti jsou poměrně dobře známé, ovšem z dostupných informací se mluví o možné paranoie, úzkostech, stresu nebo dokonce závislosti na konopí. Předpokládá se, že tyto vedlejší účinky mohou být pro pacienta škodlivé pouze z hlediska dlouhodobého užívání konopí. Ovšem je důležité se tomuto tématu dále věnovat a vyhodnotit výsledky vědeckých studií, které se otázkou problematiky dlouhodobého užívání konopí zabývají (Pratt et al., 2019). Epidemiologické studie naznačují spojitost mezi užíváním konopí a zvýšeným rizikem trvalých psychotických onemocnění v závislosti na dávce. Nicméně každý uživatel konopí není stejně negativně ovlivněn. Přestože není dosud zcela jasné, proč jsou někteří jedinci náchylnější k negativním účinkům konopí než jiní, objevují se faktory zranitelnosti od genetických predispozic po osobnostní charakteristiky (Atakan, 2012).

THC a ostatní kanabinoidy se po konzumaci rychle rozptýlí do všech ostatních tkání v závislosti na průtoku krve. Protože jsou kanabinoidy rozpustné v tucích, hromadí se v tukových tkáních a vrcholových koncentrací dosahují za 4–5 dní. Poté se pomalu uvolňují zpět do dalších tělesných kompartmentů, včetně mozku. Vzhledem k sekvestraci v tuku je poločas eliminace THC z tkání přibližně sedm dní a úplná eliminace jedné dávky může trvat až třicet dní. Je zřejmé, že při opakovaném dávkování se mohou vysoké hladiny kanabinoidů v těle hromadit a dále se dostávat do mozku. V mozku jsou THC a další kanabinoidy různě distribuovány. Vysokých koncentrací dosahují v neokortikálních, limbických, sensorických a motorických oblastech (Ashton, 2001).

3.4.1 Endokanabinoidní systém (ES)

Endokanabinoidní systém (ES) hraje ústřední roli ve vyvíjejícím se nervovém systému, zatímco ve zralém nervovém systému moduluje neuronální aktivitu a funkci sítě. ES se skládá z endogenních kanabinoidů (endokanabinoidů), kanabinoidních receptorů a proteinů, které přenášejí, syntetizují a odbourávají endokanabinoidy. ES tedy není samostatný, izolovaný systém, ale ovlivňuje mnoho dalších signálních drah a je jimi ovlivňován. Ačkoli konopí obsahuje mnoho bioaktivních látek, zdá se, že většina psychoaktivních účinků klasicky spojovaných s konopím je zprostředkována interakcí Δ^9 -tetrahydrokanabinolu (THC), hlavní psychotropní složky konopí, s kanabinoidními receptory (Lu & Mackie, 2021). CB1 a CB2 jsou nejlépe charakterizované kanabinoidní receptory. Rozmanitost signalizace receptory CB1 jsou především v nervovém systému (v mozku), ale jsou přítomny i v různých orgánech včetně jater, tukové tkáně, kůže (Bodor et al., 2005). Na rozdíl od CB1 jsou hladiny CB2 v mozku velmi nízké, studie ukázaly, že jeho exprese je omezena na specifické neuronální buňky a hojně se vyskytuje v mikroglíích a astrocytech. Naproti tomu se zdá být jasné, že receptory CB2 jsou

hojně exprimovány v buňkách patřících do imunitního systému, jako jsou monocyty, makrofáží a lymfocytech B a T. V těchto buňkách aktivace CB2 receptorů mimo jiné snižuje uvolňování prozánětlivých cytokinů nebo lymfoangiogenních faktorů. Receptory CB2 jsou navíc přítomny i v dalších periferních orgánech a typech buněk hrajících roli v imunitní odpovědi organismu, včetně sleziny, brzlíku, žírných buněk a keratinocytů, stejně jako v gastrointestinálním systému (Iannotti et al., 2016).



Obrázek č. 12: Kanabinoidní receptory CB1 a CB2 a jejich distribuce v lidském těle (Rezende et al., 2023)

3.4.2 Dermatologické onemocnění

Studium kůže a kožních onemocnění prošlo v historii významnými změnami, přinášejícími nové poznatky, diagnózy, techniky a léčebné postupy. Mezi první zmínky dermatologických onemocnění patří recepty z Ebersových a Smithových papyrů z období kolem 1600 př. n. l., známých jako Kniha zranění (viz Obrázek č. 13). Tyto papyrasy obsahují 48 případů kožních poranění a zranění z bitev a nehod na egyptských stavbách, a dále se zabývají i dalšími lékařskými obory, včetně všeobecné praxe, gynekologie, pediatrie a kosmetiky, zmiňující omlazující recepty na kůži (Hartmann, 2016).



Obrázek č. 13: Eberus papyrus (kniha Zranění) (Hartmann, 2016)

Z řeckého ostrova Kos pocházel jeden z největších představitelů řecké a západní medicíny, lékař a profesor Hippokrates (460–370 př. n. l.) (Alsaidan et al., 2015). Hippokrates vytvořil první klasifikaci kožních onemocnění, rozdělující je na idiopatická a ekzémová onemocnění. Jeho práce byla shrnuta v Corpus Hippocraticum ve 3. století př. n. l., což byl významný milník v historii medicíny a dermatologie. Tento text detailně popisoval anatomii a fyziologii kůže, včetně procesů jako je pocení, sekrece žláz a její role v homeostáze organismu (Ladda & Lynde, 2019).

Aplikace vědy do římské medicíny začala již na vrcholu Římské říše. V této souvislosti vyniká přínos Aurelia Cornelia Celsa (25 př.n.l.–50 n. l.). Ve svém díle De Medicina, lékařské encyklopedii, věnoval Celsus celou kapitolu kožním chorobám a popsal přibližně čtyřicet způsobů léčby dermatologických onemocnění.

V 15. a 16. století došlo k intenzivnímu rozšíření znalostí a přehodnocení řecké racionality, což podnítilo zvýšený zájem o lékařské obory, včetně studia kůže. V tomto období vyniká průkopnická práce Girolama Mercurialeho (1530–1606), profesora medicíny na univerzitě v italské Padově. Mercuriale navrhl, aby se dermatózy dělily na nemoci vlasové části hlavy (tineas) a nemoci společné pro ostatní oblasti kůže (tetter), přičemž tyto nemoci se dělily podle morfologických charakteristik, barvy, struktury a objemu. Mercuriale je také známý díky

svému dílu *De Morbis Cutaneis, et Omnibus Corporis Humani Excrementis Tractatus* (Pojednání o kožních chorobách), které vyšlo v roce 1572 a je považováno za předchůdce publikací v dermatologii, zavádí zájem o dermatologii ve Spojeném království a je až do začátku 20. století považován za otce britské dermatologie (Ferreira et al., 2021).

V 18. a 19. století se dermatologie v Evropě rozvinula, vynikla tři hlavní centra: Velká Británie, Francie a Rakousko. Koncem 19. století se dermatologie intenzivně rozvíjela a vznikl specifický a mezinárodně uznávaný lékařský obor. V roce 1889 se konal v Paříži první mezinárodní dermatologický a syfilologický kongres. První odborné časopisy v oboru dermatologie a venerologie byly vydávány v 19. století, včetně časopisu *Syphilidologie* založeného v Lipsku v roce 1838 a časopisu *Annales des maladies de la peau et de la syphilis* z roku 1843 (Wallach & Tillès, 1992).

V 20. století vědecký pokrok a nové diagnostické a terapeutické prostředky přinesly řadu inovací do dermatologické praxe, včetně fotografie, dermatoskopie, fototerapie a použití laseru na cílenou destrukci kožních pigmentů. V 50. a 60. letech 20. století se dermatologie stala klinickou a chirurgickou specializací díky chirurgickým postupům a technologickým prostředkům. Informační a komunikační technologie (ICT) a nanověda přinesly revoluci v komunikaci, přístupu ke zdravotnickým službám a vědeckému výzkumu a nabídly nové perspektivy v použití látek a léčiv v nanorozměrech (Antonio et al., 2014).

V současné době roste zájem o hledání nových, účinných a bezpečných dermatologických přípravků obsahujících účinné látky s vícenásobnými účinky. Rostlinné extrakty mohou díky velkému množství sekundárních metabolitů vykazovat mnohostranné účinky, např. antibakteriální, antioxidační, protizánětlivé a proti stárnutí. Rostlinné extrakty jsou proto zajímavým zdrojem biologicky aktivních látek, které lze použít jako složky kosmetických a dermatologických přípravků (Nowak et al., 2021).

3.4.3 Potenciál léčebného konopí

Důkazy ze studií naznačují, že konopí lze považovat za slibný zdroj zavedených i budoucích terapeutických látek, zejména pro léčbu některých onemocnění, jako je například bolest, roztroušená skleróza, rakovina a nevolnost/zvracení. Bohužel i přes vznik obrovského množství preklinické literatury, která popisuje působení a účinky některých kanabinoidů, bylo dosud vydáno poměrně málo publikací popisujících účinky kanabinoidů v klinických studiích prováděných na lidech (Chandra et al., 2017). Úmluvu od roku 1961, kdy bylo konopí zařazeno organizací OSN na seznam látek nepřísnějšího kontrolního seznamu se komise v roce 2021 rozhodla na základě doporučení Světové zdravotnické organizace (WHO) vyřadit konopí z tohoto seznamu a otevřít tak možnosti výzkumu a tím otevřít cestu k jeho léčebnému využití (Shakya, 2021).

3.4.4 Dostupné formy léčebného konopí

Léčebná forma konopí zahrnuje užívání této rostliny nebo kanabinoidů k léčbě nebo zmírnění různých zdravotních potíží. Konopí může být aplikováno různými způsoby, jako je kouření, inhalace, konzumace ve formě potravinových přípravků nebo příprava čaje. Dále se konopí využívá ve formách mastí a krémů (Dhadwal & Kirchhof, 2018). Kanabinoidy, aktivní látky obsažené v konopí, lze získat buď extrakcí z rostliny, izomerací kanabidiolu nebo výrobou syntetických variant. Legalizace konopí pro léčebné účely se stává stále více diskutovaným tématem ve světě a některé země již umožňují použití konopí pro léčbu pacientů trpících chronickými onemocněními (Whiting et al., 2015). Konopí se konzumuje především ve formě cigaret (jointů) nebo inhalace z dýmek a vaporizérů. Tato tradiční forma užívání umožňuje rychlý a účinný přenos účinných látek do organismu. Dále se konopí může konzumovat pečením do sušenek nebo koláčů, což je způsob, jak využít jeho účinné látky v potravinách. Tato metoda je oblíbená pro svou diskretnost a dlouhodobý účinek. Příležitostně se konopí také konzumuje jako extrakt, který lze přidat do nápojů nebo jiných pokrmů pro jeho léčebné účinky. Tímto způsobem lze využít benefity konopí i v jiných formách než tradičního kouření (Shakya, 2021).

Tabulka č. 1: Přehled povolených léků na bázi konopí v Evropě (EMCDDA, 2018)

Brand name	Description	Indications	Form
Sativex (Nabiximols)	Extract of cannabis (oil): THC and CBD	Multiple sclerosis	Sublingual spray
Marinol (Dronabinol)	Synthetic delta-9-THC	Cancer treatment, AIDS, multiple sclerosis	Gelatin capsule
Cesamet (Nabilone)	Synthetic cannabinoid similar to THC	Cancer treatment	Capsule
Bedrocan	Dried flower tips (sometimes powdered); five different strains available	Various	Plant material

3.4.5 Konopné extrakty

Extrakce konopí je klíčovým procesem pro získání koncentrovaných látek potřebných pro vývoj některých léčebných přípravků. Tento proces zahrnuje řadu důležitých parametrů, které mohou ovlivnit efektivitu a výtěžnost extrakce. Mezi tyto parametry patří druh a množství rozpouštědla, teplota, homogenita a kvalita rostlinného materiálu. Konopí lze extrahovat celou řadou rozpouštědel. Ke kapalným řadíme ethanol, hexan. K plynným dimethylether, butan. Lze extrahovat i pomocí superkritické fluidní extrakce oxidem uhličitým. Výsledný extrakt může být ovlivněn řadou výše zmíněných faktorů, tudíž porozumění extrakci konopí a jeho parametrů je nezbytné pro efektivní využití této technologie při výrobě léčivých přípravků, potravinových doplňků či kosmetických produktů založených na konopí. (Fathordoobady et al., 2019).

3.5 Kožní mikroflóra

Kůže plní funkci vnějšího rozhraní lidského těla s okolním prostředím. Funguje jako fyzická bariéra, která chrání tělo před vniknutím cizorodých patogenů a zároveň poskytuje prostředí pro komenzální mikroby jako jsou bakterie, houby a protozoa, které společně tvoří kožní mikrobiom. Kožní mikrobiota je součástí imunitního systému, kůže jako největší lidský orgán je osídlena prospěšnými mikroorganismy, pokud je tato bariéra porušena nebo dojde k narušení rovnováhy mezi komenzály a patogeny, může nastat onemocnění kůže nebo dokonce systémové onemocnění. Místa na lidské kůži lze dělit na místa dle jejich fyziologických vlastností na místa mazová, vlhká nebo suchá (Byrd et al., 2018).

Složení mikrobiomu závisí především na fyziologii daného místa na kůži. V mazových místech převládají lipofilní druhy jako jsou *Propionibacterium*, ve vlhkém prostředí se vyskytují druhy rodu *Staphylococcus* (Oh et al., 2014). Vztahy mezi kožními mikrobiálními druhy ovlivňující jejich skladbu, stabilitu a funkci jsou určeny nejen faktorem hostitele, ale i interakcemi mezi mikroorganismy samotnými. Mikroorganismy mohou působit konkurenčně nebo synergicky (Weidenmaier et al., 2012).

3.5.1 Bakterie

Kůže podporuje růst mnoha druhů bakterií, které přímo i nepřímo chrání hostitele před patogenními bakteriemi. Mezi přímé účinky patří produkce toxických metabolitů, vyčerpání základních živin nebo produkce bakteriocinů. Bohužel některé z nich jako např. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* se mohou stát patogeny a způsobit vážné kožní a systémové infekce. *S. aureus* je jedním z nejčastějších kožních bakteriálních patogenů, zejména u keratinizujících buněk (rohovějících) (Chiller et al., 2001). V posledních letech se bakteriální infekce kůže a kožních struktur stávají stále větší zátěží pro zdravotnické systémy. Tato zátěž je způsobena především šířením rezistence *Staphylococcus aureus* vůči léčivu meticilinu (MRSA). Kožní bakteriální infekce jsou velmi časté a vznikají v důsledku bakteriální invaze do kůže, blízkých měkkých tkání a jejich přídatných částí. Většinu kožních infekcí způsobuje *Staphylococcus aureus* a β -hemolytické streptokoky skupiny *epidermis*, přičemž jejich projevy a závažnost jsou různé. Klinické projevy se mohou pohybovat od mírných povrchových lézí až po život ohrožující nekrotizující a systémové infekce. Další bakterie mohou rovněž způsobovat kožní infekce s širokou škálou klinických projevů. Diagnóza je v zásadě založena na klinickém hodnocení (Bessa, 2023).

Léčba bakteriálních onemocnění vyžaduje účinnou antibiotickou terapii. I přes doporučení pro různé typy kožních infekcí může být léčba obtížná, zejména pokud jsou patogeny rezistentní na léky (Pulido–Cejudo et al., 2017).

3.5.2 Plísně

Infekce kůže a nehtů způsobené plísněmi se řadí mezi nejpočetnější a nejrozšířenější skupinu všech mykóz. Prevalence povrchových mykotických infekcí v posledních desetiletích vzrostla natolik, že kožní mykózy dnes postihují více než 20–25 % světové populace, čímž se řadí mezi nejčastější formy infekcí. Rozšíření dermatomykóz, jejich etiologických agens a převládajících anatomických vzorců infekce se liší v závislosti na geografické poloze a široké škále environmentálních a kulturních faktorů. Optimální teplota dermatofytů se pohybuje při povrchových teplotách v rozmezí 25–28 °C a infekci lidské kůže podporují zejména teplé a vlhké podmínky. Z těchto důvodů jsou povrchové houbové infekce v tropických zemích poměrně časté. Kromě toho je četnost dermatomykóz vyšší v komunitách s nízkým socioekonomickým statusem: stísněné životní podmínky nabízí mnoho příležitostí pro kontakt kůže s kůží a blízkost zvířat, zatímco hygiena může být neoptimální. Povrchové kožní infekce navíc vykazují nízkou tendenci k sebeomezení a absence nebo špatná lékařská péče dále zvyšuje epidemické šíření kožních mykóz (Havlickova et al., 2008).

Některé druhy jsou celosvětově rozšířené jako například *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* nebo *Epidermophyton floccosum* (Ameen, 2010). Houby často infikují povrch kůže a následně pronikají do rohové vrstvy, čímž předejdou deskvamaci (odlupování kůže). Farmakologické látky aplikované na povrch kůže ve formě krémů, pleťových vod nebo sprejů snadno pronikají do rohové vrstvy kůže a hubí houby (fungicidní látky) nebo jim alespoň znemožňují růst a dělení (fungistatické látky). Lokální terapie tedy dobře fungují, aby zbavily kůži plísní a kvasinek.

Azolová antibiotika, jako je mikonazol, klotrimazol a ketokonazol, jsou fungistatická, omezují růst hub, ale závisí na epidermálním obratu, aby se dosud žijící houby zbavily povrchu kůže. Allylaminy a benzylaminy, jako jsou terbinafin, naftifin a butenafin mají fungicidní účinky (Kyle & Dahl, 2004). Plísňová kožní onemocnění se dnes léčí lokálními nebo systémovými antibiotiky. Bohužel, rostoucí rezistence vůči antibiotikům a antimykotikům se stává významným celosvětovým problémem. Například v Indii bylo zjištěno, že 17–32 % klinických izolátů *Trichophyton spp.* je rezistentních vůči široce používanému antibiotiku terbinafinu (Singh et al., 2018).

V současné době je zřejmý trend legalizace užívání konopí, což má vliv na růst jeho spotřeby. S tímto nárůstem se očekává zvýšený tlak na dermatology, aby začali předepisovat konopí. Existuje několik schválených lékařských indikací pro užívání konopí, jako je psoriáza, lupus, syndrom nehtů a patel a silné bolesti. Nové studie naznačují možné využití konopí a jeho derivátů při léčbě akné, dermatitidy, svědění, hojení ran a dokonce i rakoviny kůže. Pro důkladné zkoumání těchto potenciálních využití je nezbytné provést další pečlivě kontrolované studie. Tento trend otevírá nové možnosti v oblasti dermatologie a může vést k objevu nových léčebných metod a léků pro různé kožní problémy (Dhadwal & Kirchhof, 2018).

3.6 Nanomateriály

Nanomateriály jsou látky, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí od 1 do 100 nm. Využití a aplikace nanomateriálů se rozvíjí a roste stále rychleji. Při takto nízké velikosti částic lze významně měnit vlastnosti materiálů jako je rozpustnost, reaktivita, transport přes membrány. Tato technologie má využití v oblasti vody, farmaceutického nebo potravinářského průmyslu (Armarego, 2022).

Nanomateriály lze rozdělit do čtyř typů: nanomateriály na anorganické bázi, organické, nanomateriály na bázi kompozitu a na bázi uhlíku (Majhi & Yadav, 2021). Potravinářská aditiva v nanovelikostech mohou ovlivnit chuť, texturu, trvanlivost nebo mohou být použita jako indikátory kvality potravin. V oblasti balení potravin se nanotechnologie zvažují pro zlepšení a kvality a trvanlivosti potravin. Dále se uplatňují v enkapsulačních systémech, které chrání a usnadňují distribuci látky na jejich konkrétní cílové místo (Patel et al., 2018).

3.6.1 Nanočástice

Vzhledem k trendům trhu je hnací silou přivádět neustále nové způsoby a inovace. Kosmetický průmysl se připojil do průmyslu nanotechnologií vůbec jako jeden z prvních. V roce 2009 bylo na trhu zaregistrováno více než tisíc produktů na bázi nanotechnologií, z toho 13 % bylo klasifikováno jako produkty pro kosmetické využití. Vyrábí a vyvíjí se produkty na bázi nanotechnologií, které využívají širokou škálu nanomateriálů různých velikostí, tvarů a struktur. Malé rozměry dokáží zlepšit rozpustnost a texturní kvalitu materiálu. Především jsou ceněné pro svoji schopnost překonávat bariéry, se kterými se v kosmetickém průmyslu stýkáme, a to se zlepšením penetrace kůže, stability a uvolňování funkčních látek a samy fungují jako účinné látky (Mihiranyan et al., 2012).

Vědecké výzkumy nanočástic pro jejich terapeutickou, antimikrobiálních a antivirových účinnost látek získal v poslední době zvýšenou pozornost v důsledku rostoucího výskytu rezistence vůči antibiotikům. Tento fakt vyžaduje hledání nových a účinnějších antimikrobiálních látek. Několik studií prokázalo perspektivu nanočástic při léčbě různých mikrobiálních infekcí. Terapeutické využití nanočástic jako nosičů nebo širokospektrálních inhibičních látek při výzkumu virů a mikrobů již nelze přehlížet (Sharmin et al., 2021).

3.6.2 MCM-41

MCM-41 je termín pro mezoporézní nanočástice a mikročástice čistého oxidu křemičitého. První mezoporézní oxid křemičitý byl objeven Yanagisawou a kolegy v roce 1990 (Yanagisawa et al., 1990). O dva roky později, v roce 1992, Kresge a spol. informovali o novém uspořádaném mezoporézním molekulovém sítu oxidu křemičitého. Vzhledem k tomu, že tito vědci pracovali v laboratořích společnosti Mobil Corporation, pojmenovali tento materiál MCM-41 (Mobil Composition of Matter No. 41). Od té doby se stal široce rozšířeným materiálem ve výzkumu a průmyslu (Kresge et al., 1992). MCM-41 je významný mezoporézní křemičitý materiál známý svými jedinečnými vlastnostmi. Vyznačuje se strukturou připomínající včelí plástve s rovnoměrnými mezopóry v amorfní křemíkové matici. Tento

materiál vyniká jednoduchou strukturou, snadnou přípravou. Materiál vykazuje dobře definované tvary pórů, úzké rozdělení, velký objem a výjimečnou sorpční kapacitu. MCM-41 je ideální pro katalytické aplikace jako nosný materiál díky velkému specifickému povrchu a mezopórům, které umožňují přístup velkým molekulám (Rath et al., 2014). Extrakty enkapsulované do mezoporézní matrice vykazují schopnost neutralizovat radikály a dobrou baktericidní aktivitu vůči několika referenčním kmenům. Bylo zjištěno, že vložení polyfenolických extraktů do mezopórů křemíku zvýšilo stabilitu fytochemikálií, protože materiály obsahující extrakt vykazovaly po 3–6 měsících skladování vyšší schopnost neutralizovat radikály než volné extrakty. Kromě toho materiál s extraktem tymiánu vykazoval mírně lepší antimikrobiální aktivitu ve srovnání s odpovídajícím volným extraktem (Brezoiu et al., 2020).

3.6.3 Nanojíl (bentonit)

Nanojíl je multifunkční jílový minerál, který se v průmyslových a farmaceutických odvětvích využívá díky svým vlastnostem. Bentonit je efektivně využíván pro formulaci různých systémů pro dodávání léčiv s cílem kontrolovat nebo zlepšit farmaceutické vlastnosti léčiv, jako je například rozpustnost, rychlost rozpouštění a absorpce a postupné uvolňování účinných látek. Tato schopnost bentonitu otevírá nové možnosti pro vývoj pokročilých lékových formulací s lepší účinností a biologickou dostupností (Park et al., 2016). Bentonity jsou díky svým vlastnostem často využívány ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Obecně se používají v těchto odvětvích pro svou nepřímou antibakteriální aktivitu, která je založena především na jejich vysoké kationtové výměnné kapacitě, vysoké disperzibilitě ve vodě, vysoké absorpční kapacitě a netoxických vlastnostech (Dardir et al., 2018).

3.6.4 Enkapsulace

Zapouzdření bioaktivních látek (léčiva, esenciální oleje, rostlinné extrakty, metabolity hub) umožňuje jejich ochranu před vnějšími faktory a degradací. Enkapsulace zachovává biologickou integritu, zvyšuje účinnost a snižuje těkavost volatilních látek, a tím zvyšuje trvanlivost a stabilitu přípravku, proto je použití technologie enkapsulace při výrobě bioinsekticidů, biofungicidů nebo biohnojiv slibnou strategií (Zabot et al., 2022). Pro zapouzdření se používají jako materiál především polymery, které chrání aktivní jádro. K tomuto účelu se používají například chitosan, gumy (xanthanová, akáciová, arabská), celuloza. Polymery zajišťují zadržení požadovaných sloučenin v systémech vytvořených během procesů a pomáhají prodloužit uvolňování bioaktivních sloučenin na delší dobu nebo za specifických podmínek, jako je například rozmezí pH a jiné (Yang et al., 2018). Pro proces enkapsulace bioaktivních sloučenin je třeba zvážit výběr vhodného enkapsulačního materiálu a enkapsulační techniky. Mikroenkapsulace a nanoenkapsulace jsou v dnešní době dvě nejpoužívanější technologie metody enkapsulace bioaktivních látek. Obalové materiály ovlivňují vlastnosti emulze, jako je velikost kapek, viskozita, stabilita a vlastnosti prášku. Nanoenkapsulace představuje velikost částic menší než jeden mikron, mikroenkapsulace

představuje velikost částic mezi 1 a 1000 mikrony a mikroenkapsulace vytváří částice o velikosti větší než 1000 mikronů (Premi & Sharma, 2017). V posledních letech se extraktům z *C. sativa* věnuje velká vědecká i komerční pozornost jako cennému zdroji, který by mohl být potenciálně využíván v různých oblastech (Fike, 2016). Konopný extrakt se v posledních letech stal předmětem výzkumu díky svým potenciálním terapeutickým účinkům na různá zánětlivá kožní onemocnění jako je akné, dermatitida, seborea nebo psoriáza. Konopný extrakt obsahuje mnoho bioaktivních látek jako jsou zejména kanabinoidy a terpeny, které prokazují protizánětlivé, antibakteriální a regenerační vlastnosti. Jedním z hlavních omezení konopného extraktu je jeho špatná rozpustnost ve vodě a náchylnost k chemické degradaci a biologické inaktivaci, což ovlivňuje jeho stabilitu a účinnost. Proto je potřeba vyvinout formulaci nosiče pro efektivní aplikaci tohoto extraktu na pokožku s maximálním terapeutickým účinkem. Jednou z perspektivních strategií pro překonání těchto technických problémů je enkapsulace konopného extraktu do nanomateriálů, které ochrání extrakt před vnějšími vlivy a umožní jeho cílené uvolňování na pokožku. Enkapsulace může vést ke zvýšené efektivitě léčby kožních onemocnění. Vzhledem k rostoucímu zájmu o přírodní léčebné přípravky a potenciálu konopných extraktů ve farmaceutickém průmyslu je důležité pokračovat ve výzkumu a inovacích v oblasti formulací a aplikací konopného extraktu ohledem na jeho účinnost, bezpečnost a udržitelnost (Rossi et al., 2020).

3.7 Legislativa konopí

Navzdory širokému omezení pěstování, výroby a užívání *C. sativa* zákonem v různých zemích se stále používá ve velkém měřítku. Mnoho lidí vnímá užívání konopí jako svobodu volby, která pomáhá zvyšovat jejich smysly, usnadňuje komunikaci a podporuje tvůrčí myšlení, jak tvrdí "myšlení mimo rámec". Vedle toho nedávné vědecké důkazy o léčebném potenciálu konopí nastavily cestu k dekriminalizaci a regulaci zákony o užívání konopí v různých zemích po celém světě. Skutečně, nizozemská vláda v červenci 2020 rozšířila své předpisy tak, aby umožnila experiment s pěstováním a výrobou konopí pro dodávku do kaváren. Zatímco v roce 2021 Švýcarsko povolilo pilotní projekty podle zákona o návykových látkách s cílem získat vědecké poznatky o alternativních metodách regulace nelékařského užívání konopí. Legalizace celého dodavatelského řetězce konopí v Kanadě, částech Spojených států a Uruguayi, stejně jako přijetí politiky umožňuje podnikům vyrábět a prodávat konopí pro rekreační užití (Dalli et al., 2023).

Několik evropských zemí uvolnilo politiku buď dekriminalizací, nebo depenalizací užívání a držení. Nicméně politika konopí se v Evropě stále značně liší. Zatímco Švédsko prosazuje trestní zákaz a přijalo vizi „společnosti bez drog“, Belgie, Portugalsko, Estonsko a nově i Česká republika užívání dekriminalizovaly. Nizozemsko a Španělsko mají částečně legalizované přístupy, přičemž prodej a použití jsou akceptovány některými regiony v rámci systémů Coffeeshop a Cannabis Club, resp. Rozdíly pravděpodobně odrážejí jak nedostatek konsenzu ohledně toho, která linie konopné politiky má nejlepší výsledky, pokud jde o veřejné zdraví, ekonomiku a trestnou činnost, tak rozdíly v kulturních postojích ke konopí. V Evropě se také pozoruje zvyšující se rozmanitost konopných produktů a nové výzvy v politikách a přístupech

k regulaci konopí, které jsou ovlivněny trhem pro rekreační užívání konopí v Americe a novými formami užívání této látky. Tento vývoj naznačuje, že konopí hraje stále důležitější roli v evropském prostředí a jeho regulace je stále aktuálním tématem diskuzí a změn v legislativě (Mokwena, 2019).

3.7.1 Legislativa v ČR

Česká republika, jako postkomunistická země, má svou historii s nesnadným vztahem k drogám. V dobách komunismu bylo držení jakékoliv drogy považováno za trestný čin a spadalo pod stejná ustanovení jako nelegální výroba, dovoz, vývoz a nabídka drog. Trestní zákony byly v té době velmi přísné a neponechávaly mnoho místa pro toleranci či umírněnost. S přechodem k demokracii po roce 1989 v České republice došlo k rozsáhlým změnám trestního práva, včetně onoho týkajícího se drog. Nicméně, i přes tyto změny zůstává problém drog v Česku stále aktuální a významný. V 90. letech se země potýká s rostoucím počtem případů závislosti na těžkých drogách, jako je heroin, a také s problémem šíření syntetických drog. V roce 1990 proběhla tzv. dekriminalizace, což byla v České republice významná změna v trestním právu týkající se držení nelegálních drog. Dekriminalizace držení drog pro vlastní potřebu znamenala, že takové jednání bylo vyňato z trestního zákoníku a považováno pouze za správní delikt (Belackova & Stefunkova, 2018). V roce 1998 se v České republice objevil politický tlak na zvrácení dekriminalizace drog, která byla zavedena v roce 1990. Tento tlak vznikl v reakci na rostoucí problémy s drogami v zemi, které vedly k vytvoření otevřených drogových scén. Politici reagovali na tlak veřejnosti a zavedli nové zákony, které měly za cíl snížit množství drog v oběhu a potlačit drogové scény. Došlo se ke kompromisu, vzniká držení drog pro vlastní potřebu ve větším nebo menším množství penalizované jako trestný čin. Malé množství zůstalo dekriminalizováno, to se týkalo všech druhů drog, ale v různém množství pro každou drogu (Zeman, 2007).

V roce 2010 byl v České republice přijat nový trestní zákoník. Vznikají vládní nařízení, která specifikují malá množství pro osobní spotřebu a dále snižují penalizaci za osobní držení konopí v menším množství. Ovšem maximální trest se za tento trestný čin zvýšil. Za druhé bylo zavedeno pěstování pro vlastní potřebu. Do té doby bylo osobní pěstování (konopí) považováno za držení pro vlastní potřebu, ale někdy i za (pokus) výrobu drog. Ústavní soud však krátce poté (v roce 2013) vyhláškou týkající se osobního držení zrušil s odůvodněním, že trestní odpovědnost nemůže být stanovena vládou, místo toho vydal Nejvyšší soud pokyny Výškách trestu, které by měly být použity v soudních případech (Belackova & Stefunkova, 2018).

4 Metodika

4.1 Použité chemikálie

Všechna rozpouštědla použitá pro GC a HPLC analýzu byla analytické kvality. Acetonitril (ACN) a kyselina mravenčí (FA) spolu s terpenovými standardy [(+)-3-karen, (+)-limonen, α -bergamoten, α -pinen, α -terpineol, β -myrcen, kamfen, karyofylen, karyofylen oxid, směs farnesenu, fenchol, humulen, linalool, terpinolen] a *n*-alkanový standard byly zakoupeny od firmy Sigma–Aldrich (Praha, Česká republika). Methanol, *n*-hexan, dimethylsulfoxid (DMSO), hydroxid sodný a ethanol (EtOH) byly získány od společnosti VWR Chemicals (Praha, Česko). Standardy kanabinoidů, konkrétně kanabidivarin (CBDV), kyselina kanabidivarinová (CBDVA), kanabigerol (CBG), kyselina kanabigerolová (CBGA), kanabinol (CBN), kyselina kanabinolová (CBNA), kanabidiol (CBD), kanabidiolová kyselina (CBDA), kanabichromen (CBC), tetrahydrokanabivarin (THCV), 19-tetrahydrokanabinol (THC) a tetrahydrokanabinolová kyselina A (THCA–A) byly zakoupeny od společnosti Cayman Chemicals (Ann Arbor, Spojené státy). Mikrobiologická růstová média Mueller–Hintonův bujón (MHB), Sabouradův dextrózový agar (SDA) a Sabouradův dextrózový bujón (SDB) byla zakoupena od společnosti OXOID (Praha, Česká republika), antibiotika klotrimazol (CLT), chloramfenikol (CLP). Lidská spontánně immortalizovaná buněčná linie keratinocytů (HaCaT) byla získána od firmy Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Německo). Tetraethyl orthosilicate (TEOS), *n*-cetyltrimethylammonium bromide (CTABr) byly zakoupeny od firmy Sigma–Aldrich (Praha, Česká republika).

4.2 Charakteristika konopného extraktu

Konopné extrakty byly připraveny z THC dominantní odrůdy konopí vypěstované na České Zemědělské Univerzitě v Praze, na Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů v roce 2020. Kultivace probíhala ve vnitřní (indoor) pěstírně s kontrolovanými podmínkami. Teplota místnosti byla v rozmezí 22–30 °C, vlhkost 40 a 70 %. Rostlina byla kultivována hydroponicky za použití kapkové závlahy v nádobách naplněných Euro Pebbles (expandovaný jííl). Květenství konopí použité pro extrakci bylo z rostliny Choclope (CHp). Extrakt byl připraven macerací 60 g materiálu v ethanolu v poměru 6:1 (rozpouštědlo: květy; v/w) po dobu 48 hodin. Následně byl macerát zfiltrován a rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové odparce (Rotavapor® R–100, Buchi) při 40 °C.



Obrázek č. 14: Konopný ethanolový extrakt z kultivaru Chocolope

4.2.1 Kanabinoidy

Deset miligramů každého extraktu bylo rozpuštěno v 1 ml MeOH, filtrováno přes nylonové filtry o průměru 0,45 μm (Agilent, USA), převedeno do HPLC lahvičky a předáno k analýze. Přístroj se skládal ze systému UltiMate 3000 HPLC (Thermo Fisher Scientific, USA) a byl vybaven s UV detektorem. Analýza kanabinoidů byla provedena na koloně Excel SuperC18 (250 \times 4,6 mm, 3 μm , 90 Å; ACE, Skotsko). Sloučeniny byly separovány pomocí gradientové eluce s použitím vody +0,075 % FA (A) a ACN +0,5 %FA (B) jako mobilní fáze v následujícím gradientu (A:B): 00,30:70; 10, 30:70; 100, 0:100; 120, 0:100; 140, 30:70. Teplota kolonového prostoru byla nastavena na 40 °C. Injekce byla 10 μl a rychlost průtoku byla 1 ml/min. Kanabinoidy byly detekovány při vlnových délkách mezi 190 a 400 nm. Kvantifikace byla prováděna při vlnové délce 210 nm. Vyhodnocení získaných dat bylo provedeno pomocí softwaru Chromeleon 7.2 (ThermoFisher Scientific, Spojené státy). Kalibrační křivky standardů byly připraveny v koncentračním rozmezí 2–100 $\mu\text{g/ml}$ se šesti koncentračními úrovněmi (100, 50, 20, 10, 5 a 2 $\mu\text{g/ml}$). Plochy UV píků standardů (při každé koncentraci) byly vyneseny do grafu proti odpovídajícím koncentracím standardu (v $\mu\text{g/ml}$) pomocí vážené lineární regrese pro vytvoření standardní křivky.

4.2.2 Terpeny

Extrakty byly rozpuštěny v metanolu na finální koncentraci 2 mg/ml a převedeny do lahvičky. Terpenický profil byl analyzován pomocí GC 7200 ve spojení s hmotnostním detektorem 7890 BqTOF (Agilent). Separace jednotlivých volatilních složek byla provedena na koloně HP-5MS (30ms, 0,25 mm i.d., 0,25 μ m; Agilent). Jako nosný plyn bylo použito helium; průtok byl nastaven na 1 ml/min. Teplotní program v peci začal při 60 °C s 3,5 minutovým udržováním; teplota se zvyšovala rychlostí 3,5 °C/min na 155 °C a poté rychlostí 30 °C/min na 300 °C a udržovala se podobu 10 min (celková doba procesu: 45 min). Teplota kvadrupólu byla udržována na 230 °C a teplota iontového zdroje na 230 °C. Sloučeniny byly měřeny v režimu skenování v rozsahu 55–700 Da. Identifikace analyzovaných těkavých látek byla provedena porovnáním spekter se spektry dostupných standardů a/nebo porovnáním jejich retenčních indexů (vypočtených podle Kovátse) databází NIST. Relativní kvantifikace terpenů byla provedena pomocí 7890 A GC spojeného s FID detektorem (Agilent) za stejných chromatografických podmínek. Podmínky detektoru byly nastaveny takto: $t = 300$ °C; průtok plyn–vzduch: 400 ml/min; H₂: 30 ml/min; a doplňovací průtok N₂: 5 ml/min. Všechny vzorky byly měřeny duplicitně.

4.3 Příprava nanočástic

4.3.1 Jíl

Byla použita laboratorní rozprašovací sušička. Teploty vstupního a výstupního vzduchu byly 52 °C a 33 °C. Byl použit vstupní průtok roztoku 5 ml/min. (100 ml 50 % roztoku ethanolu ve vodě v poměru 1:1) obsahoval: 1) pro čistý nanojíl 6 g čistého jílu, 2) 3 g jílu a 3 g extraktu, 3) 4 g jílu a 2 g extraktu. Jako nosný plyn byl použit dusík. Množství konopného extraktu navázaného na nanočástice bylo stanoveno gravimetricky.

4.3.2 MCM-41

Mezoporézní nanočástice oxidu křemičitého typu MCM-41 byly syntetizovány následujícím postupem: n-cetyltrimethylamonium bromid (CTABr, 2,00 g, 5,48 mmol) byl nejprve rozpuštěn v 960 ml deionizované vody. K roztoku CTABr byl přidán NaOH (aq) (2,00 M, 7,00 ml) a teplota roztoku byla upravena na 95 °C. Poté byl k roztoku CTAB po kapkách přidán TEOS (10,00 ml, 44,78 mmol). Směs byla míchána tři hodiny za vzniku bílé sraženiny a pevný produkt byl odebrán odstředěním při otáčkách 9500 za minutu a promyt ethanolem a deionizovanou vodou. Výsledná pevná látka byla vysušena při 60 °C (pevná látka v podobě, v jaké byla vyrobena). Pro přípravu konečného porézního materiálu (MCM-41) byla pevná látka ve stavu po výrobě kalcinována při 550 °C v oxidační atmosféře po dobu pěti hodin, aby se odstranil povrchově aktivní prostředek. Naplnění oxidu křemičitého konopným extraktem bylo dosaženo adsorpcí par smícháním 100 mg konopného extraktu se 100 mg kulminované MSN v těsně uzavřené lahvičce. Směs byla inkubována v peci při 40 °C po dobu

24 h za neustálého protřepávání. Množství konopného extraktu navázaného na nanočástice bylo stanoveno gravimetricky.

4.4 Charakterizace nanočástic

4.4.1 Velikost částic a zeta potenciál

Distribuce velikosti nanomateriálu, index polydisperzity (Polydispersion index, PDI) a Zeta potenciál čistých nanočástic a částic s enkapsulovanými extrakty byly měřeny pomocí DLS (Dynamic Light Scattering) na přístroji Zetasizer Nano SZ (Malvern Instruments, UK). Analýza byla provedena při úhlu rozptylu 173° , při teplotě 25°C za použití roztoku rekonstituovaných nanočástic (předem vysušených a zhomogenizovaných na jemný prášek) o koncentraci $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ v deionizované vodě o pH 7. Všechna měření byla provedena ve třech opakováních.

4.4.2 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Morfologie připravených nanočástic byla vyhodnocena transmisní elektronovou mikroskopií na přístroji JEOL JEM-1400 (JEOL Europe SAS, Croissy-sur-Seine, France). Deset mikrolitrů suspenze nanočástic v deionizované vodě bylo napipetováno na měděnou mřížku a po odpaření vody byly částice pozorovány při napětí 120 kV.

4.4.3 Termogravimetrie

Při této metodě je hodnocena hmotnost vzorku v závislosti na čase a teplotě a lze touto technikou stanovit efektivitu enkapsulace. Pro stanovení hmotnosti vzorků a následné určení množství enkapsulovaného extraktu do jílu a MCM-41 byl použit přístroj TGA/DSC 3+ Mettler Toledo balance (Mettler Toledo Inc., Schwarzenbach, Švýcarsko). Oxidace vzorků byla zajištěna proudem vzduchu ($80\text{ ml}/\text{min}$) s programem ohřevu o $10^\circ\text{C}/\text{min}$ v teplotním rozsahu $100\text{--}1000^\circ\text{C}$. Maximální teplota byla následně udržována po dobu 30 minut.

4.5 Antimikrobiální aktivita

4.5.1 Testované mikroorganismy

Antibakteriální aktivita byla testována na sedmi bakteriálních kmenech, jmenovitě *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a 29213, *Staphylococcus epidermidis* CCM 50, *Staphylococcus saprophyticus* CCM 2727, *Staphylococcus lugdunensis* CCM 4069, *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418, *Streptococcus pyogenes* CCM 4425. Antifungální aktivita konopných extraktů byla dále testována na dvanácti kmenech plísní, a to: 3 kmeny *Nannizzia fulva* (CCF 6025; 5338; 5782) 2 kmeny *Trichophyton rubrum* (CCF 4934; 4879), 2 kmeny *Arthroderma insingulare* (CCF 5417; 5943), *Trichophyton tonsurans* CCF 4930, *Nannizzia gypsea* CCF 5215, *Epidermophyton floccosum* CCM 8339, *Microsporum canis* CCM 8353, *Microsporum gypseum* 8342 *Trichophyton interdigitale* CCM 8377. Testované mikroorganismy byly obdrženy z American Type Culture Collection (ATCC), Czech Collection of Microorganisms (CCM), nebo Culture Collection of Fungi, Katedra botaniky, Univerzita Karlova, Praha (CCF).

4.5.2 Mikrodiluční metoda

Pro stanovení antimikrobiální a antimykotické aktivity vyjádřené jako minimální inhibiční koncentrace (MIC₈₀) byly pro bakterie i houby použity mírně upravené mikrodiluční metody dle CLSI (CLSI 2008, 2009). Všechny experimenty byly provedeny ve třech opakováních.

($\mu\text{g/ml}$)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1024	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
512	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
256	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
128	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
64	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
32	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
16	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
8	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Obrázek č. 15: Schéma mikrotitrační destičky

4.5.2.1 MIC₈₀ bakterie

K přípravě zásobního roztoku byly konopné extrakty enkapsulované v nanomateriálech nebo jednotlivé nanomateriály rozpuštěny na koncentraci 2048 µg/ml. Následně byly extrakty dvojnásobně sériově naředěny v koncentracích od 8 do 1024 µg/ml do 96 jamkových mikrotitračních destiček obsahujících Mueller–Hinton bujón jako růstové médium. Destičky byly inokulovány bakteriemi v konečném počtu 0,5 McF (tj. $1,5 \times 10^8$ KTJ/ml, KTJ–kolonie tvořící jednotka). Inokula byla připravena z jednodenních bakteriálních kultur kultivovaných v MHB při 37 °C. Stupeň inhibice bakteriálního růstu byl hodnocen po 24 hodinách kultivace při 37 °C pomocí multidetekčního readru BioTek Synergy H1 (Agilent) při vlnové délce 512 nm. Za MIC byla považována nejnižší koncentrace, která inhibovala růst bakterií o 80 % ve srovnání s kontrolou růstu. Jako pozitivní kontrola byly použity chloramfenikol a klotrimazol.

4.5.2.2 MIC₈₀ plísně

Zásobní roztok extraktů enkapsulovaných do nanomateriálů nebo jednotlivé nanomateriály ($c = 2048$ µg/ml) byl dvojnásobným sériovým ředěním dávkován do 96 mikrotitračních destiček s plochým dnem, výsledné testované koncentrace se tedy pohybovaly v rozmezí 16–2048 µg/ml. Jako růstové médium bylo použito médium SDB 1640 s pH 7. Mikrotitrační destičky byly inokulovány dermatofyty v konečném počtu $3-7 \times 10^5$ KTJ/ml. Inokula plísní byla připravena ze čtrnáct dní starých kultur hub pěstovaných na SDA při 27 °C. Stupeň inhibice růstu hub byl hodnocen po pěti dnech kultivace při 27 °C pomocí multidetekčního readru BioTek Synergy H1 (Agilent) při 495 nm. Za MIC byla považována nejnižší koncentrace, která inhibovala růst dermatofytů o 80 % ve srovnání s kontrolou nárůstu. Klotrimazol byl použit jako pozitivní kontrola.

4.6 Cytotoxicita

4.6.1 Kultivace

Lidské keratinocyty (Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Německo) byly udržovány při teplotě 37 °C v kontrolované atmosféře s 5 % CO₂ a 95 % vlhkostí. Buňky byly kultivovány v médiu DMEM doplněném penicilinem–streptomycinem v baňkách T75 cm² s povrchovou úpravou. Buňky HaCaT byly subkultivovány oddělením pomocí enzymu akutázy při 80–90 % konfluenci každý 3. nebo 4. den a čerstvé médium bylo doplňováno každé 2 až 3 dny.

4.6.2 Test životaschopnosti

Životaschopnost keratinocytů byla stanovena pomocí MTT testu životaschopnosti buněk za účelem vyhodnocení cytotoxického účinku nanočástic obsahujících výtažky z konopí po 24, 48 a 72 hodinách vyjádřeného jako 50 % inhibice životaschopnosti (IC₅₀) ve srovnání s neošetřenou kontrolou. Testováno bylo všech pět skupin nanočástic, neošetřené buňky byly použity jako kontrolní skupina a čistý DMSO jako slepá kontrola. Testovány byly také surové extrakty. Všechny experimentální skupiny a koncentrace byly testovány v pěti opakováních,

zatímco kontrolní skupiny byly testovány v osmi opakováních. Buňky v exponenciální růstové fázi byly odděleny při 80–90 % konfluenci a životaschopné buňky byly spočítány pomocí roztoku trypanové modři v Neubauerově počítací komůrce pod mikroskopem. Buňky byly nasazeny do 96 jamkových destiček s povrchovou úpravou v množství $1,25 \times 10^5$ buněk/ml v koncentraci 200 μ l/jamku a ponechány v inkubátoru po dobu 24 hodin. Po inkubaci byly buňky ošetřeny sériově ředěním částicemi/extrakty/ATB v koncentracích od 4 do 1024 μ g/ml. Poté byly destičky inkubovány po dobu 1–3 dnů. Po uplynutí požadované inkubační doby bylo médium u všech experimentálních skupin, včetně kontrol, odsáto a buňky byly dvakrát promyty 200 μ l DPBS. Následně bylo do experimentálních a kontrolních jamek přidáno 200 μ l bezsérového DMEM obsahujícího 500 μ g/ml MTT. Destičky byly inkubovány ve tmě po dobu dvou hodin. Následně bylo médium odsáto a vzniklé krystaly formazanu byly rozpuštěny ve 200 μ l DMSO a poté byla změřena absorbance pomocí mikrodestičkové čtečky BioTek Synergy H1 při vlnové délce 540 nm.

4.7 Vyhodnocení dat

Naměřená data byla zpracována v programu Statistica 12, kde bylo využito metody analýzy rozptylu ANOVA a Tukeyho testu.

5 Výsledky

5.1 Charakterizace konopného extraktu

V příložené Tabulce č. 1 je seznam relativního zastoupení terpenů v procentech. V extraktu konopí kultivaru Chocolepe použitém pro náš pokus bylo nejvyšší % zastoupení terpenu β -caryophyllenu ($14,87 \pm 0,05$ %), β -farnesenu ($7,49 \pm 0,1$ %), humulenu ($5,02 \pm 0,06$ %), naopak terpeny Thujene, α -pinene a β -myrcene se nepodařilo identifikovat.

Tabulka č. 2: Relativní zastoupení terpenů (%)

Terpen	EtOH
Thujene	ND
α -pinene	ND
β -myrcene	ND
(+)-Limonene	0.59 ± 0.01
Linalool	7.35 ± 0.02
Fenchol	1.93 ± 0.01
Trans-2-pinanol	1.45 ± 0.01
α -terpineol	2.07 ± 0.01
β -caryophyllene	14.87 ± 0.05
α -bergamotene	4.01 ± 0.11
humulene	5.02 ± 0.06
β -farnesene	7.49 ± 0.1
γ -muurolene	0.37 ± 0.00
Aromadendrene	1.43 ± 0.01
γ -selinene	1.44 ± 0.08
δ -cadinene	0.45 ± 0.003
α -cadinene	1.11 ± 0.004
Selina-4(15), 7(11)-diene	2.5 ± 0.02
Selina-3,7(11)-diene	3.06 ± 0.09
Germacrene B	1.55 ± 0.13
Guaiol	5.31 ± 0.06
Humulene epoxide	2.12 ± 0.06
γ -eudesmol	5.73 ± 0.03
β -eudesmol	3.8 ± 0.01
α -eudesmol	1.21 ± 0.06
α -bisabolol	1.12 ± 0.46
Juniper camphor	0.47 ± 0.002

V předložené Tabulce č. 3 je seznam identifikovaných kanabinoidů a jejich zastoupení v mg/g, nejvyšší zastoupení v extraktu Chocolepe byl prekurzor THC a to THCA ($261,75 \pm 8,20$) mg/g, samotného THC obsahoval extrakt ($51,23 \pm 1,59$) mg/g, nejnižší hodnotu zaznamenalo THCv ($0,08 \pm 0,02$) mg/g.

Tabulka č. 3: Průměrné zastoupení kanabinoidů v kultivaru Chocolepe v mg/g

Kanabinoid	EtOH
CBC	$1,45 \pm 0,34$
CBDA	$4,01 \pm 0,21$
CBG	$1,05 \pm 0,04$
CBGA	$9,51 \pm 0,22$
THC	$51,23 \pm 1,59$
THCA	$261,75 \pm 8,20$
THCV	$0,08 \pm 0,02$
Celkem	$329,10 \pm 10,33$
Výtěžnost (%)	11,18

5.2 Charakteristika nanočástic

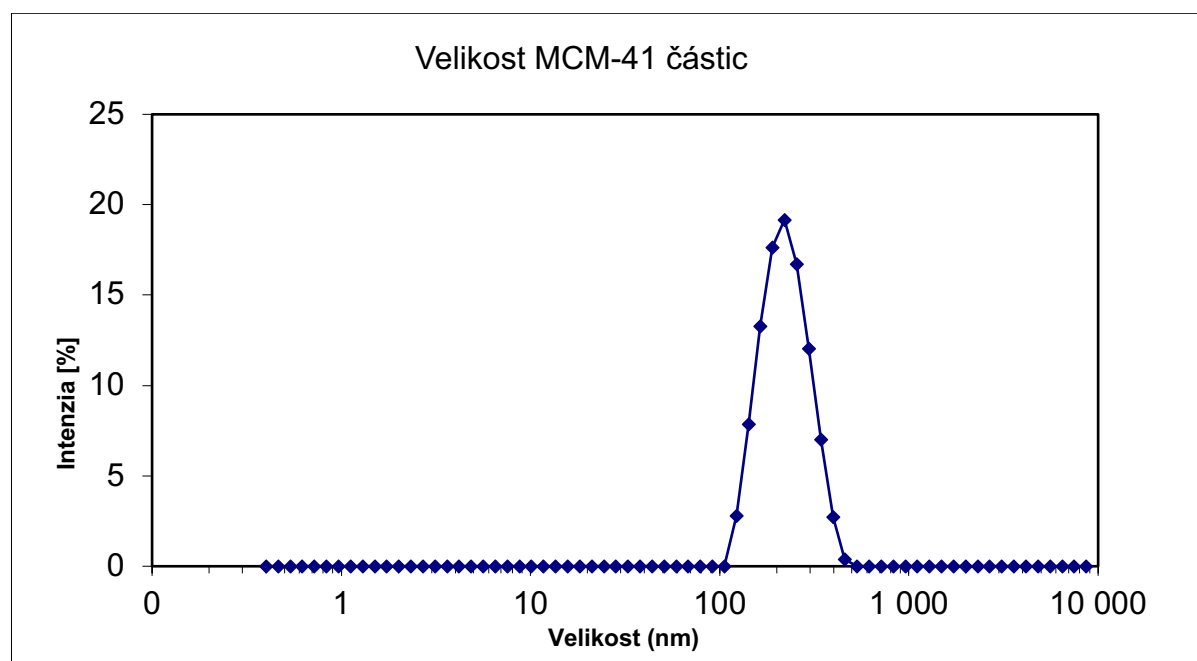
5.2.1 Velikost částic a zeta potenciál

V předložené Tabulce č. 4 je seznam částic, jejich velikosti (nm), dále PDI (polydispersity index) a Zeta potenciál (mV). Velikost částic se pohybuje v rozmezí 138,2 nm (MCM–41 empty) až 322 nm (Jíl 1:1). Největší rozměry vykazuje Jíl (299,4 nm) a nejmenší MCM–41 empty (138,2 nm). PDI (polydispersity index) je mírou rozložení molekulových hmotností ve vzorku. Udává nám, jak široká je škála velikostí polymerních řetězců v daném vzorku. V tabulce se PDI pohybuje v rozmezí 0,142 (Jíl 1:1) až 0,438 (Jíl). Zeta potenciál informuje o stabilitě koloidní suspenze. V tabulce se Zeta potenciál pohybuje v rozmezí $-25,7$ mV až $-46,8$ mV.

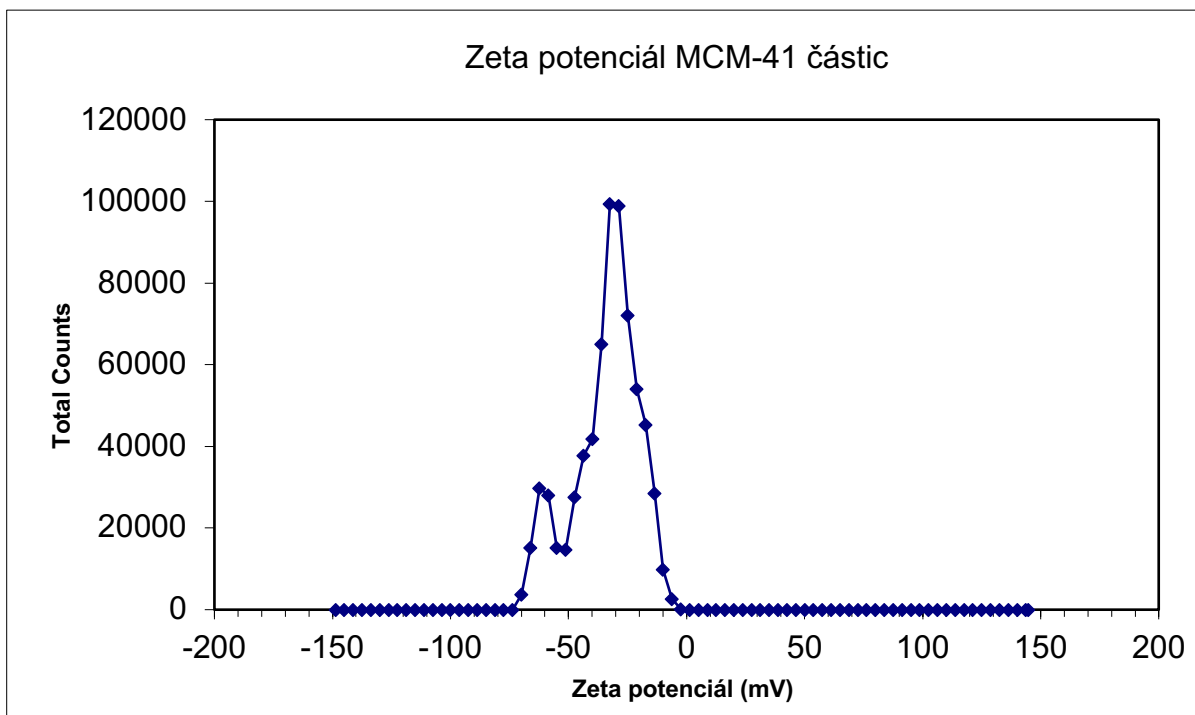
Tabulka č. 4: Velikost částic a zeta potenciál

Název částice	Velikost (nm)	PDI	Zeta potenciál (mV)
Jíl	299,4	0,438	$-46,8$
Jíl 1:1	32	0,142	$-40,7$
Jíl 2:1	227,8	0,318	$-34,2$
MCM41 empty	138,2	0,23	$-28,3$
MCM41 + extr	151,5	0,318	$-25,7$

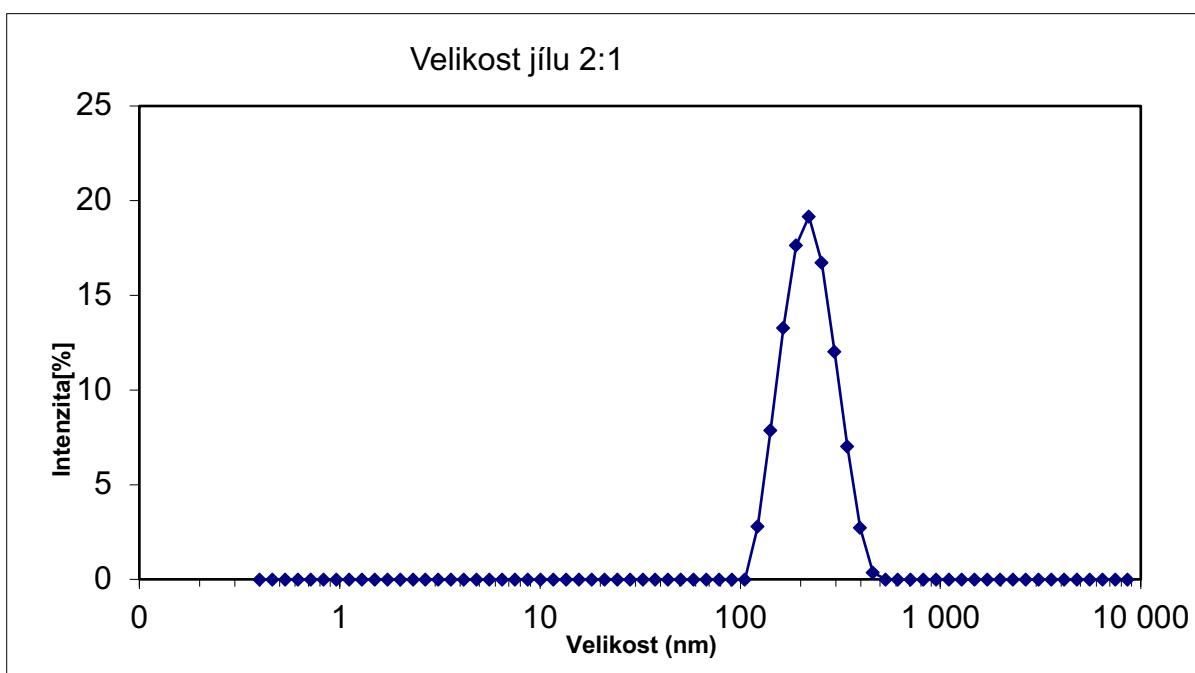
V předloženém Grafu č. 1 je znázorněna závislost počtu částic MCM-41 na jejich velikosti. Z grafu je patrné, že největší počet částic se pohyboval v rozmezí od 110 nm až 150nm. Průměrná velikost částic byla 138,2 nm. V předloženém Grafu č. 2 je znázorněna závislost počtu částic na jejich zeta potenciálu. Z grafu je patrné, že rozpětí zeta potenciálu se pohybovalo v rozmezí od -35mV až -20mV. Průměrná hodnota byla -28,3 mV. V předloženém Grafu č. 3 je znázorněna závislost počtu částic jílu s konopným extraktem na jejich velikosti. Z grafu je patrné, že největší počet částic se pohyboval v rozmezí od 200 nm až 300 nm. Průměrná velikost částic byla 227,8 nm. V předloženém Grafu č. 4 je znázorněna závislost počtu částic na jejich zeta potenciálu. Z grafu je patrné, že rozpětí zeta potenciálu se pohybovalo v rozmezí od -40 mV až -20 mV. Průměrná hodnota byla -34,2 mV. V předloženém Grafu č. 5 je znázorněna závislost počtu částic jílu s konopným extraktem na jejich velikosti. Z grafu je patrné, že největší počet částic se pohyboval v rozmezí od 200 nm až 400nm. Průměrná velikost částic byla 322 nm. V předloženém Grafu č. 6 je znázorněna závislost počtu částic na jejich zeta potenciálu. Z grafu je patrné, že rozpětí zeta potenciálu se pohybovalo v rozmezí od -45 mV až -35 mV. Průměrná hodnota byla -40,7 mV.



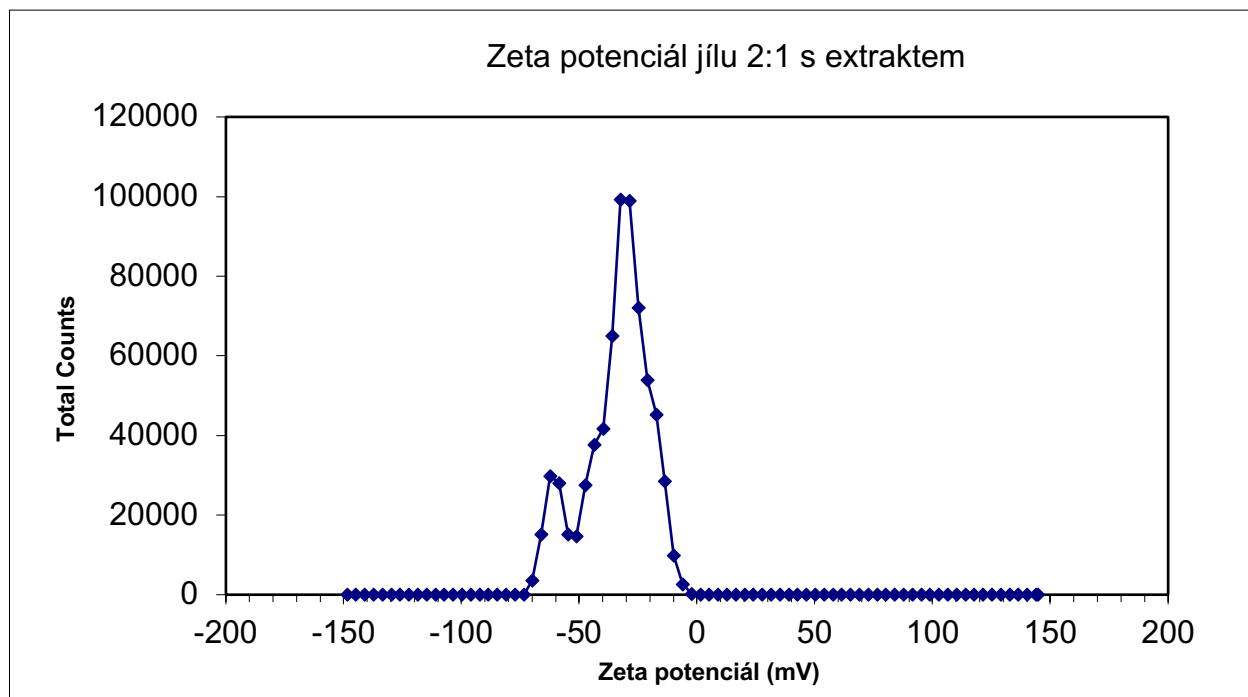
Graf č. 1: Velikost částic nanomateriálu MCM-41



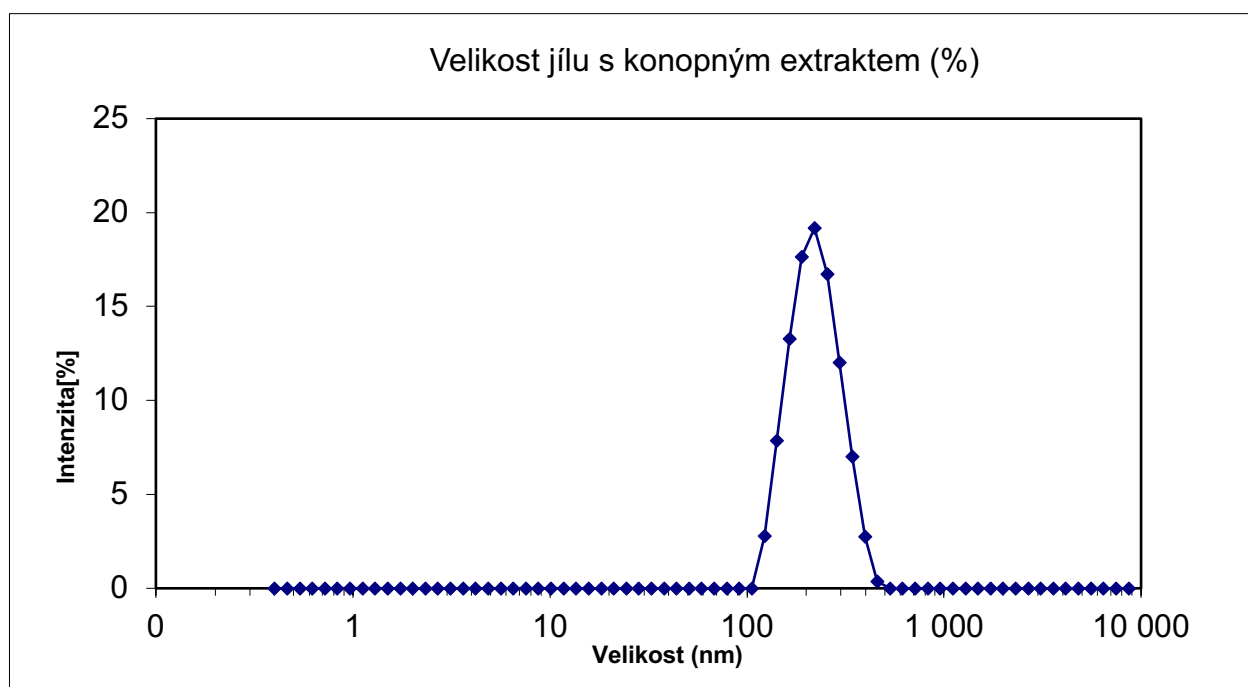
Graf č. 2: Zeta potenciál částic nanomateriálu MCM-41



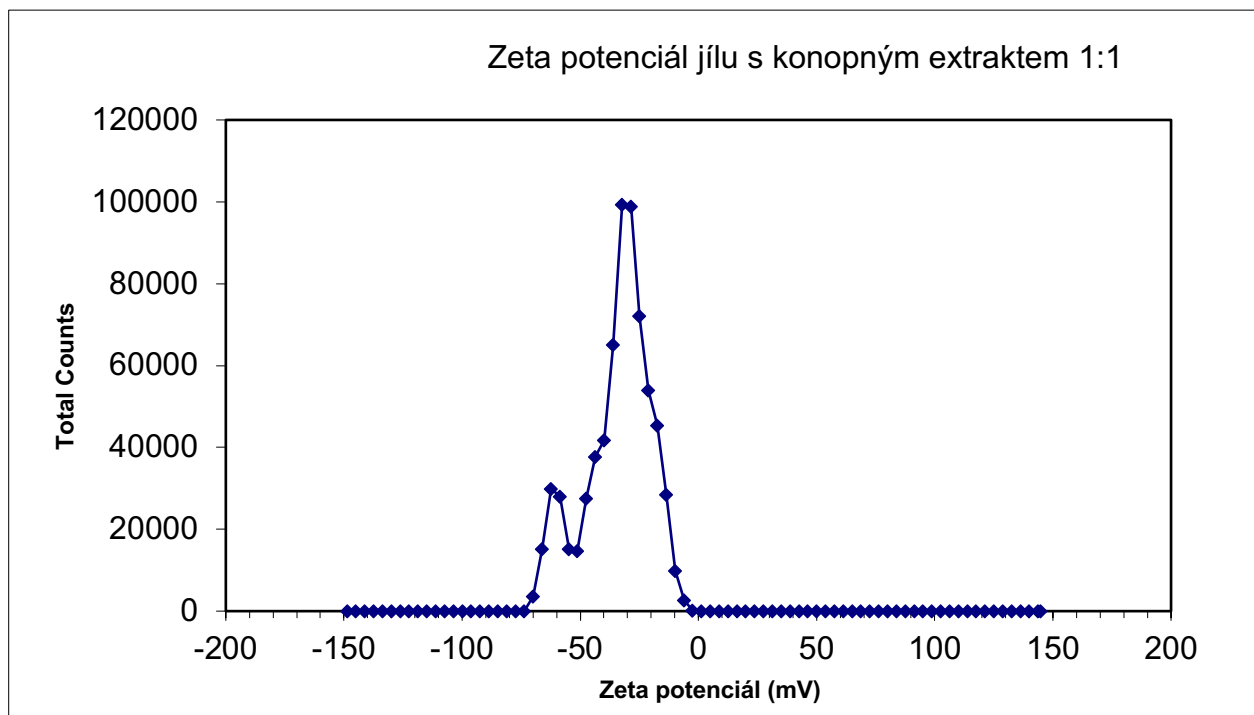
Graf č. 3: Velikost částic nanomateriálu jílu s konopným extraktem v poměru 2:1



Graf č. 4: Zeta potenciál částic nanomateriálu jílu s konopným extraktem v poměru 2:1



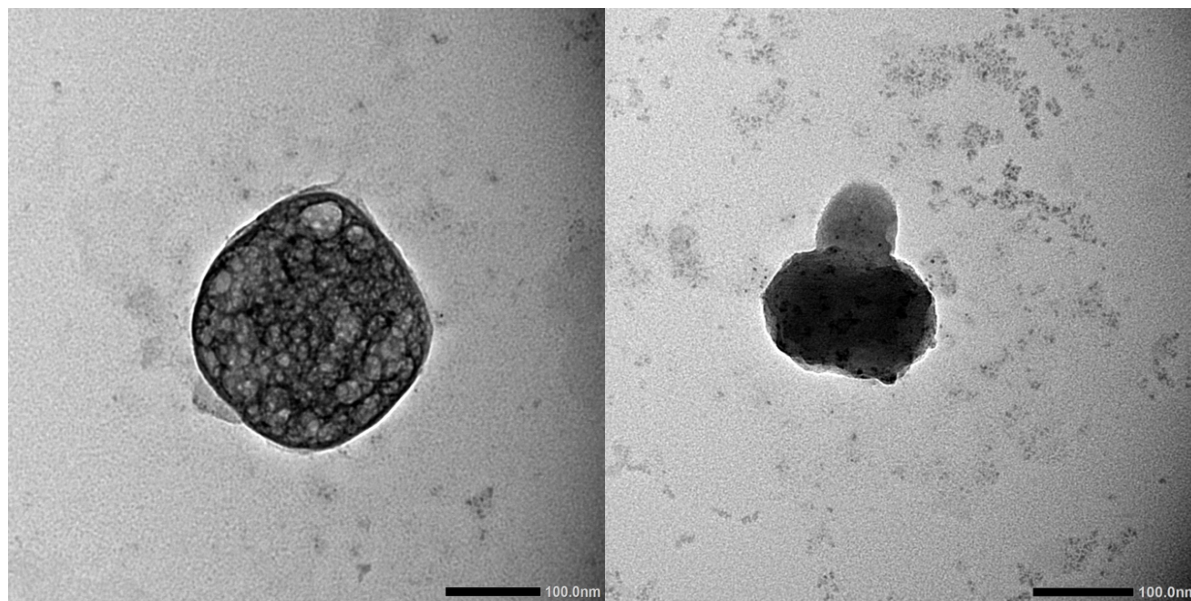
Graf č. 5: Velikost částic nanomateriálu jílu s konopným extraktem v poměru 1:1



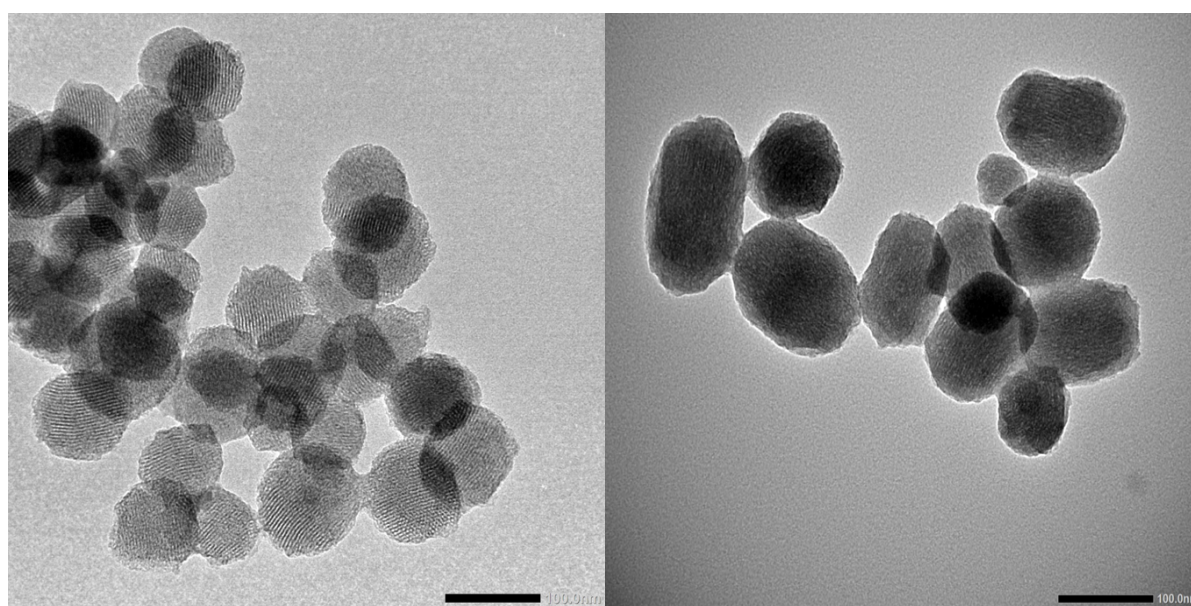
Graf č. 6: Zeta potenciál částic nanomateriálu jílu s konopným extraktem v poměru 1:1

5.2.2 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Na Obrázku č. 16 je vidět morfologie nanočástic jílu, nanočástice má kulatý tvar a síťovanou strukturu. Dále je zde znázorněna morfologie nanočástic jílu s extraktem konopí, v porovnání se částicemi samotného jílu je vidět zaplněná síťovaná kultura. Na Obrázku č. 17 je znázorněna morfologie nanočástic materiálu MCM-41, částice mají kulatý tvar a síťování připomíná otisk prstů, dále je zde znázorněna morfologie nanočástic MCM-41 s konopným extraktem, v porovnání se samotným MCM-41 je vidět zaplněná síťovaná struktura.



Obrázek č. 16: Morfologie nanočástic jílu bez extraktu (vlevo), s extraktem (vpravo)



Obrázek č. 17: Morfologie nanočástic MCM -41 bez extraktu (vlevo), s extraktem (vpravo)

5.2.3 Termogravimetrie

Z Tabulky můžeme vyvodit, že Jíl 2:1 má nejvyšší efektivitu enkapsulace ze všech tří částic (32,72 %), Jíl 1:1 měl nižší efektivitu enkapsulace (27,76 %), nicméně u poměru 1:1 je nutno vzít v potaz, že extraktu bylo celkově dvojnásobné množství oproti poměru 2:1, tudíž co do absolutního množství enkapsulace bylo větší množství u Jílu v poměru 1:1. MCM-41 mělo nejnižší efektivitu enkapsulace (9,47 %).

Tabulka č. 5: Efektivita % enkapsulace konopného extraktu do nanonosičů

Název částice	Efektivita enkapsulace
Jíl 1:1	27,76 %
Jíl 2:1	32,72 %
MCM-41 + ex.	9,47 %

5.3 Antimikrobiální aktivity

5.3.1 Bakterie

Nejcitlivějšími bakteriemi při použití jílu jako nanomateriálu (Tabulka č. 6) byly kmeny *S. epidermis* ($MIC_{80} = 16-128 \mu\text{g/ml}$). Pozitivní vliv enkapsulace konopného extraktu do jílu se projevila skoro u všech testovaných kmenů bakterií. Koncentrace MIC_{80} se viz Tabulka č. 6 se se zvyšujícím poměrem konopného extraktu vůči nanomateriálu snižuje, dokonce až o polovinu, a to konkrétně u kmenů *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus lugdunensis*. Pouze u kmenu *Streptococcus pyogenes* se efektivita enkapsulace neprokázala.

5.3.2 Plísně

MCM-41 u plísní prokazuje výrazně lepší výsledky než u bakterií. Nejcitlivějšími kmeny plísní byly *Epidermophyton floccosum*, koncentrace MIC_{80} se po enkapsulaci konopného extraktu snížila o polovinu oproti použití pouhého nanomateriálu ($64 \mu\text{g/ml}$). Nejvyšší snížení koncentrace MIC_{80} jsme zaznamenali u kmenů *Arhoderma insingulare* a *Nannizzia gypsea*, kde použití samotného nanomateriálu neprokázalo žádnou antifungální aktivitu, po enkapsulaci konopného extraktu se jasně prokazuje antifungální aktivita ($MIC_{80} = 512 \mu\text{g/ml}$). Pouze jeden kmen plísní byl rezistentní, a to *Nannizzia fulva*. Hodnoty MIC_{80} ukazují, že enkapsulace konopného extraktu do nanomateriálu má antifungální účinek. Jíl neprokázal účinek pouze u kmene *Epidermophyton floccosum*, v ostatních případech samotný jíl prokazuje antifungální aktivitu, kdy se koncentrace MIC_{80} pohybuje v rozmezí $256-1024 \mu\text{g/ml}$. Enkapsulace konopného extraktu do jílu zaznamenala pozitivní výsledky, hodnota MIC_{80} se ve většině případech snížila o polovinu, u kmene *Trichopyhton rubrum* dokonce o osminásobek.

Tabulka č. 6: MIC₈₀ (µg/ml) proti vybraným bakteriím a dermatofytům

mikroorganismus	MIC ₈₀ (µg/ml)							
	Chocolope							
bakterie	Kat. číslo	jíl	Jíl 1:1	Jíl 2:1	MCM41	MCM41 ex.	Antibiotika	Konopný ex.
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2727	128	64	64	>1024	>1024	0,065	8
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4425	>1024	>1024	>1024	128	>1024	16	128
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213	128	64	128	>1024	>1024	0,125	8
	25923	128	64	128	>1024	>1024	0,125	8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4418	16	32	64	256	512	0,065	8
	50	128	64	64	>1024	>1024	0,125	8
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	4069	64	32	64	256	>1024	0,065	16
plísně								
<i>Arhoderma insingulare</i>	5147	512	512	512	512	256	0,5	256
	5943	1024	1024	512	>2048	512	0,5	>1024
<i>Epidermophyton floccosum</i>	8339	>2048	>2048	>2048	128	64	>16	128
<i>Microsporum canis</i>	8353	512	256	256	512	256	1	256
<i>Microsporum gypseum</i>	8342	512	256	256	512	256	0,065	128
<i>Nannizzia fulva</i>	5338	256	128	64	1024	512	0,065	128
	5782	512	256	128	>2048	>2048	0,065	128
	6025	1024	256	128	512	256	0,125	64
<i>Nannizzia gypsea</i>	5125	>2048	128	128	>2048	512	0,25	128
<i>Trichophyton interdigitale</i>	8337	256	128	128	256	128	0,065	128
<i>Trichophyton rubrum</i>	4879	256	32	64	512	256	0,065	128
	4934	1024	512	512	512	512	0,065	256
<i>Trichophyton tonsurans</i>	4930	512	512	256	1024	512	1	128

5.4 Cytotoxicita

Samotný extrakt vykazoval nejnižší hodnoty IC_{50} . Nejvyšší hodnotu zaznamenal samotný jíl při 24 h. Cytotoxicita nabývala nejvyšších hodnot při 24 hodinách. Po 48 a 72 hodinách se cytotoxicita snižovala. Nejvíce cytotoxický byl samotný extrakt, nejméně pak samotný jíl a s přidavkem extraktu to byl jíl, co měl nejvyšší cytotoxický statistický rozdíl pouze po 24 hodinách.

Tabulka č. 7: Hodnota IC_{50} pro nanočástice a konopný extrakt

čas(h)	IC_{50} μ g/ml					
	Jíl	Jíl 1:1	Jíl 2:1	MCM41	MCM ex.	Konopný ex.
24	960.19 \pm 156.66 ^b	315,98 \pm 48,20 ^a	444,74 \pm 37,53 ^{ab}	625,48 \pm 49,38 ^a	587,99 \pm 27,29 ^{ba}	60,32 \pm 1,24
48	430,55 \pm 88,08	220,16 \pm 234	247,97 \pm 42,01	355,58 \pm 40,32	423,35 \pm 45,58	38,56 \pm 0,35
72	584,68 \pm 297,07	133,72 \pm 39,37	252,79 \pm 35,55	348,38 \pm 20,71	363,78 \pm 14,88	33,95 \pm 1,19

6 Diskuze

Extrakt kultivaru Chocolope byl temně zelený, což indikovalo vyšší obsah chlorofylu, chemický profil je představen v Tabulce č. 3, kde je představen profil obsahu kanabinoidů, extrakt obsahoval především prekurzor THC a to THCA $261,75 \pm 8,20$ mg/g. Terpenový profil je představen v Tabulce č. 2, zde dominoval β -karyofylen, humulen a β -farnesene. Výsledky naznačují, že kmen Chocolope patří ke kultivarům s převahou β -karyofylenu (Lewis et al., 2018).

Předložená Tabulka č. 4 prezentuje výsledky měření dvou samotných nanonosičů a tří variant nanonosičů s konopným extraktem. Tabulka č. 4 obsahuje informace o názvu částice, její velikosti (nm), PDI (polydispersity index) a Zeta potenciálu (mV). Velikost částic se pohybuje v rozmezí 138,2 nm (MCM-41 empty) až 322 nm (Jíl 1:1). Největší rozměry vykazuje Jíl (299,4 nm) a nejmenší MCM-41 empty (138,2 nm). PDI (polydispersity index) je mírou rozložení molekulových hmotností v polymerním vzorku. Udává nám, jak široká je škála velikostí polymerních řetězců v daném vzorku. V Tabulce č. 4 se PDI pohybuje v rozmezí 0,142 (Jíl 1:1) až 0,438 (Jíl). Nižší PDI značí užší rozložení velikosti částic. Zeta potenciál informuje o stabilitě koloidní suspenze. V Tabulce č. 4 se Zeta potenciál pohybuje v rozmezí $-25,7$ mV (MCM-41 ex.) až $-46,8$ mV (Jíl). Dle Toropov et al., 2018 se předpověď stability nanomateriálu pohybuje v rozmezí mezi -20 až $+20$ mV. Při pohledu na výsledky lze konstatovat, že nanomateriály a zároveň nanomateriály s enkapsulovaným konopným extraktem byly stabilní.

Rossi et al., 2020 tvrdí, že jedním z hlavních omezení konopného extraktu je jeho omezená rozpustnost ve vodě a náchylnost k chemické degradaci a biologické inaktivaci, což přímo ovlivňuje jeho stabilitu a účinnost, proto je potřeba pro potenciál konopného extraktu v léčbě kožních onemocnění vyvinout formu, která zachová jeho biodostupnost. Enkapsulace konopného extraktu může vést ke zvýšené efektivitě léčby kožních onemocnění. Dle tabulky (viz Tabulka č. 5) se zdá, že poměr jílu 2:1 je nejvhodnější pro enkapsulaci, nicméně u poměru 1:1 je nutno vzít v potaz, že extraktu bylo celkově dvojnásobné množství oproti poměru 2:1, tudíž co do absolutního množství enkapsulace bylo větší množství u Jílu v poměru 1:1. MCM-41 se dle výsledků v Tabulce č. 5 zdá být nejméně vhodným nanonosičem pro konopný extrakt. Zároveň je důležité poznamenat, že všechny nanomateriály s enkapsulovaným konopným extraktem prokázaly antimikrobiální aktivitu.

Tato práce byla založená na zjištění antimikrobiálního efektu konopí enkapsulovaného do anorganických nanonosičů (nanojíl a MCM-41), dále se zjišťovala antimikrobiální aktivita samotných anorganických nanonosičů. Studie ukazují na antimikrobiální aktivitu samotných nanonosičů (Dardir et al., 2018), Toto tvrzení se potvrdilo u jílu, konkrétně u testovaných kmenů *S. saprophyticus*, *S. aureus*, *S. epidermis*, *S. lugdunensis*, *A. insingulare* (5147,5943), *M. canis*, *N. fulva* (5338,5782,6025), *T. interdigitale*, *T. rubrum* (4879,4934), *T. tonsurans*, kdy se limit pro potvrzení antimikrobiální aktivity (MIC_{80}) pohyboval v rozmezí od 16–128 ($\mu\text{g/ml}$) u bakterií a u dermatofytů v rozmezí 256–1024 ($\mu\text{g/ml}$).

Materiál MCM–41 vykazoval lepší antifungální výsledky než antimikrobiální, proti testovaným kmenům bakterií zaznamenal pozitivní výsledky u (*S. pyogenes*, *S. epidermis*, *S. lugdunensis*). V rámci antifungální aktivity vykázal pozitivní výsledky u kmenů *A. insingulare*, *E. floccosum*, *M. canis*, *N. fulva* (5338,6025), *T. interdigitale*, *T. rubrum* (4879,4934) a *T. tonsurans*.

Dle studie z roku 1976 delta–9–tetrahydrokanabinol (Δ^9 –THC) a CBD disponují bakteriostatickým až baktericidním účinkem vůči bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* a *S. faecalis*, proto lze kanabinoidy považovat za jednu z antimikrobiálních složek konopí (van Klingereren & ten Ham, 1976). Nelze však opomenout další důležitou složku, která je odpovědná za antimikrobiální aktivitu konopí, a to terpeny. Například β –karyofylen, který dle Tabulky č. 2 představuje nejvyšší terpenický podíl dle studií prokazuje antifungální a antimikrobiální aktivitu (Sköld et al., 2006), (Dahham et al., 2015), (Han et al., 2019), (Paduch et al., 2007). Samotný konopný extrakt prokázal svou biologickou aktivitu proti dermatofytům a bakteriím skoro u všech testovaných kmenů, pouze u *A. insingulare* (5943) se antifungální aktivita neprokázala.

Rossi et al., 2020 tvrdí, že enkapsulace může vést ke zvýšené efektivitě léčby kožních onemocnění. Toto tvrzení se v naší práci podařilo potvrdit. Nanojíl v poměru 1:1 s konopným extraktem prokazoval snížení účinné koncentrace MIC_{80} u řady kmenů bakterií a dermatofytů v porovnání se samotným nanonosičem o polovinu. Poměr 2:1 vykazoval v některých případech stejné výsledky jako 1:1. MCM–41 zaznamenal pozitivní výsledek v rámci antimikrobiální aktivity u bakterií. Pouze u jednoho kmene, byla zaznamenána účinná koncentrace MIC_{80} , a to u kmene *Staphylococcus epidermis*. V rámci antifungální aktivity se prokázal pozitivní vliv enkapsulace zejména u kmenů *Arhoderma insingulare* (5943) a *Nannizzia gypsea* (5125), kdy se u použití samotného nanomateriálu nepotvrdila antifungální aktivita a po enkapsulaci se podařilo zaznamenat účinnou koncentraci MIC_{80} . Celkově se se dá konstatovat, že enkapsulace konopného extraktu do nanomateriálu může vést ke zvýšené efektivitě léčby kožních onemocnění.

Dále byla stanovena hodnota IC_{50} pro nanočástice a nanočástice s extrakty po 24 hodinách byla v rozmezí $315,98 \pm 48,20$ až $960,19 \pm 156,66$ $\mu\text{g/ml}$, po 48 hodinách $220,16 \pm 234$ až $430,55 \pm 88,08$ $\mu\text{g/ml}$, po 72 hodinách $133,72 \pm 39,37$ až $584,68 \pm 297,07$ $\mu\text{g/ml}$. (Rekha & Anila, 2019) testoval cytotoxicitu nanomateriálů na fibroblastech a zjistil, že koncentrace $IC_{50} = 710$ $\mu\text{g/ml}$ naznačuje biokompatibilitu nanomateriálů a relativně nízkou cytotoxicitu. Dle výsledků lze konstatovat, že nanočástice vybrány pro tento pokus byly biokompatibilní, a potvrzují možnost jejich využití v boji proti kožním onemocněním.

7 Závěr

Lze konstatovat, že hypotézy a cíle práce byly naplněny, antimikrobiální aktivita enkapsulovaného konopného extraktu do anorganických nosičů byla ve srovnání se samotnými anorganickými nosiči účinnější, čímž se potvrdila jeho antimikrobiální aktivita. Konopný extrakt se podařilo enkapsulovat do obou nanonosičů.

Byla ověřena antimikrobiální účinnost vůči téměř všem testovaným kmenům bakterií a dermatofytů. MCM-41 vykazovalo lepší výsledky v rámci antifungální aktivity. Nanojíl vykazoval antimikrobiální aktivitu u bakterií a dermatofytů. Nanojíl v poměru 1:1 s konopným extraktem prokazoval snížení účinné koncentrace MIC₈₀ u řady kmenů bakterií a dermatofytů v porovnání se samotným nanonosičem o polovinu. U nanonosiče MCM-41 se v rámci antifungální aktivity prokázal pozitivní vliv enkapsulace zejména u kmenů *Arhoderma insingulare* (5943) a *Nannizzia gypsea* (5125), kdy se u použití samotného nanomateriálu nepotvrdila antifungální aktivita a po enkapsulaci se podařilo zaznamenat účinnou koncentraci MIC₈₀. Celkově se dá konstatovat, že enkapsulace konopného extraktu do anorganických nanonosičů může vést ke zvýšené efektivitě léčby kožních onemocnění.

V mnoha studiích bylo prokázáno, že kanabinoidy a terpeny jakožto hlavní komponenty rostlin konopí se již po tisíciletí celosvětově využívají v tradiční medicíně. Enkapsulace konopného extraktu do nanomateriálů by mohla výrazně zlepšit využití těchto látek v boji proti kožním onemocněním. Vzhledem ke své velikosti, mají nanočástice možnost pronikat skrze buněčné bariéry a sloužit tak v medicíně jako nosiče pro biologicky aktivní látky a částečně tak nahradit široce používaná antibiotika. Práce byly prováděny v podmínkách *in vitro* a nepostihovaly kůži jako celek, která je mnohem odolnější.

V budoucnu bude potřeba provést další výzkumy, které by zahrnovaly další nanonosiče a jiné konopné extrakty. Současně s tím musí následovat testy *in vivo*, aby napomohly k efektivnějšímu využití konopí v léčbě kožních onemocnění.

8 Literatura

- Alsaidan, M., Simmons, B. J., Bray, F. N., Falto-Aizpurua, L. A., Griffith, R. D., & Nouri, K. (2015). Hippocrates' Contributions to Dermatology Revealed. *JAMA Dermatology*, *151*(6), 658. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2015.0201>
- Ameen, M. (2010). Epidemiology of superficial fungal infections. *Clinics in Dermatology*, *28*(2), 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.12.005>
- Andre, C. M., Hausman, J.-F., & Guerriero, G. (2016). Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Frontiers in Plant Science*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019>
- Antonio, J. R., Antonio, C. R., Cardeal, I. L. S., Ballavenuto, J. M. A., & Oliveira, J. R. (2014). Nanotechnology in Dermatology. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, *89*(1), 126–136. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142228>
- Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., Smith, E., & Rahman, M. M. (2008). Antibacterial Cannabinoids from *Cannabis sativa*: A Structure–Activity Study. *Journal of Natural Products*, *71*(8), 1427–1430. <https://doi.org/10.1021/np8002673>
- Armarego, W. L. F. (2022). Nanomaterials. In *Purification of Laboratory Chemicals* (pp. 586–630). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90968-6.50005-9>
- Ashton, C. H. (2001). Pharmacology and effects of cannabis: A brief review. *British Journal of Psychiatry*, *178*(2), 101–106. <https://doi.org/10.1192/bjp.178.2.101>
- Atakan, Z. (2012). Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, *2*(6), 241–254. <https://doi.org/10.1177/2045125312457586>
- Belackova, V., & Stefunkova, M. (2018). Interpreting the Czech drug decriminalization: The glass is half full – Response to Cervený, J., Chomynová, P., Mravčík, V., & van Ours, J.C. (2017). Cannabis decriminalization and the age of onset of cannabis use. *International Journal of Drug Policy*, *52*, 102–105. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2017.10.010>
- Bessa, G. (2023). Bacterial Infections. In *Dermatology in Public Health Environments* (pp. 183–202). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-13505-7_9

- Bodor, Á. L., Katona, I., Nyíri, G., Mackie, K., Ledent, C., Hájos, N., & Freund, T. F. (2005). Endocannabinoid Signaling in Rat Somatosensory Cortex: Laminar Differences and Involvement of Specific Interneuron Types. *The Journal of Neuroscience*, 25(29), 6845–6856. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0442-05.2005>
- Bonini, S. A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M., & Mastinu, A. (2018). Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal of Ethnopharmacology*, 227, 300–315. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.004>
- Brezoiu, A.-M., Prundeanu, M., Berger, D., Deaconu, M., Matei, C., Oprea, O., Vasile, E., Negreanu-Pîrjol, T., Muntean, D., & Danciu, C. (2020). Properties of Salvia officinalis L. and Thymus serpyllum L. Extracts Free and Embedded into Mesopores of Silica and Titania Nanomaterials. *Nanomaterials*, 10(5), 820. <https://doi.org/10.3390/nano10050820>
- Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3), 143–155. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>
- Calapai, F., Cardia, L., Esposito, E., Ammendolia, I., Mondello, C., Lo Giudice, R., Gangemi, S., Calapai, G., & Mannucci, C. (2022). Pharmacological Aspects and Biological Effects of Cannabigerol and Its Synthetic Derivatives. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2022/3336516>
- Chandra, S., Lata, H., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2017). Cannabis sativa L.: Botany and Horticulture. In *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology* (pp. 79–100). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6_3
- Chiller, K., Selkin, B. A., & Murakawa, G. J. (2001). Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 6(3), 170–174. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.00043.x>
- Crocq, M.-A. (2020). History of cannabis and the endocannabinoid system. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 22(3), 223–228. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2020.22.3/mcrocq>
- Dahham, S., Tabana, Y., Iqbal, M., Ahamed, M., Ezzat, M., Majid, A., & Majid, A. (2015). The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of Aquilaria crassna. *Molecules*, 20(7), 11808–11829. <https://doi.org/10.3390/molecules200711808>

- Dalli, M., Azizi, S., Azghar, A., Saddari, A., Benaissa, E., Lahlou, Y. Ben, Elouennass, M., & Maleb, A. (2023). Cannabis sativa L.: A Comprehensive review on legislation, decriminalization, phytochemistry, antimicrobial activity, and safety. *Journal of Food and Drug Analysis*, 31(3), 408–435. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.3471>
- Dardir, F. M., Mohamed, A. S., Abukhadra, M. R., Ahmed, E. A., & Soliman, M. F. (2018). Cosmetic and pharmaceutical qualifications of Egyptian bentonite and its suitability as drug carrier for Praziquantel drug. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 115, 320–329. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.01.041>
- Dhadwal, G., & Kirchhof, M. G. (2018). The Risks and Benefits of Cannabis in the Dermatology Clinic. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 22(2), 194–199. <https://doi.org/10.1177/1203475417738971>
- EMCDDA. (2018). *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*. <https://doi.org/doi:10.2810/566650>
- Farag, S., & Kayser, O. (2017). The Cannabis Plant: Botanical Aspects. In *Handbook of Cannabis and Related Pathologies* (pp. 3–12). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00001-6>
- Fathordoobady, F., Singh, A., Kitts, D. D., & Pratap Singh, A. (2019). Hemp (*Cannabis Sativa* L.) Extract: Anti-Microbial Properties, Methods of Extraction, and Potential Oral Delivery. *Food Reviews International*, 35(7), 664–684. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1600539>
- Ferreira, I. G., Weber, M. B., & Bonamigo, R. R. (2021). History of dermatology: the study of skin diseases over the centuries. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 96(3), 332–345. <https://doi.org/10.1016/j.abd.2020.09.006>
- Fike, J. (2016). Industrial Hemp: Renewed Opportunities for an Ancient Crop. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 35(5–6), 406–424. <https://doi.org/10.1080/07352689.2016.1257842>
- Gaoni, Y., & Mechoulam, R. (1964). Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society*, 86(8), 1646–1647. <https://doi.org/10.1021/ja01062a046>
- Gloss, D. (2015). An Overview of Products and Bias in Research. *Neurotherapeutics*, 12(4), 731–734. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0370-x>
- Hall, W., & Degenhardt, L. (2009). Adverse health effects of non-medical cannabis use. *The Lancet*, 374(9698), 1383–1391. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61037-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61037-0)

- Han, Y., Sun, Z., & Chen, W. (2019). Antimicrobial Susceptibility and Antibacterial Mechanism of Limonene against *Listeria monocytogenes*. *Molecules*, *25*(1), 33. <https://doi.org/10.3390/molecules25010033>
- Hartmann, A. (2016). Back to the roots – dermatology in ancient Egyptian medicine. *JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, *14*(4), 389–396. <https://doi.org/10.1111/ddg.12947>
- Havlickova, B., Czaika, V. A., & Friedrich, M. (2008). Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, *51*(s4), 2–15. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01606.x>
- Hillig, K. W., & Mahlberg, P. G. (2004). A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in *Cannabis* (Cannabaceae). *American Journal of Botany*, *91*(6), 966–975. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.6.966>
- Hourfane, S., Mechqoq, H., Bekkali, A. Y., Rocha, J. M., & El Aouad, N. (2023). A Comprehensive Review on Cannabis sativa Ethnobotany, Phytochemistry, Molecular Docking and Biological Activities. *Plants*, *12*(6), 1245. <https://doi.org/10.3390/plants12061245>
- Hüsnü, K., Başer, C., & Demirci, F. (2007). Chemistry of Essential Oils. In *Flavours and Fragrances* (pp. 43–86). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-49339-6_4
- Iannotti, F. A., Di Marzo, V., & Petrosino, S. (2016). Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Progress in Lipid Research*, *62*, 107–128. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.02.002>
- Karas, J. A., Wong, L. J. M., Paulin, O. K. A., Mazeh, A. C., Hussein, M. H., Li, J., & Velkov, T. (2020). The Antimicrobial Activity of Cannabinoids. *Antibiotics*, *9*(7), 406. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070406>
- Kresge, C. T., Leonowicz, M. E., Roth, W. J., Vartuli, J. C., & Beck, J. S. (1992). Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*, *359*(6397), 710–712. <https://doi.org/10.1038/359710a0>
- Kyle, A. A., & Dahl, M. V. (2004). Topical Therapy for Fungal Infections. *American Journal of Clinical Dermatology*, *5*(6), 443–451. <https://doi.org/10.2165/00128071-200405060-00009>
- Ladda, M. A., & Lynde, C. W. (2019). The Father of Medicine on Dermatology. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, *23*(2), 237–237. <https://doi.org/10.1177/1203475418811358>

- Lawler, A. (2019). Oldest evidence of marijuana use discovered in 2500-year-old cemetery in peaks of western China. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aay3693>
- Lewis, M., Russo, E., & Smith, K. (2018). Pharmacological Foundations of Cannabis Chemovars. *Planta Medica*, *84*(04), 225–233. <https://doi.org/10.1055/s-0043-122240>
- Lu, H.-C., & Mackie, K. (2021). Review of the Endocannabinoid System. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, *6*(6), 607–615. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016>
- MacGillivray, N. (2017). Sir William Brooke O’Shaughnessy (1808–1889), MD, FRS, LRCS Ed: Chemical pathologist, pharmacologist and pioneer in electric telegraphy. *Journal of Medical Biography*, *25*(3), 186–196. <https://doi.org/10.1177/0967772015596276>
- Magagnini, G., Grassi, G., & Kotiranta, S. (2018). The Effect of Light Spectrum on the Morphology and Cannabinoid Content of Cannabis sativa L. *Medical Cannabis and Cannabinoids*, *1*(1), 19–27. <https://doi.org/10.1159/000489030>
- Majhi, K. C., & Yadav, M. (2021). Synthesis of inorganic nanomaterials using carbohydrates. In *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science* (pp. 109–135). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821887-7.00003-3>
- McPartland, J. M. (2018). Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. *Cannabis and Cannabinoid Research*, *3*(1), 203–212. <https://doi.org/10.1089/can.2018.0039>
- Mechoulam, R., & Hanuš, L. (2000). A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chemistry and Physics of Lipids*, *108*(1–2), 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(00\)00184-5](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(00)00184-5)
- Mechoulam, R., & Shvo, Y. (1963). Hashish—I. *Tetrahedron*, *19*(12), 2073–2078. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(63\)85022-X](https://doi.org/10.1016/0040-4020(63)85022-X)
- Mihrianyan, A., Ferraz, N., & Strømme, M. (2012). Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. *Progress in Materials Science*, *57*(5), 875–910. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2011.10.001>
- Milfortová, L. (2010). Kanabinoidy. *Kontakt*, *12*(3), 343–351. <https://doi.org/10.32725/kont.2010.047>

- Mnekin, L., & Ripoll, L. (2021). Topical Use of Cannabis sativa L. Biochemicals. *Cosmetics*, 8(3), 85. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8030085>
- Mokwena, K. (2019). Social and public health implications of the legalisation of recreational cannabis: A literature review. *African Journal of Primary Health Care & Family Medicine*, 11(1). <https://doi.org/10.4102/phcfm.v11i1.2136>
- Nowak, A., Zagórska-Dziok, M., Ossowicz-Rupniewska, P., Makuch, E., Duchnik, W., Kucharski, Ł., Adamiak-Giera, U., Prowans, P., Czapla, N., Bargiel, P., Petriczko, J., Markowska, M., & Klimowicz, A. (2021). Epilobium angustifolium L. Extracts as Valuable Ingredients in Cosmetic and Dermatological Products. *Molecules*, 26(11), 3456. <https://doi.org/10.3390/molecules26113456>
- Oh, J., Byrd, A. L., Deming, C., Conlan, S., Kong, H. H., & Segre, J. A. (2014). Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature*, 514(7520), 59–64. <https://doi.org/10.1038/nature13786>
- Paduch, R., Kandefer-Szerszeń, M., Trytek, M., & Fiedurek, J. (2007). Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 55(5), 315–327. <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0039-1>
- Page, R. L., Allen, L. A., Kloner, R. A., Carriker, C. R., Martel, C., Morris, A. A., Piano, M. R., Rana, J. S., & Saucedo, J. F. (2020). Medical Marijuana, Recreational Cannabis, and Cardiovascular Health: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 142(10). <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000883>
- Pain, S. (2015). A potted history. *Nature*, 525(7570), S10–S11. <https://doi.org/10.1038/525S10a>
- Park, J.-H., Shin, H.-J., Kim, M. H., Kim, J.-S., Kang, N., Lee, J.-Y., Kim, K.-T., Lee, J. I., & Kim, D.-D. (2016). Application of montmorillonite in bentonite as a pharmaceutical excipient in drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 46(4), 363–375. <https://doi.org/10.1007/s40005-016-0258-8>
- Patel, A., Patra, F., Shah, N., & Khedkar, C. (2018). Application of Nanotechnology in the Food Industry: Present Status and Future Prospects. In *Impact of Nanoscience in the Food Industry* (pp. 1–27). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811441-4.00001-7>
- Pieracci, Y., Ascrizzi, R., Terreni, V., Pistelli, L., Flamini, G., Bassolino, L., Fulvio, F., Montanari, M., & Paris, R. (2021). Essential Oil of Cannabis sativa L: Comparison of Yield and Chemical Composition of 11 Hemp Genotypes. *Molecules*, 26(13), 4080. <https://doi.org/10.3390/molecules26134080>

- Pisanti, S., & Bifulco, M. (2019). Medical *Cannabis* : A plurimillennial history of an evergreen. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8342–8351. <https://doi.org/10.1002/jcp.27725>
- Pollio, A. (2016). The Name of *Cannabis* : A Short Guide for Nonbotanists. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), 234–238. <https://doi.org/10.1089/can.2016.0027>
- Potter, D. J. (2014). A review of the cultivation and processing of cannabis (*Cannabis sativa* L.) for production of prescription medicines in the UK. *Drug Testing and Analysis*, 6(1–2), 31–38. <https://doi.org/10.1002/dta.1531>
- Pratt, M., Stevens, A., Thuku, M., Butler, C., Skidmore, B., Wieland, L. S., Clemons, M., Kanji, S., & Hutton, B. (2019). Benefits and harms of medical cannabis: a scoping review of systematic reviews. *Systematic Reviews*, 8(1), 320. <https://doi.org/10.1186/s13643-019-1243-x>
- Premi, M., & Sharma, H. K. (2017). Effect of different combinations of maltodextrin, gum arabic and whey protein concentrate on the encapsulation behavior and oxidative stability of spray dried drumstick (*Moringa oleifera*) oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1232–1240. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.160>
- Pulido-Cejudo, A., Guzmán-Gutierrez, M., Jalife-Montaña, A., Ortiz-Covarrubias, A., Martínez-Ordaz, J. L., Noyola-Villalobos, H. F., & Hurtado-López, L. M. (2017). Management of acute bacterial skin and skin structure infections with a focus on patients at high risk of treatment failure. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 4(5), 143–161. <https://doi.org/10.1177/2049936117723228>
- Radwan, M. M., Chandra, S., Gul, S., & ElSohly, M. A. (2021). Cannabinoids, Phenolics, Terpenes and Alkaloids of Cannabis. *Molecules*, 26(9), 2774. <https://doi.org/10.3390/molecules26092774>
- Radwan, M. M., ElSohly, M. A., Slade, D., Ahmed, S. A., Wilson, L., El-Alfy, A. T., Khan, I. A., & Ross, S. A. (2008). Non-cannabinoid constituents from a high potency Cannabis sativa variety. *Phytochemistry*, 69(14), 2627–2633. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.07.010>
- Rath, D., Rana, S., & Parida, K. M. (2014). Organic amine-functionalized silica-based mesoporous materials: an update of syntheses and catalytic applications. *RSC Adv.*, 4(100), 57111–57124. <https://doi.org/10.1039/C4RA08005J>
- Rekha, S., & Anila, E. I. (2019). In vitro cytotoxicity studies of surface modified CaS nanoparticles on L929 cell lines using MTT assay. *Materials Letters*, 236, 637–639. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.11.009>

- Rezende, B., Alencar, A. K. N., de Bem, G. F., Fontes-Dantas, F. L., & Montes, G. C. (2023). Endocannabinoid System: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Pharmaceuticals*, 16(2), 148. <https://doi.org/10.3390/ph16020148>
- Rossi, P., Cappelli, A., Marinelli, O., Valzano, M., Pavoni, L., Bonacucina, G., Petrelli, R., Pompei, P., Mazzara, E., Ricci, I., Maggi, F., & Nabissi, M. (2020). Mosquitocidal and Anti-Inflammatory Properties of The Essential Oils Obtained from Monoecious, Male, and Female Inflorescences of Hemp (*Cannabis sativa* L.) and Their Encapsulation in Nanoemulsions. *Molecules*, 25(15), 3451. <https://doi.org/10.3390/molecules25153451>
- Russo, E. B. (2011). Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*, 163(7), 1344–1364. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x>
- Shakya, D. R. (2021). “Considerations for the Use of Medical Cannabis: An Overview of Benefits and Harms.” *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 36(4). <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2021.36.005886>
- Sharmin, S., Rahaman, Md. M., Sarkar, C., Atolani, O., Islam, M. T., & Adeyemi, O. S. (2021). Nanoparticles as antimicrobial and antiviral agents: A literature-based perspective study. *Heliyon*, 7(3), e06456. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06456>
- Singh, A., Masih, A., Khurana, A., Singh, P. K., Gupta, M., Hagen, F., Meis, J. F., & Chowdhary, A. (2018). High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene. *Mycoses*, 61(7), 477–484. <https://doi.org/10.1111/myc.12772>
- Sköld, M., Karlberg, A.-T., Matura, M., & Börje, A. (2006). The fragrance chemical β -caryophyllene—air oxidation and skin sensitization. *Food and Chemical Toxicology*, 44(4), 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.08.028>
- Sommano, S. R., Chittasupho, C., Ruksiriwanich, W., & Jantrawut, P. (2020). The Cannabis Terpenes. *Molecules*, 25(24), 5792. <https://doi.org/10.3390/molecules25245792>
- Surendran, S., Qassadi, F., Surendran, G., Lilley, D., & Heinrich, M. (2021a). Myrcene—What Are the Potential Health Benefits of This Flavouring and Aroma Agent? *Frontiers in Nutrition*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.699666>
- Surendran, S., Qassadi, F., Surendran, G., Lilley, D., & Heinrich, M. (2021b). Myrcene—What Are the Potential Health Benefits of This Flavouring and Aroma Agent? *Frontiers in Nutrition*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.699666>

- Toropov, A., Sizochenko, N., Toropova, A., & Leszczynski, J. (2018). Towards the Development of Global Nano-Quantitative Structure–Property Relationship Models: Zeta Potentials of Metal Oxide Nanoparticles. *Nanomaterials*, *8*(4), 243. <https://doi.org/10.3390/nano8040243>
- van Klinger, B., & ten Ham, M. (1976). Antibacterial activity of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Antonie van Leeuwenhoek*, *42*(1–2), 9–12. <https://doi.org/10.1007/BF00399444>
- Vinceković, M., Jurić, S., Marijan, M., Viskić, M., Vlahoviček-Kahlina, K., & Maslov Bandić, L. (2021). Encapsulation of herb extracts (Aromatic and medicinal herbs). In *Aromatic Herbs in Food* (pp. 263–322). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822716-9.00008-1>
- Wallach, D., & Tillès, G. (1992). First International Congress of Dermatology and Syphilology, Paris, Aug. 5–10, 1889. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *26*(6), 995–1001. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(08\)80338-6](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(08)80338-6)
- Weidenmaier, C., Goerke, C., & Wolz, C. (2012). Staphylococcus aureus determinants for nasal colonization. *Trends in Microbiology*, *20*(5), 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.03.004>
- Whiting, P. F., Wolff, R. F., Deshpande, S., Di Nisio, M., Duffy, S., Hernandez, A. V., Keurentjes, J. C., Lang, S., Misso, K., Ryder, S., Schmidtkofer, S., Westwood, M., & Kleijnen, J. (2015). Cannabinoids for Medical Use. *JAMA*, *313*(24), 2456. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.6358>
- Wood, T. B., Spivey, W. T. N., & Easterfield, T. H. (1899). III.—Cannabinol. Part I. *J. Chem. Soc., Trans.*, *75*(0), 20–36. <https://doi.org/10.1039/CT8997500020>
- Yanagisawa, T., Shimizu, T., Kuroda, K., & Kato, C. (1990). The Preparation of Alkyltrimethylammonium–Kanemite Complexes and Their Conversion to Microporous Materials. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, *63*(4), 988–992. <https://doi.org/10.1246/bcsj.63.988>
- Yang, C., Wang, Y., Lu, L., Unsworth, L., Guan, L. L., & Chen, L. (2018). Oat protein-shellac beads: Superior protection and delivery carriers for sensitive bioactive compounds. *Food Hydrocolloids*, *77*, 754–763. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.017>
- Zabot, G. L., Schaefer Rodrigues, F., Polano Ody, L., Vinícius Tres, M., Herrera, E., Palacin, H., Córdova-Ramos, J. S., Best, I., & Olivera-Montenegro, L. (2022). Encapsulation of Bioactive Compounds for Food and Agricultural Applications. *Polymers*, *14*(19), 4194. <https://doi.org/10.3390/polym14194194>

Zeman, P. (2007). Legislation and Practice concerning Prosecution of Drug Offenses in the Czech Republic. *Journal of Drug Issues*, 37(1), 45–72. <https://doi.org/10.1177/002204260703700103>

Zheng, Z., Fiddes, K., & Yang, L. (2021). A narrative review on environmental impacts of cannabis cultivation. *Journal of Cannabis Research*, 3(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s42238-021-00090-0>

Žuk-Gołaszewska, K., Żuk-Gołaszewska, K., & Gołaszewski, J. (2018). Cannabis sativa L. – cultivation and quality of raw material. *Journal of Elementology*, 3/2018. <https://doi.org/10.5601/jelem.2017.22.3.1500>