

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

***In vitro* toxicita extraktů *Cannabis* v rozdílném stupni  
zralosti na buňky střevního epitelu**

**Bakalářská práce**

**Pavel Kouřimský  
Výživa a potraviny**

**Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.**

© 2022 ČZU v Praze

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "*In vitro* toxicita extraktů *Cannabis* v rozdílném stupni zralosti na buňky střevního epitelu" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22. 4. 2022

---

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval panu Ing. Ivo Doskočilovi Ph.D. za cenné rady, trpělivost při konzultacích mé bakalářské práce, odborné vedení práce a za čas, který mi při psaní práce věnoval.

# ***In vitro* toxicita extraktů *Cannabis* v rozdílném stupni zralosti na buňky střevního epitelu**

## **Souhrn**

Nejčastější nádorové onemocnění v České republice je kolorektální karcinom. Z tohoto důvodu je snaha hledat kromě konvenční léčby i nové možnosti mezi, které patří využívání různých rostlin a jejich extraktů. Mezi takové rostliny patří i konopí, které je známé pro své omamné účinky díky obsahu THC (tetrahydrokanabinol) a CBD (kanabidiol) v sušených květech, které jsou pro tento účel využívány. Dalším využití konopí je v potravinářství, kosmetice ale i ve farmacii, a to právě díky obsahu THC a CBD a celé řadě dalších biologicky aktivních látek. Tyto biologicky aktivní látky vykazují antioxidační, protizánětlivou a protinádorovou aktivitu.

Cílem této práce bylo otestovat etanolové extrakty kultivaru *Cannabis* pěstovaného v rozdílných podmínkách hnojení a sklizeného v různých časových obdobích 14 týdnů. Z jednotlivě sklizených květenství byly připravené etanolové extrakty, které byly následně odpařeny a naředěny v DMSO na koncentraci 8 mg/ml. Takto připravené zásobní roztoky byly následně využity na testování na jednotlivých buněčných liniích (Caco-2, HT29 a CCD 841 CoN) a pomocí tetrazol bromidu byla stanovena IC<sub>50</sub> (inhibiční koncentrace).

Z dosažených výsledků je patrné, že existuje variabilita mezi jednotlivými buněčnými liniemi a časem sklizně. U buněčné linie Caco-2 byla hodnota IC<sub>50</sub> od 34,11 µg/ml do hodnot nad 128 µg/ml. U linie HT29 byly hodnoty od 27,23 µg/ml do hodnot nad 128 µg/ml a u CCD 841 CoN od 32,77 µg/ml nad 128 µg/ml. Mezi cykly, a ani mezi extrakty z různě hnojených rostlin, nebyly nalezeny statisticky průkazné rozdíly s výjimkou rozdílu mezi prvním a druhým cyklem u buněčné linie Caco-2. Statisticky významné rozdíly byly ale mezi jednotlivými týdny sklizně. Zejména mezi čtvrtým a pátým týdnem došlo k výraznému zvýšení cytotoxicity u linie HT29. Tato změna v cytotoxicitě koleruje s nárůstem kanabinoidů v rostlinách v tomto období.

V závislosti na stáří rostlin a zvyšujícímu se obsahu biologicky aktivních látek se zvyšuje toxicita jednotlivých testovaných extraktů. Z tohoto důvodu je nejvhodnější sklízet květenství minimálně od 5. týdne, kdy se zvyšuje obsah biologicky aktivních látek. Současně takto získané extrakty jsou vysoce selektivní na nádorovou buněčnou linii HT29 a téměř nemají vliv na normální buňky buněčné linie CCD 841 CoN.

**Klíčová slova:** Caco-2; HT29; CCD 841 CoN; nádorová onemocnění; selektivita; konopí

# ***In vitro* toxicity of *Cannabis* extracts at different stages of maturity on intestinal epithelial cells**

## **Summary**

The most common cancer disease in the Czech Republic is colorectal cancer. For this reason, there is an effort to find new possibilities, in addition to conventional treatment, which include the use of various plants and their extracts. Such plants include *Cannabis*, which is known for its narcotic effects due to the content of THC and CBD in dried flowers, which are used for this purpose. Another use of *Cannabis* is in the food industry, cosmetics, but also in pharmacy, thanks to the content of THC and CBD and a number of other biologically active substances. These biologically active substances have antioxidant, anti-inflammatory and anti-tumor activity.

The aim of this work was to test ethanol extracts of *Cannabis* cultivar grown under different fertilization condition and harvested at different time periods within 14 weeks. Ethanolic extracts were prepared from individually harvested inflorescences, which were subsequently evaporated and diluted in DMSO to a concentration of 8 mg/ml. This way prepared stock solutions were then used for testing on individual cell lines (Caco-2, HT29 and CCD 841 CoN). The IC<sub>50</sub> was determined using tetrazole bromide.

The results show that there is variability between cell lines and harvest time. For the Caco-2 cell line, the IC<sub>50</sub> ranged from 34.11 µg/ml to values over 128 µg/ml. For the HT29 line, values ranged from 27.23 µg/ml to values over 128 µg/ml and for CCD 841 CoN from 34.27 µg/ml over 128 µg/ml. No statistically significant differences were found between cycles or between extracts from differently fertilized plants. The only exception was the difference in the results between the first and the second cycle in Caco-2 cell line. But there were statistically significant differences between harvested weeks. Especially between the fourth and fifth week, there was significant increase in cytotoxicity in the HT29 line. This change in cytotoxicity correlates with the increase of cannabinoids in plants during this period.

Depending on the age of the plants and the increasing content of biologically active substances, the toxicity of the individual tested extracts increases. For this reason, it is best to harvest the inflorescence at least from the fifth week, when the content of biologically active substances increases. At the same time, the extracts thus obtained are highly selective for the tumor cell line HT29 and have almost no effect on the normal cells of the CCD 841 CoN cell line.

**Keywords:** Caco-2; HT29; CCD 841 CoN; cancer diseases; selectivity; *Cannabis*

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>7</b>
<b>2 Cíl práce .....</b>	<b>8</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Gastrointestinální trakt.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2 Nemoci gastrointestinálního traktu.....</b>	<b>11</b>
3.2.1 Crohnova choroba.....	11
3.2.2 Nádorová onemocnění .....	11
<b>3.3 Konopí (<i>Cannabis</i> spp.).....</b>	<b>12</b>
<b>3.4 Kanabinoidy .....</b>	<b>13</b>
3.4.1 THC .....	14
3.4.2 CBD .....	17
<b>3.5 Ostatní biologicky aktivní látky obsažené v konopí.....</b>	<b>19</b>
3.5.1 Terpeny .....	19
3.5.2 Fenolové sloučeniny .....	21
<b>4 Metodika .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Použité materiály.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2 Metodika experimentů.....</b>	<b>26</b>
4.2.1 Příprava vzorků a extraktů konopí.....	26
4.2.2 Kultivace buněčných linií .....	27
4.2.3 Stanovení toxicity .....	27
4.2.4 Statistické vyhodnocení .....	27
<b>5 Výsledky.....</b>	<b>29</b>
<b>6 Diskuze .....</b>	<b>33</b>
<b>7 Závěr .....</b>	<b>35</b>
<b>8 Literatura.....</b>	<b>36</b>
<b>9 Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>47</b>
<b>10 Samostatné přílohy .....</b>	<b>I</b>

# 1 Úvod

Léčebné účinky *Cannabis* spp. známe už dlouho. Tyto léčebné účinky způsobují biologicky aktivní látky v *Cannabis*, přesněji kanabinoidy. *Cannabis* je rozšířenou rostlinou se širokým spektrem využití od doplňků stravy, mastiček, rekreačních drog až po farmacii. Přes široké využití *Cannabis* v léčbě nádorových onemocnění se ví jen minimálně o tom, jaké jsou účinky extraktů konopí z rostlin v různých stádiích zralosti, zejména před botanickou zralostí nebo po ní. Také se málo ví o tom, jaký vliv může hrát výživa vlastní rostliny v závislosti na příjmu živin a způsobu jejich použití. Všechny tyto aspekty mohou ovlivňovat výslednou toxicitu použitých extraktů.

V poslední době se sledují účinky biologicky aktivních látek na buněčných liniích. Je to hlavně z toho důvodu že je to levnější a rychlejší než pokusy na zvířatech, jedná se o lidské buněčné linie, a ještě k tomu o linie různých karcinomů. Tyto vlastnosti buněčných liniích otevírají možnosti testování cytotoxicity jak jednotlivých sloučenin, tak i jejich reálných směsí v extraktech z rostlin. Lze tak i sledovat faktory ovlivňující obsah biologicky aktivních látek v rostlinách a pěstovat rostliny pro dané účely s cílenou aplikací na určitý druh karcinomu.

## 2 Cíl práce

Cílem práce bylo pomocí standardních metod určit hodnotu  $IC_{50}$  u testovaných extraktů *Cannabis* v rozdílném stavu zralosti na buněčných liniích kolorektálního karcinomu (Caco-2 a HT29) a zdravých buňkách (CCD 841 CoN), a následně vybrat nejvhodnější stádia zralosti *Cannabis*, při kterých budou mít extrakty nejvyšší cytotoxicitu.

Hypotézou práce bylo, že rozdílný stupeň zralosti *Cannabis* spp. bude mít významný vliv na *in vitro* toxicitu lidských buněčných linií a se zvyšující se zralostí rostlin bude toxicita významně silnější.



## 3 Literární rešerše

### 3.1 Gastrointestinální trakt

Pro udržení životních funkcí je nezbytné přijímat potravu. Orgány podílející se na příjmu, mechanickém i chemickém zpracování potravy, rozštěpení na jednotlivé živiny (trávení) a jejím následném vstřebání (resorpci) tvoří gastrointestinální trakt (dále jen GIT). Ten můžeme rozdělit na 3 části: 1) horní část je tvořena ústy, jícnem a žaludkem; 2) střední část, skládající se z tenkého střeva, a 3) dolní části, která představuje tlusté střevo (Kittnar, 2020).

V **ústní dutině** dochází k příjmu veškeré potravy. Potrava je mechanicky rozmělněna a během žvýkání dochází k promíchání se slinami. Sliny se skládají z hlenovité látky mucinu, který umožňuje polykání a usnadňuje pohyby při žvýkání a artikulaci. Dále také obsahuje malé množství NaCl,  $\alpha$ -amylázu (ptyalin) zahajující trávení škrobů, imunoglobulin A, lysozym a laktoferrin (starající se o imunitní obranu) (Kittnar, 2020) a  $\text{HCO}_3^-$  jako pufrovací látku na pH okolo 7, které je optimální pro aktivitu amylázy (Silbernagl et al., 2016). Peristaltická vlna vyvolaná polykacím reflexem posouvá sousto svalovou trubicí hltanu a jícnu do žaludku. Vdechnutí potravy zabraňuje horní svěrač jícnu a dolní svěrač jícnu zabraňuje pronikání obsahu žaludku do jícnu a následnému poškození jícnu (Kittnar, 2020).

Přijatá potrava se v **žaludku** hromadí a po malých dávkách je dále předávána do dalších částí GIT. Žaludek se skládá ze dvou hlavních částí, a to z proximálního a distálního žaludku. Proximální část slouží především k uskladnění potravy. V distální části žaludku je potrava upravena a jsou zde žaludeční šťávou natráveny proteiny. Žaludeční šťáva obsahuje pepsinogen, který je aktivován kyselým prostředím roztokem kyseliny chlorovodíkové, na aktivní pepsin podílející se na trávení bílkovin. Kyselina chlorovodíková vytvářející kyselé prostředí, tím působí baktericidně, umožňuje aktivaci pepsinu a přispívá k denaturaci bílkovin. Následně je v žaludeční šťávě obsažen mucin jako ochranný filtr před poškozením žaludeční stěny kyselinou chlorovodíkovou (Silbernagl et al., 2016). Nejen enzymy a kyselina chlorovodíková se stará o zpracování potravy v žaludku, ale také vlastní pohyby žaludku hrají význam. Pohyby žaludku promíchávají jednotlivé složky potravy a dále ji rozmělnují do kašovitého stavu (Kittnar, 2020). Ze žaludku odchází trávenina vrátníkem do tenkého střeva po 3 až 4 hodinách (Madni et al., 2016) v závislosti na trávené matrici.

**Tenké střevo** je asi 2 m dlouhý orgán skládající se ze 3 částí. Z *duodena* ústící ze žaludku, pokračující jako *jejunum* a poslední část je *ileum*, které ústí do tlustého střeva. Hlavní funkcí tenkého střeva je dokončení trávení potravy a resorpce produktů štěpení spolu s vodou, elektrolyty a vitamíny. Štěpení je zde zprostředkováváno pomocí enzymů pankreatické šťávy. Trávení tuků je zprostředkováno díky solím žlučové kyseliny, které jsou obsaženy ve žluči z jater. Velké množství živin je zde vstřebáno a odvedeno portální žílou do jater, a to díky sliznici s velkým obsahem klků, a tím i zvětšenou plochou pro vstřebání živin (Silbernagl et al., 2016). Průchod tenkým střevem je relativně rychlý a může trvat jen několik hodin (Kittnar, 2020). Vstřebané živiny jsou tedy následně odváděny portální žílou do jater.

**Játra** díky své exokrinní a zásobovací funkci patří mezi jedny z nejdůležitějších orgánů v lidském těle (Silbernagl et al., 2016). Spolu se živinami a jinými vstřebanými látkami se dostávají do jater i některé toxické látky, případně mikroorganismy, které prošly střevní bariérou. Díky velkému přívodu krve jsou játra důležitý orgán homeostázy a slouží jako centrum zpracování živin z potravy, metabolické a detoxikační centrum, tím že eliminují látky

ohrožující organismu, a také jako zásobárna některých látek převážně bílkovin, tuků a glykogenu. Následně jsou místem syntézy řady látek a hrají značnou roli ve vylučování a termoregulaci (Kittnar, 2020). Syntetizuje se zde žluč, která je následně uskladňována ve žlučníku, a tím játra vykonávají svoji exokrinní funkci. Žluč se vylévá do tenkého střeva ve dvanáctníku, kde pomáhá s trávením tuků.

Nejen žlučník, ale také **slinivka břišní** pomáhá s trávením potravy v tenkém střevě. Jednou z primárních funkcí slinivky břišní je tvorba pankreatické šťávy, která se také vylévá do tenkého střeva ve dvanáctníku, a neutralizace chymu, což je tekutá nebo kašovitá forma natrávené potravy, na požadované pH a to mezi 7-8. Tato pankreatická šťáva též obsahuje trávicí enzymy, většinou jejich prekurzory, které následně štěpí bílkoviny (trypsinogeny, proelastáza), tuky (pankreatická lipáza) a sacharidy ( $\alpha$ -amyláza) (Silbernagl et al., 2016).

**Tlusté střevo** je asi 1,3 m dlouhá trubice (Kittnar, 2020) a je poslední částí GIT. Skládá se z céka, kolonu (tračník) a rekta (konečník). Z tenkého střeva sem proudí tekutý nebo kašovitý obsah nazývaný jinak chymus. Zde pak dochází k resorpci vody a elektrolytů z chymu. Tlusté střevo je osídleno střevní mikrobiotou, která zpřístupňuje z nestravitelných částí tráveniny živiny a tráví komplexní sacharidy. Během těchto procesů dochází k produkci vitamínů, např. vitamínu K a mastných kyselin, které jsou v tlustém střevu resorbovány. Navíc střevní mikrobiota významnou měrou přispívá jak ke zdraví trávicího traktu, tak i k celkové imunitě organismu (Silbernagl et al., 2016). Souhrnně mezi čtyři základní funkce tlustého střeva patří resorpce vody a elektrolytů, skladování střevního obsahu, produkce vitamínu K a na závěr tvorba a vylučování formované stolice (Kittnar, 2020).

Celková doba průchodu tráveniny může dosahovat až 120 h a je ovlivněna složením přijímané potravy (Silbernagl et al., 2016). Čím je přijímaná potravina komplexnější a hůře zpracovatelná, tím se potřebný čas od příjmu po vstřebání prodlužuje. Naopak u jednoduchých potravin a léčiv se doba příjmu výrazně zkracuje. Při perorálním podání léčiv dochází ke vstřebání převážně sliznicí tenkého střeva a obvyklá doba vstřebání trvá 30 minut (Lincová et Farghali, 2007; Lüllmann et al., 2004; Madni et al., 2016). Někteří autoři jako například Lincová a Farghali (2002) a Lüllmann et al. (2004) uvádí, že je možné ovlivnit místo vstřebání zvýšenou ochranou léčiva před nízkým pH v žaludku. Další z možností je rektální podání léčiv. Zde účinek nastupuje obvykle již mezi 15 až 20 minutami po aplikaci.

Přes všechna možná autoimunitní opatření dochází i tak v lidském organismu k celé řadě onemocnění trávicího traktu.

Tato onemocnění vznikají často kvůli dlouhému průchodu tráveniny přes trávicí trakt nebo špatným složením diety. Doba pasáže tráveniny tlustým střevem je ovlivněna hlavně díky vláknině, která zrychluje průchod zažívacím traktem, čímž ale snižuje její možnou využitelnost. Na druhou stranu, kvůli dlouhé době pasáže může vznikat více volných radikálů a v důsledku toho vznikat řada onemocnění, jako třeba kolorektální karcinom. Špatné složení diety může způsobovat třeba zácpu a potíže s defekací, fisury a hemoroidy, syndrom dráždivého tračníku, zánětlivá onemocnění střev, průjemy a alergie. Jedná se hlavně o nevyvážený přísun ovoce a zeleniny, velké množství červeného masa, velký příjem tuků a energie, anebo mléčné výrobky v případě alergií a intolerancí (Pelikán, 2005; Tan et Seow-Choen, 2007; Young, 2000).

## 3.2 Nemoci gastrointestinálního traktu

Onemocnění trávicího traktu je celá řada, počínaje refluxní chorobou jícnu, přes bakteriální, virové či parazitární infekce, po velice závažná onemocnění jako jsou například žaludeční vředy, Crohnova choroba, ulcerózní kolitida a nejrůznější nádorová onemocnění.

### 3.2.1 Crohnova choroba

Mbachi et al. (2019) a Mescher (2018) popisují Crohnovu chorobu (CCH) jako idiopatický chronický zánětlivý proces, který se může vyskytnout v jakékoliv části trávicí trubice, ale nejčastěji se vyskytuje v tenkém nebo tlustém střevě. Kombinace genetických a imunitních faktorů a vlivu prostředí je dosud ne úplně objasněná příčina vzniku CCH (Mescher, 2018). Záněty prochází celou tloušťkou trávicí stěny a mezi záněty jsou úseky nepoškozené sliznice. Tato choroba je občas spojena s komplikacemi, které působí významnou morbiditu a mortalitu. Pacienti trpící CCH tlustého střeva mohou mít veliké množství příznaků. Průjem je nejčastěji příznakem onemocnění tenkého střeva, ale krvácivé průjmy jsou častější u pacientů trpících CCH. U některých pacientů se také může rozvinout fulminantní nebo toxická kolitida, horečky, tachykardie, hypotenze, metabolické acidózy nebo oligurie a akutní renální selhání (Hedrick et Friel, 2013). V několika experimentálních modelech byl prokázán protizánětlivý účinek konopí při střevních zánětech (Allegretti et al., 2013; Lal et al., 2011; Naftali et al., 2013; Storr et al., 2014), ale není známo, zda to koreluje s menším počtem komplikací u pacientů s Crohnovou chorobou (Mbachi et al., 2019). Naftali et al. (2013) studovali 21 pacientů s Crohnovou chorobou, které náhodně rozdělili do dvou skupin a bylo jim podáváno konopí v podobě cigaret dvakrát denně. Jedna skupina, 11 pacientů, dostávala cigarety s konopím obsahující 11,5 mg tetrahydrokanabinolu (THC) a druhá skupina, 10 pacientů, dostávala cigarety s konopím, ze kterých bylo THC vyextrahováno. Po 8 týdnech pokusu u 5 pacientů ze skupiny, které bylo podáváno THC, a u jednoho pacienta z placebo skupiny, došlo ke klinické remisi neboli návratu k původnímu fungování před vypuknutím nemoci. Tento výsledek ale nedosáhl statistické významnosti, nejspíše kvůli malému počtu pacientů.

### 3.2.2 Nádorová onemocnění

Nádor je velké množství tkáně, které vzniklo díky nekoordinované a autonomní proliferaci buněk, kdy došlo k selhání mechanismu apoptózy. Apoptóza je programovaná buněčná smrt nevyvolávací zánět. Podle biologického chování dělíme nádory na benigní neboli nezhoubné nádory, a maligní, zhoubné nádory. Benigní nádory rostou pomaleji, mají vysoký stupeň diferenciací a chybí jim metastáze. Maligní nádory mají rychlý růst, nejsou prakticky diferenciovány a velmi často metastázuje (Zámečník, 2019). Vznik metastáz je schopnost rozšířit se pomocí migrace a napadnout další, jak sousední, tak úplně jiné části lidského těla a zakládat zde vzdálená ložiska již zmiňované metastáze (Geiger et Peeper, 2009). Nádory se mohou projevit komplikací v daném místě svého bujení, tím že způsobují bolest, tlak, krvácení nebo vyřadí funkci daného orgánu. Nádory se mohou objevit od mozku, přes prsa, až po tlusté střevo. Podle místa vzniku se jednotlivé nádory označují a v tlustém střevě se setkáváme s označením kolorektální karcinom. Jedná se o maligní epiteliální nádor s definujícím znakem, kterým je invaze do submukózy ne-li hlouběji, na rozdíl od karcinomů v jiných lokalizacích. Patří mezi tři nejčastější maligní nádory na světě spolu s karcinomem plic a prsu, a jedná se o druhou nejčastější příčinu smrti ze všech maligních karcinomů. U můžu se vyskytuje jako

třetí nejčastější hned po karcinomu prostaty a plic a u žen se vyskytuje dokonce jako druhý nejčastější, více častý je už jenom karcinom prsu. Výskyt kolorektálního karcinomu se hodně liší i geograficky, například ve Spojených státech amerických se jedná o třetí nejčastější případ karcinomu (Stintzing, 2014), za to v Evropě se jedná u druhý nejčastější případ. Když budeme porovnávat jednotlivé státy a věkovou standardizovanou incidenci tak na prvním místě je Jižní Korea a Česká republika je na šestém místě. Z hlediska pohlaví je na prvním místě u mužské populace Slovensko a na prvním místě v ženské populaci je Norsko. Česká republika je u mužské populace na čtvrtém místě a u ženské na šestnáctém místě. Průměrný věkový výskyt je okolo 60 let (Zámečník, 2019).

Vznik nádorových onemocnění je kombinace genetických a vnitřních a vnějších faktorů. Mezi nejzávažnější vnitřní a vnější faktory vzniku nádorových onemocnění patří strava, kouření, konzumace alkoholu, těžké kovy, nadměrné sluneční světlo, záření, nedostatek fyzické aktivity (Irigaray et al., 2007) a podle Sankpal et al. (2012) se životní prostředí podílí na vzniku skoro 80 % nádorových onemocnění. U prevence vzniku kolorektálního karcinomu se dává důraz na potravu. Vysoce energeticky bohatá strava s vysokým obsahem tuků, rafinovaných cukrů a živočišných bílkovin také často označovaná jako „západní dieta“ se považuje za predispozici vzniku kolorektálního karcinomu. Na druhou stranu strava bohatá na ovoce, zeleninu a vlákninu se považuje jako protektivní. Vláknina totiž pomáhá ke zrychlení střevní motility a tím i snížení kontaktu sliznice a tráveniny. Ke zrychlení střevní motility pomáhá i zvýšení fyzické aktivity, proto je dalším prekurzorem „sedavý“ typ života, který je často spojován s již zmiňovanou „západní dietou“. Dlouho trvající idiopatické střevní záněty, jako je CCH a ulcerózní kolitida, také značně zvyšují vznik kolorektálního karcinomu (Zámečník, 2019).

Pro testování účinků biologicky aktivních látek na nádorové buňky se používá nejrůznější buněčné linie. Nejčastěji používanými jsou linie A549, Caco-2, CCD 841 CoN, HT29 a MCF-7. Dle databáze ExPasy provozované švýcarským institutem pro bioinformatiku ([www.expasy.org/cellosaurus](http://www.expasy.org/cellosaurus)) je linie A549 karcinom plic, Caco-2 a HT29 kolorektální karcinom, CCD 841 CoN zdravá buněčná linie střev a MCF-7 je invazivní karcinom prsu.

### 3.3 Konopí (*Cannabis spp.*)

Konopí seté (*Cannabis sativa* L., 1753) je velice variabilní, komplexní, polymorfní druh (Russo et al., 2008). Jako místo původu konopí je považována Eurasie (Xu et al., 2021). Jedná se o jednoletou rostlinu, rozmnožující se pomocí semen. Ideálním místem pro růst konopí jsou otevřená slunná místa s dobře propustnou a lehkou půdou (Grotenhermen et Russo, 2013). V současnosti je konopí celosvětově rozšířené a roste v různých nadmořských výškách, stanovištích, půdních a klimatických podmínkách (Clarke et Merlin, 2017). Spolu s chmelem otáčivým (*Humulus lupulus* L., 1753) se řadí do čeledi konopovité (*Cannabaceae*) (Schultes et al., 1970). Jedná se o dvoudomou rostlinu z čehož vyplývá, že je schopná tvořit jak samičí, tak samčí rostliny. Díky své genetické plasticitě je těžké *Cannabis* zařadit a pořád se diskutuje o správné botanické klasifikaci (Malík et al., 2021). Small a Cronquist (1976) ke klasifikaci *Cannabis* použili dvoufázový přístup, kde kombinují morfologické a chemické vlastnosti, čímž získali 4 skupiny. Ale Zhang et al. (2018) doporučují, aby konopí bylo být považováno za monotyp jako *Cannabis sativa* L. a rozděleno do tří poddruhů: *Cannabis sativa* (konopí seté), *Cannabis indica* (konopí indické) a *Cannabis ruderalis* (konopí plevelné). Z hlediska nařízení

vlády č. 463/2013 Sb. se konopí seté dělí do dvou odlišných skupin, a to na technické konopí a „obyčejné“ konopí (marihuana). Abychom mohli legálně klasifikovat technické konopí, tak rostlina nesmí obsahovat více než 0,2 g/100 g v sušině v Evropě a 0,3 g/100 g v sušině v Severní Americe opojné sloučeniny  $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinol ( $\Delta^9$ -THC) (Small, 2015; Fike, 2016; Leonard et al., 2020). Takto nízká hladina THC v technickém konopí nevyvolá intoxikaci (Xu et al., 2021). U konopí indického se setkáváme s hladinou větší než 0,3 g/100 g THC v sušině, a má tedy vysoce opioidní účinky a pěstuje se pouze za tímto účelem. Pod názvem marihuana můžeme též znát samičí květenství a následnou pryskyřici vznikající na těchto vrcholech pod názvem hašiš.

Konopí seté má mnoho využití, a to jak technické konopí, tak i konopí „obyčejné“ (marihuana). Technické konopí bylo po většinu naší historie pěstováno pro přízi a semena, jako dvouúčelová plodina, ale v omezené míře také jako zdroj oleje (Small, 2015). V posledních několika desítkách let vzrostl zájem o technické konopí jako víceúčelovou plodinu. Poprvé od roku 2015 překročilo technické konopí hranici 20 000 ha jako dvouúčelová plodina, a to s využitím na semeno a pro přízi (Tang et al., 2016). Se vzrůstajícím požadavkem na technické konopí a jeho pěstování se rozrostl i zájem o jeho další šlechtění s důrazem na vysoké výnosy a nízkou koncentraci THC. V popředí šlechtitelského zájmu jsou i další znaky, včetně větších semen se snadnějším loupáním, obsahem specifických aminokyselin a mastných kyselin a dalších biologicky aktivních sloučenin s významem pro potravinářství, farmacii a lékařství (Fike, 2016; Leonard et al., 2020; Ngobeni et al., 2016; Salentijn et al., 2015; Schluttenhofer et Yuan, 2017).

Možností využití konopí pro lékařské účely je mnoho a využívá se k léčbě celé řady nemocí (Wingerchuk, 2004). Toto využití je díky specifickému obsahu THC, kanabidiol-CBD a kanabichrom-CBC, což jsou konopné metabolity. Bylo zjištěno, že kanabinoidy zmírňují neurologické stavy včetně symptomů souvisejících s roztroušenou sklerózou, jako jsou spasticita, bolest, třes a dysfunkce močového měchýře (Baker et al., 2003). U dalších neurologických stavů, jako jsou chronicky nezvladatelná bolest, dystonie a Tourettův syndrom, bylo také zjištěno zmírnění po užívání konopí (Strouse, 2016; Williamson et Evans, 2012). Dále se konopí používá k léčbě anorexie u pacientů trpících AIDS anebo u nádorových onemocnění (Baker et al., 2003; Williamson et Evans, 2012). V gastroenterologii se konopí využívá k léčení anorexie, zvracení, bolestí břicha, gastroenteritidy, průjmů, střevních zánětů a diabetické gastroparézy (Izzo et Camilleri, 2008).

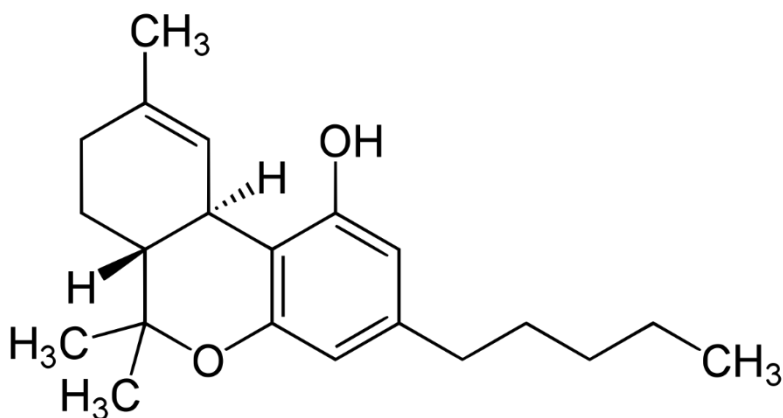
### **3.4 Kanabinoidy**

V současnosti je známo více jak 100 různých látek, které se souhrnně označují jako kanabinoidy a byly získány z konopí (ElSohly et al., 2017). Hladina kanabinoidů se v průběhu růstu mění, od fáze semenáčku po období květu se hladina kanabinoidů obecně zvyšuje. Obsah kanabinoidů je rozdílný i v různých částech rostliny a zvyšuje se od větších stonků, po menší a mladší listy, květy až po perigonální listy, které pokrývají samičí květy a následně i plody. K relativní změně obsahu kanabinoidů může dojít i díky různým podmínkám okolí. Podmínky, které byly zkoumány, jsou dostupnost živin, teplota, intenzita světla, kvalita světla, intenzita ultrafialového světla a fotoperiodicita (Small, 2015). Kanabinoidy můžeme dělit na neutrální kanabinoidy a kanabinoidní kyseliny (Malík et al., 2021). Původ kanabinoidů je z kanabigerolové kyseliny a liší se především tím, jak je tento prekurzor zacyklen. Díky svým

psychoaktivním účinkům je fytoKANABINOID THC nejznámějším a je primární intoxikační sloučeninou v konopí (Tomko et al., 2020) a zdá se být i neaktivnější (Naftali et al., 2011). Stejně tak CBD je jedním z neaktivnějších KANABINOIDŮ (Naftali et al., 2011), který má také opojné účinky, podobně jako THC (Tomko et al., 2020). Výzkum funkčních rolí endokanabinoidního systému v imunitní modulaci ukazuje, že se KANABINOIDY účastní téměř všech hlavních imunitních událostí (Naftali et al., 2011). KANABINOIDY posouvají rovnováhu prozánětlivých cytokinů a protizánětlivých cytokinů směrem k profilům pomocných T buněk typu 2 (Th2 fenotyp) a potlačují buněčně zprostředkovanou imunitu, zatímco humorální imunita může být posílena (Pacifci et al., 2003). Mají schopnost narušovat progresi nádoru na různých úrovních, a to hlavně díky indukci smrti rakovinných buněk apoptózou nebo zastavením buněčného cyklu a zároveň inhibicí proliferace těchto buněk. Minimálně jedna z těchto vlastností byla prokázána u prakticky všech testovaných typů nádorových buněk (Cerretani et al., 2020). Tomko et al. (2020) uvádí, že mnohem více experimentálních výstupů (získaných z *in vitro*, *in vivo*, a dokonce i z několika klinických studií) podporuje to, že THC a CBD mají lepší protinádorovou aktivitu než ostatní KANABINOIDY.

### 3.4.1 THC

THC (Obrázek 1) je hlavní psychoaktivní látkou přítomnou v kultivarech *Cannabis* spp. Biosyntéza THC začíná u KANABIGEROLOVÉ Kyseliny (CBGA). CBGA je převedena enzymem THCA syntázou na tetrahydroKANABINOLOVOU Kyselinu (THCA) za vzniku heterocyklického kruhu (Taura et al., 1995). THCA se také někdy nazývá jako primární fytoKANABINOID, protože jiné fytoKANABINOIDY jsou generovány z tohoto a dalších 2 prekurzorů převážně neenzymatickou degrační cestou. Dekarboxylací za zvýšené teploty vzniká z THCA THC (Malík et al., 2021).



Obrázek 1: Strukturní vzorec Δ9-THC

Jeho účinky jsou zprostředkované pomocí receptoru CB1 (Bridgeman et Abazia, 2017). THC se aktivuje navázáním na receptor CB1 v centrálním nervovém systému. Tímto navázáním na receptor CB1 se aktivuje G-protein, a to vyvolá buď aktivaci nebo inhibici řady signálních transdukčních drah. G-protein přímo inhibuje vápníkové a sodíkové kanály typu N a P/Q a také nepřímo inhibuje kanály typu A adenylát cyklázy. Dále se aktivují draslíkové kanály MAP (mitogenem aktivované proteinkinázy) kinázová signální dráha. Tímto THC vyvolá intoxikační, euforické pocity a léčebné účinky spojené s užitím konopí (Bisogno et al.,

2001). THC je nejběžněji podáváno perorální cestou, lze jej podávat i intravenózně, intramuskulárně a inhalačně. Vzhledem k vysokým lipofilním vlastnostem je THC vysoce vázáno na plazmatické proteiny a je tak snadno distribuováno do vaskulárních tkání jako jsou játra, srdce a plíce a v tukové tkáni dochází k jeho akumulaci. Kvůli psychoaktivním účinkům THC na centrální nervovou soustavu, existují obavy u předepisování THC pro léčebné využití u pacientů s nádorovým onemocněním. Kromě psychoaktivních účinků na centrální nervovou soustavu existují i další nežádoucí účinky jako je tolerance, závislost a problémy související se zneužíváním (Afrin et al., 2020; Tomko et al., 2020). I přes omezení a obavy spojené s léčbou THC existuje spousta studií ohledně využití THC jako potencionální protinádorové terapie.

To, co dělá THC potencionálním kandidátem v protinádorové terapii je jeho schopnost inhibovat buněčný růst a proliferaci, indukovat apoptózu, zastavit buněčný cyklus, redukovat růst nádoru, inhibovat tvorbu metastáz a mnoho další. V současné době byla již provedena spousta *in vitro* i *in vivo* pokusů a také pár klinických studiích. Účinky THC byly testovány na různých typech nádorových buněk od buněčných linie mozku (gliomy), plic, prsu, střev, slinivky břišní, prostaty až po leukemii (Tomko et al., 2020).

Allister et al. (2005) testovali *in vitro* THC na 5 buněčných liniích gliomů (SF126, U87-MG, U251, U373-MG a SF188). Těchto 5 buněčných liniích bylo po 7 dnech ošetřováním THC testováno na citlivost antiproliferačního efektu THC. Výsledný antiproliferační efekt byl pro SF126 =  $7 \pm 7$  %, U87-MG =  $19 \pm 11$  %, U251 =  $14 \pm 13$  %, U373-MG =  $10 \pm 1$  % a SF188 =  $16 \pm 6$  %. U buněčné linie SF126 byla citlivost na antiproliferační efekt nejvyšší. Následně byly buňky SF126 ošetřeny koncentrací od 0,1 do 2  $\mu\text{M}$  THC na zjištění antiproliferačního efektu a hodnoty  $\text{IC}_{50}$ . Pro THC byla hodnota  $\text{IC}_{50}$  0,60  $\mu\text{M}$ . O 5 let později Marcu et al. (2010) změřili na 3 stejných buněčných liniích (SF126, U251 a U87-MG) jiné hodnoty  $\text{IC}_{50}$  po ošetření THC.  $\text{IC}_{50}$  bylo pro SF126 2,5  $\mu\text{mol/l}$ , pro U251 3,3  $\mu\text{mol/l}$  a pro U87-MG 3,3  $\mu\text{mol/l}$ .

A549, H469 a H1792 jsou buněčné linie plic, na kterých byl též pozorován pozitivní vliv THC. Signifikantní inhibici buněk v závislosti na dávce (10-100  $\mu\text{M}$  THC) zjistili Milian et al. (2020) u těchto tří buněčných liniích. U A549 vyšlo  $\text{IC}_{50}$  27,25  $\mu\text{M}$ , H469 vyšlo  $\text{IC}_{50}$  30,64  $\mu\text{M}$  a H1792 dosáhlo  $\text{IC}_{50}$  hodnoty 33,39  $\mu\text{M}$ . Tyto hodnoty  $\text{IC}_{50}$  byly naměřeny při koncentraci THC 30  $\mu\text{M}$ , a právě tato koncentrace byla využita i v dalším jejich experimentu. Již zmiňovaná linie A549 a další linie MRC-5 byly testovány na cytotoxickou aktivitu po ošetření nanočásticemi, které obsahovaly THC. Byly porovnávány hodnoty  $\text{IC}_{50}$  pro samostatné THC a pro nanočástice s THC. U A549  $\text{IC}_{50}$  bylo  $60,8 \pm 23,6$   $\mu\text{M}$  pro samostatné THC a pro nanočástice s THC bylo  $\text{IC}_{50}$   $42,3 \pm 29,3$   $\mu\text{M}$ , což značí 1,4 větší efekt pro nanočástice s THC než samotné THC. U linie MRC-5 byl efekt 1,6 větší pro nanočástice s THC. Samotné THC mělo  $\text{IC}_{50} = 99,2 \pm 41,4$   $\mu\text{M}$  a nanočástice s THC měly  $\text{IC}_{50} = 76,2 \pm 20,6$   $\mu\text{M}$  (Martín-Banderas et al., 2015).

Karcinom prsu lze též ovlivnit pozitivně pomocí THC. Životaschopnost buněčné linie MCF-7 karcinomu prsu byla ovlivněna přítomností THC.  $\text{IC}_{50}$  dosáhlo hodnot 34,5  $\mu\text{M}$ , a dokonce při přítomnosti estradiolu při fyziologické koncentraci (100  $\mu\text{M}$ ) bylo  $\text{IC}_{50}$  10,4  $\mu\text{M}$  (Takeda et al., 2013). Buněčná linie MDA-MB-231, byla ošetřena THC o koncentraci 25  $\mu\text{M}$ , čímž byla dokázána indukce 2-hydroxylázy mastných kyselin, a tím suprese receptorů aktivovaných peroxisomovým proliferátorem (Hirao-Suzuki et al., 2019).

V buňkách kolorektálního karcinomu (Caco-2) mělo THC  $IC_{50} = 16,5 \pm 0,2 \mu M$  (Ligresti et al., 2006).  $IC_{50}$  bylo též měřeno na buněčné linii HT29, kde dosáhlo hodnot  $30,0 \pm 1,01 \mu M$  (Cerretani et al., 2020). Vyšší hodnoty  $IC_{50}$  byly pozorovány na buněčné linii CCD 841 CoN, kde se  $IC_{50}$  rovnalo  $64,47 \pm 0,88 \mu M$  (Plyduang et al., 2014). Při koncentraci  $10 \mu M$  THC byla u buněk karcinomu střev (SW480, HCT-15, HT29, Caco-2, HCT116, LS174T a SW620) indukovaná apoptóza pomocí aktivace CB1 receptorů a následné inhibice PI3K-AKT a RAS-MAPK/ERK dráhy (Greenhough et al., 2007). Biodegradabilní mikrokuličky THC byly vyvinuty jako alternativní způsob podání kanabinoidů, než je obvyklá orální cesta. Mikrosféry THC byly schopny inhibovat buněčnou proliferaci mnoha druhů rakoviny, včetně střevních rakovinných buněk Caco-2, po dobu 9 dnů (de La Ossa et al., 2013).

Další buněčné linie, kde THC ovlivňuje životaschopnost buněk jsou linie DU-145 a LNCaP (karcinom prostaty). U linie DU-145 bylo  $IC_{50} > 25 \mu M$  po 72 hodinách, ale u buněk, které se nechaly vyhladovět 16 hodin a které byly následně po 24 hodin ošetřovány zvyšující se koncentrací THC, bylo  $IC_{50} = 11,7 \pm 3 \mu M$ . U druhé zmiňované linie karcinomu prostaty LNCaP byla první hodnota  $IC_{50} = 16,9 \pm 3 \mu M$  a druhá po vyhladovění  $IC_{50} = 5,5 \pm 3 \mu M$  (de Petrocellis et al., 2013).

Poslední zmiňovaná ale nespecifikovaná buněčná linie je linie CEM, což je buněčná linie akutní lymfocytární leukemie. U této linie mělo THC hodnotu  $IC_{50} = 13 \pm 0,49 \mu M$  (Scott et al., 2017). Nejen *in vitro* pokusy s THC byly prováděny na nádorových buňkách, ale také *in vivo* experimenty.

*In vivo* experiment na buněčné linii gliomu (U87-MG) prokázal po ošetření  $15 \text{ mg/kg}$  (hmotnosti) THC redukci růstu nádoru, posílení autofagie, zvýšení intenzity imunobarvení a vylepšení apoptózy (Hernández-Tiedra et al., 2016).

LL2 je karcinom plic, na němž byla testována antikarcinogenní aktivita THC při koncentraci  $5 \text{ mg/kg}$  hmotnosti na myším modelu C57BL/6. Na konci experimentu po 41 dnech bylo změřeno 1,5násobné zmenšení nádoru. Dokonce změny v tělesné hmotnosti mezi kontrolní skupinou a skupinou léčených myší, naznačovaly ideální bezpečnostní rozpětí *in vivo* přípravků (Martín-Banderas et al., 2015).

Na myším modelu karcinomu prsu buněčné linie MDA-MB-231 byla pozorovaná redukce růstu nádoru po podání THC v dávce  $45 \text{ mg/kg}$  hmotnosti myši (Blasco-Benito et al., 2018).

K redukci objemu nádoru došlo u imunodeficientních myších, kterým byly naočkovány buňky karcinomu slinivky břišní MiaPaCa2. K redukci nádoru došlo po podání  $15 \text{ mg/kg/d}$  THC. Myši byly takto ošetřovány po 15 dnů a poté došlo k porovnání velikosti nádoru s kontrolou (Carracedo et al., 2006).

Klinická studie prokázala potenciál THC při léčbě recidivního multiformního glioblastomu. Pacientům bylo podáváno první den  $20\text{-}40 \mu g$  THC a následně bylo postupně zvýšení dávky během 2-5 dnů na  $80\text{-}180 \mu g$  na den. Střední doba podávání byla 10 dnů. U 2 pacientů bylo prokázáno, že THC snížilo barvení nádorových buněk Ki67 u glioblastomu (Guzmán et al., 2006). Další studie tentokrát testující efekt Dronabinolu, což je obecný název pro molekulu THC ve farmaceutickém kontextu, na pacienty s nádorem mozku neměla žádné nežádoucí vedlejší účinky na centrální nervovou soustavu v porovnání s předchozími studiemi. Tato studie ale byla omezena nízkou dávkou dronabinolu ( $10 \text{ mg}$ ) a nízkým počtem účastníků (Allen, 2019). Dronabinol také inhiboval diferenciační blokádu u dvou pacientů s leukémií.

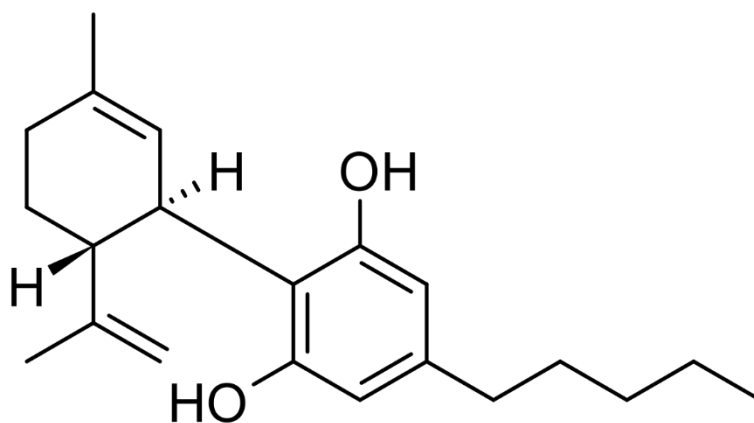


Dronabinol byl podáván napřed 2 kapky 2x denně a následně bylo množství upraveno na 6 kapek 2x denně bez zaznamenaných vedlejších účinků (Kampa-Schittenhelm et al., 2016).

THC není jediným fytokanabinoidem přítomným v *Cannabis* a také není jediný s podpůrnými léčivými účinky u nádorových onemocněních.

### 3.4.2 CBD

CBD (Obrázek 2) je také jedním z hlavních a nejrozsáhleji prozkoumaných fytokanabinoidů přítomných v různých druzích konopí. Biosyntéza kanabidiolu (CBD) je velice podobná syntéze THC. Z CBGA je pomocí intramolekulární oxidoreduktázy (CBDA syntázy) vytvořena kanabidiolová kyselina (CBDA) (Taura et al., 1995), jejíž struktura je výsledkem pericyklické reakce zahrnující ztrátu protonu (Dewick, 2002). CBDA je následně dekarboxylována za zvýšené teploty do své neutrální podoby kanabidiolu (CBD). CBDA se stejně jako THCA někdy označuje jako primární fytokanabinoid (Malík et al., 2021).



Obrázek 2: Strukturální vzorec CBD

Nejběžnější cestou podání v lékařském prostředí je orální cestou, a to v podobě oleje. CBD není omamné, a proto je jako potencionální terapeutické činidlo vhodnější než některé jiné kanabinoidy, které mají psychoaktivní účinky, jako je třeba THC (Tomko et al., 2020). Léčba pomocí CBD vykazuje spoustu příznivých protinádorových účinků při léčbě nádorového onemocnění plic, prsu, kolorektálního karcinomu, prostaty, melanomu, leukémie, děložního čípku, mozku, neuroblastomu a mnohočetného myelomu (Afrin et al., 2020; Kis et al., 2019).

Jedním z mnoha příznivých protinádorových účinků CBD, které zde budou zmíněny, je indukce apoptózy u gliomových buněk, přesněji u neuroblastů, buněčné linie SH SY5Y a IMR-32. Indukce apoptózy byla účinnější při dávce 10  $\mu\text{M}$  v porovnání s 5  $\mu\text{M}$  CBD u obou buněčných linií (Alharris et al., 2019). Linie gliomových kmenových buněk GSC3832 a GSC387 byly ošetřeny CBD o koncentraci 2  $\mu\text{M}$  kvůli zjištění jejich životaschopnosti.  $\text{IC}_{50}$  pro GSC3832 bylo 3,5  $\mu\text{M}$  a pro GSC387 bylo 2,6  $\mu\text{M}$ . V obou případech CBD zvýšilo produktivitu reaktivních forem kyslíku (ROS) (Singer et al., 2015). Při testu proliferace buněk na liniích T98G (multiformní glioblastom) a U87MG (glioblastom astrocytu) zjistili autoři větší efektivitu čistého CBD než ve směsi jako v botanické léčivé látce. Po 72 hodinách byla hodnota  $\text{IC}_{50}$  u T98G pro čisté CBD  $5,2 \pm 1,3 \mu\text{mol/l}$  a pro ve směsi  $13 \pm 2,6 \mu\text{mol/l}$ . Druhá buněčná linie U87MG měla hodnoty  $\text{IC}_{50}$  po 72 hodinách pro čisté CBD  $9,7 \pm 1,3 \mu\text{mol/l}$  a ve směsi

bylo  $11 \pm 0,4 \mu\text{mol/l}$  (Scott et al., 2014). Buněčná linie neuroblastomu SK-N-SH byla CBD při zvyšující se dávce po dobu 48 hodin na jejím buněčném cyklu. Po ošetření  $5 \mu\text{g/ml}$  došlo v G1 fázi procentuálnímu vzrůstu sekvestrovaných buněk z 65,8 % (neošetřené buňky) na 82,4 %. Zároveň s tím byl zjištěn pokles buněk ve fázi G2 a S, a to naznačuje, že buněčný růst byl zastaven ve fázi G1 (Fisher et al., 2016).

Jak u THC, tak i u CBD byla zkoumána inhibice proliferace na buněčných liniích karcinomu plic (A549, H469 a H1792). Při koncentraci  $30 \mu\text{M}$  CBD bylo naměřeno  $\text{IC}_{50}$   $37,31 \mu\text{M}$  u A549, pro H469  $39,78 \mu\text{M}$  a pro H1792  $46,41 \mu\text{M}$  (Milian et al., 2020). Na stejné buněčné linii (A549) a na linii H460 karcinomu plic, byl odhalen vliv CBD na apoptózu. Přesněji na indukci apoptózy pomocí zvýšení hladiny COX-2 (prostaglandin-endoperoxid syntáza 2) a PPAR- $\gamma$  (receptor aktivovaný peroxisomovým proliferátorem). Při koncentraci  $3 \mu\text{mol/l}$  CBD došlo po 8 hodinách k vrcholu zvýšení regulace COX-2 u A549. H460 byl stejný výsledek vysoce významný i po 18 hodinách (Ramer et al., 2013).

K indukci apoptózy a autofagie došlo u buněk MDA-MB-231 (karcinom prsu). Výsledky byly vypočítány jako procenta apoptózy a procenta autofagie. Při koncentraci  $5 \mu\text{mol/l}$  CBD bylo značně více autofagie (60 %) než apoptózy (40 %). Za to při koncentraci  $10 \mu\text{mol/l}$  nebyl tak velký rozdíl mezi autofagií (80 %) a apoptózou (90 %) (Shrivastava et al., 2011).

Při léčbě kolorektálního karcinomu CBD snižovalo životaschopnost buněk a indukovalo apoptózu. Tyto vlastnosti byly prokázány u HCT116 a DLD-1. Snížení životaschopnosti buněk bylo v závislosti na dávce CBD od 0 po  $8 \mu\text{M}$  po 24 hodin. Při koncentraci  $6 \mu\text{M}$  došlo k indukci apoptózy, která byla indikovaná pomocí TUNEL-pozitivních buněk (Jeong et al., 2019). Cytotoxicita a suprese životaschopnosti byla zaznamenána na jiné buněčné linii kolorektálního karcinomu, a to na linii HT29. Hodnota  $\text{IC}_{50}$  se rovnala  $30,0 \pm 3,02 \mu\text{M}$  (Cerretani et al., 2020). U linie Caco-2 byla prokázána inhibiční koncentrace ( $\text{IC}_{50}$ ) CBD, která byla  $3,73 \mu\text{M}$  (Borrelli et al., 2014).

Životaschopnost buněčných liniích karcinomu prostaty DU-145 a LNCaP byla ovlivněna CBD. U linie DU-145 bylo  $\text{IC}_{50} = 25,3 \pm 8 \mu\text{M}$  po 72 hodinách ale u buněk, které se nechaly vyhladovět 16 hodin a následně po 24 hodin ošetřovány zvyšující se koncentrací bylo  $\text{IC}_{50} = 5,4 \pm 1 \mu\text{M}$ . U druhé zmiňované linie karcinomu prostaty LNCaP byla první hodnota  $\text{IC}_{50} = 25 \pm 3 \mu\text{M}$  a druhá po vyhladovění  $\text{IC}_{50} = 5,7 \pm 2 \mu\text{M}$  (de Petrocellis et al., 2013). Další *in vitro* pokus byl na CEM buněčné linii akutní lymfocytární leukemie.  $\text{IC}_{50}$  pro tyto buňky bylo  $7,8 \pm 0,21 \mu\text{M}$ . Při kombinaci THC a CBD v poměru 1:1 bylo  $\text{IC}_{50} = 3,6 \pm 0,19 \mu\text{M}$  (Scott et al., 2017).

S CBD byly také prováděny *in vivo* pokusy. CBD zvýšilo dobu přežití myši po naočkování  $5 \times 10^3$  gliomových kmenových buněk liniích GSC3832 a GSC387. Tento nízký počet buněk může vytvářet spoustu agresivních nádorů, a proto je progrese rychlá a medián přežití u GSC3832 je 27 dní a u GSC387 21 dní. Po 9 dní, kdy byla potvrzena progrese nádoru, bylo myším podáváno  $15 \text{ mg/kg}$  CBD 5 dní v týdnu do konce experimentu. Myši s GSC3832 po podání CBD měly dobu přežití delší o 5 dní a stejného výsledku bylo dokázáno i u myších s GSC387 (Singer et al., 2015). U buněčných liniích T98G a U87MG byl vyzorován vyšší účinek čistého CBD než v botanické léčivé látce. Zatímco u buněčné linie myšího gliomu GL261, která je geneticky identická k C57BL/6, nebyl zjištěn tak razantní rozdíl.  $\text{IC}_{50}$  čistého CBD byla  $10 \pm 3,9 \mu\text{mol/l}$ , zato v botanické léčivé látce byla  $11 \pm 0,4 \mu\text{mol/l}$  (Scott et al., 2014).

V myším modelu na buněčné linii 4T1,2 (karcinom prsu) CBD inhibovalo buněčnou proliferaci, migraci a invazi. Při koncentracích 3 a 6  $\mu\text{M}$  CBD po 48 hodinách bylo dosaženo těchto výsledků. Při vyšší koncentraci byl efekt signifikantnější. Dále u buněčné linie 4T1,2 a MVT-1, a také u karcinomu prsu, byla inhibice metastáze do plic, při dávkách 10 mg/kg. Při této stejné dávce došlo i ke zmenšení objemu nádorů (Elbaz et al., 2015).

Karcinom plic na myším modelu buněčné linie A549 byl ošetřen CBD 5 mg/kg hmotnosti každých 72 hodin po dobu 27 dnů. CBD redukovalo velikost nádoru mnohem více, než kontrola (Ramer et al., 2013).

Při koncentracích 10 nebo 20 mg/kg docházelo k redukci velikosti nádoru na myším modelu s buněčnou linií kolorektálního karcinomu HCT116 Luc<sup>+</sup>. Při dvojnásobné koncentraci docházelo k výraznější redukci velikosti nádorů. Doba pozorování byla 34 dnů a nádory byly měřeny jednou za 3 dny. Následně při dávce 20 mg/kg CBD byla také zjištěna indukce apoptózy pomocí aktivace Noxa (Jeong et al., 2019). Další studie prokázaly, že léčba CBD snižovala proliferaci buněk rakoviny tlustého střeva, indukovala apoptózu a měla také antimetastatické a antiangiogenní účinky. Autoři také prokázali že 5 mg/kg CBD bylo účinnější než 1 mg/kg na buňkách kolorektálního karcinomu CT26 (Honarmand et al., 2018).

### 3.5 Ostatní biologicky aktivní látky obsažené v konopí

#### 3.5.1 Terpeny

V přírodě existuje více než 20 000 terpenů a jsou složkami pryskyřic a silic a můžeme je získat z rostlin, květin, a dokonce i hmyzu. V porovnání s tímto číslem, tak pouze jenom malé množství, přibližně 200 terpenů, se nachází v *Cannabis* (Tomko et al., 2020). Terpeny patří mezi primární složku silic a způsobují aromatické vlastnosti *Cannabis* (Sommano et al., 2020). Díky svým aromatickým vlastnostem, pomáhají v rozlišování mezi kmeny konopí, díky odlišné vůni, chuti a dalším vlastnostem (Baron, 2018). V kultivarech *Cannabis* se nejčastěji objevuje monoterpen myrcen, seskviterpen  $\beta$ -karyofylen a  $\alpha$ -humulen. Dále se běžně vyskytuje  $\alpha$ -pinen, linalool, bisabolil, limonen, ocimen, geraniol, valencen a (E)- $\beta$ -farnesen a spousta sekundárních terpenů jako jsou cineil, sabinen, terpinen a další (Baron, 2018). Některé terpeny jsou těžko identifikovatelné a mezi ně patří zejména kviterpeny. Nejen těžká identifikace, ale také místo odebrání vzorku z vnitřku rostliny, hraje roli v terpenovém profilu. Obvykle ale najdeme terpeny v květu, a to v množství od 2 do 5 %. I přes takto menší zastoupení, jsou dostupné informace o jejich potencionálním příznivém účinku, čítaje protizánětlivé, analgetické, antidepressivní, antivirové, antibakteriální a další, včetně účinků souvisejících s nádorovým onemocněním jako je třeba chemoprevence (Paduch et al., 2007; Tomko et al., 2020).

**Myrcen** ( $\beta$ -myrcen) je častý monoterpen, který je hlavní složkou v mnoha rostlinných druzích, včetně chmele a *Cannabis*, ale lze jej nalézt i v citronové trávě, granátovém jablku, mrkvi, citrusech, bobkovém listu a verbeně. Jedná se o oblíbené potravinářské ochucovadlo do nápojů a potravin. Dále se používá v kosmetice, mýdlech a detergentech. Díky svým aromatickým vlastnostem je využit jako výchozí materiál pro komerčně důležité příchutě a vůně jako je nerol, geraniol, linalool (Behr et Johnen, 2009). Další využití aromatických vlastností je v pivovarství, kde myrcen do značné míry určuje chmelové aroma (Haslbeck et al., 2017). Myrcen ale netvoří jen aroma chmelu, ale značnou částí se podílí na aromatu *Cannabis*, kde vytváří mírně sladkou chuť a poskytuje aromata, která jsou kořenitá, zemitá a pižmová

(Wedman-St. Louis, 2018). Mimo aromatické účinky má myrcen další různé biologické účinky jako je analgetikum, antidiabetikum, antioxidant, protizánětlivé, antibakteriální a protinádorové účinky a také potencionální antiosteoartritickou aktivitu a schopnost zastavit nebo minimálně zpomalit destrukci chrupavek a tím pádem i progresi osteoartrózy (Baron, 2018; Rufino et al., 2015; Surendran et al., 2021). Přes zjištěné přínosné účinky panuje u používání myrcenu velká nejistota, protože v roce 2010 americký Národní toxikologický program (NTP) zveřejnil zprávu o jeho toxikologii a karcinogenezi. Byly nalezeny *in vivo* důkazy pro vznik nádorových onemocnění ledvin u samců potkanů, a samců myši bylo onemocnění lokalizováno v játrech (National Toxicology Program, 2010).

Také ale byl zjištěn *in vitro* cytotoxicitický efekt proti lidskému karcinomu děložního čípku (HeLa buněčná linie), plic (A549) a adenokarcinomu tlustého střeva (HT29) při koncentraci nad 200 µg/ml (da Silva et al., 2007). O mechanismech účinku myrcenu a pozitivních i negativních účincích je překvapivě známo velmi málo, i přes to, jak vysoké hladiny jsou obsaženy v *Cannabis*. Pro určení potencionálního použití myrcenu u lidí a případných omezení je třeba udělat více studií a prací (Tomko et al., 2020).

Zmiňované antioxidační účinky myrcenu byly pozorovány v krvi kapra obecného, kde zmírňoval aktivitu superoxiddismutázy (SOD), snižoval aktivitu glutathionperoxidázy (GPx) a katalázy (CAT) (Hoseini et al., 2019).

**β-karyofylen** je stejně jako myrcen přítomný celosvětově u řady rostlin a můžeme ho najít v černém pepři, hřebíčku, oreganu, bazalce a rozmarýnu. Typický je tím, že má pepřové nebo kořenové aroma (Tomko et al., 2020). Jak již bylo zmíněno, tak jeho zastoupení je i v *Cannabis* a je toho využíváno při detekci *Cannabis* psy (Russo, 2011). Podle Fidyt et al. (2016) je aktivita β-karyofylenu menší v porovnání s vlastnostmi známějších kanabinoidů, ale i tak je mnoho důkazů, že má potenciál jako doplňková léčba při nádorových onemocněních. Dahham et al. (2015) popsali *in vitro* antiproliferační efekt β-karyofylenu z kůry kmene *Aquilaria crassna* na dvou liniích kolorektálního karcinomu, a to na liniích HCT-116 (IC<sub>50</sub> = 28 µg/ml) a HT29 (82 µg/ml), a také na buňky karcinomu slinivky břišní. Na druhou stranu studie Ambrož et al. (2015) odhalila, že β-karyofylen izolovaný z *Myrica rubra* nijak neovlivnil životaschopnost buněk kolorektálního karcinomu buněčné linie Caco-2. Byla též zjištěna *in vitro* cytotoxická aktivita u buněčných liniích karcinomu plic A549 (IC<sub>50</sub> = 28,18 ± 1,96 µg/ml) a vaječníku OAW 42 a PA-1, kde β-karyofylen zastavil buněčný cyklus apoptózy (Arul et al., 2020; Chung et al., 2019). Mimo přímou protinádorovou aktivitu má β-karyofylen schopnost zvyšovat efektivitu běžných protinádorových léčiv, jako jsou paclitaxel nebo doxorubicin. U paclitaxelu (0,025 mg/ml) byla zvýšená aktivita u buněk karcinomu prsu (MCF-7, 28 ± 2 %), tlustého střeva (DLD-1, 17,3 ± 0,2 %) a také u buněčné linie myších fibroblastů (L-929, 18,4 ± 0,2 %) (Legault et Pichette, 2007). Tento efekt, zvýšení účinnosti léčiv, je s největší pravděpodobností díky schopnosti β-karyofylenu zabudovat se do buněčné membrány nádorové buňky, čímž zlepší její propustnost pro léčiva (Fidyt et al., 2016). Karyofylen má i jiné zajímavé účinky, které se netýkají nádorových onemocnění. Byl zjištěn *in vivo* pozitivní vliv u potkanů, kdy zmírňoval chronickou kardiotoxicitu, která byla vyvolána aktivací myokardiálního CB2 receptoru (Meeran et al., 2019), dále antioxidační efekt, působí jako silné lokální anestetikum a také má vliv na žaludeční cytoprotektory (Baron, 2018).

Dalším terpenem obsaženým skoro ve všech kultivarech *Cannabis* je **α-humulén**. Jedná se o izomer β-karyofylenu. V přírodě je humulén velmi častý, má velice výrazné aroma

a zapříčiňuje chuť řady bylin. Poprvé byl izolován ze silice Chmele otáčivého (*Humulus lupulus*), který se řadí do stejné čeledi jako *Cannabis*. Jeho přítomnost ve chmelu a následně též v pivu, utváří spolu s myrcenem a dalšími látkami typické hořké chmelové aroma (Baron, 2018; Tomko et al., 2020).

Nejen v pivu ve spolupráci s dalším terpenem má pozitivní efekt, ale překvapivě kombinace humulenu a karyofylenu výrazně zvýšila *in vitro* efektivitu léčiv Oxaliptalinu a 5-fluorouracilu u kolorektálního karcinomu buněčné linie Caco-2 (Ambrož et al., 2019). Další překvapující *in vitro* vliv spolupůsobení humulenu s karyofylenem byl u inhibice buněčného růstu. Samotný humulen (32 µg/ml) inhiboval buňky přibližně z 50 % a po přidání 10 µg/ml β-karyofylenu byl buněčný růst inhibován ze 75 % (Legault et Pichette, 2007). Humulen má pozitivní účinky i samostatně. Už v roce 2003 studie (Legault et al., 2003) zjistila že silice z jedle balzámové, ve kterém byl humulen jedinou aktivní látkou, vykazovala *in vitro* cytotoxickou aktivitu proti buněčným liniím včetně MCF-7 (73 ± 2 µg/ml), PC-3 (73 ± 2 µg/ml), A549 (68 ± 2 µg/ml), DLD-1 (71 ± 2 µg/ml), M4BEU (55 ± 2 µg/ml) a CT-26 (53 ± 1 µg/ml) úměrně v závislosti na čase a množství. Již zmiňovaná inhibice buněčného růstu humulemem i se zvýšenou apoptózou byla prokázána v *in vitro* i v *in vivo* modelu xenoinplantátu hepatocelulárního karcinomu (Chen et al., 2019).

### 3.5.2 Fenolové sloučeniny

Flavonoidy patří mezi nejvíce rozsáhlou skupinu rostlinných fenolových sloučenin obsahující více než 8 000 metabolitů, přičemž se stále objevují nové a nové sloučeniny v různých rostlinných druzích. V samotné rostlině jsou flavonoidy využívány k celé řadě procesů od inhibice buněčného cyklu, fyziologické regulaci, a ochraně rostliny před UV zářením a škůdci (Lowe et al., 2021).

Hlavním významem flavonoidů pro člověka je jejich schopnost pozitivního účinku na lidské zdraví, kdy jsou hlášeny četné antioxidační, antidiabetické, antitrombogenní, protizánětlivé a také protinádorové účinky, kterým je v poslední době věnována hojná pozornost (Gontijo et al., 2016; Lowe et al., 2021; Procházková et al., 2011; Serafini et al., 2010). Flavonoidy obsahují 2 benzoové kruhy, které jsou spojeny tříuhlíkovým řetězcem. Flavonoidy dělíme dle stupně oxidace C<sub>3</sub> řetězce na 6 skupin – flavonoly, flavanoly, flavanony, flavony, anthokyaniny a isoflavony. V rostlinách a zejména v ovoci a zelenině jsou zodpovědné za typické zbarvení a chuť, kdy např. u grapefruitu je jeho hořkost způsobena přítomností hesperidinu (Velíšek et Hajšlová, 2009; Wen et al., 2020).

Mezi jedny z nejznámějších flavonoidů patří kemferol, kvercetin, naringerin, epikatechin a další. Ze všech známých sloučenin v *Cannabis*, zaujímají flavonoidy přibližně 10 %, což odpovídá 20 různým typům, které jsou čítány hlavně z podtříd flavonů a flavonolů. Již zmiňovaný kemferol a kvercetin jsou součástí 20 různých typů fenolových sloučenin v *Cannabis* a také cannflavin A a cannflavin B, které se zde vyskytují jedinečně (Flores-Sanchez et Verpoorte, 2008; Jin et al., 2020). Efektivita těchto látek je ale sporná v případě inhalačního podání, protože pouze nepolární nízkomolekulární fenolové látky jsou těkavé (Kaczorová et al., 2020). Rozložení flavonoidů v rostlině *Cannabis* je rozdílné. V semenech a v kořenech se skoro nevyskytují, ale v listech a květech mohou představovat až 2,5 % v sušině. Zatímco účinky flavonoidů z mnoha odlišných rostlin byly studovány, tak v porovnání s potenciálními účinky s ohledem na jejich interakce s dalšími sloučeninami v *Cannabis*

a terapeutickými účinky v rozdílných aspektech nádorových onemocněních je o nich známo málo (Tomko et al., 202).

**Flavonoly** jsou důležitými žlutými barvivy, společně s flavony. Významnější flavonoly vyskytující se v potravinách mají v poloze C-3, C-5, C-7 a C'-4 hydroxyskupinu a vzájemně rozdíly mají v poloze C'-3 a C'-5. Některé flavonoly, jako například myricetin, kvercetin a kemferol se vyskytují hlavně jako glykosidy a jako kopigmenty k anthokyanidům (Velíšek et Hajšlová, 2009).

**Kemferol** je běžně vyskytující se flavonol ve stravě jako jsou jablka, jahody, fazole, čaj a brokolice (Kashyap et al., 2017) tak i v mnoha léčivých rostlinách jako je *Aloe vera* L., *Ginko biloba* L., *Rosmarinus officinalis* L a mnoho dalších (Devi et al., 2015) a samozřejmě také v *Cannabis*. Kemferol přilákal mnoho výzkumů díky svým potencionálním léčebným vlastnostem, hlavně jako potencionální protinádorové činidlo (Tomko et al., 2020). Mezi prokázané léčebné vlastnosti kemferolu a jeho glykosylového derivátu patří kardioprotektivní, protizánětlivé, antioxidační, neuroprotektivní, antimikrobiální, protinádorové a antikarcinogenní účinky (M. Calderon-Montano et al., 2011). Jako protinádorové činidlo se projevuje díky jeho schopnosti inhibovat buňky buď zastavením buněčného cyklu anebo vyvoláním apoptózy a snížením migrace i invaze karcinogenních buněk. Tyto jeho vlastnosti byly prokázány na různých typech karcinogenních tkáních jako jsou karcinom prsu, plic, žaludku, kolorektální karcinom, leukémie, jater a vaječníků (Tomko et al., 2020).

V *in vitro* experimentu na buněčné linii MDA-MB-231 (karcinom prsu), byl prokázán antiproliferační efekt při hodnotě  $IC_{50}=43 \mu\text{mol/l}$  po 3 dnech po ošetření kemferolem. Na stejné buněčné linii byla též prokázána inhibice buněčného cyklu ve fázi  $G_2/M$ . Bylo to dokázáno tím, že po ošetření kemferolem ( $50 \mu\text{mol/l}$ ) v  $G_1$  fázi poklesl počet živých buněk z 85,48 % na 51,35 % a v  $G_2$  fázi byl rapidní nárůst z 9,27 % na 37,5 % živých buněk (L. Zhu et Xue, 2019). Kemferol ( $120 \mu\text{M}$ ) vykazoval stejnou aktivitu i na karcinom žaludku na buněčné linie MKN28 a SGC7901. Též byla dokázána inhibice proliferace buněk, a to s hodnotami  $IC_{50}=55,52 \mu\text{mol/l}$  (MKN28) a  $IC_{50}=63,42 \mu\text{mol/l}$  (SGC7901) a také inhiboval buněčný cyklus ve fázi  $G_2/M$  u obou buněčných liniích. Po 48 hodinách při koncentraci  $60 \mu\text{M}$  byl počet živých buněk 21,47 % (MKN28) a 21,21 % (SGC7901) a při koncentraci  $120 \mu\text{M}$  byl 44,40 % (MKN28) a 38,85 % (SGC7901) (Song et al., 2015). Významného snížení migrace a invaze buněk karcinomu jater linie 786-O bylo dokázáno po ošetření kemferolem při koncentracích od 0 do  $100 \mu\text{M}$  a bylo dosaženo snížení o 60 % u invaze a o 55 % u migrace (Hung et al., 2017). Při nižší koncentraci kemferolu ( $25 \mu\text{M}$ ) bylo potvrzeno stejného výsledku, a to inhibice migrace a invaze, u buněk karcinomu plic A549 (Jo et al., 2015).

Buněčné linie SGC7901 (karcinom žaludku) a 786-O (karcinom jater) byly testovány také *in vivo* na myších modelech. Myším se SGC7901 bylo podáno 20 mg/kg/den kemferolu po 3 týdny a poté byl nádor změřen. Po 3 týdnech byla značná suprese nádoru oproti kontrole a nedošlo ani k výrazným změnám v tělesné stavbě, hmotnosti jater a sleziny u myši (Song et al., 2015). Myším s karcinomem jater (786-O) byl podán kemferol ve 2 různých dávkách, jedné skupině 2 a druhé 10 mg/kg/den a třetí byla placebo skupina. Po 150 dnech byly nádory vyjmuty a porovnány. U placebo skupiny vzniklo pod 40 metastazujících uzlíků (nádorů), u skupiny ošetřené 2 mg/kg/den kemferolu okolo 20 nádorů a u poslední skupiny podávané 10 mg/kg/den kemferolu pod 10 nádorů (Hung et al., 2017).

Kombinace kemferolu s různými látkami též vykazuje pozitivní účinky. Například kombinace kemferolu s 5-fluoroacilem (5-FU), což je cytotoxický chemoterapeutický lék, měla pozitivní účinek na buňky kolorektálního karcinomu (HCT-8, HCT-16 a LS174). U buněčných liniích HCT byla pozorována inhibice buněk v závislosti na dávce. Hodnota  $IC_{50}$  byla u buněčné linie HCT-8 pro kemferol 350  $\mu\text{M}$  a pro 5-FU byla 177,78  $\mu\text{M}$ . U buněčné linie HCT-16 byla hodnota  $IC_{50}$  pro kemferol 184,33  $\mu\text{M}$  a 5-FU 77,63  $\mu\text{M}$ . Tyto data byla následně využita ke generování prvních poměrů pro následné kombinační studie a k výpočtu kombinačního indexu. Mezi těmito daty vykazovaly synergický protikarcinogenní efekt buňky HCT-8 při koncentracích kemferolu 100  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  5-FU v porovnání s efektem jednotlivých těchto složek. Kombinační index byl 0,351. Konzistentní výsledky byly, ale nalezeny u druhé buněčné linie u HTC-16, když byl kemferol a 5-FU v poměru 5:1. Kombinační index tohoto poměru byl 0,621 (Li et al., 2019). Při koncentraci 120  $\mu\text{M}$  kemferolu na buněčnou linii kolorektálního karcinomu (LS174), byl kemferol a jeho analogy schopny snížit životaschopnost buněk, které jsou rezistentní na 5-FU. Při již zmiňované koncentraci 120  $\mu\text{M}$  byl nejvyšší inhibiční efekt a to 80 % (Riahi-Chebba et al., 2019).

**Kvercetin** je přítomen ve spoustě druhů ovoce i zeleniny. Je například v kapustě, třesních, brokolici, citrusových plodech, bobulích a obzvláště velké zastoupení má ve slupkách červené cibule (2,5-6,5 %) (Velíšek et Hajšlová, 2009) a také v různých semenech, zrnech a listech. I přes svoji hořkou chuť je jedním z nejvíce konzumovaných dietních flavonoidů. Zdravotní přínosy kvercetinu můžou být zachovány u zpracovaných potravin, pokud byly upravovány méně intenzivním způsobem (Kumar et al., 2017).

A o jaké zdravotní benefity se jedná? Jedná se o antioxidační aktivitu, antivirovou aktivitu, neuroprotektivní efekt, kardiovaskulární vlastnosti, působení proti astmatu, protizánětlivé vlastnosti, pozitivní vliv na imunitu, na diabetes mellitus a hlavně také antikarcinogenní účinky (D'Andrea, 2015; Kumar et al., 2017; S. M. Tang et al., 2020). Pozitivní působení kvercetinu na nádorové onemocnění bylo zjištěno u mnoha typů karcinomu od prostaty, prsu, plic, tlustého střeva, žaludku, leukémie až vaječníku v *in vitro* a *in vivo* experimentech. Zároveň byla prokázána schopnost kvercetinu inhibovat buněčný cyklus, indukovat apoptózu, snižovat objem nádoru a zvýšit míru přežitelnosti zvířat v *in vivo* studii (S. M. Tang et al., 2020).

*In vitro* experimenty kvercetinu prokázaly tyto výsledky. U leukémie lidské buněčné linie U937, kvercetin inhiboval buněčný cyklus při koncentraci 20  $\mu\text{M}$  mezi  $G_2$  a M fázi (Lee et al., 2006). Ve stejné fázi byla zjištěna inhibice u buněčných liniích SGC-7901 a MGC-803 karcinomu žaludku po ošetření kvercetinem o koncentraci 20  $\mu\text{M}$  (Y. Zhu et al., 2017) a u buněčné linie MDA-MB-45 karcinomu prsu při koncentraci 100  $\mu\text{M}$  (Choi et al., 2008). U jiné buněčné linie karcinomu prsu (MCF-7) byla inhibice buněčného cyklu v jiné fázi, a to v S fázi ( $IC_{50}$ = 92,4  $\mu\text{M}$ ) (Chou et al., 2010). Mezi fázemi  $G_0$  a  $G_1$  byla zjištěna inhibice u karcinomu prostaty (PC-3 a DU-145). Buněčná linie PC-3 byla inhibována při koncentraci 60  $\pm$  5,4  $\mu\text{M}$  po 48 hodinách a DU-145 byla při koncentraci 100  $\pm$  4,0  $\mu\text{M}$  také po 48 hodinách (Hamidullah et al., 2015). Efekt kvercetinu na apoptózu byl také testován na linii karcinomu plic (H460). Po ošetření kvercetinem o koncentraci 50  $\mu\text{M}$  byl podíl buněk po 4 dnech 88 % (Youn et al., 2013). Buňky kolorektálního karcinomu (SW480) byly ošetřeny kvercetinem (100  $\mu\text{M}$ ) a byl zjištěn jeho vliv na buněčné metastáze (Feng et al., 2018).

*In vivo* efekt kvercetinu na apoptózu byl pozorován u buněčné linie A2780S, což je buněčná linie karcinomu vaječníku. Vliv kvercetinu na apoptózu byl ze 22,64 % u koncentrace 15 µg/ml a ze 30,89 % u koncentrace 30 µg/ml (Gao et al., 2012). Již zmiňovaný efekt kvercetinu na snižování objemu nádoru prokázal Yang et al. (2016) u buněčné linie lidského karcinomu prostaty (PC-3) na myším modelu v dávkách 25, 50 a 75 mg/kg. Po 4 týdnech byla inhibice v první dávce 22,85 %, v druhé 29,6 % a ve třetí dávce 37,5 %. Zároveň nebyly pozorovány vedlejší účinky spojené s lékem, jako jsou křeče, špatný duševní stav a hematurie.

Cytotoxické účinky nejen samotného kvercetinu byly prokázány. Bylo zjištěno, že v kombinaci s různými sloučeninami má zvýšené cytotoxické účinky na různé rakovinné buňky (Tomko et al., 2020). Například v kombinaci s polyfenolem resveratrolem inhiboval poškození DNA a buněčný růst, synergicky způsobil buněčnou smrt a indukoval zástavu v S fázi buněčného cyklu u buněk karcinomu úst (SCC-15) a hltnanu (Cal-33). Při koncentraci 10 µM jak resveratrolu, tak kvercetinu bylo inhibováno poškození DNA u Cal-33. Buněčný růst byl inhibován při koncentracích 25 µM kvercetinu a 20 µM resveratrolu u SCC-15 a při koncentraci 10 µM u obou složek u Cal-33. Stejná koncentrace obou složek byla též použita a prokázána jako funkční při indukcii zástavy buněčného cyklu v S fázi u Cal-33. Vyšší koncentrace, a to přesněji 20 µM resveratrolu a 25 µM kvercetinu, musela být použita, aby stejného výsledku bylo dokázáno i u SCC-15 (Singh et al., 2020). Též kombinace kvercetinu s kurkuminem anebo s extraktem z *Lycopodium clavatum* prokázaly cytotoxickou aktivitu (Banerjee et al., 2020; Mansourizadeh et al., 2020; Mutlu Altundağ et al., 2020).

**Flavony** stejně jako flavonoly jsou nejrozšířenějším žlutým pigmentem rostlin. Časté sloučeniny v potravinách jsou flavony, které mají substituci, nejčastěji hydroxylovou nebo metoxylovou skupinu, na C-5 a C-7 a méně časté jsou flavony se substitucí na kruhu A v poloze C-6 a na kruhu B v poloze C'-4. Nejčastějšími zástupci z řad flavonů jsou hispidin, akacetin, tangeretin vyskytující se v řadě citrusů (Velíšek et Hajšlová, 2009). Pro *Cannabis* je unikátní flavon cannflavin A, cannflavin B a cannflavin C.

**Cannflaviny** jsou pro konopí specifické. Mají jedinečnou bioaktivitu, která se zdá být spojená se dvěma klíčovými modifikacemi jejich flavonového základu. Jedná se o postranní prenylační vzorec, který je buď geranyl nebo dimethylallyl, dále jsou cannflaviny A i B modifikovány methoxy skupinou na třetím uhlíku kruhu B (Rea et al., 2019).

O prospěšných a léčebných účincích flavonoidů je hodně známo. Jenže o potencionálních účincích cannflavinů, hlavně canflavinu A a C, je známo málo, převážně ve využití proti nádorovým onemocněním (Tomko et al., 2020). Ale Moreau et al. (2019) prokázali antiproliferační aktivitu a indukcii apoptózy cannflavinu B, přesněji jeho izomeru, který se nevyskytuje v přírodě, FBL-03G (Caflanon). Testovali 2 buněčné linie karcinomu slinivky břišní Panc-02 a KPC. Použití 1 µM Caflonu mělo synergické účinky s 4 Gy radioterapie na snížení proliferace buněk u obou buněčných liniích. Tento výsledek ukazuje na terapeutický potencionál Caflanonu. Při koncentraci 4 µM Caflonu došlo k vyšší indukci apoptózy než u samostatné radioterapie 4 Gy. Všechny tyto výsledky naznačují indukci apoptózy a inhibici proliferace nádorových buněk při správné koncentraci léčiva Caflanonu.

V *in vivo* studii na myším modelu byl vypořádán opožděný lokální i metastatický progres nádoru a taky zvýšená životaschopnost myši při koncentraci Caflanonu 100 µM (Moreau et al., 2019).



Úřad pro potraviny a léčiva Spojených států amerických udělil v roce 2019 Caflanonu status léku pro vzácná onemocnění a s tím bylo naplánováno zahájení klinických studií jako potencionálního léčiva na karcinom slinivky břišní. Caflanon byl také identifikován ve vzácném kultivaru bohatém na flavonoidy pocházejícímu z Jamajky, který je znám také jako Černá labuť (Tomko et al., 2020).

## 4 Metodika

### 4.1 Použité materiály

Buněčné kultury kolorektálního karcinomu Caco-2, HT29 a normální buňky CCD 841 CoN byly zakoupeny z European Collection of Cell Culture (ECACC). Eagle's minimum essential medium (EMEM) bylo koupeno od American Type Culture Collection (ATCC) (US), fetální bovinní sérum (FBS) od Sigma-aldrich (CZ), hydrogen uhličitán sodný, pyruvát sodný, glutamin, neesenciální aminokyseliny a roztok penicilin-streptomycinu, trypsin, fosfátový pufr (PBS) od Biowest (F), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetraazolium bromid (MTT), který byl získán od Thermo fisher scientific (US). Dimethylsulfoxid (DMSO) a etanol (EtOH) byly koupeny od Lach-Ner (CZ). Dále kultivační láhve, serologické pipety a 96-jamkové destičky byly zakoupeny u ThermoFisher (UK). Čtečka mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 (Tecan, Švýcarsko). Vzorky konopí byly získány z Katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin, FAPPZ.

### 4.2 Metodika experimentů

#### 4.2.1 Příprava vzorků a extraktů konopí

Extrakty konopí v EtOH byly získány od Ing. Matěje Malíka z Katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin. Rostliny konopí byly pěstovány v „indoor“ pěstebním prostoru se speciální kapénkovou závlahou v denním režimu. Pro závlahu byly využívány různé živné roztoky denně čerstvě míchané. Mikroklima bylo udržováno s optimální relativní vlhkostí a koncentrací CO<sub>2</sub>. teplota v pěstebním prostoru se lišila v závislosti na denním cyklu, kdy během dne bylo 25 °C a v noční fázi byla teplota 22°C. Světelný režim byl zajišťován vysokotlakými sodíkovými výbojkami, které zajistily plné světelné spektrum důležité pro rostlinu.

Pro pokus byl využit uniformní rostlinný materiál pocházející z matečních rostlin léčebného konopí genotypu s pracovním názvem „McLove“.

Byli použity 4 varianty hnojiv při pěstování rostlinného materiálu. Varianta A je Hydro A+B, varianta B je Hydro A+B a Sugar Royal, varianta C je Hydro A+B a Green Sensation a varianta D je Hydro A+B a Sugar Royal a Green Sensation.

V rámci pokusu byly sklizeny rostliny v rozdílném stupni zralosti a odlišných cyklech s využitím různých druhů výživy. Po odebrání byly rostliny zbaveny kořenů, zváženy v čerstvém stavu a rozděleny na 3 části (květ, stonek a list), které se následně zvážily ještě samostatně. Všechny části se usušily a znovu převážily před uskladněním. Listy s květy se uskladnily do chladicích boxů. Před samotnou analýzou byly všechny části homogenizovány. Květy byly zmrazeny tekutým dusíkem a rozemlety v třecí misce.

Ve vzorcích byly stanoveny obsahy kanabinoidů. Analýzy byly prováděny na Katedře agroenvironmentální chemie a výživy rostlin. Výsledky poskytnuté Ing. Matějem Malíkem jsou uvedeny v Příloze 1.

Pro extrakci fytoKANABINOIDŮ z nadrcených a homogenizovaných květů byla použita optimalizovaná metoda zvaná „dynamická macerace“ (Brighenti et al., 201). Od každého vzorku bylo naváženo 0,30 g do 50 ml kádinek a následně přidáno 10 ml rozpouštědla (EtOH). Takto připravené vzorky byly 60 minut macerovány za stálého míchání na magnetické míchače při 300 otáčkách za minutu. Filtrát byl následně vytvořen pomocí zařízení dle

Mortona za sníženého tlaku a převeden do 50ml kónických zkumavek. Květy byly poté opatrně odstraněny z filtru, přesunuty zpět do původních kádinek a bylo přidáno nových 10 ml rozpouštědla. Tento krok byl zopakován celkem třikrát a všechny tři filtráty z jednoho vzorku se smísily dohromady.

Následně byl vzorek rozdělen na dvě části. Z první části bylo odebráno 0,5 ml vzorku, který byl posléze 12× zředěn. Po zředění byly vzorky naposled filtrovány přes nylonové stříkačkové filtry do vialek. a analyzovány na HPLC-DAD (kapalinová chromatografie s detekcí diodového pole), pro stanovení chemického profilu biologicky aktivních látek.

Druhá část vzorku byla odpařena na vakuové rotační odparce Heimdolf, zbytek byl následně rozpuštěn v DMSO na koncentraci 8,19 mg/ml DMSO, vzorky byly následně uskladněny při -80 °C do vlastní analýzy. Takto připravený zásobní roztok byl následně využit pro testování cytotoxických účinků na lidské střevní buňky.

#### **4.2.2 Kultivace buněčných linií**

Buněčné linie kolorektálního karcinomu Caco-2, HT29 a CCD 841 CoN byly kultivovány v EMEM s 10% FBS, 1% roztokem penicilinu a streptomycinu, 1% hydrogenuhličitanem sodným, 1% pyruvát sodným, 1% neesenciálními aminokyselinami. Buňky byly pěstovány v kultivačních lahvích (75 cm<sup>2</sup>) s 15 ml kompletního media, v CO<sub>2</sub> inkubátoru s vlhčenou atmosférou při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Medium bylo měněno jednou za dva dny. Po sedmidenní kultivaci a 90% konfluenci byly buňky propláchnuty pomocí PBSa následně byl přidáno 5 ml trypsinu na 3 minuty. Po těchto 3 minutách byl trypsin neutralizován 5 ml EMEM. Uvolněné buňky byly přeneseny do 15ml zkumavky typu Falcon a centrifugovány 10 min při 200× g. Následně bylo odstraněno medium a nahrazeno čerstvým.

Část buněčné suspenze byla využita na založení nové kultivační láhve, druhá část po spočítání koncentrace životaschopných buněk na automatické počítače buněk byla využita na založení mikrotitrační destičky na vlastní pokus.

#### **4.2.3 Stanovení toxicity**

Pro stanovení životaschopnosti byl s menší modifikací využit test dle Mosmannem (1983) využívající tetraziolovou sůl MTT. Buňky Caco-2, HT29 byly vysazeny na 96-jamkové destičky v hustotě 2,5×10<sup>3</sup>/ml a normální buňky CCD 841 CoN v hustotě 2,5×10<sup>5</sup>/ml. Po 24h inkubaci, bylo odstraněné medium a nahrazeno 100 µl nového EMEM ve kterém byl již rozpuštěný vzorek pomocí sériového ředění v koncentraci 4-128 µg/ml, destička byla následně inkubována 72h.

Po 72h byly vzorky s EMEM odstraněny a nahrazeny 100 µl nového EMEM, které obsahovalo MTT v koncentraci 1 mg/ml po dobu 2 h. Následně bylo EMEM společně s MTT odstraněno a nahrazeno 100 µl DMSO. Absorbance byla následně změřena při 555 nm pomocí spektrofotometru Tecan Infinite M200 (Tecan Group, Männedorf, Švýcarsko) a bylo vypočteno procento životaschopnosti (hodnota IC<sub>50</sub>) v porovnání s neošetřenou kontrolou. Pro každý test byly provedeny 3 nezávislé experimenty.

#### **4.2.4 Statistické vyhodnocení**

Získaná data jsou prezentována jako průměr ± směrodatná odchylka (SD). Statistické výpočty byly provedeny pomocí programů Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA) a Statistica v.12.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Pro zjištění rozdílů mezi vzorky byla použita třífaktorová analýza rozptylů (ANOVA) s následným post-hoc Scheffeho testem

a hladinou pravděpodobnosti  $\alpha = 0,05$ . Vzorky byly také hodnoceny metodou hlavní komponenty (PCA) a pomocí hierarchického shlukování. U hodnot  $IC_{50}$  větších než  $128 \mu\text{g/ml}$  byla pro statistické zpracování použita hodnota  $128 \mu\text{g/ml}$ .

## 5 Výsledky

V práci byla sledována *in vitro* toxicita extraktů *Cannabis* pěstovaných ve 2 cyklech, se 4 variantami hnojení u rostlin sklizených každý týden po dobu 14 dnů. Testována byla na 3 různých buněčných liniích. Na buněčných liniích kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT29 a CCD 841 CoN buněčná linie, což je linie normální lidské tkáně střev.

Tabulka 1 uvádí průměrné hodnoty kdy dochází k 50% inhibici (IC<sub>50</sub>) z jednotlivých cyklů. Bylo zjištěno, že mezi cykly pěstování na HT29 a CCD 841 CoN není statistický rozdíl (p>0,05). Rozdíl mezi cykly pěstování byl zjištěn u Caco-2 (p = 0,0001).

**Tabulka 1:** Průměrné hodnoty IC<sub>50</sub> jednotlivých cyklů

Buněčná linie	Caco-2	HT29	CCD 841 CoN
	IC <sub>50</sub> průměr ± SD (µg/ml)		
1. cyklus	116,19 ± 25,78	57,67 ± 29,11	112,91 ± 29,32
2. cyklus	98,42 ± 35,60	63,60 ± 24,90	112,97 ± 27,61

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr IC<sub>50</sub> ± směrodatná odchylka.

V Tabulce 2 vidíme výsledky v závislosti na typu hnojení. Mezi vzorky nebyly shledány žádné statistické rozdíly v závislosti na typu hnojení (p>0,05).

**Tabulka 2:** Průměrné hodnoty IC<sub>50</sub> jednotlivých variant hnojení

Hnojení	A	B	C	D
	IC <sub>50</sub> průměr ± SD (µg/ml)			
Caco-2	103,94 ± 35,02	106,26 ± 32,62	104,03 ± 34,27	114,93 ± 25,08
HT29	57,66 ± 21,17	61,90 ± 22,97	62,55 ± 31,63	61,01 ± 32,30
CCD 841 CoN	109,02 ± 30,58	120,27 ± 20,63	107,50 ± 32,37	115,26 ± 26,82

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr IC<sub>50</sub> ± směrodatná odchylka. Hnojení A (Hydro A+B), hnojení B (Hydro A+B a Sugar Royal), hnojení C (Hydro A+B a Green Sensation) a hnojení D (Hydro A+B a Sugar Royal a Green Sensation)

Statisticky průkazné rozdíly byly shledány mezi vzorky testovanými na linii HT29 v závislosti na době sklizně. Což je vyznačeno rozdílnými indexy u výsledků v Tabulce 3. Naopak mezi vzorky testovanými na liniích Caco-2 a CCD 841 CoN nebyly zjištěny statisticky průkazné rozdíly.

U linie HT29 je vidět obzvláště rozdíl mezi 4 týdnem a 5 týdnem, kdy došlo k výraznému poklesu IC<sub>50</sub> (Obrázek 3). Rozpětí jednotlivých naměřených hodnot IC<sub>50</sub> bylo u HT29 od 27,23 µg/ml do hodnot nad 128 µg/ml.

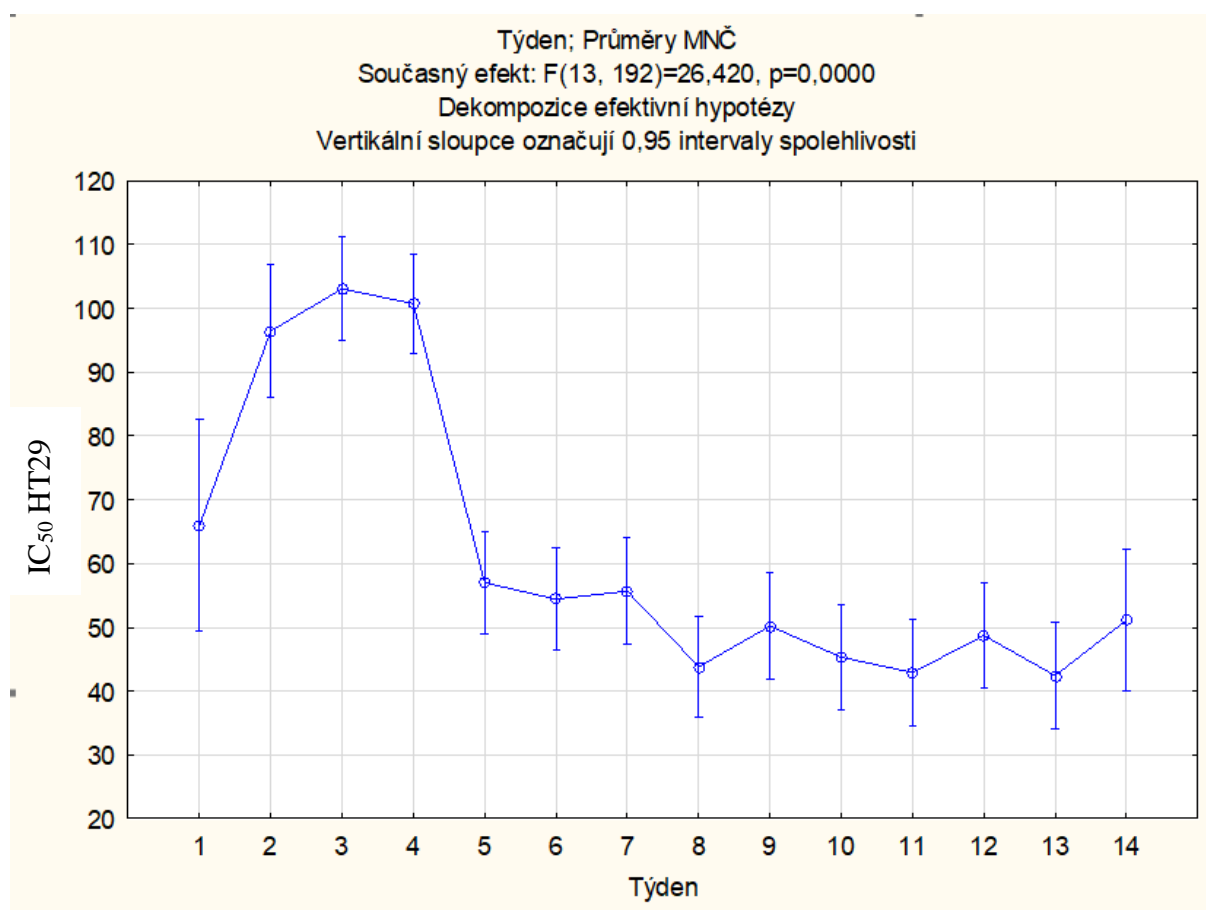
U Caco-2 buněk byly hodnoty IC<sub>50</sub> v rozpětí od 34,11 µg/ml do 128 µg/ml, ale většina hodnot byla nad 128 µg/ml, takže extrakty nevykazovaly příliš velkou cytotoxicitu.

U buněčné linie CCD 841 CoN hodnoty IC<sub>50</sub> dosahovaly od 32,77 µg/ml nad 128 µg/ml, ale též velká část hodnot byla nad 128 µg/ml, tudíž opět nevykazovaly příliš signifikantní cytotoxicitu.

**Tabulka 3:** Průměrné hodnoty IC<sub>50</sub> v jednotlivých týdnech sklizně

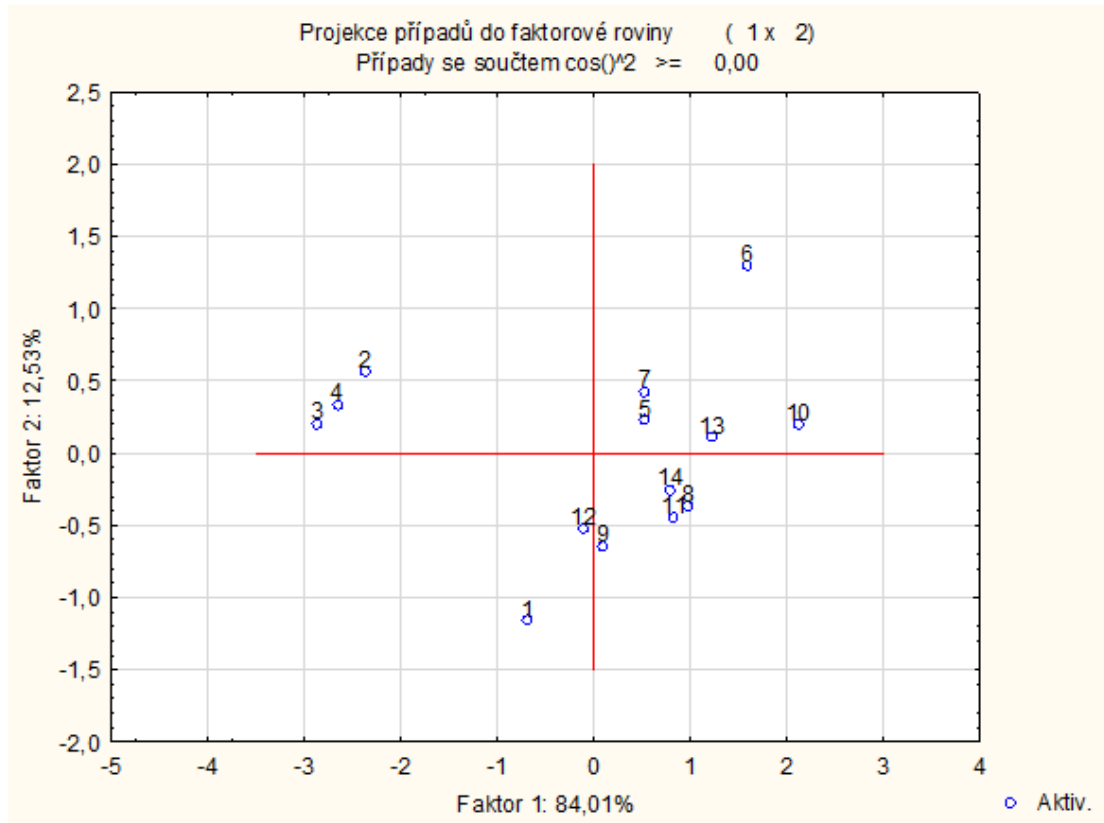
Buněčná linie	Caco-2	HT29	CCD 841 CoN
Týden	IC <sub>50</sub> průměr ± SD (μg/ml)		
1	105,54 ± 38,90	65,97 ± 9,95 <sup>ab</sup>	>128
2	116,25 ± 21,47	96,48 ± 22,04 <sup>a</sup>	122,08 ± 17,76
3	116,18 ± 20,50	103,09 ± 21,09 <sup>a</sup>	>128
4	116,02 ± 21,49	100,74 ± 16,84 <sup>a</sup>	125,74 ± 4,30
5	105,84 ± 31,47	57,02 ± 18,59 <sup>b</sup>	109,47 ± 29,75
6	104,06 ± 35,68	54,43 ± 16,69 <sup>b</sup>	94,94 ± 33,39
7	107,06 ± 31,72	55,66 ± 28,90 <sup>b</sup>	107,58 ± 27,00
8	103,73 ± 36,15	43,82 ± 10,19 <sup>b</sup>	111,94 ± 29,96
9	106,79 ± 33,71	50,20 ± 11,89 <sup>b</sup>	118,72 ± 25,17
10	98,01 ± 38,92	45,30 ± 10,48 <sup>b</sup>	101,79 ± 34,64
11	104,66 ± 35,19	42,93 ± 9,93 <sup>b</sup>	113,16 ± 28,25
12	109,09 ± 33,08	48,75 ± 13,71 <sup>b</sup>	118,46 ± 25,98
13	104,54 ± 31,56	42,32 ± 10,50 <sup>b</sup>	106,41 ± 34,62
14	103,47 ± 32,28	51,15 ± 6,68 <sup>b</sup>	112,16 ± 31,21

U hodnot IC<sub>50</sub> na HT29 byly zjištěny statisticky průkazné rozdíly mezi výsledky ( $p < 0,05$ ), které jsou vyznačeny odlišnými indexy

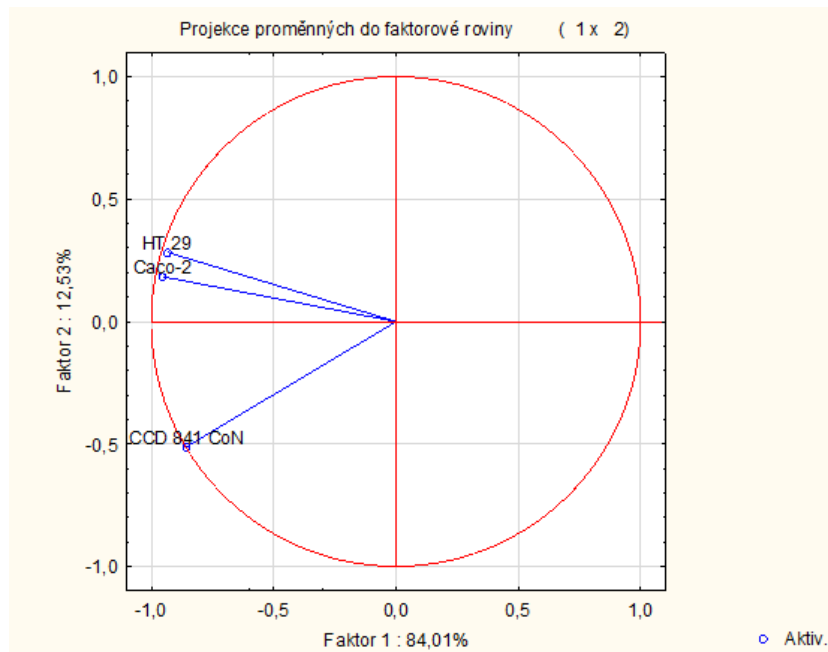
**Obrázek 3:** Závislost IC<sub>50</sub> na týdnu sklizně u extraktů testovaných na HT29

Celkem hodnoty IC<sub>50</sub>, kde byla zjištěna cytotoxicita, byly od 27,23 μg/ml do 126,94 μg/ml, což je 52,13 % ze všech výsledků (z celkem 610 výsledků, bylo 318 pod hodnotou 128 μg/ml). U zbylých byla hodnota IC<sub>50</sub> nad 128 μg/ml.

Obrázek 4 znázorňuje výsledky PCA analýzy vzorků v různých týdnech sklizně pro všechny buněčné linie zároveň. Z grafu je vidět, že se výrazně odlišují vzorky z 2., 3. a 4. týdne, a to na základě odlišných hodnot  $IC_{50}$  u HT29 a Caco-2 (Obrázek 5). Dále se od zbylých týdnů odlišují vzorky z týdnů 1 a 6.



**Obrázek 4:** Výsledky PCA analýzy v závislosti na týdnu pěstování-projekce případů

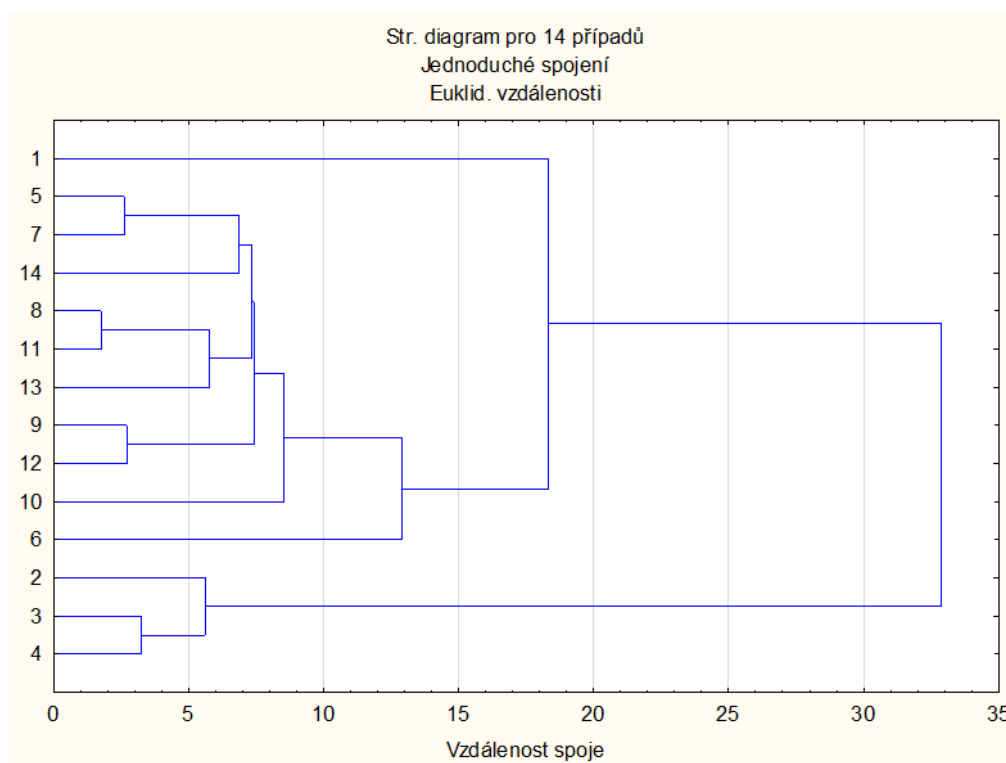


**Obrázek 5:** Výsledky PCA analýzy v závislosti na týdnu pěstování-projekce proměnných

Tyto závěry potvrzují i výsledky hierarchického shlukování (Obrázek 6), kde je též vidět odlišnost vzorků z 2., 3. a 4. týdne a následná odlišnost vzorků z 1. a 6 týdne.

Výsledky z 2., 3. a 4. týdne měly nejvyšší průměrné hodnoty  $IC_{50}$  u buněčných liniích Caco-2 a HT29.

Tato odlišnost je v souladu s Obrázkem 3, který uvádí výraznou změnu  $IC_{50}$  u extraktů testovaných na HT29 mezi 4. a 5. týdnem.



**Obrázek 6:** Výsledky shlukové analýzy v závislosti na týdnu pěstování



## 6 Diskuze

V rámci práce byl sledován vliv extraktů *Cannabis* s rozdílnou dobou sklizně a způsobem pěstování na cytotoxický efekt na lidské buněčné linie intestinálního traktu.

Jak rostlina *Cannabis*, tak extrakty z ní připravené obsahují celou řadu látek s vlivem na nádorové buněčné linie, včetně cytotoxického účinku. Nejvýznamnější skupinou látek v konopí je THC a CBD, mimo to obsahuje ale také další biologicky aktivní látky jako jsou myrcen,  $\beta$ -karyofylen,  $\alpha$ -humulen, kemferol, kvercetin a cannflaviny. V naší práci nás však zajímal vliv rozdílné doby sklizně na účinek etanolového extraktu společně s vlivem rozdílného způsobu hnojení.

Odlišné varianty hnojení se neprokázaly jako statisticky průkazné. U Caco-2 byl větší rozdíl mezi variantou hnojení D a A, B, C než mezi variantami A, B, C. Tento rozdíl se dá vysvětlit tak, že varianta D je kombinací všech hnojiv, takže rostlině byl dodán dostatek živin a nedostala se do tak velkého stresu, aby došlo k syntéze kanabinoidů. U HT29 nedošlo k žádnému signifikantnímu rozdílu, hodnoty  $IC_{50}$  se lišily maximálně o 5  $\mu\text{g/ml}$  mezi hnojením A a C. U CCD 841 CoN byly menší rozdíly mezi hnojeními A, C a B, D. Rozdíl činil maximálně 13  $\mu\text{g/ml}$ . Na všech třech buněčných liniích vykazovaly nejnižší hodnoty  $IC_{50}$  extrakty hnojené variantou A. Jelikož varianta A je jenom Hydro A+B bez dalších příměsí, tak může být rostlina vystavena větší hladině stresu, a tím pádem může vytvářet více sekundárních metabolitů, jako jsou kanabinoidy a ostatní biologicky aktivní látky.

Mimo naše testování toxicity byly stanoveny i obsahy THC a CBD. Mezi 4. a 5. týdnem došlo k nárůstu koncentrace kanabinoidních látek, které byly změřeny Ing. Malíkem. Jedná se přesněji o CBDA, CBDVA (kanabidivarinová kyselina), CBG (kanabigerol), CBGA, CBNA (kanabinolová kyselina), THCA a THCVA (tetrahydrokanabivarinová kyselina) v prvním cyklu a v druhém cyklu se jedná o  $\Delta$ -8-THC (delta-8-tetrahydrokanabinol),  $\Delta$ -9-THC, CBD, CBDA, CBG, CBGA, CBNA, THCA a THCVA. Všechny tyto látky mohou přispívat k cytotoxicitě. Průměrné hodnoty  $IC_{50}$  našich extraktů byly ve čtvrtém týdnu  $116,02 \pm 21,49 \mu\text{g/ml}$  a v pátém týdnu  $105,84 \pm 31,47 \mu\text{g/ml}$  pro buněčnou linii Caco-2, mezi čtvrtým a pátým týdnem byly  $100,74 \pm 16,84 \mu\text{g/ml}$  a  $57,02 \pm 18,59 \mu\text{g/ml}$  pro HT29 a u linie CCD841 CoN bylo  $IC_{50}$  ve čtvrtém týdnu  $125,74 \pm 4,30 \mu\text{g/ml}$  a v pátém  $109,47 \pm 29,75 \mu\text{g/ml}$ . Naše vzorky měly v prvním cyklu průměrný obsah THC  $0,154 \pm 0,032 \%$  a v druhém cyklu  $0,307 \pm 0,054 \%$ . Zastoupení CBD v našich extraktech bylo v prvním cyklu  $0,009 \pm 0,004 \%$  a ve druhém cyklu  $0,029 \pm 0,009 \%$ . Cytotoxicitu látek obsažených v *Cannabis* potvrzují i studie autorů, kteří testovali jednotlivé čisté sloučeniny. THC vykazovalo cytotoxické účinky na buněčné linii Caco-2 ( $IC_{50} = 16,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ) (Ligresti et al., 2006), na linii HT29 ( $IC_{50} = 30,0 \pm 1,01 \mu\text{M}$ ) (Cerretani et al., 2020) a také na linii CCD 841 CoN ( $IC_{50} = 64,47 \pm 0,88 \mu\text{M}$ ) (Plyduang et al., 2014). CBD též vykazovalo cytotoxické účinky, a to na linii Caco-2 ( $IC_{50} = 3,73 \mu\text{M}$ ) (Borrelli et al., 2014) a také na linii HT29 ( $IC_{50} = 30,0 \pm 3,02 \mu\text{M}$ ) (Cerretani et al., 2020). Dle Laezza et al. (2020) prokázalo CBD (10  $\mu\text{M}$ ) částečné nebo žádné účinky na obdobné buněčné linii CCD 841 CoTr, pocházející ze stejného zdroje jako CCD 841 CoN.

Jelikož v našem případě byla testována cytotoxicita extraktů, a ne jednotlivých kanabinoidních látek, tak byly námi naměřené hodnoty  $IC_{50}$  jiné, než uvádí například Ligresti et al. (2006) kteří naměřili cytotoxicitu THC na linii Caco-2, kde bylo  $IC_{50}$  rovno  $16,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$ .

Plyduang et al. (2014) zjistili hodnotu  $IC_{50}=64,47 \pm 0,88 \mu M$  na linii CCD 841 CoN, Cerretani et al. (2020) naměřili hodnotu  $IC_{50}$  THC  $30,0 \pm 1,01 \mu M$  a také hodnotu CBD  $30,0 \pm 3,02 \mu M$  na linii HT29. Borrelli et al. (2014), kteří také měřili  $IC_{50}$  CBD na buněčné linii Caco-2, dosáhli hodnot  $3,73 \mu M$ . Při testování celých extraktů byla prokázána cytotoxicita na buněčných liniích Caco-2 a HT29, což je v souladu s výsledky, které uvádí Janatová et al. (2022) kde bylo testováno 6 různých kultivarů *Cannabis* v optimální zralosti. Tito autoři uvádí průměrné hodnoty  $IC_{50}$  extraktů testovaných na Caco-2 v rozpětí od 13,83 do 29,91  $\mu g/ml$  u HT29 8,48 až 25.71  $\mu g/ml$ . V našem případě byly průměrné hodnoty  $IC_{50}$  u buněčné linie Caco-2 v rozpětí od 34,11  $\mu g/ml$  do hodnot nad 128  $\mu g/ml$  a u HT29 od 27,23  $\mu g/ml$  do hodnot nad 128  $\mu g/ml$ . Přičemž vyšších hodnot bylo dosahováno u extraktů při nižší zralosti, než byla optimální pro sklizeň.

Jak již bylo zmíněno, obsahují extrakty konopí také celou řadu dalších biologicky aktivních látek, které mohou mít vliv na buněčné dělení, případně mohou snižovat oxidační poškození buňky v důsledku oxidačního stresu a vystavení volných radikálů, které mohou vyvolat jak nádorové onemocnění, tak i neurodegenerativní a celou řadu dalších onemocnění. Mezi takové látky patří myrcen s hodnotou  $IC_{50}$  více jak 200  $\mu g/ml$  na buněčné linii karcinomu střev (HT29) (da Silva et al., 2007) a s jeho antioxidační aktivitou kdy zmírňuje aktivitu SOD, GPx a CAT (Hoseini et al., 2019). Obdobně účinkoval i  $\beta$  karyofylen při koncentraci 82  $\mu g/ml$  na buněčné linii HT29 (Dahham et al., 2015). Samotný  $\alpha$ -humulen (32  $\mu g/ml$ ) inhiboval buňky přibližně z 50 % a po přidání 10  $\mu g/ml$   $\beta$ -karyofylenu byl buněčný růst inhibován o 75 % na buněčné linii MCF-7 (karcinom prsu) (Legault et Pichette, 2007). Další biologicky aktivní látkou je kemferol, který má cytostatickou schopnost při koncentraci 50  $\mu mol/l$  inhibuje buněčný cyklus v  $G_2/M$  fázi, mimo to prokazoval také cytotoxické účinky při koncentraci  $IC_{50} = 43 \mu mol/l$  (L. Zhu et Xue, 2019). Po ošetření 20  $\mu M$  kvercetinu byla také inhibice mezi  $G_2$  a M fází (Y. Zhu et al., 2017) a na buněčné linii MCF-7 byla naměřena hodnota  $IC_{50} = 230 \pm 4,144 \mu M$  (Minaei et al., 2016). Při koncentraci 4  $\mu M$  izomeru cannflavinu došlo k indukci apoptózy (Moreau et al., 2019).

Vliv sklizně na rozdílnou cytotoxickou aktivitu není doposud publikován na Web of Science. Dle našich výsledků by bylo vhodné sklízet rostliny od 5. týdne jejich růstu. Naproti tomu jsou již publikace, kdy se autoři zabývají obsahem kanabinoidů. Namdar et al. (2019) sledovali obsah kanabinoidů v rostlinách sklizených po 14 a 35 dnech od začátku období kvetení a zjistili, že obsah kanabinoidů závisí nejen na době sklizně, ale i na typu použitého osvětlení. Nicméně se jedná o stále ne úplně probádané vlastnosti.

## 7 Závěr

- V práci bylo zjištěno, že rozdílný stupeň zralosti *Cannabis* spp. měl významný vliv na *in vitro* toxicitu lidských buněčných linií, přičemž k výraznému zvýšení cytotoxicity extraktů došlo u extraktů z rostlin sklizených mezi čtvrtým a pátým týdnem. V tomto období došlo zároveň k nárůstu kanabinoidů v pěstovaných rostlinách. Bylo tudíž potvrzeno, že se zvyšující se zralostí rostlin bude toxicita významně silnější.
- Cytotoxicita se statisticky významně nelišila v závislosti na způsobu hnojení rostlin a cyklu pěstování. Vyjímkou byly rozdíly mezi prvním a druhým cyklem u buněčné linie Caco-2.
- Extrakty byly testovány pomocí hodnoty  $IC_{50}$  na buněčných liniích kolorektálního karcinomu (Caco-2 a HT29) a zdravých buňkách (CCD 841 CoN). Nejvyšší cytotoxicitu vykazovaly extrakty na linii HT29, takže by do budoucna mohlo být vhodné jejich využití při léčbě kolorektálního karcinomu.

## 8 Literatura

- Afrin, F., Chi, M., Eamens, A. L., Duchatel, R. J., Douglas, A. M., Schneider, J., Gedye, C., Woldu, A. S., Dun, M. D. 2020. Can Hemp Help? Low-THC Cannabis and Non-THC Cannabinoids for the Treatment of Cancer. *Cancers*. 12 (4). doi: 10.3390/CANCERS12041033.
- Alharris, E., Singh, N. P., Nagarkatti, P. S., Nagarkatti, M. 2019. Role of miRNA in the regulation of cannabidiol-mediated apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncotarget*. 10 (1). 45. doi: 10.18632/ONCOTARGET.26534.
- Allegretti, J. R., Courtwright, A., Lucci, M., Korzenik, J. R., Levine, J. 2013. Marijuana use patterns among patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 19 (13). 2809–2814. doi: 10.1097/01.MIB.0000435851.94391.37.
- Allen, D. 2019. Dronabinol therapy: Central nervous system adverse events in adults with primary brain tumors. *Clinical Journal of Oncology Nursing*. 23 (1). 23–26. doi: 10.1188/19.CJON.23-26.
- Allister, S. D., Chan, C., Taft, R. J., Luu, T., Abood, M. E., Moore, D. H., Aldape, K., Yount, G. 2005. Cannabinoids selectively inhibit proliferation and induce death of cultured human glioblastoma multiforme cells. *Journal of Neuro-Oncology* 2005 74:1. 74 (1). 31–40. doi: 10.1007/S11060-004-5950-2.
- Ambrož, M., Boušová, I., Skarka, A., Hanušová, V., Králová, V., Matoušková, P., Szotáková, B., Skálová, L. 2015. The Influence of Sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the Antiproliferative and Pro-Oxidative Effects of Doxorubicin and Its Accumulation in Cancer Cells. *Molecules* 2015, Vol. 20, Pages 15343–15358. 20 (8). 15343–15358. doi: 10.3390/MOLECULES200815343.
- Ambrož, M., Šmatová, M., Šadibolová, M., Pospíšilová, E., Hadravská, P., Kašparová, M., Skarková, V. H., Králová, V., Skálová, L. 2019. Sesquiterpenes  $\alpha$ -humulene and  $\beta$ -caryophyllene oxide enhance the efficacy of 5-fluorouracil and oxaliplatin in colon cancer cells. *Acta Pharmaceutica*. 69 (1). 121–128. doi: 10.2478/ACPH-2019-0003.
- Arul, S., Rajagopalan, H., Ravi, J., Dayalan, H. 2020. Beta-Caryophyllene Suppresses Ovarian Cancer Proliferation by Inducing Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 20 (13). 1530–1537. doi: 10.2174/1871520620666200227093216.
- Baker, D., Pryce, G., Giovannoni, G., Thompson, A. J. 2003. The therapeutic potential of cannabis. *The Lancet Neurology*. 2 (5). 291–298. doi: 10.1016/S1474-4422(03)00381-8.
- Banerjee, A., Pathak, S., Jothimani, G., Roy, S. 2020. Antiproliferative effects of combinational therapy of *Lycopodium clavatum* and quercetin in colon cancer cells. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 31 (4). doi: 10.1515/JBCPP-2019-0193/MACHINEREADABLECITATION/RIS.
- Baron, E. P. 2018. Medicinal Properties of Cannabinoids, Terpenes, and Flavonoids in Cannabis, and Benefits in Migraine, Headache, and Pain: An Update on Current Evidence and Cannabis Science. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 58 (7). 1139–1186. doi: 10.1111/HEAD.13345.
- Behr, A., Johnen, L. 2009. Myrcene as a Natural Base Chemical in Sustainable Chemistry: A Critical Review. *ChemSusChem*. 2 (12). 1072–1095. doi: 10.1002/CSSC.200900186.
- Bisogno, T., Hanuš, L., de Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D. E., Brandi, I., Moriello, A. S., Davis, J. B., Mechoulam, R., di Marzo, V. 2001. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: Effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *British Journal of Pharmacology*. 134 (4). 845–852. doi: 10.1038/SJ.BJP.0704327.

- Blasco-Benito, S., Seijo-Vila, M., Caro-Villalobos, M., Tundidor, I., Andradás, C., García-Taboada, E., Wade, J., Smith, S., Guzmán, M., Pérez-Gómez, E., Gordon, M., Sánchez, C. 2018. Appraising the “entourage effect”: Antitumor action of a pure cannabinoid versus a botanical drug preparation in preclinical models of breast cancer. *Biochemical Pharmacology*. 157 . 285–293. doi: 10.1016/J.BCP.2018.06.025.
- Borrelli, F., Pagano, E., Romano, B., Panzera, S., Maiello, F., Coppola, D., de Petrocellis, L., Buono, L., Orlando, P., Izzo, A. A. 2014. Colon carcinogenesis is inhibited by the TRPM8 antagonist cannabigerol, a Cannabis-derived non-psychoactive cannabinoid. *Carcinogenesis*. 35 (12). 2787–2797. doi: 10.1093/CARCIN/BGU205.
- Bridgeman, M. B., Abazia, D. T. 2017. Medicinal Cannabis: History, Pharmacology, And Implications for the Acute Care Setting. *Pharmacy and Therapeutics*. 42 (3). 180. Retrieved from /pmc/articles/PMC5312634/
- Brighenti, V., Pellati, F., Steinbach, M., Maran, D., Benvenuti, S. 2017. Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type Cannabis sativa L. (hemp). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 143 . 228–236. doi: 10.1016/J.JPBA.2017.05.049.
- Carracedo, A., Gironella, M., Lorente, M., Garcia, S., Guzmán, M., Velasco, G., Iovanna, J. L. 2006. Cannabinoids Induce Apoptosis of Pancreatic Tumor Cells via Endoplasmic Reticulum Stress–Related Genes. *Cancer Research*. 66 (13). 6748–6755. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0169.
- Cerretani, D., Collodel, G., Brizzi, A., Fiaschi, A. I., Menchiari, A., Moretti, E., Moltoni, L., Micheli, L. 2020. Cytotoxic effects of cannabinoids on human ht-29 colorectal adenocarcinoma cells: Different mechanisms of THC, CBD, and CB83. *International Journal of Molecular Sciences*. 21 (15). 1–15. doi: 10.3390/IJMS21155533.
- Chen, H., Yuan, J., Hao, J., Wen, Y., Lv, Y., Chen, L., Yang, X. 2019.  $\alpha$ -Humulene inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and induces apoptosis through the inhibition of Akt signaling. *Food and Chemical Toxicology*. 134 . 110830. doi: 10.1016/J.FCT.2019.110830.
- Choi, E. J., Bae, S. M., Ahn, W. S. 2008. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Archives of Pharmacal Research* 2008 31:10. 31 (10). 1281–1285. doi: 10.1007/S12272-001-2107-0.
- Chou, C. C., Yang, J. S., Lu, H. F., Ip, S. W., Lo, C., Wu, C. C., Lin, J. P., Tang, N. Y., Chung, J. G., Chou, M. J., Teng, Y. H., Chen, D. R. 2010. Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Archives of Pharmacal Research* 2010 33:8. 33 (8). 1181–1191. doi: 10.1007/S12272-010-0808-Y.
- Chung, K. S., Hong, J. Y., Lee, J. H., Lee, H. J., Park, J. Y., Choi, J. H., Park, H. J., Hong, J., Lee, K. T. 2019.  $\beta$ -Caryophyllene in the Essential Oil from Chrysanthemum Boreale Induces G1 Phase Cell Cycle Arrest in Human Lung Cancer Cells. *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 3754. 24 (20). 3754. doi: 10.3390/MOLECULES24203754.
- Clarke, R. C., Merlin, M. D. 2017. Critical Reviews in Plant Sciences Cannabis Domestication, Breeding History, Present-day Genetic Diversity, and Future Prospects. . doi: 10.1080/07352689.2016.1267498.
- da Silva, S. L., Figueiredo, P. M., Yano, T. 2007. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves. *Acta Amazonica*. 37 (2). 281–286. doi: 10.1590/S0044-59672007000200015.
- Dahham, S. S., Tabana, Y. M., Iqbal, M. A., Ahamed, M. B. K., Ezzat, M. O., Majid, A. S. A., Majid, A. M. S. A. 2015. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial

- Properties of the Sesquiterpene  $\beta$ -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules* 2015, Vol. 20, Pages 11808–11829. 20 (7). 11808–11829. doi: 10.3390/MOLECULES200711808.
- D'Andrea, G. 2015. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*. 106 . 256–271. doi: 10.1016/J.FITOTE.2015.09.018.
- de La Ossa, D. H. P., Gil-Alegre, M. E., Ligresti, A., Aberturas, M. D. R., Molpeceres, J., Torres, A. I., di Marzo, V. 2013. Preparation and characterization of  $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol-loaded biodegradable polymeric microparticles and their antitumoral efficacy on cancer cell lines. *Journal of Drug Targeting*. 21 (8). 710–718. doi: 10.3109/1061186X.2013.809089.
- de Petrocellis, L., Ligresti, A., Schiano Moriello, A., Iappelli, M., Verde, R., Stott, C. G., Cristino, L., Orlando, P., di Marzo, V. 2013. Non-THC cannabinoids inhibit prostate carcinoma growth in vitro and in vivo: pro-apoptotic effects and underlying mechanisms. *British Journal of Pharmacology*. 168 (1). 79–102. doi: 10.1111/J.1476-5381.2012.02027.X.
- Devi, K. P., Malar, D. S., Nabavi, S. F., Sureda, A., Xiao, J., Nabavi, S. M., Daglia, M. 2015. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacological Research*. 99 . 1–10. doi: 10.1016/J.PHRS.2015.05.002.
- Dewick, P. M. 2002. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Vol. 2. Chichester. John Wiley and Sons. ISBN: 978-0-470-74168-9.
- Elbaz, M., Nasser, M. W., Ravi, J., Wani, N. A., Ahirwar, D. K., Zhao, H., Oghumu, S., Satoskar, A. R., Shilo, K., Carson, W. E., Ganju, R. K. 2015. Modulation of the tumor microenvironment and inhibition of EGF/EGFR pathway: Novel anti-tumor mechanisms of Cannabidiol in breast cancer. *Molecular Oncology*. 9 (4). 906–919. doi: 10.1016/J.MOLONC.2014.12.010.
- ElSohly, M. A., Radwan, M. M., Gul, W., Chandra, S., Galal, A. 2017. Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. 103 . 1–36. doi: 10.1007/978-3-319-45541-9\_1.
- Feng, J., Song, D., Jiang, S. Y., Yang, X. H., Ding, T. T., Zhang, H., Luo, J., Liao, J., Yin, Q. 2018. Quercetin restrains TGF- $\beta$ 1-induced epithelial–mesenchymal transition by inhibiting Twist1 and regulating E-cadherin expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 498 (1). 132–138. doi: 10.1016/J.BBRC.2018.02.044.
- Fidy, K., Fiedorowicz, A., Strzdała, L., Szumny, A. 2016.  $\beta$ -caryophyllene and  $\beta$ -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer Medicine*. 5 (10). 3007–3017. doi: 10.1002/CAM4.816.
- Fike, J. 2016. Industrial Hemp: Renewed Opportunities for an Ancient Crop. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 35 (5–6). 406–424. doi: 10.1080/07352689.2016.1257842.
- Fisher, T., Golan, H., Schiby, G., Prichen, S., Smoum, R., Moshe, I., Peshes-Yaloz, N., Castiel, A., Waldman, D., Gallily, R., Mechoulam, R., Toren, A. 2016. In Vitro and In Vivo Efficacy of Non-Psychoactive Cannabidiol in Neuroblastoma. *Current Oncology* 2016, Vol. 23, Pages 15–22. 23 (s1). 15–22. doi: 10.3747/CO.23.2893.
- Flores-Sanchez, I. J., Verpoorte, R. 2008. PKS Activities and Biosynthesis of Cannabinoids and Flavonoids in *Cannabis sativa* L. *Plants. Plant and Cell Physiology*. 49 (12). 1767–1782. doi: 10.1093/PCP/PCN150.
- Gao, X., Wang, B., Wei, X., Men, K., Zheng, F., Zhou, Y., Zheng, Y., Gou, M., Huang, M., Guo, G., Huang, N., Qian, Z., Wei, Y. 2012. Anticancer effect and mechanism of polymer micelle-encapsulated quercetin on ovarian cancer. *Nanoscale*. 4 (22). 7021–7030. doi: 10.1039/C2NR32181E.

- Geiger, T. R., Peeper, D. S. 2009. Metastasis mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1796 (2). 293–308. doi: 10.1016/J.BBCAN.2009.07.006.
- Gontijo, V. S., dos Santos, M. H., Viegas Jr., C. 2016. Biological and Chemical Aspects of Natural Biflavonoids from Plants: A Brief Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 17 (10). doi: 10.2174/1389557517666161104130026.
- Greenhough, A., Patsos, H. A., Williams, A. C., Paraskeva, C. 2007. The cannabinoid  $\delta$ 9-tetrahydrocannabinol inhibits RAS-MAPK and PI3K-AKT survival signalling and induces BAD-mediated apoptosis in colorectal cancer cells. *International Journal of Cancer*. 121 (10). 2172–2180. doi: 10.1002/IJC.22917.
- Grotenhermen, F., Russo, E. 2013. Cannabis and Cannabinoids: Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential. *Cannabis and Cannabinoids: Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential*. 1–439. doi: 10.4324/9780203479506.
- Guzmán, M., Duarte, M. J., Blázquez, C., Ravina, J., Rosa, M. C., Galve-Roperh, I., Sánchez, C., Velasco, G., González-Feria, L. 2006. A pilot clinical study of  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *British Journal of Cancer* 2006 95:2. 95 (2). 197–203. doi: 10.1038/sj.bjc.6603236.
- Hamidullah, Kumar, R., Saini, K. S., Kumar, A., Kumar, S., Ramakrishna, E., Maurya, R., Konwar, R., Chattopadhyay, N. 2015. Quercetin-6-C- $\beta$ -d-glucopyranoside, natural analog of quercetin exhibits anti-prostate cancer activity by inhibiting Akt-mTOR pathway via aryl hydrocarbon receptor. *Biochimie*. 119 . 68–79. doi: 10.1016/J.BIOCHI.2015.10.012.
- Haslbeck, K., Bub, S., Schönberger, C., Zarnkow, M., Jacob, F., Coelhan, M. 2017. On the Fate of  $\beta$ -Myrcene during Fermentation-The Role of Stripping and Uptake of Hop Oil Components by Brewer's Yeast in Dry-Hopped Wort and Beer. *Brewing Science*. doi: 10.23763/BRSC17-16HASLBECK.
- Hedrick, T., Friel, C. 2013. Colonic crohn disease. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*. 26 (2). 84–89. doi: 10.1055/s-0033-1348046.
- Hernández-Tiedra, S., Fabriàs, G., Dávila, D., Salanueva, Í. J., Casas, J., Montes, L. R., Antón, Z., García-Taboada, E., Salazar-Roa, M., Lorente, M., Nylandsted, J., Armstrong, J., López-Valero, I., McKee, C. S., Serrano-Puebla, A., García-López, R., González-Martínez, J., Abad, J. L., Hanada, K., Boya, P., Goñi, F., Guzmán, M., Lovat, P., Jäättelä, M., Alonso, A., Velasco, G. 2016. Dihydroceramide accumulation mediates cytotoxic autophagy of cancer cells via autolysosome destabilization. *Autophagy*. 12 (11). 2213–2229. doi: 10.1080/15548627.2016.1213927/SUPPL\_FILE/KAUP\_A\_1213927\_SM3281.ZIP.
- Hirao-Suzuki, M., Takeda, S., Watanabe, K., Takiguchi, M., Aramaki, H. 2019.  $\Delta$ 9-Tetrahydrocannabinol upregulates fatty acid 2-hydroxylase (FA2H) via PPAR $\alpha$  induction: A possible evidence for the cancellation of PPAR $\beta$ / $\delta$ -mediated inhibition of PPAR $\alpha$  in MDA-MB-231 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 662 . 219–225. doi: 10.1016/J.ABB.2018.12.011.
- Honarmand, M., Namazi, F., Mohammadi, A., Nazifi, S. 2018. Can cannabidiol inhibit angiogenesis in colon cancer? *Comparative Clinical Pathology* 2018 28:1. 28 (1). 165–172. doi: 10.1007/S00580-018-2810-6.
- Hoseini, S. M., Yousefi, M., Hoseinifar, S. H., van Doan, H. 2019. Antioxidant, enzymatic and hematological responses of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with myrcene- or menthol-supplemented diets and exposed to ambient ammonia. *Aquaculture*. 506 . 246–255. doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2019.03.048.
- Hung, T. W., Chen, P. N., Wu, H. C., Wu, S. W., Tsai, P. Y., Hsieh, Y. S., Chang, H. R. 2017. Kaempferol Inhibits the Invasion and Migration of Renal Cancer Cells through

- the Downregulation of AKT and FAK Pathways. *International Journal of Medical Sciences*. 14 (10). 984. doi: 10.7150/IJMS.20336.
- Irigaray, P., Newby, J. A., Clapp, R., Hardell, L., Howard, V., Montagnier, L., Epstein, S., Belpomme, D. 2007. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 61 (10). 640–658. doi: 10.1016/J.BIOPHA.2007.10.006.
- Izzo, A. A., Camilleri, M. 2008. Emerging role of cannabinoids in gastrointestinal and liver diseases: basic and clinical aspects. *Gut*. 57 (8). 1140–1155. doi: 10.1136/GUT.2008.148791.
- Janatová, A., Doskočil, I., Božik, M., Fraňková, A., Tlustoš, P., Klouček, P. 2022. The chemical composition of ethanolic extracts from six genotypes of medical cannabis (*Cannabis sativa* L.) and their selective cytotoxic activity. *Chemico-Biological Interactions*. 353 . 109800. doi: 10.1016/J.CBI.2022.109800.
- Jeong, S., Yun, H. K., Jeong, Y. A., Jo, M. J., Kang, S. H., Kim, J. L., Kim, D. Y., Park, S. H., Kim, B. R., Na, Y. J., Lee, S. il, Kim, H. do, Kim, D. H., Oh, S. C., Lee, D. H. 2019. Cannabidiol-induced apoptosis is mediated by activation of Noxa in human colorectal cancer cells. *Cancer Letters*. 447 . 12–23. doi: 10.1016/J.CANLET.2019.01.011.
- Jin, D., Dai, K., Xie, Z., Chen, J. 2020. Secondary Metabolites Profiled in Cannabis Inflorescences, Leaves, Stem Barks, and Roots for Medicinal Purposes. *Scientific Reports* 2020 10:1. 10 (1). 1–14. doi: 10.1038/s41598-020-60172-6.
- Jo, E., Park, S. J., Choi, Y. S., Jeon, W. K., Kim, B. C. 2015. Kaempferol Suppresses Transforming Growth Factor- $\beta$ 1-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Migration of A549 Lung Cancer Cells by Inhibiting Akt1-Mediated Phosphorylation of Smad3 at Threonine-179. *Neoplasia*. 17 (7). 525–537. doi: 10.1016/J.NEO.2015.06.004.
- Kaczorová, D., Béres, T., Čavar Zeljković, S., Bjelková, M., Kuchař, M., Tarkowski, P. 2020. O konopí bez předsudků | Chemické listy. *Chemické Listy*. 114 (4). 277–284. Retrieved from <http://blog.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3586>
- Kampa-Schittenhelm, K. M., Salitzky, O., Akmut, F., Illing, B., Kanz, L., Salih, H. R., Schittenhelm, M. M. 2016. Dronabinol has preferential antileukemic activity in acute lymphoblastic and myeloid leukemia with lymphoid differentiation patterns. *BMC Cancer*. 16 (1). 1–12. doi: 10.1186/S12885-015-2029-8/TABLES/2.
- Kashyap, D., Sharma, A., Tuli, H. S., Sak, K., Punia, S., Mukherjee, T. K. 2017. Kaempferol – A dietary anticancer molecule with multiple mechanisms of action: Recent trends and advancements. *Journal of Functional Foods*. 30 . 203–219. doi: 10.1016/J.JFF.2017.01.022.
- Kis, B., Ifrim, F. C., Buda, V., Avram, S., Pavel, I. Z., Antal, D., Paunescu, V., Dehelean, C. A., Ardelean, F., Diaconeasa, Z., Soica, C., Danciu, C. 2019. Cannabidiol-from Plant to Human Body: A Promising Bioactive Molecule with Multi-Target Effects in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 20 (23). doi: 10.3390/IJMS20235905.
- Kittnar, O. 2020. *Lékařská fyziologie*. 2nd ed. Praha. Grada. ISBN: 978-80-247-1963-4. Retrieved from [https://www.grada.cz/lekarska-fyziologie-\(1\)-10299/](https://www.grada.cz/lekarska-fyziologie-(1)-10299/)
- Kumar, R., Vijayalakshmi, S., Nadanasabapathi, S. 2017. Health Benefits of Quercetin. *Defence Life Science* . doi: 10.14429/dlsj.2.11359.
- Laezza, C., Pagano, C., Navarra, G., Pastorino, O., Proto, M. C., Fiore, D., Piscopo, C., Gazerro, P., Bifulco, M. 2020. The Endocannabinoid System: A Target for Cancer



- Treatment. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 747. 21 (3). 747. doi: 10.3390/IJMS21030747.
- Lal, S., Prasad, N., Ryan, M., Tangri, S., Silverberg, M. S., Gordon, A., Steinhart, H. 2011. Cannabis use amongst patients with inflammatory bowel disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 23 (10). 891–896. doi: 10.1097/MEG.0B013E328349BB4C.
- Lee, T. J., Kim, O. H., Kim, Y. H., Lim, J. H., Kim, S., Park, J. W., Kwon, T. K. 2006. Quercetin arrests G2/M phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells. *Cancer Letters*. 240 (2). 234–242. doi: 10.1016/J.CANLET.2005.09.013.
- Legault, J., Dahl, W., Debiton, E., Pichette, A., Madelmont, J. C. 2003. Antitumor activity of balsam fir oil: Production of reactive oxygen species induced by  $\alpha$ -humulene as possible mechanism of action. *Planta Medica*. 69 (5). 402–407. doi: 10.1055/S-2003-39695/ID/1.
- Legault, J., Pichette, A. 2007. Potentiating effect of  $\beta$ -caryophyllene on anticancer activity of  $\alpha$ -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 59 (12). 1643–1647. doi: 10.1211/JPP.59.12.0005.
- Leonard, W., Zhang, P., Ying, D., Fang, Z. 2020. Hempseed in food industry: Nutritional value, health benefits, and industrial applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 19 (1). 282–308. doi: 10.1111/1541-4337.12517.
- Li, Q., Wei, L., Lin, S., Chen, Y., Lin, J., Peng, J. 2019. Synergistic effect of kaempferol and 5-fluorouracil on the growth of colorectal cancer cells by regulating the PI3K/Akt signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*. 20 (1). 728–734. doi: 10.3892/MMR.2019.10296/HTML.
- Ligresti, A., Moriello, A. S., Starowicz, K., Matias, I., Pisanti, S., de Petrocellis, L., Laezza, C., Portella, G., Bifulco, M., di Marzo, V. 2006. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 318 (3). 1375–1387. doi: 10.1124/JPET.106.105247.
- Lincová, D., Farghali, H. 2007. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2nd ed. Praha. Galén. ISBN: 978-80-7262-373-0.
- Lowe, H., Steele, B., Bryant, J., Toyang, N., Ngwa, W. 2021. Non-Cannabinoid Metabolites of *Cannabis sativa* L. with Therapeutic Potential. *Plants* 2021, Vol. 10, Page 400. 10 (2). 400. doi: 10.3390/PLANTS10020400.
- Lüllmann, Heinz., Mohr, Klaus., Wehling, Martin., Wenke, M., Mühlbachová, E. 2004. *Farmakologie a toxikologie*. 2nd ed. Praha. Grada. ISBN: 80-247-0836-1.
- M. Calderon-Montano, J., Burgos-Moron, E., Perez-Guerrero, C., Lopez-Lazaro, M. 2011. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 11 (4). 298–344. doi: 10.2174/138955711795305335.
- Madni, A., Kanwal, R., Tariq, M., Baloch, A., Shah, K., Jabbar, A., Khan, M. I., Rehman, M. 2016. A peer-reviewed journal Devising Interactive Dissolution Experiment for Pharmacy Students (part I): Use of USP Type II Apparatus for Comparison of Immediate Release and Enteric Coated Tablets in Time Varying pH Conditions Devising Interactive Dissolution Experiment for Pharmacy Students (part I): Use of USP Type II Apparatus for Comparison of Immediate Release and Enteric Coated Tablets in Time Varying pH Conditions. *PSM Biol. Res.* 01 (2). 83–87. Retrieved from [www.psmpublishers.org](http://www.psmpublishers.org)
- Malík, M., Velechovský, J., Tlustoš, P. 2021. The overview of existing knowledge on medical cannabis plants growing. *Plant, Soil and Environment*. 67 (8). 425–442. doi: 10.17221/96/2021-PSE.

- Mansourizadeh, F., Alberti, D., Bitonto, V., Tripepi, M., Sepehri, H., Khoee, S., Geninatti Crich, S. 2020. Efficient synergistic combination effect of Quercetin with Curcumin on breast cancer cell apoptosis through their loading into Apo ferritin cavity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 191 . 110982. doi: 10.1016/J.COLSURFB.2020.110982.
- Marcu, J. P., Christian, R. T., Lau, D., Zielinski, A. J., Horowitz, M. P., Lee, J., Pakdel, A., Allison, J., Limbad, C., Moore, D. H., Yount, G. L., Desprez, P. Y., McAllister, S. D. 2010. Cannabidiol enhances the inhibitory effects of  $\Delta^9$ - tetrahydrocannabinol on human glioblastoma cell proliferation and survival. *Molecular Cancer Therapeutics*. 9 (1). 180–189. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0407/354840/P/CANNABIDIOL-ENHANCES-THE-INHIBITORY-EFFECTS-OF-9.
- Martín-Banderas, L., Muñoz-Rubio, I., Prados, J., Álvarez-Fuentes, J., Calderón-Montaño, J. M., López-Lázaro, M., Arias, J. L., Leiva, M. C., Holgado, M. A., Fernández-Arévalo, M. 2015. In vitro and in vivo evaluation of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol/PLGA nanoparticles for cancer chemotherapy. *International Journal of Pharmaceutics*. 487 (1–2). 205–212. doi: 10.1016/J.IJPHARM.2015.04.054.
- Mbachi, C., Attar, B., Wang, Y., Paintsil, I., Mba, B., Fugar, S., Agrawal, R., Simons-Linares, R. C., Jaiswal, P., Trick, W., Kotwal, V. 2019. Association Between Cannabis Use and Complications Related to Crohn’s Disease: A Retrospective Cohort Study. *Digestive Diseases and Sciences*. 64 (10). 2939–2944. doi: 10.1007/s10620-019-05556-z.
- Meeran, M. F. N., al Tae, H., Azimullah, S., Tariq, S., Adeghate, E., Ojha, S. 2019.  $\beta$ -Caryophyllene, a natural bicyclic sesquiterpene attenuates doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity via activation of myocardial cannabinoid type-2 (CB2) receptors in rats. *Chemico-Biological Interactions*. 304 . 158–167. doi: 10.1016/J.CBI.2019.02.028.
- Mescher, A. L. 2018. *Junqueirovy základy histologie*. Vol. 1. Praha. Galén. p. 0–558. ISBN: 978-80-7492-324-1.
- Milian, L., Mata, M., Alcacer, J., Oliver, M., Sancho-Tello, M., de Llano, J. J. M., Camps, C., Galbis, J., Carretero, J., Carda, C. 2020. Cannabinoid receptor expression in non-small cell lung cancer. Effectiveness of tetrahydrocannabinol and cannabidiol inhibiting cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in vitro. *PLOS ONE*. 15 (2). e0228909. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0228909.
- Minaei, A., Sabzichi, M., Ramezani, F., Hamishehkar, H., Samadi, N. 2016. Co-delivery with nano-quercetin enhances doxorubicin-mediated cytotoxicity against MCF-7 cells. *Molecular Biology Reports*. 43 (2). 99–105. doi: 10.1007/S11033-016-3942-X/FIGURES/4.
- Moreau, M., Ibeh, U., Decosmo, K., Bih, N., Yasmin-Karim, S., Toyang, N., Lowe, H., Ngwa, W. 2019. Flavonoid Derivative of Cannabis Demonstrates Therapeutic Potential in Preclinical Models of Metastatic Pancreatic Cancer. *Frontiers in Oncology*. 9 . 660. doi: 10.3389/FONC.2019.00660/BIBTEX.
- Mutlu Altundağ, E., Yılmaz, A. M., Serdar, B. S., Jannuzzi, A. T., Koçtürk, S., Yalçın, A. S. 2020. Synergistic Induction of Apoptosis by Quercetin and Curcumin in Chronic Myeloid Leukemia (K562) Cells: II. Signal Transduction Pathways Involved. *Nutrition and Cancer*. 73 (4). 703–712. doi: 10.1080/01635581.2020.1767167.
- Naftali, T., Bar-Lev Schleider, L., Dotan, I., Lansky, E. P., Sklerovsky Benjaminov, F., Konikoff, F. M. 2013. Cannabis induces a clinical response in patients with crohn’s

- disease: A prospective placebo-controlled study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 11 (10). doi: 10.1016/j.cgh.2013.04.034.
- Naftali, T., Lev, L. B., Yablekovitz, D., Half, E., Konikoff, F. M. 2011. Treatment of Crohn's disease with cannabis: an observational study. *The Israel Medical Association Journal: IMAJ*. 13 (8). 455–458. Retrieved from <https://europepmc.org/article/med/21910367>
- Namdar, D., Charuvi, D., Ajjampura, V., Mazuz, M., Ion, A., Kamara, I., Koltai, H. 2019. LED lighting affects the composition and biological activity of *Cannabis sativa* secondary metabolites. *Industrial Crops and Products*. 132 . 177–185. doi: 10.1016/J.INDCROP.2019.02.016.
- National Toxicology Program 2010. NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of beta-myrcene (CAS No. 123-35-3) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Gavage studies). National Toxicology Program Technical Report Series. 557 . 1–163. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21415873/>
- Ngobeni, N. D., Mokoena, M. L., Funnah, S. M. 2016. Growth and yield response of fibre hemp cultivars (*Cannabis sativa* L.) under different N-levels in Eastern Cape Province of South Africa. *African Journal of Agricultural Research*. 11 (2). 57–64. doi: 10.5897/AJAR12.0675.
- Pacifici, R., Zuccaro, P., Pichini, S., Roset, P. N., Poudevida, S., Farré, M., Segura, J., de la Torre, R. 2003. Modulation of the immune system in cannabis users. *JAMA*. 289 (15). 1929-a-1931. doi: 10.1001/JAMA.289.15.1929-B.
- Paduch, R., Kandefers-Szerszeń, M., Trytek, M., Fiedurek, J. 2007. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2007 55:5. 55 (5). 315–327. doi: 10.1007/S00005-007-0039-1.
- Pelikán, M. 2005. Obiloviny jako funkční potravina. *Potravinářská Revue*. (5). 13–15.
- Plyduang, T., Lomlim, L., Yuenyongsawad, S., Wiwattanapatpee, R. 2014. Carboxymethylcellulose–tetrahydrocurcumin conjugates for colon-specific delivery of a novel anti-cancer agent, 4-amino tetrahydrocurcumin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 88 (2). 351–360. doi: 10.1016/J.EJPB.2014.05.011.
- Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N. 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 82 (4). 513–523. doi: 10.1016/J.FITOTE.2011.01.018.
- Ramer, R., Heinemann, K., Merkord, J., Rohde, H., Salamon, A., Linnebacher, M., Hinz, B. 2013. COX-2 and PPAR- $\gamma$  confer cannabidiol-induced apoptosis of human lung cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 12 (1). 69–82. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0335/84639/AM/CYCLOOXYGENASE-2-AND-PEROXISOME-PROLIFERATOR.
- Rea, K. A., Casaretto, J. A., Al-Abdul-Wahid, M. S., Sukumaran, A., Geddes-McAlister, J., Rothstein, S. J., Akhtar, T. A. 2019. Biosynthesis of cannflavins A and B from *Cannabis sativa* L. *Phytochemistry*. 164 . 162–171. doi: 10.1016/J.PHYTOCHEM.2019.05.009.
- Riahi-Chebbi, I., Soud, S., Othman, H., Haoues, M., Karoui, H., Morel, A., Srairi-Abid, N., Essafi, M., Essafi-Benkhadir, K. 2019. The Phenolic compound Kaempferol overcomes 5-fluorouracil resistance in human resistant LS174 colon cancer cells. *Scientific Reports* 2019 9:1. 9 (1). 1–20. doi: 10.1038/s41598-018-36808-z.
- Rufino, A. T., Ribeiro, M., Sousa, C., Judas, F., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Mendes, A. F. 2015. Evaluation of the anti-inflammatory, anti-catabolic and pro-anabolic effects of E-caryophyllene, myrcene and limonene in a cell model of osteoarthritis. *European Journal of Pharmacology*. 750 . 141–150. doi: 10.1016/J.EJPHAR.2015.01.018.

- Russo, E. B. 2011. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*. 163 (7). 1344–1364. doi: 10.1111/J.1476-5381.2011.01238.X.
- Russo, E. B., Jiang, H.-E., Li, X., Sutton, A., Carboni, A., del Bianco, F., Mandolino, G., Potter, D. J., Zhao, Y.-X., Bera, S., Zhang, Y.-B., Lü, E.-G., Ferguson, D. K., Hueber, F., Zhao, L.-C., Liu, C.-J., Wang, Y.-F., Li, C.-S. 2008. Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia. *Journal of Experimental Botany*. 59 (15). 4171–4182. doi: 10.1093/jxb/ern260.
- Salentijn, E. M. J., Zhang, Q., Amaducci, S., Yang, M., Trindade, L. M. 2015. New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. *Industrial Crops and Products*. 68 . 32–41. doi: 10.1016/J.INDCROP.2014.08.011.
- Sankpal, U. T., Pius, H., Khan, M., Shukoor, M. I., Maliakal, P., Lee, C. M., Abdelrahim, M., Connelly, S. F., Basha, R. 2012. Environmental factors in causing human cancers: emphasis on tumorigenesis. *Tumor Biology* 2012 33:5. 33 (5). 1265–1274. doi: 10.1007/S13277-012-0413-4.
- Schluttenhofer, C., Yuan, L. 2017. Challenges towards Revitalizing Hemp: A Multifaceted Crop. *Trends in Plant Science*. 22 (11). 917–929. doi: 10.1016/J.TPLANTS.2017.08.004.
- Schultes, R., Joyce, C., Curry, S. H. 1970. Random thoughts and queries on the botany of cannabis. Undefined.
- Scott, K. A., Dalgleish, A. G., Liu, W. M. 2014. The combination of cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol enhances the anticancer effects of radiation in an orthotopic murine glioma model. *Molecular Cancer Therapeutics*. 13 (12). 2955–2967. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0402/361282/P/THE-COMBINATION-OF-CANNABIDIOL-AND-9.
- Scott, K. A., Dalgleish, A. G., Liu, W. M. 2017. Anticancer effects of phytocannabinoids used with chemotherapy in leukaemia cells can be improved by altering the sequence of their administration. *International Journal of Oncology*. 51 (1). 369–377. doi: 10.3892/IJO.2017.4022/HTML.
- Serafini, M., Peluso, I., Raguzzini, A. 2010. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*. 69 (3). 273–278. doi: 10.1017/S002966511000162X.
- Shrivastava, A., Kuzontkoski, P. M., Groopman, J. E., Prasad, A. 2011. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Molecular Cancer Therapeutics*. 10 (7). 1161–1172. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-1100/82957/AM/CANNABIDIOL-INDUCES-PROGRAMMED-CELL-DEATH-IN.
- Silbernagl, S., Despopoulos, A., Jandová, K., Langmeier, M., Kittnar, O., Kurišćák, Eduard., Mlčková, Pavla., Nedbalová, M., Riljak, V., Wittner, M. 2016. Atlas fyziologie člověka: překlad 8. německého vydání. . 448. Retrieved from [https://www.grada.cz/atlas-fyziologie-cloveka-\(1\)-8167/](https://www.grada.cz/atlas-fyziologie-cloveka-(1)-8167/)
- Singer, E., Judkins, J., Salomonis, N., Matlaf, L., Soteropoulos, P., McAllister, S., Soroceanu, L. 2015. Reactive oxygen species-mediated therapeutic response and resistance in glioblastoma. *Cell Death & Disease* 2015 6:1. 6 (1). e1601–e1601. doi: 10.1038/cddis.2014.566.
- Singh, V., Singh, R., Kujur, P. K., Singh, R. P. 2020. Combination of Resveratrol and Quercetin Causes Cell Growth Inhibition, DNA Damage, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Oral Cancer Cells. *ASSAY and Drug Development Technologies*. 18 (5). 226–238. doi: 10.1089/ADT.2020.972.

- Small, E. 2015. Evolution and Classification of *Cannabis sativa* (Marijuana, Hemp) in Relation to Human Utilization. *The Botanical Review* 2015 81:3. 81 (3). 189–294. doi: 10.1007/S12229-015-9157-3.
- Small, E., Cronquist, A. 1976. A PRACTICAL AND NATURAL TAXONOMY FOR CANNABIS\*. Source: *Taxon*. 25 (4). 405–435.
- Sommano, S. R., Chittasupho, C., Ruksiriwanich, W., Jantrawut, P. 2020. The Cannabis Terpenes. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 5792. 25 (24). 5792. doi: 10.3390/MOLECULES25245792.
- Song, H., Bao, J., Wei, Y., Chen, Y., Mao, X., Li, J., Yang, Z., Xue, Y. 2015. Kaempferol inhibits gastric cancer tumor growth: An in vitro and in vivo study. *Oncology Reports*. 33 (2). 868–874. doi: 10.3892/OR.2014.3662/HTML.
- Stintzing, S. 2014. Management of colorectal cancer. *F1000Prime Reports*. 6 . doi: 10.12703/P6-108.
- Storr, M., Devlin, S., Kaplan, G. G., Panaccione, R., Andrews, C. N. 2014. Cannabis use provides symptom relief in patients with inflammatory bowel disease but is associated with worse disease prognosis in patients with Crohn’s disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 20 (3). 472–480. doi: 10.1097/01.MIB.0000440982.79036.D6.
- Strouse, T. B. 2016. Cannabinoids in Medical Practice. *Cannabis and Cannabinoid Research*. 1 (1). 38. doi: 10.1089/CAN.2015.0010.
- Surendran, S., Qassadi, F., Surendran, G., Lilley, D., Heinrich, M. 2021. Myrcene—What Are the Potential Health Benefits of This Flavouring and Aroma Agent? *Frontiers in Nutrition*. 8 . 400. doi: 10.3389/FNUT.2021.699666/BIBTEX.
- Takeda, S., Yoshida, K., Nishimura, H., Harada, M., Okajima, S., Miyoshi, H., Okamoto, Y., Amamoto, T., Watanabe, K., Omiecinski, C. J., Aramaki, H. 2013.  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol disrupts estrogen-signaling through up-regulation of estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ). *Chemical Research in Toxicology*. 26 (7). 1073–1079. doi: 10.1021/TX4000446/ASSET/IMAGES/TX4000446.SOCIAL.JPEG\_V03.
- Tan, K. Y., Seow-Choen, F. 2007. Fiber and colorectal diseases: Separating fact from fiction. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 13 (31). 4161. doi: 10.3748/WJG.V13.I31.4161.
- Tang, K., Struik, P. C., Yin, X., Thouminot, C., Bjelková, M., Stramkale, V., Amaducci, S. 2016. Comparing hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars for dual-purpose production under contrasting environments. *Industrial Crops and Products*. 87 . 33–44. doi: 10.1016/J.INDCROP.2016.04.026.
- Tang, S. M., Deng, X. T., Zhou, J., Li, Q. P., Ge, X. X., Miao, L. 2020. Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 121 . 109604. doi: 10.1016/J.BIOPHA.2019.109604.
- Taura, F., Morimoto, S., Shoyama, Y. 1995. Cannabinerolic acid, a cannabinoid from *Cannabis sativa*. *Phytochemistry*. 39 (2). 457–458. doi: 10.1016/0031-9422(94)00887-Y.
- Tomko, A. M., Whynot, E. G., Ellis, L. D., Dupré, D. J. 2020. Anti-Cancer Potential of Cannabinoids, Terpenes, and Flavonoids Present in Cannabis. *Cancers* 2020, Vol. 12, Page 1985. 12 (7). 1985. doi: 10.3390/CANCERS12071985.
- Velíšek, J., Hajšlová, J. 2009. *Chemie potravin II*. Vol. 3. Tábor. OSSIS. p. 644. ISBN: 9788086659176.
- Wedman-St. Louis, B. 2018. *Cannabis - A Clinician’s Guide*. Boca Raton. CRC Press Taylor and Francis Group. p. 0–325. ISBN: 9781138303249.

- Wen, W., Alseikh, S., Fernie, A. R. 2020. Conservation and diversification of flavonoid metabolism in the plant kingdom. *Current Opinion in Plant Biology*. 55 . 100–108. doi: 10.1016/J.PBI.2020.04.004.
- Williamson, E. M., Evans, F. J. 2012. Cannabinoids in Clinical Practice. *Drugs* 2000 60:6. 60 (6). 1303–1314. doi: 10.2165/00003495-200060060-00005.
- Wingerchuk, D. 2004. Cannabis for medical purposes: cultivating science, weeding out the fiction. *The Lancet*. 364 (9431). 315–316. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16741-X.
- Xu, Y., Li, J., Zhao, J., Wang, W., Griffin, J., Li, Y., Bean, S., Tilley, M., Wang, D. 2021. Hempseed as a nutritious and healthy human food or animal feed source: a review. *International Journal of Food Science & Technology*. 56 (2). 530–543. doi: 10.1111/IJFS.14755.
- Yang, F., Jiang, X., Song, L., Wang, H., Mei, Z., Xu, Z., Xing, N. 2016. Quercetin inhibits angiogenesis through thrombospondin-1 upregulation to antagonize human prostate cancer PC-3 cell growth in vitro and in vivo. *Oncology Reports*. 35 (3). 1602–1610. doi: 10.3892/OR.2015.4481/HTML.
- Youn, H. S., Jeong, J. C., Jeong, Y. S., Kim, E. J., Um, S. J. 2013. Quercetin Potentiates Apoptosis by Inhibiting Nuclear Factor-kappaB Signaling in H460 Lung Cancer Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 36 (6). 944–951. doi: 10.1248/BPB.B12-01004.
- Young, G. P. 2000. Colorectal disorders: A dietary management perspective. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 9 (S1). S76–S82. doi: 10.1046/J.1440-6047.2000.00178.X.
- Zámečník, J. 2019. *Patologie*. 1st ed. Praha. PRAGER PUBLISHING. ISBN: 978-80-270-6457-1. Retrieved from <https://ucebnice-patologie.cz/produkt/patologie/>
- Zhang, Q., Chen, X., Guo, H., Trindade, L. M., Salentijn, E. M. J., Guo, R., Guo, M., Xu, Y., Yang, M. 2018. Latitudinal adaptation and genetic insights into the origins of cannabis sativa L. *Frontiers in Plant Science*. 871 . 1876. doi: 10.3389/FPLS.2018.01876/BIBTEX.
- Zhu, L., Xue, L. 2019. Kaempferol Suppresses Proliferation and Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis, and DNA Damage in Breast Cancer Cells. *Oncology Research*. 27 (6). 629. doi: 10.3727/096504018X15228018559434.
- Zhu, Y., Jiang, Y., Shi, L., Du, L., Xu, X., Wang, E., Sun, Y., Guo, X., Zou, B., Wang, H., Wang, C., Sun, L., Zhen, Y. 2017. 7-O-Geranylquercetin induces apoptosis in gastric cancer cells via ROS-MAPK mediated mitochondrial signaling pathway activation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 87 . 527–538. doi: 10.1016/J.BIOPHA.2016.12.095.

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

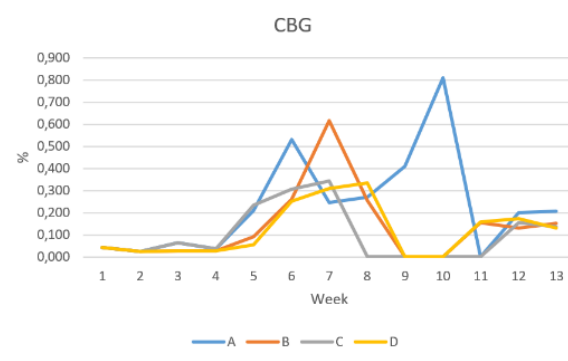
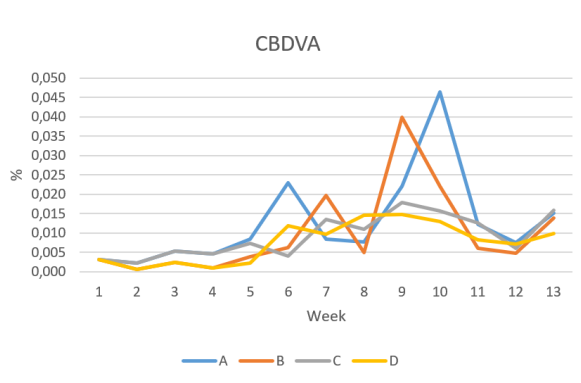
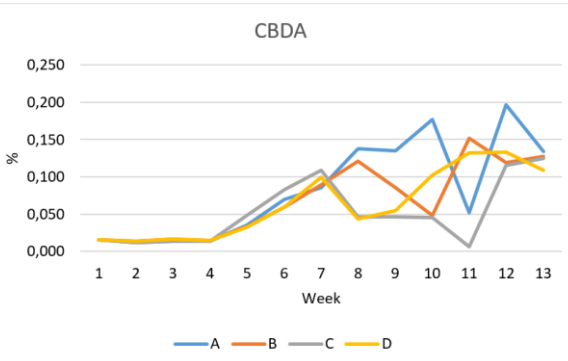
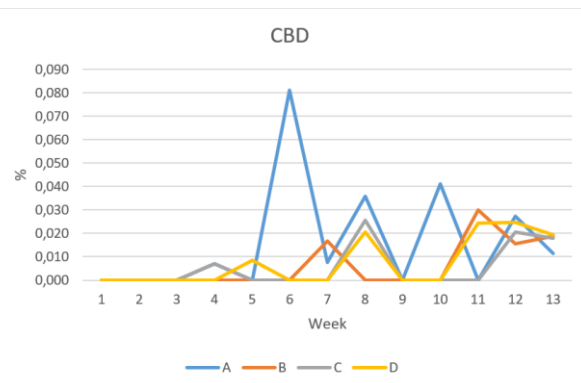
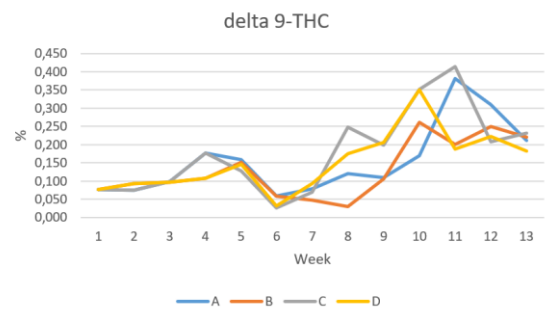
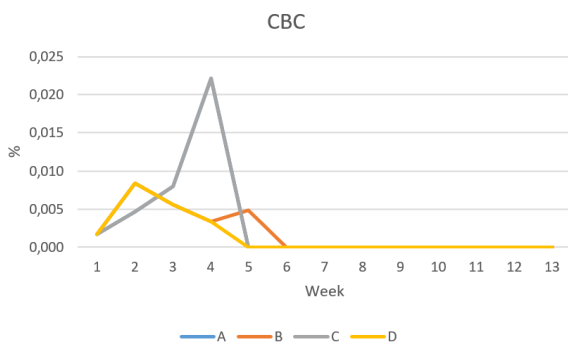
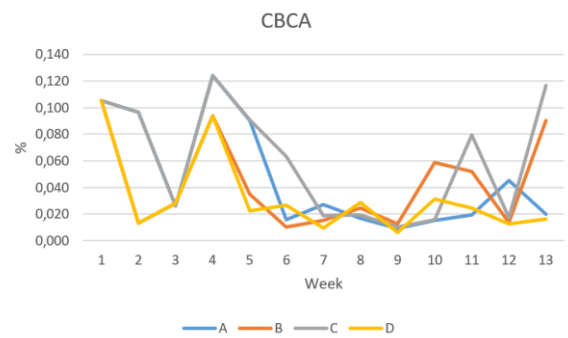
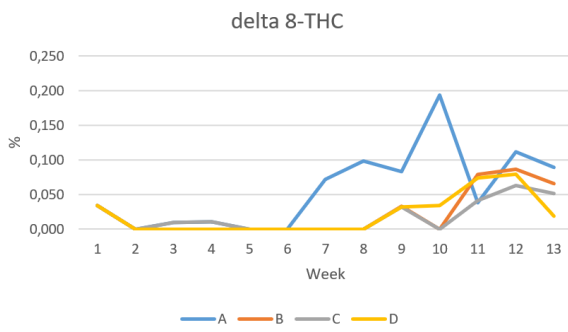
5-FU 5-fluoroacil  
ANOVA Analýza rozptylu  
ATCC American Type Culture Collection  
CAT kataláza  
CBC Kanabichromen  
CBD Kanabinodil  
CBDA Kanabidiolová kyselina  
CBDVA Kanabidivarinová kyselina  
CBG Kanabigerol  
CBGA Kanabigerolová kyselina  
CBNA Kanabinolová kyselina  
CCH Chrohnova choroba  
COX-2 Prostaglandin-endoperoxid syntáza-2  
DMSO Dimethylsufoxid  
ECACC European Collection of Cell Culture  
EMEM Eagle's Minimum Essential Medium  
EtOH Etanol  
FBS Fetální bovinní sérum  
GIT Gastrointestinální trakt  
GPx glutathionperoxidáza  
HPLC-DAD Kapalná chromatografie s detektorem diodového pole  
IC<sub>50</sub> Inhibiční koncentrace, množství potřebné k inhibici 50 % buněk  
MAP Mitogen aktivovaná proteinkináza  
MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid  
NTP Národní toxikologický program  
PBS Fosfátový pufr  
PCA Metoda hlavních komponent  
PPAR- $\gamma$  Receptor aktivovaný peroxisomovým proliferátorem  
ROS Reaktivní forma kyslíku  
SD Směrodatná odchylka  
SOD superoxiddismutáza  
THC Tetrahydrokanabinol  
THCA Tetrahydrokanabinolová kyselina  
THCVA Tetrahydrokanabivarinová kyselina  
 $\Delta$ 8-THC Delta-8-tetrahydrokanabinol  
 $\Delta$ 9-THC Delta-9-tetrahydrokanabinol



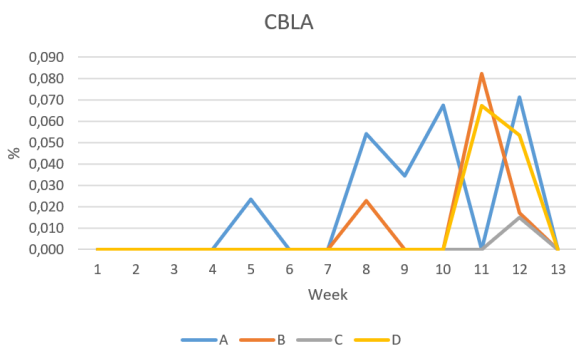
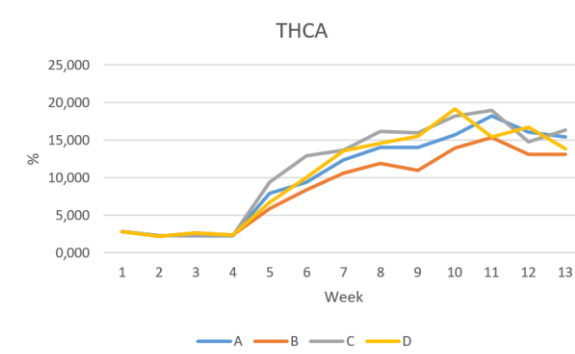
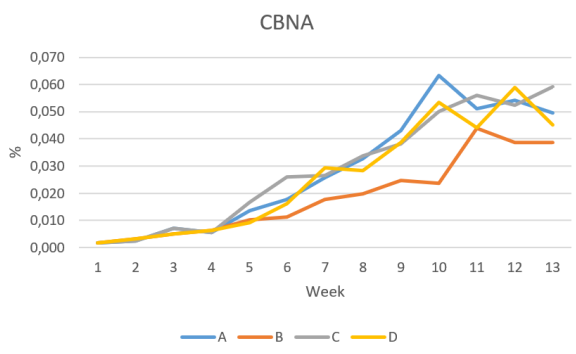
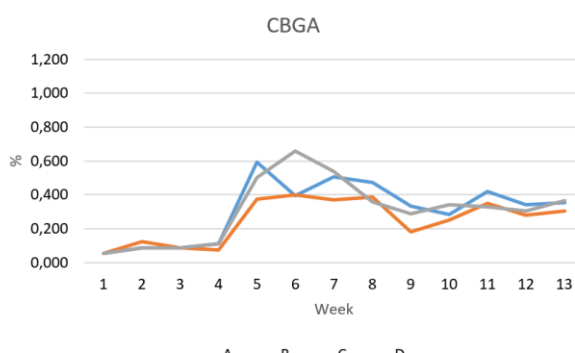
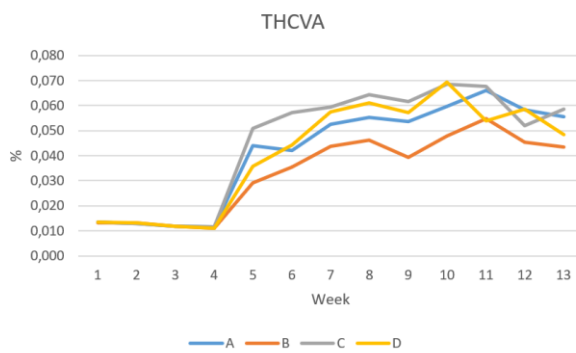


# 10 Samostatné přílohy

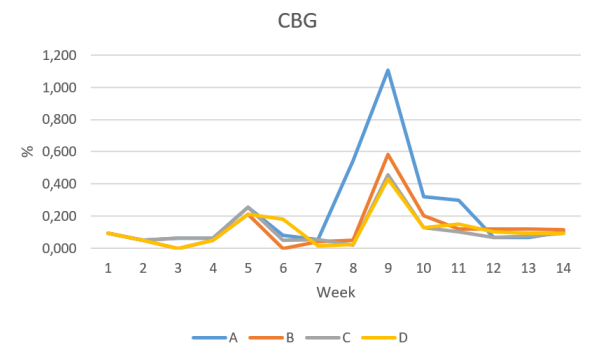
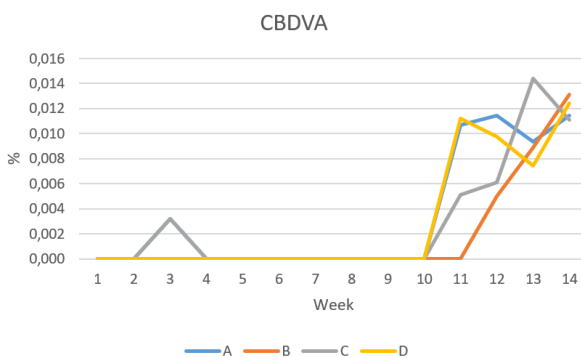
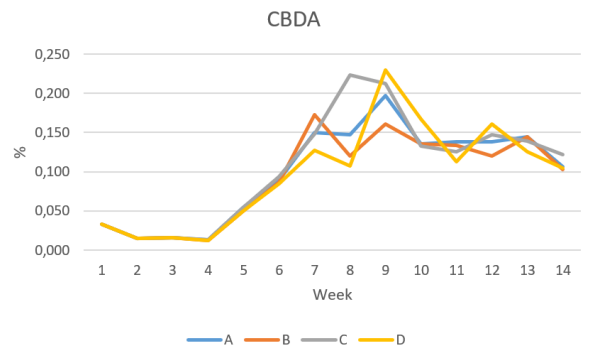
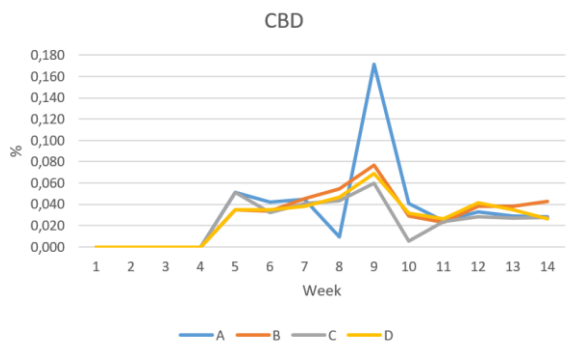
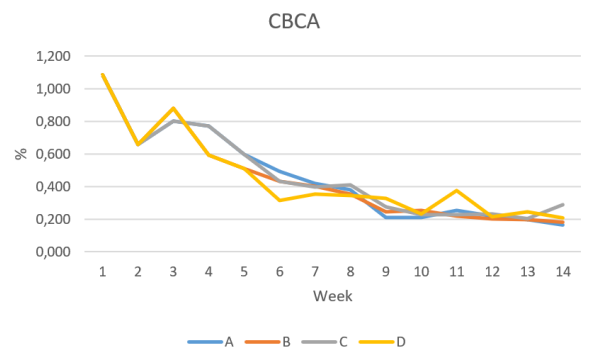
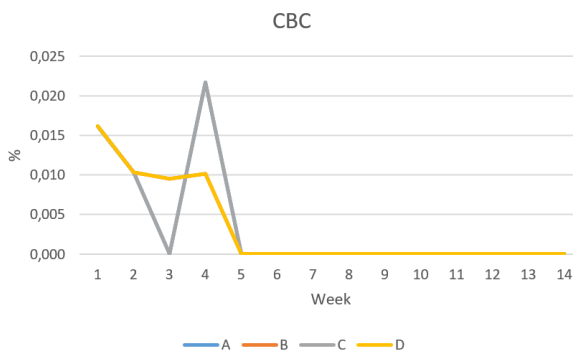
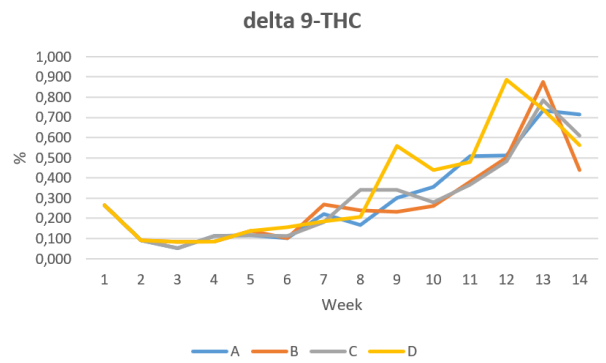
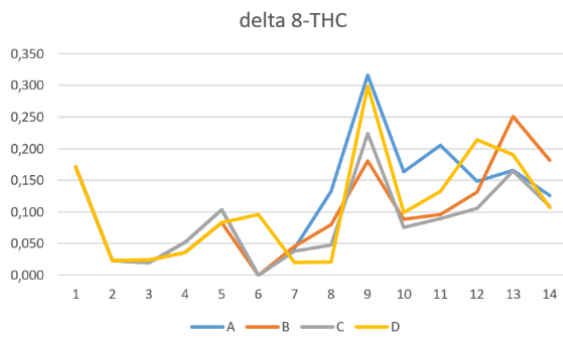
## Příloha 1: Obsahy kanabinoidů při různých hnojeních (1. a 2. cyklus)



## Příloha 1: pokračování



## Příloha 1: pokračování



## Příloha 1: pokračování

