

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Antioxidační a protizánětlivé aktivity extraktu *Cannabis
spp.***

Diplomová práce

Bc. Karolína Fišerová

Výživa a potraviny

Ing. Ivo Doskočil, Ph.D

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Antioxidační a protizánětlivé aktivity *Cannabis spp.*" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D za cenné rady, trpělivost při konzultacích a čas, který mi věnoval. Dále bych ráda poděkovala Katedře agroenvironmentální chemie a výživy rostlin za podklady k mé diplomové práci. V neposlední řadě patří veliké poděkování mé rodině a přátelům za podporu.

Antioxidační a protizánětlivé aktivity extraktu *Cannabis spp.*

Souhrn

Antioxidační a protizánětlivá aktivita látek jsou důležité vlastnosti nezbytné pro zachování zdraví a prevenci řady onemocnění. Jedním ze zdrojů, kde lze takové látky najít, může být konopí. Konopí obsahuje řadu biologicky aktivních sloučenin, mezi které patří například kanabinoidy, flavonoidy, terpeny či fenoly. K významným účinkům této rostliny lze zařadit pozitivní vliv na imunitní reakce, snižování oxidačního stresu, antikancerogenní účinky či snížení počtu záchvatů u pacientů s těžkou epilepsií.

Cílem práce bylo stanovit schopnost inhibovat produkci NO v deseti různých extraktech konopí setého (*Cannabis sativa*) na buněčné linii RAW264.7. Rostliny byly pěstovány v rozdílných podmínkách hnojení a sklizeny v 8. a 9. týdnu generativní fáze. Následně byly z jednotlivých rostlin připravené etanolové (EtOH) extrakty, uzpůsobené na konečnou koncentraci 10 mg/ml.

V extraktu byl stanoven celkový obsah fenolových sloučenin pomocí metody TPC (Total phenolic content) a dále bylo provedeno stanovení produkce oxidu dusnatého (NO) na myších makrofázích buněčné linie RAW264.7, které byly stimulovány pomocí lipopolysacharidů, společně s testem toxicity pro stanovení bezpečné koncentrace pro makrofágy.

U metody TPC bylo největší množství fenolových látek v etanolovém vzorku z konopí s hodnotami $116,74 \pm 2,88$ mg GAE/ml extraktu. Naopak nejmenší množství bylo s hodnotami $53,17 \pm 4,09$ mg GAE/ml.

Výsledky metody inhibice produkce NO na RAW264.7 buňkách byly nejlepší při nejvyšší koncentraci 50 μ g/ml. Hodnoty inhibice zde dosahovaly 62,65 %. S poklesem koncentrace docházelo i k poklesu schopnosti extraktu snižovat produkci NO. Současně byla tato koncentrace bezpečná pro buněčnou linii a nesnižovala životaschopnost pod 95 %.

Námi testované vzorky mají schopnost snižovat produkci NO jako jednoho z markerů zánětů. A bylo by vhodné tyto vzorky podrobit dalšímu testování na schopnost inhibovat cytokiny, jako jsou interleukiny, případně tumor nekrozní faktor.

Klíčová slova: Cannabis spp.; TPC; inhibice oxidu dusnatého; protizánětlivá aktivita; RAW264.7

Antioxidant and anti-inflammatory activities of Cannabis spp. extract

Summary

The antioxidant and anti-inflammatory activity of substances are important properties essential for maintaining health and preventing diseases. One of the sources where such substances can be found is cannabis. Cannabis contains a range of biologically active compounds, which include cannabinoids, flavonoids, terpenes and phenols. Significant benefits of this plant are its positive effect on immune reactions, reduction of oxidative stress, anti-carcinogenic effects and reduction of seizures in patients with severe epilepsy.

The goal of this study was to determine the ability to inhibit NO production of ten different extracts of Cannabis sativa on the cell line RAW264.7. Plants were grown under different fertilizing conditions and they were harvested at the 8th and 9th week of the generative phase. Subsequently, ethanolic (EtOH) extracts were prepared from each plant to a final concentration of 10 mg/ml.

The total phenolic compound content of the extract was determined using the total phenolic content (TPC) method, and furthermore, nitric oxide (NO) production was determined on mouse macrophages of the RAW264.7 cell line stimulated with lipopolysaccharides, along with a toxicity test to determine the safe concentration for macrophages.

For the TPC method, the highest amount of phenolic compounds was in ethanol sample with values of $116,74 \pm 2,88$ mg GAE/ml of extract whereas the lowest amount was in sample with values of $53,17 \pm 4,09$ mg GAE/ml.

The results of NO production inhibition method on RAW264.7 cells were best at the highest concentration of 50 μ g/ml. The inhibition values here reached 62,65 %. As the concentration decreased, the ability of the extract to reduce NO production also decreased. At the same time, this concentration was safe for the cell line and it did not reduce the viability below 95 %.

The tested samples have the ability to reduce NO production as one of the markers of inflammations. And it would be appropriate to subject these samples to further testing for their ability to inhibit cytokines such as interleukins or tumor necrosis factor.

Keywords: Cannabis spp.; TPC; nitric oxide inhibition; anti-inflammatory activity; RAW264.7

Obsah

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3	Teoretická část	10
3.1	Volné radikály, oxidační stres a antioxidanty	10
3.1.1	Antioxidační ochrana organismu.....	10
3.2	Oxidační stres a jeho patofyziologie	11
3.2.1	Parkinsonova choroba	11
3.2.2	Epilepsie	12
3.2.3	Nádorové onemocnění.....	12
3.2.4	Oxidační stres a zánět.....	13
3.3	Zánět a imunita	14
3.3.1	Imunitní systém	14
3.3.2	Zánět: fyziologická reakce těla na poškození.....	15
3.4	Protizánětlivá aktivita konopí a jeho ochrana před nemocemi	15
3.4.1	Crohnova choroba	16
3.4.2	Roztroušená skleróza.....	17
3.5	Konopí (Cannabis spp)	17
3.5.1	Botanika konopí	17
3.5.2	Historie konopí	18
3.5.3	Legislativa konopí	19
3.6	Látky v konopí s antioxidační a protizánětlivou aktivitou	19
3.6.1	Kanabinoidy	19
3.6.2	Endokanabiodní systém ECS a jeho receptory.....	20
3.6.3	Tetrahydrokanabinol THC	21
3.6.4	Kanabidiol CBD	22
3.6.5	THCA	22
3.6.6	Terpeny v konopí.....	23
3.6.7	Limonen.....	23
3.6.8	Pinen.....	24
3.6.9	Myrcen.....	25
3.6.10	Karyofylen.....	25
3.6.11	Fenolické sloučeniny.....	26
3.6.12	Alkaloidy	27
4	Metodika	28
4.1	Rostlinný materiál	28
4.2	Ostatní materiál	28
4.3	In vitro antioxidační testy	28

4.3.1	TPC – stanovení celkových fenolických sloučenin.....	28
4.4	<i>In vitro</i> stanovení protizánětlivé aktivity	29
4.4.1	Kultivace makrofágů buněčné linie RAW 264.7	29
4.4.2	Inhibice oxidu dusnatého.....	29
4.4.3	Test cytotoxicity (MTT)	29
4.5	Statistické vyhodnocení	29
5	Výsledky	30
5.1	Výsledky stanovené metodou TPC	30
5.2	Výsledky stanovení produkce NO a cytotoxicity (MTT).....	30
6	Diskuze	32
7	Závěr	35
8	Literatura.....	36
9	Seznam použitých zkratk.....	44
10	Seznam obrázků a tabulek	45

1 Úvod

Volné radikály jsou jedním z faktorů, jež přispívají ke vzniku oxidačního stresu, který je spojován s celou řadou onemocnění. Příkladem takových chorob mohou být neurodegenerativní onemocnění, jako jsou Parkinsonova či Alzheimerova nemoc, případně jiné chronické choroby včetně zánětů nebo nádorová onemocnění. Volné radikály mají také významný vliv na stárnutí organismu (Halliwell & Gutteridge 2015). Antioxidační a protizánětlivé účinky, obsažené v rostlinných extraktech, by mohly mít potenciálně příznivý efekt na ochranu proti oxidačnímu stresu a potlačení či snížení zánětlivé reakce v těle. Mezi extrakty s těmito účinky lze zařadit i extrakty z konopí, které obsahují řadu biologicky aktivních látek. Nejznámější skupinou biologicky aktivních látek obsažených v konopí jsou kanabinoidy (Zielonka et al. 2020). Konkrétním zástupcem kanabinoidů je například THC, které je známo především pro své psychotropní účinky, nicméně konopí obsahuje i mnoho dalších látek, které nevykazují omamné efekty. Mezi známé kanabinoidy bez psychotropních účinků patří například CBD. Dalšími biologicky aktivními látkami jsou terpeny, jako třeba limonen, pinen, myrcen, alkaloidy či flavonoidy (Chandra et al. 2017; Zielonka et al. 2020). Všechny zmíněné látky vykazují uvedené antioxidační a protizánětlivé účinky a byl u nich zjištěn pozitivní vliv na metabolismus a schopnost být určitým preventivním prvkem před oxidačním stresem. Nejen z tohoto důvodu se v poslední době konopné výrobky těší velké oblibě. Tyto extrakty lze využít ve farmacii, potravinářství i kosmetice. Konkrétně se vyrábějí nejrůznější oleje, krémy či pochutiny. Konopí lze sehnat i v podobě kapslí s velkým obsahem CBD. Kapsle se doporučují na spánek nebo relaxaci. Výrobky s obsahem CBD jsou na rozdíl od výrobků s obsahem THC v ČR legální (Landa et al. 2020).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Stupeň zralosti Cannabis spp. má výrazný vliv na antioxidační a protizánětlivou aktivitu testovaných extraktů.

Cíl práce: Cílem je stanovit antioxidační a protizánětlivou aktivitu extraktů Cannabis spp. sklizených v rozdílném stupni zralosti a stanovit neoptimálnější zralost pro jejich další využití.

3 Teoretická část

3.1 Volné radikály, oxidační stres a antioxidanty

Volné radikály (VR) jsou vysoce reaktivní molekuly, atom či iont většinou s jedním nepárovým elektronem ve valenčním obalu. Mají schopnost samostatné existence. Během svého působení dokáží VR vyvolat řetězovou reakci tvorby dalších VR (Halliwell & Gutteridge 2015). VR rozdělujeme na dvě základní formy, a to volné kyslíkové radikály (Reactive oxygen species; ROS) a volné dusíkové radikály (Reactive nitrogen species; RNS) (Kabel 2014). Řadu let jim je přikládán význam během procesu stárnutí (Warraich et al. 2020), ale také při řadě dalších biologických procesů. Mezi tyto procesy můžeme zařadit oxidační fosforylaci v mitochondriích, buněčnou signalizaci, fagocytózu a mnoho dalších základních procesů v organismu. Na těchto biologických pochodech se podílejí enzymy, jako je oxidáza, cyklooxygenáza a další, které katalyzují vznik VR. Tyto volné radikály jsou endogenního původu (Halliwell & Gutteridge 2015; Vitolo 2019).

Endogenní formy ROS jsou součástí dýchacího řetězce, kdy při oxidaci vzdušným kyslíkem vzniká energie a spolu s ní vznikají i VR, především superoxidové ($\bullet\text{O}_2^-$) a hydroxylové ($\text{HO}\bullet$). Endogenní formy ROS vznikají také při metabolismu nasycených mastných kyselin, kdy spolu s biologicky významnými látkami (prostanoidy, leukotrieny), vznikají také rizikové peroxidy ($\text{ROO}\bullet$) (Halliwell & Gutteridge 2015). Významným zástupcem endogenní RNS je oxid dusnatý ($\text{NO}\bullet$) (Raju et al. 2015). Tuto molekulu si organismus syntetizuje sám pomocí specifických enzymů nazývaných NO-synthasy (NOS). Enzymy oxidují arginin na citrulin a dochází k uvolnění NO, který za fyziologických okolností plní v organismu více funkcí. Například může regulovat cévní tonus, tím způsobuje uvolňování hladkých svalů v cévách. Uvolněním svalů v cévách se zvýší průtok krve a tak dochází k optimálnímu zásobování tkání živinami a kyslíkem. V neposlední řadě NO hraje důležitou roli v imunitním systému například tím, že díky svému antimikrobiálnímu účinku zabíjí cizí patogeny (bakterie, viry a houby) (Halliwell & Gutteridge 2015). Na druhou stranu ke zvýšení produkce NO dochází i u řady patologických stavů, jako jsou neurodegenerativní onemocnění či záněty. Proto může být NO brán jako marker buněčného zánětu (Vitolo 2019). Dalším významným zástupcem RNS je peroxonitrit (ONOO^-). Tento reaktivní oxidant vzniká z vysokých koncentrací NO a O_2^- při zánětlivých procesech či infekcích. ONOO^- je toxický a v těle může poškodit DNA, proteiny i lipidy nebo vést k produkci dalších reaktivních sloučenin (Macášek et al. 2011; Ahmad et al. 2019).

Další možností je, že volné radikály vznikají v důsledku vnějších vlivů a jsou exogenního původu. Sem patří například oxid dusičitý ($\text{NO}_2\bullet$). Vyskytují se ve znečištěném prostředí, zvláště z výfukových plynů spalovacích motorů. Dalším zdrojem exogenních volných radikálů je UV záření (Halliwell & Gutteridge 2015; Vitolo 2019).

Ačkoli jsou oxidační reakce pro život klíčové, působení VR v organismu je nebezpečné, protože mohou reagovat s molekulami buněk a poškozovat je (Kabel 2014). Aby se zabránilo tomuto poškození, jsou v organismu přítomny antioxidanty, které jsou současně přijímány i stravou (Halliwell & Gutteridge 2015).

3.1.1 Antioxidační ochrana organismu

Mezi antioxidanty řadíme látky se schopností vyvažovat ROS nebo RNS, případně nepřímo působit a regulovat tak antioxidační ochranu (Kabel 2014). Antioxidanty lze podobně

jako VR dělit na endogenní a exogenní. Mezi endogenní patří například superoxidizmutáza SOD, která je katalyzátorem přeměny superoxidu na peroxid vodíku (Neha et al. 2019). Dalším důležitým enzymem je kataláza, která se nachází například v červených krvinkách a rozkládá vniklý peroxid vodíku na vodu a kyslík. Glutathionperoxidáza a peroxiredonin jsou v součinnosti s ostatními enzymy a také katalyzují peroxid vodíku na vodu a kyslík (Halliwell & Gutteridge 2015; Vitolo 2019). Komplexace kovů je ochranný proces, při kterém specializovaná bílkovina dokáže navázat kov a vytvořit s ním stabilní komplex. Příkladem takové vazby je transferin, který váže železo v krevní plazmě a bezpečně ho transportuje do místa metabolických procesů, kde je potřeba (Halliwell & Gutteridge 2015; Papas 2019). Pokud by železo (nebo jiný potřebný kov) nebylo takto vázáno, hrozil by vznik radikálů (Halliwell & Gutteridge 2015). Dalším mechanismem jsou antioxidační substráty, mezi které patří jak endogenní antioxidanty, jako je například bilirubin, tak i exogenní antioxidanty obsažené v potravinách, jako jsou například vitaminy C a E, karotenoidy, flavonoidy či kanabinoidy (Kabel 2014; Halliwell & Gutteridge 2015). Jako antioxidační ochrana slouží také obnovovací enzymy (lipáza, proteáza), které nahrazují a obnovují poškozené membrány (Vitolo 2019).

Mezi antioxidanty exogenního původu patří většinou sekundární metabolity rostlin, které u nich způsobují typické zbarvení a chuť. Největší zastoupení těchto antioxidantů v potravě představují rostlinné fenolové sloučeniny, které mají schopnost vyvazovat ROS a RNS (Halliwell & Gutteridge 2015). V případě, že je nedostatek antioxidantů v potravě, může docházet k hromadění volných radikálů a ke vzniku oxidačního stresu, který má negativní vliv na lidské zdraví (Kabel 2014; Halliwell & Gutteridge 2015).

3.2 Oxidační stres a jeho patofyziologie

V důsledku hromadění volných radikálů dochází ke vzniku takzvaného oxidačního stresu (Halliwell & Gutteridge 2015). Je známo, že se oxidační stres podílí na celé řadě onemocnění, kde může být i primární příčinou vzniku (Neha et al. 2019). Například u aterosklerózy je oxidační stres hlavním rizikovým faktorem pro vznik tohoto onemocnění (Kattoor et al. 2017). Současně však ROS i RNS mohou vznikat jako důsledek onemocnění, při kterém dochází k nadprodukci těchto látek (Halliwell & Gutteridge 2015). Je známo, že ROS a RNS hrají významnou úlohu v patologii řady onemocnění, jako jsou různé kardiovaskulární choroby, Parkinsonova choroba, epilepsie či nádorové onemocnění (Aguiar et al. 2012; Blesa et al. 2015; Hayes et al. 2020).

3.2.1 Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba je neurodegenerativní onemocnění postihující centrální nervovou soustavu. Souvisí s úbytkem nervových buněk v mozku, především v jádrech *substantia nigra* (Velayundhan et al. 2014; Halliwell & Gutteridge 2015). Tyto mozkové buňky produkují neurotransmitter dopamin, který zajišťuje přenos signálu a je důležitý pro kontrolu pohybu a koordinaci. Pokud buňky ubývají, pacient začne být ztuhlý, zpomalí se pohyb, případně se objeví klidový třes, poruchy držení těla a špatná stabilita stoje (Večlová et al. 2012).

Přesné mechanismy vzniku nemoci a ubývání buněk zatím nejsou zcela popsány, ale předpokládá se, že důležitou roli hraje špatná funkce enzymů dýchacího řetězce. Špatná funkce vede k nadměrné produkci ROS, což negativně působí na dopaminergní systém v těle (Blesa et al. 2015). Klasická medikace, tedy antiparsonika, nahrazují chybějící dopamin, čímž se potlačí příznaky. Pokračování nemoci se ale nezastaví, tudíž vznikají pozdní psychické

a pohybové komplikace nemoci. Antiparsonika navíc mohou mít četné vedlejší účinky, a proto se vyvíjí velká snaha o objevení nového léku (Večlová et al. 2012).

Figura et al. (2022) shrnuje poznatky studií o vlivu konopí na Parkinsonovu chorobu. Bylo zjištěno, že pacienti trpící touto chorobou, kteří jsou zároveň uživateli konopí, často hlásí pozitivní účinky. Mezi tyto účinky se řadí například snížení bolesti, zlepšení spánku, zlepšení nálady či snížení třesu. Na druhou stranu klinické studie zatím jednoznačně neprokázaly účinky konopí na symptomy Parkinsonovy choroby. Nebylo tak doposud jasně dosaženo konsensu v otázce, zda je konopí účinné a bezpečné pro pacienty trpící touto chorobou. Je tedy třeba vést další výzkumy, aby bylo možné účinnost potvrdit a případně určit způsob bezpečného dávkování (Bougea et al. 2020).

3.2.2 Epilepsie

Epilepsie je neurologické, chronické onemocnění, jehož projevem jsou opakující se záchvaty, které jsou způsobené poruchou elektrické aktivity v mozku (Reddy & Golub 2016).

Projevy mohou být od mírných záškubů po závažné záchvaty, které v extrémním případě, kvůli možné zástavě dýchání, mohou končit smrtí (Ošlejšková 2008; Devinsky et al. 2017). Faktorů způsobujících epilepsii je více, jako například vrozené genetické predispozice, traumata mozku, infekce, nádory či abnormality v mozku (Fisher et al. 2014). Tyto faktory mohou mít mimo jiné vliv na špatnou funkci mitochondrií, která může být příčinou vzniku VR. Vznik VR může způsobit abnormální neuronovou aktivitu, ta se projevuje například epileptickými záchvaty. Na druhou stranu epilepsie může také zvýšit oxidativní stres s poškodit buňky (Aguiar et al. 2012). V konzervativní terapii je nejvíce využívána farmakoterapie antiepileptiky, která pomáhá kontrolovat a snižovat počet záchvatů. U části pacientů, kteří trpí těžkou formou epilepsie dostupná farmaka nezabírají (Ošlejšková 2008; Devinsky et al. 2017). Devinsky et al. (2016) publikovali intervenční studii, kde bylo zahrnuto 214 pacientů s těžkými formami epilepsie. Užívali CBD v dávce 2-5 mg/kg/den po dobu 12 týdnů. Primárním cílem bylo hodnotit, zda dojde ke snížení frekvence epileptických záchvatů. Výsledkem této studie bylo, že 36,5 % pacientů dosáhlo snížení motorických záchvatů a u 9 % pacientů došlo k redukci záchvatů až z 90 %. O rok později proběhla dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná studie, kde bylo náhodně vybráno 120 dětí a mladých dospělých s Dravetovým syndromem. Toto onemocnění způsobuje těžké epileptické záchvaty a pacienti obvykle neodpovídají dobře na tradiční antiepileptické léky. Vybraným pacientům bylo po dobu 14 dnů podáváno CBD v množství 20 mg/kg/den, druhá skupina dostávala placebo. Výsledky ukázaly, že pacienti, kteří dostávali CBD, měli v průměru 38,9 % snížení počtu záchvatů oproti 13,3 % u placebem kontrolované skupiny (Devinsky et al. 2017).

3.2.3 Nádorové onemocnění

Nádorové onemocnění je různorodá skupina chorob, při kterých dochází ke ztrátě kontroly buněčného dělení a růstu. Za normálních okolností jsou buňky schopny svou mutaci detekovat a opravit, nebo samy sebe zničit apoptózou (Almeida & Barry 2011). Při tomto onemocnění se některá populace vlastních buněk organismu začne nekontrolovatelně množit a vytvářet nové tkáně. Tyto nově vytvořené tkáně mohou být benigní (nezhoubné), nebo maligní (zhoubné), což je závislé na tom, jestli se dokáží šířit do okolních tkání a zda mohou být přenášeny na jiná místa v těle a tvořit tzv. metastáze (Almeida & Barry 2011; Halliwell & Gutteridge 2015).

Jednou z nejběžnějších léčebných metod je chirurgická léčba. Tuto metodu nelze použít, pokud se nádorové onemocnění již rozšířilo do dalších částí těla (Breugom et al. 2015). Mezi další postupy léčby nádorového onemocnění patří radioterapie, což je vysokofrekvenční záření, kterému se vystaví nádor a které má zastavit růst a dělení napadených buněk. Novější metodu představuje imunoterapie, kdy dochází ke stimulaci imunitního systému (Formenti & Demaria 2013; Halliwell & Gutteridge 2015). Dalším nástrojem v boji proti nádorovému onemocnění může být chemoterapie. Tato léčba obsahuje léky, které postihují všechny rychle se dělící buňky. Buňky nádoru nejsou schopné se z postižení tak efektivně vzpamatovat jako buňky zdravé, což je princip efektu chemoterapie. Tento fakt s sebou bohužel nese rozsáhlé vedlejší účinky, mezi které patří: nevolnost, zvracení, únava, snížená chuť k jídlu, časté vypadávání vlasů, zvýšená náchylnost k infekcím, krvácení atd (Halliwell & Gutteridge 2015).

Jedním z alternativních způsobů léčení nádorového onemocnění by mohlo být i léčení pomocí konopí. Shrivastava et al. (2011) uskutečnili *in vitro* studii, která se zaměřila na vliv kanabinoidu CBD na buněčnou smrt v buněčné linii lidského karcinomu prsu. Byly použity koncentrace od 0-10 mmol/L. Konkrétně se ukázalo, že se stoupající koncentrací CBD dochází k nárůstu apoptózy a autofagie a klesá životaschopnost nádorových buněk.

Kromě ovlivňování buněčných procesů podporujících antikancerogenní účinky se kanabinoidy jeví jako účinné při snižování bolesti, zvracení a nevolností, spojených s konvenčními léčebnými postupy, jako je chemoterapie (Velasco et al 2016). Příčiny vzniku nádorového onemocnění mohou být různorodé. Mezi jedny z nejčastěji uvažovaných příčin patří například genetické faktory nebo nezdravý životní styl (Blackadar 2016). Určitý vliv na vznik nádorového onemocnění mohou mít karcinogenní látky v ovzduší, vodě a potravě. Mezi tyto látky lze zařadit polycyklické aromatické uhlovodíky, které se tvoří například při spalování fosilních paliv či kouření (Rangarajan et al. 2015). K rizikovým faktorům lze také zařadit dlouhodobou expozici slunečnímu záření bez ochranných prostředků a opakovaná spálení kůže (Blackadar 2016). V neposlední řadě i některé typy zánětu jsou rizikovým faktorem nádorového onemocnění. Činitelé a nemoci, které způsobují chronický zánět a predispozici k nádorovému onemocnění, zahrnují například ulcerózní kolitidu, záněty jícnu či záněty žlučových cest (Halliwell & Gutteridge 2015; Blackadar 2016).

3.2.4 Oxidační stres a zánět

Oxidační stres je se zánětem propojen a mohou se navzájem ovlivňovat. Patofyziologie zánětu je příznačná tím, že při ní dochází k infiltraci různých imunitních buněk (monocyty, makrofágy...) do tkání, podle místa a druhu zánětu (Chatterjee 2016; Dunders 2020). Imunitní buňky ve tkáních poté produkují ROS, pomocí kterých bojují s patogeny. Při nadbytku opět může docházet k přímému vzniku oxidačního stresu (Chatterjee 2016). Produkované ROS poté mohou aktivovat zánětlivé dráhy, kvůli kterým dojde k aktivaci prozánětlivých buněk (cytokinů, chemokinů), které přitahují další imunitní buňky do místa zánětu. K tomuto procesu dochází kvůli ochraně organismu proti infekcím a zánětu. Ovšem při nadměrné aktivaci těchto prozánětlivých drah a z toho plynoucí nadměrné produkci prozánětlivých buněk může dojít k poškození organismu, snížení imunity a tvorbě chorob a zánětů (Behm et al. 2011; Novotná & Novák 2012; Chatterjee 2016).

3.3 Zánět a imunita

3.3.1 Imunitní systém

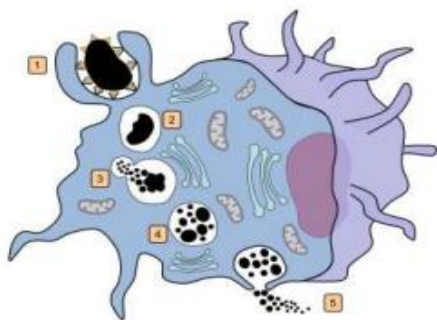
Imunitní systém je souborem buněčných mechanismů, které zajišťují integritu organismu a napomáhají k rozeznávání a likvidaci potenciálně škodlivých cizích patogenů, mezi které patří viry, bakterie a plísně (Kumar et al. 2021). Organismus je imunitním systémem chráněn i před vlastními nežádoucími buňkami, mezi které patří například nádorové buňky a buňky s genetickými mutacemi. Tento mechanismus se nazývá autoimunita. Pokud se organismus musí bránit před patogeny, dojde k imunitní odpovědi, která má dva odlišné rysy: vrozený a adaptivní (Ferenčík et al. 2011; Dunders 2020).

Vrozená imunita je první reakcí těla na patogen. Jedná se o nespecifickou a rychlou reakci. Mezi složky vrozené imunity patří kůže, sliznice a další buňky, které tvoří první obrannou linii (Ferenčík et al. 2011). Pokud patogen překoná tuto obranu a dostane se do organismu, imunitní systém spustí další obranné mechanismy, mezi které patří buňky imunitního systému jako granulocyty (neutrofilní, bazofilní a eozinofilní), monocyty a tkáňové makrofágy, dendritické buňky a NK (natural killer cells) (Kumar et al. 2021).

Funkce neutrofilních granulocytů je především fagocytóza cizorodých částic. Bazofilní granulocyty obsahují heparin a histamin, což jsou látky uplatňující se především při zánětu. Bazofilní granulocyty jsou také schopné fagocytovat. Eozinofilní granulocyty se uplatňují zejména při obraně proti různým parazitickým prvokům, ploštěncům a hlístům, stejně jako předešlé granulocyty mají schopnost fagocytózy. Monocyty jsou označovány jako „profesionální fagocyty“. Makrofágy také fagocytují a stejně jako dendritické buňky spolupracují s adaptivní imunitou, pomáhají aktivovat imunitní odpověď. NK buňky jsou schopny rozpoznat a zabít infikované buňky. To lze uplatnit například proti infekcím (Kočárek 2010; Patel et al. 2021). Fagocytóza je základním obranným mechanismem, které tyto buňky využívají (Obrázek 1). Jedná se o schopnost pohlcovat cizorodé částice, mikroby či poškozené buňky (Ferenčík et al. 2011; Kumar et al. 2021).

Imunitní systém funguje jako celek. Jeho porucha může být v některých případech doprovázena zánětem (Ferenčík et al. 2011; Kumar et al. 2021).

Adaptivní neboli specifická imunita se vyvíjí v průběhu života jedince. Tato imunita je specifická vůči určitým patogenům a má paměťovou funkci. Patogen má na svém povrchu antigenní struktury, které si imunitní systém zapamatuje a zahájí podle nich příslušnou imunitní odpověď (Kumar et al. 2021). Mezi expozicí antigenu a reakcí adaptivní imunity dochází k delší časové prodlevě než u vrozené, nicméně po opakovaném vystavení organismu stejnému antigenu je imunitní reakce pohotovější a intenzivnější (Ferenčík et al. 2011). Existují dva typy adaptivní imunity: humorální a buněčná. Humorální imunitu tvoří B-lymfocyty, které se zaměřují na tvorbu protilátek, díky kterým bojují proti patogenům. Buněčná imunita je tvořena T-lymfocyty, které rozpoznávají a eliminují patogeny infikovaných a nádorových buněk (Kumar et al. 2021). Imunitní systém funguje jako celek, porucha tohoto systému může být v některých případech doprovázena zánětem (Ferenčík et al. 2011; Kumar et al. 2021).



Obrázek 1: schéma fagocytózy; (Boháčová 2015).

Schéma fagocytózy:

- 1) Receptor rozpozná antigen, který je následně obklopen fagocytující buňkou
- 2) Pohlcený antigen je uzavřen
- 3) Dochází k rozkladu antigenu pomocí enzymu
- 4) Produkty rozkladu jsou nakonec exocytózou a odstraněny pryč z fagocytu 5

3.3.2 Zánět: fyziologická reakce těla na poškození

Zánět je nejstarším obranným mechanismem organismu na poškození nebo infekci. Tato reakce má za úkol chránit tělo a podpořit jeho regeneraci. Zánět je proces, který imunitní systém využívá pro odstranění počáteční příčiny poškození buněk, odstranění nekrotických buněk a obnovu poškozené tkáně (Ferenčík et al. 2011). Při fyzickém porušení bariéry pokožky a sliznice pronikne například virus přes poraněnou kůži nebo sliznici, organismus se brání a může odpovídat zmíněnou zánětlivou reakcí. Poškození s konečným důsledkem zánětu může vyvolat například i deficit bílkovin, vitamínů či kyslíku (Dunders 2020; Gopi et al. 2021).

Odpověď organismu na poškození může být lokální nebo systémová. Pro lokální zánět je typickým klinickým projevem zčervenání (*rubor*) a zvýšení místní teploty (*calor*), které je způsobeno zvýšeným průtokem krve do postižené oblasti. To umožní přívod imunitních buněk a dalších látek, které jsou potřebné pro léčbu tkáně (Kumar et al. 2021). Dále je patrný otok (*tumor*), který také umožní imunitním buňkám prostoupit do postižené oblasti. Bolestivost (*dolor*) má za úkol přimět jedince, aby šetřil postiženou oblast. Stejně tak porušení funkce (*functio leasa*) je dočasným nebo trvalým symptomem, který má také zajistit ochranu a lepší léčbu postižené oblasti. Systémovým příznakem je horečka, která tělu pomáhá zabít patogeny (Dunders 2020).

Zánět může být akutní či chronický a účastní se ho některé buňky imunitního systému. Základní buňkou při akutním zánětu, která se do zánětlivého ložiska dostává jako první a reguluje vývoj, je neutrofil. U chronického zánětu jsou uplatněny hlavně makrofágy a T – lymfocyty. Dalšími důležitými buňkami jsou endotelové buňky cév, eozinofily, žírné buňky, trobocyty a mnoho dalších látek. Ty regulují průběh zánětlivé reakce mimo jiné tím, že produkují zánětové mediátory. Mezi tyto mediátory patří cytokiny, chemokiny, prostaglandiny, proteiny akutní fáze zánětu a další (Gopi et al. 2021; Pahwa et al. 2022).

Zánětlivé procesy jsou spojeny s mnoha různými nemocemi, protože velmi silná nebo přetrvávající zánětlivá reakce může mít za následek poškození tkáně a vést k různým zdravotním problémům (Chatterjee 2016; Pagoretti et al. 2020).

3.4 Protizánětlivá aktivita konopí a jeho ochrana před nemocemi

Ke konkrétním látkám, které konopí obsahuje a jež mají protizánětlivé vlastnosti, lze zařadit například kanabinoidy, terpeny a flavonoidy. Z výzkumu vyplývá, že kanabinoidy ovlivňují imunitní systém tím, že se vážou na specifický receptor CB₂ (Vucković et al. 2018; Zielonka et al. 2020). Přesné mechanismy, kterými tyto látky chrání organismus proti zánětu, se teprve studují. Obecně ale lze systém ochrany proti zánětu rozdělit na čtyři základní procesy.

Prvním z nich je proces apoptózy, což je programovaná smrt buňky (Lukhele & Motadi 2016). Stejně jako všechny živé organismy mají i buňky svůj zamýšlený životní cyklus. Pokud je buňka poškozena vnějšími příčinami, jako je například poranění či infekce, dojde k buněčné smrti nazývané nekróza. Druhým způsobem, kterým buňky umírají, je „zdravý“ způsob zvaný apoptóza. Tento děj programované smrti je nezbytný v životním cyklu všech buněk. Některé studie ukazují, že například kanabinoidy mohou aktivovat apoptózu, což by mohlo být využito v léčbě nádorových onemocnění (Rieder et al. 2010; Lukhele & Motadi 2016). Druhým mechanismem k ochraně organismu je inhibice proliferace. Proliferace buněk je proces, kdy se buňky dělí a množí, což je za normálních okolností důležité pro vývoj a regeneraci tkání v těle. V některých případech ale může dojít k nekontrolovatelné proliferaci, což vede k abnormálnímu růstu tkání. To může být spojeno s různými onemocněními včetně nádorového onemocnění. Z tohoto důvodu je inhibice nekontrolovatelné proliferace buněk klíčová při léčbě nádorového onemocnění a dalších nemocí (Rieder et al. 2010; Seltzer et al. 2020). Třetím procesem bránícím zánětu je suprese cytokinů. Pokud jsou cytokiny produkovány nedostatečně, snižuje to obranyschopnost organismu. Negativní je však i přílišná produkce cytokinů, která může také vést k zánětu či poškození tkání, jako je tomu například u autoimunitních onemocnění (Rieder et al. 2010; Moudgil & Choubey 2011). Čtvrtým a klíčovým mechanismem pro ochranu buněk před zánětem je produkce a indukce T-lymfocytů. (Rieder et al. 2010; Kumar et al. 2021).

3.4.1 Crohnova choroba

Crohnova choroba je zánětlivé onemocnění, které postihuje stěnu trávicího traktu a může se vyskytovat kdekoli od úst až po konečník. V důsledku zánětu může dojít k řadě změn v postižené oblasti, například se mohou vyskytnout vředy, jizvy, zúžení či naopak ztlustění stěny střeva (Kumar et al. 2021). Tyto změny mohou vést ke komplikacím. Přestože je tato nemoc známa již několik desítek let, mechanismy patologie nejsou uspokojivě popsány. Hromadící se důkazy z posledních let naznačují, že nemoc vzniká v důsledku nepřiměřené reakce na střevní mikroflóru u geneticky predisponovaných jedinců (Ambrúzová et al. 2012).

Léčba Crohnovy choroby obvykle zahrnuje kombinaci několika různých postupů. V první řadě je důležité dodržovat zdravý životní styl. Dále jsou pacientům podávány léky jako například kortikosteroidy či imunomodulátory pro snížení zánětu a zpomalení průběhu onemocnění. V některých případech je nutný i chirurgický zákrok, zejména pokud dojde k významnému poškození střeva nebo rozvoji abscesů či píštělí (Lago & Gisbert 2020).

Závěry některých studií ukazují, že v léčbě Crohnovy choroby a dalších zánětlivých střevních onemocněních by konopí mohlo být účinné. Například Naftali et al. (2013) provedli studii, které se zúčastnilo 21 pacientů. Tito účastníci studie nereagovali na klasickou léčbu steroidy, imunomodulátory či jinými léčivými. Pacienti byli náhodně rozřazeni do dvou skupin, první skupině podávali konopí ve formě cigaret obsahujících 115 mg THC a druhé skupině podávali placebo. Aktivita onemocnění a laboratorní testy byly hodnoceny během 8 týdnů léčby a 2 týdny poté. Ve výsledku toho výzkumu kompletní remise dosáhlo 5 z 11 pacientů, oproti placebo, kde k remisi došlo u 1 z 10 pacientů.

Existuje několik dalších zdrojů, které také uvažují využít potenciál konopí v léčbě Crohnovy choroby. Ovšem pro přijetí konopí do rutinního léčebného postupu bude muset proběhnout ještě mnoho dalších studií s co největším počtem sledovaných subjektů (Schicho & Storr 2014; Kafil et al. 2018).

3.4.2 Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza je autoimunitní onemocnění centrálního nervového systému, které postihuje myelinovou pochvu nervových vláken (Kumar et al. 2021). Myelinová pochva slouží jako izolant nervových vláken a umožňuje rychlý přenos nervových impulsů. Při roztroušené skleróze se imunitní systém obrátí proti vlastnímu tělu a napadá myelinové obaly nervových vláken v mozku a míše, až dojde k jejich následné ztrátě (Horáková 2011). Tato nemoc postihuje především mladé lidi ve věku 20-40 let, ženy dvakrát častěji než muže. Přesná příčina vzniku roztroušené sklerózy není zcela jasná. Vědci se domnívají, že je způsobena kombinací genetických a enviromentálních faktorů (Horáková 2011; Sládková 2015).

Příznaky onemocnění jsou velmi různorodé, záleží na lokalizaci demyelinizační léze v CNS. Symptomy mají velmi často tendenci ke spontánní regresi, což může mít za následek pozdější stanovení diagnózy, většinou až když se přidají další klinické projevy. Mezi typické příznaky patří například zánět očního nervu, který se podle rozsahu může projevit „jen“ zhoršením vidění, zamlžením obrazu různého stupně, výpadkem zorného pole či poruchou barevného vidění (Sládková 2015; Kumar et al. 2021). V některých případech může tento symptom skončit až ztrátou zraku. Dalším příznakem může být porucha hybnosti, kdy opět může dojít na nejhorší, tedy úplnou paralýzu. Sexuální disfunkce jsou rovněž velmi frekventovanou poruchou. Pacienti si také nezdívka stěžují na únavu, poruchy s vyprazdňováním či bolest kdekoli po těle (Sládková 2015).

Podle Corey-Bloom et al. (2012) je u roztroušené sklerózy je velmi důležitá včasná diagnostika, která razantně zpomalí progresi neurologického deficitu a aktivitu onemocnění. Pacientům s těžkou formou roztroušené sklerózy v některých případech dostupné léky nezabírají. Výzkum měl sledovat vývoj roztroušené sklerózy a spasticity u 30 pacientů. Studie byla kontrolována placebem a potvrdila snížení symptomů a bolesti u pacientů, kteří užívali konopí.

Giacoppo et al. (2017), kteří se zabývali účinností a bezpečností léčby přípravkem Sativex, kde jsou hlavní aktivní složky kanabinoidy THC a CBD, uvádějí, že lze pacienty s těžkou spasticitou, která je spojena s roztroušenou sklerózou, léčit právě tímto přípravkem. Pacienti, kteří užívali Sativex, hlásili zlepšení svých příznaků, včetně snížení svalové ztuhlosti, bolesti a zlepšení kvality spánku. Přípravek byl navíc poměrně dobře snášen, nežádoucí účinky hlásil průměrně jen jeden pacient z deseti. Nejčastějšími vedlejšími účinky byly například závratě, únava, úzkost, zácpa nebo průjem či bolest hlavy. K úplnému potvrzení zjištění bude však zapotřebí rozsáhlejších a dlouhodobějších studií.

3.5 Konopí (*Cannabis spp*)

Systematicky konopí patří do čeledi kopřivotvaré (*Urticales*), čeledi konopnaté (*Canabinaceae*). Hlavním kanabinoidem s psychotropním účinkem je tetrahydrokanabinol (THC) (Koren et al. 2020). Podle odborných botanických zdrojů existuje konopí buď jeden druh – (*Cannabis sativa*) s různými poddruhy a varietami, nebo tři samostatné druhy – konopí seté, konopí indické (*Cannabis indica*) a konopí rumištní (*Cannabis ruderalis*) (Chandra et al. 2017; Landa et al. 2020).

3.5.1 Botanika konopí

Konopí je dvoudomé, to znamená, že jsou rozlišeny samičí a samčí květy. Samčí rostlina bývá vyšší a méně robustní než samičí (Obrázek 2) (Small 2015). Kanabinoidních látek

obsahují samci zanedbatelné množství. Toto malé množství lze nalézt především v listech, stoncích a v pylu. Hlavním úkolem samců konopí je opylovat samičí květy. Samci se díky své délce pěstují především na vlákno. Pokud je konopí pěstováno za účelem jeho psychotropních účinků, samci se záměrně a systematicky odstraňují (Chandra et al. 2017).

Samičí květy tvoří hustě olistěné krátké složité hrozny, které jsou rozloženy v horní části rostliny v několika vrstvách a tvoří tzv. palice. Tyto vrcholky samičího květenství jsou známé pod názvem marihuana a pryskyřice, která vzniká na vrcholcích, se nazývá hašiš. Pokud dojde k opylení, v květech (palicích) se začnou tvořit semena. Samice tak ztrácí veškerou pryskyřici, což je z hlediska pěstování konopí pro kanabinoidy nežádoucí. V praxi jsou využívána například geneticky upravená semena, ze kterých téměř vždy vyroste samičí rostlina. Tímto způsobem pěstitel předchází nežádoucímu procesu opylení (Small 2015; Punja & Holmes 2020).



Obrázek 2: konopí seté, A: kvetoucí samčí rostlina, B: plodící samičí rostlina, C: shluk samčích květů, D: plod (nažka) obklopen listenem, E: pohled na širokou plochu nažky, F: pohled na úzkou stranu nažky, G: pestík se semeníkem a dvěma bliznami, H: pestík obklopen mladými listeny; (Small 2015).

3.5.2 Historie konopí

K domestikaci konopí došlo před několika tisíci lety. Bylo tak jednou z prvních domestikovaných rostlin. Už ve starověku bylo vlákno využíváno například pro výrobu ošacení nebo papíru, dále (kromě psychoaktivního účinku) bylo konopí uplatňováno při léčbě somatických onemocnění, jako je například bolest hlavy, horečka, bakteriální infekce, průjem, revmatické bolesti, malárie (Pollastro et al. 2018; Crocq 2020).

Přestože je konopí původem z Asie, v Indii vznikla takzvaná „konopná kultura“. Užívání konopí tam má velkou tradici, která přetrvává dodnes. Tato rostlina byla identifikována jako jedna z pěti posvátných indických rostlin včleněných do základů hinduistického i buddhistického náboženství. Rostlina byla používána především k odstranění úzkostí, odstranění bolesti (Crocq 2020).

V dnešní době je konopí hojně využíváno například v potravinářství, farmacii, textilním průmyslu, ovšem díky jeho potenciálním psychotropním účinkům je jeho použití legislativně upraveno jak v České republice, tak ve světě (Chandra et al. 2017; Landa et al. 2020).

3.5.3 Legislativa konopí

V České republice zákon ukládá, že pěstování rostliny s obsahem $> 0,3 \%$ (suchá hmotnost květenství) THC je možné pouze pro léčebné účely. Pokud je rostlina s obsahem THC $> 0,3 \%$, pěstitel je povinen takovou skutečnost nahlásit nebo musí požádat o pěstební licenci. Pěstování technického konopí bylo kolem 90. let v některých zemích povoleno, oproti tomu indické konopí s omamnými účinky je z velké části zakázáno a pěstování potíráno (Miovský et al. 2008). Pro udělení povolení pěstitelům konopí na vlákno Evropská unie požaduje, aby celkové množství THC nepřesáhlo $0,2 \%$ (suchá hmotnost květenství) (Backer et al. 2012). Některé země rekreační užívání povolují. Příkladem takových zemí jsou Uruguay či některé státy USA. Užívání konopí pro rekreační účely je de facto povoleno i v Nizozemsku, existují však podmínky, za jakých k užití může dojít. Legalizace konopí s sebou jistě nese mnohá úskalí, na druhou stranu má velmi pozitivní vliv na rozšíření výzkumů a detailnější studování nejen protizánětlivých a antioxidačních účinků (Chandra et al. 2017).

3.6 Látky v konopí s antioxidační a protizánětlivou aktivitou

Konopí obsahuje četné biologicky aktivní sloučeniny, které se řadí jak do primárních, tak do sekundárních metabolitů (Zielonka et al. 2020). Primární metabolity vznikají v organismu při základních metabolických procesech (syntéza proteinů, sacharidů, lipidů a nukleových kyselin). Tyto látky jsou produktem běžných metabolických drah a jsou pro růst, vývoj a přežití organismu esenciální. Příkladem látek, které se řadí do primárních metabolitů, jsou aminokyseliny, mastné kyseliny, cukry, nukleotidy. Sekundární metabolity organismus produkuje jako látky pro specifické účely, do kterých řadíme ochranu proti predátorům, regulace růstu a vývoje či komunikace s jinými organismy (Saurabh et al. 2015).

Konkrétně v konopí není role sekundárních metabolitů zcela objasněna, ovšem v případě kanabinoidů se předpokládá funkce ochranná proti škůdcům, vysychání, nemocem a ultrafialové radiaci (Gülck & Moller 2020). K sekundárním metabolitům konopí řadíme kanabinoidy, sterbenoidy, flavonoidy, lignany terpenoidy a alkaloidy (Zielonka et al. 2020).

Konopí obsahuje mnoho biologicky aktivních látek a důvodem, proč se konopí stalo předmětem takového zájmu, je fakt, že tento rod rostlin jako jediný na světě obsahuje chemické látky zvané fytoKANABINOIDY (Zielonka et al. 2020).

3.6.1 Kanabinoidy

Tuto skupinu chemických látek některé zdroje označují za „rostlinné jedy“. Protože se mezi kanabinoidy řadí i synteticky připravené látky, mohou být kanabinoidy rostlinného původu někdy nazývány jako fytoKANABINOIDY (Milfortová 2010). Tyto sloučeniny jsou tvořeny dvěma hlavními skupinami, a to jsou kanabinoidy a terpeny (Zielonka et al. 2020).

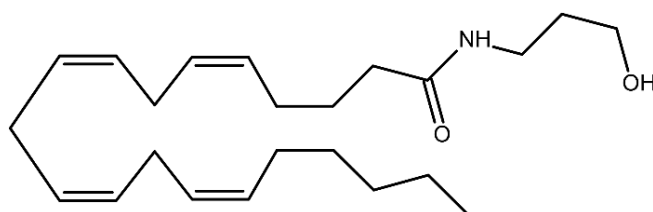
Konopí může mít účinky jak sedativní, tak i stimulační nebo i halucinogenní. Vše závisí na dávce, konkrétní rostlině, psychické pohodě uživatele a okolních podmínkách. Projev stimulačních účinků však nemusí být pouze pozitivní a může uživatele přivést i k pocitu úzkosti, zmatenosti až deprese (Landa et al. 2020). Halucinogenní účinek se může projevit jako zvýšené smyslové vnímání či mírné halucinace, tento efekt ale není častý a většinou je zapotřebí větších dávek kanabinoidů (Chandra et al. 2017). Na rozdíl od jiných psychoaktivních rostlin

kanabinoidy nepatří do chemické skupiny alkaloidů, a právě to dělá konopí výjimečným (Zielonka et al. 2020). Tyto chemické sloučeniny jsou specifické tím, že jsou rozpoznávány endokanabinoidním systémem (Kendall & Yudowski 2017; Zielonka et al. 2020).

3.6.2 Endokanabinoidní systém ECS a jeho receptory

Endokanabinoidní systém neboli ECS je komplexní systém buněčné signalizace a je přítomný u všech vyšších živočichů včetně člověka. Jedná se o jeden z klíčových regulačních mechanismů, které řídí různé události, jako je například nálada, vnímání bolesti, učení a paměť (Milfortová 2010). Je využíván například k regulaci hladiny hormonů, tělesné teploty, spánku a dalších. Má vliv na celou řadu životních funkcí včetně příjmu potravy nebo rozmnožování. Podílí se na udržení homeostáz lidského těla. Pomáhá organismu se vyrovnávat se stresem a úzkostí. ECS spolupracuje s centrální nervovou soustavou a provádí retrográdní signalizaci (Kendall & Yudowski 2017).

ECS produkuje neurotransmitery, které se nazývají endokanabinoidy. Tyto látky se vážou na specifické kanabinoidní receptory a jejich prostřednictvím působí na organismus. Na rozdíl od fytokanabinoidů mají endokanabinoidy zcela odlišné chemické složení, ale působí také prostřednictvím endokanabinoidního systému (Milfortová 2010; Kendall & Yudowski 2017). Z chemického hlediska jsou endokanabinoidy lipidické látky, které jsou odvozené od kyseliny arachidonové. Tato kyselina je pro člověka esenciální látkou, která se řadí k nenasyceným mastným kyselinám, jež tvoří fosfolipidy buněčných membrán. Endokanabinoidy se nacházejí téměř ve všech částech mozku, kde jsou syntetizovány a uvolňovány při stimulaci neuronů. Jedním z nejznámějších endokanabinoidů je anandamid (Obrázek 3) (Rádl 2021).



Obrázek 3: strukturní vzorec anandamidu; (Milfortová 2010).

Farmakologické účinky kanabinoidů se z velké části projevují prostřednictvím specifických kanabinoidních receptorů. Tyto receptory jsou součástí endokanabinoidního systému. Existují dva typy endokanabinoidních receptorů CB₁ a CB₂ (Kendall & Yudowski 2017). Pokud se kanabinoid naváže na CB₁ nebo CB₂ receptor, mohou vzniknout různé účinky v závislosti na mnoha faktorech. Proto jsou tyto receptory důležitými cíli pro léčebné účely. Kanabinoidní receptory existují v různých orgánech včetně kůže, jejich koncentrace je ale soustředěna především na mozek (Rádl 2021).

Receptory CB₁ jsou v hojném zastoupení v některých oblastech mozku, jako například v mozkové kůře, hippocampu, bazálních gangliích, mozečku a mozkovém kmeni. Tato místa v mozku jsou zodpovědná za emoční homeostázu, paměť, vnímání bolesti, smyslové vnímání, posturální kontrolu a další funkce mozku. Receptory CB₂ se vyskytují především v periferním nervovém a imunitním systému. Ačkoli je jejich úloha stále předmětem zkoumání, předpokládá se, že zprostředkovávají imunologické účinky kanabinoidů (Kendall & Yudowski 2017). Z farmakologického hlediska se díky tomuto působení kanabinoidy stávají složitým, ale zajímavým tématem a předmětem k dalším studiím. Kanabinoidy jako THC, CBD, THCA patří mezi nejvíce studované kanabinoidy, které se v rostlině konopí vyskytují (Rádl 2021).

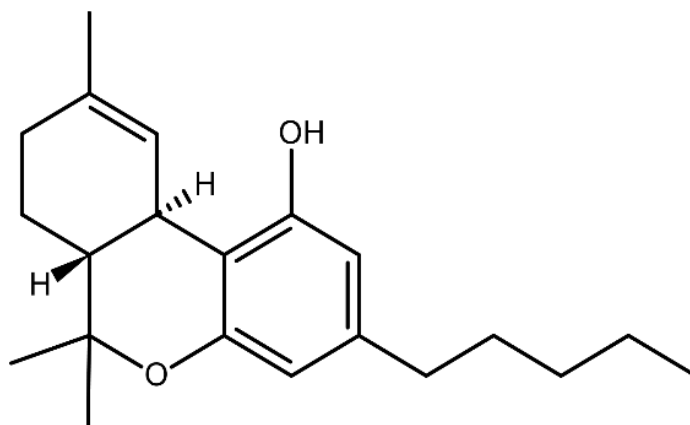
3.6.3 Tetrahydrokanabinol THC

THC (Obrázek 4) je hlavní účinnou složkou a nejvýznamnější látkou z hlediska biologické aktivity, která se vyskytuje v konopí. Nejvíce THC, přibližně 10-12 %, je v květenství, 1-2 % v listech, 0,1-0,3 % ve stoncích a ještě méně je v kořenech (Jin et al. 2020). Celkový obsah THC se v rostlině mění podle různých vývojových stadií. Při klíčení je obsah minimální, před začátkem květu se obsah THC navýší a je stabilní po celou vegetativní fázi před objevením květů. K dalšímu výraznému navýšení dochází v průběhu reprodukčního stadia, maxima poté rostlina dosáhne krátce po odkvětu. Následuje pokles obsahu THC, který je považován za počátek stárnutí rostliny (Backer et al. 2012). Množství kanabinoidů v květenství se pohybuje od minimálního množství pod 1 % až po velmi silné konopí o obsahu 30 % (Jin et al. 2020).

Podle celkového THC a celkového CBD se rozeznávají tři hlavní chemotypy (chemické fenotypy) konopí:

- Chemotyp I.: „Drogový typ“ obsahuje velké celkové množství THC – více, než 0,3 % a nízký obsah CBD – méně, než 0,5 % v hmotnosti suchého květenství. Tento fenotyp je nejžádanější, co se týká psychotropních účinků.
- Chemotyp II.: „Meziprodukt“ obsahuje vysoké množství celkového CBD a střední až vysoké množství THC. Poměr mezi těmito látkami je většinou velmi vyrovnaný s mírnou převahou CBD.
- Chemotyp III.: „Nedrogový typ“ obsahuje převážné množství CBD a obsah THC obvykle nižší než 0,3 % v hmotnosti suchého květenství. Tento fenotyp se využívá při pěstování konopí pro CBD a při pěstování technického konopí (Backer et al. 2012).

Gaffal et al. (2013) provedli studii účinku THC na protizánětlivou aktivitu, konkrétně *in vivo* u myši a *in vitro* na myších buňkách kostní dřeně. V obou případech byla vyvolána alergická kožní dermatitida. Toto zánětlivé onemocnění se na kůži projevuje zarudnutím, svěděním v místě kontaktu s alergenem. Výsledky ukázaly, že aplikace THC snížila zánět u obou typů experimentů. THC inhiboval produkci prozánětlivých proteinů (cytokinů a chemokinů), což zánět kůže omezilo. Tento poznatek je důležitý například pro budoucí využití kanabinoidů pro léčbu nejen kožních zánětlivých onemocnění.



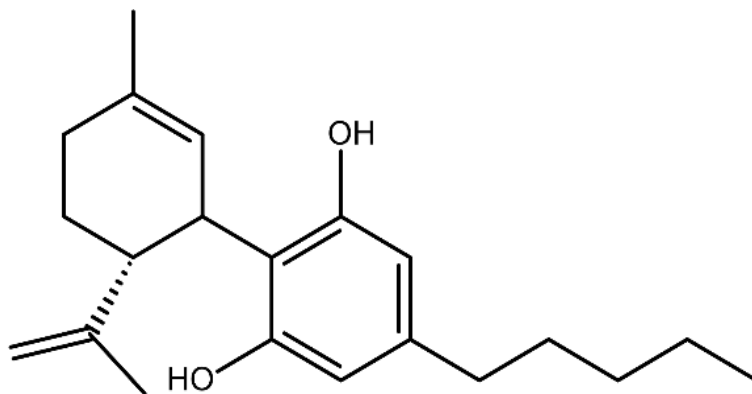
Obrázek 4: strukturní vzorec THC; (Chandra et al. 2017).

3.6.4 Kanabidiol CBD

Kanabidiol, dále jen CBD (Obrázek 5), se také vyskytuje téměř ve všech odrůdách konopí, a to od velmi nízkých hodnot až po zhruba 95 % přítomných kanabinoidů. Na rozdíl od THC však nevykazuje žádné halucinogenní účinky. Stejně jako u THC závisí i obsah CBD na konopném chemotypu. Obecně se obsah CBD v rostlině pohybuje přibližně od minimálního množství pod 1 % až po přibližně 15 % (Backer et al. 2012).

V některých studiích byl prokázán potenciál CBD působit antiepilepticky, antioxidantně, protizánětlivě, antidepressivně (Karlíčková 2019). CBD lze využít pro psychiatrické obtíže, jako například posttraumatický stres, problémy se spaním, úzkosti, psychózy, změny nálad. Další studie naznačují, že CBD může snižovat návykové účinky některých zneužívaných drog. Pacienti s Parkinsonovou chorobou také hlásili zlepšení kvality života a spánku při užívání této látky. V závěru těchto studií je konstatováno, že CBD lze použít na široké spektrum terapeutických účinků, včetně neuroprotektivních, ovšem je potřeba provést další studie na větším počtu lidí pro podrobnější informace (Leweke et al. 2012; Elsaid et al. 2019; Karlíčková 2019).

V poslední době se těší velké oblibě nejrůznější výrobky z CBD, velmi populární jsou konopné oleje. Jedná se o extrakty z konopných odrůd s vysokým obsahem CBD a nízkým obsahem THC. Pokud je obsah THC skutečně nízký, jsou tyto výrobky legální. Extrakty obsahují menší desítky procent CBD. Doporučují se pro lepší spánek, regeneraci a relaxaci (Karlíčková 2019).



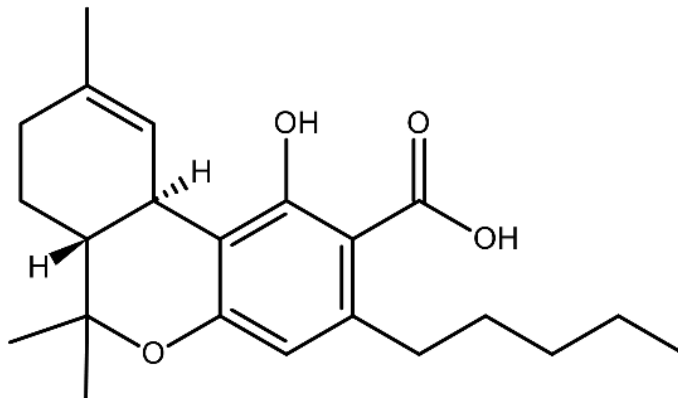
Obrázek 5: chemická struktura CBD; (Karlíčková 2019).

3.6.5 THCA

Tetrahydrokanabinolová kyselina (Obrázek 6), tedy THCA, je kyselá forma THC a zároveň je jeho nepsychoaktivním prekurzorem. THCA se na THC mění během procesu sušení či při dekarboxylaci. Dekarboxylace nastává, když je rostlinný materiál vystaven vysoké teplotě okolo 110 °C (Iffland 2016).

Carmona-Hidalgo et al. (2021) provedli studii, která zahrnovala *in vivo* testy na buněčných liniích, kde byla zkoumána antifibrotická aktivita THCA. Fibróza je zmnožený stav tkáně v důsledku hojivého procesu po zánětu, zranění či reparativní reakce na jiné podněty. Dále studie obsahovala *in vivo* zvířecí modely myší, u kterých byl vyvolán zánět jater. Bylo zjištěno, že THCA významně snížil fibrózu i vyvolaný zánět. V této studii THCA snížilo infiltraci T-lymfocytů a makrofágů, tyto imunitní buňky se mohou podílet na zánětlivých

procesech v játrech a snížení jejich infiltrace a současně snížení zánětu může být indikátorem skutečnosti, že THCA má potenciál protizánětlivých účinků. Tato sloučenina by tak mohla mít slibné ambice pro využití v léčbě jaterních onemocnění (Carmona-Hidalgo et al. 2021). Jiná studie potvrdila antioxidační charakter této látky, který by mohl pomoci chránit buňky před volnými radikály (Dawidowicz et al. 2021).



Obrázek 6: chemická struktura THCA; (Dawidowicz et al. 2021).

3.6.6 Terpeny v konopí

Terpeny jsou uhlovodíky složené z izoprenových jednotek. Tvoří jednu z největších skupin rostlinných sloučenin, jen v konopí se jich nachází několik desítek. Jsou lipofilní a snadno procházejí fosfolipidovou membránou (Kaczorová et al. 2020). Terpeny jsou klasifikovány podle počtu opakujících se pěti uhlíkatých stavebních jednotek zvaných monoterpeny a sekviterpeny. Monoterpeny obsahují dvě molekuly a sekviterpeny tři molekuly izoprenu (Sommano et al. 2020).

V rostlinách jsou zodpovědné za mnoho biologických funkcí, například se podílejí na funkci a struktuře membrán, odolnosti, vývoji a ochraně. Také se podílejí na fotosyntéze. Typickou vlastností pro terpeny je jejich těkavost. Jsou součástí silic z konopí a jejich produkce probíhá stejnými žlázami, jakými se produkují kanabinoidy. Vzhledem k těkavosti je značná část terpenů přítomna jen v čerstvé rostlině. Kolem 140 terpenů v konopí je zodpovědných za typickou konopnou vůni, 17 nejběžnějších terpenů lze použít k hodnocení fenotypických nebo biologických vlastností odrůd (Kaczorová et al. 2020). Nejhojněji zastoupenou skupinou terpenoidů v konopí jsou monoterpenoidy, dominuje především myrcen, pinen, limonen a terpinolen (Chandra et al. 2017; Kaczorová et al. 2020).

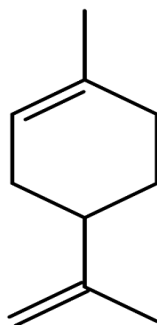
3.6.7 Limonen

Limonen (Obrázek 7) je jedním z nejběžnějších terpenů v přírodě. Je hlavní složkou několika citrusových olejů (pomerančový, citrónový, mandarinkový, limetkový, grapefruitový). Obecně je uznáván jako bezpečný, a tak jej lze nalézt v běžných potravinách (Ravichandran et al. 2018).

Zmíněný monoterpen je dále hojně studován pro svou antikancerogenní aktivitu. Limonen se ukázal jako důležitý nástroj v prevenci a léčbě nádorového onemocnění, mohl by tak posloužit jako doplněk k současným léčebným postupům. Výsledky výzkumů ukazují, že limonen je schopen zlepšit účinnost léčby nádorového onemocnění a zpomalit nebo dokonce zastavit růst nádorů. Z tohoto důvodu by mohl být perspektivním přírodním nástrojem v boji proti této nemoci. Jeho výzkum by měl být dále podporován a rozvíjen (Araújo-Filho et al.

2021; Kamran et al. 2022). Dalším příznivým účinkem limonenu je jeho protizánětlivý efekt, který lze aplikovat například při péči o pleť v případě různých kožních problémů, jako je akné nebo atopický ekzém. V důsledku schopnosti potlačovat bakterie způsobující akné může limonen snížit zánět v těle a tím pomoci potlačit zarudnutí, svědění a podráždění pokožky, což jsou časté příznaky kožních problémů. (Yoon et al. 2010; Zielonka et al. 2020).

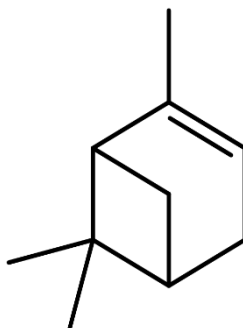
Bylo prokázáno, že limonen snižuje úzkost u myši prostřednictvím serotoninových receptorů (Zielonka et al. 2020). Serotonin je hormon nervové tkáně, který patří mezi základní přenašeče nervových vzruchů. Pokud máme v těle těchto přenašečů málo, dochází ke snížení přenosu nervových vzruchů. To ovlivňuje pocit úzkosti a deprese (Cowen & Browning 2015). Některé studie ukazují, že by limonen díky svým vlastnostem mohl mít antidepresivní účinky, nicméně je třeba provést další studie k potvrzení (Zielonka et al. 2020).



Obrázek 7: chemická struktura limonenu; (Morehouse et al. 2017).

3.6.8 Pinen

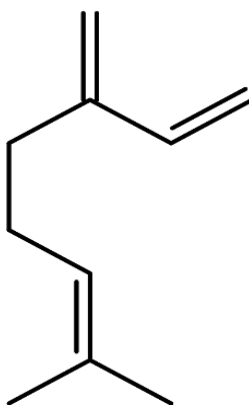
Dalším hojně zastoupeným monoterpenoidem je pinen (Obrázek 8), který má mimo jiné bronchodilatační účinky, což znamená, že může pomoci rozšířit dýchací cesty a usnadnit proudění vzduchu. To ho činí užitečným při léčbě různých onemocnění dýchacích cest, jako je například astma (Hou et al. 2019; Zielonka et al. 2020). Experimentální studie také naznačují, že vykazuje antioxidační, antimikrobiální a cytotoxickou aktivitu a mohl by být slibnou protinádorovou látkou. Pinen má potenciál být terapeutickým prostředkem například pro léčbu rakoviny prostaty (Zhao et al. 2018; Hou et al. 2019). Ukazuje se, že protinádorové účinky pinenu zahrnují různé mechanismy. Kromě již zmíněných je to například regulace progresu buněčného cyklu či stimulace apoptózy, což je programovaná buněčná smrt (Hou et al. 2019).



Obrázek 8: chemická struktura pinenu; (Allenspach & Steuer 2021).

3.6.9 Myrcen

Myrcen (Obrázek 9) je další přírodní organickou sloučeninou, která se mimo konopí běžně vyskytuje v aromatických rostlinách, jako například v tymiánu, chmelu, mangu či citrónové trávě (Baron 2018). Tento monotерpen je jedním z nejhojněji zastoupených terpenů konopí (Chandra et al. 2017; Kaczorová et al. 2020). Myrcen má silné protizánětlivé, anxiolytické a analgetické účinky. Soudí se, že tato látka má podobný mechanismus na snížení bolesti jako opioidy. Některé studie naznačují, že působí také jako svalový relaxant, hypnotikum a sedativum (Baron 2018; Zielonka et al. 2020). Hoseini et al. (2020) a Khalili et al. (2020) potvrdili, že myrcen potlačuje oxidační stres u kapra obecného (*Caprinus carpio*).

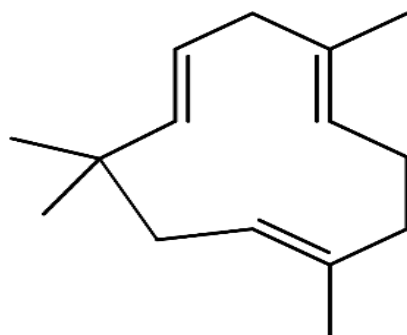


Obrázek 9: chemická struktura myrcenu; (Behr & Johnen 2009).

3.6.10 Karyofylen

Karyofylen patří do další početné skupiny terpenů, která se nazývá sekviterpeny. Jedním z nejvíce zastoupených sekviterpenů je právě karyofylen (Obrázek 10) (Gertsch et al. 2008; Kaczorová et al. 2020). Kromě konopí se karyofylen nachází například v oreganu (*Origanum vulgare*), skořici (*Cinnamomum spp.*) nebo v černém pepři (*Piper nigrum*). Bylo prokázáno, že karyofylen je agonista kanabinoidního receptoru CB₂. Jedná se tak o první dokázanou látku (mimo kanabinoidy) působící na tyto receptory. Karyofylen se díky svému pikantnímu aromatu, které se podobá černému pepři, často využívá v potravinářství, například v kořenících směsích či marinádách. Může být také přidáván do kosmetických výrobků (Gertsch et al. 2008).

Předpokládá se, že z evolučního hlediska je karyofylen v rostlině syntetizován kvůli obraně rostliny. Na jedné straně má schopnost přitahovat predátory (herbivory), na straně druhé odpuzuje samotné herbivory. Díky tomu slouží jako účinný obranný mechanismus a pozitivně přispívá k růstu a zdraví rostlin tím, že snižuje poškození způsobené herbivorním hmyzem. Kromě toho má karyofylen také potenciál být terapeutickou sloučeninou, zejména v aplikacích proti zánětlivým procesům a bolesti (Russo 2011).



Obrázek 10: chemická struktura karofylenu; (Gertsch et al. 2008).

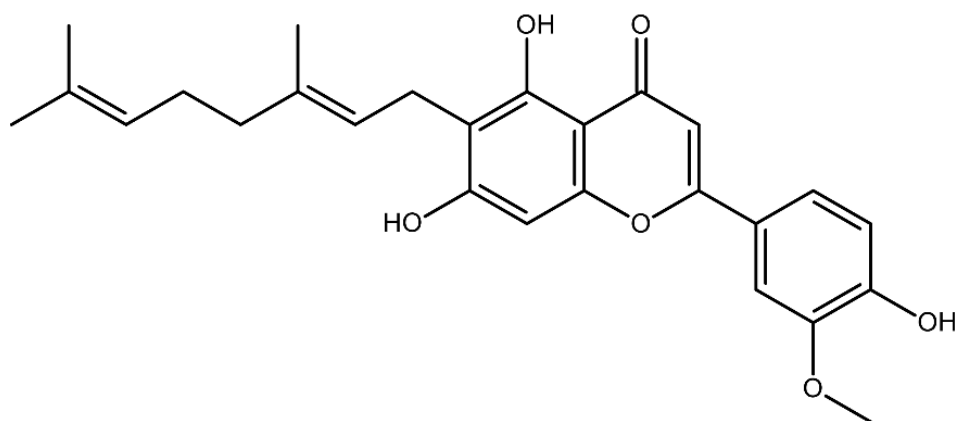
3.6.11 Fenolické sloučeniny

Tyto biologicky aktivní sloučeniny jsou velmi rozšířenou skupinou sekundárních metabolitů, které obsahují hydroxylovou funkční skupinu (-OH) vázanou přímo na benzenový kruh (aromatické jádro). Tyto látky jsou hojně přítomné v přírodě a mohou být nalezeny mimo jiné také v ovoci, zelenině, koření, kávě a dalších potravinách. Fenolické sloučeniny se vyskytují také v mnoha léčivých rostlinách (Rosa et al. 2019). Tyto látky mají především antioxidační vlastnosti a mohou být uplatněny při léčbě pacientů cytostatiky, při alergii, regulaci krevního tlaku nebo při léčbě neurodegenerativních onemocnění. Fenolické látky lze rozdělit na fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany (Kaczorová et al. 2020).

Flavonoidy

Tyto sekundární metabolity jsou všudypřítomné ve vyšších rostlinách. Přestože v konopí byly identifikovány více než dvě desítky flavonoidů, přesná biosyntéza v rostlině není zatím zcela objasněna. Jejich rozmanitost a diverzifikace je velmi užitečná pro taxonomické studie. Flavonoidy jsou distribuovány v různých extracelulárních a sub-extracelulárních kompartmentech rostliny, jako jsou například membrány, chloroplasty, vakuoly a jádro (Pollastro et al. 2018). Mimo konopí se flavonoidy vykytují konkrétně například v ovoci, zelenině, víně či kakau. Nejčastější strukturou společnou pro flavonoidy jsou dva aromatické kruhy, které jsou vzájemně vázány třemi atomy uhlíku a vytvářejí kyslíkatý heterocyklus (Rosa et al. 2019).

Pro konopí je unikátní kannflavin A (Obrázek 11) a kannflavin B. Jedná se o tzv. flavony, což je podskupina flavonoidů. Kannflavin je látka, která je známá především pro svou antioxidační, antimikrobiální a protizánětlivou aktivitu (Pollastro et al. 2018). Studie od Tomko et al. (2022) byla zaměřena na výzkum potenciálních protinádorových efektů kannflavinu A. Byl zkoumán vliv kannflavinu A v koncentraci 0-100 μM na buňky rakoviny močového měchýře a také bylo uvažováno o synergických účincích kannflavinu A s chemoterapeutiky a kanabinoidy. Synergická cytotoxická účinnost byla s gemcitabinem provedena v koncentraci od 0-100 μM , cisplatinem také od 0-100 μM a s kanabinoidy od 0-10 μM . Výsledek ukázal, že zkoumaná látka má tyto uvažované potenciální protinádorové vlastnosti a může inhibovat růst buněk rakoviny močového měchýře. Kromě toho bylo zjištěno, že kombinace kannflavinu A s chemoterapeutiky, jako je gemcitabin a cisplatin, a s kanabinoidy může mít synergické účinky a zlepšit účinnost léčby. Nicméně jsou potřebné ještě další studie, které detailněji odhalí účinnost a bezpečnost kannflavinu A u lidí.

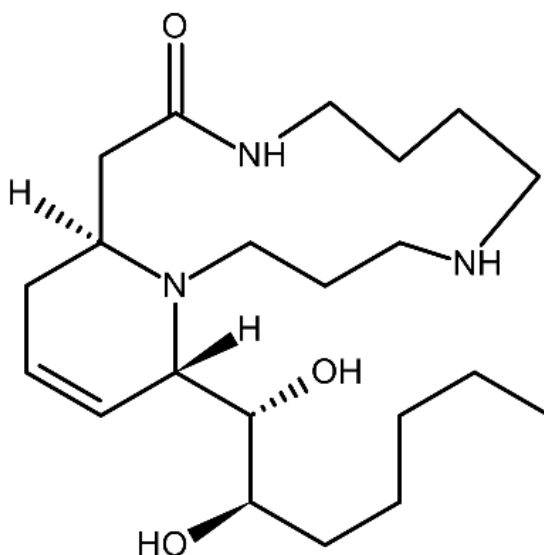


Obrázek 11: chemická struktura kannflavinu A; (National Center for Biology 2023).

3.6.12 Alkaloidy

Další skupinou konopných látek jsou alkaloidy. Tyto sloučeniny jsou velmi rozsáhlou skupinou nízkomolekulárních substancí, které mají společné, že jsou sekundárními metabolity rostlin a živočichů. Alkaloidy se vyznačují tím, že obsahují dusík (Kurek 2019). Přestože jsou alkaloidy velmi významnou a v poslední době hojně studovanou skupinou, jejich plný biologický význam není stále zcela objasněn. Mezi jedny z hlavních a prokázaných funkcí alkaloidů patří obrana rostlin proti herbivorům, jako jsou hmyz či savci (Lowe et al. 2021). Alkaloidy mohou být biologicky aktivní, některé patří mezi jedy (strychnin, mescalín, ...), jiné se běžně používají (káva, pepř, nikotin, ...) (Vezikov & Simpson 2022).

Mezi alkaloidy izolované z rostliny konopí patří například kanabinasativin (Obrázek 12) nebo anhydrokanabisativin. Tyto látky vykazovaly antiparazitní, antipyretické, antiemetické, protinádorové, diuretické a analgetické vlastnosti. Kanabisativin a anhydrokanabisativin se vyskytují v různých koncentracích v celém těle rostliny konopí a s již zmíněnými látkami mají společné, že také vykazují protizánětlivé a antioxidační schopnosti (Lowe et al. 2021).



Obrázek 12: chemická struktura kanabisativinu

4 Metodika

4.1 Rostlinný materiál

Materiál byl získán z Katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin od Ing. Matěje Malíka, Ph.D. Rostliny konopí byly vypěstovány uvnitř místnosti s kontrolovanými podmínkami. Zavlažování bylo zajištěno pomocí kapénkové závlahy, za den byla rostlina zavlažena 9×, a tak se ke každé rostlině dostalo 846 ml / den živného roztoku. Mikroklimatické parametry zajišťovala ventilační jednotka, která udržovala teplotu podle denního cyklu. Během denní fáze 25 °C a v noční fázi byla teplota snížena na 22 °C, relativní vlhkost byla nastavena na 60 %. Atmosféra byla obohacována CO₂, vhodné světelné spektrum bylo zajištěno pomocí sodíkových výbojek. Rostliny použité v pokusech byly z matečných rostlin genotypu léčebného konopí, které neslo pracovní název „Mclove“. Při pěstování rostlin byly použity dvě varianty výživy. První skupina rostlin byla hnojena základním hnojivem s přidavkem produktu od Emerald Harvest a druhá skupina byla hnojena základním hnojivem s přidavkem produktu od Emerald Goddess a s přidáním huminových kyselin.

Konopí bylo sklizeno v rozdílném stupni zralosti, konkrétně v 8. a 9. týdnu, poté došlo k rozdělení rostlin do skupin dle způsobu výživy a dle rozdílných stupňů zralosti.

Rostliny byly dále rozděleny na květy, stonek a listy, zváženy v čerstvém stavu a usušeny. Listy a květy byly uskladněny v chladících boxech. Před dalšími operacemi byly všechny části rostlin zhomogenizovány, následně květy zmrazeny tekutým dusíkem a rozemlety v třecí misce.

Rozemleté a zhomogenizované květy (včetně listů) byly následně macerovány metodou „dynamické macerace“ (Brighenti et al. 2017). Od každého vzorku bylo naváženo 0,30 g a přidáno 96 % ethanolu (EtOH). Následovala macerace po dobu 60 min za stálého míchání při 300 otáčkách za minutu. Směsi byly filtrovány ve vakuu pomocí Mortonova filtračního zařízení a filtrát byl odebrán. Květy byly vyjmuty z filtru a smíchány s dalšími 10 ml rozpouštědla (EtOH). Tento krok se opakoval dvakrát a filtráty se spojily. Alikvoty 0,5 ml každého vzorku byly zředěny 10 ml 96 % EtOH a znovu přefiltrovány přes nylonové stříkačkové filtry do lahvíček. Následně byly připraveny extrakty vzorků na koncentraci 10 mg/ml pro další analýzy, včetně testování antioxidační a protizánětlivé aktivity.

4.2 Ostatní materiál

Folin-Ciocalteu činidlo; kyselina gallová; buněčná linie myších makrofágů RAW 264.7; RPMI 1640 medium; glukosa; fetální bovinní sérum (FBS); neesenciální aminokyseliny; penicilín; streptomycin; MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid); lipopolisacharid (LPS); etanol; 96-jamkové mikrotitrační destičky; kultivační láhve od Thermo-Scientific (UK).

4.3 *In vitro* antioxidační testy

4.3.1 TPC – stanovení celkových fenolických sloučenin

Ke stanovení celkových fenolických sloučenin bylo použito modifikované metody. Do 96 jamkové destičky bylo třeba odpipetovat 100 µl vzorku, následně se přidalo 100 µl destilované vody a postupně se vzorek pomocí dvojnásobného ředění nařadil na požadovanou koncentraci (z poslední pozice je 100 µl odstraněno). Poté bylo přidáno 25 µl čistého Folin-Ciocalteu a destička se nechala 10 minut na orbitální třepačce při 50 rpm/min. Následně

se připravilo 75 μ l 12 % Na_2CO_3 a celá destička byla inkubována po dobu jedné hodiny v temnu při teplotě 37 °C. Absorbance byla měřena při 700 nm. Výsledek byl vyjádřen jako ekvivalent gallové kyseliny.

4.4 *In vitro* stanovení protizánětlivé aktivity

4.4.1 Kultivace makrofágů buněčné linie RAW 264.7

Buněčné linie myších makrofágů RAW 264.7 byly pěstovány v médiu RPMI 1640, kde bylo obsaženo 10 % FBS, 1 % roztok penicilínu a streptomycinu, 1 % neesenciálních aminokyselin, 2 mmol glutaminu a 2 % glukózy. Následně byly buňky pěstovány v kultivačních lahvích 75 cm² s 15 ml DMEM média, které byly vloženy do inkubátoru, kde byla řízená atmosféra 5 % CO_2 a 37 °C, buňky byly sklizeny druhý den. Sklizení buněk probíhalo druhý den a uvolněny byly pomocí serologické stěrky. Následně byly buňky centrifugovány na odstředivce a poté bylo odstraněno staré médium a bylo nahrazeno 5 ml nového média. Poté k 1 ml této směsi bylo přeneseno do 9 ml nového média pro další kultivaci.

4.4.2 Inhibice oxidu dusnatého

Buňky naředěné na koncentraci 1×10^5 byly pipetovány do 96 jamkové destičky v množství 100 μ l. Destička byla vložena do CO_2 inkubátoru na 2 hodiny. Po uplynutí dvou hodin byly přidány testované vzorky společně s LPS o celkovém obsahu 100 μ l. Dosažené požadované koncentrace byly 1 – 0,03 % extraktu v mediu společně s 1 μ g/ml LPS. Následně připravená mikrotitrační destička byla vložena do CO_2 inkubátoru na dobu 24 hodin. Po 24 hodinách bylo odebráno 50 μ l supernatantu, který byl následně v nové 96 jamkové destičce smíchán s 50 μ l Griessova činidla.

Následně byla měřena absorbance při 540 nm. Obsah výsledného NO byl změřen pomocí kalibrační křivky dusitanu sodného.

4.4.3 Test cytotoxicity (MTT)

Test toxicity probíhal následně po testu inhibice NO. Z 96 jamkové destičky bylo odstraněno médium a přidáno nové médium MTT (1 μ g/ml) a vloženo do CO_2 inkubátoru na dobu dvou hodin. Následně bylo MTT odstraněno a nahrazeno 100 μ l DMSO. Absorbance byla naměřena při 555 nm a referenční hodnotě 720 nm. Procento životaschopných buněk bylo vypočteno v porovnání s neošetřenou kontrolou.

4.5 Statistické vyhodnocení

Zjištěná data byla vyhodnocena jako průměr \pm a směrodatná odchylka, dále byl proveden t-test pro vícenásobná porovnání s Bonferoniho korekcí na hladině významnosti $p < 0,5$. Lineární korelační koeficient (r) byl stanoven mezi metodami TPC a produkcí NO. Statistické vyhodnocení bylo provedeno v Excelu.

5 Výsledky

5.1 Výsledky stanovené metodou TPC

Množství celkových fenolových sloučenin bylo určeno metodou TPC a vyjádřeno jako ekvivalent kyseliny gallové. Největší množství fenolových sloučenin obsahoval etanolový vzorek č. 1 s hodnotami $116,74 \pm 2,88$ mg GAE/ml extraktu, druhé největší množství těchto látek měl vzorek č. 4 s hodnotami $77,5 \pm 2,66$ mg GAE/ml extraktu.

Tabulka 1: Antioxidační aktivita měřená metodou TPC vyjádřená v mg GAE/ml extraktu

TPC (mg GAE/ml extraktu)	
Vzorek	Průměr \pm SD
1	$116,74 \pm 2,88$
2	$63,58 \pm 1,27$
3	$72,65 \pm 0,25$
4	$77,05 \pm 2,66$
5	$53,23 \pm 0,63$
6	$63,51 \pm 1,81$
7	$53,17 \pm 4,09$
8	$56,19 \pm 1,07$
9	$61,83 \pm 1,67$
10	$76,21 \pm 4,35$

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr mg GAE/ml extraktu \pm směrodatná odchylka.

5.2 Výsledky stanovení produkce NO a cytotoxicity (MTT)

V první koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ bylo sedm statisticky významných vzorků pro schopnost snižovat produkci NO. Ve druhé koncentraci 25 $\mu\text{g/ml}$ byly statisticky významné tři vzorky pro schopnost snižovat produkci NO. Třetí koncentrace 12,5 $\mu\text{g/ml}$ ukázala statisticky významné tři vzorky pro schopnost snižovat produkci NO. Významnost rozdílů mezi jednotlivými vzorky byla stanovena pomocí t-testu na hladině významnosti $p < 0,05$, vzhledem ke kontrole s přídatkem LPS, která představovala 100 % produkce NO.

V žádném z 10 testovaných extraktů nebyla zjištěna cytotoxicita na buněčné linii myších makrofágů RAW 264.7. Všechny testované vzorky extraktů měly životaschopnost vyšší než 90 % oproti kontrole (tab. 2). T= toxické a životaschopnost < 90 %, N= netoxické a životaschopnost > 90 %.

Tabulka 2: Protizánětlivá aktivita vyjádřena v %

Vzorek	% Produkce NO			MTT
	EtOH	EtOH	EtOH	
	50 µg/ml	25 µg/ml	12,5 µg/ml	
	Průměr ± SD	Průměr ± SD	Průměr ± SD	
1	47,32 ± 6,53*	74,9 ± 6,46	87,50 ± 7,52	N
2	59,75 ± 1,70*	80,50 ± 3,75	96,52 ± 6,81	N
3	60,59 ± 7,17*	85,52 ± 7,44	98,05 ± 4,23	N
4	53,98 ± 8,79	78,62 ± 8,38	96,88 ± 4,72	N
5	57,42 ± 8,98	85,89 ± 1,45*	98,20 ± 4,55	N
6	56,94 ± 8,18	87,81 ± 14,31	96,40 ± 6,83	N
7	40,20 ± 5,08*	64,86 ± 7,16	79,76 ± 7,95	N
8	48,51 ± 9,34*	72,08 ± 3,58*	86,94 ± 1,26*	N
9	51,32 ± 6,88*	78,14 ± 5,80	88,83 ± 2,49	N
10	37,35 ± 10,03*	68,27 ± 9,33	81,74 ± 7,48	N

*statistická významnost $p < 0,05$; N – necytotoxická, T – cytotoxická koncentrace snižující životaschopnost makrofágů < 90 %.

Výsledky ukazují, že u koncentrace extraktu 50 µg/ml měla nejvýraznější schopnost snižovat produkci NO na buněčné linii RAW264.7. Vzorek č. 10 snižoval produkci NO o více než 62 %, ostatní vzorky se pohybovaly od 59,8 – 40,25 %. Koncentrace extraktu 25 µg/ml ukázala schopnost snižovat produkci NO od 21,92 % – 14,11 %. Nejmenší schopnost snižovat produkci NO byla změřena u nejnižší koncentrace extraktu 12,5 µg/ml a to o 13,06 %.

6 Diskuze

Užívání a konzumace nejrozličnějších druhů ovoce, zeleniny, léčivých rostlin či živočišných zdrojů, které mají pozitivní vliv na organismus, jsou datovány prakticky od začátku civilizace. Výjimku tvoří ani konopí. K domestikaci této rostliny došlo již před několika tisíci lety a už ve starověku byla tato rostlina hojně využívána. Z Asie se rozšířila prakticky po celém světě a stala se nedílnou součástí řady domorodých medicínských systémů. Ještě dříve, než lidstvo poznalo podrobněji složení rostlin, se konopí běžně využívalo pro své základní léčebné efekty. Nezřídka bylo konopí využíváno k léčbě bolesti, horečky, průjmu či jiných zdravotních problémů (Pollastro et al. 2018; Crocq 2020).

Také při dnešním způsobu života mnohých lidí najde konopí své uplatnění. V moderní společnosti velmi převažuje život s přemírou stresu, znečištěným životním prostředím, častou konzumací alkoholu, drog či užívání mnoha léků, to vše může být notným zdrojem dávky VR. Organismus disponuje přirozenou ochranou proti těmto vlivům. Pokud ale dlouhodobě dochází k vystavování organismu nadměrnému množství VR, dochází k dysbalanci (Neha et al. 2019). Dysbalance je dána nerovnováhou mezi tvorbou VR a schopností organismu takové látky neutralizovat. To může mít za následek vznik oxidačního stresu, čímž dochází mimo jiné ke snížení imunity, poškození DNA a vzniku mnoha nemocí. Z tohoto důvodu je v posledních letech kladen velký důraz na zvýšený příjem antioxidantů a protizánětlivých látek, které pomáhají dysbalanci zvrátit a ochránit tak organismus před vznikem chorob (Halliwell & Gutteridge 2015).

Chandra et al. (2017) a Zielonka et al. (2020) potvrzují, že k pozitivním efektům konopí dochází prostřednictvím jeho protizánětlivé a antioxidantní aktivity. To přináší velký zájem laické i vědecké části společnosti a vzrůstá počet vědeckých prací, které se zabývají touto tematikou. Přesto stále velké množství mechanismů není objasněných, a tak je potřeba provádět další studie, které pomohou tuto problematiku lépe pochopit a přinesou nové důkazy.

Hlavním cílem této práce bylo změřením antioxidantní a protizánětlivé aktivity 10 extraktů konopí a stanovením nejoptimálnější zralosti pro jejich další využití. Rostlinný materiál medicínského konopí byl pěstován uvnitř a hnojen dvěma způsoby hnojení. Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin nám laskavě poskytla extrakty pro testování, informace o koncentracích některých látek, údaje o hnojení a pěstování rostlin. Z výsledků je patrné, že v tomto pokusu, provedeném na Katedře agroenvironmentální chemie a výživy rostlin, ovlivnil rostliny spíše způsob hnojení než doba sklizně. Sklizeň proběhla 8. a 9. týden generativní fáze, v tomto případě neměl rozdílný stupeň zralosti významný vliv a lze říci, že obě doby sklizně jsou optimální. Kromě doby sklizně může mít vliv na obsah antioxidantů i způsob hnojení. To potvrzuje stále více důkazů, které ukazují, že výživa rostlin je hlavním faktorem ovlivňujícím růst a funkci rostlin, včetně vlivu na sekundární metabolismus (Bernstein et al. 2019).

Největší antioxidantní aktivita byla zjištěna metodou TPC u extraktu č. 1. Tento extrakt byl připraven z rostliny sklizené v 8. týdnu generativní fáze a živen hnojivem Emerald Harvest. Extrakt č. 1 obsahoval naměřené hodnoty $116,74 \pm 2,88$ mg GAE/ml. Další extrakty byly v rozmezí 77,05 – 53,17 mg GAE/ml. Podobných hodnot dosahovali i Isidore et al. (2021). Při jednom z měření výzkumníci uvedli, že největší hodnoty byly okolo 80,4 – 67 mg GAE/g z methanolového (MeOH) extraktu. Tato studie dále potvrzuje teorii, že chemický profil konopí

se liší také v závislosti na podmínkách pěstování. Uvádí, že u pěstování stejného kultivaru, ale v jiných lokalitách byl zaznamenán významný rozdíl v hodnotách TPC. Po změření jiné odrůdy v další části jejich pokusu dosáhly hodnoty TPC až 125,12 mg GAE/g (extrahováno v 80% EtOH) (Isidore et al. 2021).

Rostliny na výrobu extraktu z ČZU byly pěstovány uvnitř. Isidore et al. (2021) testovali venkovní rostlinný materiál. Výsledky testů však ukazují, že nebyl významný rozdíl v obsahu fenolických látek mezi rostlinami pěstovanými uvnitř a rostlinami pěstovanými venku.

Phupaboon et al. (2022) provedli porovnávání macerace a mikrovlnné extrakce s následným TPC testem. Bylo zjištěno, že proces mikrovlnné extrakce se zdá být o mnoho účinnějším než macerace MeOH. Při maceraci MeOH byl výsledek metody TPC u 11,3 mg GAE/g, ale při mikrovlnné extrakci dosahoval výsledek až 218,9 mg GAE/g. Dále byl (po mikrovlnné extrakci) metodou TPC měřen i kratom (*Mitragina speciosa*), jehož hodnoty dosahovaly až 306,9 mg GAE/g. Mikrovlnná extrakce nabízí řadu dalších výhod, jako jsou kratší extrakční doba, nižší spotřeba rozpouštědla či menší riziko degradace, na druhou stranu konvenční macerace má jednodušší postupy, obsluhu a nižší náklady na provedení.

Drinic et al. (2018) provedli metodu TPC, kdy použili EtOH v koncentraci od 30 % - 90 %. Jejich dosažené koncentrace byly v porovnání s extrakty z ČZU velmi malé, největší hodnota byla naměřena u 30% EtOH a dosahovala 10 mg GAE/g. Drinic et al. (2018) použili rostlinný materiál z instituce pro ekologickou produkci a biodiverzitu, to by mohl být důvod, proč je výsledek jejich TPC testování tolik rozdílný. Pravděpodobně použili zcela odlišný způsob pěstování rostlin (hnojení, substrát, ochranné prostředky, ...) a tak byl zaznamenán markantní rozdíl v obsahu celkových fenolových sloučenin.

U testů toxicity byly všechny vzorky negativní. Konopí je bráno jako nezávadné a lze ho konzumovat například v doplňcích stravy. Navíc má mnoho biologicky aktivních látek s léčebným charakterem, a proto není překvapivý negativní výsledek cytotoxicity. Metoda MTT toxicity je spojena s metodou produkce NO, která je zaměřena na protizánětlivé vlastnosti zkoumaných látek. Nejvýznamnější schopnost snižovat produkci NO na buněčné linii vyšla u extraktu č. 10 při koncentraci 50 µg/ml. Konkrétní hodnota inhibice produkce tohoto extraktu byla 62,65 %. Ostatní koncentrace nebyly tak významné, z toho vyplývá, že vzorek se snižující se koncentrací snižuje schopnost tlumit produkci NO.

Bor et al. (2006) provedli test produkce NO na buněčnou linii 264.7 při koncentraci 200 µg/ml u vodných extraktů lilku vejcoplodého (*Solanum melongena*). Inhibice produkce NO dosahovala až 80 % bez známek toxicity. Bor et al. (2006) spolu s Joo et al. (2014) uvádí, že obsah fenolických sloučenin extraktu může korelovat s inhibicí produkce NO. V našem pokusu však vyšlo, že porovnáním výsledků metody TPC a inhibice produkce NO nebyla prokázána statistická významnost mezi jednotlivými údaji. Proto lze říci, že mezi extrakty z ČZU neexistuje statisticky významný rozdíl mezi obsahem fenolů a snížením produkce NO. Je tak pravděpodobné, že v inhibici produkce hrají roli také jiné látky, například kanabinoidy. Z výsledku poskytnutých Katedrou agroenvironmentální chemie a výživy rostlin vyplývá, že například koncentrace THCA u vzorku č. 10 byla největší, konkrétně 1,8 mg/ml. To by mohlo předpoklad o vlivu kanabinoidů podpořit. Jinou možností, jak by mohlo dojít ke zvýšené inhibici NO by byla přítomnost dalších redukujících látek. Mezi tyto látky patří například kyselina salicylová, kyselina askorbová a další. Tyto látky mají také protizánětlivé vlastnosti. Vzhledem k tomu, že konopí obsahuje těchto dalších látek malé (nebo žádné) množství, tak

přítomnost kanabinoidů a fenolických látek (případně terpenů) hraje hlavní roli. Celkově lze vzorky z ČZU (především č. 1 a č. 10) hodnotit jako potenciálně prospěšné pro své antioxidační a protizánětlivé vlastnosti.

7 Závěr

Cílem práce bylo stanovit antioxidační a protizánětlivou aktivitu 10 (EtOH) vzorků konopí a stanovit optimální stupeň zralosti. Na zjištění antioxidační aktivity *in vitro* byla použita metoda TPC. Dále bylo zjištěno *in cellulo* protizánětlivé působení na buněčnou linii RAW264.7 s posouzením cytotoxicity pomocí MTT.

Stupeň zralosti *Cannabis spp.* má obecně vliv na antioxidační a protizánětlivou aktivitu extraktů. Nicméně práce potvrdila, že není významný rozdíl mezi sklizní v 8. a 9. týdnu a že optimální jsou v tomto případě obě varianty.

Vysoký obsah fenolových sloučenin měl extrakt č. 1, který obsahoval $116,74 \pm 2,88$ mg GAE/ml extraktu. Nejvýznamnější schopnost snižovat produkci NO na buněčné linii vyšla u extraktu č. 10 při koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$. Hodnota inhibice tohoto extraktu dosahovala až 62,65 % bez známky cytotoxicity. Bylo potvrzeno, že se snižující se koncentrací klesá schopnost tlumit produkci NO.

Mezi hodnotami metody TPC a inhibicí produkce NO nebyla statisticky významná korelace, proto vysokou protizánětlivou aktivitu lze připsat také jiným sloučeninám, jako například kanabinoidům.

8 Literatura

- Aguiar CCT, et al. 2012. Oxidative Stress and Epilepsy: Literature Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2012**: 1-12.
- Ahmad R, Hussain A, Ahsan H. 2019. Peroxynitrite: cellular pathology and implications in autoimmunity. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* **40**: 123-138.
- Allenspach M, Steuer Ch. 2021. A-Pinene: A never-ending story. *Phytochemistry* **190**: 1-7.
- Almeida CA, Barry SA. 2011. *Cancer: Basic Science and Clinical Aspects*. Wiley-Blackwell, UK.
- Ambrůzová B, Rádová M, Michálek J, Sachlová M, Slabý O. 2012. Nové poznatky v patogenezi Crohnovy choroby. *Vnitřní lékařství* **58**: 291-298.
- Araújo-Filho HG, Dos Santos JF, Carvalho MTB, Picot L, Fruitier-Arnaudin I, Groult H, Quintans-Júnior LJ, Quintans JSS. 2021. Anticancer activity of limonene: A systematic review of target signaling pathways. *Phytotherapy Research* **35**: 4957-4970.
- Backer DB, Maebe K, Verstraete AG, Charlier C. 2012. Evolution of the Content of THC and Other Major Cannabinoids in Drug-Type Cannabis Cuttings and Seedlings During Growth of Plants. *Forensic sciences* **57**: 918-922.
- Baron EP. 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**: 1139-1186.
- Behm B, babilas M, Landthaler M, Schreml S. 2011. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **26**: 812-820.
- Behr A, Johnen L. 2008. Myrcene as a Natural Base Chemical in Sustainable Chemistry: A Critical Review. *ChemSusChem* **2**: 1072-1095.
- Bernstein N, Gorelick J, Zerahia R, Koch S. 2019. Impact of N, P, K, and Humic Acid Supplementation on the Chemical Profile of Medical Cannabis (*Cannabis sativa* L). *rontiers in Plant Science* **10**: 1-13.
- Blackadar CB. 2016. Historical review of the causes of cancer. *World Journal of Clinical Oncology* **7**: 54-86.
- Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. 2015. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy* **9**: 1-9.
- Boháčová T. 2015. Úvod do imunogenetiky: MHC,BCR,TCR,IG. Univerzita Palackého v Olomouci, Katedra zoologie a antropologie. Available from

https://zoologie.upol.cz/old/osoby/fellnerova/imunologie_pdf/7_Uvod_do_imunogenetiky_MHC_BCR_TCR_Ig_2015_11text.pdf (accessed duben 2023).

- Bougea A, Koros Ch, Simitsi AM, Chrysovitsanou Ch, Loenardos A, Stefanis L. 2020. Medical cannabis as an alternative therapeutics for Parkinsons' disease: Systematic review. *Complementary Therapies in Clinical Practice* **39**: 1-9.
- Breugom AJ, et al. 2015. Adjuvant chemotherapy after preoperative (chemo)radiotherapy and surgery for patients with rectal cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *The Lancet Oncology* **16**: 200-207.
- 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.
- Carmona-Hidalgo, González-Mariscal I, García-Martin A, Prados ME, Ruiz-Pino F, Appendino G, Tena-Sempere M, Munoz E. 2021. Δ^9 -Tetrahydrocannabinolic Acid markedly alleviates liver fibrosis and inflammation in mice. *Phytomedicine* **81**: 1-14.
- Corey-Bloom J, Wolfson T, Gamst A, Jin S, Marcotte TD, Bentley H, Gouaux B. 2012. Smoked cannabis for spasticity in multiple sclerosis: a randomized, placebo-controlled trial. *Canadian Medical Association Journal* **184**: 1143-1150.
- Cowen PJ, Browning M. 2015. What has serotonin to do with depression?. *World Psychiatry* **14**: 158-160.
- Crocq MA. 2020. History of cannabis and the endocannabinoid systém. *Dialogues in Clinical neuroscience* **22**: 223-228.
- Dawidowicz AL, Oslozowy-Tomczyk M, Typek R. 2021. CBG, CBD, Δ^9 -THC, CBN, CBGA, CBDA and Δ^9 -THCA as antioxidant agents and their intervention abilities in antioxidant action. *Fitoterapia* **152**: 1-10.
- Devinsky et al. 2016. Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial. *The Lancet Neurology* **15**: 270-278.
- Devinsky et al. 2017. Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome. *New England Journal of Medicine* **376**: 2011-2020.
- Drinic Z, Vidovic S, Vladic J, Koren A, Biljana K, Sikora V. 2018. Effect of extraction solvent on total polyphenols content and antioxidant activity of *Cannabis sativa* L. *Lekovite sirovine* **38**: 17-21.
- Dunders G. 2020. *Imunitní odpověď v mikrobiologii*. Grada, Praha.

- Elsaid S, Kloiber S, Le Foll B. 2019. *Molecular Basis of Neuropsychiatric Disorders: from bench to Bedside*. Elsevier, USA.
- Elsain S, Kloiber S, Le Foll B. 2019. Effects of cannabidiol (CBD) in neuropsychiatric disorders: A review of pre-clinical and clinical findings. In: *Molecular Basis of Neuropsychiatric Disorders: from Bench to Bedside* **167**: 25-27.
- Ferenčík M, Rovenský J, Shoenfeld Y, Mat'ha V. 2011. *Imunitní systém*. Grada, Praha.
- Figura M, Dariusz K, Slawek J. 2022. Cannabis in Parkinson's Disease — the patient's perspective versus clinical trials: a systematic literature review. *Neurologia i Neurochirurgia Polska* **56**: 21-27.
- Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A. 2014. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* **55**: 475-482.
- Formenti SC, Demaria S. 2013. Combining Radiotherapy and Cancer Immunotherapy: A Paradigm Shift. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **105**: 256-265.
- Gaffal E, Cron M, Glodde N, Tüting T. 2013. Anti-inflammatory activity of topical THC in DNFB-mediated mouse allergic contact dermatitis independent of CB1 and CB2 receptors. *Allergy* **68**: 994-1000.
- Gertsch J, Leonti M, Raduner S, Racz I, Chen JZ, Xie XQ, Altmann KZ, Karsak M, Zimmer A. 2008. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 9099-9104.
- Giacoppo S, Bramanti P, Mazzone E. 2017. Sativex in the management of multiple sclerosis-related spasticity: An overview of the last decade of clinical evaluation. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* **17**: 22-31.
- Gopi S, Amalraj A, Kunnumakkara A, Thomas S. 2021. *Inflammation and natural products*.
- Gülck T, Moller BL. 2020. Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Trends in Plant Science* **25**: 985-1004.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford university press, UK.
- Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. 2020. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell* **38**: 167-197.
- Horáková D. 2011. Roztroušená skleróza – naše současné možnosti při diagnostice, stanovení prognózy nemoci a sledování efektivity léčby. *Neurologie pro praxi* **12**: 265-269.
- Hoseini SM, Khalili M, Rajabiesterabadi H, Hoseinifar SH, Van Doan H. 2020. Effects of dietary monoterpene, myrcene, administration on immune- and health-related genes

- expression in common carp gill following exposure to copper sulfate. *Fish & Shellfish Immunology* **98**: 438-445.
- Hou J, Zhang Y, Zhu Y, Zhou B, Ren Ch, Liang S, Guo Y. 2019. A-Pinene Induces Apoptotic Cell Death via Caspase Activation in Human Ovarian Cancer Cells. *Medical Science Monitor* **25**: 6631-6638.
- Chandra S, ElSohly MA, Lata H. 2017. *Cannabis sativa L. – Botany and Biotechnology*. Springer, Switzerland.
- Chatterjee S. 2016. Oxidative Stress, Inflammation, and Disease. In: *Oxidative Stress and Biomaterials*. Elsevier, Amsterdam.
- Iborra M, Moret I, Rausell F, Bastida G, Aguas M, Cerrillo E, Nos P, Beltrán B. 2011. Role of oxidative stress and antioxidant enzymes in Crohn's disease. *Biochemical Society Transactions* **39**: 1102-1106.
- Iffland K, Carus M, Grotenhermen F. 2016. Decarboxylation of Tetrahydrocannabinolic acid (THCA) to active THC. *EIEH* **1**: 1-3.
- Isidore E, Karom H, Ioannou I. 2021. Extraction of Phenolic Compounds and Terpenes from *Cannabis sativa L.* By-Products: From Conventional to Intensified Processes. *Antioxidants* **10**: 1-24.
- 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* **10**: 1-14.
- Joo T, Sowndhararajan K, Hong S, Lee Jaehak, Park SY, Kim S, Jhoo JW. 2014. Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by stem bark of *Ulmus pumila L.* *Saudi Journal of Biological Sciences* **21**: 427-435.
- Kabel AM. 2014. Free Radicals and Antioxidants: Role of Enzymes and Nutrition. *Journal of Nutrition and Health* **2**: 35-38.
- Kaczorová D, Béres T, Zeljkovič SČ, Bjelková M, Kuchař M, Tarkowski P. 2020. O konopí bez předsudků. *Chemické listy* **114**: 277-284.
- Kafil TS, Nguyen TM, Macdonald JK, Chande N. 2018. Cannabis for the treatment of Crohn's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **26**: 502-509.
- Kamran S, Sinniah A, Abdulghani MAM, Alshawsh MA. 2022. Therapeutic Potential of Certain Terpenoids as Anticancer Agents: A Scoping Review. *Cancers* **14**: 1100.
- Karlíčková J. 2019. Potenciální léčebné využití kanabidiolu (CBD) z konopí setého. *Praktické lékařství* **15**: 227-230.

- Kattoor AJ, Pothineni NV, Palagiri D, Mehta JL. 2017. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports* **19**: 1-11.
- Kendall DA, Yudowski GA. 2017. Cannabinoid Receptors in the Central Nervous System: Their Signaling and Roles in Disease. *frontiers in Cellular Neuroscience* **10**: 1-10.
- Khalili M, Attar M, Amirlatifi R, Maleki ZN, Hoseini SM. 2020. Effects of dietary myrcene administration on antioxidant gene responses in common carp (*Cyprinus carpio*), exposed to copper sulphate. *Aquaculture Research* **51**: 1653-1659.
- Kočárek E. 2010. *Biologie člověka*. Scientia, Praha.
- Koren A, Sikora V, Kiproviski B, Brdar-Jokanovic M, Acimovic M, Konstantinovic B, Latkovic D. 2020. Controversial taxonomy of hemp. *Genetika* **52**: 1-13.
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Turner J. 2021. *Pathologic basis of disease*. Elsevier, New York.
- Kurek J. 2019. *Alkaloids*. Elsevier, Chorvatsko.
- Lago R, Gisbert JP. 2020. The Role of Immunomodulators and Biologics in the Medical Management of Stricturing Crohn's Disease. *Journal of Crohn's and Colitis* **14**: 557-566.
- Landa L et al. 2020. *Léčebné konopí v současné medicínské praxi*. Grada, Praha.
- Leweke FM, Piomelli D, Pahlisch F, Muhl D, Gerth CW, Hoyer C, Klosterkötter J, Hellmich M, Koethe D. 2012. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry* **20**: 1-7.
- Lowe H, Steele B, Bryant J, Toyang N, Ngwa W. 2021. Non-Cannabinoid Metabolites of *Cannabis sativa* L. with Therapeutic Potential. *Plants* **10**: 1-16.
- Lukhele S, Motadi LR. 2016. Cannabidiol rather than *Cannabis sativa* extracts inhibit cell growth and induce apoptosis in cervical cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **16**: 2-16.
- Macášek J, Zeman M, Vecka M, Vávrová L, Kodydková J, Tvrznická E, Žák A. 2011. Reaktivní kyslíkové a dusíkové sloučeniny v klinické medicíně. *Časopis lékařů českých* **8**: 421-472.
- Milfortová L. 2010. Kanabinoidy. *Kontakt* **3**: 343-351.
- Mioviský M et al. 2008. *Konopí a konopné drogy: adiktologické kompendium*. Grada, Praha.
- Morehouse BR, Kumar RP, Matos JO, Olsen SN, Entova S, Oprian DD. 2017. Functional and Structural Characterization of a (+)-Limonene Synthase from *Citrus sinensis*. *Biochemistry* **56**: 1706-1715.

- Moudgil KD, Choubey D. 2011. Cytokines in Autoimmunity: Role in Induction, Regulation, and Treatment. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **31**: 695-703.
- Naftali T, Schleider LBL, Dotan I, Lansky EP, Benjaminov FS, Konikoff FM. 2013. Cannabis Induces a Clinical Response in Patients With Crohn's Disease: A Prospective Placebo-Controlled Study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **11**: 1276-1280.
- National Center for Biotechnology Information. 2023. PubChem Compound Summary for CID 10071695, Cannflavin A. NCBI, USA. Available from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cannflavin-A> (accessed March 2023).
- Neha K, Haider MR, Pathak A, Yar MS. 2019. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistr* **178**: 687-704.
- Novotná & Novák. 2012. *Alergie a astma*. Grada, Praha.
- Ošlejšková H. 2008. Epilepsie a její léčba. *Praktické lékařství* **4**: 55-59.
- Pagoretti V, Swanson KA, Bethea JR, Probert L, Eisel ULM, Fischer R. 2020. Inflammation and Oxidative Stress in Multiple Sclerosis: Consequences for Therapy Development. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2020**: 1-19.
- Pahwa R, Goyal A, Jialal. 2022. Chapter 16. The Human Microbiome in Health and Disease. Academic Press, London. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/> (Accessed January 2023).
- Papas AM. 2019. *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*. CRC Press, USA.
- Patel AA, Ginhoux F, Yona S. 2021. Monocytes, macrophages, dendritic cells and neutrophils: an update on lifespan kinetics in health and disease. *Immunology* **163**: 250-261.
- Phupaboon S, Matra M, Prommachart R, Totakul P, Supamong Ch, Wanapat M. 2022. Extraction, Characterization, and Chitosan Microencapsulation of Bioactive Compounds from *Cannabis sativa* L., *Cannabis indica* L., and *Mitragyna speciosa* K. *Antioxidants* **11**: 1-11.
- Pollastro F, Minassi A, Fresu LG. 2018. Cannabis Phenolics and their Bioactivities. *Current Medicinal Chemistry* **23**: 1160-1185.
- Punja ZK, Holmes JE. 2020. Hermaphroditism in Marijuana (*Cannabis sativa* L.) Inflorescences – Impact on Floral Morphology, Seed Formation, Progeny Sex Ratios, and Genetic Variation. *Frontiers in Plant Science* **11**: 1-20.
- Rádl S. 2021. Terapeutické využití látek ovlivňujících kanabinoidní receptory. *Chemické listy* **115**: 246-253.

- Raju K, et al. 2015. Regulation of brain glutamate metabolism by nitric oxide and S-nitrosylation. *Science Signaling* **8**: 1-10.
- Rangarajan T, Rajendran P, Nandakumar N, Lokeshkumar B, Rajendran P, Nishigaki I. 2015. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **5**: 182-189.
- Ravichandran Ch, Badgular PC, Gundev P, Upadhyay A. 2018. Review of toxicological assessment of d-limonene, a food and cosmetics additive. *Food and Chemical Toxicology* **120**: 668-680.
- Reddy DS, Golub VM. 2016. The Pharmacological Basis of Cannabis Therapy for Epilepsy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **357**: 45-55.
- Rieder SA, Chauhan A, Singh U, Nagarkatti M, Nagarkatti P. 2010. Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. *Immunobiology* **215**: 598-605.
- Rosa LA, Moreno-Excamilla JO, Rodrigo-Garcia J, Alvarez-Parrilla E. 2019. Phenolic Compounds. In: *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Elsevier, USA.
- Russo EB. 2011. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology* **163**: 1344-1364.
- Saurabh P, Manila B, Niraj T, Sonal P, Bansal YK. 2015. Secondary metabolites of plants and their role: overview. *Current trends in biotechnology and pharmacy* **9**: 293-304.
- Seltzer ES, Watters AK, Mackenzie D, Granat LM, Zhang D. 2020. Cannabidiol (CBD) as a Promising Anti-Cancer Drug. *Cancers* **12**: 2-26.
- Shrivastava A, Kuzontkoski PM, Groopman JE, 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**: 1161-1172.
- Schicho R, Storr M. 2013. Cannabis Finds Its Way into Treatment of Crohn's Disease. *Pharmacology* **93**: 1-3.
- Sládková V. 2015. Diagnostika roztroušené sklerózy, typické klinické příznaky. *Medicína pro praxi* **12**: 236-242.
- Small E. 2015. Evolution and Classification of Cannabis sativa (Marijuana, Hemp) in Relation to Human Utilization. *The botanical review* **81**:189-294.
- Sommano SR, Chittasupho Ch, Ruksiriwanich W, Jantrawut P. 2020. The Cannabis Terpenes.

- Tewari et al. 2021. Role of Nitric Oxide in Neurodegeneration: Function, Regulation, and Inhibition. *Current Neuropharmacology* **19**: 114-126.
- Tomko AM, Whynot EG, Dupré DJ. 2022. Anti-cancer properties of cannflavin A and potential synergistic effects with gemcitabine, cisplatin, and cannabinoids in bladder cancer. *Journal of Cannabis Research* **4**: 1-14.
- Večlová J, bednářová I, Pospíšil L, Erbanová Z. 2012. Parkinson. *Společnost Parkinson* **37**: 1-40.
- Velasco G, Sánchez C, Guzmán M. 2016. Anticancer Mechanisms of Cannabinoids. *Current Oncology* **23**: 22-32.
- Velayudhan L, Diepen E, Suribhatla S, Prettyman R. 2013. Therapeutic Potential of Cannabinoids in Neurodegenerative Disorders: A Selective Review. *Current Pharmaceutical Design* **20**: 1-13.
- Vezikov L, Simpson M. 2022. *Plant Alkaloids Toxicity*. StatPearls, USA.
- Vitolo M. 2019. Overview on the biological role of free radicals. *WJPR* **13**: 23-46.
- Vucković S, Srebro D, Vujović KS, Vučetić Č, Prostran M. 2018. Cannabinoids and Pain: New Insights From Old Molecules. *Frontiers in Pharmacology* **9**: 1-19.
- Warraich UM, Hussain F, Ur H, Kayani R. 2020. Aging - Oxidative stress, antioxidants and computational modeling. *Heliyon* **6**: 1-11.
- Yoon WY, Lee NH, Hyun ChG. 2010. Limonene Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Production of Nitric Oxide, Prostaglandin E2, and Pro-inflammatory Cytokines in RAW 264.7 Macrophages. *Journal of Oleo Science* **59**: 415-421.
- Zhao Y, Chen R, Wang Y, Yang Y. 2018. Inhibits Human Prostate Cancer Growth in a Mouse Xenograft Model. *Chemotherapy* **63**: 1-7.
- Zielonka DM, Kiraga L, Kozłowski RM. 2020. Medical potential of cannabis: an overview. *Handbook of natural fibres* **2**: 419-448.

9 Seznam použitých zkratek

CB ₁ , CB ₂	endokanabinoidní receptory
CBD	kanabidiol
CNS	centrální nervová soustava
ČR	Česká republika
ČZU	Česká zemědělská univerzita
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECS	endokanabinoidní systém
EtOH	etanol
FBS	fetální bovinní sérum
GAE	kyselina gallová
LPS	lipopolysacharid
MeOH	metanol
MTT	kolorimetrická metoda využívající mitochondriální rozklad 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid na formazan
NK	natural killer cells
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
RAW264.7	buněčné makrofágy
RNS	reactive nitrogen species, volné dusíkové radikály
ROS	reactive oxygen species, volné kyslíkové radikály
RPMI	roswell park memorial institute medium
SD	směrodatná odchylka
SOD	superoxiddizmutáza
THC	tetrahydrokanabinol
THCA	tetrahydrokanabinolová kyselina
TPC	total phenolic content, celková antioxidační kapacita
UK	Velká Británie
USA	Spojené státy americké
UV	ultrafialové záření
VR	volné radikály

10 Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1	schéma fagocytózy
Obrázek 2	konopí seté
Obrázek 3	strukturní vzorec anandamidu
Obrázek 4	strukturní vzorec THC
Obrázek 5	chemická struktura CBD
Obrázek 6	chemická struktura THCA
Obrázek 7	chemická struktura limonenu
Obrázek 8	chemická struktura pinenu
Obrázek 9	chemická struktura myrcenu
Obrázek 10	chemická struktura karofylenu
Obrázek 11	chemická struktura kannflavinu A
Obrázek 12	chemická struktura kanabisativinu
Tabulka 1	Antioxidační aktivita měřená metodou TPC vyjádřená v mg GAE/ml extraktu
Tabulka 2	Protizánětlivá aktivita vyjádřena v %