

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakognozie



Studium metabolismu

v *in vitro* kulturách *Cannabis sativa* L.

Disertační práce

Mgr. Jaroslav Peč

Školitel: Doc. RNDr. Jaroslav Dušek, CSc.

Hradec Králové 2010

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Děkuji Doc. RNDr. Jaroslavu Duškovi, CSc. za odborné vedení mého postgraduálního studia. Za finanční podporu děkuji výzkumnému záměru MSM0021620822, programu Erasmus, Fondu mobility Univerzity Karlovy a firmě Zentiva a.s.

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu 261 002 / 2010.

V Hradci Králové 1.1.2010

Mgr. Jaroslav Peč

I.	ÚVOD	1
II.	CÍL PRÁCE	3
III.	TEORETICKÁ ČÁST	4
1.	KONOPÍ SETÉ, <i>CANNABIS SATIVA</i> L.	4
1.1	<i>Botanický popis rostliny</i>	4
1.2	<i>Původ výskytu a historie využívání</i>	6
1.3	<i>Charakteristika drogy</i>	8
1.4	<i>Pěstování konopí</i>	10
1.5	<i>Toxicita</i>	12
1.6	<i>Ostatní využívané konopné suroviny</i>	13
1.7	<i>Konopný olej</i>	14
1.8	<i>Legislativa související s konopím</i>	14
1.8.1	<i>Forenzní analýza</i>	16
2.	OBSAHOVÉ LÁTKY <i>CANNABIS SATIVA</i> L.	18
2.1	<i>Kanabinoidy</i>	18
2.2	<i>Ostatní významné sekundární metabolity konopí</i>	23
2.3	<i>Obsahové látky konopného oleje</i>	26
3.	FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI	29
3.1	<i>Lidský endokanabinoidní systém</i>	29
3.2	<i>Terapeutické využití kanabinoidů a používaná léčiva</i>	32
3.2.1	<i>Nežádoucí účinky, bezpečnost a interakce s ostatními léky</i>	38
3.2.2	<i>Aplikační lékové formy a farmakokinetika</i>	41
3.3	<i>Ostatní sekundární metabolity s významnými farmakologickými vlastnostmi</i>	44
3.4	<i>Farmakologické účinky a potenciál využití polynenasycených mastných kyselin konopného oleje</i>	44
4.	ROSTLINNÉ BIOTECHNOLOGIE	48
4.1	<i>Explantátové kultury</i>	48
4.2	<i>Podmínky kultivace</i>	48
4.2.1	<i>Živné médium</i>	48
4.2.2	<i>Fyzikální a chemické podmínky kultivace</i>	50
4.2.3	<i>Kultivační zařízení</i>	50
4.3	<i>Růst a množení buněk, růstová křivka</i>	51
4.4	<i>Využití explantátových kultur</i>	51
4.5	<i>Metody ovlivnění produkce sekundárních metabolitů</i>	52
5.	METABOLOMIKA JAKO SOUČÁST FUNKČNÍ GENOMIKY	55
5.1	<i>Využití analytických metod v metabolomice se zaměřením na NMR</i>	56
5.2	<i>Analýza hlavních komponent (PCA)</i>	58
IV.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	60

1.	PŘÍSTROJE.....	60
2.	CHEMIKÁLIE.....	61
3.	TKÁŇOVÁ KULTURA <i>CANNABIS SATIVA</i> L.....	62
3.1	<i>Tkáňová kultura</i>	62
3.2	<i>Živné médium</i>	62
3.3	<i>Kontaminační test</i>	63
3.4	<i>Tvorba kalusové kultury</i>	64
3.5	<i>Elicitace – jasmonová kyselina, pektin</i>	65
3.6	<i>Somatická embryogeneze</i>	65
4.	ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ, EXTRAKCE A INSTRUMENTÁLNÍ ANALÝZA	67
4.1	<i>Odebírání a zpracování vzorků</i>	67
4.2	<i>Extrakce média a příprava vzorků pro NMR analýzu</i>	67
4.3	<i>Extrakce buněčného materiálu a příprava vzorků pro NMR analýzu</i>	68
4.4	<i>Extrakce na pevné fázi</i>	68
4.5	<i>NMR analýza a zpracování spekter</i>	68
4.6	<i>HPLC-MS analýza</i>	69
5.	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ	71
V.	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	73
1.	BIOTECHNOLOGICKÉ VÝSLEDKY KULTIVACE, KONTAMINAČNÍ TESTY, TVORBA KALUSOVÝCH KULTUR A SOMATICKÝCH EMBRYÍ	73
2.	FRAKCE METANOL-VODA	80
2.1	<i>Linie GC:</i>	84
2.2	<i>Linie GB:</i>	103
3.	FRAKCE MÉDIA	122
4.	FRAKCE CHLOROFORM	142
5.	CHEMICKÁ ANALÝZA HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ	150
VI.	ZÁVĚR	158
VII.	SUMMARY	160
VIII.	POUŽITÉ ZKRATKY	162
IX.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	164
X.	OBRAZOVÁ PŘÍLOHA	174
XI.	SEZNAM PUBLIKACÍ A PŘEDNÁŠEK	177
XII.	PODĚKOVÁNÍ.....	179

I. Úvod

Předkládaná disertační práce je zaměřena na studium tradiční, avšak kontroverzní léčivé rostliny, konopí setého (*Cannabis sativa* L.). Práce zahrnuje stručnou historii, základní botanický popis, farmakognostické a farmakologicko – terapeutické informace, kde je kladen důraz na shrnutí již využívaných léčiv odvozených případně souvisejících s konopím a jeho obsahovými látkami a na další perspektivy využití ve farmacii a medicíně. Biosyntéza a chemické rozdělení nejdůležitějších sekundárních metabolitů jsou také uvedeny. V krátkosti jsou zmíněny další využívané konopné suroviny. Vlastní experimentální práce je založena na využití biotechnologických postupů, chemické analýzy rostlinných metabolitů především pomocí NMR s metabolomickým přístupem v rámci funkční genomiky. Související kapitoly jsou součástí teoretické části práce.

Léčivé rostliny z tradičních systémů medicíny, jako například Číny nebo Indie případně dalších vyspělých kultur, představují důležitý zdroj informací díky tisíciletým zkušenostem s jejich využíváním. Dalšími nejvíce zkoumanými perspektivními teritorii jsou tropické oblasti Střední a Jižní Ameriky, jižního Tichomoří nebo jižní Afriky, které vynikají obrovskou biodiverzitou a výskytem endemických druhů ¹⁾. Mořské organizmy představují další z velké části neprobádanou oblast. Nelze ovšem také opomíjet tradiční rostliny Evropy, u kterých může panovat přesvědčení, že jsou již zcela prozkoumány. Opak je pravdou. I známé tradiční rostliny stále mohou vydat zajímavé látky, především s využitím moderních analytických a farmakologických postupů ²⁾.

Právě konopí seté a jeho obsahové látky lze zhodnotit následující větou: „Od etnofarmakologie k moderním léčivům“. Etnofarmakologie je věda, která objevuje zapomenutá přírodní léčiva našich předků, především léčivé rostliny, zkoumá jejich původní účinky a v konfrontaci s moderními vědeckými postupy využívá poznatků tisíciletého soužití lidí s okolní přírodou a jejími dary ^{3, 4)}. I když konopí zapomenuto nikdy úplně nebylo, především díky jeho potenciálu ke zneužívání, bylo dlouhou dobu zatracováno a legislativně omezeno, což mělo negativní dopad na jeho výzkum. Vědecký pokrok ovšem dokazuje oprávněnost používání kanabinoidů, jejich syntetických derivátů a látek ovlivňujících biosyntézu a degradaci endogenních kanabinoidů v terapii řady významných chorob a je důležité tyto medicínské úspěchy oddělit od snah zneužití konopí pouze jako drogy. Jen díky výzkumu této tradiční rostliny byl objeven lidský endokanabinoidní systém, na základě kterého mohou vzniknout nová léčiva pro závažné choroby. K moderním a bezpečným

léčivům vede dlouhá cesta, mnoho výzkumů na poli chemie, farmakologie a klinických studií. Je ale pravděpodobné, že léčiva v počátku založená na výzkumu konopí budou sloužit lidem při zdolávání chorob i v České republice, tak jako již v některých státech světa pomáhají ⁵⁾.

Mnoho chemických sloučenin lidstvo stále nedokáže získat jiným způsobem než využitím geniální rostlinné chemické továrny. V posledních letech se však stále obtížněji zajišťuje přísun těchto přírodních surovin, neboť dochází ke zmenšování rostlinných zdrojů v souvislosti s narušováním životního prostředí. Sběr divoce rostoucích léčivých rostlin i jejich polní pěstování je značně sezónní záležitostí závislou na mnoha dalších faktorech, nehledě k tomu, že i díky nadměrnému těžení rostlin z přírodních zdrojů vzniká nebezpečí jejich úplného vyhubení. Rostlinné zdroje z kvantitativního hlediska také přestávají stačit potřebám moderní medicíny, což je často způsobeno nízkou produkcí zajímavých látek, případně jejich lokalizací v obtížně přístupných rostlinných orgánech, nebo neúměrně dlouhou dobou růstu. Velké úsilí je proto věnováno na vypracování finančně zajímavých postupů výroby žádaných rostlinných látek pomocí alternativních zdrojů, kde můžeme zařadit i explantátové kultury rostlin ^{6, 7)}.

Díky stále se vyvíjejícím metodám analytické chemie, technologických postupů a především také díky genovým manipulacím, geometricky narůstá objem získaných dat a tím vzniká také potřeba nových přístupů ve zkoumání živých systémů. Jedním ze zajímavých pohledů systémové biologie je metabolomika, která je využívána v této práci. Metabolomický přístup se snaží hodnotit veškeré produkované metabolity kvalitativně i kvantitativně a v kooperaci s dalšími –omik metodami funkční genomiky tak skládat informace o živém organismu s cílem využít tyto poznatky k ovlivnění studovaného systému. Metabolomický přístup v rámci funkční genomiky může poskytnout mnoho důležitých informací pro pochopení studovaných procesů a dále se také jedná o bouřlivě se vyvíjející metodologický přístup a analytické metody, kterých lze využít jak v primárním výzkumu tak aplikované v technologiích např. farmaceuticko medicínských, v biotechnologickém nebo potravinářském průmyslu. Na druhou stranu sebou tyto přístupy přináší nejednu komplikaci oproti tradiční chemické analýze. Jedná se především o využití vhodných analytických metod a díky zkoumání velkých sad vzorků vzniká také nutnost využití účinných statistických nástrojů ^{8, 9)}.

II. Cíl práce

Cílem této práce bylo studium explantátových kultur odvozených z *Cannabis sativa* L. a to v následujících oblastech:

- Vyhledat informace o rostlině *Cannabis sativa* L. se zaměřením na sekundární metabolity, farmakologii, léčiva a související problematiku této rostliny v České republice.
- Podrobení již vytvořených kultur kontaminačním testům a výběr vhodných kandidátů pro experiment na základě biotechnologických vlastností.
- Identifikace a kvantifikace metabolitů produkovaných neovlivněnými suspenzními kulturami s využitím analytické metody NMR.
- Elicitace suspenzních kultur a jejich dlouhodobé sledování s využitím metabolomického přístupu – NMR chemická analýza doplněná statistickým zpracováním pomocí PCA.
- Iniciací somatické embryogeneze a vliv na produkci obsahových látek.
- Analýza vybraných vzorků s využitím hmotnostní spektrometrie zaměřená na identifikaci kanabinoidů.

III. Teoretická část

1. Konopí seté, *Cannabis sativa* L.

Konopí a jeho produkty jsou velice rozsáhlou kapitolou, která zasahuje do mnoha odvětví lidské činnosti. Jedná se například o způsoby pěstování jak technického konopí, tak kultivarů s vysokým obsahem kanabinoidů. S tímto souvisí problematika šlechtění, agrotechnologických postupů pěstování nebo technologie zpracování jednotlivých částí rostliny. Důležitá je také problematika pěstování konopí s vysokým obsahem psychoaktivních látek (kanabinoidů) například pro farmaceutické účely, kde je ovšem nutné akceptovat zákonné požadavky. Dalšími oblastmi potenciálního zájmu je oblast práva určující hranice používání konopných produktů, psychologie a léčba drogové závislosti a další oblasti spojené se zneužíváním této rostliny. Z farmaceutického hlediska jsou zajímavé kanabinoidy a jejich farmakologické účinky, které jsou z části prozkoumány a používají se již ve farmakoterapii. Na druhou stranu je stále mnoho neprozkoumaných oblastí účinků těchto látek a stále probíhá jejich intenzivní výzkum, stejně tak jako dalších doprovodných metabolitů. Z mnoha empirických pozorování, jak současných tak etnodisciplín, lze také dále vyhledávat možné benefity a rizika používání konopí a využít je na poli vědeckých výzkumů.

1.1 Botanický popis rostliny

Říše	Plantae
Oddělení	Magnoliophyta
Třída	Magnoliopsida
Podtřída	Dilleniidae
Řád	Urticales
Čeleď	<i>Cannabaceae</i>

Cannabaceae neboli konopovité jsou obecně jednoleté až vytrvalé byliny s přímou nebo ovíjivou lodyhou se vstřícnými listy. Květy jsou dvoudomé ve vrcholičnatých květenstvích, plodem je nažka. Patří sem rody *Humulus* a *Cannabis* zastoupené rostlinami *H. lupulus* L. (chmel otáčivý), *H. scandens* (Lour.) Merrill (chmel japonský), *C. sativa* L. (konopí seté, konopě setá) a *C. ruderalis* Janisch. (konopí rumištní)^{1, 10}.

Taxonomie konopí prošla obdobím mnoha debat, jak o zařazení do čeledi, tak také jestli se jedná o rod s výskytem jednoho druhu nebo více jednotlivých druhů (především *C. sativa*, *C. indica* a *C. ruderalis*). Jeden široce přijatý taxonomický systémem konopí uvádí rod *Cannabis* jako jednodruhový *sativa* s dalším rozlišením na poddruhy subsp. *sativa* a *indica* a na další variety. V novější literatuře je ovšem spíše upřednostňován jednodruhový systém *Cannabis sativa* s rozlišením o jakou chemovarietu se jedná podle zastoupení obsahových látek. Tento poslední systém je odůvodňován především rozsáhlým šlechtěním konopí během posledních století na dvě základní větve – pro produkci vláken a pro produkci kanabinoidů, s čímž souvisí i vznik širokého rozpětí fenotypů rostliny. Pro potřebu porovnání jednotlivých rostlin byly vytvořeny systémy hodnocení na základě obsahu jednotlivých kanabinoidů. K nejrozšířenějším patří systém navržený Wollerem, který zohledňuje obsah psychoaktivního THC a jeho rozkladného produktu CBN proti nepsychoaktivnímu CBD. Turner dále navrhl další model, který bere v úvahu širokou škálu kanabinoidů, nebo lze zmínit rozdělení rostlin do jednotlivých typů přímo podle obsahu THC a CBD ^{11, 12}).

Systém podle Wollera $\frac{\Delta^9\text{-THC}}{\text{CBD}}$

Systém podle Turnera $\frac{\Delta^9\text{-THC} + \text{CBN} + \text{THC} + \text{THCV} + \text{THC-P} + \text{THC-D} + \text{THC-O} + \text{THC-P} + \text{THC-D} + \text{THC-O}}{\text{CBD} + \text{CBN} + \text{CBG} + \text{CBG} + \text{CBG} + \text{CBG} + \text{CBG} + \text{CBG}}$

- poměr > 1: narkotický typ; $\Delta^9\text{-THC} > 1 \%$, $\text{CBD} = 0$.
- poměr = 1: přechodný typ; $\Delta^9\text{-THC} > 0,5 \%$, $\text{CBD} > 0,5 \%$.
- poměr < 1: typ pro vlákna; $\Delta^9\text{-THC} < 0,25 \%$, $\text{CBD} > 0,5 \%$.

Konopí je jednoletá bylina, vzpřímená, v horní polovině krátce větvená, s hranatou dutou a dřevnatějící lodyhou. Rostlina dorůstá obvykle výšky 1 až 6 m. Řapíkaté listy jsou dlanitě složené s pilovitými podlouhlými až kopinatými lístky, na vrcholu dlouze celokrajně zašpičatělými. Spodní listy jsou vstřícné nejčastěji 5 až 7 čtené, výše postavené jsou střídavé s 1 až 3 lístky. Květy jsou jednopohlavné, dvoudomé; prašníkové v řídkých úžlabních nebo koncových vrcholičnatých latách, pestíkové pak tvoří velmi redukovaná vrcholičnatá květenství skládající husté, bohatě olistěné klasy. Okvětní lístky prašníkových květů jsou zelenavé, s úzkým bělavým lemlem obepínající 5 tyčinek. Pestíkové květy tvoří nepatrné okvěti s nápadně dlouhými (až 20 mm) bílými, růžovými nebo žlutavě zelenými bliznami. Pohlaví není rozeznatelné, dokud rostlina nevyspěje a nezačne kvést. Plody jsou vejcovité až

elipsoidní nažky, šedavě bílé až světle hnědé s jemně síťovanou skulpturou na povrchu, obalené zaschlým okvětím a uzavřené v obalu z podpůrného listenu (příloha 1) ^{1, 10)}. Ze semen klíčí přibližně stejné množství samčích a samičích rostlin ¹³⁾.

1.2 Původ výskytu a historie využívání

Původní oblast rozšíření konopí je stejně jako taxonomie tohoto druhu komplexní směsí různých výzkumů, lišící se dle popisu jednotlivých autorů. Shoda panuje ve zjištění, že konopí je původní druh centrální Asie, rozprostírající se od Kaspického moře, přes jižní a centrální část Ruska, až po sever Indie a jihozápadní část Himálají. Nynější země Kyrgyzstán, Kazachstán, Tádžikistán, Afganistan, Mongolsko a dále severozápad Číny představují původní oblasti výskytu. Konopí pravděpodobně provázelo nomádské kmeny a rozšiřovalo se spolu s osídlovanými oblastmi.

Vzhledem k původnímu rozšíření až v oblasti jižní Číny bylo konopí známé a písemně zaznamenané již ve 3. tisíciletí př. n. l. čínským vládcem Shen-Nungem (i když písemně pravděpodobně pochází až z 1. století). Konopí bylo používáno při revmatismu, gynekologických problémech, roztržitosti nebo malárii. Využívalo se také pro své anestetické a analgetické vlastnosti v dávné chirurgii například formou vinného výluhu. Ze starověkého Egypta lze zmínit snad nejstarší text na kameni z Pyramid v Memphisu datující se okolo 2350 př. n. l a Papyry Ramassův III a Ebersův datující se do 16. a 17. století př. n. l. Konopí bylo používáno orálně, ale také jako klystýr, v očních přípravcích nebo v podobě léčivých obvazů. Další zdroje vypovídají také o vaginální aplikaci nebo o vykuřovadlu. Pravděpodobně již tenkrát byly odhaleny účinky protizánětlivé, anthelmintické, antiparazitární nebo využití při glaukomu. Konopí se přirozeně v Egyptě nevyskytovalo, proto bylo pravděpodobně dostupné pouze pro vyšší vrstvy obyvatel, které také zastávali důležité kněžské posty. Indické nejranější zmínky můžeme nalézat v Atarvavédě, která je datována 2000 let př. n. l. Konopí tvoří důležitou část rostlinného instrumentáře tradiční medicíny, Ajurvédy, a shrnutí indikací konopí v Indii z 20. století tvoří úctyhodný seznam. Z oblasti Mezopotámie se dochovaly hliněné tabulky se záznamy o terapeutickém využití konopí (2000 př. n. l.). Asyřané například používali konopí orálně pro léčbu impotence nebo deprese, topicky na pohmožděniny, nebo inhalováním při arthritidě. Bible neobsahuje zřejmé zmínky týkající se konopí. Lze pouze odvozovat na základě podobnosti slov ostatních civilizací.

Z prehistorické Evropy a Skythie (území rozkládající se v oblasti dnešní Ukrajiny až po Indii) se dochovaly mísy zdobené výrazy stočeného provazu, které byly používány pro

spalování konopí na rozžhavených kamenech a inhalování vznikajícího kouře. Pravděpodobně se spalovaly hrudky pryskyřice, nebo celá rostlina. Konopná semena jsou nejtrvanlivější z celé rostliny a byla objevena v neolitických vykopávkách v oblasti Německa, Švýcarska, Rakouska a Rumunska.

At' se to zdá jakkoli zvláštní, antické literární památky nám neskýtají téměř žádné informace týkající se užívání konopí. Zdá se, že psychoaktivní účinky pro ně nebyly moc přitažlivé a dávali spíše přednost alkoholu, který byl dostupnější a levnější. Další z příčin mohlo být také kouření (inhalování), které bylo pro většinu antických civilizací neznámé. Skythie, od které mohly zvyk inhalování páleného konopí převzít, pro ně byla barbarská země a tento primitivní zvyk se nerozšířil. Existují literární zmínky týkající se botanického zařazení, pěstování konopí a zpracování vláken. Z medicínálního využití nás Plinius starší upozorňuje na konopná semena, která způsobují impotenci, léčí bolesti uší a vyhání z nich červy a ostatní stvoření, avšak za cenu bolesti hlavy. Dále přisuzuje konopí úpravu zažívání a odvar z kořene používá pro jeho analgetický účinek při silných bolestech jako například u dny. Dioskorides a Galen zmiňují snížení sexuální potence a účinek při bolesti uší. Pseudo-Apuleius přidává recepty na studené bolesti (konopí, kopřivová semena a ocet) a otok hrudníku (konopí s tukem). Je zajímavé, že Plinius starší, Galen i další autoři přisuzují účinek semenům, což je část rostliny, která obsahuje minimum účinných kanabinoidů. Možné vysvětlení je že autoři špatně interpretovali Skythijské praktiky při spalování celé rostliny, po které zůstávala pouze semena, nebo že zaměnili používané kousky pryskyřice za semena.

Persie a Arábie je spjata s konopím dlouhou tradicí a svědčí o tom i název drogy hašiš, který pochází z arabské fráze „hashish al kief“ což znamená „sušená droga radosti“. Literárních zmínek pocházejících z této oblasti týkajících se konopí je mnoho, kde jednou z nejznámějších je příběh sekty hashishinů (později zkomoleno na „assasin“ neboli vrah), kde vystupuje i postava Aladina, ovšem není jisté, jestli je tato verze pravdivá. Podle arabského receptáře „Makhsanul aldawaiya“ bylo konopí považováno za drogu utišující, vstřebávající žluč, aperitiv a při mírném užívání prodlužující život. Zrychluje představivost, prohlubuje myšlení a zlepšuje rozhodování. Rumphius uvádí v „Herbarium amboinence“ z roku 1095 použití konopí při léčbě gonorey a astmatu. Konopí bylo používáno jako anestetikum před operacemi. V tradiční medicíně bylo ovšem také popsáno že konopí způsobuje šílenství, bezvědomí, oslabuje srdce, potlačuje tvorbu spermií a znemožňuje kontrolu nad ejakulací ^{12, 14, 15}.

Tab. 1: dochované složení lektvarů s obsahem konopí ¹²⁾:

Název	Složení	Původ
Zabibah	Konopí, opium, med	Egypt
Barsh	Konopí, semena máku, květy durmanu, muškátový oříšek, hřebíček, šafrán. Vařeno v mléce s cukrem.	Persie
Sabzi	Konopí, semena máku, okurková semena, černý pepř, kardamom. Utlučeno v hmoždíři a přidáno mléko.	Persie

V Evropě se o konopí dozvídáme ve 12. století od Hildegardy z Bingenu (analgetické účinky). Peter Schoofer uvádí v herbáři z roku 1485 použití při gastrointestinálních problémech, při edému, jako náplast na popáleniny a analgetikum. V 16. století se objevují herbáře od autorů Otto Brunfelse, Hieronymuse Bocka nebo Leonhardta Fuchse, dále v českých zemích známý Mattioliho herbář a v 17. století jsou z anglosaské tvorby známy herbáře od Johna Gerarda, Johna Parkinsona a nejnámější od Nicholase Culpepera. Všechna tato díla ovšem čerpají z prací Řeckých a Římských autorů Plinia, Galéna nebo Dioskorida bez významných nových informací ^{14, 16, 17, 18)}.

Evropa 19. století je charakterizována podrobnějšími výzkumy a rozvojem věd. V oblasti medicínálního využití konopí byly také učiněny velké pokroky oproti pouhému kopírování antických autorů. V polovině 19. století byla marihuana v Evropě využívána jako hypnotikum, antikonvulsant, analgetikum, anxiolytikum a antitusikum v různých lékových formách. Především u východoevropských národů se konopí dostalo do místních lidových zvyků a tradic. Postupem času začalo být zneužíváno a začátkem 20. století bylo zařazeno jako nelegální prostředek i přes doporučení lékařů nebo vědců a úplně vymizelo z terapie. Časté zmínky jsou o využití bohémy, kteří ji požívali k umělecké tvorbě ^{12, 14, 15)}.

1.3 Charakteristika drogy

Makroskopická charakteristika: Droga je tmavě zelené nebo zeleno hnědé barvy, skládající se ze 1,5 až 3 cm velkých květenství. Pryskyřice už není lepkavá, ale je tvrdá a křehká. Pach, který je velmi ceněný u čerstvé drogy, je slabý. Droga má lehce hořkou chuť. Lze nalézt oválné konopné semeno. Pryskyřice je žlutá až hnědá amorfni polotuhá látka, rozpustná v alkoholu, etheru a karbon disulfidu ¹⁹⁾.

Mikroskopická charakteristika: Pryskyřice je sekretována přisedlými nebo stopkovitými žlaznatými trichomy, 130 – 250 µm dlouhými. Hlava trichomu je obvykle osmi buněčná a stopka jednobuněčná nebo složená z více řad buněk. Stopkaté žlaznaté trichomy jsou zastoupeny pouze na listenech a okvětních lístcích, přisedlé žlaznaté trichomy jsou přítomny především na listech. K odlišení těchto trichomů od ostatních (např. *Lamiaceae*) lze použít barvení Fast Blue B, které se skládá z vanilinaldehydu v etanolicím roztoku kyseliny sírové a barví kanabinoidy sytě červeně. Další trichomy jsou přisedlé kónické jednobuněčné, s obsahem cystolitů uhličitanu vápenatého v rozšířených základnách. Posledním typem jsou hojné krycí trichomy pokrývající celou rostlinu (příloha 3) ^{11, 19)}.

Sklízí se celé rostliny, které jsou v temnu usušeny a všechny nadzemní části, kromě hlavního stonku, jsou použity pro extrakci obsahových látek. Pro přípravu farmaceutické drogy Cannabis flos se využívají neoplozená květenství ze samičí rostliny, přičemž centrální stonky květenství a větší listy jsou odstraněny (příloha 2). Samčí rostlina může poskytovat také vysoký obsah kanabinoidů, ale většinou neprodukuje tak velké množství rostlinného materiálu ^{11, 20)}. Aktivní látky jsou žlaznatými trichomy sekretovány ve formě pryskyřice, která je nejvíce tvořena od začátku kvetení do doby tvorby semen. Samotná pryskyřice může být získávána ručním sběrem nachytáváním na kožené oblečení nebo ostatní předměty, ze kterých je následně seškrabána. Kromě těchto tradičních surovin se lze setkat i s moderními způsoby přípravy proséváním květenství nebo extrakcí trichomů k přípravě hašiše ^{12, 19)}.

Tab. 2: Obsah THC v jednotlivých částech rostliny a jejich používané názvy ^{13, 14, 19, 21)}.

Část rostliny	Obsah Δ^9 -THC	Používané názvy*
Listy	0,5 – 3 %	Bhang**
Květní vrcholy	3 – 10 %	Ganja, marihuana***
Pryskyřice	14 – 25 %	Charas, hašiš
Extrakt z pryskyřice	až 60 %	Hašišový olej

* Slova bhang, ganja a charas jsou původem indická, hašiš pochází z arabštiny a marihuana z Mexika. Z dalších lze zmínit názvy afrického původu kief a dagga. Používané české slangové výrazy jsou například tráva, joint, brčko nebo žilka.

** Bhang je méně kvalitní materiál složený z konopných květů se semeny, listů a stonků.

*** Ganja jsou neoplozené samičí květní vrcholy bez semen. Marihuana byla původně názvem pro levný tabák, dnes ovšem označení odpovídá sušeným listům a květním vrcholům konopí.

Žláznaté trichomy představují dynamický systém biosyntézy kanabinoidů a v závislosti na jejich morfologickém umístění na rostlině lze získat různě kvalitní materiál (tab. 2). Všechny části rostliny, jak samčí tak samičí, obsahují kanabinoidy^{11, 12)}.

Konopná droga není součástí platného Evropského nebo Českého lékopisu^{22, 23)}. V Evropském pohledu lze použít monografii z holandského Úřadu pro lékařské využití konopí, která stanovuje základní požadavky pro materiál distribuovaný v holandských lékárnách²⁰⁾. Kanadské ministerstvo zdravotnictví také charakterizuje konopí pro lékařské účely²⁴⁾. U drogy je sledován obsah nejdůležitějších kanabinoidů, cizí příměsi (stopky, hmyz a ostatní živočišné kontaminanty) a rozdrobnění (lístky nejsou zkráceny více jak 20 % délky květenství). Pro hodnocení jsou dále využity články Evropského lékopisu – Zbytky pesticidů, Mikrobiologické zkoušení nesterilních výrobků (plísňe a aerobní bakterie $\leq 10^2$ cfu.g⁻¹; gram negativní a enterobakterie $10 \leq$ cfu.g⁻¹; *P. aeruginosa* a *S. aureus* nepřítomny) a Těžké kovy (olovo max. 20,0 ppm; rtuť max. 0,5 ppm; kadmium max. 0,5 ppm). Droga je uchovávána v temnu a suchu při pokojové teplotě^{20, 22)}.

1.4 Pěstování konopí

Konopí seté lze rozdělit do dvou šlechtitelských větví. Jednou jsou rostliny používané pro produkci vláken a semen, druhou větví jsou rostliny s vysokým obsahem psychoaktivního THC, případně se specifickým profilem ostatních kanabinoidů²⁵⁾.

Obsah kanabinoidů, zejména psychoaktivního Δ^9 -THC, závisí především na genetické linii a na podnebí ve kterém jsou rostliny pěstovány¹⁹⁾. Byly vyšlechtěny variety na produkci vláken, což jsou rostliny vzrůstem vysoké, s nízkým farmakologickým efektem. Naopak s vysokým obsahem kanabinoidů jsou rostliny nízké, keřovité^{13, 25)}. Rostliny pěstované v teplém podnebí obecně produkují více pryskyřice a více psychoaktivních kanabinoidů oproti rostlinám pěstovaným v chladnějším podnebí. Dále má také vliv nadmořská výška, zda se jedná o samčí nebo samičí rostlinu, případně lze rozlišit různé chemovariety konopí podle typu tvořeného kanabinoidu. Lze také pozorovat závislost tvorby různých kanabinoidů na ontogenetickém vývoji rostliny, kde THC je hlavním metabolitem dospělých rostlin¹⁹⁾.

Rostliny s vysokým obsahem kanabinoidů jsou produkovány specializovanými institucemi, které zajišťují dodávky rostlinného materiálu podrobeného kvalitativním testům, tak aby droga vyhovovala farmaceutickým potřebám a byly splněny legislativní požadavky

¹¹⁾ V České republice podle dostupných informací neexistuje certifikovaný dodavatel konopí pro lékařské účely. Ze zahraničních firem lze zmínit GW Pharmaceuticals ²⁶⁾ ve Velké Británii, Prairie Plant Systems Inc. ²⁷⁾ v Kanadě nebo Stichting Institute of Medicinal Marijuana ²⁸⁾ v Holandsku, které dodávají farmaceutický materiál a zároveň se věnují výzkumu a šlechtění konopí.

Vyšlechtěné odrůdy s nízkým obsahem THC (méně než 0,3%) pro produkci vláken a semen jsou pěstovány v ČR a celé EU. EU dále reguluje pěstování odrůd konopí pro vlákna svou dotační politikou, a ty musí splňovat podmínku nižšího obsahu Δ^9 -THC než 0,2 %. Tento limitní obsah kontrolují z odebraných vzorků pověřené laboratoře metodou kapilární plynové chromatografie.

Vyšlechtěné odrůdy, které splňují kladené nároky, jsou uvedeny v příslušném nařízení Komise (ES), přičemž z cca 30 způsobilých odrůd se v ČR pěstuje jednodomá polská odrůda Beniko, která je odzkoušená pro naše území. Odrůda Juso-11, vyšlechtěná na Ukrajině, která se také pěstovala na území ČR, byla vyřazena z katalogu odrůd kvůli velkému podílu dvoudomých rostlin. Největšími producenty technického konopí jsou Francie, Německo a v posledních letech i ČR. Vyšlechtěné odrůdy uvedené v seznamu jsou většinou jednodomé rostliny, které vyhovují pěstitelským potřebám a jsou výhodné pro produkci vláken a semene ^{29, 30, 31)}.

Tab. 3: Rozdělení rostlin konopí podle produkce hlavních kanabinoidů ^{25, 29, 30, 31)}.

Rostliny pěstované pro	Množství Δ^9 -THC	Množství CBD	Poznámka	Kontrolní orgán
Pryskyřici	> 0,3 %	Nízká koncentrace	Nelegální v ČR	Policie ČR, OKTE
Vláknó a semena	< 0,3 % ČR < 0,2 % EU	Vysoká koncentrace	Povolené odrůdy s možností pěstování v ČR a dotované EU	Národní referenční laboratoř, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

1.5 Toxicita

Konopí je známé především pro své psychotropní účinky podobné alkoholové intoxikaci. Jedná se o pocity euforie přecházející do příjemných pocitů uklidnění a odpočinku. Uživatelé mohou také pociťovat sedaci, veselost, pocit hladu, zvýšenou citlivost ke vnímání barev a zvuků, letargii a pokřivené vnímání času a prostoru. Dochází k ovlivnění krátkodobé paměti projevující se zmatenou verbální komunikací (krátké věty, zpomalená řeč). Tyto efekty doprovázejí také terapeutické využití kanabinoidů, přičemž jsou vnímány spíše negativně v závislosti na terapeutickém využití a je usilováno o jejich oddělení od žádaných účinků. Letální dávka LD₅₀ byla orálně pro krysou stanovena 800 – 1900, pro psa až 3000 a u opice až 9000 mg.kg⁻¹. U člověka byly vyzkoušeny dávky až 1000 mg denního příjmu THC. Velký význam má také efekt rozvoje tolerance^{12, 25, 32)}.

Účinek kanabinoidů na člověka je velmi široký. Od periferních efektů po působení na CNS. Je možno pozorovat hypotermii, antipyretický účinek, potenciaci adrenalinové hyperglykémie i inzulinové hypoglykémie. Psychotomimetický efekt nedosahuje účinku halucinogenů, pouze výjimečně ve vysokých dávkách, u predisponovaných jedinců, nebo u přípravků s vysokou koncentrací THC jako hlavního kanabinoidu. Mohou se tak vyskytnout panické a anxiotické stavy, depersonalizace, přičemž halucinace se mohou objevit i po delší prodlevě, tak jak jsou známy v případě LSD. Dále je také uváděna vyšší incidence depresí, náchylnost k rozvoji psychóz a dlouhodobé užívání může vést k poškození vnímání a paměti. V těchto souvislostech je význam kladen především na závislost dávky a predispozici jedince. V souvislosti s ovlivněním psychomotorických funkcí je nutné upozornit na problém nevhodnosti řízení motorových vozidel a obsluhy strojů pod vlivem konopí (kanabinoidů). Zneužívání drogy může vést k hlubokým změnám v lidském organismu, k poškození imunitního systému, k teratogenezi, k potenciaci hormonálních funkcí působením na jejich regulátory. Následkem může být impotence (u žen přechodné zvýšení libida), sterilita, nebezpečí trvalého poškození mozku, při kouření drogy je silně drážděno dýchací ústrojí, dochází ke změnám psychiky. Zevní kontakt s drogou může způsobit dermatitidu, blefaritidu, konjunktivitidu a keratitidu^{25, 33, 34)}.

Na užívání konopné drogy vzniká závislost, i když v menším rozsahu než jak je udáváno u alkoholu, heroinu nebo kokainu. Za tento efekt, spolu i s většinou ostatních farmakologických účinků, jsou zodpovědné hlavní sekundární metabolity kanabinoidy. Lidí vyhledávajících léčbu této závislosti v poslední dekádě významně přibýlo, pravděpodobně díky vysoce kvalitní dostupné droze. Nejčastější udávané důvody léčby jsou nespokojenost,

nízká produktivita, interpersonální, rodinné a finanční problémy, problémy s pamětí. Častější užívání znamená vyšší riziko rozvoje závislosti. Abstinenční syndrom se projevuje depresemi, podrážděností, poruchami spánku a únavou, snížením příjmu potravy, pocením, sliněním, touhou po droze. Významnost závislosti ukazuje i délka abstinenčního syndromu, která může u dlouhodobého silného užívání trvat až 1 měsíc. Rozvoj závislosti a nežádoucích účinků závisí na předchozích zkušenostech s užíváním drogy a na dávce, přičemž adolescenti jsou více náchylní než dospělí. Léčba závislosti na konopí využívá především multisystémovou psychosociální terapii, přičemž ve farmakoterapii se zatím osvědčily pouze THC, Rimonabant (CB₁ antagonist) a léčiva ovlivňující CNS typu antidepresiv a anxiolytik (mirtazepin, buspiron)^{35, 36, 37}.

➤ **3.2.1 Nežádoucí účinky, bezpečnost a interakce s ostatními léky**

1.6 Ostatní využívané konopné suroviny

S konopím je spojován především obsah psychoaktivních kanabinoidů, které jsou v přírodě jedinečné a zapříčiňují výrazné farmakologické účinky. Významné je ovšem využití celé rostliny, které vychází již z dob, kdy bylo konopí významnou surovinou každodenního života. Jedná se o produkci kvalitních vláken pro technické účely a zdroj vysychavého oleje využitelného v potravinářství nebo kosmetice. Velmi zajímavou oblastí jsou především poznatky týkající se nenasycených mastných kyselin a jejich vlivu na lidské zdraví¹².

Obsah kanabinoidů v produktech vyráběných z konopí značně závisí na chemovarietách rostlin, ze kterých jsou produkty získávány. Obecně lze říci, že veškeré komerční produkty, ať se jedná o olej, semena, mouku, nápoje, čokoládu, šampóny a další, obsahují stopová množství kanabinoidů. Nejrozšířenější je CBD, který obsahují povolené odrůdy rostlin pěstované v EU, přičemž vysoký obsah Δ^9 -THC naznačuje původ rostlin mimo EU s celkově vyšším obsahem této psychotropní látky. Zvýšený obsah kanabinoidů v konopném oleji může být způsoben nedokonalými sklizňovými postupy nebo nedokonalým pročištěním semen, způsobujícími kontaminaci oleje ulpívající pryskyřicí. Ze studií vyplývá, že i nadměrná konzumace konopných produktů nevede k pozitivním výsledkům testů na kanabinoidy, ať se jedná o test moče u orálně používaných přípravků nebo analýzu vlasů u kosmetických přípravků. K pozitivním výsledkům by mohlo dojít pouze po konzumaci produktů vyrobených z rostlin s vysokým obsahem Δ^9 -THC z nelegálních zdrojů, a proto je nutné provádět kontrolní chemické analýzy konopných produktů^{38, 39, 40, 41}.

1.7 Konopný olej

Konopný olej se získává lisováním nebo extrakcí ze semen *Cannabis sativa* L. Lisování za studena nebo extrakce za superkritických podmínek jsou nejvýhodnější postupy z hlediska zachování obsahových látek, přičemž aplikace mikrovlnného záření při extrakci po určitou dobu může přinést dodatečné pozitivní změny v kvalitě oleje⁴²⁾. Barva oleje je od nažloutlé až po tmavě zelenou a vyznačuje se ořechovou chutí^{43, 44)}. Bylo by chybou zaměňovat tento olej s jinými konopnými produkty, především s ethanolickým extraktem konopné pryskyřice, který obsahuje až 60 % Δ^9 -THC a v anglické literatuře se nazývá „cannabis oil“ nebo „hash oil“ neboli „hašišový olej“^{13, 25, 33)}.

Kvůli obsahu nenasycených mastných kyselin je konopný olej náchylný k oxidaci, která je zvyšována teplem a světlem. Z tohoto důvodu je olej zbytečně používat na fritování nebo pečení a dává se přednost jeho použití za studena jako stolního oleje⁴³⁾. Z průmyslového využití lze zmínit výrobu biopaliv a plastických hmot⁴⁵⁾.

- **2.3** *Obsahové látky konopného oleje*
- **3.4** *Farmakologické účinky a potenciál využití polynenasycených mastných kyselin konopného oleje*

1.8 Legislativa související s konopím

V ČR je pěstování konopí legislativně ošetřeno zákonem o návykových látkách³¹⁾, který zakazuje pěstovat druhy a odrůdy rostliny konopí (rod *Cannabis*), které mohou obsahovat více než 0,3 % látek ze skupiny tetrahydrokanabinolů. Tyto je spolu s konopnou pryskyřicí zakázáno získávat. Pro účely zákona se konopím rozumí nadzemní část rostliny, jejíž součástí může být také kvetoucí nebo plodonosný vrcholík. Rostliny obsahující vysokou koncentraci THC, případně dalších žádoucích kanabinoidů, se využívají ve výzkumu a pro potřeby medicíny. Bedrokan, Bedrobinol a Bediol jsou například odrůdy poskytující sušenou drogu (*Cannabis flos*) vydávanou na lékařský předpis v holandských lékárnách, lišící se v poměrném obsahu THC a CBD^{20, 46)}. V současné době na českém trhu není registrovaný léčivý přípravek obsahující konopný extrakt, tinkturu, dronabinol nebo jiný léčivý přípravek na bázi konopí (podle osobního sdělení Jitky Židlické, Tiskové a informační oddělení SÚKL, 11. 3. 2008). Lékárna však představuje důležité zdravotnické zařízení s povolením k zacházení s návykovými látkami a přípravky, které má potenciál vydávat léčiva na bázi konopí a kanabinoidů s nezbytným informačním doprovodem (tab. 4).

Z důležitých kultivarů THC bohatých rostlin známých především z Holandského trhu lze zmínit Skunk[®] (název získal díky významnému pachu), Durban[®], Northern lights[®] či White widow atd., které jsou známé především pro rekreační uživatele marihuany^{11, 47)}. Na tomto místě je ovšem nutné upozornit, že nedovolená výroba, dovoz, vývoz, prodej a přechovávání takovýchto odrůd (s vysokým obsahem THC) je v ČR nelegální a hrozí za ně sankce podle trestního zákona (č. 40/2009 Sb.). Toto nové znění platné od 1. 1. 2010 zařazuje konopí jako měkkou drogu se sankcí odnětí svobody na 1 rok za přechovávání a 6 měsíců za pěstování v množství větším než malém. Další sankce se pohybují od peněžitých trestů až po odnětí svobody do 8 let, podle závažnosti trestného činu. Množství větší než malé je nově definováno a vydáváno v nařízeních vlády, paralelně s trestním zákonem a vychází ze závazného pokynu policejního prezidenta (č. 39/1998), pokynu nejvyššího státního zástupce (č. 6/2000) a odborných vyjádření. Pro THC je množství větší než malé stanoveno od 1,0 g (asi 20 dávek po 50 mg) a počet pěstovaných rostlin více než 3. Množství menší než malé je pak hodnoceno podle zákona o přestupcích (č. 200/1990 Sb.), kde hrozí peněžitá sankce do 15 000 Kč^{48, 49)}. ČR se řadí ke státům s nízkou tolerancí k pěstování a užívání konopí s vysokým obsahem psychoaktivních kanabinoidů, i kdyby bylo používáno pouze pro vlastní účely, případně pro vlastní empirickou terapii onemocnění. Současný trend, jak je patrné z nového trestního zákona, se snaží najít kompromis mezi liberálnějším pojetím a radikálním odmítáním veškerých drog a nově je rozděluje podle míry jejich zneužívání a nebezpečnosti. K úplnému osvobození pěstování a užívání konopí pro vlastní potřebu v novém trestním zákoně nedochází. Záleží především také na rozhodnutí státního zástupce a především na rozhodnutí soudu, jak budou hodnotit jednotlivé individuální případy⁴⁸⁾.

Je nepochybné že konopí je drogou, která ovlivňuje lidský centrální nervový systém, a proto podléhá zákonným ustanovením jednotlivých států, ať benevolentnímu nebo striktnímu zákazu užívání. Velice diskutabilní otázkou nejenom českých zákonů se tak stává povolení používání konopí pro lidi s různými zdravotními problémy, kterým obsahové látky přinášejí úlevu. Tato problematika je složitým a rozsáhlým tématem zákonodárců, drogové politiky, možného vzniku závislosti a dalších zdravotních problémů, ale také uvědomění a porozumění problému laickou veřejností.

Tab. 4: Zařazení konopných produktů podle zákona o návykových látkách č. 167/1998 Sb. ³¹⁾

Konopí extrakt a tinktura.	Příloha č. 1 zákona. Omamné látky zařazené do seznamu I podle Jednotné Úmluvy o omamných látkách.	Recept a žádanka musí být označeny modrým pruhem.
Dronabinol.	Příloha č. 5 zákona. Psychotropní látky zařazené do seznamu II podle Úmluvy o psychotropních látkách.	
Konopí. Pryskyřice z konopí.	Příloha č. 3 zákona. Omamné látky zařazené do seznamu IV podle Jednotné Úmluvy o omamných látkách.	Mohou být použity pouze k vědeckým a velmi omezeným terapeutickým účelům.
Tetrahydrokanabinoly, všechny izomery.	Příloha č. 4 zákona. Psychotropní látky zařazené do seznamu I podle Úmluvy o psychotropních látkách.	

1.8.1 Forenzní analýza

Policejní kriminalistické laboratoře, odbor kriminalisticko technických expertíz (OKTE), využívají k testování přítomnosti THC v zabavených vzorcích rostlinného materiálu metodu plynové chromatografie s detekcí FID. Alternativní metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV/VIS detekcí, kterou je možné detekovat původní koncentrace THC i THCA, díky vyloučení zahřívání vzorku (podle osobního sdělení Ing. Ivo Vykydala, OKTE, Hradec Králové). Při chemické analýze by měla být použita metoda schopná detekovat jak THC tak i THCA a následně součtem koncentrací kvantifikovat celkové množství psychoaktivního THC, které vzniká při aplikaci drogy po jejím zahřátí. Druhou možností je kvantitativní převedení THCA na THC před vlastní analýzou. Z uvedených zdrojů vyplývá, že přeměna THCA na THC při analýze plynovou chromatografií však neprobíhá kvantitativně ^{50, 51)}.

V analýze biologického materiálu, zejména krve a moči, se využívá detekce vlastních kanabinoidů a jejich tělních metabolitů, především nejdůležitějších 11-OH-THC a THC-9-COOH. Tyto testy provádí soudní znalci v oboru toxikologie a specializované toxikologické laboratoře, například Ústavy soudního lékařství nebo Ústavy klinické biochemie a diagnostiky ve fakultních nemocnicích. K předběžnému screeningu jsou používány imunochemické metody, po kterých následuje chemická analýza s cílem identifikovat a

kvantifikovat celou škálu kanabinoidů a jejich metabolitů i ve stopových koncentracích. K dispozici jsou systémy tenkovrstvé chromatografie (Toxi Lab[®] THC II společnosti Varian Inc.), dále pak plynová a kapalinová chromatografie s detekcí hmotnostním spektrometrem^{52, 53}), který v dnešní době představuje za daných podmínek vysoce selektivní (minimální možnost interference ze strany strukturálně podobných látek) a velmi citlivý analytický detektor (detekční limit podle testovaného metabolitu, nejčastěji 1 ng/ml pro THC-9-COOH). Každý občan případně také zaměstnavatel má možnost monitorovat používání marihuany a to pomocí komerčně dostupných detekčních systémů. Tyto screeningové metody pracují na základě imunochemické reakce vazbou testovaných metabolitů (nejčastěji THC-9-COOH v moči, THC v potu a slinách) se specifickými protilátkami a většinou se interpretují přítomností či nepřítomností daného zbarvení na detekčním proužku (Dynex Test[®], OralStat[®] Mavand, DrugWipe, Cozart[®], Envitec SmartClip[®], Bio-Rad Tox/See[™], Triage[®], Syva[®] Rapid Test atd.). Jedná se však pouze o předběžný test, jehož pozitivní výsledky je nutné vždy potvrdit další analytickou metodou. K testování se nejčastěji používá moč, pot nebo sliny. Je možné také používat stěry z ploch, jako jsou klávesnice, mobilní telefon a další osobní věci. Detekční limity jsou udávány výrobcem a korespondují s předpokládanými koncentracemi testovaných metabolitů v jednotlivých biologických vzorcích^{54, 55}). Policie České republiky a ojediněle také městská policie používá takovýchto detekčních systémů především v souvislosti s řízením motorových vozidel pod vlivem omamných a psychotropních látek. Využití vlasů má význam spíše kriminalistický ve zvláštních případech a analýza vyžaduje kvalitní laboratorní vybavení na bázi hmotnostní spektrometrie se zabezpečením proti kontaminaci laboratorního prostoru hledanými analyty (podle osobního sdělení PharmDr. Viktora Voříška, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové)⁵⁶).

2. Obsahové látky *Cannabis sativa* L.

Metabolizmus konopí je velice komplexní a celkově je popisováno více než 480 sloučenin. Velkou část z nich tvoří primární metabolity, jako jsou aminokyseliny, cukry, lipidy, steroidy nebo jednoduché fenolické látky. Významná je ovšem produkce sekundárních metabolitů, kde nejzajímavější struktury představují kanabinoidy a dále jsou zastoupeny flavonoidy, lignany, dihydrostilbenoidy a příbuzné metabolity, látky terpenového metabolismu a i několik zástupců alkaloidů^{57, 58}). Biologická role sekundárních metabolitů v konopné rostlině není plně známá, ale v případě kanabinoidů se předpokládá ochranný vliv díky jejich antifungálním a antibakteriálním účinkům a ochrana proti predátorům. Dihydrostilbeny a ostatní fenolické látky představují také ochranné sloučeniny pro rostlinu a jsou využívány i jako regulační hormony. Podobné protektivní a signální účinky lze předpokládat i u terpenů^{11, 59}).

2.1 Kanabinoidy

Kanabinoidy představují nejvíce studované sekundární metabolity konopí s výraznými farmakologickými účinky. Doposud bylo popsáno 83 různých struktur. Následující výčet udává jednotlivé typy kanabinoidů a v závorce počet identifikovaných zástupců (obr. 1): typ kanabigerolový (12), kanabichromenový (9), kanabidiolový (7), Δ^9 -tetrahydrokanabinolový (9), Δ^8 -tetrahydrokanabinolový (2), kanabicyklolový (3), kanabielsoinový (5), kanabinolový (7), kanabinodiolový (2), kanabitriolový (9) a další různé kanabinoidní struktury (18). Výzkum konopí je od 60. let 20. století do dnešní doby pokryt mnoha publikacemi popisujícími identifikaci nových či známých metabolitů^{57, 58, 60, 61}). Nově byly izolovány také estery kanabinoidů s mono- a seskviterpeny⁶²).

Kanabinoidy vznikají směsnou biosyntézou kombinací dvou metabolických drah. Jedná se o acetátovou metabolickou dráhu, z níž vzniká polyketidový řetězec a deoxyxylulozovou dráhu lokalizovanou v plastidech vedoucí k monoterpenu geranyl difosfátu, které vytvoří specifickou skupinu C₂₂ respektive C₂₁ (neutrální forma) terpenofenolických látek. Mevalonátová biosyntetická cesta lokalizovaná v cytosolu je v tvorbě geranyl difosfátu pravděpodobně využívána jen velice omezeně^{59, 63}). První molekula zabudovaná do struktury kanabinoidu v acetátové dráze není acetyl-CoA, ale jedná se o hexanoyl-CoA, jehož fragment v podobě postranního pětiuhlíkatého řetězce je rozpoznatelný ve velké většině kanabinoidů. Claisenovou kondenzací jsou k hexanoátu

přikondenzovány 3 molekuly acetyl-CoA (v aktivované formě malonyl-CoA) a je vytvořen polyketidový řetězec, jehož cyklizací (aldolová kondenzace) je vytvořena olivetolová kyselina. Tento řetězec reakcí je řízen olivetol syntázou. Následuje C-alkylační reakce, která z geranyl difosfátu a olivetolové kyseliny vytvoří kanabigerolovou kyselinu, která tvoří základ pro další cyklizace v monoterpenové části a tím pro širokou škálu kanabinoidních struktur (obr. 2). Krok přikondenzování je enzymaticky řízen prenylázou geranyl difosfát:olivetolát geranyltransferázou, která může akceptovat i neryl difosfát⁶⁴⁾ a mohou tak vznikat *trans*- nebo *cis*- izomery kanabigerolové kyseliny. Předpokládá se také existence více izoform daného enzymu. Konformační změna na dvojně vazbě v monoterpenové části může být také racionálně vysvětlena tvorbou allylového kationtu, který následně umožní elektrofilní cyklizaci obdobnou jako u ostatních terpenových derivátů (obr. 3). V intaktní rostlině je také tento krok řízen enzymaticky oxidocyklázami, a to syntázou kanabidiolové kyseliny, Δ^9 -tetrahydrokanabinolové kyseliny a kanabichromenové kyseliny, které byly doposud charakterizovány. Syntáza Δ^9 -tetrahydrokanabinolové kyseliny byla identifikována pouze v zásobních vezikulách žlaznatých trichomů, což dokládá exkluzivitu tvorby THC právě v této morfologické části rostliny a dále také prezentuje zásobní orgán jako součást v biosyntetické dráze^{13, 59)}.

Izolované kanabinoidy jsou olejovitého charakteru bez pachu¹¹⁾. Primárně jsou kanabinoidy biosyntetizovány ve formě karboxylové kyseliny, která je již během rostlinného růstu a především následně v posklizňovém průběhu dekarboxylována a je tak tvořena neutrální forma kanabinoidu. Vzhledem k enzymatické tvorbě jsou koncové produkty chirální sloučeniny, jejichž absolutní konfigurace má významný efekt na jejich biologickou aktivitu. Především chirální centra 6aR a 10aR, dále pak fenolická a metylová skupina v pozicích 1 a 9 (číslování dle dibenzopyranu) a postranní alifatický řetězec jsou důležité z hlediska terapeutického využití. Biosyntéza kanabinoidů může být dále pozměněna nahrazením hexanoyl-CoA v prvotních fázích acetátové dráhy, přičemž mohou vznikat kanabinoidy s různě dlouhým postranním řetězcem. Po klasických kanabinoidech jsou nejvíce zastoupeny sloučeniny s tříuhlíkatým postranním řetězcem charakterizované koncovkou –varin, kde je hexanoyl-CoA nahrazen butyryl-CoA^{58, 59)}.

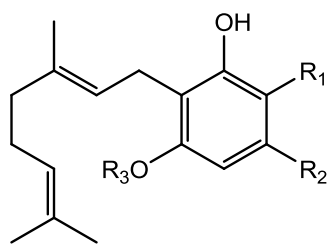
Je využíváno 5 různých číslovacích systémů chemické struktury kanabinoidů. Číslování na základě dibenzopyranu a monoterpenové číslování založené na *p*-cymenu patří k nejpoužívanějším a jsou užívány i v této disertační práci. Nejvýznamějšími zástupci kanabinoidů jsou (-)- Δ^9 -*trans*-(6aR, 10aR)-tetrahydrokanabinol (THC; $[\alpha]_D = -140^\circ$) a

(-)-*trans*-(3*R*, 4*R*)-kanabidiol (CBD; $[\alpha]_D = -139,5^\circ$) na nichž jsou prezentovány číslovací systémy (obr. 2) ^{58, 65}.

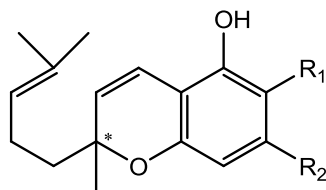
I když jsou kanabinoidy specificky vázány na konopí, byly objeveny podobné struktury i v jiných rostlinách. Jedná se o isoflavonoidy v *Desmodium cant* (*Fabaceae*), kde substituce geranylem a jeho přeskupením podobně jako u konopí je dosaženo kanabinoidního skeletu (desmodianony). Kanabinoidům podobné sloučeniny, které vycházejí z bibenzylové struktury, byly také objeveny v jätrovce *Radula perrottetii* (*Radulaceae*) (obr. 4) ^{66, 67}.

➤ **3.2** *Terapeutické využití kanabinoidů a používaná léčiva.*

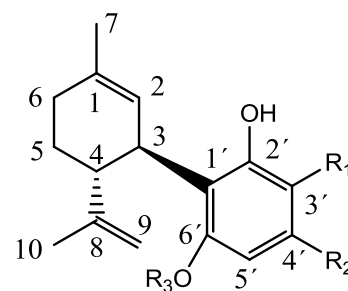
Obr. 1: Rozdělení kanabinoidů na základě chemické struktury⁵⁸⁾.



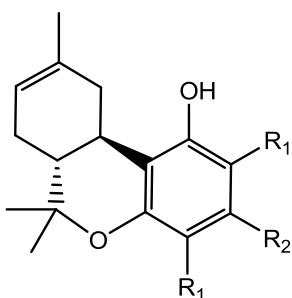
Kanabigerolový typ



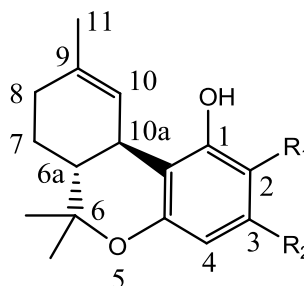
Kanabichromenový typ



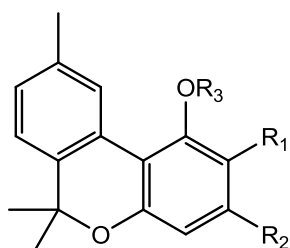
Kanabidiolový typ



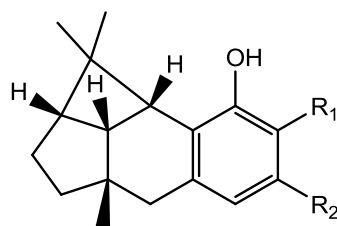
Δ^8 -*trans*-Tetrahydrokanabinolový typ



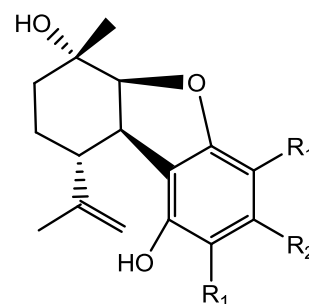
Δ^9 -*trans*-Tetrahydrokanabinolový typ



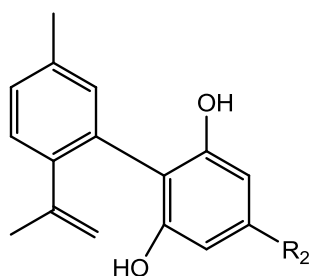
Kanabinolový typ



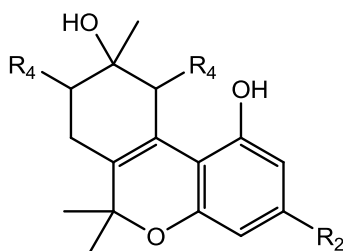
Kanabicyklolový typ



Kanabielsoinový typ



Kanabinodiolový typ



Kanabitriolový typ

* ... chirální centrum

⋮ ... S - konfigurace

▲ ... R - konfigurace

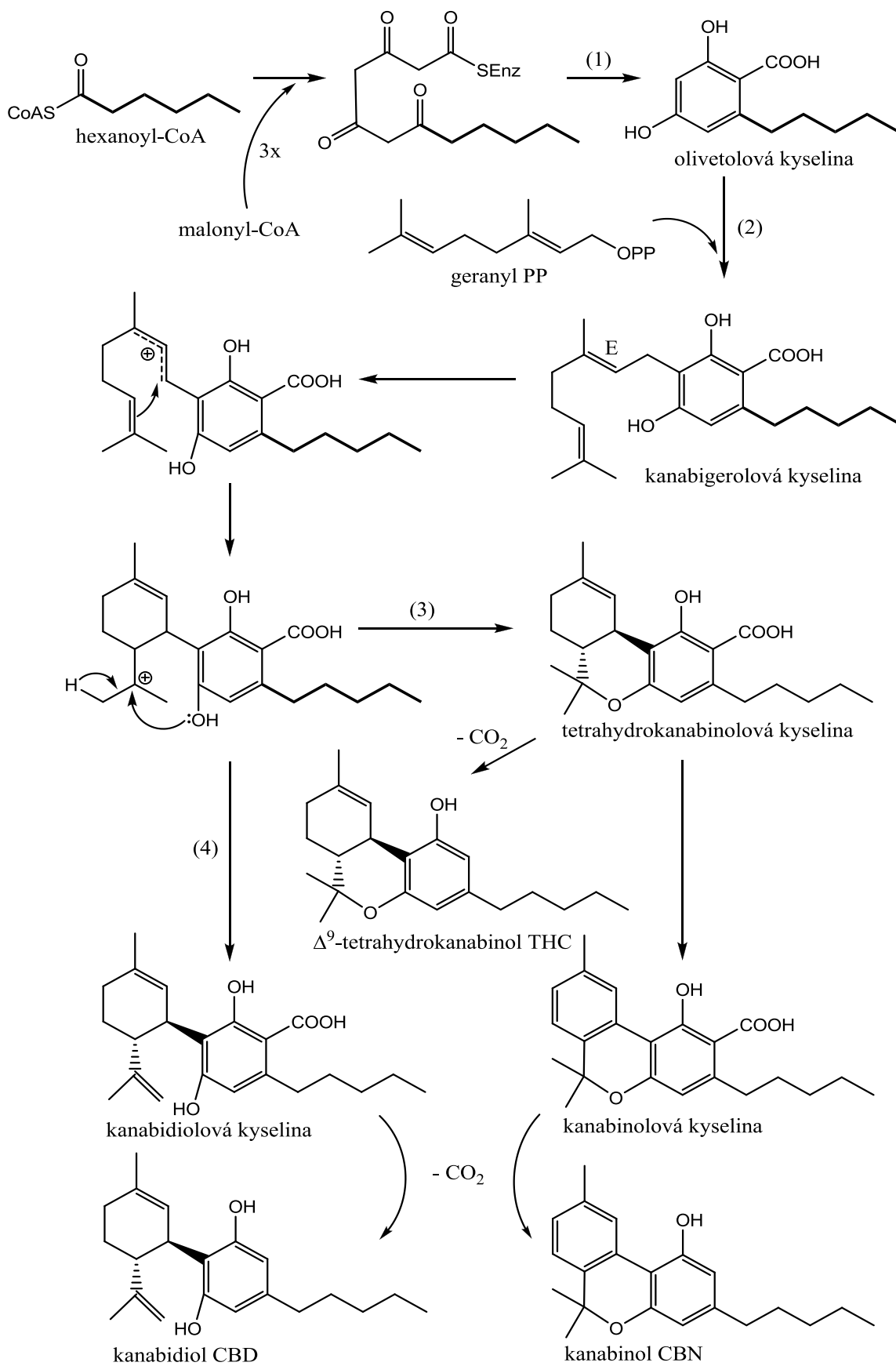
R₁ ... H, COOH

R₂ ... C₅, C₃ řetězec

R₃ ... H, CH₃

R₄ ... H, OH

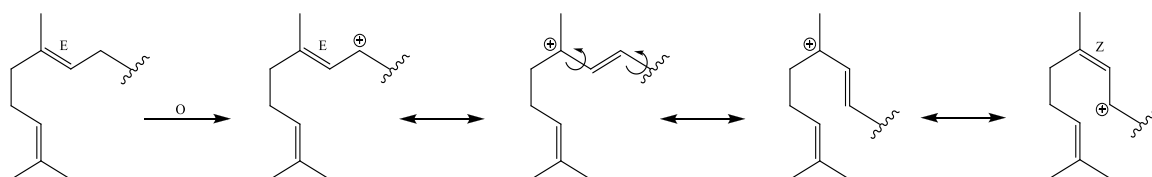
Obr. 2: Biosyntéza kanabinoidů^{13, 59)}.



Legenda k obr. 2:

- (1)... Olivetol syntáza.
- (2)... Geranyl difosfát:olivetolát geranyltransferáza.
- (3)... Syntáza Δ^9 -tetrahydrokanabinolové kyseliny.
- (4)... Syntáza kanabidiolové kyseliny.

Obr. 3: Konformace geranyl difosfátu ¹³⁾.



2.2 Ostatní významné sekundární metabolity konopí

Ostatní sekundární metabolity konopí představují širokou škálu sloučenin odvozených z acetátové i šikimátové biosyntetické cesty. Terpenový metabolismus je v konopí hojně rozšířen a lze ho vypočítat v mnoha konopných metabolitech.

Flavonoidy jsou široce rozšířené v celé rostlinné říši a jejich biosyntéza obecně probíhá kombinací šikimátové a acetátové cesty ^{13, 59)}. Chalkon syntáza patřící do rodiny polyketid syntáz je v rámci acetátové cesty klíčovým enzymem. Poznatky o různých enzymech této rodiny a o jejich izoformách jsou nezbytné k odhalení řízení metabolických cest, toku primárních metabolitů a jejich zpracování do následných sekundárních struktur. Vzhledem k tomu že acetátová dráha je také součástí biosyntézy kanabinoidů, vyvstává možnost směřování biosyntézy do flavonoidního případně stilbenového metabolismu na úkor kanabinoidů. Jednou z dalších součástí výzkumu souvisejícího s touto disertační prací bylo právě studium exprese polyketid syntáz v intaktních rostlinách a v odvozených kulturách ⁶⁸⁾. V konopí bylo identifikováno 23 flavonoidů např. C glykosidy vitexin a orientin a jejich glukosidy a rhamnoglukosidy. Z dalších flavonoidů lze zmínit aglykony kaempferol, kvercetin, apigenin nebo luteolin a jejich glukosidy, sophorosidy a glukuronidy ^{69, 70, 71, 72, 73)}. Zajímavé flavony představují kanflavin A, B a C a 6-prenylapigenin, které jsou substituovány prenylovou skupinou nebo geranylem v pozici 6 nebo 8 (obr. 4) ^{59, 74, 75)}. Podobné struktury byly nalezeny také například v rostlinách *Dorstenia manii* (*Moraceae*) ^{76, 77)}, *Erithrina mildbraedii* (*Fabaceae*) ⁷⁸⁾, *Diploctropis ferruginea* (*Fabaceae*) ⁷⁹⁾, také v propolisu ⁸⁰⁾, nebo prenylované isoflavonoidy v rodu *Sophora* ⁸¹⁾.

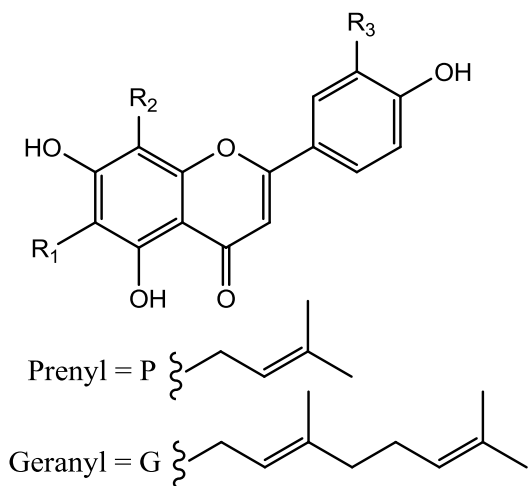
Biosynteticky podobnou skupinou flavonoidům jsou dihydrostilbenové (bibenzylové) metabolity, dihydrofenantreny a spiroindany, které představují velice strukturálně rozmanitou skupinu látek. Lze nalézt sloučeniny obsahující dvě benzenová jádra jako např. kanabistilbeny, kanipren, ale také širokou škálu tricyklických sloučenin např. kanithreny a kanabispirony (obr. 4) ^{59, 75, 82, 83, 84, 85}. I tyto sloučeniny byly nalezeny v jiných rostlinách, např. v již zmiňované *Radula perrottetii* (*Radulaceae*) ⁶⁷ nebo v orchideji *Dendrobium amoneum* (*Orchidaceae*) ⁸⁶. Celkem bylo identifikováno v konopí asi 30 fenolických látek, spolu s floroglucinolem, který byl objeven při studiu přítomnosti olivetolové kyseliny v rostlině ^{58, 75, 87}.

V konopí byla identifikována celá škála terpenů, až 120 látek, přičemž nejvíce zastoupeny jsou mono a seskviterpeny. Tyto jsou díky své těkavosti zodpovědné za výrazný pach rostliny a drogy, především pak limonen a β -myrcen ^{57, 88, 89}.

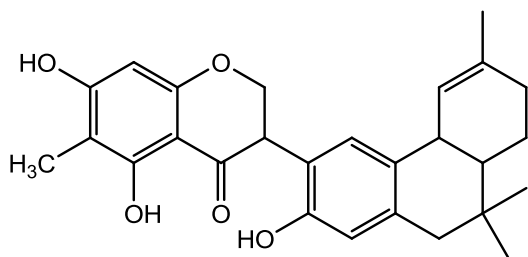
Z dalších metabolitů byly v konopí identifikovány alkaloidy, které jsou zastoupeny jednak jednoduchými sloučeninami typu hordeninu nebo trigonelinu, ale také složitější strukturou kanabisativinu a anhydrokanabisativinu, které jsou biosynteticky odvozené od spermidinu (obr. 4) ^{59, 90, 91}. Arylnftalenové deriváty kanabisin A – G představují v konopí skupinu lignanamidů ^{92, 93, 94}, které byly také nalezeny např. v *Mitrephora thorelii* (*Annonaceae*) ⁹⁵ nebo *Jacquemontia paniculata* (*Convolvulaceae*) ⁹⁶.

➤ **3.3** *Ostatní sekundární metabolity s významnými farmakologickými vlastnostmi.*

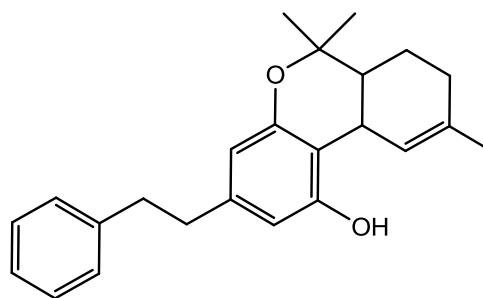
Obr. 4: Ostatní sekundární metabolity^{59, 66, 67, 74, 75)}.



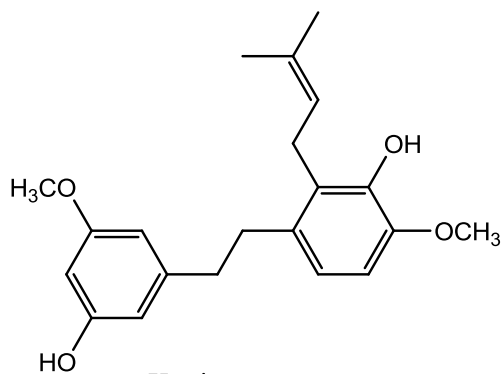
	R ₁	R ₂	R ₃
Kanflavin A	G	H	OCH ₃
Kanflavin B	P	H	OCH ₃
Kanflavin C	H	G	OCH ₃
6-prenylapigenin	P	H	H



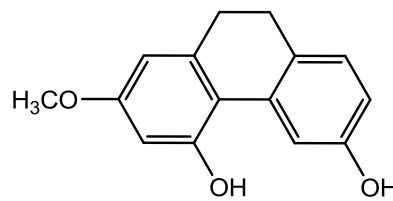
Desmodianon E (*Desmodium canum*)



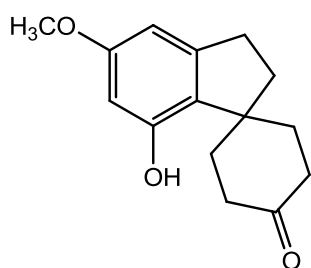
Perrottetin (*Radula perrottetii*)



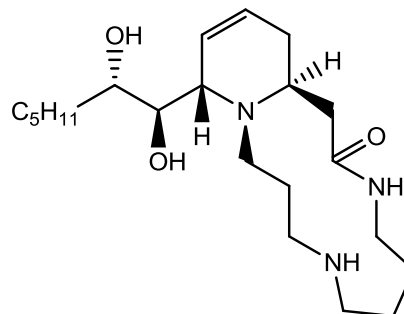
Kanipren



Kanithren 1



Kanabispiron



(+)-Kanabisativin

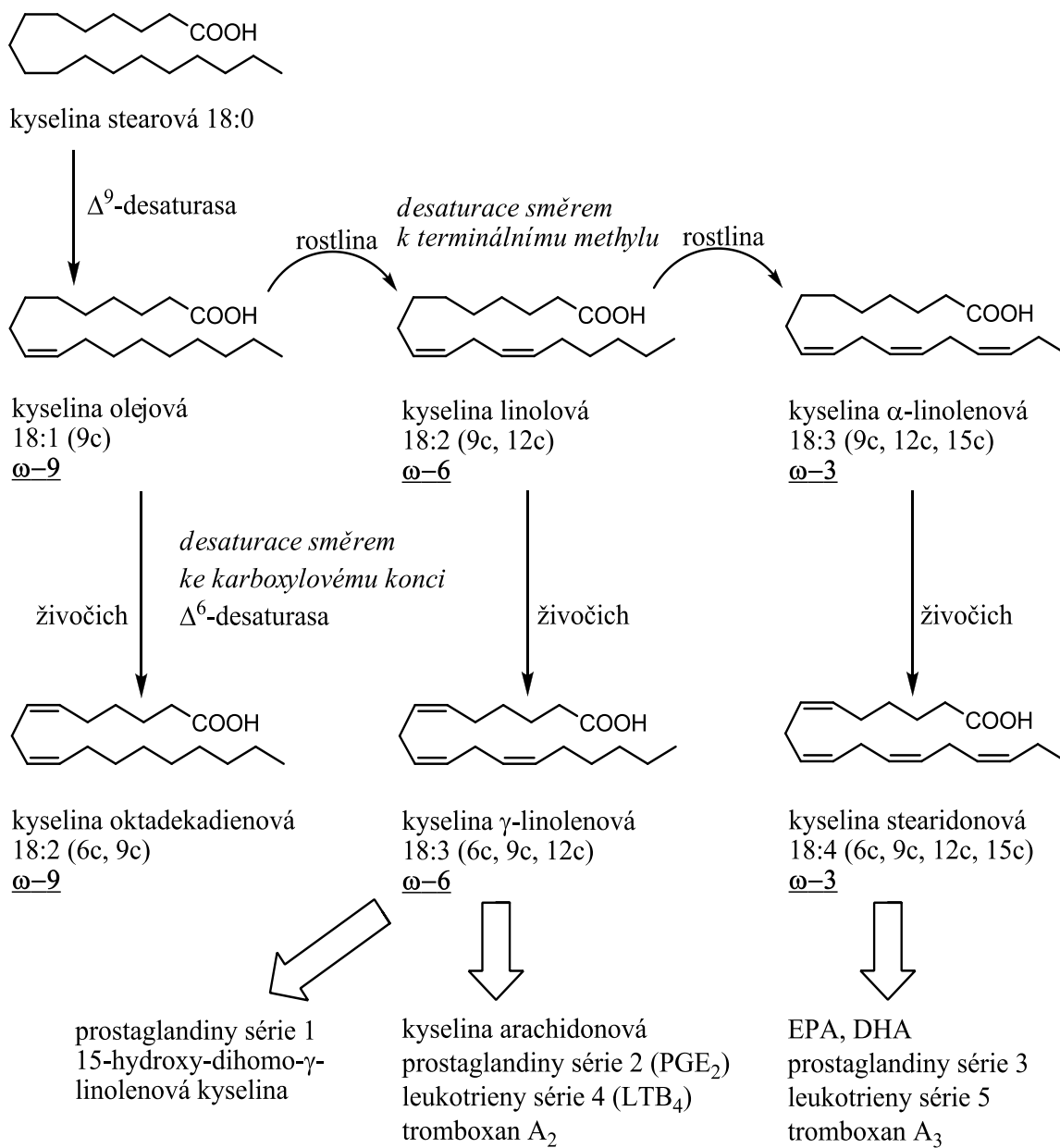
2.3 Obsahové látky konopného oleje

Konopná semena obsahují 26 až 37 % vysychavého oleje, jehož složení je závislé na klimatických podmínkách a zvolené odrůdě. Nejvýznamnější obsahové látky konopného oleje jsou mastné kyseliny a především jejich polynenasycené formy, kterých obsahuje 70 – 80 %. Jejich obsah závisí především na environmentálních faktorech^{33, 44)}. Tabulky 5 a 6 udávají zastoupení jednotlivých nasycených a nenasycených mastných kyselin s jejich průměrným obsahem, který odpovídá odrůdě Beniko. Ta se v jedné ze studií, která zkoumala 51 různých odrůd, umístila na prvních místech v produkci kvalitního oleje s průměrným výtěžkem 34,5 %^{13, 44)}. Konopný olej je alternativním zdrojem jak γ -linolenové kyseliny, která se získává z brutnákového a pupalkového oleje, tak také linolové kyseliny získávané z lněného a slunečnicového oleje^{44, 97)}.

Dále semena obsahují 25 % proteinů a až 28 % vlákniny. Konopné proteiny jsou rovnocenné například proteinům vaječného bílku nebo sóji a představují kvalitní nutriční zdroj především díky obsahu esenciálních aminokyselin a dobré stravitelnosti. Semena obsahují vitamíny thiamin a riboflavin, vitamín E a z minerálů fosfor, draslík, hořčík, vápník, sodík, mangan a měď. Zajímavý je také obsah železa a zinku, které jsou důležitými kofaktory v lidském metabolismu mastných kyselin^{34, 98, 99)}. Plastochromanol-8, což je derivát γ -tokotrienolu, vyniká svými antioxidačními vlastnostmi v ochraně nenasycených mastných kyselin⁴⁴⁾. Celkovou vlastností oleje je jeho antioxidační aktivita¹⁰⁰⁾. Ze sekundárních rostlinných metabolitů byly detekovány myrcen a β -karyofylen. Ve stopových množstvích olej obsahuje β -sitosterol a methylsalicylát¹⁰¹⁾.

- **3.4 Farmakologické účinky a potenciál využití polynenasycených mastných kyselin konopného oleje**

Obr. 5: Biosyntéza nenasycených mastných kyselin a jejich vztah k metabolismu eikosanoidů
13, 97, 102)



Tab. 5: Průměrný obsah nasycených mastných kyselin v konopných semenech ⁴⁴⁾.

<i>Název kyseliny</i>	<i>Průměrný obsah v semenech [g/100g]</i>
Myristová, 14:0	0,01
Palmitová, 16:0	1,97
Margarinová, 17:0	0,02
Stearová, 18:0	0,82
Arachidová, 20:0	0,25
Behenová, 22:0	0,09
Lignocerová, 24:0	0,04

Tab. 6: Průměrný obsah nenasyčených mastných kyselin v konopných semenech ⁴⁴⁾.

<i>Název kyseliny</i>	<i>Průměrný obsah v semenech [g/100g]</i>
Hexadecenová, 16:1 (7c)	0,04
Palmitolejová, 16:1 (9c)	0,01
Vakcenová, 18:1 (11c)	0,25
Olejová, 18:1 (9c)	3,35
Linolová, 18:2 (9c, 12c)	18,48
α-linolenová, 18:3 (9c, 12c, 15c)	7,17
γ-linolenová, 18:3 (6c, 9c, 12c)	0,66
Stearidonová, 18:4 (6c, 9c, 12c, 15c)	0,31
Gondoová, 20:1 (11c)	0,13
Ikosadienová, 20:2 (11c, 13c)	0,02
Eruková, 22:1 (13c)	0,01
Nervonová, 24:1 (15c)	0,06

3. Farmakologické vlastnosti

Kanabinoidy, jako hlavní farmakologicky aktivní obsahové látky, jsou zodpovědné za účinky konopné drogy. Odlišná farmakologická aktivita různých typů kanabinoidů a jejich vzájemné interakcemi v lidském organismu, vedou ke složitému systému, který lze těžce hodnotit farmakologickými a klinickými testy. Proto je většina výzkumů zaměřena právě na dva hlavní zástupce THC a CBD¹¹⁾. I většina ostatních kanabinoidů vykazuje určitý stupeň aktivity na kanabinoidní receptory, od agonistického působení (kanabinol, Δ^8 -tetrahydrokanabinol) po antagonistické (tetrahydrokanabivarinu). Z hlediska dalších účinků lze zmínit kanabigerol a kanabichromen, které vykazují antibakteriální, protizánětlivé a analgetické účinky, deriváty kanabichromanonu byly testovány s částečným úspěchem pro antimalarické a antileishmaniózní účinky^{14, 61, 103)}. Důležitým zdrojem farmakologických informací je také celá škála obměněných chemických struktur klasických kanabinoidů i sloučenin zcela strukturně odlišných od fytoKANABINOIDŮ, které působí jako agonisté nebo antagonisté na kanabinoidních receptorech (obr. 6). Konopné flavonoidy, terpenové látky nebo dihydrostilbeny představují další významné rostlinné metabolity s účinky na lidský organizmus. Tyto se mohou dále podílet na celkovém působení konopné drogy ovlivněním farmakokinetiky i farmakodynamiky kanabinoidů, nebo působit vlastními specifickými účinky^{11, 103)}.

3.1 Lidský endokanabinoidní systém

Kanabinoidní receptory spolu s endogenními kanabinoidy souhrnně tvoří endokanabinoidní systém. Podle nových poznatků jsou do něj začleňovány také enzymy tvorby a degradace endokanabinoidů a spolu se specifickým membránovým přenašečem se tak stávají možným místem zásahu potenciálních léčiv¹⁰⁴⁾. FytoKANABINOIDY přítomné v konopí sice nejsou chemicky příbuzné endogenním látkám, ale sdílí jejich účinky (obr. 1, 6). V počátcích výzkumu byla aktivita kanabinoidů připisován ovlivnění buněčných membrán nespécifickým mechanismem účinku díky jejich lipofilnímu charakteru. V roce 1988 byl ovšem objeven receptor s vysokou afinitou k fytoKANABINOIDŮM, který byl označen CB₁, jež v roce 1993 doplnil druhý receptor CB₂. Tyto významné objevy tak odstartovaly výzkum zcela nového lidského signálního systému. Kanabinoidní (CB) receptory jsou vývojově velmi staré a lze je nalézt i u ostatních savců, ptáků, obojživelníků nebo ryb¹¹⁾. CB₁ i CB₂ jsou součástí rodiny receptorů, jejichž aktivita je v buňce přenášena G-proteinem (G_{i/o}). Tento

system je spjat s adenylát cyklázou, která je aktivací receptorů ovlivňována negativně čímž je tvořeno méně cAMP. Druhým signálním přenašečem je mitogenem aktivovaná proteinkináza, která je ovlivňována pozitivně. CB₁ receptory také prostřednictvím zmiňovaných signálních drah ovlivňují různé typy iontových kanálů (K⁺, Ca²⁺), produkci oxidu dusnatého, mobilizují arachidonovou kyselinu a pravděpodobně působí i dalšími mechanismy účinku, které ještě nejsou zdaleka prozkoumány a nemusí být spjaty se známými receptory^{11, 105}). Některé z účinků endokannabinoidů jsou pravděpodobně přenášeny rovněž jinými typy receptorů, např. vaniloidním typem receptoru TRPV1, dále PPAR_γ, nebo mohou působit jako modulátory na alosterických vazebných místech např. u muskarinových a glutamátových receptorů^{105, 106, 107}).

Dalším důležitým poznatkem je rozmístění ES v lidském těle. CB₁ receptory jsou nejvíce zastoupeny v centrální nervové soustavě (CNS), přičemž jejich heterogenní rozmístění má velký význam z hlediska účinků kanabinoidů na jednotlivé části mozku. Takto lze například vysvětlit účinky na vnímání, paměť nebo motorické funkce, díky zastoupení receptorů v mozkové kůře, hippokampu, bazálních gangliích nebo v mozečku¹⁰⁵). Vztah k emocím či stresu je spojován s umístěním CB₁ receptorů v amygdale, hippokampu, hypothalamu a prefrontální kůře, spojitost s ovlivněním příjmu potravy má hypothalamus, nucleus accumbens, nervus vagus a ganglion nodosum. Další důležitou lokací CB₁ receptorů jsou neurony zajišťující vnímání bolesti a to v mozku (periaqueductální šed', rostroventrální část prodloužené míchy, thalamus, hypothalamus, mozková kůra, limbický systém, amygdala) i mimo něj (zadní míšní kořeny, aferentní nervová vlákna)^{106, 108-112}). CB₁ receptory jsou také přítomné v gastrointestinálních a reprodukčních orgánech, na imunitních buňkách, sympatických gangliích, srdci, cévním endotelu, plicích, močovém měchýři, nadledvinkách nebo hypofýze. Umístění ES na různě lokalizovaných nervových zakončeních zajišťuje propojení kanabinoidní aktivity s excitačními a inhibičními neurotransmitery jako jsou acetylcholin, noradrenalin, GABA, dopamin, glutamát nebo serotonin, jejichž uvolňování je zpravidla působením CB receptorů inhibováno. V případě excitatorních mediátorů se tento jev nazývá depolarizací indukované potlačení excitace, v případě inhibitorních mediátorů jde o depolarizací indukované potlačení inhibice. Jedná se o druh krátkodobé synaptické plasticity a spolu s dlouhodobou synaptickou plasticitou tak může ES ovlivňovat strukturální a funkční vlastnosti neuronů a synapsí po dobu několika hodin až týdnů, což je důležité například pro myšlení, učení a další funkce CNS^{11, 105, 106, 109}). Aktivita CB receptorů je regulována retrográdně, což znamená, že endokannabinoidy jsou sekretovány z postsynaptické membrány

a působí na presynapticky uložené kanabinoidní receptory. ES je důležitou součástí nervové soustavy zajišťující strukturální a funkční homeostázu a je mu přisuzována role stresového regulátoru ^{113, 114, 115}).

CB₂ receptory a jejich funkce v organismu jsou mnohem méně studovány a prozkoumány než jak je tomu u CB₁. Jejich aktivita je stejně jako u CB₁ receptorů spjata negativně s adenylát cyklázou, ovšem bez ovlivnění iontových kanálů ¹¹⁶). CB₂ jsou nejvíce zastoupeny v imunitním systému, především v B lymfocytech a NK buňkách, dále také v makrofázích a T lymfocytech. Slezina, thymus, pankreas a tonzily jsou další místa s vysokým zastoupením CB₂ receptorů. Dochází zde především k regulaci tvorby cytokinů, což má za následek ovlivnění širokého spektra imunitních funkcí, jako je tvorba protilátek nebo proliferace a migrace leukocytů ^{11, 105, 117}). Novější studie ukazují, že CB₂ receptory jsou zastoupeny i v CNS, zejména v mikrogliových podpůrných buňkách a astrocytech, kde pravděpodobně sehrávají důležité funkce v procesu zánětu ^{106, 118, 119}).

Doposud nalezené lidské endogenní kanabinoidy jsou deriváty kyseliny arachidonové (obr. 6). K nejdůležitějším patří *N*-arachidonoylethanolamid (anandamid), 2-arachidonoylglycerol (2-AG) a 2-arachidonoylglycerylether (noladin ether). Anandamid působí jako parciální agonista na oba typy receptorů srovnatelně s THC. 2-AG působí agonisticky také na oba typy receptorů, ovšem s větší afinitou než je tomu u anandamidu. Noladin má potom signifikantně vyšší afinitu k CB₁. Tyto mediátory jsou syntetizovány *de novo* z fosfolipidů buněčných membrán a nejsou skladovány do zásoby ^{113, 114, 120}). Spouštěcím impulzem je depolarizace postsynaptické membrány doprovázená zvýšenou koncentrací Ca²⁺, nebo aktivace specifických receptorů typu G-proteinu (G_{q/11}) doprovázená uvolněním intracelulárních zásob Ca²⁺. Možná je také jejich vzájemná kombinace, která může mít souvislost s propojení několika různých neurotransmitterových systémů ^{104, 113}). Uvolněné endokanabinoidy se rozpouští v presynaptické membráně, kde reagují s CB receptory. Během krátké doby jsou z mimobuněčného prostoru transportovány difúzí, endocytózou nebo specifickým přenašečem zpět do buněk a enzymaticky rozštěpeny, přičemž transportní mechanismus zůstává nevyřešenou otázkou. Anandamid je štěpen především hydrolázou amidu mastných kyselin (FAAH) umístěnou postsynapticky na membránách hladkého endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu nebo na mitochondriích a 2-AG monoacylglycerollipázou umístěnou presynapticky v buněčném cytosolu. Různá substrátová selektivita a heterogenní orgánové rozmístění hydrolyzujících enzymů (kromě uvedených jsou identifikovány i další) může mít vztah k regulaci hladiny a délky trvání účinku různých

endokanabinoidů, případně k regulaci rozdílných signálních drah jedním endokanabinoidem^{21, 104, 108, 121}). Degradace se účastní i COX-2, která tak může ovlivňovat tonus ES. Zároveň jsou také tvořeny specifické metabolity typu prostaglandinů (PGE₂-G, PGI₂-G) s biologickou aktivitou na imunitní, neurologické nebo vaskulární úrovni. Zajímavá může být také souvislost se standardně používanými analgetiky typu inhibitorů COX¹²²).

Psychoaktivní fytkanabinoid THC je zodpovědný za účinky konopné drogy svým agonistickým působením na CB₁ a CB₂ receptorech. V některých případech bylo ovšem dokázáno i jeho antagonistické působení, zejména v závislosti na hustotě a vazebné účinnosti CB receptorů, což může mít význam u některých nemocí. Pro své agonistické vlastnosti se stal hlavní předlohou látkou pro syntetické deriváty. Nepsychoaktivní CBD naopak působí antagonisticky na CB₁ receptorech, čímž je zajímavý z hlediska modulace účinků THC, především oslabováním jeho nežádoucích efektů jako jsou sedace, tachykardie nebo anxiogenní účinky^{120, 123, 124}). CBD dále působí jako inverzní agonista CB₂ receptorů a lze tak spolu s dalšími mechanismy (inhibice cyklooxygenázy a lipoxygenázy, ovlivnění produkce prostaglandinů a leukotrienů) vysvětlit jeho imunosupresivní a protizánětlivé působení. Z *in vivo* pokusů na krysách vyplývá, že je CBD významná aktivní sloučenina, ovšem často přehlížená ve stínu THC. Zajímavé jsou také účinky antioxidační a neuroprotektivní, které mohou být významné v léčbě Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby. Pozitivní efekty byly sledovány na diabetes mellitus typu 1, cerebrální ischemii, revmatoidní artritidu a vývoj rakoviny. Z dalších jsou to antikonvulzivní (terapie epilepsie), anxiolytické, antipsychotické, antiemetické účinky a dále působí na zlepšení kvality spánku^{118, 120, 125, 245}).

3.2 Terapeutické využití kanabinoidů a používaná léčiva

Antiemetické účinky kanabinoidů jsou jednou z prvních indikací, která odstartovala éru jejich využívání v terapii. K tlumení nauzey a zvracení v souvislosti s chemoterapií u onkologicky nemocných jsou k dispozici dva přípravky – synteticky připravený THC (dronabinol) registrovaný pod názvem Marinol[®] (2,5 mg, 5 mg, 10 mg) a syntetický kanabinoid nabilon pod jménem Cesamet[™] (1 mg). Další indikací Marinolu[®] je profylaxe a léčba postoperativní nauzey a zvracení. Marinol[®] je registrovaným léčivým přípravkem v USA a Kanadě, Cesamet[™] potom navíc ve Velké Británii. Doporučené dávkování Marinolu[®] pro dospělé v jeho hlavní indikaci je 5 mg/m², 1 až 3 hodiny před aplikací chemoterapie, poté každé 2 až 4 hodiny s maximem 4 až 6 dávek za den. V případě postoperativní nauzey a zvracení je doporučená dávka 5 – 15 mg/m² každých 3 až 6 hodin.

Cesamet™ je podáván dvakrát denně, 1 až 2 mg. Maximální denní dávka je 6 mg rozdělená do 3 dávek ¹²⁶⁾. Využití intramuskulárně aplikovaného levonantradolu je limitováno nežádoucími účinky na CNS ²¹⁾. Kontrola emeze pomocí kanabinoidů je odůvodňována přítomností CB₁ receptorů v mozgovém kmeni. Inhibice motility zažívacího ústrojí je potom způsobena umístěním CB₁ receptorů na cholinergních nervových zakončeních myenterického plexu, způsobujících inhibici uvolňování acetylcholinu ^{112, 127)}. Zájem o využití kanabinoidů v této indikaci postupně upadá v souvislosti se zavedením modernější léčby pomocí antagonistů serotoninových (5-HT₃) a neurokininových (NK-1) receptorů, které nemají psychotropní nežádoucí účinky. Nicméně u pacientů u kterých nelze nauzeu a zvracení zvládnout konvenční léčbou lze aplikovat terapii kanabinoidy ^{21, 126)}.

Stimulace chuti k jídlu je možným zásahem ke zlepšení zdravotního stavu u kachexie, která se vyskytuje u rozvinutých stádií rakoviny nebo u lidí s AIDS. K tomuto účelu se využívá agonistického působení kanabinoidů na CB₁ receptorech, které podporuje anabolický metabolismus. Pro léčbu anorexie spojené s onemocněním AIDS je také registrován přípravek Marinol®. Doporučené dávkování je 2,5 mg před jídlem s denním maximem 20 mg ^{21, 126)}. Prokázané imunosupresivní účinky kanabinoidů, např. snižování hladiny CD4⁺ a CD8⁺ lymfocytů, nehrají v této indikaci negativní roli, i když pro potvrzení je nutné provést doplňující dlouhodobé studie. Další pozitivní aspekty, udávané pro užívání marihuany u HIV infikovaných lidí, jsou lepší kontrola nauzey a žaludeční nevolnosti, zlepšení anxiózních stavů a kvality spánku v souvislosti s onemocněním a antiretrovirální léčbou ^{21, 128)}. Odhalení účinků kanabinoidů na příjem potravy vedlo k dalším výzkumům v oblasti kontroly metabolických procesů. V ES tak byl objeven významný fyziologický regulátor energetického metabolismu, který má vliv na příjem potravy a kalorické vyváženosti. V tomto procesu jsou zapojeny části CNS uvedené v předešlém textu, ale také periferní tkáně zahrnující bílou tukovou tkáň, játra, slinivku, střeva a příčně pruhované svaly. Objevením antagonistů kanabinoidních receptorů se tak staly dalšími terapeutickými cíli obezita a metabolický syndrom. Mechanismus účinku nespočívá pouze v prostém omezení příjmu potravy, ale především v ovlivnění složité regulační kaskády centrálních neuropeptidů (např. proopiomelanokortinu, neuropeptidu Y, kortikotropin uvolňujícího a thyreotropin uvolňujícího hormonu, preproorexinu, melanin koncentrujícího hormonu) a periferních hormonů (leptinu, inzulinu, ghrelinu, glukokortikoidů, malonyl-koenzymu A, cholecystokininu). Antagonisté CB₁ receptorů dosahují v periferních tkáních úbytku hmotnosti zvýšením dozrávání adipocytů bez ukládání tuku v tukové tkáni, zvyšují lipolýzu a

regulují glukózovou homeostázu. Dalším pozitivním efektem v rámci zlepšení metabolického syndromu je periferní regulace metabolismu mastných kyselin snížením hladiny triglyceridů a LDL lipoproteinů. Pozitivní vliv je dále sledován u inzulínové rezistence a u pacientů s diabetem typu 2^{109, 129, 130}). Polymorfismus FAAH je také spojován s genetickou predispozicí k obezitě¹¹⁸). Doposud nejvíce testovaný selektivní antagonist CB₁ receptorů rimonabant (obr. 6) je obsažen v léčivém přípravku Acomplia[®], který byl registrován i v ČR. Acomplia[®] se používala jako doplněk dietních opatření a cvičení při léčbě obezity a byla vydávána na lékařský předpis s doporučeným dávkováním 20 mg/den^{131, 132}). Hlavním nežádoucím účinkem tohoto léku je zvýšený výskyt depresivních stavů, na které upozorňuje i zpráva Státního ústavu pro kontrolu léčiv z 19. 7. 2007. Zásadní kontraindikací bylo proto použití u pacientů s neléčenými psychickými poruchami^{109, 126, 133, 134}). Kvůli těmto nežádoucím účinkům byl přípravek ztažen z trhu a byla ukončena centralizovaná registrace. Díky pozitivním výsledkům u obezity a díky dalším doprovodným výhodným efektům se dá předpokládat důležitá pozice antagonistů CB₁ receptorů v klinické praxi, přičemž jsou další látky v 2. a 3. fázi klinických výzkumů^{110, 248}).

Další zajímavou oblastí jsou analgetické účinky zprostředkované ES, bez ovlivnění doposud nejúčinnějšího známého systému opioidního. Agonisté CB₁ receptorů působí na širokou škálu typů bolestí, jako jsou zánětlivá, akutní nebo neuropatická, přičemž se předpokládá fyziologická role ES při modulaci senzitivity bolesti. Na druhou stranu antagonisté CB₁ receptorů analgetický efekt ruší. V antinocicepční dráze ovlivněné ES jsou zastoupeny oblasti CNS (viz. výše), z nichž nejdůležitější se zdají být především amygdala, periakveduktální šed' a rostroventrální část prodloužené míchy, které jsou zastoupeny v regulaci sestupné dráhy bolesti. Předpokládá se také antinocicepční působení na úrovni míchy a periferních nervů. Z doposud objevených mediátorů zastoupených v dráze bolesti ovlivněné ES jsou to neurotransmitery GABA a glutamát, které se účastní antinocicepčního účinku při aktivaci CB₁ receptorů. U nepříliš prozkoumaných CB₂ receptorů se také předpokládá analgetický potenciál. Při současné aktivaci opioidního a endokanabinoidního systému dochází k synergismu analgetického účinku^{111, 116, 135}). S pozitivními analgetickými výsledky u onkologických pacientů byly testovány perorální THC (10, 15 a 20 mg) a benzopyranoperidin (syntetický analog THC, 4 mg). Ajulemová kyselina účinkovala u chronické neuropatické bolesti, intramuskulární levonantradol byl pak s úspěchem použit u pooperační bolesti. Sativex[®] (sublingvální sprej) byl úspěšně testován u bolesti způsobené revmatoidní artritidou, u neuropatické bolesti spojené s roztroušenou sklerózou (viz. dále),

nebo u kancerózní bolesti^{21, 123, 136}). Z dalších typů jsou pozitivní výsledky udávány u neuralgie trigeminu, migrény nebo u svalové a neuropatické bolesti pacientů s AIDS. Výsledky klinických studií u analgetických účinků kanabinoidů jsou ovšem často nejasné, především v souvislosti s účinností na typy bolestí s různým patofyziologickým základem^{21, 118, 137}).

Roztroušená skleróza je autoimunní neurodegenerativní onemocnění doprovázené demyelinizací, u něhož se s částečným úspěchem využívá kanabinoidů. V klinických studiích byly vyzkoušeny marihuana, hašiš, perorální THC, nabilon a extrakty z konopí podávané perorálně nebo sublingválně s většinovým obsahem THC, CBD, případně jejich směsi. Z často nepřesvědčivých výsledků vyplynuly symptomy spojené s onemocněním, u kterých došlo ke zlepšení. Jsou to spasticita a s ní související bolest, kvalita spánku a třes. Slibným preparátem je v současnosti Sativex[®], který je registrován v Kanadě pro symptomatickou úlevu od neuropatické bolesti způsobené roztroušenou sklerózou. Kromě již zmiňovaných pozitivních účinků, vyplývá z klinických studií se Sativexem[®] zlepšení dysfunkce močového měchýře a mobility pacientů^{21, 112, 118, 138}). Mechanismus účinku u bolesti a spasticity pravděpodobně spočívá v ovlivnění motorických neuronů a nedostatku jejich inhibice sestupnými drahami vyšších nervových center vzhledem k jejich demyelinizaci. Určitou pozitivní úlohu mohou sehrávat také CB₂ receptory s protizánětlivým potenciálem vzhledem k autoimunnímu charakteru roztroušené sklerózy^{117, 119, 139}). Stejně tak jako u ovlivnění bolesti je vzhledem ke komplexnosti endokanabinoidního systému možné předpokládat různé efekty kanabinoidů na různé části nervové soustavy, z čehož mohou plynout nejednoznačné výsledky v klinických studiích. Pozitivní účinky kanabinoidů na roztroušenou sklerózu jsou všeobecně přijímány, alespoň na určité skupiny pacientů, i když je nutné vyhodnotit možné nežádoucí účinky spojené s dlouhodobým užíváním^{137, 140, 141}).

Vliv kanabinoidů a role ES byly zkoumány také u dalších neurodegenerativních onemocnění, u Parkinsonovy (PD) a Alzheimerovy choroby (AD), amyotrofické laterální sklerózy (ALS) a Huntingtonovy chorey (HD)^{118, 119, 142, 143}). U všech zmíněných se v patofyziologii neurodegenerace významně uplatňuje rozvoj zánětlivé reakce a to především v astrocytech a mikrogliových buňkách. Tyto buňky jsou součástí imunitního systému v CNS s protektivními vlastnostmi. Při jejich nadměrné aktivaci ovšem dochází k toxickému efektu a zvýšené destrukci neuronů kvůli hyperaktivaci imunitního systému. Neuroprotektivní aktivita spojená s ES v sobě zahrnuje několik možných mechanismů – například ochranu před glutamátovou excitotoxicitou nebo ischemií, redukcí influxu Ca²⁺ doprovázenou inhibicí

následných signálních kaskád, ovlivnění dalších metabolických drah fosforylací kinázami, potlačení produkce TNF- α , produkci transkripčních faktorů nebo antioxidační aktivitu zprostředkovanou fenolickými skupinami kanabinoidů^{112, 142, 144}). V případě uváděných neurodegenerativních onemocnění dochází k ovlivnění obou známých kanabinoidních receptorů, přičemž vliv CB₂ na modulaci zánětlivé reakce a jejich umístění v mikrogliových buňkách²⁴⁷) je důležitým poznatkem, který může vést k vývoji nových léčiv založených na specifických CB₂ agonistech se schopností odstraňování amyloidních plaků. CB₁ receptory jsou také významně spojeny s neuroprotektivními vlastnostmi a podporou tvorby nových funkčních synapsí, na druhou stranu kvůli snižování uvolňování acetylcholinu v hippocampu by mohlo docházet ke zhoršování příznaků AD. Tento efekt je znám také při používání marihuany zdravými jedinci, kdy dochází ke zhoršení krátkodobé paměti a je důkazem propojení poznávacích procesů, myšlení a ES. V jedné studii zahrnující 6 pacientů užívajících dronabinol (2,5 mg) bylo ovšem dosaženo určitých pozitivních výsledků u AD^{118, 119, 142, 143}). V případě PD nebyly zjištěny jednoznačné pozitivní účinky při užívání nabilonu a rimonabantu, přičemž aktivace CB₁ receptorů může spíše vést k apoptóze dopaminových neuronů. Zapojení ES ve vývoji nemoci a jejich symptomů je ovšem významné s možným terapeutickým potenciálem^{21, 112, 115, 118, 142}). U ALS je díky CB₂ protizánětlivým účinkům zpomalena progresse nemoci, aktivace CB₁ receptorů však pravděpodobně negativně ovlivňuje přežívání motorických neuronů. Ve studii účinků THC na ALS bylo dosaženo pouze zlepšení spasticity, chuti k jídlu a nespavosti. U poslední zmíněné HD byla zjištěna nízká hladina endokanabinoidů v CNS a aktivace ES by mohla pomoci při kontrole motorických problémů. V několika klinických studiích prováděných na lidech ovšem nebylo dosaženo pozitivních výsledků. Jako slibná léčiva nemocí spojených s CNS se jeví použití inhibitorů degradačních enzymů endokanabinoidů nebo inhibitorů jejich vychytávání. Často jsou v klinických studiích dosahovány pozitivní výsledky jak u agonistů tak antagonistů CB receptorů, proto jak zvyšování, tak snižování endokanabinoidní aktivity v organismu může přinést pozitivní výsledky v závislosti na dávkování nebo fázi choroby. Vliv ES na neurodegenerativní choroby je nesporný a velmi slibný ve vývoji nových léčiv, výzkum v této oblasti a poznání všech regulačních mechanismů je ovšem teprve v počátcích^{115, 118, 142, 143}). Otázkou také zůstává, jestli je možné zabránit rozvoji neurodegenerace již v počátcích s využitím ES a jeho neuroprotektivních účinků, nebo jestli je možné využít ovlivnění CB receptorů „pouze“ k potlačení symptomů.

Imunosupresivní a protizánětlivé účinky zprostředkované CB₂ receptory jsou charakterizovány snížením produkce prozánětlivých (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF a IFN- γ) a zvýšením produkce protizánětlivých cytokinů (IL-4, IL-10). S odhalením těchto účinků se otevírá potenciál ovlivnění chronických zánětlivých chorob. Jako jedna ze slibných účinných látek byla vyvinuta ajulemová kyselina, která také působí tlumivě na lipoxygenázu a COX-2^{112, 117, 119, 125, 145}). Potenciál protizánětlivých účinků byl již zmíněn ve vztahu k neurodegenerativním onemocněním (viz. výše). S částečnými pozitivními výsledky byly testovány ajulemová kyselina, kanabidiol a Sativex[®] u revmatoidní arthritidy. Jedná se především o mírnění symptomů kloubních potíží a snížení imunitní reaktivity^{117, 146}).

Pro úplnost jsou v následujícím odstavci uvedeny další potenciální indikace využívající ovlivnění ES. Ve většině případů jsou dostupné výsledky *in vitro*, případně s využitím zvířecích modelů, často však s omezeným počtem klinických studií u lidí.

- Jedná se například o možnost terapie Gilles-Touarettova syndromu (orálně podávané THC redukovalo motorické a zvukové tiky a obsedantně-kompulzivní chování), poškození míchy, epilepsie (potenciální antikonvulzivní účinky – nejslibnější kanabidiol), anorexie, mozkové mrtvice, osteoporózy, nespavosti, respiračního systému (asthma bronchiale, bronchodilatace a protizánětlivé účinky, vyšší dávky THC naopak iritací působí bronchokonstrikci), kardiovaskulárních (např. prevence aterosklerózy, ovlivnění hypertenze a vliv na metabolický syndrom – také viz. výše) a gastrointestinálních chorob (redukce emeze, gastrické sekrece a střevní motility, potenciál při léčbě chronických zánětlivých střevních onemocnění)^{21, 112, 117, 118, 127}). Dále byl také objeven pozitivní účinek antagonistů CB₁ receptorů na průběh fibrózy a steatózy jater^{147, 148}). Neméně zajímavou oblastí je ovlivnění reprodukčního systému, kde jsou zjištěny účinky ES na dozrávání spermií (snížují jejich produkci, životnost a motilitu), dělohu a na průběh těhotenství^{108, 118, 149}).
- Redukce očního tlaku u glaukomu byla pozorována po aplikaci marihuany nebo THC (oční kapky s koncentrací 0,05 a 0,1%). Nevýhodou je v tomto případě krátká doba působení, nežádoucí centrální účinky u systémového podání a možnost použití více efektivních a méně toxických léčiv^{21, 118}). ES byl také objeven v sítnici oka¹⁵⁰).
- Možnost terapie rakoviny s využitím kanabinoidů vychází z poznatků zvýšené exprese CB receptorů na některých rakovinných buňkách. Stimulací receptorů tak může docházet k selektivnímu ovlivnění nádoru s možností přímého zastavení růstu, buněčné smrti, inhibice migrace nebo nepřímo inhibicí angiogeneze a ovlivněním imunitního systému.

Důležitou úlohu mohou také sehrávat tělní metabolity kanabinoidů jako např. ethanolamin. Na druhou stranu v případě že rakovinné buňky neexprimují CB receptory, aplikované kanabinoidy mohou působit tlumivě na imunitní systém, čímž může docházet k supresi antitumorové imunitní odpovědi. Pozitivní výsledky způsobené aktivací CB receptorů byly pozorovány u rakoviny štítné žlázy, prsu, tlustého střeva, prostaty, lymfomů, melanomů, rakoviny pankreatu a u některých nádorů mozku. V případě karcinomu plic, močového měchýře, spinocelulárního karcinomu, glioblastomu, astrocytomu a karcinomu ledvin mohou naopak kanabinoidy působit stimulačně na růst nádorů. Pravděpodobně také závisí na stádiu diferenciaci buněk. Pouze další studie však odhalí, jestli se zásah do ES zařadí mezi již existující léčebné postupy rakoviny^{107, 118, 246}. Pro úlevu od bolesti způsobenou pokročilými stádii rakovinou, kde nestačí vysoké dávky opiátů, je v Kanadě používán Sativex[®]¹³⁸.

- Poruchy nálady jsou dalším centrem pozornosti při studiu ES. Vliv na emoce, anxiolytické a antidepressivní působení jsou zajímavými farmakologickými cíly. Nutno ale upozornit na opačné účinky (také viz. oddíl nežádoucí účinky), kde kanabinoidy mohou vyvolat nebo zhoršit deprese případně působit anxiogenně, což je vysvětlováno především různou dávkou kanabinoidů a predispozicí jedinců^{106, 115, 151}. Kognitivní procesy nebo vývoj nervové soustavy jsou další potenciální oblasti vlivu ES^{106, 152}.
- Propojení ES s opioidními receptory, dopaminergním systémem a možnost regulace pocitu odměny a posilování tvorby závislosti jsou impulzy k vývoji nových léčiv v terapii závislosti na alkoholu, opiátech nebo nikotinu^{118, 153, 154}. Dále lze možnost modulace dopaminergních mesolimbických signálních drah promítnout i do léčby obezity vzhledem k ovlivnění pocitu odměny a motivace ve vztahu k příjmu potravy^{130, 153}.

Potenciál inhibitorů degradačních enzymů endokanabinoidů (viz. 3.1 lidský endokanabinoidní systém) je v dnešní době další perspektivní studovanou oblastí. Velkou předností je absence nežádoucích účinků na CNS, spojených s aplikací agonistů přímo na CB receptory. Uváděna je také větší specifita účinku pouze na místa, kde jsou endokanabinoidy tvořeny a hydrolyzovány. Možné uplatnění kopíruje již výše probírané indikace^{108, 121, 154, 155}.

3.2.1 Nežádoucí účinky, bezpečnost a interakce s ostatními léky

Vzhledem k rozsáhlému působení kanabinoidů lze pozorovat v souvislosti s jejich aplikací řadu nežádoucích účinků, především na kardiovaskulární, respirační a nervový systém.

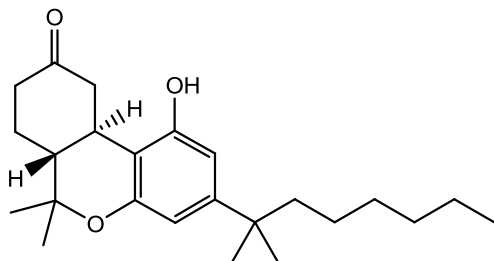
Užívání marihuany může vést k psychologickým poruchám a k závislosti. Nežádoucí účinky spojené s kardiovaskulárním systémem jsou tachykardie, hypertenze, palpitace a ortostatická hypotenze. Tolerance k těmto účinkům se vyvíjí během několika dnů až týdnů, stejně tak jako k některým dalším THC zprostředkovaným efektům. Tento jev je vysvětlován redukcí hustoty a vazebné účinnosti CB₁ receptorů. Z nežádoucích účinků spojených s nervovou soustavou se jedná o sucho v ústech, nauzeu, ospalost, otupělost, závratě nebo noční můry. Dále se vyskytují poruchy vízu, rozmazané vidění, suché oči, červenání a pálení očí, mydriáza, fotofobie a svalová slabost. Akutní intoxikace je spojená s halucinacemi, depersonizací, strachem z umírání, paranoiou, depresemi a psychózami. Dlouhodobé silné užívání marihuany může vyústit v psychologické dysfunkce, neschopnost soustředění a ztráty paměti^{11, 120, 126, 145, 156}.

S přihlédnutím k vyjmenovaným nežádoucím účinkům, variabilitě působení u různých pacientů, nedostatku klinických studií a vzhledem k současné nedostupnosti standardizovaného rostlinného materiálu, nelze všeobecně doporučit léčebné experimentování s konopím. U pacientů trpících kardiovaskulárními chorobami hrozí zvýšené riziko mozkové mrtvice a infarktu myokardu. Dále vzniká velké nebezpečí rozvoje případně zhoršení stavu psychiatrických poruch, jako jsou schizofrenie¹⁵⁷, psychózy, maniodepresivní epizody, poruchy příjmu potravy, deprese nebo panické a anxiózní stavy. Marihuana může také způsobit nežádoucí zvýšení hmotnosti u diabetických a obézních pacientů a její každodenní užívání představuje rizikový faktor vzniku jaterní steatózy u pacientů s chronickou hepatitidou typu C. Lidé trpící chronickou obstrukční plicní nemocí, asthmatem, tuberkulózou, rakovinou nebo pacienti po transplantacích by se také měli neodborné aplikaci konopí vyhnout. Těhotné a kojící ženy by neměly užívat marihuanu vzhledem k negativnímu působení na strukturální a neurobehaviorální vývoj plodu. S prenatální expozicí marihuany je také spojeno zvýšené riziko rozvoje leukémie v dětství.

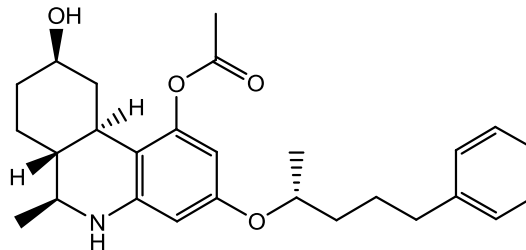
Marihuana a kanabinoidy interagují s celou řadou léčiv. V případě opiátů, barbiturátů, benzodiazepinů, myorelaxancií a alkoholu dochází k potenciaci, což může vést k útlumu CNS. Snížení účinku je pozorováno u inhibitorů proteázy a theofylinu, fluoxetin může vyvolat epizody mánie, u sildenafilu pak vzniká nebezpečí infarktu myokardu. Kombinace s tricyklickými antidepresivy, anticholinergiky a α -agonisty představuje zvýšené riziko tachykardie a exacerbace hypertenze. Z látek nebezpečných v kombinaci s konopím lze dále zmínit naltrexon, disulfiram, neuroleptika a anestetika. Při používání se systémově podávanými kortikoidy se zvyšuje riziko imunosuprese^{126, 145, 148, 156}.

Obr. 6: Látky ovlivňující endokanabinoidní systém ¹¹⁾.

Syntetické s klasickou kanabinoidní strukturou

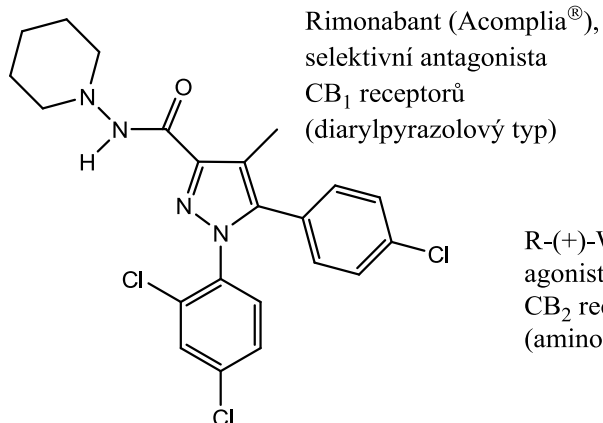


Nabilon (Cesamet™)

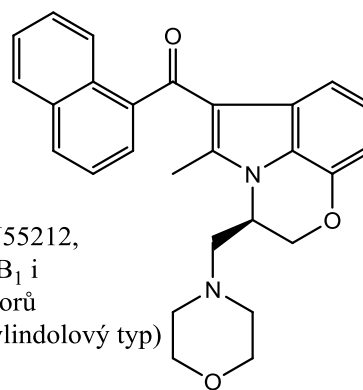


Levonantradol

Syntetické s nekanabinoidní strukturou

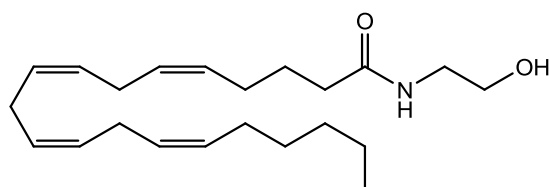


Rimonabant (Acomplia®),
selektivní antagonist
CB₁ receptorů
(diarylpyrazolový typ)

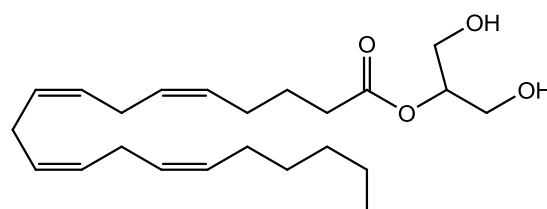


R-(+)-WIN55212,
agonista CB₁ i
CB₂ receptorů
(aminoalkylindolový typ)

Endogenní kanabinoidy *



Anandamid



2-Arachydonoylglycerol

* Znázorněná konformace U-tvaru endogenních kanabinoidů nejvíce koresponduje se strukturou THC a je tak vysvětlováno ovlivnění stejných receptorů takto strukturálně odlišnými molekulami.

Vzhledem k významnému metabolismu kanabinoidů jaterním cytochromovým systémem může docházet k farmakokinetickým interakcím s ostatními léky. Zvýšení biologické dostupnosti kanabinoidů může být způsobeno enzymovými inhibitory, jako jsou makrolidová antibiotika, antimykotika, blokátory kalciových kanálů, inhibitory HIV proteázy, amiodaron a isoniazid. Rifampicin, karbamazepin, fenobarbital, fenytoin, primidon, troglitazon nebo přípravky na bázi třezalky tečkované mohou naopak způsobit zrychlený jaterní metabolismus kanabinoidů. Další interakce lze předpokládat s léky se silnou vazbou na plazmatické proteiny^{126, 156)}.

3.2.2 Aplikační lékové formy a farmakokinetika

Většina tradičních aplikačních způsobů využívajících rostlinnou drogu zahrnuje v její přípravě zahřátí vzorku (kouření, vaporizaci, pečení) pro dosažení dekarboxylace kyselé formy kanabinoidu (především THCA) na neutrální analog (THC)^{25, 156)}. Základním aplikačním způsobem konopí je kouření, které zajišťuje téměř okamžitý nástup účinku s maximem plazmatické hladiny asi po 9 minutách a minimální jaterní first-pass metabolismus. Variabilita biologické dostupnosti 2 – 56 % je způsobená především rozdílností ve způsobu kouření a rozdílné kvalitě drogy. S tímto související pozitivum je možnost titrace požadovaných účinků pacientem, negativem je pak špatná kontrola dávkování^{55, 158)}. Kouření je však v moderní medicíně nevhodnou lékovou formou, zejména kvůli vzniku karcinogenních látek v průběhu spalování a vzhledem ke společenským normám. Při kouření marihuany vzniká vyšší obsah karcinogenů než u klasických cigaret, což může vést ke vzniku karcinomu plic. Kouření marihuany je také spojováno s vyšším výskytem tumorů hlavy a krku, s rozvojem faryngitidy, rinitidy a chronické obstrukční plicní nemoci^{145, 159, 160)}. Modernější metodou inhalace kanabinoidů z rostlinné drogy představuje vaporizér, který proudem regulovaně zahřátého vzduchu extrahuje rostlinnou drogu nebo kapalný extrakt a vznikající jemný kouř jímá v sáčku, ze kterého se následně inhaluje. Tato cesta je výhodnější z hlediska aplikace, dobré biologické dostupnosti kanabinoidů (54 % extrahovaných kanabinoidů, přičemž průměrné vstřebání plicemi z celkové dávky je 30-40 %) a redukce tvorby karcinogenních látek^{161, 162)}. Při kouření a optimalizovaném zahřívání ve vaporizéru dochází k úplné přeměně THCA na neutrální THC, ale při kouření také k jeho částečné destrukci^{55, 163)}.

Měkké želatinové tobolky léčivého přípravku Marinol[®] představují perorální lékovou formu, kde jsou kanabinoidy vzhledem ke svému lipofilnímu charakteru rozpuštěny v oleji.

Jako nejvhodnější jsou uváděny sezamový olej a glykocholát, které zvyšují biodostupnost kanabinoidů. Cesamet™ je také určen k perorální aplikaci. Tato léková forma je vzhledem k farmakokinetickým parametrům považována spíše za méně vhodnou, především kvůli pomalé absorpci, degradaci v žaludku a významnému jaternímu first-pass metabolismu kanabinoidů. Biologická dostupnost po perorálním podání se pohybuje v rozmezí 4 – 20 % s maximální plazmatickou hladinou dosaženou za 4 až 6 hodin^{19, 126}).

Orální sprej Sativex® aplikovaný na sliznici úst poskytuje v jedné dávce (100 µl) 2,7 mg THC současně s 2,5 mg CBD, což z celkového extraktu představuje 70 %. V minoritním množství jsou dále zastoupeny ostatní fytoKANABINOIDY (5%), flavonoidy, terpenoidy a fytoSTEROLY, protože se jedná o rostlinný extrakt. Nástup účinky je v průběhu 15 – 40 minut, což pacientům umožňuje účinně titrovat dávku a minimalizovat nežádoucí účinky. Firmou GW Pharmaceuticals, která se věnuje vývoji léčiv založených na kanabinoidech včetně Sativexu®, bylo také vyvinuto elektronické dávkovací zařízení. Toto by bylo možné použít k dávkování Sativexu® s výhodami, jako jsou umožnění záznamu dat a kontroly compliance ošetřujícím lékařem nebo farmaceutem, možnost kontroly dávkování případně předávkování nebo zneužití^{11, 55, 123, 138}). Sativex® využívá poznatku, že extrakt z rostliny má v mnohých ohledech výhodnější účinky než jednotlivé izolované látky. Zde se jedná především o standardizovaný obsah současně podávaného THC a CBD. Tento koncept je známý i u dalších léčivých rostlin v moderní fytoterapii a vysvětluje se současným synergistickým případně antagonistickým působením obsahových látek v celkovém extraktu. K dispozici jsou také orální spreje s většinovým množstvím THC (Tetranabinex®) a CBD (Nabidiolex®)^{19, 123, 164}).

THC-hemisukcinát v podobě rektálních čípků je v porovnání s perorální aplikací výhodnější díky vyšší absorpci a nižšímu first-pass metabolismu, což zajišťuje asi dvojnásobnou biologickou dostupnost. Další výhodnou lékovou formu z hlediska farmakokinetiky mohou představovat transdermální náplasti s postupným uvolňováním⁵⁵). Pro doplnění lze uvést konopný odvar jako tradiční lékovou formu, která je využívána v etnomedicíně například na Jamajce a jeho příprava se rozšířila i v Evropě. Kanabinoidy jsou ovšem ve vodě méně rozpustné. THC pouze asi ze 17 %, kdežto jeho kyselý analog THCA už z 63 %, přičemž vařením ve vodě je konverze THCA na THC minimální. Je pravděpodobné, že za účinky konopného odvaru nebo nálevu mohou být zodpovědné právě kyselé formy kanabinoidů. Nejen THCA, ale i kombinace dalších kyselých forem (kanabigerolová kyselina, tetrahydrokanabivarinová kyselina), případně dalších sekundárních metabolitů jako jsou

flavonoidy, mohou představovat zajímavý terapeutický zdroj ¹⁶⁵⁾. Suchý extrakt po odpaření rozpouštědla není v případě kanabinoidů vhodný vzhledem k tomu že se tvoří olejovitá substance nevhodná pro přípravu lékových forem. Naopak velice vhodnou metodou se jeví extrakce za superkritických podmínek ¹¹⁾.

Plazmatická koncentrace absorbovaného THC se díky lipofilitě kanabinoidu rychle snižuje distribucí do vysoce prokrvených tkání (plíce, srdce, mozek a játra) a jaterním metabolismem. Významným prostorem pro ukládání kanabinoidů je tuková tkáň. Distribuční objem THC je 10 l/kg a z 95 – 99 % se váže na plazmatické lipoproteiny. THC rychle přestupuje přes placentu, přičemž koncentrace jsou 3 – 6 x nižší v pupečnickové krvi oproti koncentraci v krvi matky. Naopak koncentrace v mléce kojících žen mohou být až několikanásobně vyšší. Hlavní metabolismus THC probíhá v játrech, i když i ostatní orgány jako jsou mozek, tenké střevo a plíce jsou metabolicky aktivní. Hlavní jaterní enzymové systémy zodpovědné za oxidaci THC jsou CYP 450, 2C9, 2C19 a 3A4 a je známo více než 100 metabolitů THC. Oxidací THC vzniká jako hlavní sloučenina 11-hydroxytetrahydrokanabinol (11-OH-THC), který je také psychoaktivně účinný. Dalším krokem je oxidace na karboxylovou kyselinu za vzniku farmakologicky neaktivní 11-nor- Δ^9 -tetrahydrokanabinol-9-karboxylové kyseliny (THC-9-COOH). THC-9-COOH a jeho glukuronid jsou hlavními konečnými produkty lidského metabolismu THC. Cytochromové systémy mohou oxidovat i další místa kanabinoidní molekuly, především v poloze 8 nebo alifatický postranní řetězec (číslování podle dibenzopyranu). Metabolismus CBD je analogický THC oxidací methylové skupiny 7 (číslování podle *p*-cymenu) až na karboxylovou kyselinu. Z farmakokinetického hlediska nemá CBD významný vliv na metabolismus THC. Eliminace THC probíhá z 65 % stolicí (především 11-OH-THC), z 20 % močí (především glukuronidy THC-9-COOH) a během 5 dní je exkretováno 80 – 90 %. Poločas exkrece kanabinoidů je ovšem variabilní a vzhledem k postupnému uvolňování z tukových zásob a enterohepatální cirkulaci může po dlouhodobém používání marihuany případně čistých kanabinoidů činit až několik týdnů. Farmakokinetika kanabinoidů či profil nalezených tělních metabolitů jsou důležitými parametry pro racionální farmakoterapii a pro testování expozice návykovými látkami ve forenzních vědách ^{55, 126)}.

3.3 Ostatní sekundární metabolity s významnými farmakologickými vlastnostmi

Nejen kanabinoidy jsou farmakologicky aktivní sekundární metabolity obsažené v konopí. I když ostatní látky a jejich účinky leží často právě ve stínu kanabinoidů, dá se předpokládat jejich farmakologická aktivita. Pro více informací je ovšem nezbytné nahlížet i k jiným rostlinám s podobnými sekundárními metabolity, vzhledem k nedostatku rozsáhlejších studií věnujících se konopí.

Antibakteriální účinky konopné silice byly vyhodnoceny jako mírné ¹⁶⁶⁾, antitrombotické účinky v porovnání s ostatními silicemi spíše nevýrazné ¹⁶⁷⁾, ale u β -karyofilenu byl objeven výrazný agonistický účinek na CB₂ receptory ES systému, který může mít vztah k protizánětlivým účinkům ¹⁶⁸⁾.

Flavonoidy z konopí inhibovaly *in vitro* tvorbu prostaglandinu E₂ ¹⁶⁹⁾ a uvádějí se jejich účinky protizánětlivé a antioxidační. Předpokládá se, že spolu s terpenoidy představují skupinu látek, modulujících účinek kanabinoidů, jak farmakodynamicky, tak díky inhibici CYP 450 ^{75, 170)}. Konopné kanflaviny A a C vykazaly antileishmaniózní účinek, 6-prenylapigenin pak mírnou anti-MRSA a antimalarickou aktivitu ⁷⁵⁾. Z účinků prenylovaných flavonoidů a isoflavonoidů ostatních rostlin lze zmínit inhibiční aktivitu na enzymy metabolismu arachidonové kyseliny (COX, LOX) ¹⁷¹⁾, fytoestrogenní a chemoprotektivní účinky obsahových látek chmelu ¹⁷²⁾, inhibiční účinky na enzym tyrozin fosfatázu 1B ⁷⁸⁾, nebo *in vitro* cytotoxickou aktivitu ⁷⁹⁾.

Dihydrostilbenové metabolity, dihydrofenathreny a spiroindany jsou skupinou konopných látek, jejichž aktivita nebyla podle dostupné literatury příliš zkoumána. Biologická aktivita těchto sloučenin je ovšem zajímavá, což nasvědčují podobné rostlinné sekundární metabolity s účinky např. antifungálními ^{173, 174)} a antibakteriálními ^{175, 176, 177)}, antineoplastickými ^{177, 178, 179, 180)}, neuroprotektivními ¹⁸¹⁾ nebo antialergickými ¹⁸²⁾. Lignanamidy jsou také neprobádanou součástí konopných sekundárních metabolitů, přičemž například u blínu černého byla objevena cytotoxická aktivita kanabisinu D a G a grossamidu ¹⁸³⁾. Tribulusamidy A a B jsou pak hlavní hepatoprotektivní lignanamidy v kotvičniku ¹⁸⁴⁾.

3.4 Farmakologické účinky a potenciál využití polynenasycených mastných kyselin konopného oleje

Metabolismus eikosanoidů – prostaglandinů, leukotrienů a tromboxanů, které vznikají přeměnou mastných kyselin pomocí enzymů COX a LOX, je důležitý při regulaci

metabolických dějů a dysbalance v příjmu mastných kyselin může mít za následek různé patologické stavy. Pokud převládá příjem ω -6 mastných kyselin s nedostatkem jejich ω -3 analogů, je tvořeno více produktů odvozených od kyseliny arachidonové, PGE_2 a LTB_4 , což jsou látky potencující zánět. Naopak s příjmem ω -3 mastných kyselin jsou tvořeny alternativní prostaglandiny série 3 a leukotrieny série 5, které mají odlišnou biologickou aktivitu a v regulační kaskádě působí tlumivě, čímž brzdí rozvoj zánětlivé reakce (obr. 5)^{97, 185)}. Součástí těchto dějů je také uvolňování široké škály cytokinů, které dále ovlivňují proces zánětu a dochází zde k propojení s imunitním systémem. Z výše uvedeného vyplývá, že ω -3 protizánětlivé účinky jsou způsobené kompeticí s kyselinou arachidonovou a tvorbou alternativních protizánětlivě působících eikosanoidů. Esenciální mastné kyseliny proto skýtají terapeutický potenciál při zánětlivých a autoimunních chorobách^{101, 185)}. Pozitivní efekty byly dokázány například při léčbě lupénky, chronického zánětlivého kožního onemocnění, u něhož byly zkoušeny především rybí ω -3 mastné kyseliny^{186, 187)}. Dále u chorob jako jsou asthma, ulcerózní kolitida, Crohnova nemoc nebo revmatoidní artritida. Často se ovšem jedná o multifaktoriální onemocnění, kde je dysbalance esenciálních mastných kyselin pouze jedním článkem řetězce etiopatogeneze^{34, 98, 101, 185, 188)}. I když největší terapeutický význam mají EPA a DHA které se nachází zejména v rybích tucích, konopný olej obsahuje významné procento ω -3 kyselin, které mohou sloužit jako prekurzory pro další biosyntézy protizánětlivých eikosanoidů¹⁸⁸⁾. Některé studie ovšem nasvědčují, že přeměna kyseliny α -linolenové je u dospělých lidí účinná jen ze 4 až 9 %, u žen může dosahovat až 21 % díky vyšším koncentracím estrogenů^{189, 190)}.

Souhra vysokého obsahu lehce stravitelného proteinu, mastných kyselin, vlákniny, vitamínů a minerálů dělají ze semen a z nich získávaného oleje kvalitní nutriční zdroj. Pro terapeutické účinky uváděné v literatuře je ovšem nejdůležitější obsah nenasycených mastných kyselin ω -6 a ω -3 v poměru 2,5:1 typický pro konopný olej. Tento poměr je důležitý pro správný metabolismus mastných kyselin, pro jejich přeměnu klíčovým enzymem Δ^6 -desaturázou a pro další účinky mediátorů z nich tvořených. Nejnovější poznatky ukazují, že neoptimálnější ω -6: ω -3 poměr je 2:1 až 3:1¹⁹¹⁾. Pro porovnání lze uvést tento poměr pro moderní západní dietu 15 – 20:1, což má vliv na vývoj mnoha civilizačních chorob jako jsou hypertenze, obezita, diabetes, asthma, deprese, autoimunní choroby nebo rakovina¹⁸⁵⁾. Optimální profil mastných kyselin má také olej získávaný ze semen černého rybízu, u něhož byly prokázány pozitivní účinky na imunitní systém. Naopak oleje z brutnáku nebo pupalky se v klinických studiích příliš neosvědčily, což je pravděpodobně důsledek nepřítomnosti ω -3

kyselin ^{98, 191}). Polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (20 – 22 uhlíkových atomů) působí také jako modulátory genové transkripce ¹⁹⁰).

Jednou z často diskutovaných indikací je atopický ekzém, což je zánětlivé chronické kožní onemocnění, které zahrnuje odchylky imunologické a kožní. Rozvoj ekzému je založen na genetické predispozici a na vývoji alergické reakce. Existuje několik faktorů, kterým se připisuje důležitá role v etiopatogenezi a jedním z nich je defektní metabolismus mastných kyselin (snížená aktivita Δ^6 -desaturázy, změna v profilu kožních lipidů a v metabolismu sfyngomyelinu a ceramidu). Bylo provedeno mnoho klinických studií na využití různých olejů nebo suplementace jednotlivými mastnými kyselinami v léčbě atopického ekzému, ale z těchto pozorování nevyplývá jejich jednoznačný pozitivní vliv. Ve studii, která přímo zkoumala vliv perorálního podávání konopného oleje (30 ml/den), bylo dosaženo pozitivních výsledků na zlepšení suchosti kůže, svědivosti a snížení dodatečného používání dermatologik. Tento efekt se dá vysvětlit zlepšením membránových funkcí díky příjmu polynenasycených mastných kyselin v metabolicky optimálním poměru, kde kyselina linolová je významnou složkou ceramidů, které zastávají důležité bariérové funkce. Díky obsahu γ -linolenové a stearidonové kyseliny se může efektivně obejít limitující krok defektní Δ^6 -desaturázy při biosyntéze prostaglandinů a leukotrienů. Díky této suplementaci, v tomto případě především γ -linolenovou kyselinou, je snížena produkce prozánětlivých metabolitů odvozených od kyseliny arachidonové (leukotrieny série 4 – LTB_4 , prostaglandiny série 2 – PGE_2) a jsou syntetizovány alternativní látky tlumící zánět (prostaglandiny série 1, 15-hydroxy-dihomo- γ -linolenová kyselina). Prostřednictvím snížení produkce PGE_2 a dalších mediátorů je redukován vznik IgE, což vede k mírnění alergické reakce. Další důležité zjištění je, že defekt Δ^6 -desaturázy je vrozený a způsobuje u vyvíjejícího se organismu deficit arachidonové kyseliny a jejich metabolitů, což má za následek abnormální vývoj imunitního systému a jeho hypersenzibilizaci, která vede k alergickým reakcím. Proto suplementace esenciálními mastnými kyselinami zejména γ -linolenovou v 1. roce života může mít pozitivní efekt právě na vývoj imunitního systému, ale v pozdějším věku je účinek spíše zaměřen na úroveň kůže a potlačení zánětu ^{34, 97, 98, 185, 191-196}).

Esenciální mastné kyseliny vykazují pozitivní účinky také na kardiovaskulární systém. Jedná se především o tři roviny. První dvě využívají již diskutované balancované tvorby eikosanoidů, přičemž u kardiovaskulárního systému hrají důležitou roli tromboxany a další druhy prostaglandinů. Především dochází díky ω -3 kyselinám ke snížené produkci protrombogenního tromboxanu A_2 a ke zvýšené tvorbě tromboxanu A_3 s protisrážlivými

účinky. Výše zmiňované protizánětlivé působení se pozitivně podílí na stabilizaci aterogenních plátů a na celkovém vývoji aterosklerózy. Třetím mechanismem je antiarytmické působení ω -3 kyselin, které ovlivňují membránu kardiomyocytů, snižují její excitabilitu a ovlivňují iontové kanály^{34, 98, 197}). Studie prováděné s konopným olejem vykazují ovlivnění hladiny sérových lipidů, přičemž dochází ke snižování LDL a zvyšování hladiny HDL lipoproteinů. Esenciální mastné kyseliny konopného oleje dále působí kardioprotektivně na ischemickou tkáň¹⁹⁸⁻²⁰⁰).

Zajímavou oblastí je také účinek esenciálních mastných kyselin na neurologické a psychiatrické poruchy. Esenciální mastné kyseliny jsou součástí neuronálních membránových fosfolipidů a zajišťují optimální fluiditu, správnou funkci při vazbě neurotransmiterů a signálních molekul. Z výzkumů je patrný jejich pozitivní vliv na poruchy nálady, deprese nebo rozvoj demence. Vliv na choroby jako jsou roztroušená skleróza, schizofrenie nebo Alzheimerova choroba není úplně rozpoznán, ale díky prokázaným protizánětlivým a imunomodulačním účinkům a membránovým funkcím, může mít jejich suplementace v těchto případech pozitivní efekt¹⁸⁹).

Při dlouhodobém perorálním užívání má konopný olej pozitivní vliv na kvalitu kůže, nehtů a vlasů. Topicky působí olej na pokožku hydratačně, zlepšuje její elasticitu a bariérové funkce. Lokálně se může uplatnit protizánětlivé působení, jak je posáno výše^{191, 201}).

4. Rostlinné biotechnologie

4.1 Explantátové kultury

Jako explantáty se označují různé typy *in vitro* kultivovaných orgánů vyňatých z rostlin, jejich částí, meristemických pletiv, buněk, protoplastů a kalusů. Jde o aseptickou kultivaci za umělých definovaných podmínek^{202, 203)}. Hlavní výhody buněčné kultivace oproti kultivaci celé rostliny spočívají např. v produkci za kontrolovaných podmínek a v prostředí nezávislém na klimatických změnách, půdních podmínkách nebo na geografickém původu rostliny. Získaný materiál dosahuje uniformity, jaké nelze v přírodních podmínkách dosáhnout a kontrolou buněčného růstu a racionální regulací metabolických procesů je snaha dosáhnout ekonomicky výhodné produktivity^{204, 205)}.

Možnosti využití explantátových kultur vycházejí ze skutečnosti, že téměř každá somatická buňka více či méně specializovaných rostlinných pletiv je totipotentní. To znamená, že obsahuje kompletní genetickou výbavu celé rostliny. Explantátovou kulturu lze tedy získat z kterékoli části rostliny, nadzemní nebo podzemní, explantací parenchymatické tkáně a jejím přenesením a následnou kultivací^{7, 203)}.

Buněčné suspenzní kultury jsou relativně homogenní populace buněk, nebo malých buněčných agregátů, které jsou kultivovány v pohybujiícím se tekutém živném médiu. Buňky suspenze jsou v přímém kontaktu s živným médiem, což zaručuje snadný přístup živin a výměnu dýchacích plynů. Suspenzní kultury jsou spolu s kalusovými hojně využívány a z dalších jsou to kultury orgánové, protoplastové, prašňíkové nebo embryogenní^{202, 206)}.

4.2 Podmínky kultivace

Pro kultivaci explantátových kultur je potřeba zajistit aseptickou práci v řízených podmínkách především volbou vhodného živného média, fyzikálních a chemických podmínek kultivace a volbou vhodného kultivačního zařízení²⁰²⁾.

4.2.1 Živné médium

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v explantátových kulturách rostlin je složení kultivačního média. Média používaná jak pro kultivaci buněk, tak rostlinných pletiv či orgánů obsahují obvykle následující složky^{202, 203, 206)}:

Makroelementy – jedná se o šest nejdůležitějších prvků: dusík (v nitrátové formě, popřípadě ve formě amonných solí), fosfor, vápník, draslík, hořčík a síra.

Mikroelementy – nezbytné jsou železo, mangan, zinek, bór, měď a molybden. Dále je možno dodat kobalt, jod, sodík, chlor – tyto ale nemusí být pro růst explantátové kultury nezbytné.

Zdroj uhlíku – nejčastěji ve formě sacharózy, případně glukózy a fruktózy, které slouží jako zdroj energie.

Vitamíny – *in vivo* rostlina si je syntetizuje sama, nejsou nezbytné pro růst a vývoj, ale pro *in vitro* kulturu mohou být limitujícím faktorem, protože jsou katalyzátory řady biochemických procesů. Nejčastěji se vyskytuje thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin a myo-inositol. Z dalších jsou to např. biotin, k. listová, k. askorbová, k. pantothenová, riboflavin atd.

Aminokyseliny a další zdroje organického dusíku – kultivované rostlinné buňky jsou schopny syntetizovat všechny nezbytné aminokyseliny, ale přítomnost některých může mít stimulační účinky.

Nedefinované organické sloučeniny – jsou organické extrakty, které stimulují růst explantátových kultur např. kokosové mléko, kvasnicový extrakt.

Látky používané pro zpevnění média – nejčastěji je využíván agar. Místo zpevněného média lze použít fixaci explantátu na můstku z filtračního papíru, polyuretanové pěny nebo čedičové vaty.

Růstové regulátory – jsou látky, které v různých koncentracích mohou působit inhibičně nebo pozitivně na růst. Endogenní růstové regulátory tzv. růstové hormony jsou: auxiny, cytokiny, gibereliny, kyselina abscisová a etylen. Mimo ně existuje v rostlinách množství látek s růstově regulační aktivitou jako např. brassinosteroidy, polyamidy, kyselina jasmonová, oligosacharidy nebo fenolické látky. Fytohormony jsou výrazně méně specifické než živočišné hormony (účinek se může pohybovat od stimulace k inhibici v závislosti na koncentraci) avšak mechanismus účinku je velmi blízký²⁰⁷⁾.

- **auxiny** (např. kyselina indolyloctová, indolylmásečná) – Používají se ke stimulaci růstu kalusu a buněk, indukci tvorby prýtlů a zejména kořenů²⁰²⁾. Hlavní fyziologické účinky jsou stimulace prodlužovacího růstu, apikální dominance, stimulace zakořeňování a stimulace dělení buněk. Spolu s cytokiny jsou základní složkou médií pro explantátové kultury²⁰⁷⁾.

- **cytokininy** (např. benzylaminopurin, 6-dimethylaminopurin) – stimulují buněčné dělení a tvorbu axilárních prýtů²⁰²⁾. Záleží na vzájemném poměru auxinu a cytokininu, jejich vyrovnanost vede k tvorbě nediferencovaného pletiva (kalusu), nadbytek cytokininu vyvolává regeneraci prýtů a nadbytek auxinu regeneraci kořenů²⁰⁷⁾.
- **gibereliny** – jejich hlavním účinkem je stimulace prodlužovacího růstu (na rozdíl od auxinů se účinek týká pouze nadzemních částí rostliny), indukce kvetení a stimulace klíčení²⁰⁷⁾.
- **kyselina abscisová** – mezi její účinky spadá inhibice prodlužovacího růstu, stimulace opadu či regulace vodního režimu²⁰⁷⁾.

Existuje celá řada médií používaných pro různé druhy rostlin a pro různé účely kultivace. Nejpoužívanějšími jsou např. podle Murashigeho a Skooga (MS), podle Gamborga (B5) nebo podle Schenka a Hildebrandta (SH)^{202, 206)}.

4.2.2 Fyzikální a chemické podmínky kultivace

Pro udržení optimálních podmínek kultivace je nutné měřit a regulovat základní fyzikální ukazatele jako je teplota, tlak, průtok plynů a kapalin, pěna či viskozita. Důležitým faktorem je také kvalita a kvantita světla, které mohou snižovat, zvyšovat, nebo nemusí výrazně ovlivňovat produkci sekundárních metabolitů^{202, 203)}.

Z chemických činitelů prostředí je důležité zajistit patřičné pH, oxidačně redukční potenciál, koncentraci a tenzi rozpuštěného kyslíku, oxidu uhličitého nebo dalších plynů²⁰³⁾.

4.2.3 Kultivační zařízení

Volba vhodného kultivačního zařízení má pro přípravu explantátových kultur rostlinných buněk značný význam, neboť při kultivacích ve větších objemech se rostlinné buňky liší od mikrobiálních zejména vysokou zdánlivou viskozitou buněčných suspenzí, spojenou s citlivostí ke střížným silám v důsledku značného buněčného objemu. Vhodným laboratorními zařízeními mohou být pomaloběžné rollery nebo třepačky pro umístění Erlenmayerových baněk. Pro produkci ve větším měřítku jsou ovšem nezbytné bioreaktory, které vyhovují kultivačním podmínkám i v objemech desítek až stovek litrů. Jako výhodná zařízení se ukázaly např. sterilní vaky k jednorázovému použití umístěné na podložce zajišťující vlnění obsahu a tím jeho mísení a provzdušňování. Klasické bioreaktory představují skleněné nebo nerezové nádoby s vhodným míchadlem a monitorovacími prvky.

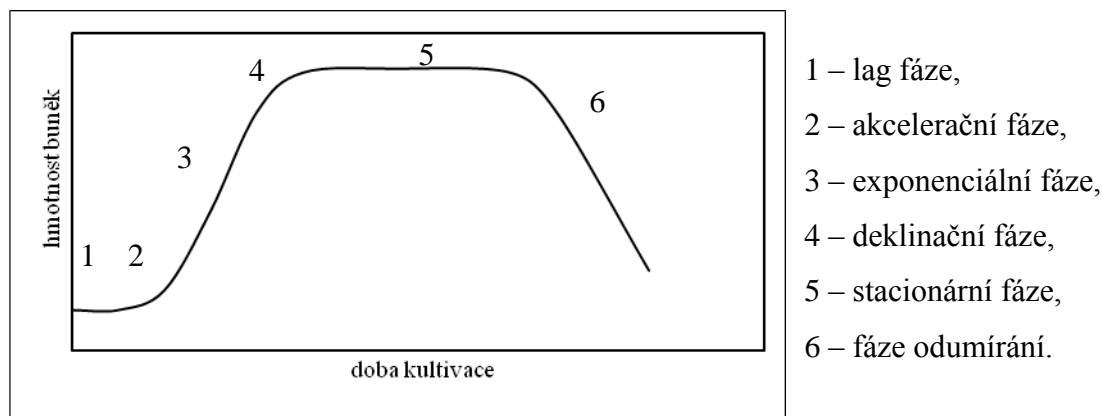
Jako ukázkou specifického bioreaktoru lze zmínit zařízení pro růst kořenových kultur, které jsou na stojanu sprejovány živným médiem^{203, 208}.

4.3 Růst a množení buněk, růstová křivka

Pro pochopení jakéhokoliv biotechnologického procesu jsou nutné kinetické studie, které se zabývají rychlostmi produkce buněk nebo jejich metabolitů a vlivy různých faktorů na tyto rychlosti. Růstem je míněno zvýšení hmotnosti buněk, množením pak zvýšení počtu buněk v kultivační kapalině²⁰³.

Vynášíme-li hmotnost buněk v závislosti na čase, získáme růstovou křivku, na které můžeme nalézt základní fáze růstu. Lag fáze je období přizpůsobování buněk v novém prostředí po naočkování, v níž počet živých buněk obvykle klesá, v akcelerační fázi se buňky množí se stále stoupající rychlostí a dosahují maximální konstantní rychlosti v exponenciální fázi. V deklinační fázi se rychlost množení zpomaluje následkem vyčerpání substrátů nebo hromaděním toxických metabolitů, ve stacionární fázi je rychlost množení a odumírání buněk v rovnováze a ve fázi odumírání rychlost odumírání buněk převyšuje rychlost množení²⁰³.

Růstová křivka:



4.4 Využití explantátových kultur

Explantátové rostlinné kultury se uplatní zejména jako^{203, 204}:

- Alternativní příprava produktů získaných dosud z rostlin v polní kultuře.
- Získávání produktů obsažených v nesnadno pěstovatelných rostlinách.
- Získávání nových látek v důsledku změn metabolismu explantátových rostlinných buněk.

- d) Produkty biotransformací, kdy z poměrně levných a dostupných substrátů lze získat farmaceuticky významné látky.
- e) Rozmnožování rostlin *in vitro*, ozdravování a konzervace rostlinných druhů.
- f) Získávání geneticky modifikovaných rostlin.

Rostliny představují nenahraditelný zdroj pro vyhledávání biologicky aktivních sloučenin využívaných v terapii řady závažných chorob^{209, 210} a zároveň také látek pro potravinářský průmysl (barviva, korigencia vůně, sladidla, silice) nebo pro zemědělství. V uvedených oblastech lze využívat produkce s pomocí explantátových rostlinných kultur. Jako příklady medicínsky důležitých metabolitů lze uvést např. antineoplastické alkaloidy z *Catharanthus roseus* nebo *Camptotheca acuminata*, případně antimalaricky působící artemisinin z *Artemisia annua*. I když byla produkce mnoha takovýchto zajímavých látek provedena biotechnologicky v laboratorním měřítku, ve velké většině případů nebylo dosaženo ekonomické produkce ve velkém měřítku. Za nejvýraznější úspěchy farmaceuticky využívaných metabolitů v průmyslovém využití lze uvést např. antineoplasticky působící paklitaxel (*Taxus* spp.), ginsenosidy používané jako doplňky stravy z *Panax ginseng*, berberin z *Coptis japonica*, sanguinarin z *Papaver Somniferum*, protizánětlivě využívané látky z *Coleus blumei* (Rozmarýnová kyselina), *Echinacea purpurea* a *E. angustifolia* (polysacharidy). Jednou z prvních látek připravovaných průmyslově biotechnologicky je šikonin z *Lithospermum erythrorhizon*^{208, 211, 212}.

Konopí je jednou z rostlin, u které nebylo dosaženo výrazných úspěchů při produkci kanabinoidů v explantátových kulturách^{213, 214}. Heitrich a Binder (1981) publikovali úspěšnou produkci THC kalusovou kulturou *Cannabis sativa*²¹⁵, v dalších publikacích už jsou ovšem uváděny jen částečné úspěchy v biotransformaci flavonoidů²¹⁶, prekurzorů kanabinoidů²¹⁷ nebo vlastních kanabinoidů^{218, 219}.

4.5 Metody ovlivnění produkce sekundárních metabolitů

Vzhledem ke snaze o zvýšení produkce žádaných metabolitů explantátovými kulturami, byly vypracovány různé způsoby jejich ovlivnění. V první řadě je šlechtěním a selekcí usilováno o získání rostlinného materiálu s vhodnými předpoklady stabilních vysokoprodukčních linií v závislosti na aktivitě metabolických drah. Dalším krokem je stanovení vhodných *in vitro* podmínek, jako jsou složení živného média, použití růstových regulátorů a zajištění optimálních fyzikálně chemických podmínek. Vzhledem k tomu že sekundární metabolismus je často vázán na určitý stupeň diferenciacce rostlinných pletiv, je

možné změnami růstových hormonů docílit kultivace např. prýtlů nebo kořenů a tím dosáhnout žádané produkce. S tímto souvisí i transformace rostliny s využitím *Agrobacterium rhizogenes* a tvorbou kořenových kultur s možností inkorporace genetické informace. Nevýhodu *in vitro* pěstování diferencovaných pletiv představuje komplikovanější stavba bioreaktoru. Imobilizace rostlinných buněk v uměle přidávané matrix představuje další možnost jak dosáhnout vyšších výtěžků, také v souvislosti s částečnou diferenciací. Nevýhody tohoto postupu představují potenciální extrakce produkovaných látek z imobilizačních matrix a horší převeditelnost systému do většího objemu. Zvýšení produkce může být také dosaženo dodáváním prekurzorů v dané metabolické dráze, *in situ* odebráním tvořeného produktu nebo zvýšením rozpustnosti metabolizovaných látek s využitím β -cyklodextrinu. Somatická embrya představují také útvary s počínající diferenciací, u kterých lze dosáhnout pozitivní aktivace metabolických drah^{211, 220}.

Při procesu elicítace se využívá schopnosti rostlin i rostlinných buněk kultivovaných *in vitro* reagovat na různé stresové podněty, vyvolané například patogeny nebo vlivy prostředí, celou řadou obranných reakcí, na jejichž konci dochází ke zvýšené akumulaci sekundárních metabolitů (fytoalexinů). Může být ovlivněna vlastní biosyntéza, uskladňování, transportní nebo degradační procesy a to jak sekundárních tak primárních metabolitů. Elicitory můžeme rozdělit na dva základní subtypy – biotické a abiotické. Biotické elicitory jsou agens biologického původu, které vystupují v interakcích rostlina-mikroorganismus. Jedná se o kompletní homogenáty inaktivovaných kultur mikroorganismů, o enzymy štěpící buněčnou stěnu (pektinázy, celulázy), nebo o přímo aplikované oligosacharidy, peptidy, glykopeptidy nebo lipidy představující signály vyvolané napadením patogenu nebo jiného škůdce. Jako abiotické elicitory se označují stresoví činitelé fyzikálního nebo chemického původu, jako UV záření, ionty těžkých kovů, změny osmotického tlaku, změny pH a další. Často se také využívají molekuly zapojené v procesu kaskádového přenosu signálu, představované především kyselinou jasmonovou a jejím metylesterem nebo kyselinou salicylovou. Nevýhodou elicítace je skutečnost, že ne všechny látky jsou tvořeny jako ochranné fytoalexiny, proto proces elicítace nemusí být vždy úspěšný. Úspěch elicítace je také závislý na výběru elicitoru a jeho koncentraci, na fázi buněčného růstu ve které je přidáván, nebo na kultivačních podmínkách^{211, 220, 221}.

Elicítace představuje komplexní proces, při kterém jsou buňky schopné rozpoznat signální molekuly (elicitory) na základě vazby s receptorovým systémem, který se nejčastěji nachází na povrchu plazmatické membrány. Signály jsou dále přenášeny pomocí signálních

drah G-proteinu, fosfolipázy C, adenylát cyklázy, dochází ke změnám koncentrace Ca^{2+} iontů a dalšími amplifikačními kaskádami protein kináz jsou aktivovány mitogenem aktivované protein kinázy. Tyto děje vedou k aktivaci transkripčních faktorů, ke změnám transkripce genů kódujících enzymy zapojené v biosyntéze sekundárních metabolitů, případně vedou k dalším posttranslačním modifikacím. Časová posloupnost obranných dějů zahrnuje během několika prvních hodin procesy spojené s aktivitou G-proteinu, uvolňováním signálních molekul např. NO, cAMP, IP_3 , dochází k cytoplazmatické acidifikaci a extracelulární alkalizaci, tvoří se reaktivní formy kyslíku, akumulují se fenylpropany, jasmonová kyselina a etylen, kdežto sekundární metabolity jsou tvořeny až v řádově desítkách hodin po procesu elicitace. Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu^{221, 222}).

Zajímavým a velice perspektivním oborem je metabolické inženýrství, které využívá poznatků molekulární biologie a staví na dokonalé znalosti metabolických drah, které se snaží pozměnit a optimalizovat. V této souvislosti jsou metabolomika a další -omik metody důležitým zdrojem informací, vzhledem k tomu, že velká část metabolických posloupností stále ještě není rozpoznána^{208, 220, 223}).

5. Metabolomika jako součást Funkční genomiky

Metabolomika je nová věda objevující se od konce 90. letech 20. století, jejíž bouřlivý rozvoj je vidět v nárůstu odborných publikací do dnešní doby. Období po rozluštění genomu, jak lidského, tak některých dalších organismů, je charakterizováno nárůstem dat z různých oborů a pohledů na funkční zákonitosti organismů (sytémová biologie), potažmo na funkci genů (funkční genomika), doprovázené rozvojem analytických metod a statistickým zpracování velkých objemů získaných dat²³⁸). Cílem této kapitoly není uvést celkový výčet odborné literatury vztahující se ke všem zákoutím funkční genomiky a souvisejících –omik disciplín, ale spíše uvést základní myšlenky a přístup k metabolomice, jakož i její zařazení v prostoru funkční genomiky a její další využití.

Metabolomika je věda studující celkový rozsah metabolitů produkovaných daným organismem, kvalitativně i kvantitativně. Je to rovnocenná věda dalším disciplínám, které studují metabolismus na dalších úrovních živého systému: genomika studuje celkový genom organismu, transkriptomika celkový soubor transkriptů RNA, proteomika celkový soubor proteinů, po níž lze hierarchicky zařadit metabolomiku. Zde je nutné podotknout, že tvrzení „analýza všech metabolitů“ je velice ambiciózní, ovšem na hranici možností současných analytických metod, vzhledem k obrovské diverzitě rostlinných metabolitů, jejich rozdílné polaritě, šíři koncentrací a možnosti zachytit jen výřezy ve studiu živého organismu. Byly vytvořeny i další –omik disciplíny studující specifické děje jako např. fluxomika (tok metabolitů), lipidomika (látky lipidového charakteru), interaktomika (vzájemné interakce), metabonomika (termín využívaný v biochemické analýze v toxikologii nebo patofyziologii) atd. Propojení poznatků –omik disciplín by mělo přinést důležité informace pro pochopení případně ovlivnění živého organismu. **Metabolom** je soubor metabolitů produkovaných daným organismem v daném čase za určitých podmínek, což jsou konečné produkty genové exprese a dalších regulatorních procesů. Přístup ke studiu široké škály nízkomolekulárních primárních i sekundárních metabolitů lze rozdělit na dvě základní větve. **Metabolické profilování** se zaměřuje na vybranou skupinu metabolitů, s možností opomenutí především neidentifikovaných látek. Tento cílený přístup využívá jak kvalitativní, tak kvantitativní chemické analýzy. **Metabolický otisk prstu** (metabolický fingerprint) se na druhou stranu snaží o zachycení maximálního počtu metabolitů, i bez jejich identifikace, což představuje necílený přístup zaměřený na vyhledávání rozdílností a detekci důležitých metabolitů. Cílená analýza vybraného metabolitu spíše nevyhovuje definici metabolomiky a funkční genomiky,

v souvislosti s požadavkem holistického přístupu a měla by být vnímána spíše čistě z analytického pohledu^{224, 225, 226}).

Využití metabolomiky zabývající se rostlinami spočívá především v identifikaci nebo rozlišení genotypu a fenotypu v souvislosti s taxonomií, průzkumem transgenních organismů a rozdílností mezi divokou a transgenní rostlinou. Zkoumá funkce genů a související regulační procesy rostlinné fyziologie, s čímž úzce souvisí i studium biosyntetických drah. Dalšími oblastmi mohou být kontrola kvality léčiv a analýza extraktů léčivých rostlin. Hledání nových struktur z přírodních zdrojů je další perspektivní využití. Metabolomika se rozvíjí nejen v oblasti rostlinného materiálu, ale i v analýze ostatních biologických vzorků (buňky, tkáň, tělní tekutiny – moč, krev) v lékařské toxikologii, fyziologii nebo patofyziologii a stává se důležitým nástrojem v detekci biomarkerů určitého onemocnění, sledování jeho průběhu a terapie. Nutrigenomika a nutriční metabolom představují propojení mezi stravou a zdravím člověka. Metabolomický přístup lze nalézt i v široké škále oborů potravinářského průmyslu^{226, 227, 228}). Metabolomika se stále rozvíjí a stále se objevují nové oblasti potenciálního využití.

5.1 Využití analytických metod v metabolomice se zaměřením na NMR

Pro metabolomickou analýzu je možné využívat široké škály chemických analytických metod. Obecně je požadována metoda rychlá („high throughput screening“), spolehlivá, citlivá, vhodná na automatizaci, pokrývající dostatečnou oblast metabolitů a vyžadující pouze malé množství vzorku. Výběr vhodné metody je kompromisem mezi požadovanými vlastnostmi, kde každá metoda vyniká v určitých oblastech. Prozatím ovšem nebylo u žádné dosaženo všech požadovaných parametrů a každá z metod v určitých směrech vyniká nebo naopak zaostává. Dalším významným krokem je vhodná příprava vzorku, tak aby nedošlo ke znehodnocení a případné ztrátě zajímavých sloučenin. Zároveň musí být příprava rychlá vzhledem ke zpracování velkých sad vzorků.

Metabolomika může být založená na separačních metodách v kombinaci s vhodnými detektory, nejčastěji: TLC, LC-UV/VIS, LC-MS, GC-MS, CE-MS. Dále je možné využít spektrální metody jako IČ, NMR nebo MS a mikroarray systémy. Separační metody obecně vynikají citlivostí a specifitou s možností kombinace se všemi významnými detektory (UV/PDA, NMR, MS, NMR + MS). Jejich nevýhody představují různorodé parametry separace (externí podmínky, rozdíly v rozpuštědlech a především rozdílné kolony a jejich neustálý vývoj), kde se v průběhu času ztrácí reprodukovatelnost a dále např. nutnost

kalibračních křivek pro kvantitativní analýzu nebo pomalá průchodnost systémem (především u LC). Každá z metod (GC, LC, CE) je pak vhodná pro různé skupiny metabolitů. UV/VIS je vázán na separační metody, je selektivní pouze pro látky s chromofory a poskytuje minimální strukturní informaci. IČ poskytuje především informace o funkčních skupinách a je spíše používán pro analýzu metabolického otisku prstu. Významnými a nejvíce používanými metabolomickými detektory jsou MS a NMR, které mohou být použity samostatně, nebo v kombinaci s chromatografickou metodou (především MS). Veškeré zmíněné analytické metody je nutné vnímat jako komplementární metody a ne jako soupeře, vzhledem k tomu, že každá z nich může poskytnout důležité informace. MS v dnešní době představuje nejcitlivější analytický detektor, je selektivní a rychlý, lze získat strukturní informace s využitím fragmentací a pro GC-MS existují databáze chemických sloučenin. Nevýhody představuje nutnost tvorby kalibračních křivek pro každou látku při kvantitativní analýze a reprodukovatelnost MS systému. Ta je kromě metody tvrdé elektronové ionizace (electron impact) horší, vzhledem k rozdílným typům používaných ionizačních metod s mnoha proměnnými parametry a často zde ještě hraje roli kombinace s chromatografií (viz. výše)^{224, 227, 229, 230)}.

Výhody NMR spočívají ve vysoké reprodukovatelnosti založené na fyzikálním měření rezonance magnetického momentu jádra atomu, na přímé korelaci mezi intenzitou signálu a molární koncentrací (¹H NMR)^{231, 232, 233, 234)}, rychlosti (záleží na typu experimentu, přístroji a množství vzorku), nedestruktivnosti a poskytnutí významných strukturních informací. Nevýhody představuje nízká senzitivita, kterou je snaha zvýšit vývojem silnějších magnetů, využitím chlazení elektronických součástí (kryosondy) a prodloužením času měření. Další nevýhody představují použití různých deuterovaných rozpouštědel a různé síly magnetického pole přístroje, které lze ovšem standardizací překonat. Nevýhodou představuje i komplexnost spekter při studiu směsí. Moderní instrumentální postupy využívají i kombinace kapalinové chromatografie s NMR jak online tak offline a propojení kapalinové chromatografie s NMR a následně MS. Identifikace metabolitů na základě NMR měření probíhá přiřazením signálů v ¹H spektrech. Pro další potvrzující data, nebo pro objasnění chemické struktury se dále využívají ¹³C a ¹⁵N spektra a různé druhy 2D NMR spekter, nejčastěji J-res, COSY, HSQC, HMBC a další stále se vyvíjející metody. Při přípravě extraktů vzorků pro NMR měření může být použito přímo deuterovaných rozpouštědel^{235, 236, 237)}.

Nutnost vypracování společného protokolu, standardních operačních postupů, pro možnost porovnávání výsledků z různých pracovišť, vypracování společného protokolu pro

ukládání a sdílení dat, zatím není v metabolomice úplně vyřešeno. V transkriptomice či proteomice jsou tyto protokoly a různé databáze již realitou, je ovšem nutné přihlídnout k faktu, kolik základních stavebních kamenů tyto vědy využívají (5 nukleových bází, 22 aminokyselin). Naproti tomu v metabolomice se předpokládá až 200 000 různých chemických struktur, kde tvorba databází je extrémně náročnou problematikou. NMR je v tomto ohledu velice výhodnou metodou díky zaznamenání trvalé informace založené na fyzikálních parametrech, zaručující jejich neměnnost a tím reprodukovatelnost v průběhu času a vývoje nových technologií^{226, 235}). Pro úplnost je důležité uvést některé již existující metabolomické projekty spektrálních databází, jako např. „Human Metabolome Database“²³⁹), „Biological Magnetic Resonance Data Bank“²⁴⁰) nebo „Medison Metabolomics Consortium Database“²⁴¹), které jsou volně přístupné na internetu. Další možností je využití komerčního softwaru, který přímo obsahuje databázové systémy pro rychlejší a účinnější zpracování naměřených dat.

5.2 Analýza hlavních komponent (PCA)

Pro analýzu velkého počtu získaných dat s mnoha proměnnými, které odpovídají komplexní směsi produkovaných metabolitů, je vhodné využít odpovídající statistické nástroje. Tyto nám pomohou odlišit stále se opakující sekvence od významných rozdílů způsobenými například experimentálními vlivy a zkrátit tak čas potřebný na analýzu primárních spektrálních dat.

Významným zástupcem použitelným pro zpracování vícerozměrných dat je analýza hlavních komponent. Jedná se o lineární nelineární shlukovací metodu, nevyžadující předchozí znalost o souboru vzorků, která redukuje stupeň multivariabilních dat do zástupných bodů (latentních proměnných), přičemž zachovává jednotlivé rozdílnosti původních měření. Lineární projekce jednotlivých hlavních komponent jsou tvořeny na základě minima součtu čtverců odchylek v multidimenzionálním prostoru latentních proměnných a jsou zobrazovány v grafické variantě jako rozptylový diagram komponentního skóre (tzv. skóre diagram), který umožňuje rychlé a jednoduché vyhodnocení, nejčastěji v dvourozměrném měřítku (pro jednoduchá data stačí pouze jeden rozměr, na druhou stranu moderní software je schopen zobrazit také 3D). Latentní proměnné mají výrazně lepší vlastnosti pro zpracování – je jich výrazně méně, vystihují téměř celou proměnlivost původních znaků a jsou vzájemně nekorelované. První hlavní komponenta je takovou lineární kombinací, která má největší rozptyl mezi všemi ostatními lineárními kombinacemi

(vyjadřuje se procentuelně). Druhá hlavní komponenta má největší rozptyl mezi zbytkem lineárních kombinací a je kolmá na komponentu první. Analogicky jsou definovány ostatní hlavní komponenty. Pro názornost lze tento proces připodobnit vložení roviny do třírozměrného prostoru, tak, abychom dosáhli přehlednosti a dobré interpretovatelnosti. Nedílnou součástí jsou vždy tzv. loading diagramy, neboli grafy komponentních vah, které graficky představují, jak dalece jsou jednotlivé proměnné totožné s danou komponentou, nebo z jiného úhlu řečeno – které proměnné jsou zodpovědné za separaci. Loading parametry jsou tedy přímo spjaty s původními proměnnými, přičemž skóre a loading diagramy jsou navzájem komplementární. V rámci NMR měření jsou loading diagramy využívány k detekci jednotlivých chemických posunů (spektrálních oblastí) zodpovědných za separaci daných vzorků či jejich shluků. Obecně je separace nejvýznamnější v prvních třech komponentách (PC1, PC2 a PC3), ale zajímavé výsledky mohou být dosaženy i pro komponenty vyšších stupňů. PCA modely jsou konstruovány ze všech naměřených vzorků a lze konstatovat, že čím více měření, tím přesnější je následná statistická analýza^{242, 243, 244}.

Pro úplnost je nutné zmínit významný krok předpřípravy dat před vlastní analýzou. Jedná se zejména o škálování a centrování, pro zajištění optimálního porovnávání jednotlivých vzorků a jejich umístění v zobrazovaných grafech. Je nutné upozornit, že jakákoliv změna v předpřípravných parametrech může mít významný vliv na celkový výsledek analýzy. S tímto souvisí jeden zásadní poznatek: Analýza vícerozměrných dat je důležitá metoda pro získání informací z metabolomických dat, ale výsledky jsou zakódovány jen a pouze v původních datech, ne v statistické analýze.

IV. Experimentální část

1. Přístroje

- laboratorní analytické váhy Laboratory Pro 32/34 F: Sartorius, Goettingen;
- laboratorní váhy: Sartorius, Goettingen;
- pH metr Micro pH 9000: Gerhardt, Königswinter;
- mikroskop Nikon Diaphot, čočka Fluor 20; 0,75; 160/0,17; 331035, hlavní vlnová délka 365 nm, excitační filtr UV330 – 380, DM 400, okulárový filtr 420: Nikon, Tokyo;
- rtuťová lampa HB0 – 100W/2: Nikon, Tokyo;
- autokláv 50/90E s/n LI2384: Getinge, Zwijndrecht.
- lyofilizátor Modulyo, olejová pumpa RV12: Edwards, Velká Británie;
- centrifuga Varifuge 3,0 R: Heraeus Sepatech, Waltham;
- centrifuga BHG HermLe Z 231 M: B. HermLe, Gosheim;
- ultrazvuková lázeň 1L, 5L: Sonicor, New York;
- rotační vakuová odparka R – 210 (vodní lázeň B – 419, vakuová pumpa V – 700): Büchi, Flawil;
- třepačka typu vortex Vibrofix VF1: IKA, Staufen;
- G10 Gyrotory Shaker: New Brunswick Scientific Co., Edison;
- inkubátor 7233: Inventum, Veenendaal;
- NMR spektrometr 500 MHz Bruker AV-500, sonda TINS dual-flow: Bruker, Karlsruhe;
- NMR spektrometr 600 MHz Bruker DMX-600, sonda TXI-ZGRAD ATM Cryo-probe: Bruker, Karlsruhe;
- HPLC chromatograf v kombinaci s hmotnostním spektrometrem, série 1100 SL, APCI: Agilent Technologies, Palo Alto;
- chromatografická kolona Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 x 4,6 mm (5 µm): Agilent, Santa Clara;
- extrakční kolona SEP - Pak[®] Cartridge Plus C18: Waters Corporation, Milford;
- box s laminárním prouděním vzduchu CLF 690: Clean air techniek, Woerden;
- aku pipeta Pipetus[®] – aku: Hirschmann Laborgerate, Eberstadt;

2. Chemikálie

- metanol absolute *p. a.*, etylacetát *p. a.*, chloroform stabilizovaný etanolem *p. a.*, metanol absolute pro HPLC: Merck Biosolve Ltd., Valkenswaard;
- CDCl_3 (99,80 %), Metanol- d_4 (99,8 %): Euriso-top, Paříž;
- D_2O (99,9 %): Spectra Stable Isotopes, Columbia;
- NaOD: Cortec, Paříž;
- 3-(trimethylsilyl)propionát- d_4 sodný *puriss.*, dihydrogenfosforečnan draselný *p. a.*, dusičnan draselný *p. a.*, dusičnan amonný *p. a.*, kyselina boritá *p. a.*, síran manganatý *p. a.*, síran zinečnatý *p. a.*, jodid draselný *p. a.*, molybdenan sodný *p. a.*, síran měďnatý *p. a.*, chlorid kobaltnatý *p. a.*, kyselina nikotinová *p. a.*, glycin *p. a.*, chlorid sodný *p. a.*: Merck, Darmstadt;
- jodid draselný *p. a.*, ethylendiamin disodná sůl *p. a.*, sacharóza *p. a.*, myoinositol *p. a.*, agar Gelrite, pepton z kaseinu, agar z kaseinového a sojového peptonu, kvasinkový extrakt, malt extrakt agar *pro zvláštní účely*, NAA, kinetin *pro rostlinné explantátové kultury*: Duchefa Biochemie, Haarlem;
- 2,4-D, IAA *pro rostlinné explantátové kultury*: Fluka, Buchs;
- síran hořečnatý *p. a.*: OPG Farma, Utrecht;
- síran železnatý *p. a.*: Brocades-ACF, Maarssen;
- chlorid thiaminia *p. a.*: Janssen Chimica, Geel;
- chlorid vápenatý *p. a.*, chlorid pyridoxinia, Jasmonová kyselina *pro rostlinné explantátové kultury*, citrusový pektin *p. a.*: Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim;
- THC, THCA: Katedra farmakognosie, Univerzita Leiden;

3. Tkáňová kultura *Cannabis sativa* L.

3.1 Tkáňová kultura

Pro pokusy byly použity tři druhy suspenzních kultur (GB, GC a Fiber) odvozené z intaktní rostliny *Cannabis sativa* L. variety Four-way. Semena rostliny byla získaná ze Sensi Seed Bank, Amsterdam, Holandsko a jejich kultivace probíhala v kultivační místnosti Univerzity Leiden, Leiden, Nizozemí. Explantátové kultury GB a GC byly odvozeny z listů, kultura Fiber z květů. Kultivace suspenzních a ostatních kultur byla prováděna v kultivační komoře Katedry farmakognosie University Leiden na rotační třepačce (110 rpm) za kontinuálního osvětlení (1066 – 1600 lux) při teplotě 25 ± 2 °C. Udržovací kultivace probíhala ve 250 ml Erlenmayerových baňkách uzavřených silikonovým těsněním. Pravidelné pasážování probíhalo ve čtrnáctidenních intervalech, kde bylo 25 ml suspenzní kultury asepticky přeneseno automatickou pipetou do 50 ml sterilního živného média. Pro produkci kultur ve větším měřítku byly použity 500 ml a 1000 ml Erlenmayerovy baňky s využitím analogických postupů a objemů, tak aby bylo dosaženo zředění 1:2 při pasážování. Pro práci s explantátovými kulturami byl používán box s laminárním prouděním vzduch a sterilní pomůcky podle zásad práce v aseptickém prostředí.

3.2 Živné médium

Suspenzní explantátové kultury byly kultivovány v tekutém živném médiu podle Murashigeho a Skooga doplněné o komponenty vitamínů média B5 dle Gamborga a s přídatkem 2 mg.l^{-1} 2,4-D a 1 mg.l^{-1} kinetinu jako růstových regulátorů. Složení živného média vztažené na 1 litr bylo následující^{249, 250}:

CaCl ₂ . 2 H ₂ O	440,00 mg
KH ₂ PO ₄	170,00 mg
KNO ₃	1900,00 mg
MgSO ₄	182,00 mg
NH ₄ NO ₃	1650,00 mg
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	27,80 mg
Na ₂ EDTA . 2 H ₂ O	40,90 mg

MnSO ₄ · H ₂ O	16,90 mg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	13,80 mg
H ₃ BO ₃	6,20 mg
KI	0,83 mg
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25 mg
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025 mg
myoinositol	100,00 mg
glycin	4,00 mg
kyselina nikotinová	1,00 mg
pyridoxin hydrochlorid	1,00 mg
thiamin hydrochlorid	10,00 mg
sacharóza	30 000,00 mg

V případě použití zpevněného média byl použit agar Gelrite v koncentraci 4000 mg.l⁻¹ v případě agaru pro kalusové kultury a somatickou embryogenezi, nebo 15000 mg.l⁻¹ v případě agaru pro kontaminační testy. pH média bylo vždy upraveno na hodnotu 5,8 a médium sterilizováno v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 121 °C a tlaku 0,1 MPa.

3.3 Kontaminační test

Pro zjištění kontaminace suspenzních kultur byla provedena kultivace na mikrobiologických substrátech s následujícím složením:

LB agar:

- Kaseinový hydrolyzát – 10 g.l⁻¹
- Kvasinkový extrakt – 5 g.l⁻¹
- Chlorid sodný – 5 g.l⁻¹
- Upraveno pH = 7,0

Malt extrakt agar:

- Maltóza – 12,75 g.l⁻¹
- Dextrin – 2,75 g.l⁻¹
- Pepton – 0,78 g.l⁻¹
- Upraveno pH = 4,7

Tryptózo sojový agar:

- Kaseinový hydrolyzát – 15 g.l⁻¹
- Sojový pepton – 5 g.l⁻¹
- Chlorid sodný – 5 g.l⁻¹
- Upraveno pH = 7,3

Malt extrakt agar byl použit specificky pro růst kvasinek a plísní, LB agar a Tryptózo sojový agar pro růst bakterií.

Kultivační agary byly připraveny dle rozpisu v případě LB a Tryptózo sojového agaru, pro Malt extrakt agar byla použita hotová směs výrobce (Fluka). Půdy byly sterilizovány a asepticky rozlity do Petriho misek. Po zatuhnutí byly misky ponechány v sušárně při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin pro kontrolu kontaminace a vysušení.

Očkování agarů rostlinnou suspenzí kulturou bylo provedeno dvěma způsoby. Jednak přenesením pipetou několika kapek kultury a následným rozetřením po agaru sterilní špachtlí, druhá metoda očkování probíhala mikrobiologicky nad kahanem s využitím bakteriologické kličky. Očkování agarů probíhalo v aseptickém prostředí pro minimalizaci možnosti kontaminace vnějším prostředím.

Každý druh agaru byl naočkován kulturou GB, GC nebo Fiber a to jak metodou pipetování a roztěru, tak bakteriologickou kličkou. Vše ve třech paralelních provedeních. Kultivace naočkovaných agarů probíhala při teplotě kultivace rostlinných suspenzních kultur (25 °C) a v inkubátorech při 30 a 37 °C. Naočkované agary byly sledovány po dobu jednoho týdne.

3.4 Tvorba kalusové kultury

Pro tvorbu kalusových kultur byly použity kultury GB a GC. 10 ml suspenzní kultury bylo asepticky přeneseno do Petriho misek s živným médiem zpevněným agarem. Pro tvorbu kalusových kultur byly použity dva typy média. První totožné s médiem pro suspenzní kultury a druhý typ s obměněným složením růstových hormonů ve složení 0,5 mg.l⁻¹ IAA, 2 mg.l⁻¹ 2,4-D, 0,2 mg.l⁻¹ kinetinu a 0,5 mg.l⁻¹ NAA. Kultivace probíhala za kontinuálního osvětlení (1066 – 1600 lux) nebo kontinuální tmy při teplotě 25 ± 2 °C. Pasážování bylo prováděno po 30 dnech pomocí sterilních pinzet a lžiček.

3.5 Elicitace – jasmonová kyselina, pektin

Elicitační experiment byl proveden u suspenzních kultur GB a GC se standardním živným médiem a za stejných kultivačních podmínek jako u udržovacích suspenzních kultur. Z připravených zásobních kultur jednotlivých linií byly buňky asepticky vakuově přefiltrovány přes Büchnerovu nálevku a 5 g buněk bylo naočkováno do 50 ml živného média ve 250 ml Erlenmayerových baňkách. Elicitace Jasmonovou kyselinou a pektinem byla provedena 4. den po inokulaci (není započítán den inokulace = nultý den). Pro každý odběr byly použity 3 paralelní vzorky elicitovaných i kontrolních kultur. První odběr byl proveden po inokulaci (čas 0 = T0), druhý odběr 2. den (T1) po inokulaci a třetí odběr 4. den (T2) po inokulaci, kde již začaly být odebírány vzorky kontrolní i elicitované. Dále byly odebírány vzorky každý druhý den po dobu života suspenzních kultur (cca 1 měsíc) (T3, T4, atd.).

Pro elicitaci byl připraven 30 % etanolový roztok Jasmonové kyseliny, který byl sterilizován filtrací (0,22 μm filtr). Ke kulturám byla Jasmonová kyselina asepticky napipetována (0,1 ml) tak aby vznikla konečná koncentrace 100 μM . Jako kontrola byl použit 30 % etanolový roztok. Kultury elicitované Jasmonovou kyselinou byly kultivovány v oddělené komoře, pro zamezení kontaminace ostatních vzorků.

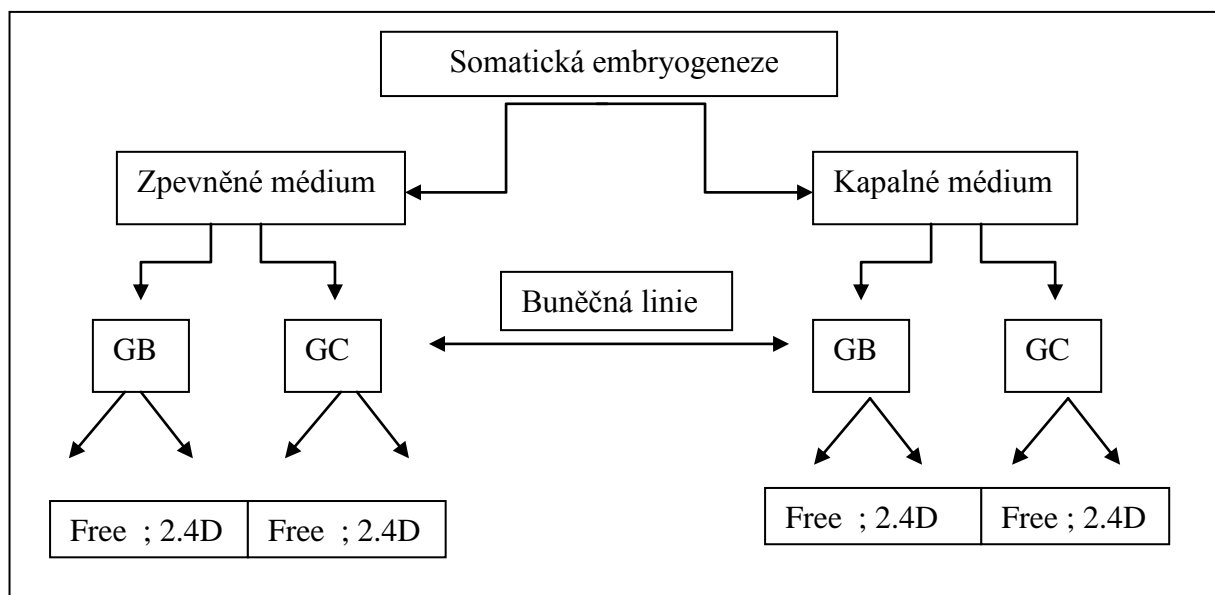
Pro elicitaci bylo použito 50 mg pektinu upraveného následným postupem: k naváženému pektinu bylo přidáno 1,5 ml vody s upraveným pH = 4,6 (pomocí HCl) a suspenze byla inkubovaná při 80 °C po dobu 5 minut. Směs byla sterilizována v autoklávu a uchována při 4 °C po dobu 12 hodin. Před elicitací byla směs při 60 °C po dobu 10 minut roztavena a asepticky přidána do suspenzních kultur.

3.6 Somatická embryogeneze

V experimentu pro vznik somatické embryogeneze byly použity kultury GB a GC. Kultivace probíhala na kruhové třepačce v případě suspenzních kultur, nebo stacionárně v případě kultivace na agarem zpevněném médiu v Petriho miskách. Kultivační podmínky byly totožné jako u udržovacích suspenzních kultur, přičemž živné médium bylo upraveno pro potřeby tvorby somatických embryí a to bez přídavku fytohormonů, nebo s přídavkem vyšší koncentrace auxinu (2 mg.l^{-1} 2,4-D) jako jediného růstového regulátoru (obr. 7). Jak tekutá tak zpevněná média byla inokulována 5 g asepticky pod tlakem zfiltrovaných buněk ve třech paralelních provedeních pro obě kultury a obě živná média. Pasážování embryogenních suspenzních kultur probíhalo ve 14 denních intervalech metodou zředění 1:2, tak jako v případě udržovacích suspenzních kultur. Pasážování embryogenních kultur na agaru

probíhalo po 30 dnech. Při každém pasážování byl odebrán vzorek pro mikroskopickou a chemickou analýzu po dobu 2 měsíců.

Obr. 7: Schéma experimentu somatické embryogeneze.



4. Zpracování vzorků, extrakce a instrumentální analýza

4.1 Odebírání a zpracování vzorků

Před filtrací suspenzních kultur byl odebrán vzorek pro hodnocení životnosti buněk. Dále byly suspenzní kultury pod tlakem přefiltrovány na Büchnerově nálevce. Buněčný materiál byl dvakrát promyt 100 ml destilované vody, zvážen pro získání vlhké hmotnosti, neprodleně zmrazen v tekutém dusíku a uchován při -25 °C do lyofilizace. Zmražené buňky byly lyofilizovány, znovu zváženy pro získání hmotnosti sušiny a uchovány při pokojové teplotě pro extrakci. Stejný postup byl aplikován na buněčný materiál rostoucí na agarových půdách.

U odsátého média bylo změřeno pH, médium bylo neprodleně zmrazeno v tekutém dusíku a uchováno při -25 °C do extrakce.

Hodnocení životnosti buněk bylo provedeno s využitím fluorescenčního mikroskopu a fluorescein diacetátu jako identifikačního činidla. Byl vytvořen 0,5 % zásobní roztok fluorescein diacetátu v acetonu, který byl uchováván v chladu a jehož ředěním (50x zředění živným médiem) byl v čas potřeby vytvořen roztok pro vlastní měření. Na podložní sklíčko byla nanesa 1 kapka suspenzní kultury, 1 kapka čerstvě zředěného fluorescein diacetátu, obě byly smíseny a překryty krycím sklíčkem^{251, 252}. Směs byla inkubována při pokojové teplotě 3 minuty a následně byl preparát pozorován v pěti různých místech. Byl zaznamenán celkový počet buněk a počet živých buněk se zelenou fluorescencí, z nichž byla procentuelně spočítána životnost buněk.

4.2 Extrakce média a příprava vzorků pro NMR analýzu

10 ml média bylo dvakrát extrahováno 10 ml etylacetátu v dělicí nálevce. Spojené etylacetátové extrakty byly vysušeny síranem sodným bezvodým. Zfiltrované vysušené extrakty byly odpařeny do sucha na vakuové rotační odparce. Po odpaření etylacetátu bylo přidáno malé množství metanolu a znovu odpařeno do sucha. Odpařené vzorky byly uchovány při 4 °C do doby vlastního NMR měření.

V den NMR měření bylo do odpařených vzorků média napipetováno deuterované rozpouštědlo: 800 µl metanolu -*d*₄; baňka byla protřepána na vortexu pro úplné rozpuštění odparce a extrakt byl přepipetován do 5 mm NMR kyvety. Po NMR měření byly vzorky v deuterovaných rozpouštědlech uchovány v Eppendorf zkumavkách (1,5 ml) při 4 °C.

4.3 Extrakce buněčného materiálu a příprava vzorků pro NMR analýzu

100 mg lyofilizovaných buněk bylo extrahováno dvakrát směsí 4 ml chloroformu a 4 ml metanol-voda (1:1) v tlustostěnných zkumavkách uzavřených šroubovacím víčkem. Směs rozpouštědel s buněčným materiálem byla 30 s protřepávána na vortexu a poté byla 10 minut ponechána v ultrazvukové lázni. Po každé extrakci byly vzorky odstředěny v chlazené centrifuze (4 °C) při 3000 ot./min. po dobu 20 minut. Po extrakcích byly získané vrstvy spojeny, tak aby vznikly dvě frakce: metanol-voda a chloroform. Tyto byly odpařeny do sucha na vakuové rotační odparce. Pro lepší odpaření frakce metanol-voda byla baňka po částečném odpaření promyta metanolem a odpařena do sucha. Odpařené vzorky byly uchovány při 4 °C do doby vlastního NMR měření.

V den NMR měření bylo do odpařených vzorků chloroformu a metanol-voda napipetováno deuterované rozpouštědlo: 800 μl CDCl_3 v případě chloroformové frakce, směs $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-}d_2 - \text{D}_2\text{O}$ (0,01% TSP, pH = 6,0) a metanolu- d_4 v poměru 400 μl : 400 μl v případě frakce metanol-voda; baňka byla protřepána na vortexu pro úplné rozpuštění odparku a extrakt byl přepipetován do 5 mm NMR kyvety. Po NMR měření byly vzorky metanol-voda uchovány v Eppendorf zkumavkách (1,5 ml) a chloroformové vzorky ve skleněných vialkách (1 ml) při 4 °C. Roztok $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-}d_2 - \text{D}_2\text{O}$ (0,01% TSP, pH = 6,0) byl připraven rozpuštěním 10 mg TSP a 1,232 g KH_2PO_4 ve 100 ml D_2O a upravením pH = 6 pomocí 1M NaOD.

4.4 Extrakce na pevné fázi

Pro objasnění struktury pozorovaných metabolitů bylo nezbytné provést rozdělení směsi, kvůli překryvu signálů ve 2D NMR spektrech. Pro chromatografii byl připraven směsný vzorek obsahující požadované sloučeniny. Byla použita komerční chromatografická kolonka C18 (SEP - Pak[®], Waters). Nanesený vzorek byl rozdělen do 3 frakcí (voda, metanol – voda 1:1, metanol) a jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí NMR.

4.5 NMR analýza a zpracování spekter

^1H NMR spektra byla měřena při 25 °C na 500 MHz Bruker AV-500 spektrometru. Jako interní zámek byl použit metanol- d_4 nebo CDCl_3 , podle použitého systému rozpouštědel. Každé ^1H NMR spektrum bylo měřeno 128 skeny vyžadující 10 min a 26 s měřícího času s následujícími parametry: 0,16 Hz/bod; pulzní šířka (PW) = 30° (11,3 μs); relaxační

zpoždění (RD) = 1,5 s. Pro potlačení signálu vody bylo použito nízkoenergetické selektivní ozařování na frekvenci vody během recyklačního zpoždění. FIDy byly převedeny Fourierovou transformací (FT) s funkcí LB = 3,0 Hz. Vzniklá spektra byla manuálně zřazována a kalibrace byla provedena pro signál TSP na 0,00 ppm v případě použití interního standardu; 3,30 ppm v případě použití metanolu-*d*₄; 7,26 ppm v případě použití CDCl₃.

2D NMR spektra J-Resolved, COSY, HSQC a HMBC byla měřena při 25 °C na 600 MHz Bruker DMX-600 spektrometru. J-Resolved spektra byla měřena 8 skeny na 128 inkrementů pro osu F1 a 8 k pro osu F2 s použitím spektrální šíře 5000 Hz v F2 (osa chemického posunu) a 66 Hz v F1 (osa spin-spinové interakční konstanty). Bylo použito relaxační zpoždění 1,5 s odpovídající 56 min měřícího času. Dataset byl vyplněn nulami na 512 bodů v F1 a obě dimenze byly vynásobeny sine-bell funkcí (SSB = 0) před dvojitou komplexní FT. Spektra J-Resolved nakloněná o 45° byla symetrizována podle osy F1. Spektra COSY byla měřena 4 skeny se 1,0 s relaxačním zpožděním a 6361 Hz spektrální šíře v obou dimenzích, byla použita funkce sine-bell (SSB = 0). HSQC spektra byla měřena 32 skeny se 1,0 s relaxačním zpožděním, 6361 Hz spektrální šíře v ose F2 a 27,164 Hz v ose F1. Funkce Qsine (SSB = 2,0) byla použita v případě HSQC. HMBC spektra byla pořízena se stejnými parametry jako v případě HSQC s výjimkou 30,183 Hz spektrální šíře v ose F2. Optimalizovaná interakční konstanta byla 145 Hz pro HSQC a 8 Hz pro HMBC. Spektra J-Resolved a COSY byla symetrizována a všechna spektra byla kalibrována na základě ¹H spekter, nebo s využitím signálu použitého rozpouštědla. Veškeré operace byly provedeny v XWIN NMR (verze 3.5, Bruker).

4.6 HPLC-MS analýza

Pro cílenou analýzu kanabinoidů byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostním spektrometrem. Pro analýzu byly použity chloroformové extrakty, které byly odpařeny a znovu rozpuštěny v metanolu. Dále byly použity extrakty média rozpuštěné v deuterovaném metanolu z NMR měření bez dalších úprav. Analýza byla provedena pro kultury GB a GC, jak pro elicitované tak kontrolní vzorky. Jako standardy byly použity THC a THCA.

Pro nástřik do HPLC systému bylo použito 5 µl vzorku. Byl použit lineární gradient mobilní fáze (metanol-voda) 60 – 100 % po dobu 28 min s konstantním průtokem 1 ml.min⁻¹; následovalo vymývání 100 % metanolem po dobu 2 min a gradientní návrat 100 – 60 % po dobu 1 min. Detekce byla provedena hmotnostním spektrometrem; pozitivní a negativní mód

chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) byl proveden za podmínek: tlak rozprašovacího plynu (N_2) 35 psi; odpařovací teplota 400 °C; teplota sušícího plynu (N_2) 350 °C při 10 l.min⁻¹; napětí kapiláry 4000 V (pozitivní ionizace), 3000 V (negativní ionizace); koronární proud 4 μ A (pozitivní ionizace), 15 μ A (negativní ionizace). Byly použity dva módy detekce hmotnostním spektrometrem: SIM senzitivní pouze pro molekulové hmotnosti kanabinoidů (MW = 315, 359); Scan detekující celou škálu molekulových hmotností obsažených metabolitů.

5. Statistické zpracování

Statistické zpracování naměřených hodnot (váha, pH média, životnost buněk) bylo provedeno na základě těchto vzorců²⁵³⁾:

aritmetický průměr:
$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

směrodatná odchylka:
$$s = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

životnost buněk:
$$\% = \frac{B\check{z}}{Bn} \times 100$$

n rozsah souboru

x_i naměřené hodnoty

\bar{x} aritmetický průměr

s směrodatná odchylka

Bn celkový počet buněk

B \check{z} počet živých buněk

Kvantifikace vybraných signálů NMR spekter byla provedena na základě těchto vzorců^{231, 232, 242)}.



$$c_{rel} = \frac{\text{int (exp)}}{\text{int (kontrola)}} \times 100$$

c ... koncentrace

int ... integrační hodnota daného signálu NMR spektra

cíl ... cílová látka

IS interní standard

MW ... molekulová hmotnost

m ... hmotnost

c_{rel} ... relativní koncentrace

int (kontrola) ... integrační hodnota daného metabolitu v kontrolním vzorku

int (exp) ... integrační hodnota daného metabolitu v ovlivněném vzorku použitého experimentu

* ... děleno počtem vodíků odpovídajícím cílovému signálu

** ... děleno počtem vodíků odpovídajícím internímu standardu

Hodnoty odpovídající internímu standardu TSP ve vzorcích frakce metanol-voda:

MW = 172, 28; počet vodíků v signálu = 9; c [μg] = 267, 034; c [μmol] = 1,55;

integrační hodnota IS = 100.

Statistické vyhodnocení naměřených ^1H NMR spekter bylo provedeno analýzou hlavních komponent, softwarově programem SIMCA-P, Umetrics, Umeå, Švédsko. Proces zpracování ^1H NMR spektra až po vlastní statistickou analýzu zahrnoval následující parametry:

- Bucketování: ^1H NMR spektra byla po zřazování, kalibrování a upravení základové linie převedena do ASCII formátu programem AMIX, Bruker Biospin a uložena do formy tabulky MS Excell. Rozsah zpracovávaného spektra byl od 0,3 do 10,0 ppm. Šířka integračního rozmezí byla jednotně požitá 0,04 ppm;
- Byly použity dvě možnosti bucketování – bez využití interního standardu a s využitím interního standardu, jehož rozmezí +1,0 až -1,0 bylo následně po provedeném bucketingu z tabulky vymazáno.
- V rámci bucketování byly odstraněny části spektra odpovídající signálům reziduálního rozpouštědla dle použitého extrakčního systému:
Frakce metanol-voda (3,30 – 3,34; 4,74 – 4,98), frakce chloroform (7,18 – 7,30), Extrakt média (3,26 – 3,34; 4,74 – 4,98).
- Získaná tabulka byla zpracována programem SIMCA-P (v. 11.0). Byl použit dvojí typ škálování – unit variance nebo parreto.
- Byly vytvořeny základní diagramy skóre a loading, na základě programem vygenerovaných hlavních komponent.

V. Výsledky a diskuse

Následující stať je rozdělena na jednotlivé kapitoly odpovídající jednotlivým etapám experimentální práce. První kapitola (1.) pojednává o studiu růstových aktivit kultur doplněných o kontaminační testy, tvorbu kalusů a somatických embryí. Následuje vyhodnocení elicitovaných kultur a to frakce metanol-voda (2.) a chloroform (4.) extrahované z buněčného materiálu a také extrakty média (3.). Frakce metanol-voda je rozdělena na jednotlivé kultury, ovšem frakce chloroformu a média jsou vzhledem k jejich podobnosti vyhodnocovány současně.

Pro studium obsahových látek pomocí NMR byla využita knihovna spekter Katedry farmakognosie, University Leiden a volně přístupné internetové metabolomické databáze (viz. I, 5.1). Ukázky typických spekter kanabinoidů CBD a THC jsou uvedeny na obrázku 54 a 55.

1. Biotechnologické výsledky kultivace, kontaminační testy, tvorba kalusových kultur a somatických embryí.

Před přistoupením k vlastním experimentům bylo rozhodnuto podrobit již existující suspenzní kultury testům na kontaminaci mikroorganismy. Kultury GB a GC byly vyhodnoceny jako nekontaminované, kdežto u Fiber kultury byla odhalena kontaminace, projevující se růstem bílých kolonií. Tyto kolonie byly identifikovány na LB a tryptózo sojovém agaru a to nejvíce za teploty 25 °C. Vzhledem k této kontaminaci nebyla kultura Fiber použita k následným experimentům.

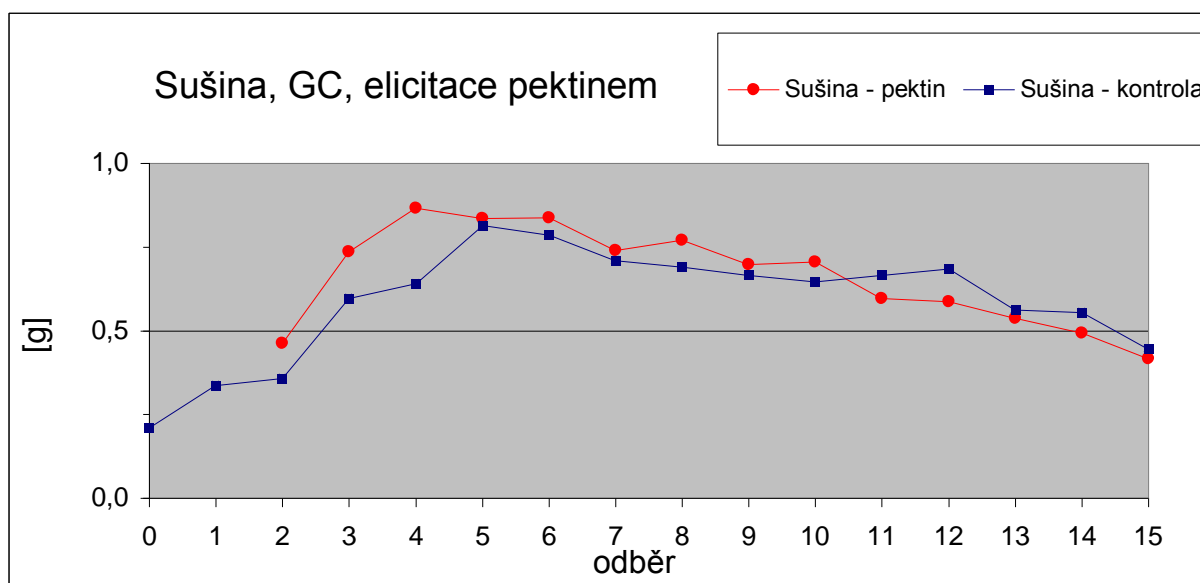
Vzhledem k existenci kultur GB a GC pouze ve formě suspenzí, bylo rozhodnuto vytvořit kalusové kultury pro možnost obnovy buněčného materiálu při možné kontaminaci suspenzních kultur. GB kulturu bylo možné pěstovat pouze za světla, přičemž ve tmě kultura během několika týdnů odumřela. Obě kultury přenesené na B5 médium ztratily během několika týdnů zelenou barvu, ale vzhledem k dostatečnému nárůstu biomasy byly dále kultivovány. Optimální růstové podmínky zajistilo původní MS médium doplněné B5 vitamíny, na kterém bylo dosaženo stabilní kalusové kultury GB i GC linie. GC kultura byla na tomto médiu schopná přežít i ve tmě, přičemž změnila barvu ze sytě zelené na světle zelenou. Ze zmíněných vitálních kultur byly po tříměsíční kultivaci odebrány vzorky pro chemickou analýzu. V této byly odhaleny metabolity, tak jak bude uvedeno v následujících analýzách buněčného materiálu, přičemž nebyly nalezeny zástupci sekundárních metabolitů,

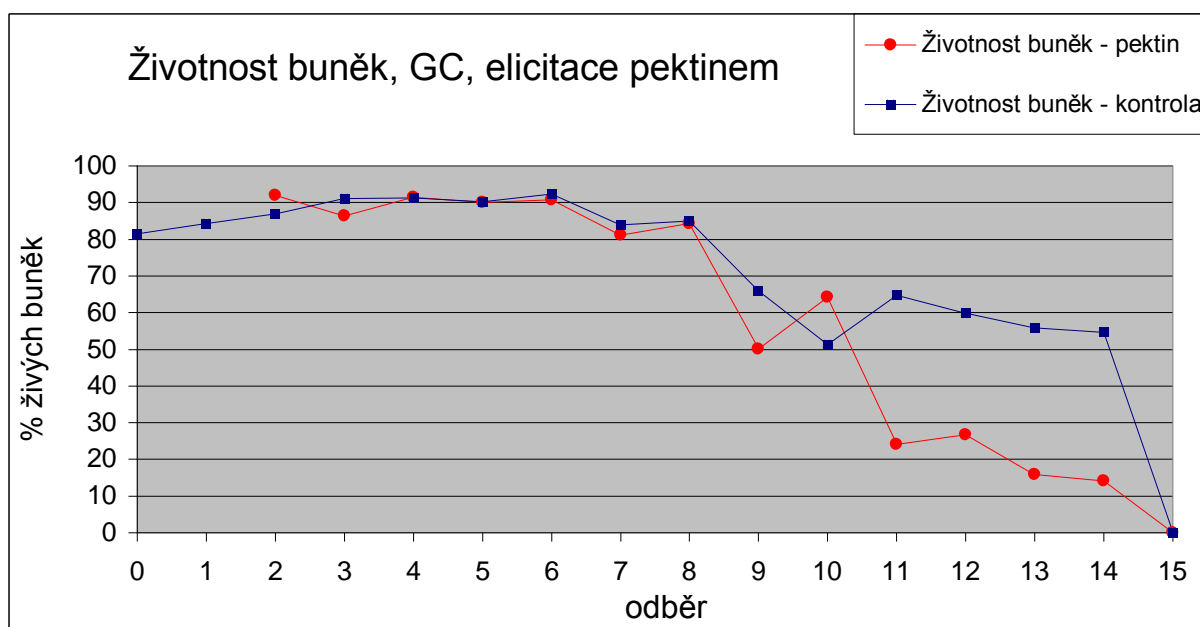
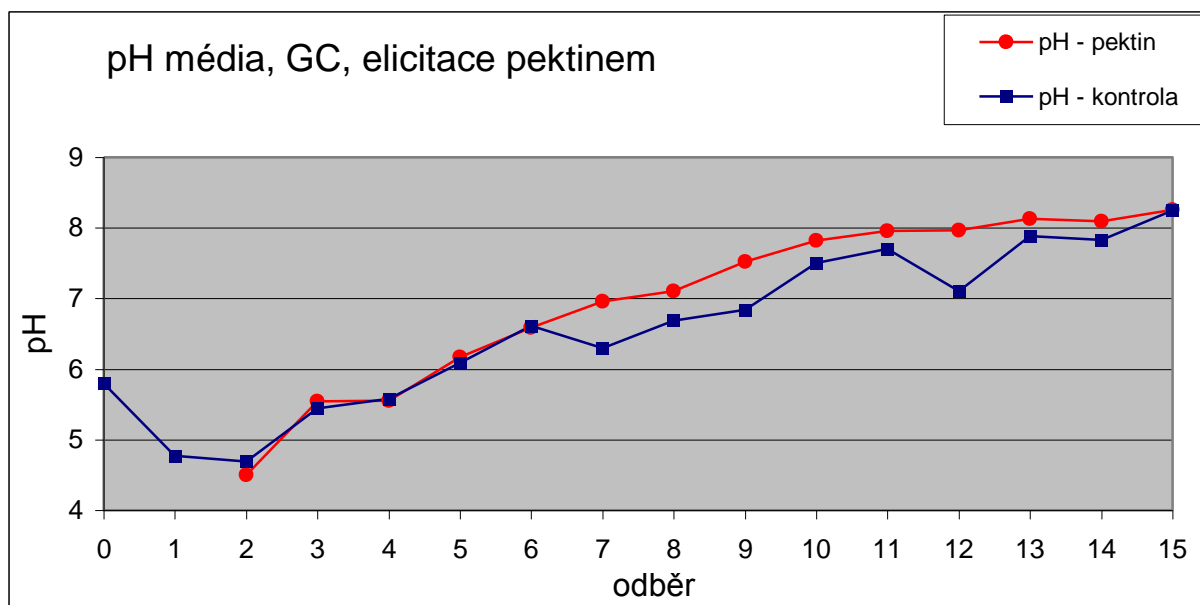
zejména kanabinoidů. Kalusové kultury byly dále ponechány jako záloha buněčného materiálu.

Před vlastní metabolickou analýzou elicitovaných kultur, byly získány základní biotechnologické parametry. Pro zjištění růstových fází kultur byla měřena hmotnost buněk, jejich životnost a dále pH média. Na základě vyhodnocených parametrů byly následně zvoleny časy odběru vzorků, tak aby experiment pokryl celou růstovou křivku, s možností pozorování celé stacionární fáze.

- Následující 3 grafy (obr. 8) znázorňují kontrolu a elicitaci pektinem linie GC. Na růstové křivce lze popsat lag fázi do 4. dne, exponenciální fázi do 10. dne a stacionární fázi do 22. dne experimentu. Pektin urychlil nárůst biomasy kultury do 12. dne, přičemž následovalo zpomalení růstu během stacionární fáze a rychlejší odumírání kultury. Toto bylo doprovázeno i zvýšením pH a změnou barvy kultivovaných buněk ze zelené na žlutohnědou.

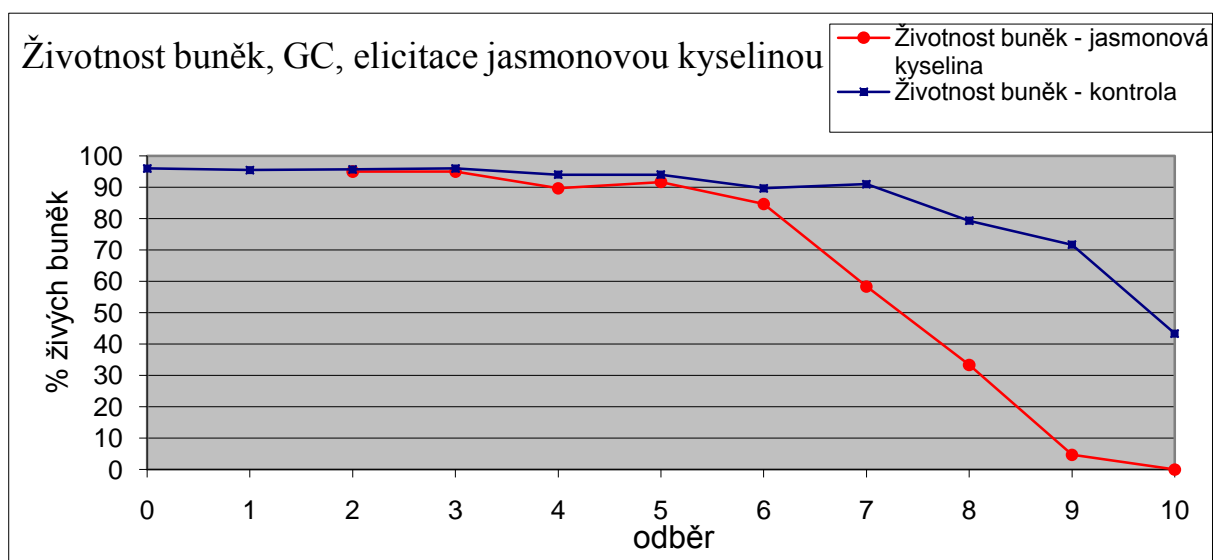
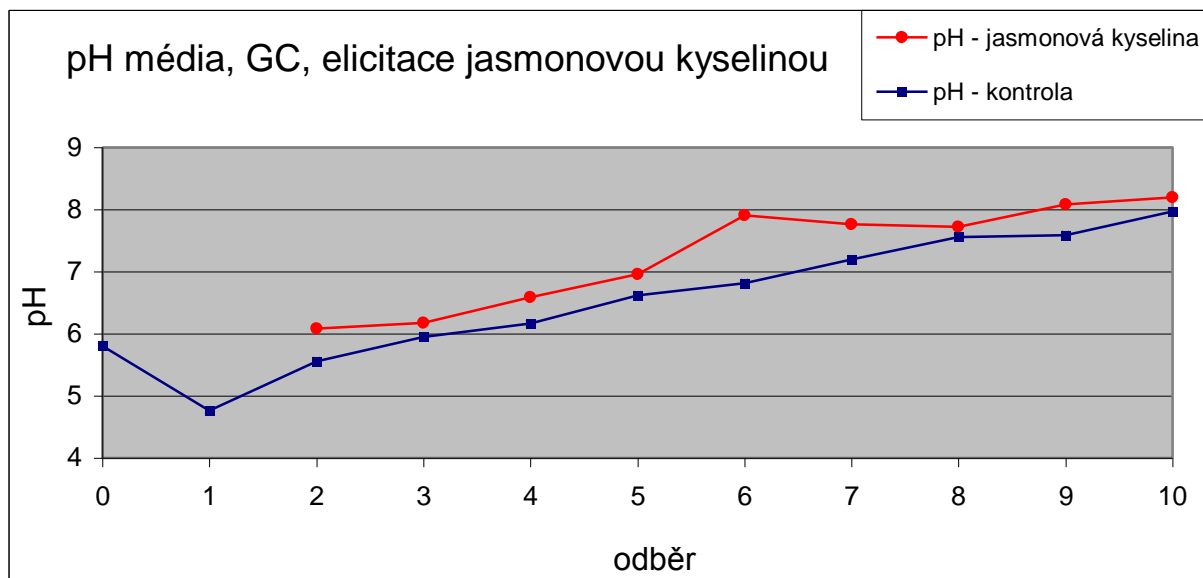
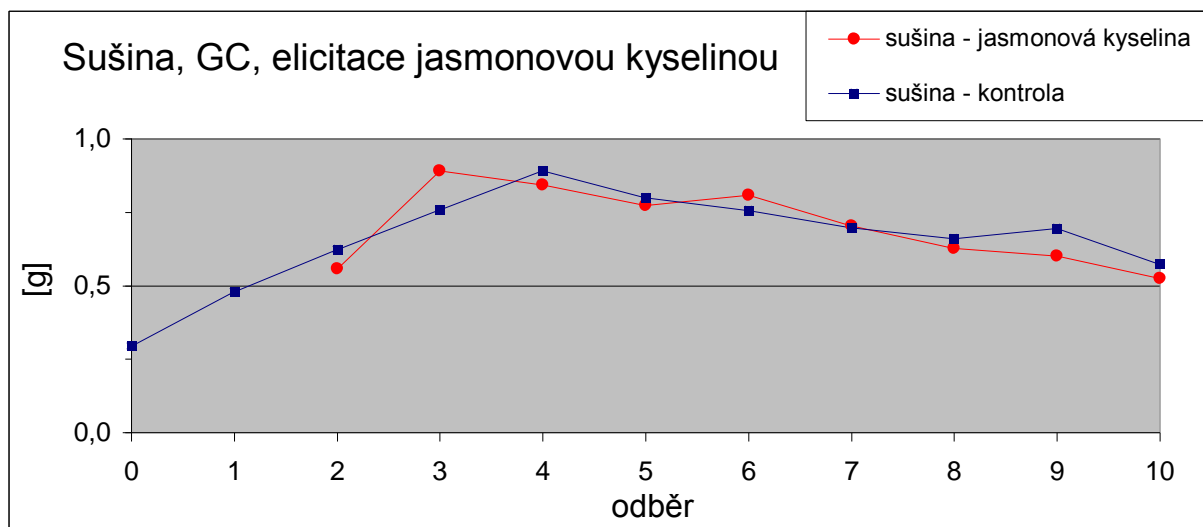
Obr. 8:





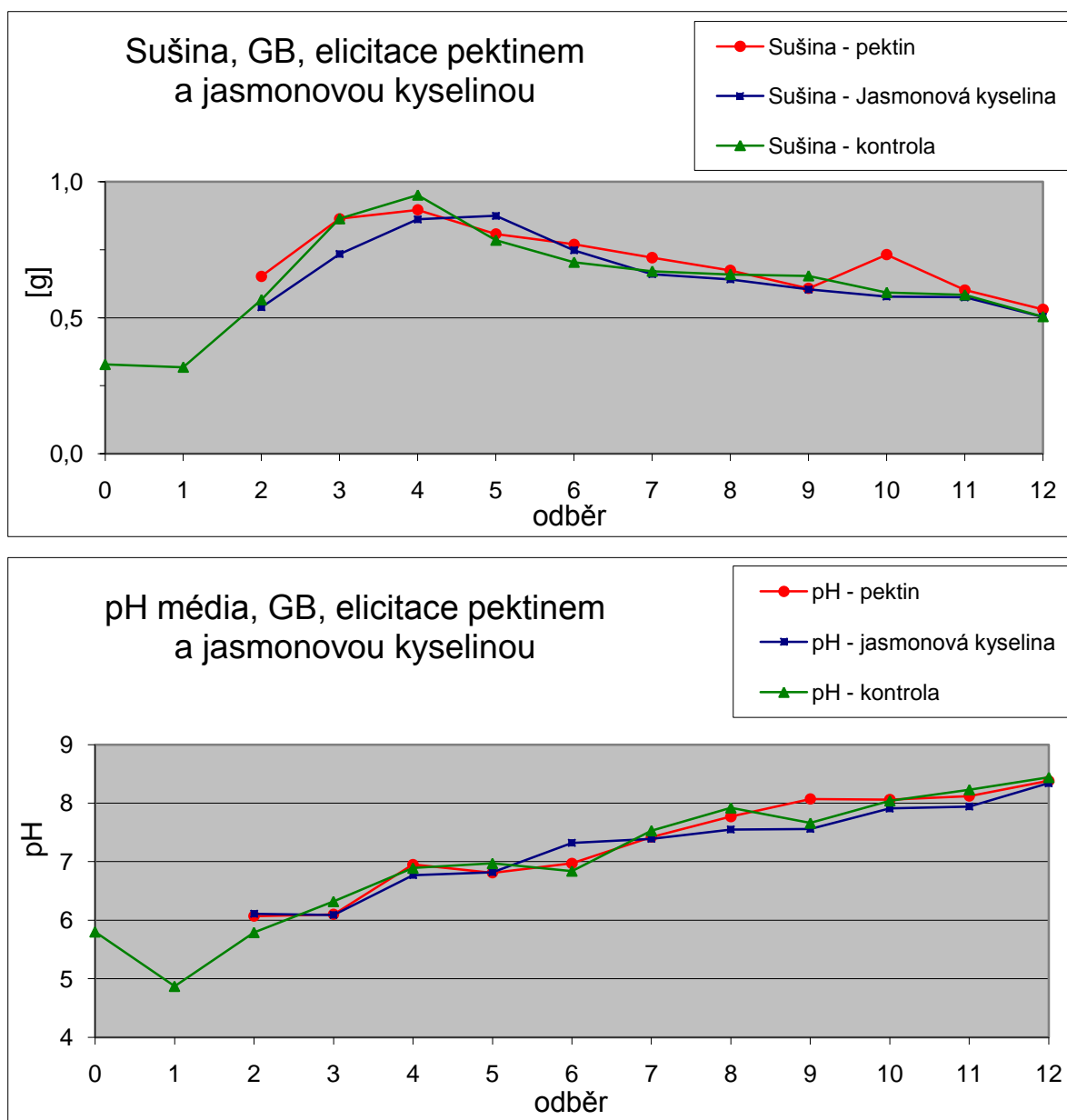
- Následující 3 grafy (obr. 9) znázorňují kontrolu a elicitaci jasmonovou kyselinou linie GC. V tomto případě bylo ke kontrole přidáno 100 μ l 30% etanolu, pro porovnání, zda by mohl působit také jako elicitor v případě elicitace jasmonovou kyselinou. Po elicitaci jasmonovou kyselinou bylo zvýšeno pH média a došlo k dřívějšímu snížení životnosti buněk. Celkově bylo působení jasmonové kyseliny agresivnější v porovnání s pektinem, o čemž svědčí i výrazná změna barvy kultur přes hnědou na černou v průběhu týdne po elicitaci.

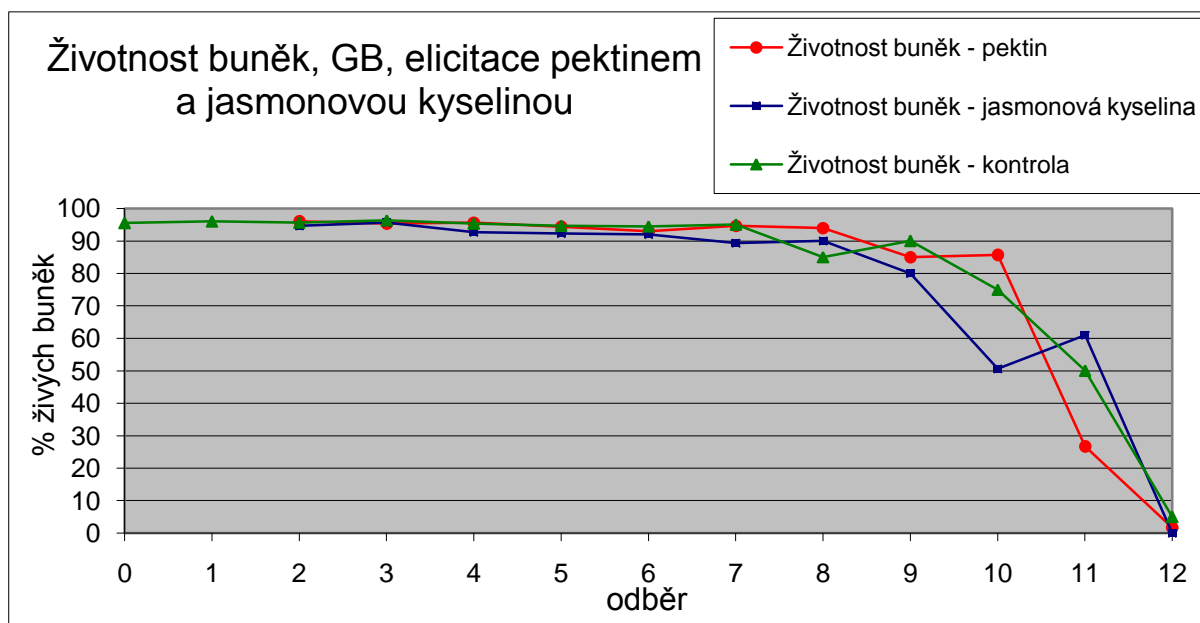
Obr. 9:



- Následující 3 grafy (obr. 10) znázorňují kontolu a elicitace pektinem a jasmonovou kyselinou u linie GB. Pouze jedna kontrolní linie byla použita pro obě elicitace. GB kultura má rychlejší exponenciální fázi růstu oproti GC do 8. dne a stacionární fázi do 20. dne. Z grafu sušiny je patrný pokles hmotnosti mezi 8. až 10. dnem po nástupu stacionární fáze, v porovnání s linií GC. U grafů pH a životnosti buněk nejsou pozorovány výraznější odchylky mezi kontrolou a elicitacemi. GB kultura reagovala na elitaci jasmonovou kyselinou také změnou zbarvení přes hnědou k černé, avšak celkově tento efekt nebyl tak výrazný jako u GC.

Obr.10:





Celkově lze zhodnotit, že elicítace jasmonovou kyselinou měla výraznější dopad na suspenzní kulturu, především v linii GC, kdy došlo k dřívějšímu odumírání kultury. Ovšem buněčný růst nebyl následkem obou elicítací výrazně ovlivněn a také u pH média nebyly pozorovány výrazné změny.

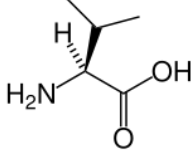
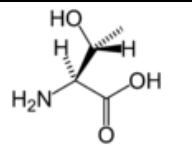
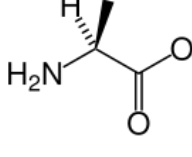
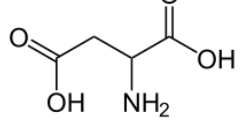
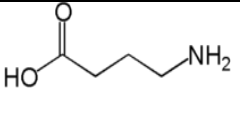
V rámci biotechnologických pokusů byla provedena indukce somatické embryogeneze, což je jedna z metod rostlinné regenerace. Dochází k produkci bipolárního zygotického embrya se zárodky meristému kořenové i nadzemní části rostliny. Somatická embrya se vyvíjí přes několik stádií – globulární, torpédové, dvouděložné až do vývinu vlastní rostliny. Indukce somatické embryogeneze vyžaduje u většiny druhů vysokou koncentraci auxinu v živném médiu (většinou 2,4-D). Avšak tato zvýšená koncentrace naopak zabraňuje vývoji embrya do rozvinutějších stádií. Vzhledem k tomuto jevu lze dále využít médium bez přídavku fytohormonů pro další vývoj²⁵⁴⁾. Somatická embrya jsou strukturálně diferencovanější než suspenzní nebo kalusové kultury a mohou tak být využita k produkci sekundárních metabolitů vázaných na diferencovaná rostlinná pletiva. U citrusů byla například pozorována indukce biosyntézy flavonoidů u somatických embryí v porovnání se suspenzními a kalusovými kulturami, což bylo vysvětleno indukcí chalkon syntázy v průběhu diferenciace²⁵⁵⁾. V případě indukce u suspenzních a kalusových kultur *Cannabis sativa* L. by mohlo docházet k analogické indukci různých izoform polyketid syntáz v produkci sekundárních metabolitů. V rámci experimentu byla pozorována výrazná změna barvy na sytě zelenou při kultivaci GC v médiu bez přídavku hormonů a byla pozorována tvorba shluků globulárního až srdcovitého charakteru (cca 2,5 mm). Na médiu suplementovaném 2,4-D

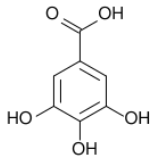
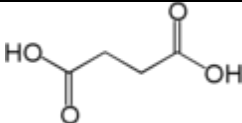
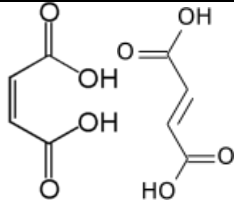
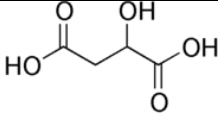
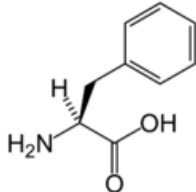
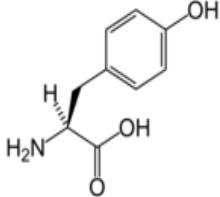
nedocházelo k tak výrazné tvorbě agregátů a kultura se spíše podobala suspenzi. V případě GB kultury byla výraznější agregace na médiu suplementovaném 2,4-D, avšak byly pozorovány pouze globulární tvary. I když byl pozorován výrazný vliv na fenotyp kultur, chemická NMR analýza odhalila pouze metabolity odpovídající suspenzním kulturám (viz. níže) a nebyly odhaleny žádné sekundární metabolity. Vysvětlení může spočívat v krátkém časovém intervalu pro produkci embryí a nedostatečné míře diferenciaci pletiva.

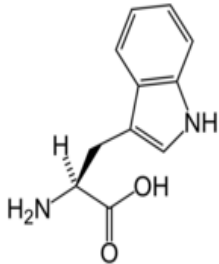
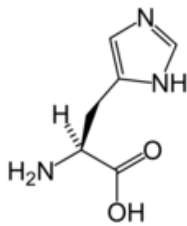
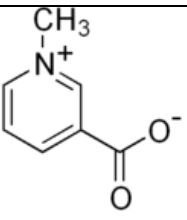
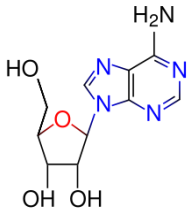
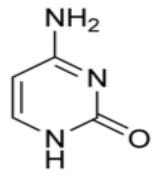
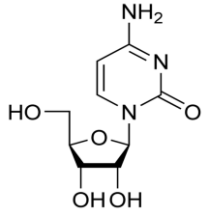
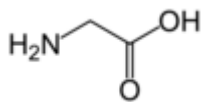
2. Frakce metanol-voda

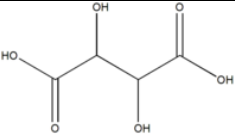
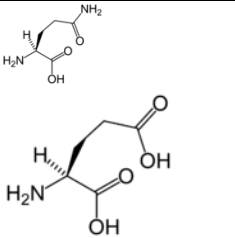
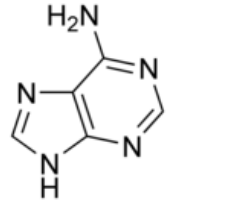
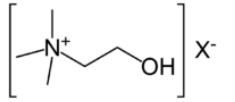
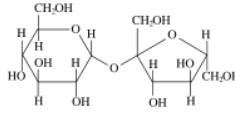
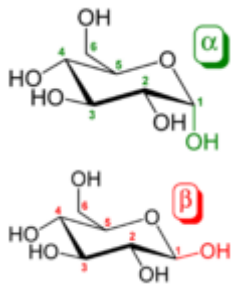
Na základě naměřených ^1H NMR spekter byly identifikovány základní metabolity polárního charakteru produkované kulturami GC a GB, shrnuté do tabulky 7. Identifikace metabolitů byla prokázána doplňkovými 2D NMR experimenty, především J-res, COSY a HMBC.

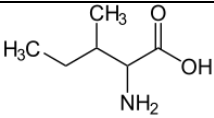
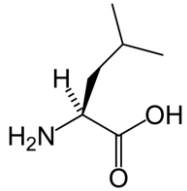
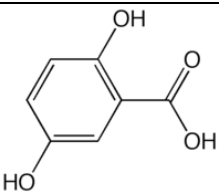
Tab. 7: Identifikované sloučeniny v GC a GB buněčných líních, frakce metanol-voda.

Sloučenina	Standartní ^1H NMR chemický posun (ppm) a interakční konstanta (Hz)	Nalezený ^1H NMR chemický posun (ppm) a interakční konstanta (Hz)	Chemická struktura
Valin	1.00 (d, 7.0) 1.05 (d, 7.0) 2.27 (m) 3.54 (d, 4.3)	1.00 (H- γ , d, 6.97) Jres, C 1.05 (H- γ' , d, 6.97) Jres, C 2.29 (H- β) C 3.57 (H- α) C	
Threonin	1.34 (d, 6.6) 3.51 (d, 5.1) 4.22 (qi)	1.33 (H- γ , d, 6.48) Jres, C 3.52 (H- α , d, 4.89) Jres, C 4.24 (H- β , qi) Jres, C	
Alanin	1.49 (d, 7.2) 3.72 (q)	1.48 (H- β , d, 7.21) Jres, C 3.73 (H- α , q, 7.22) Jres, C	
Asparagová kyselina	2.81 (dd, 16.9, 8.2) 2.95 (dd, 16.9, 4.0) 3.93 (dd, 8.2, 4.0)	2.83 (H- β , dd, 16.99, 7.91) 2.94 (H- β' , dd, 16.99, 4.01) 3.95 (H- α , dd, 8.1, 4.0) Jres, C	
GABA	3.02 (t, 7.5) 2.30 (t, 7.5) 1.90 (qi, 7.5)	3.01 (H-4, t, 7.5) 2.31 (H-2, t, 7.5) 1.90 (H-3, qi, 7.5) Jres, C	

Galová kyselina	7.09 (s)	6,95 (H-2, H-6, s)	
Jantarová kyselina	2.60 (s)		
Maleinová kyselina (cis) Fumarová kyselina (trans)	6.26 (s)	6.54 (H-2, H-3, s)	
Jablečná kyselina	2.76 (dd, 16.4, 7.2) 2.86 (dd, 16.4, 4.6) 4.52 (dd, 7.2, 4.6)		
Fenylalanin	7.34 (t) 7.40 (t) 3.30 (dd) 3.09 (dd) 3.92 (dd)	7.32 (d,d) 7.34 (t) 7.40 (t) 7.32 – 7.40 (H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, m) 3.30 (H-β, dd, 14.4, 9.64) Jres, C 3.09 (H-β', dd, 14.4, 8.45) Jres, C 3.94 (H-α) C	
Tyrosin	3.01 (dd) 3.21 (dd) 3.86 (dd) 6.85 (d, 8.5) 7.18 (d, 8.5)	3.01 (H-β, dd) Jres, C 3.20 (H-β', dd) Jres, C 3.86 (H-α, dd) Jres, C 6.85 (H-3, H-5, d, 8.44) (COSY-3.22) 7.18 (H-2, H-6, d, 8.44) Jres, C	

Tryptofan	3.26 (dd) 3.50 (dd) 3.98 (dd) 7.14 (t) 7.22 (t) 7.29 (s) 7.47 (d, 7.9) 7.72 (d, 7.9)	3.27 (H-β) C 3.50 (H-β') C 3.98 (H-α, dd) Jres, C 7.14 (H-6, t, 7.7) Jres, C 7.22 (H-5, t) Jres, C 7.29 (H-2, s) Jres 7.47 (H-7, dt, 8.0) (COSY-3.26) 7.72 (H-4, dt) Jres, C	
Histidin	7.07 (s) 7.80 (s) (d) 3.93 (dd) 3.12 (dd) 3.25 (dd)	7.00 (H-4, s) Jres	
Trigonelin	8.11 (t) 8.87 (m) 9.15 (s)	8.10 (H-5, t) 8.86 (H-4, H-6, m) 9.15 (H-2, s)	
Adenosin	8.35 (s) 8.23 (s) 6.03 (d, 6.5) (cukr)	8.35 (H-2, s) 8.23 (H-8, s) 6.04 (H-1', d, 6.62)	
Cytosin	5.94 (d, 7.1) 7.49 (d, 7.1)		
Cytidin	6.04 (d, 7.6) 7.85 (d, 7.6) 5.91 (d, 5.2) ribóza	5.86 (H-5, d, 8.07) 7.93 (H-6, d, 8.07) 5.91 (H-1', d)	
Glycin	3.51 (s)	3.56 (H-α, s) (3.51 (t))	

Vinná kyselina	4.30 (s)		
Glutamová kyselina	2.05 (m) 2.13 (m) 2.42 (t podobný) 3.69 (dd)		
Acetát	1.9 (s)		
Adenin	8.19 (s) 8.22 (s)		
Cholin	3.2 (s) 3.4 4.0	3.21 (H-1', H-2', H-3', s)	
Sacharóza	! 5.42 (d, 3.8) ! 4.22 (d, 8.8) Fruktóza ze sacharózy 4.05 (t) 3.75 – 3.92 (zejména) 3.68 (s), 3.82 (d))	5.40 (H-1, d, 3.78) 4.19 (H-1', d, 8.51)	
α – Glukóza β – Glukóza	5.19 (d, 3.7) alfa 4.58 (d, 8.0) beta 3.68 – 3.89 (3.68 (s), 3.71 (s)) 3.34 – 3.50 (3.38 (s), 3.44 (s)) 3.20 (dd)	5.19 (H-1, d, 3.78) alfa 4.58 (H-1, d, 7.88) beta	

Etanol glukosid	1.24 (t)	1.24 (H-2, t)	
Isoleucin	0.94 (t, 7.4) 1.01 (d, 7.0) 1.26 (m) 1.44 (m) 1.98 (m) 3.67 (d, 3.9)	0.95 (H-5, t, 7.5) 1.02 (H-6, d, 6.8)	
Leucin	0.97 (m) 1.73 (m) 3.73 (t, 8.4)	0.97 (H-5, d, 6.5) 0.98 (H-6, d, 6.7)	
2,5-dihydroxybenzoová kyselina. Gentisová kyselina*		6.61 (H-3, d, 8.23) 6.99 (H-4, dd, 8.23, 2.47) 7.21 (H-6, d, 2.47)	

Jres = kontrolováno pomocí 2D J-Res.

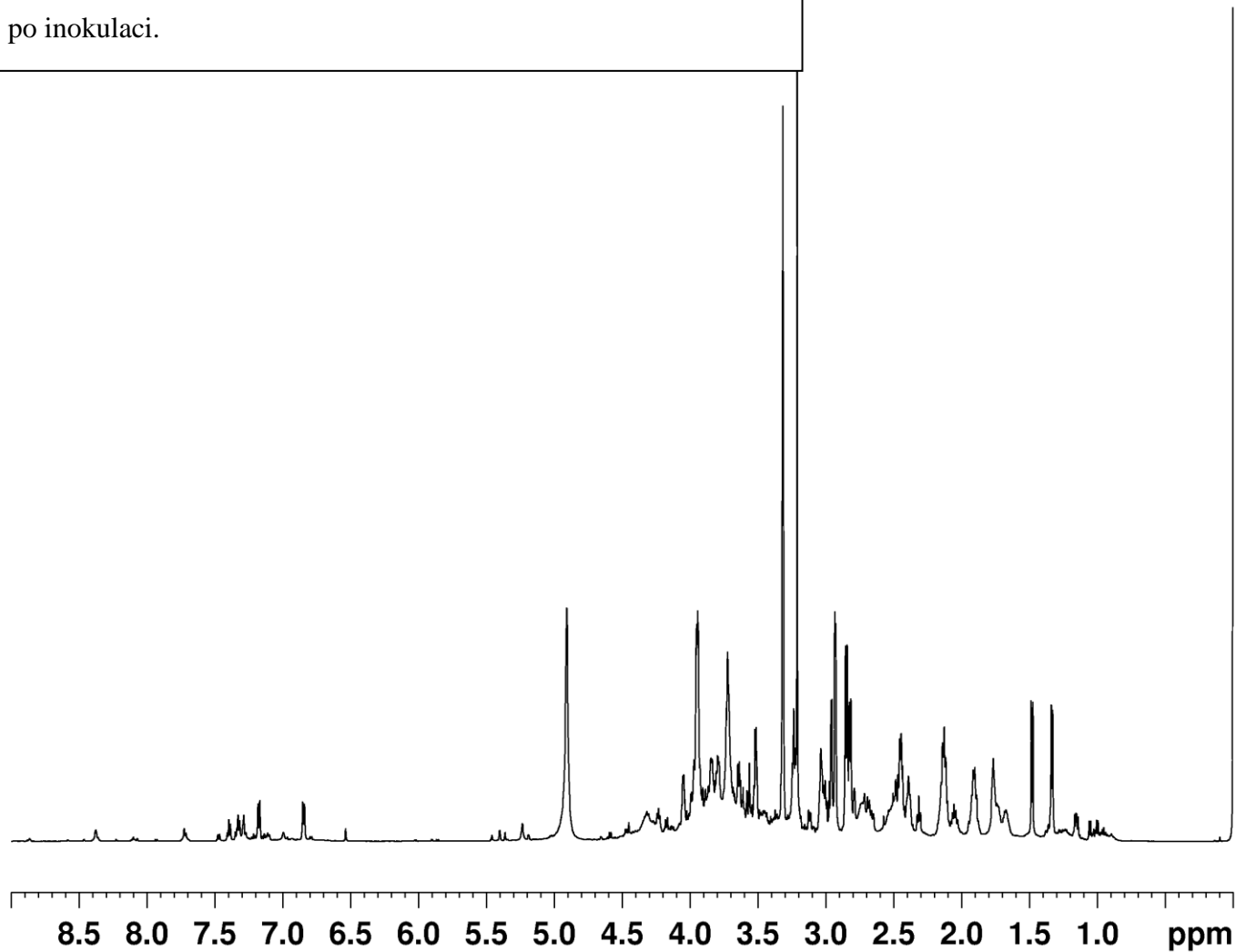
C = kontrolováno pomocí 2D COSY.

* = sloučenina identifikovaná ve frakci média, použité rozpouštědlo MeOD.

2.1 Linie GC:

Identifikované metabolity jsou představeny na následujících spektrech, vybraných z kultury GC, kontroly, elicitace pektinem a jasmonovou kyselinou (obr. 11 – 14). Daná spektra byla vybrána jako průřezová, zahrnující většinu nalezených metabolitů. Nejvhodnější spektra pro analýzu chemické struktury byla do 16. dne kultivace, vzhledem k rozšíření signálu spektra u starších kultur. Jedno z možných vysvětlení tohoto efektu je vliv vysoké koncentrace oligosacharidů, při vyloučení špatně provedeného shimování a vlastního měření. Na obrázcích 15 až 18 jsou uvedeny ^1H NMR přehledy kultury GC elicitované pektinem a jasmonovou kyselinou, které mají své jednotlivé kontroly. Každé spektrum je označeno dnem odběru (D0 = den 0, D4 = den 4...). Přehledová spektra jsou jednotně upravena tak, aby bylo možné porovnávat jednotlivé intenzity signálů. Důležité části spektra jsou označena červeným ohraničením.

Obr. 11: ^1H NMR. Metanol-voda; GC; elicítace pektinem; 20. den po inokulaci.



```
Current Data Parameters
NAME      fcog082006Young
EXPNO     23
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20060819
Time      11.42
INSTRUM   dmx600
PROBHD    5 mm CP1H1
PULPROG   zgpg30
TD         32768
SOLVENT   MeOD
NS         128
DS         8
SWH        8012.820 Hz
FIDRES     0.244532 Hz
AQ         2.0447731 sec
RG         128
DW         62.400 usec
DE         8.50 usec
TE         293.1 K
D1         2.0000000 sec
d12        0.00002000 sec
d13        0.00000300 sec

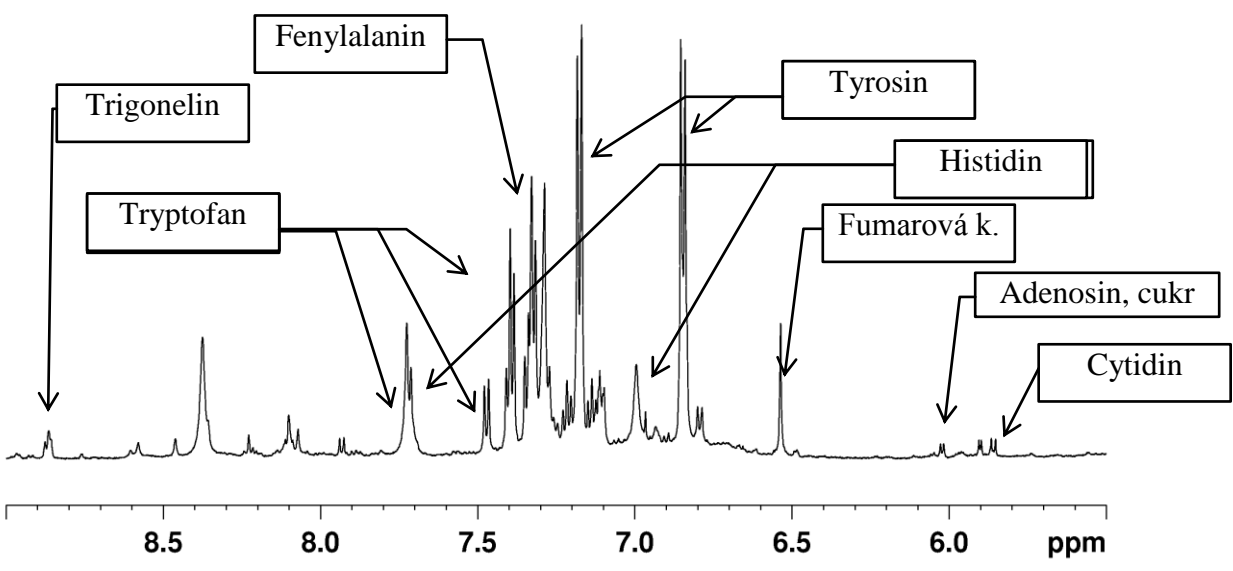
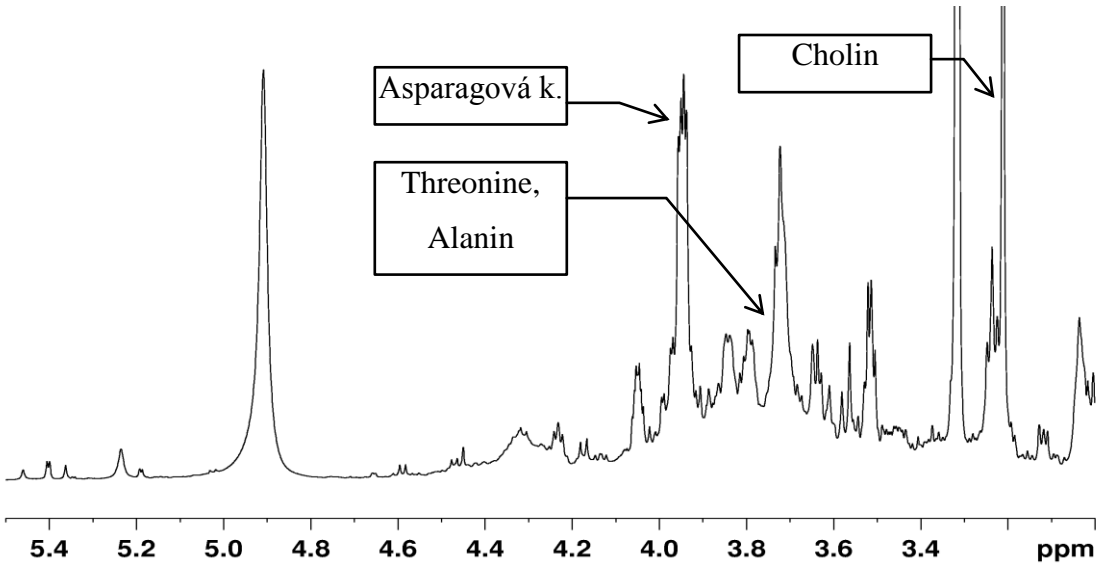
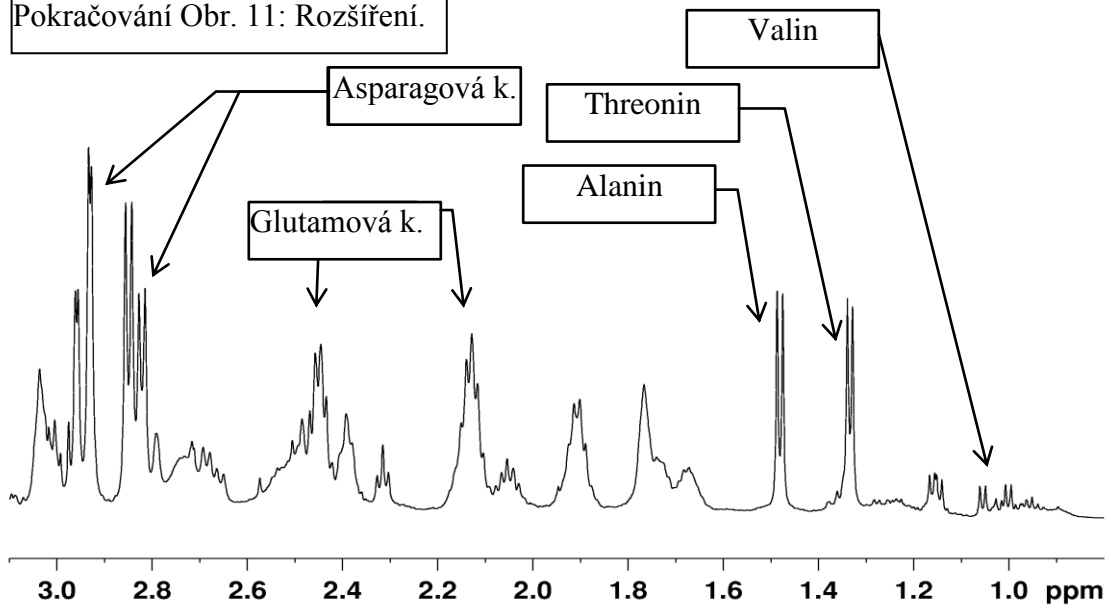
----- CHANNEL f1 -----
NUC1       1H
P1         11.20 usec
PL1        -6.00 dB
PL9        47.00 dB
SFO1       600.1329248 MHz

F1 - Acquisition parameters
ND0        1
TD         32
SFO1       600.1329 MHz
FIDRES     31.250000 Hz
SW         1.666 ppm
FnMODE     undefined

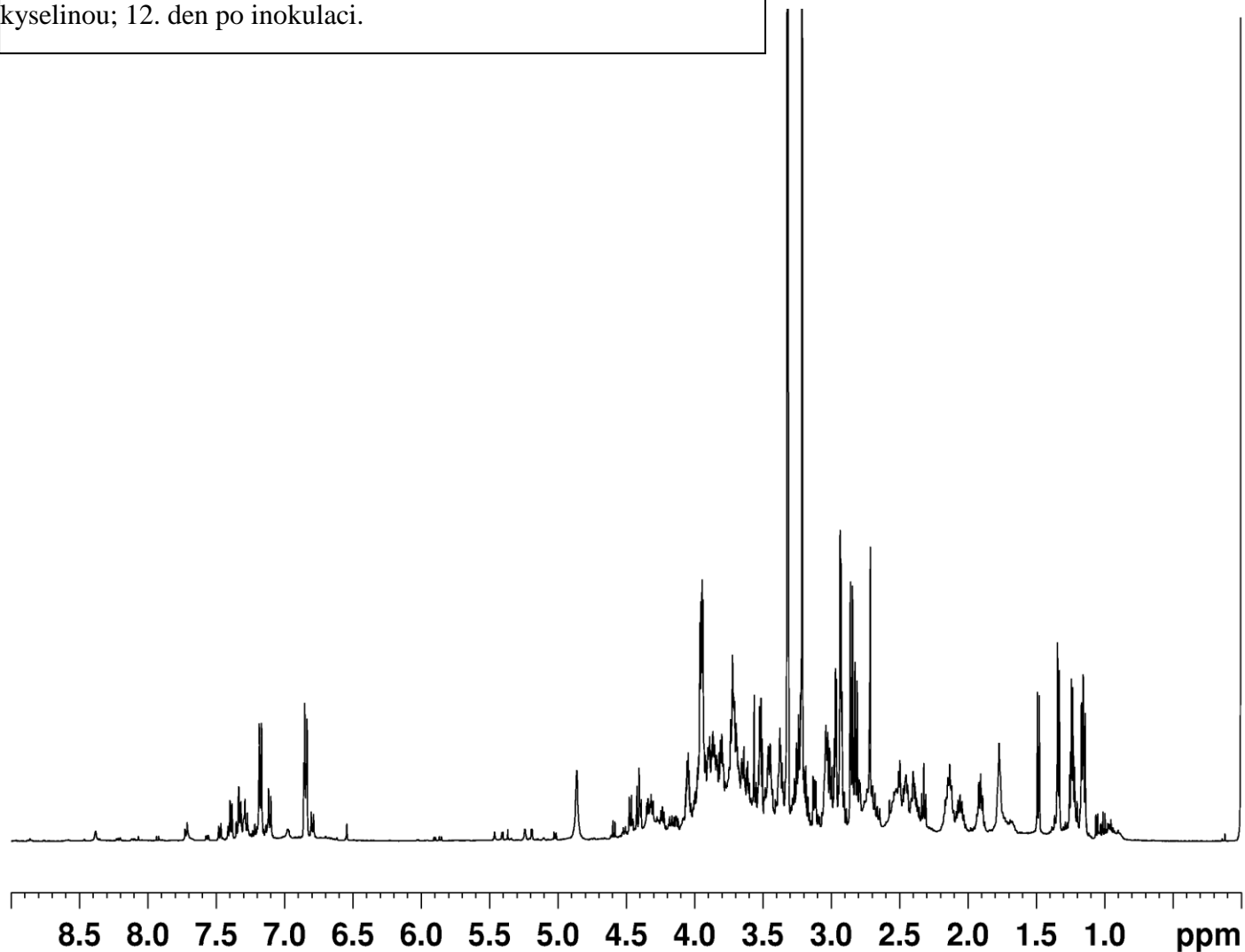
F2 - Processing parameters
SI         65536
SF         600.1300105 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.30 Hz
GB         0
PC         1.00

F1 - Processing parameters
SI         32
MC2        QF
SF         600.1300000 MHz
WDW        SINE
SSB        0
LB         0.30 Hz
GB         0.1
```

Pokračování Obr. 11: Rozšíření.



Obr. 12: ^1H NMR. Metanol-voda; GC; elicítace jasmonovou kyselinou; 12. den po inokulaci.



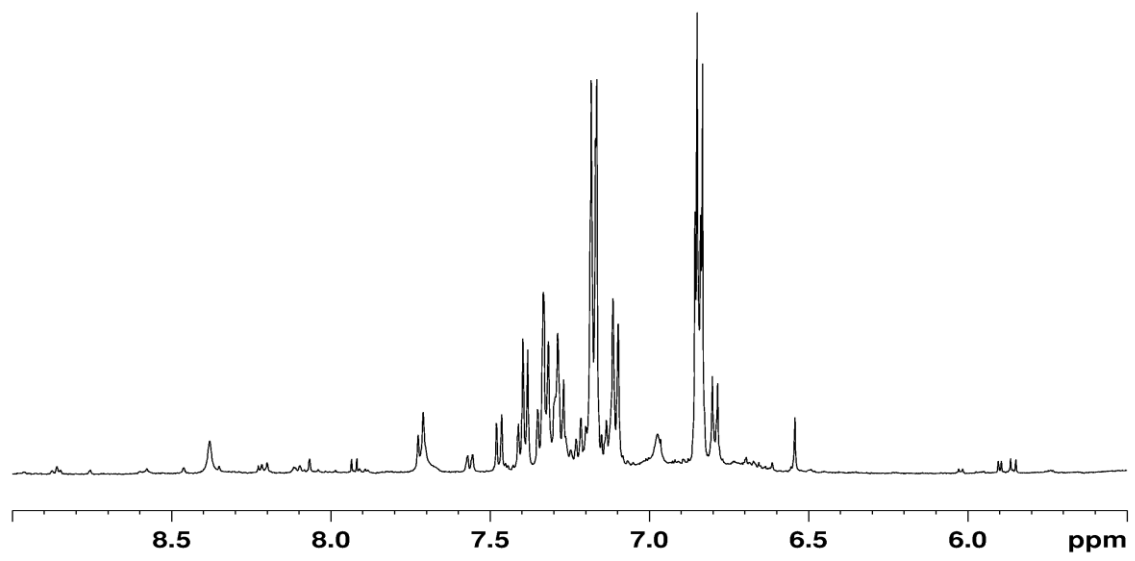
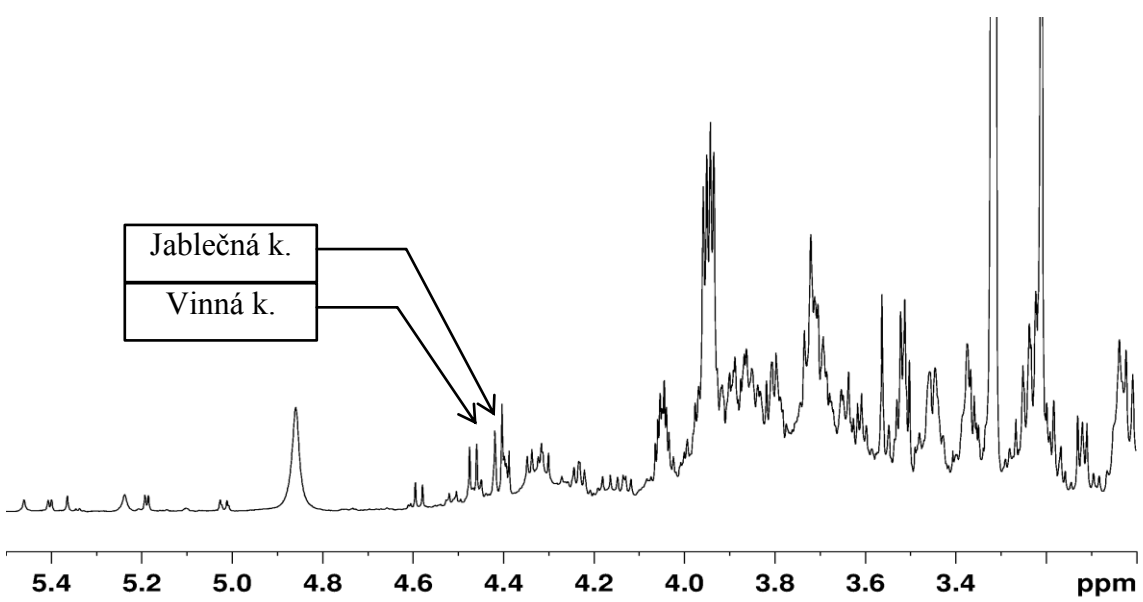
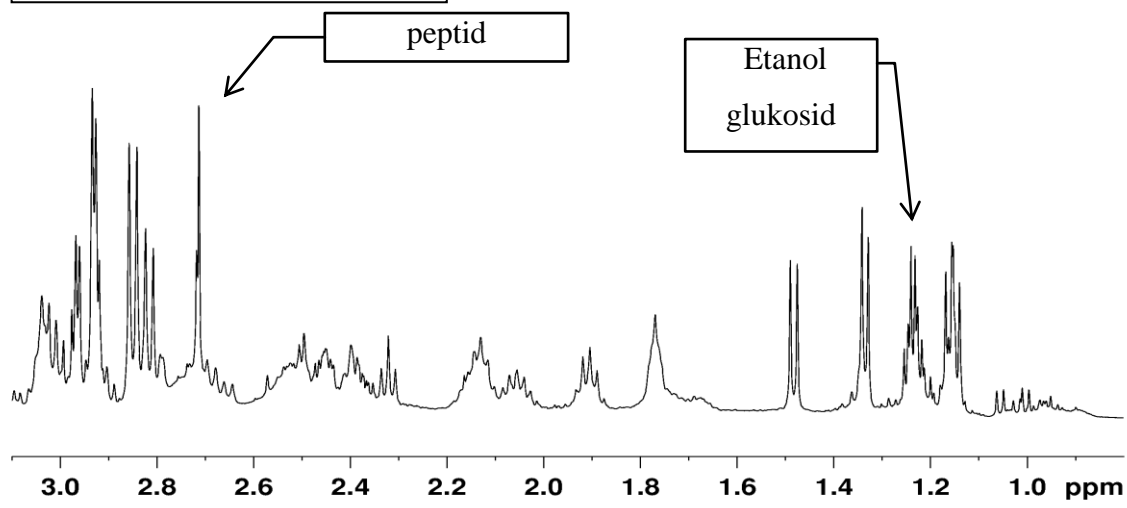
```
Current Data Parameters
NAME      YHJA0701Fcoq
EXPNO     3
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20070128
Time      6.05
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PATXI 1H/
PULPROG   zgpg30
TD         65536
SOLVENT   MeOD
NS         128
DS         4
SWH        10330.578 Hz
FIDRES     0.157632 Hz
AQ         3.1719923 sec
RG         228.1
DW         48.400 use
DE         6.00 use
TE         673.2 K
D1         1.50000000 sec
d12        0.00002000 sec
TD0        1

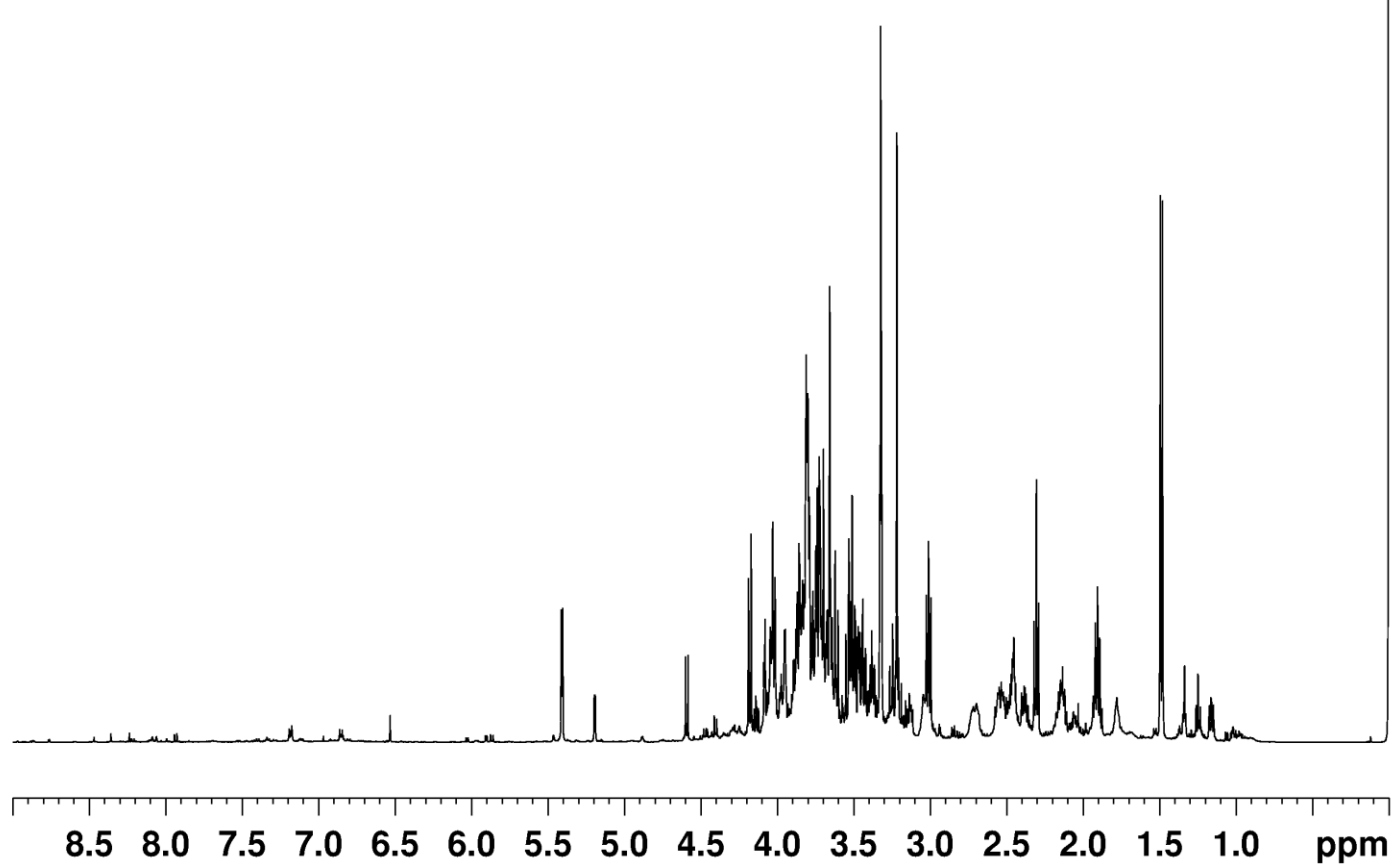
===== CHANNEL f1 =====
NUC1       1H
P1         11.00 use
PL1        2.00 dB
PL9        55.15 dB
SFO1       500.1324538 MHz

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         500.1300076 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.30 Hz
GB         0
PC         1.00
```

Pokračování Obr. 12: Rozšíření.



Obr. 13: ^1H NMR. Metanol-voda; GC; kontrola jasmonové kyseliny; den 0, ihned po inokulaci.



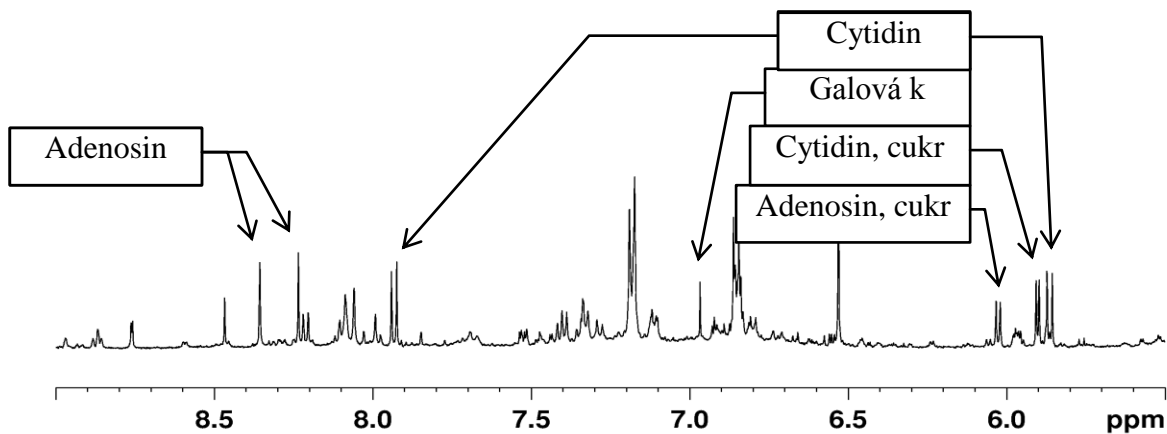
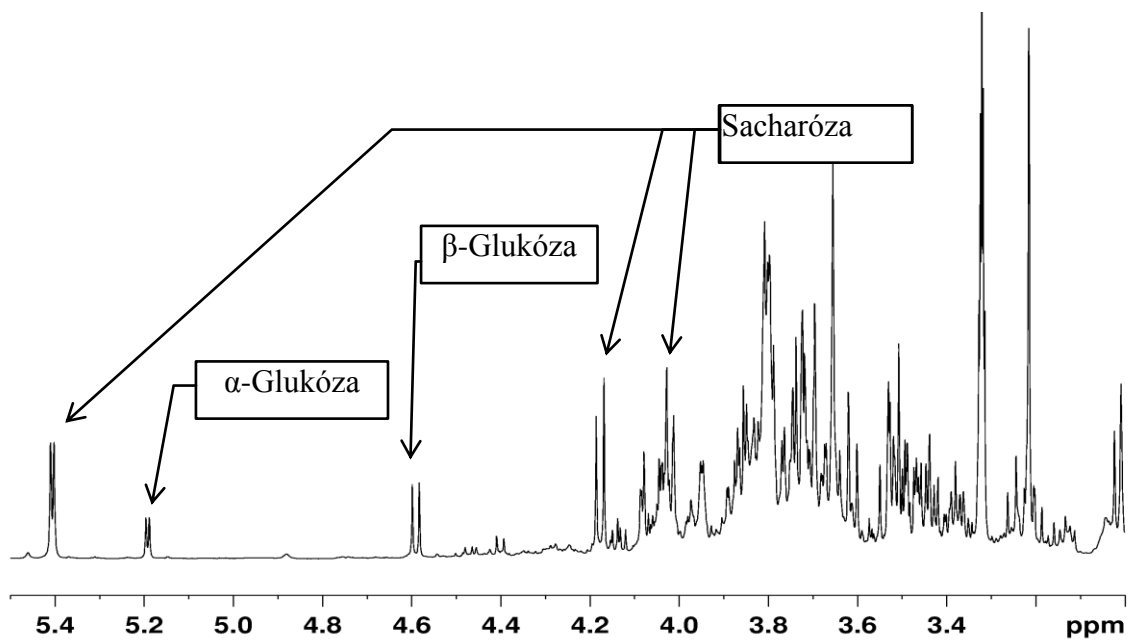
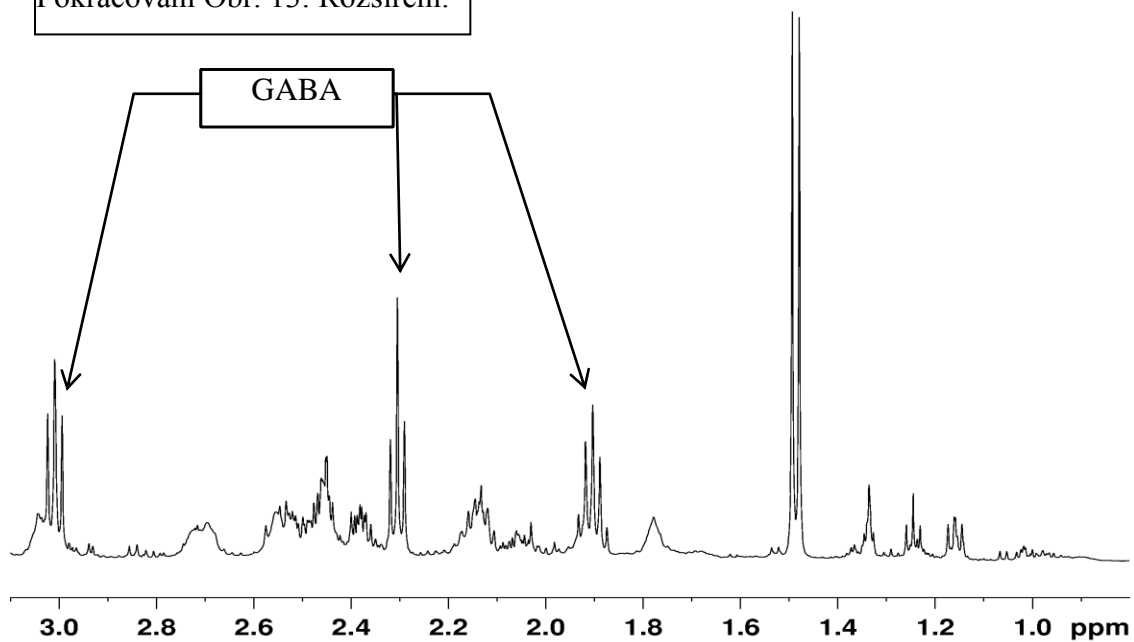
```
Current Data Parameters
NAME      YHJA0701Fcog
EXPNO     6
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20070128
Time      6.55
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PAXI 1H/
PULPROG   zgpr30
TD        65536
SOLVENT   MeOD
NS         128
DS         4
SWH       10330.578 Hz
FIDRES    0.157632 Hz
AQ        3.1719923 sec
RG         203.2
DW        48.400 use
DE        6.00 use
TE        673.2 K
D1        1.50000000 sec
d12       0.00002000 sec
TD0       1

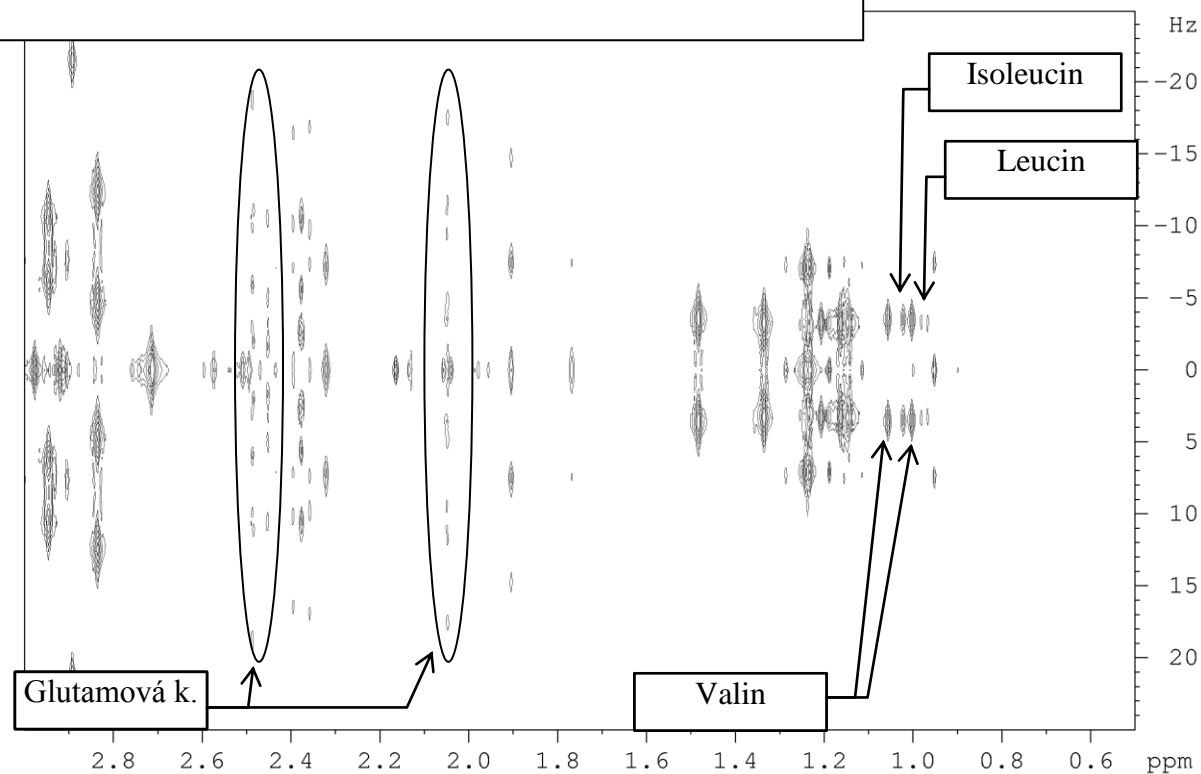
===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
P1        11.00 use
PL1       2.00 dB
PL9       55.15 dB
SFO1     500.1324538 MHz

F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        500.1300054 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.30 Hz
GB        0
PC        1.00
```

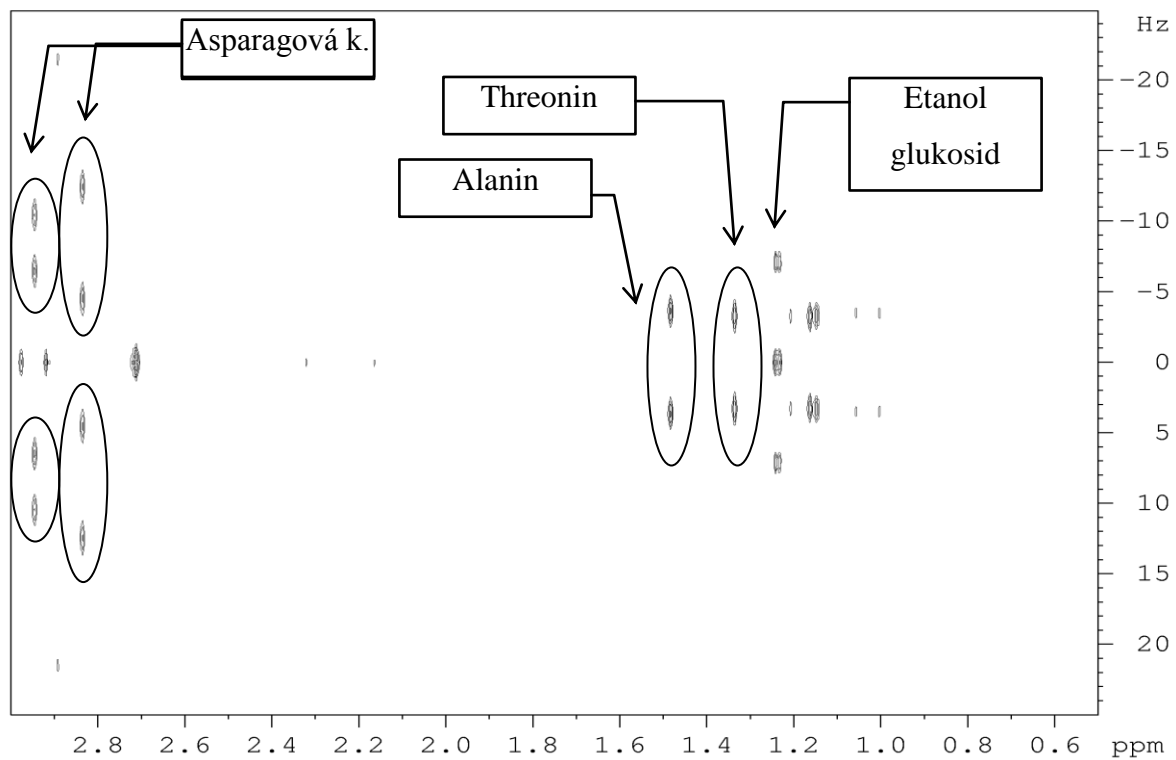
Pokračování Obr. 13: Rozšíření.



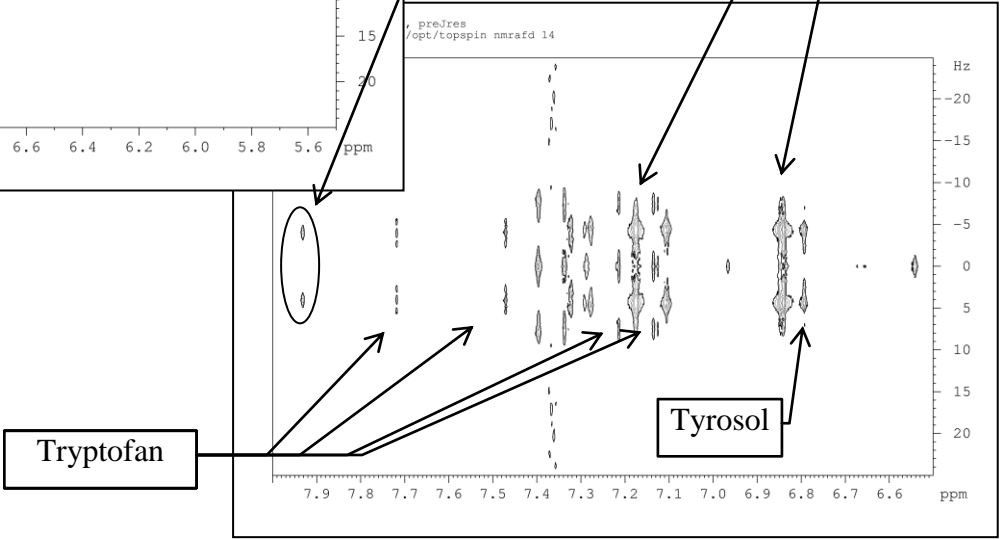
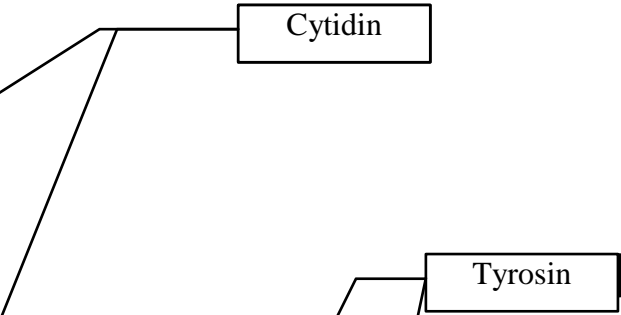
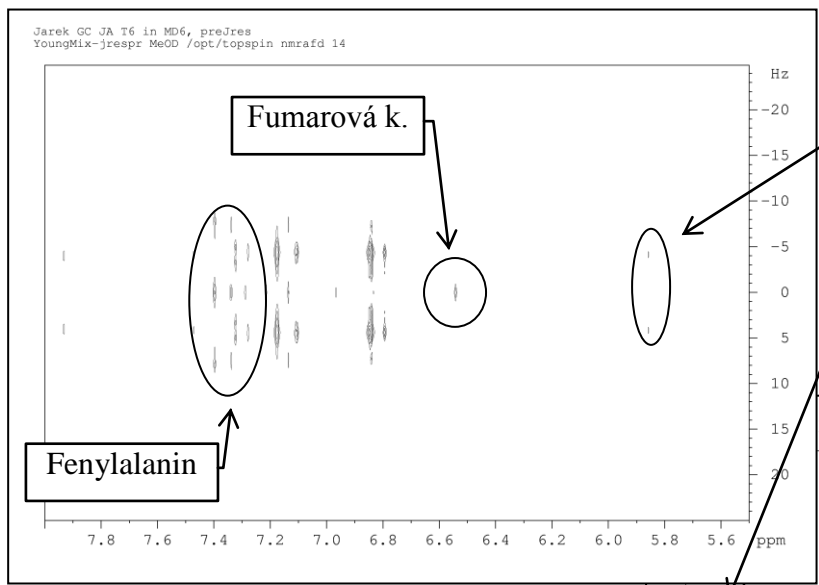
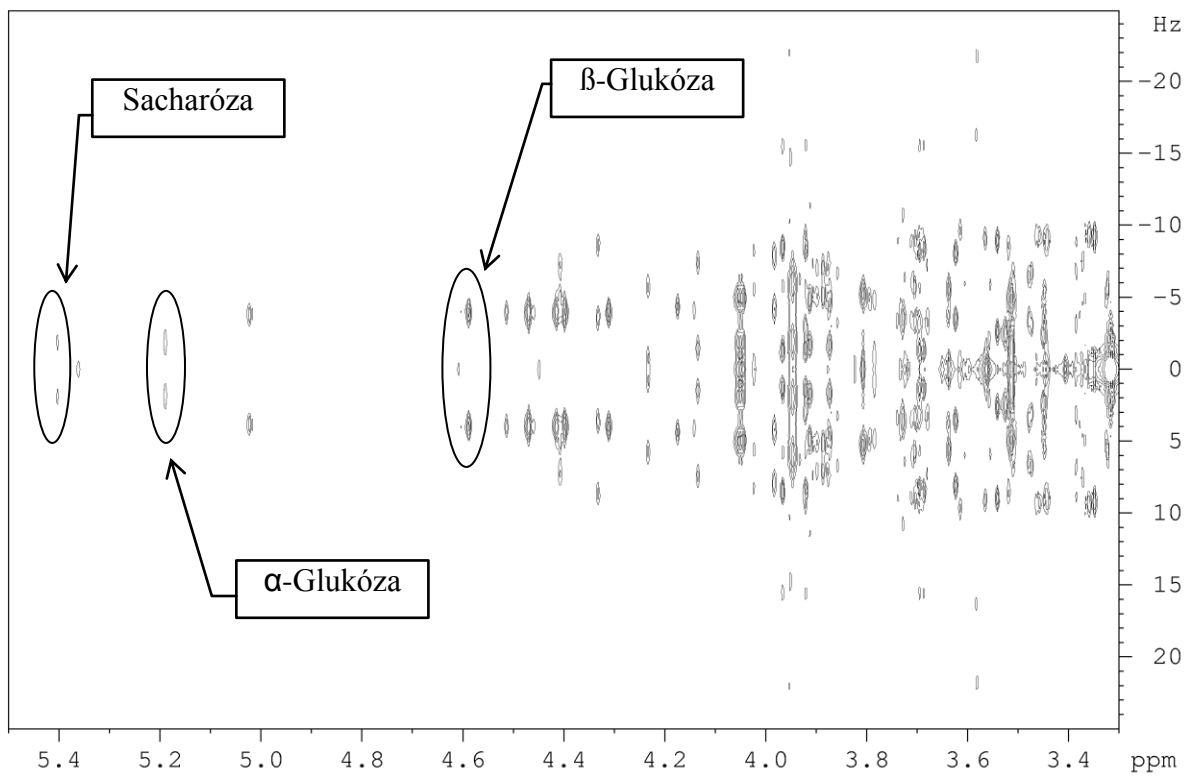
Obr. 14: J-Res 2D NMR. Metanol-voda; GC; elicitace jasmonovou kyselinou; 12. den po inokulaci.



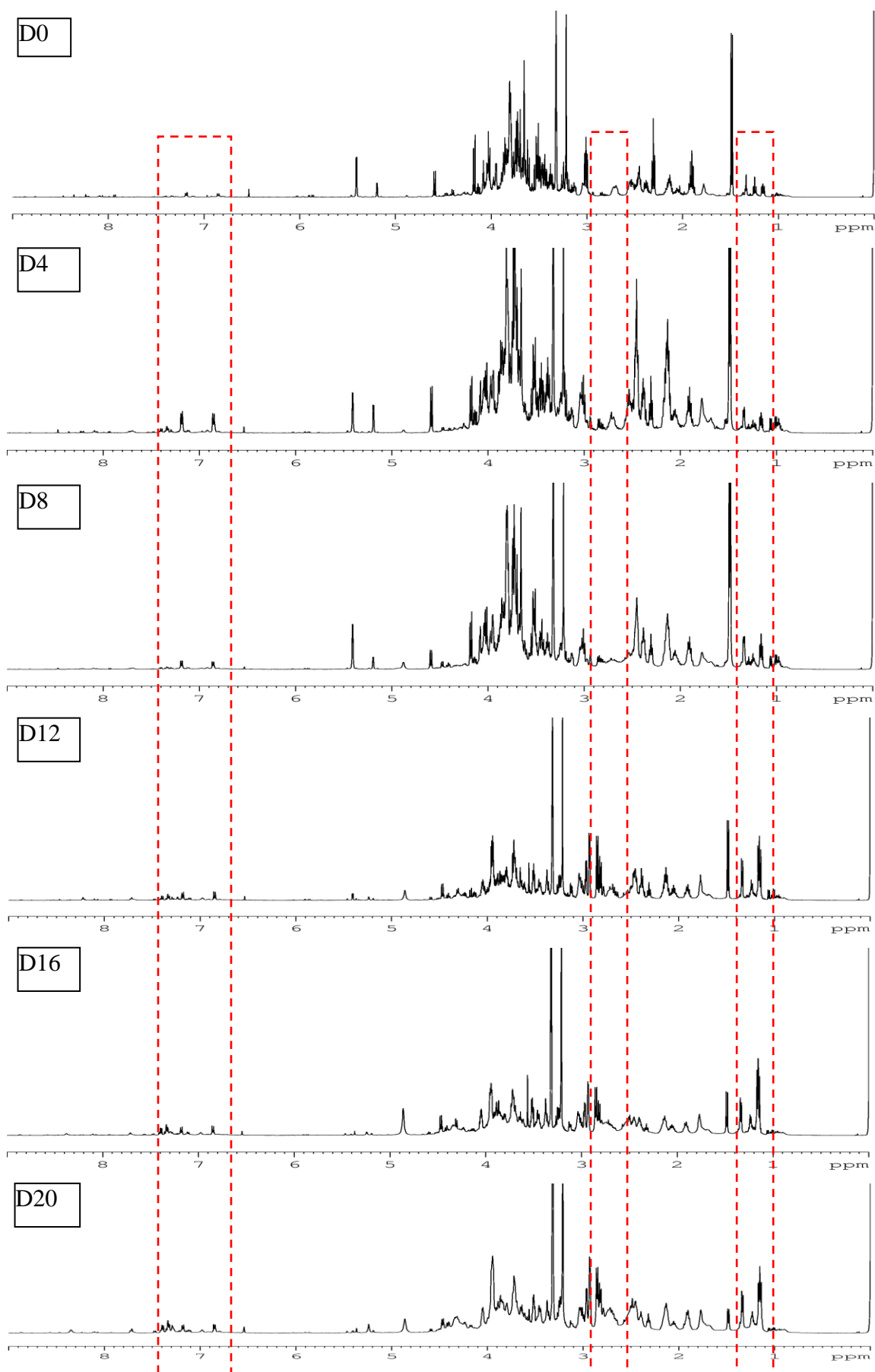
Jarek GC JA T6 in MD6, preJres
YoungMix-jrespr MeOD /opt/topspin nmrafd 14



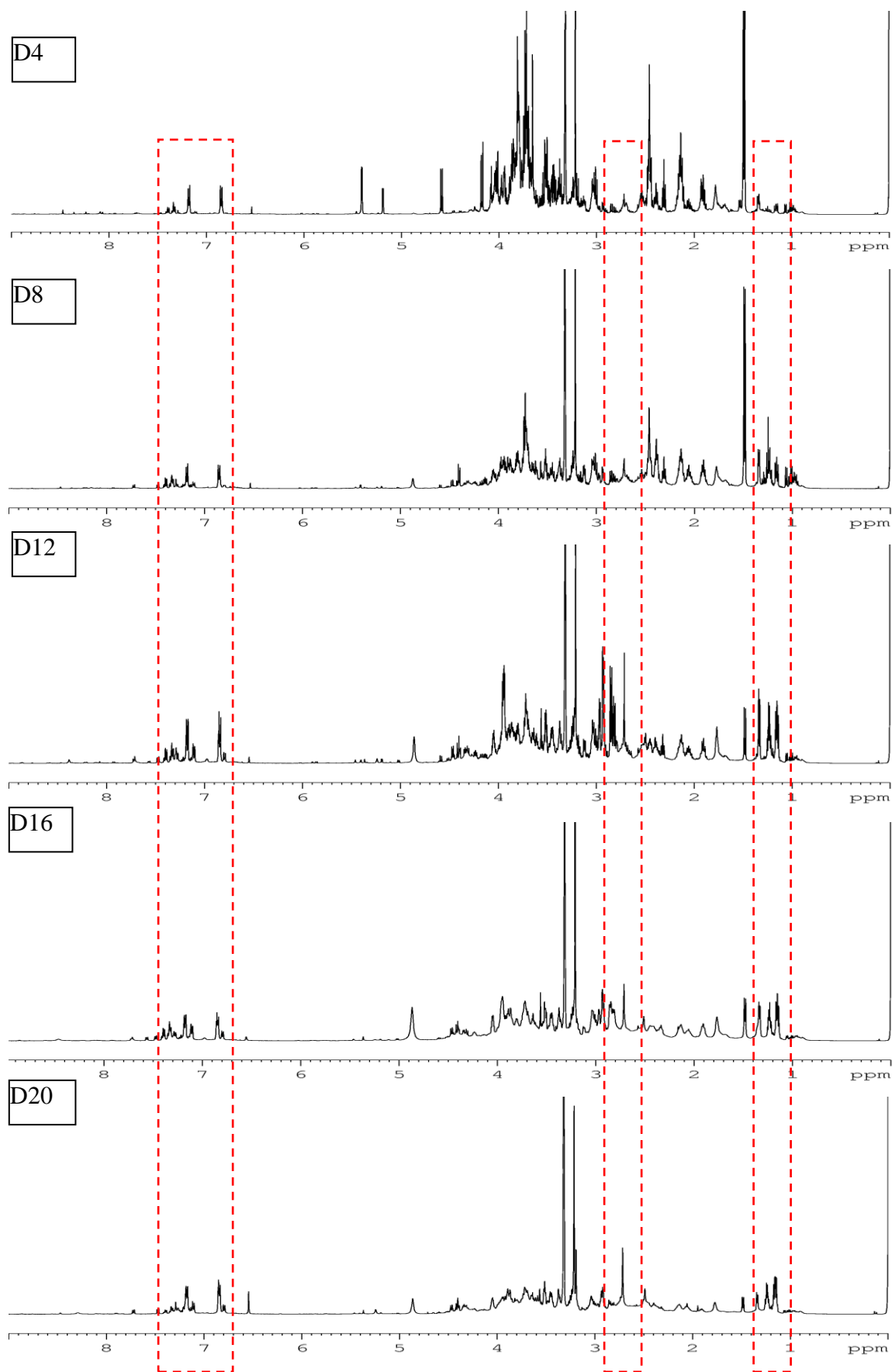
Pokračování Obr. 14:



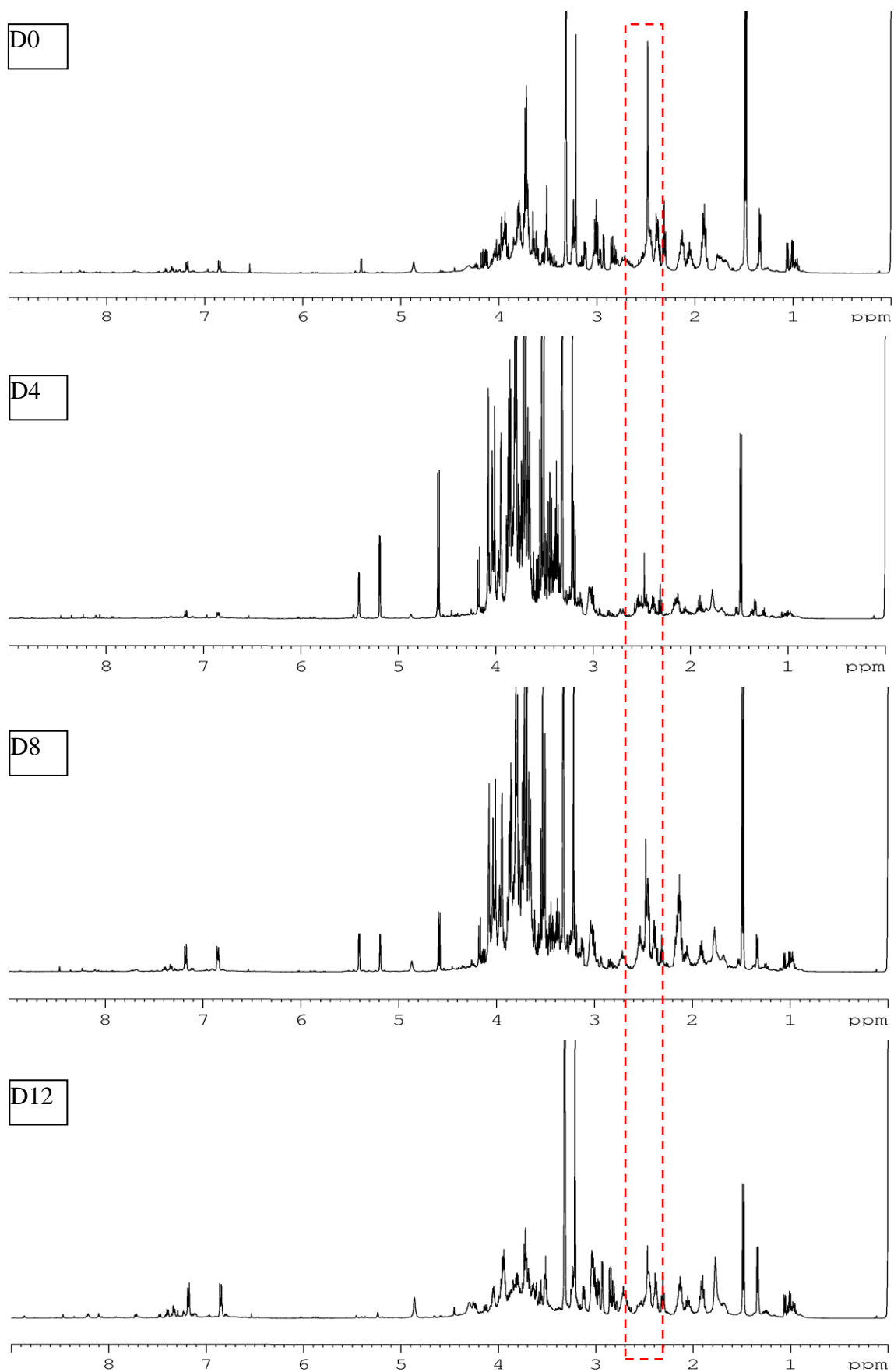
Obr. 15: ^1H NMR. Přehled; GC / kontrola z elicitace jasmonovou kyselinou:



Obr. 16: ^1H NMR. Přehled; GC / elicítace jasmonovou kyselinou:

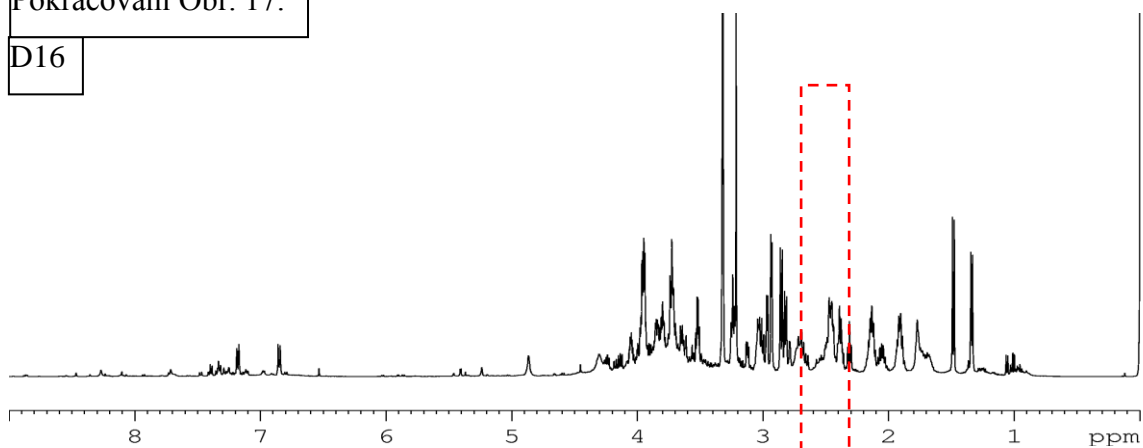


Obr. 17: ^1H NMR. Přehled; GC / kontrola z elicitace pektinem:

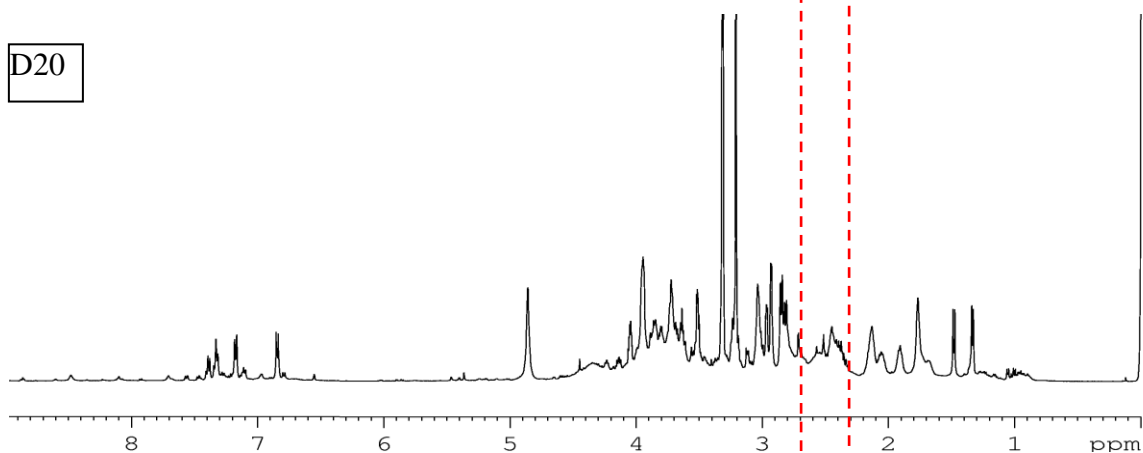


Pokračování Obr. 17:

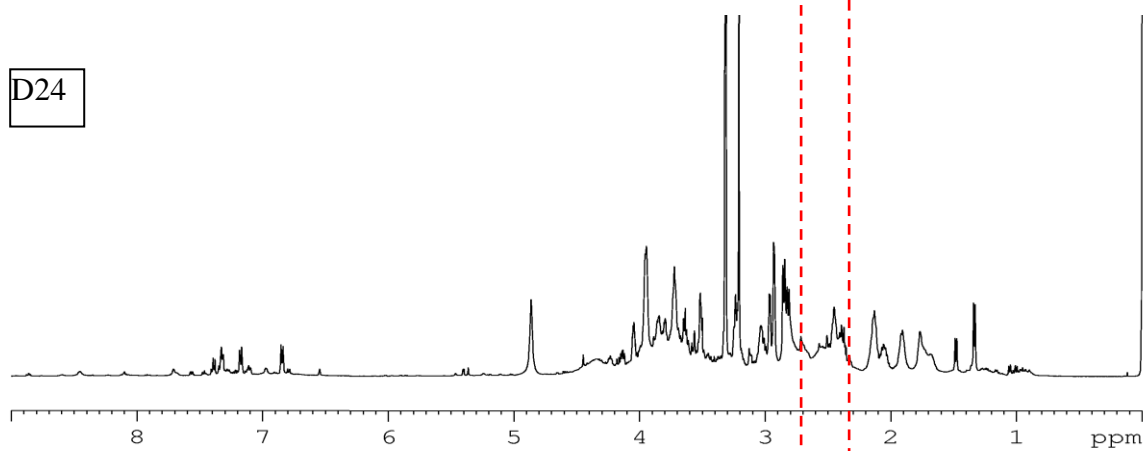
D16



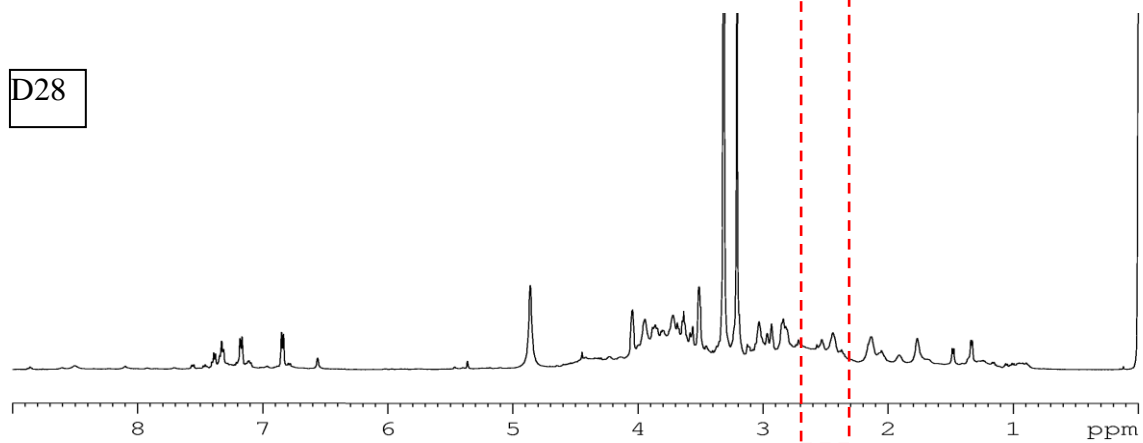
D20



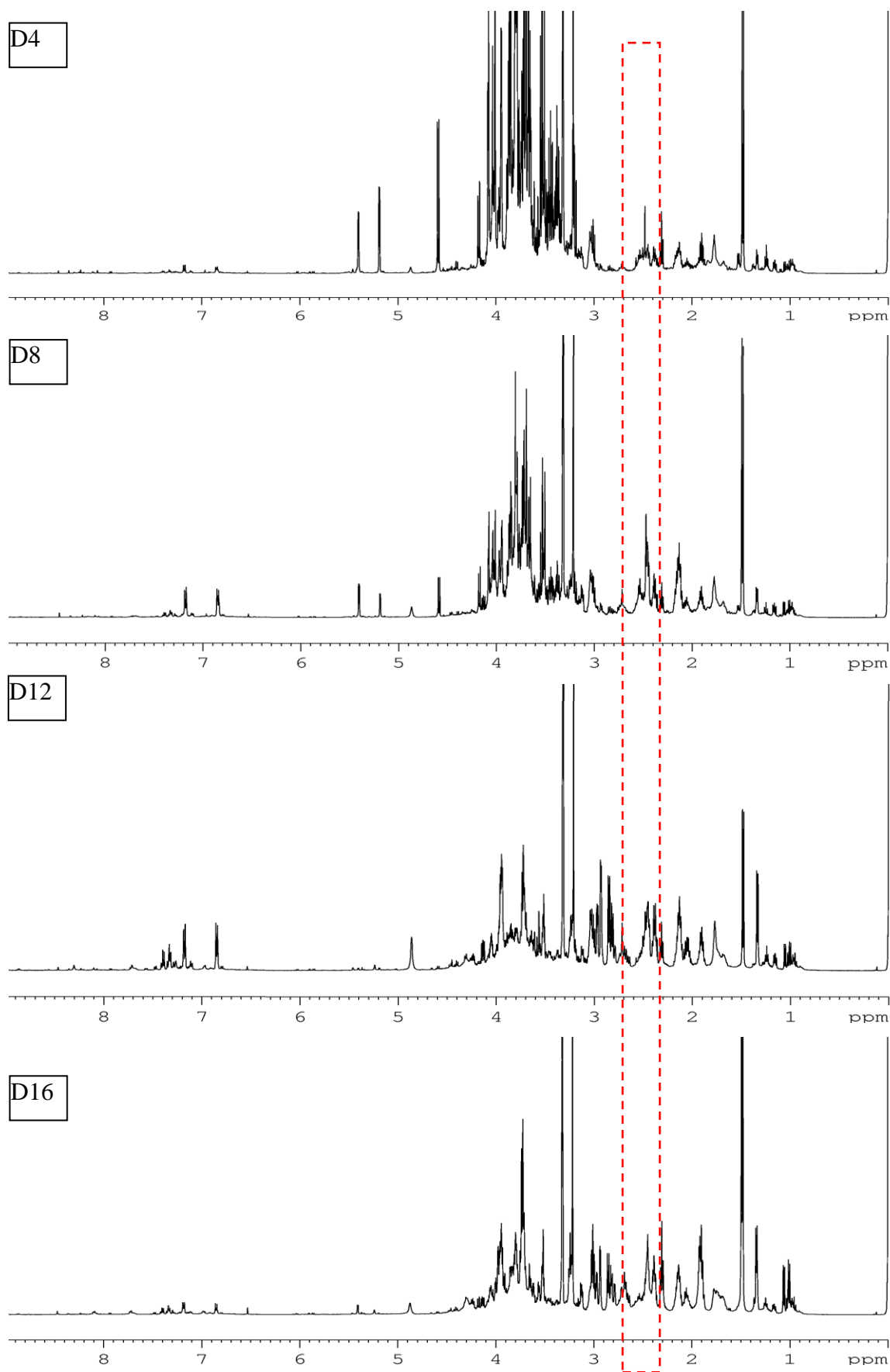
D24



D28

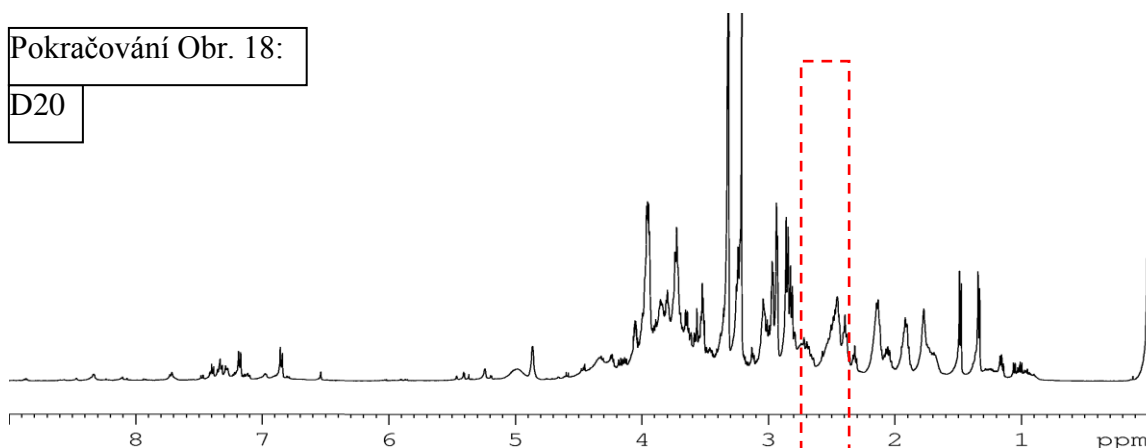


Obr. 18: ^1H NMR. Přehled; GC / elicítace pektinem:

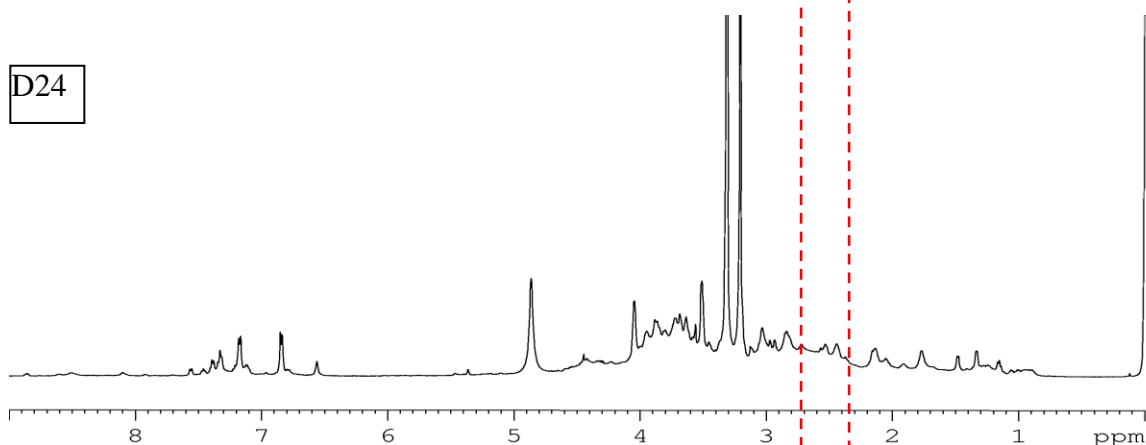


Pokračování Obr. 18:

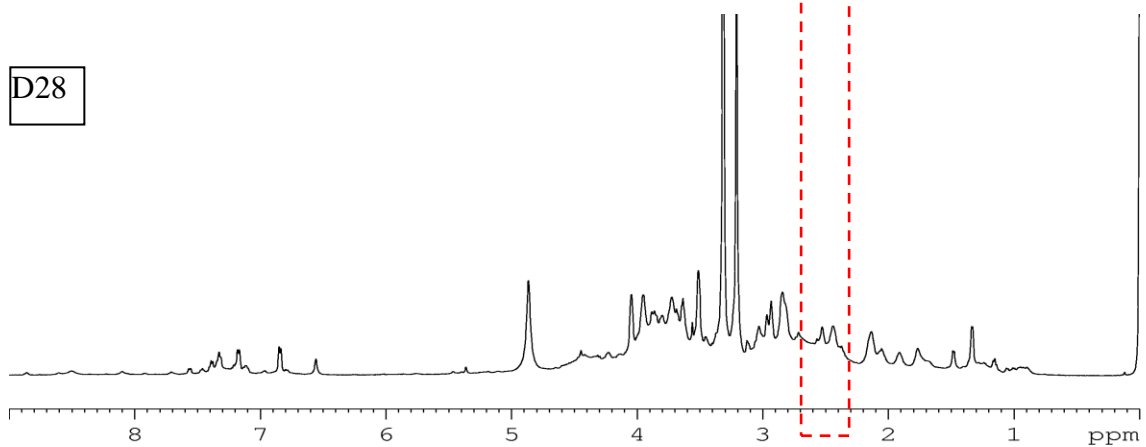
D20



D24



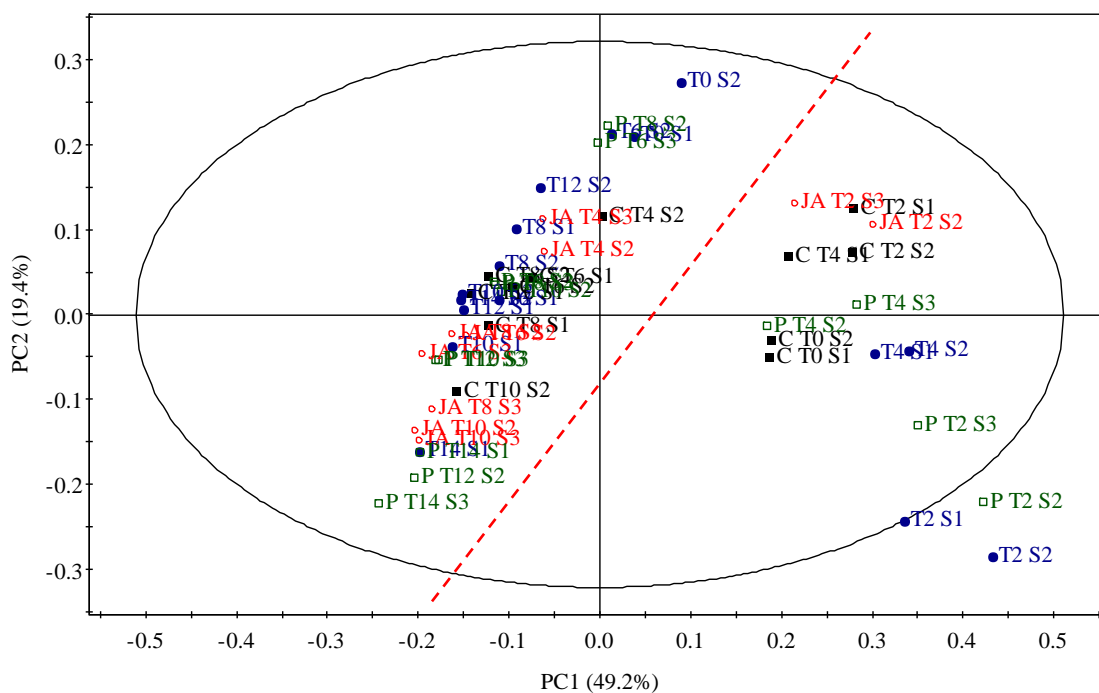
D28

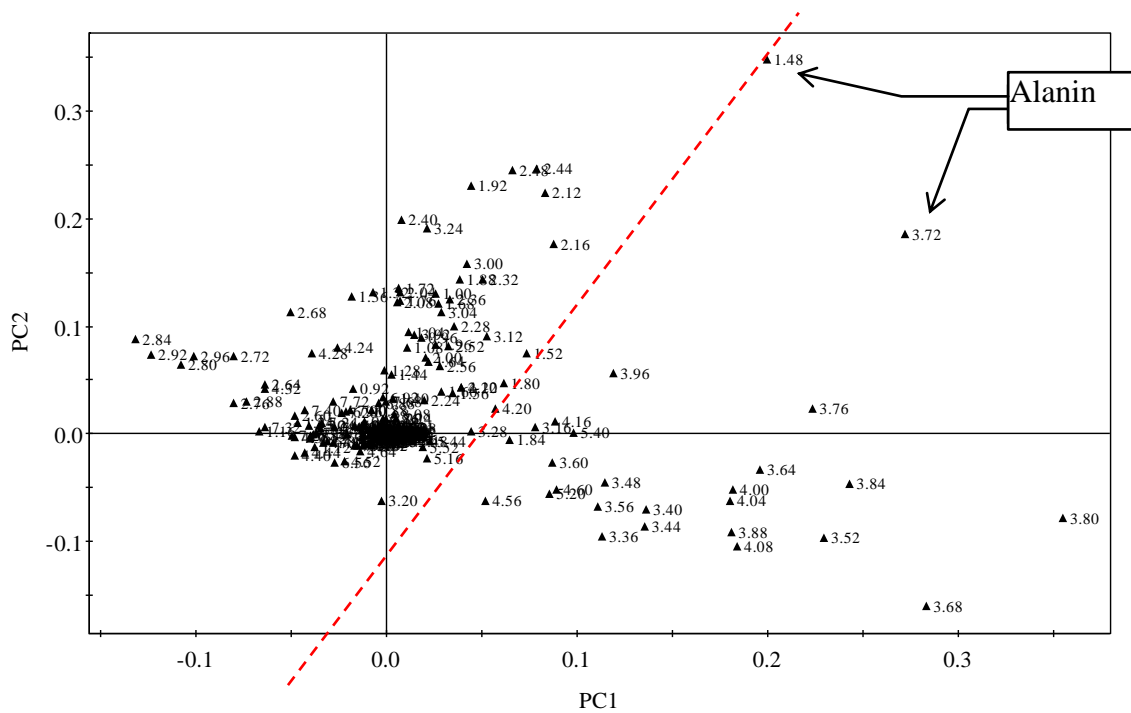


Z naměřených ^1H NMR spekter byla provedena PCA analýza buněčné linie GC. PC1 rozdělila vzorky podle časové posloupnosti na pravé straně do 8. dne kultivace (obr. 19), což odpovídá zvýšené hladině cukrů v mladých kulturách ($\delta 5.40$, $\delta 5.20$, $\delta 4.60$ s oblastí $\delta 3.16$ – $\delta 4.08$). Dále byla v prvním týdnu kultivace pozorována zvýšená koncentrace alaninu. Významnou separaci poskytla PC6, pomocí které byl rozdělen vzorek elicitovaný jasmonovou kyselinou proti kontrole (obr. 20). Pro detailnější zpracování rozdílností způsobených elicitací jasmonovou kyselinou byl použit sloupcový loading diagram (obr. 21), který znázorňuje porovnání vzorku elicitovaného jasmonovou kyselinou oproti průměru. Po elicitaci

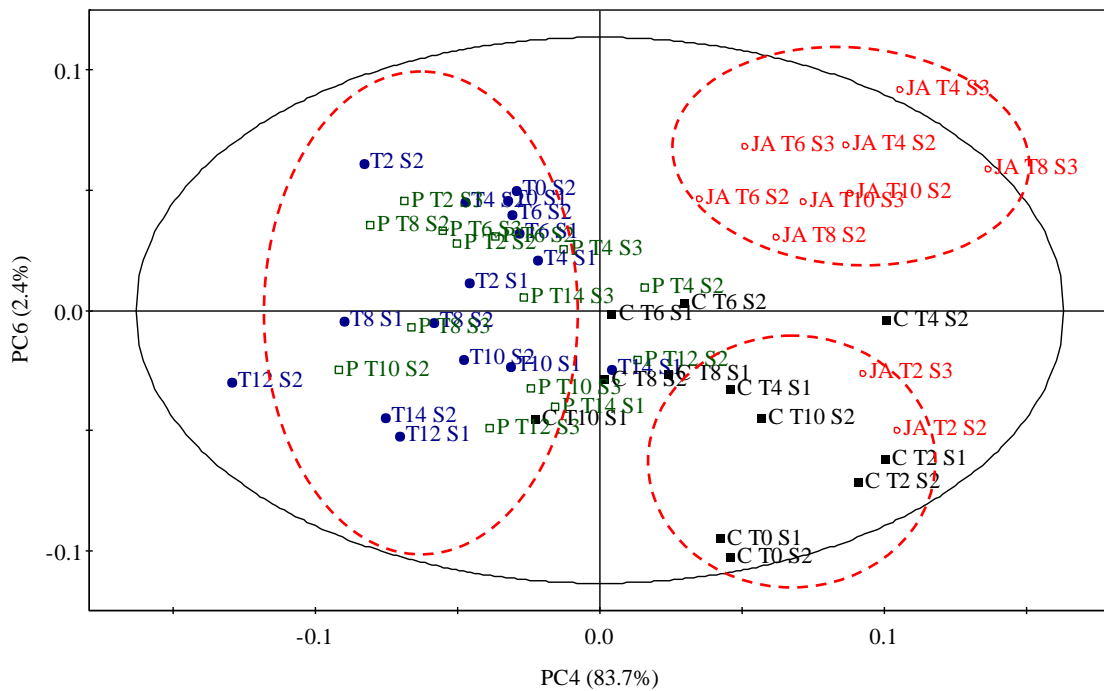
jasmonovou kyselinou došlo k výraznému zvýšení koncentrace aromatických sloučenin, a to fenylalaninu, tryptofanu, tyrosinu a tyrosolu (viz tab.7). V kontrolním vzorku byly naopak významné signály alifatických aminokyselin, zejména glutamové kyseliny, a dále sacharózy. Významným signálem zodpovědným za separaci elicítace jasmonovou kyselinou je $\delta 1.24$, který byl identifikován jako glukosid etanolu a jeho přítomnost byla vysvětlena metabolizací etanolu jako rozpouštědla pro jasmonovou kyselinu. Glukosilace je v tomto případě detoxifikační proces. PC4 oddělila elicítaci jasmonovou kyselinou od vzorku s přidavkem pektinu, přičemž v rámci elicítace pektinem nebyla nalezena významná separace pomocí PCA, což dokládá, že nebylo dosaženo významné změny metabolismu polárních metabolitů. Lze konstatovat, že mladší kultury (do 16. dne kultivace v levém horním kvadrantu – obr.20), kontrolní i elicítované pektinem, obsahují alifatické aminokyseliny valin, threonin a asparagovou kyselinu, přičemž aromatické sloučeniny nejsou ovlivněny.

Obr. 19: Skóre a loading diagram linie GC elicítované pektinem a jasmonovou kyselinou, spolu s kontrolami (PC 1 – 2).

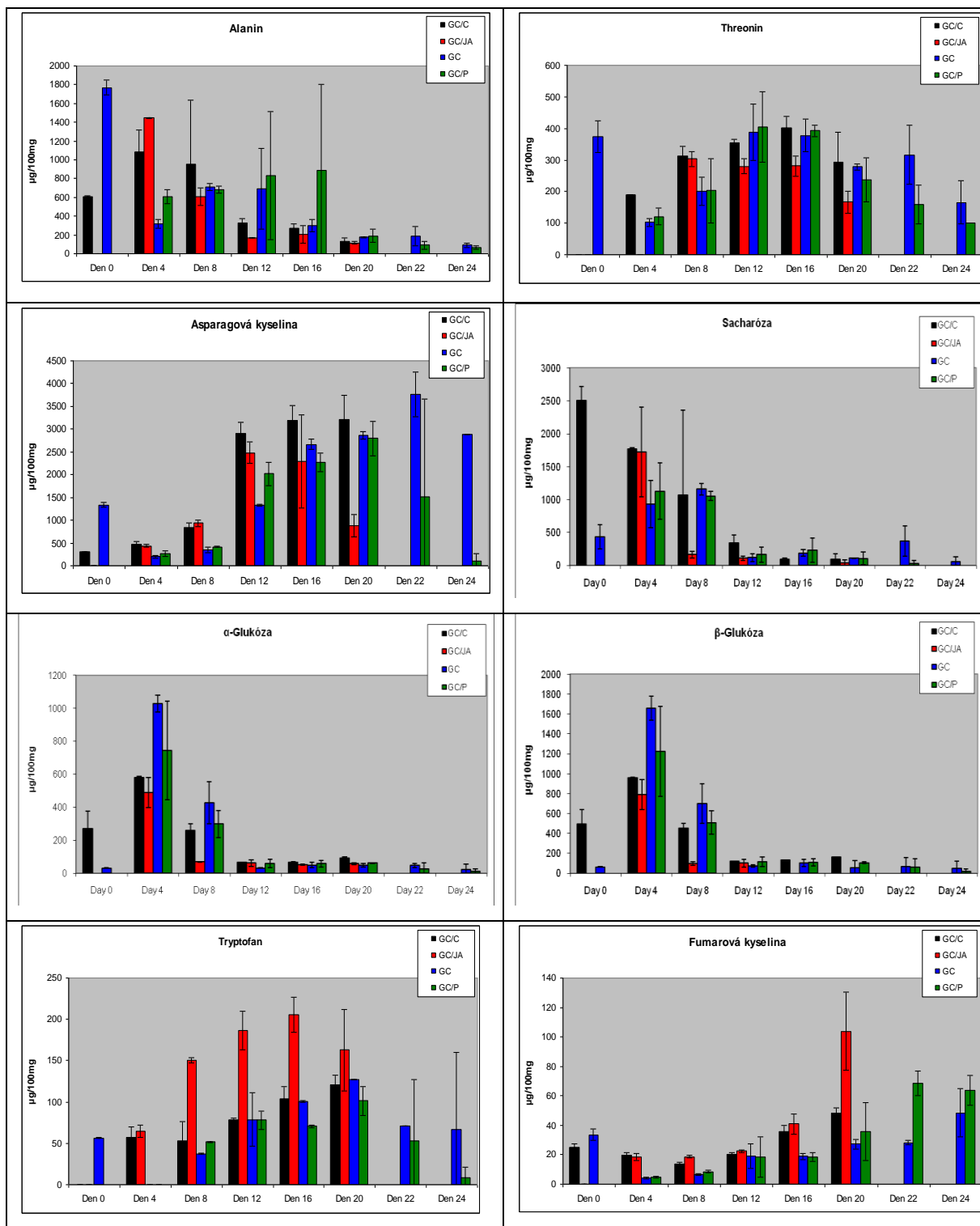


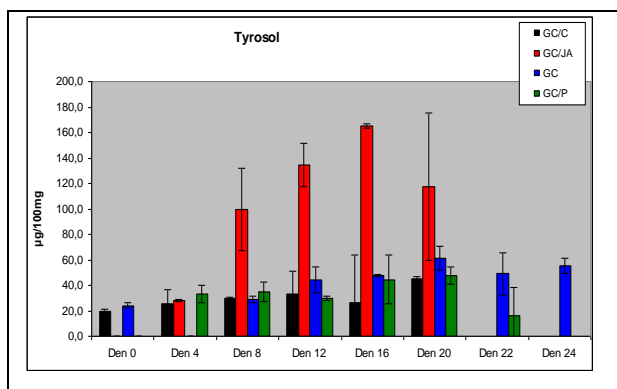


Obr. 20: Skóre a loading digramy linie GC elicitované pektinem a jasmonovou kyselinou, spolu s kontrolami (PC 4 – 6).



Obr. 22: Kvantifikace některých sloučenin identifikovaných v GC linii elicované pektinem nebo jasmonovou kyselinou.





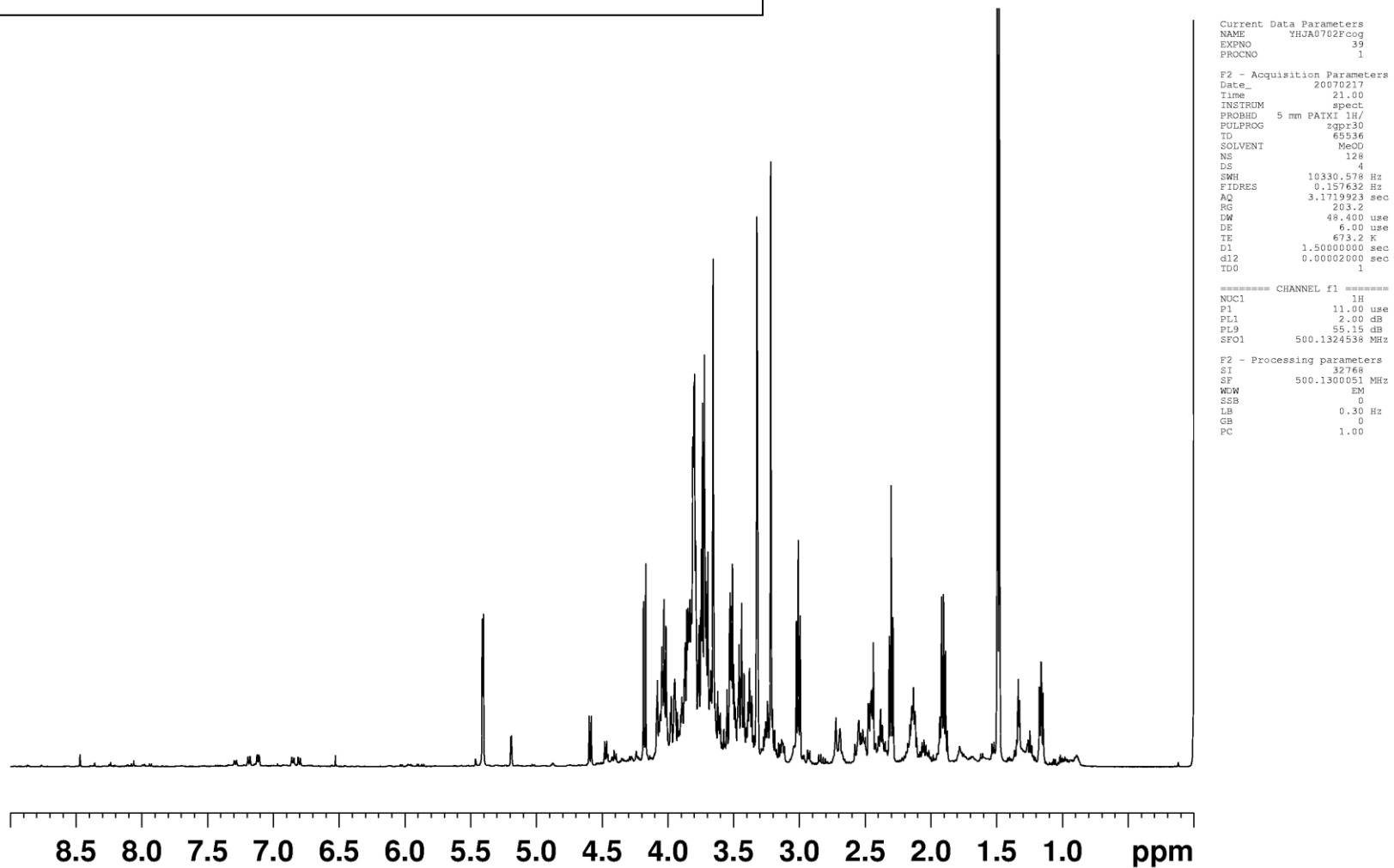
Na základě kvantifikace metabolitů (obr. 22) v porovnání s růstovými křivkami lze vyhodnotit alanin jako metabolit exponenciální fáze růstu spolu s vysokým obsahem cukrů. Metabolismus alaninu byl pravděpodobně ovlivněn elicitací pektinem, kdy se objevilo kolísání koncentrace alaninu ve stacionární fázi. U sacharózy a glukózy bylo pozorováno částečné snížení koncentrace u elicitací, což může být důsledek zintenzivnění metabolismu po elicitaci. Threonin a asparagová kyselina jsou pak hlavní metabolity stacionární fáze růstu. U obou metabolitů bylo pozorováno snížení koncentrace mezi 12. a 20. dnem kultivace u elicitace jasmonovou kyselinou a stejně tak i v terminálních stádiích u elicitace pektinem. Fumarová kyselina je nejvíce zastoupena v terminálních stádiích a elicitacemi byla naopak koncentrace 2x zvýšena. Z kvantifikovaných aromatických metabolitů tryptofanu a tyrosolu je patrný výrazný nárůst koncentrace po elicitaci jasmonovou kyselinou, také vyhodnocený s využitím PCA.

V této části je nutné upozornit na jeden ze záporů metody NMR, která spočívá v nemožnosti přesné kvantifikace, při částečném překryvu signálů jednotlivých sloučenin. Možným řešením je využití 2D NMR experimentu, např. J-Res s následnou redukcí štěpení jednotlivých signálů způsobující jejich zúžení a následně kvantifikací těchto zúžených signálů. Tento proces měření je ovšem značně zdlouhavý v porovnání s jednoduchým ^1H NMR měřením a v této práci nebyl využit, vzhledem k použití PCA.

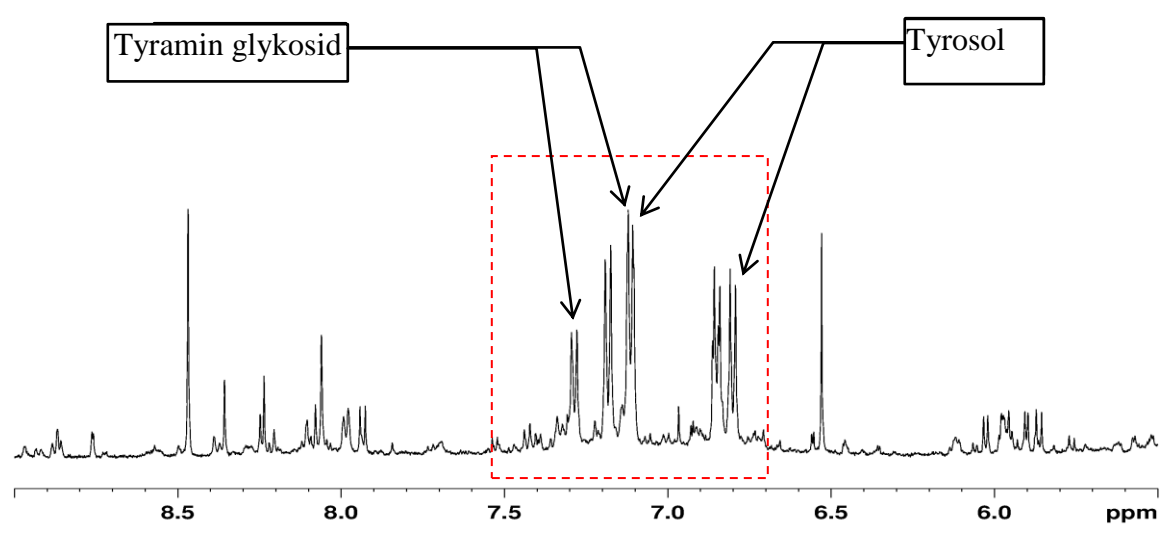
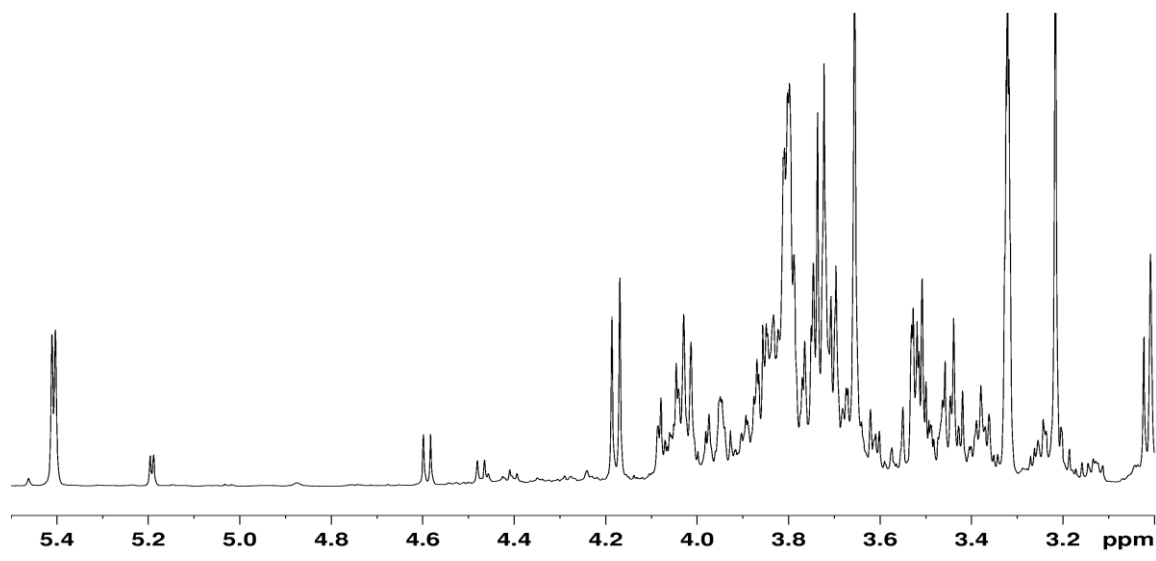
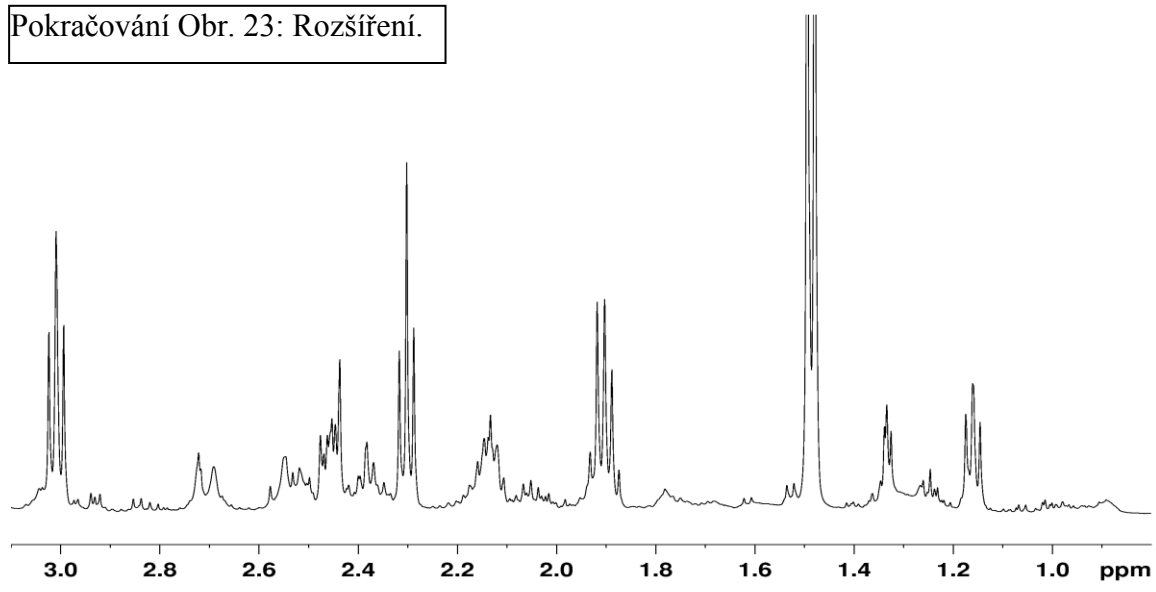
2.2 Linie GB:

Stejně jako v případě GC kultury jsou uvedena výběrová spektra reprezentující další nalezené metabolity (obr. 23 – 25), především s důrazem na aromatickou oblast spektra ($\delta 6.5$ – $\delta 8.0$). Dále jsou doplněna přehledová spektra (obr. 26 – 28). U linie GB byl použit pouze jeden kontrolní set vzorků pro obě elicitace.

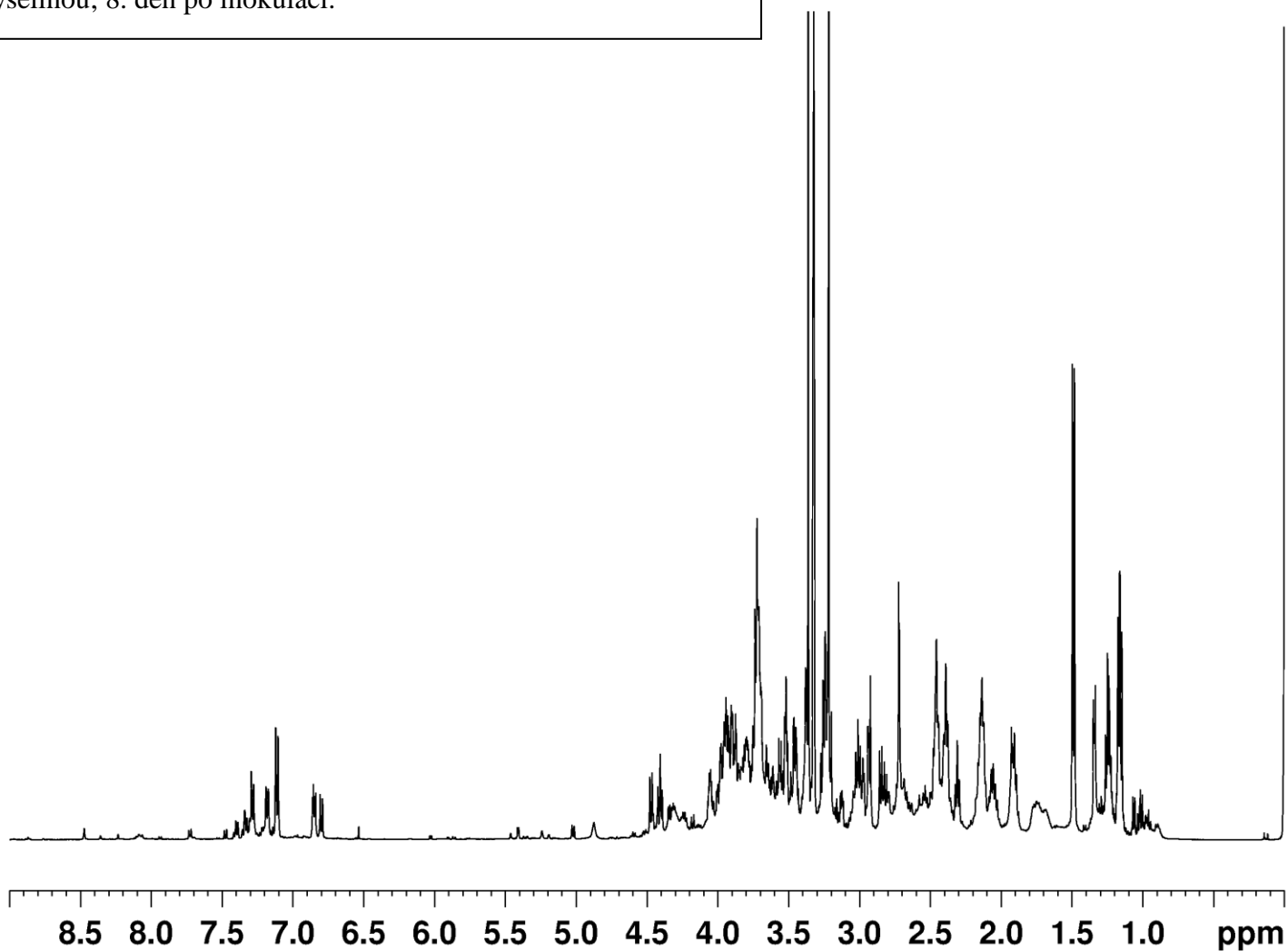
Obr. 23: ^1H NMR. Metanol-voda; GB; kontrola; 4. den po inokulaci.



Pokračování Obr. 23: Rozšíření.



Obr. 24: ^1H NMR. Metanol-voda; GB; elicítace jasmonovou kyselinou; 8. den po inokulaci.



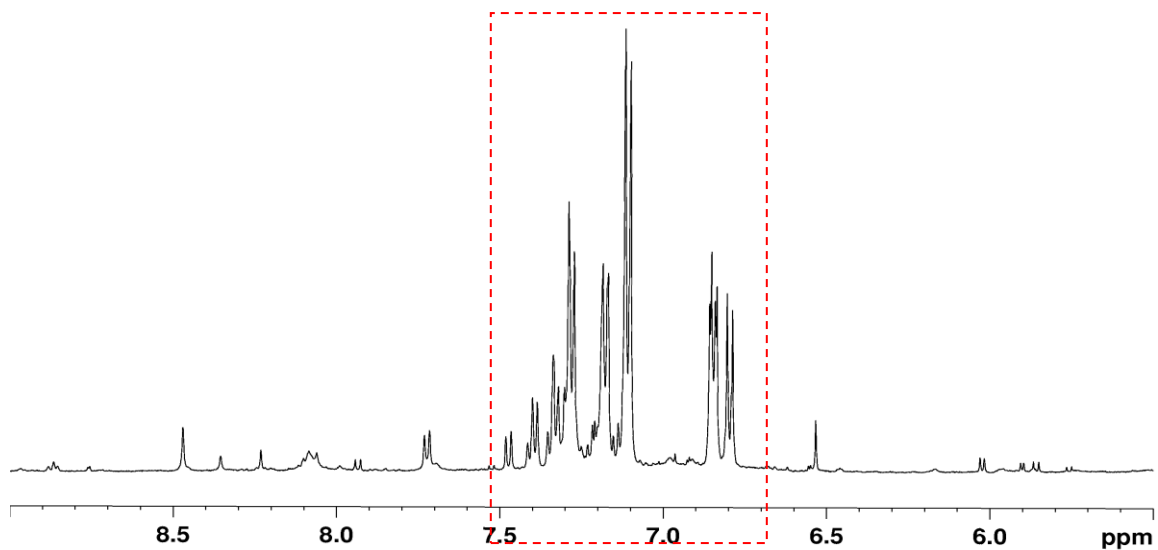
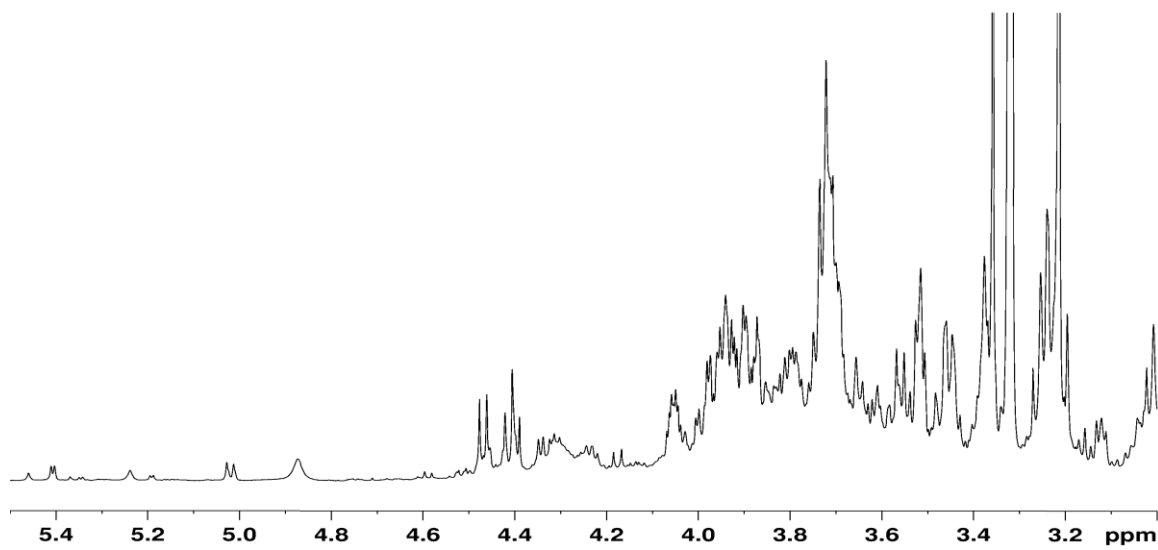
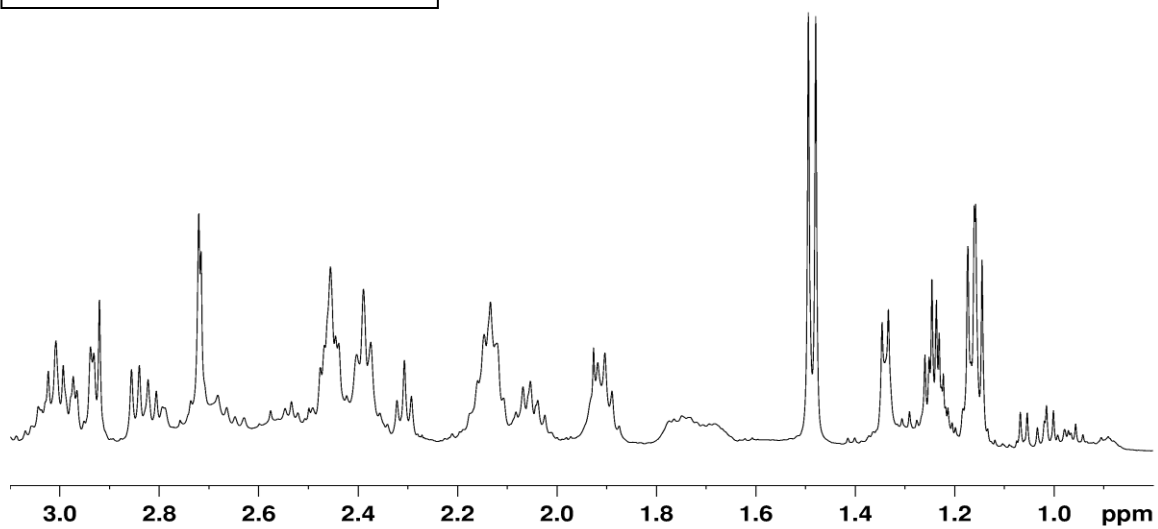
```
Current Data Parameters
NAME      YHJA0702Fcog
EXPNO     52
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20070218
Time      0.42
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PAXI 1H/
PULPROG   zgpr30
TD        65536
SOLVENT   MeOD
NS        128
DS        4
SWH       10330.578 Hz
FIDRES    0.157632 Hz
AQ        3.1719923 sec
RG        203.2
DW        48.400 use
DE        6.00 use
TE        673.2 K
D1        1.50000000 sec
d12       0.00002000 sec
TD0       1

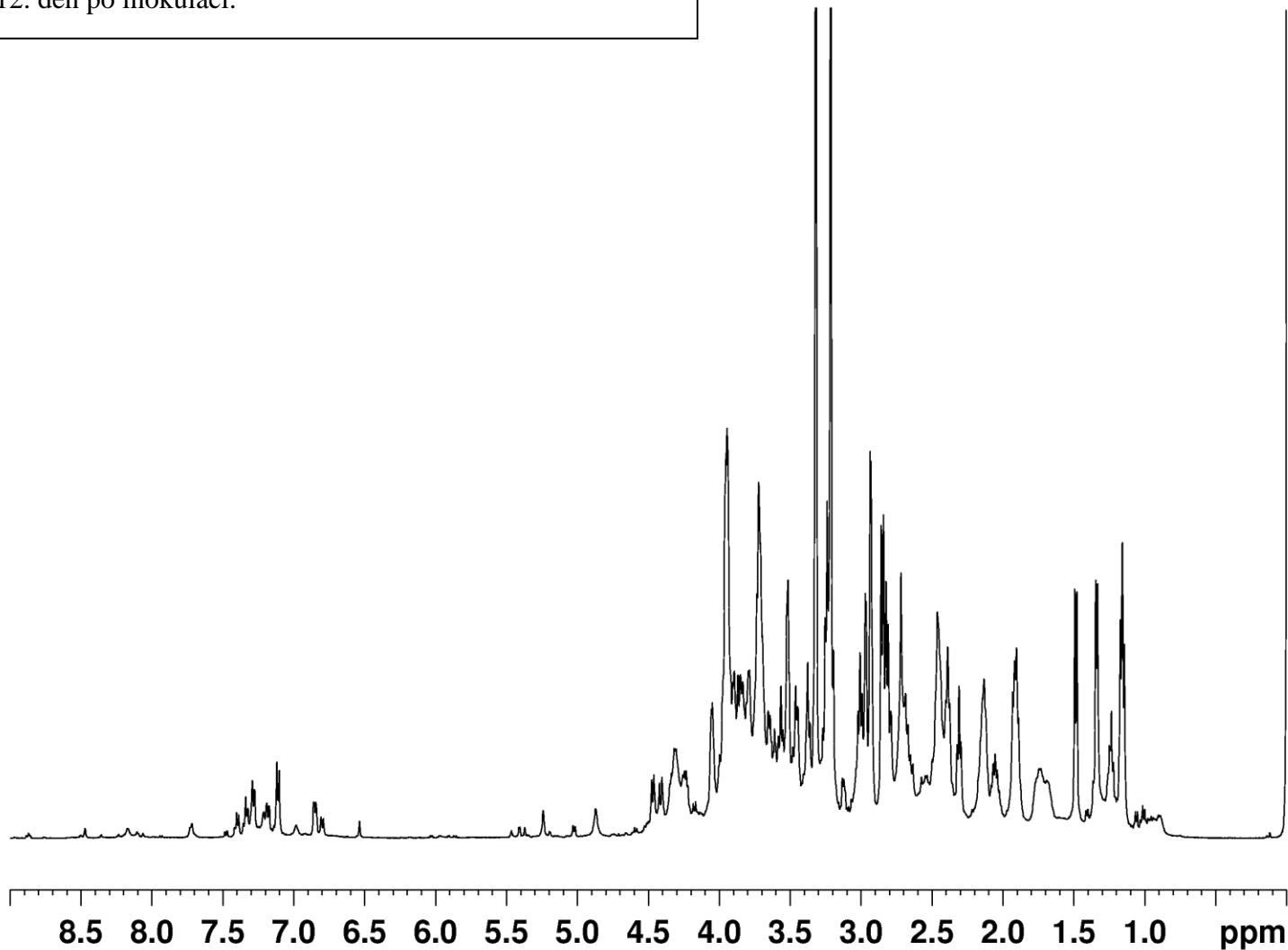
===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
P1        11.00 use
PL1       2.00 dB
PL9       55.15 dB
SFO1      500.1324538 MHz

F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        500.1300054 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.30 Hz
GB        0
PC        1.00
```

Pokračování Obr. 24: Rozšíření.



Obr. 25: ^1H NMR. Metanol-voda; GB; elicítace pektinem;
12. den po inokulaci.



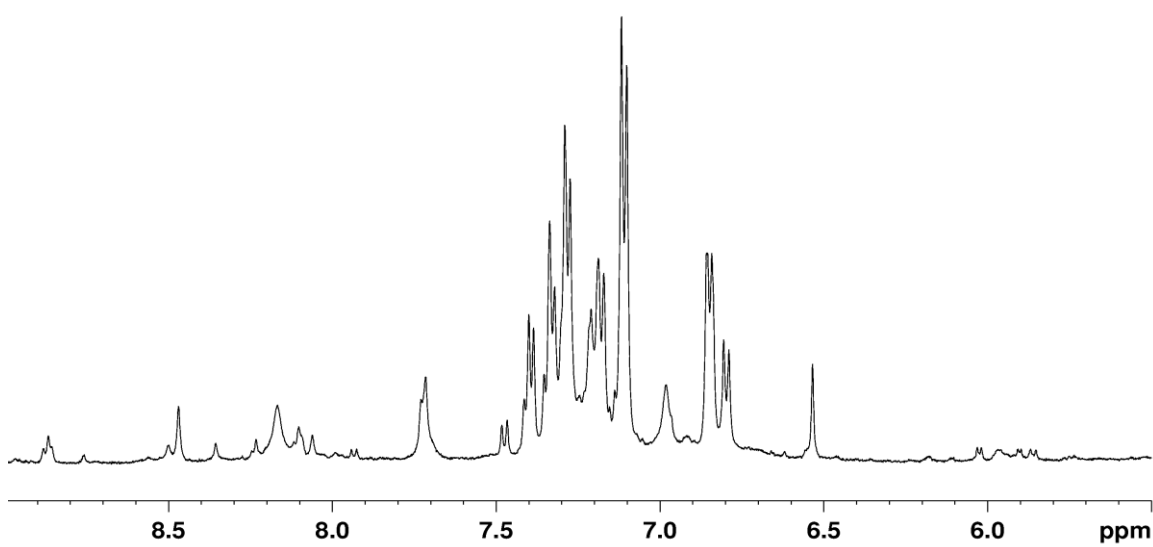
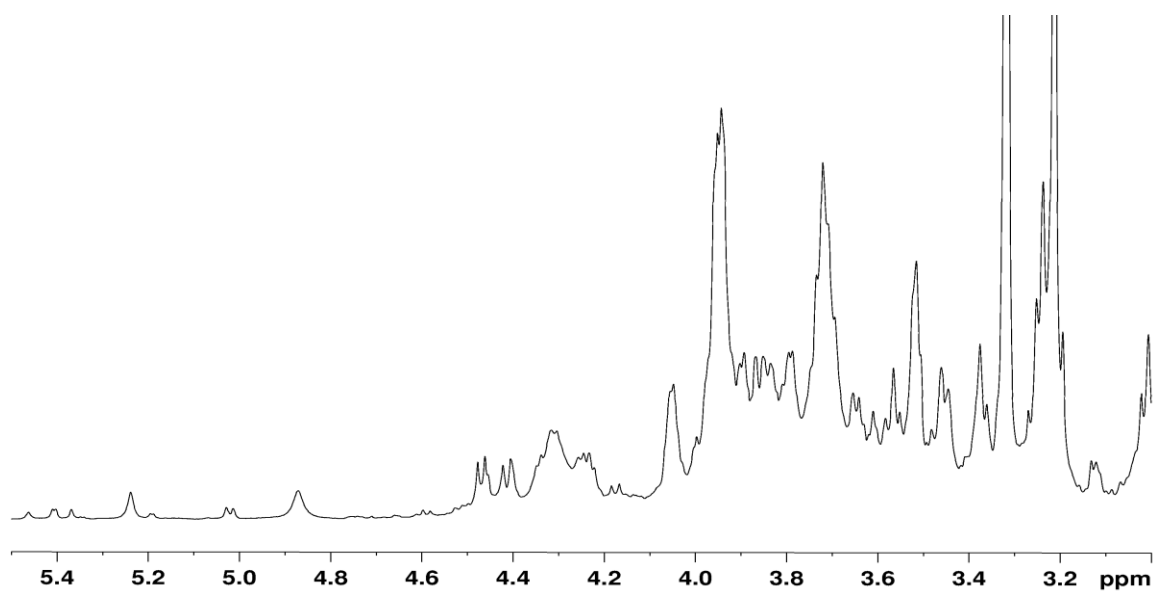
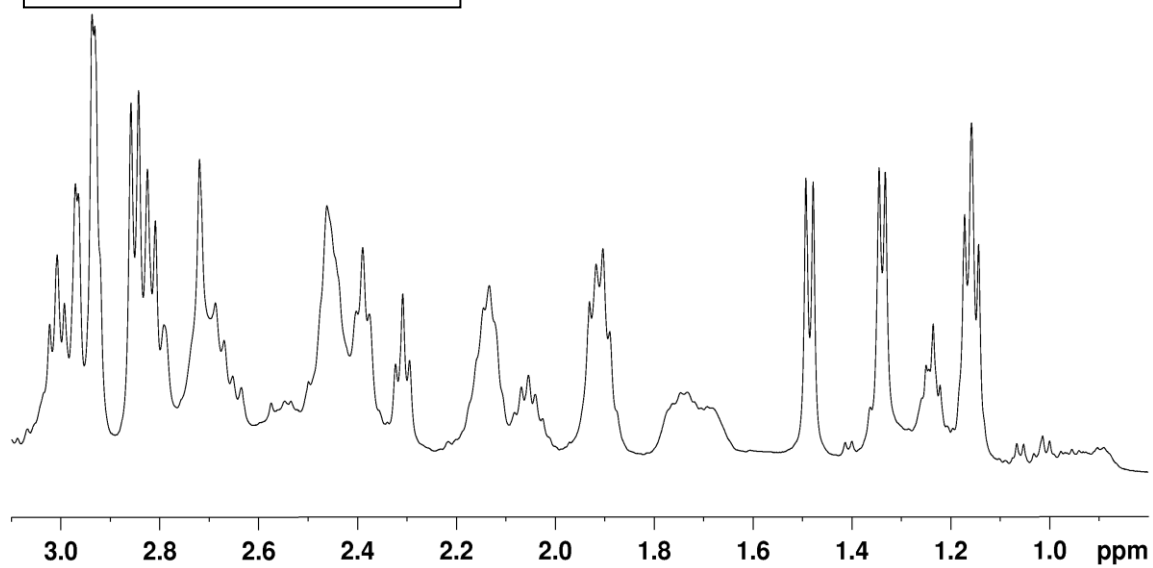
```
Current Data Parameters
NAME      YHJA0702F00g
EXPNO    47
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20070217
Time     23.19
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PATXI 1H/
PULPROG  zgpg30
TD       65536
SOLVENT  MeOD
NS       128
DS       4
SWH      10330.578 Hz
FIDRES   0.157632 Hz
AQ       3.1719923 sec
RG       203.2
DE       6.00 use
TE       673.2 K
D1       1.5000000 sec
d12      0.00002000 sec
TD0      1

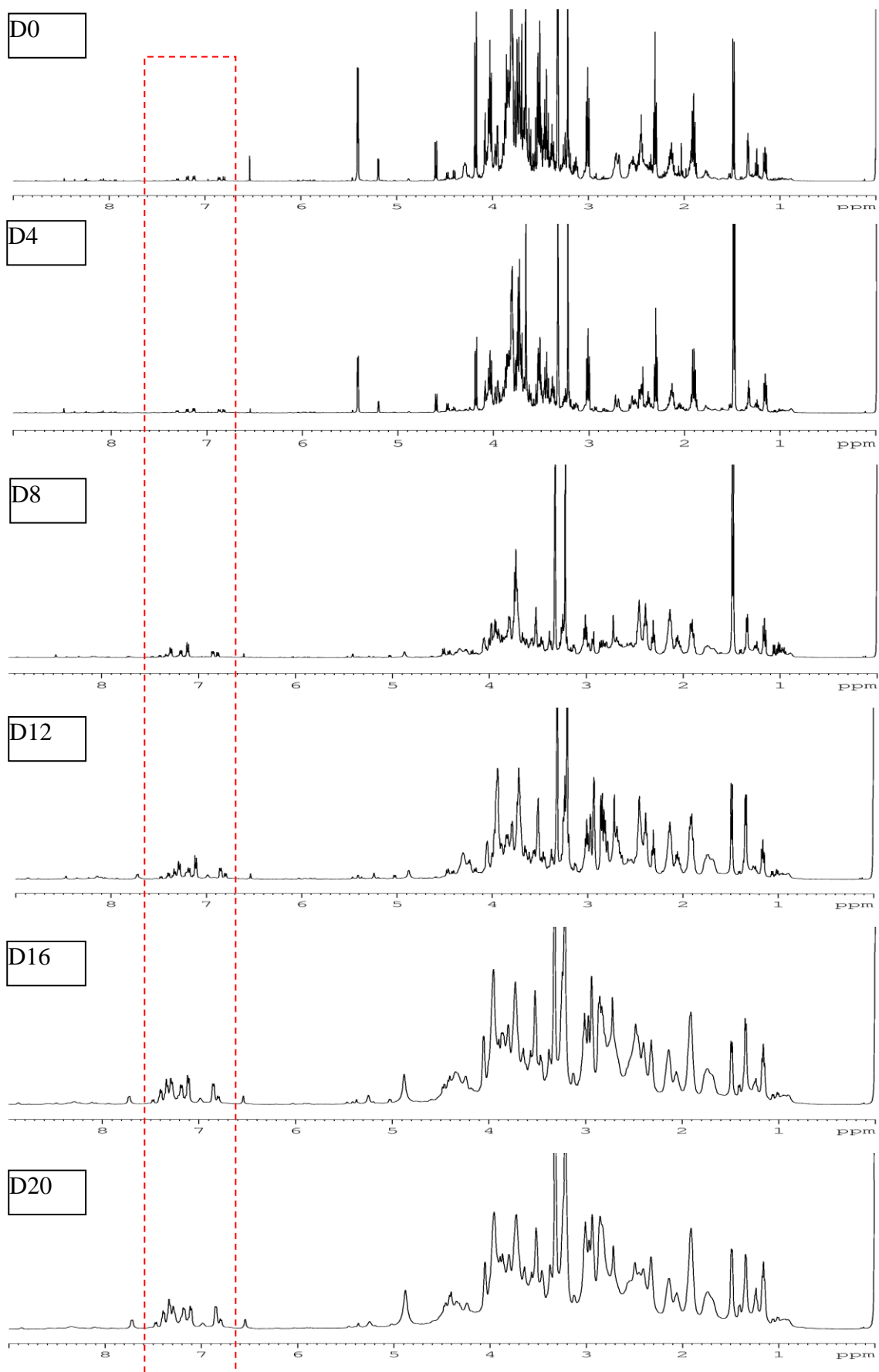
===== CHANNEL f1 =====
NUC1     1H
P1       11.00 use
PL1      2.00 dB
PL9      55.15 dB
SFO1     500.1324538 MHz

F2 - Processing parameters
SI       32768
SF       500.1300061 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       0.30 Hz
GB       0
PC       1.00
```

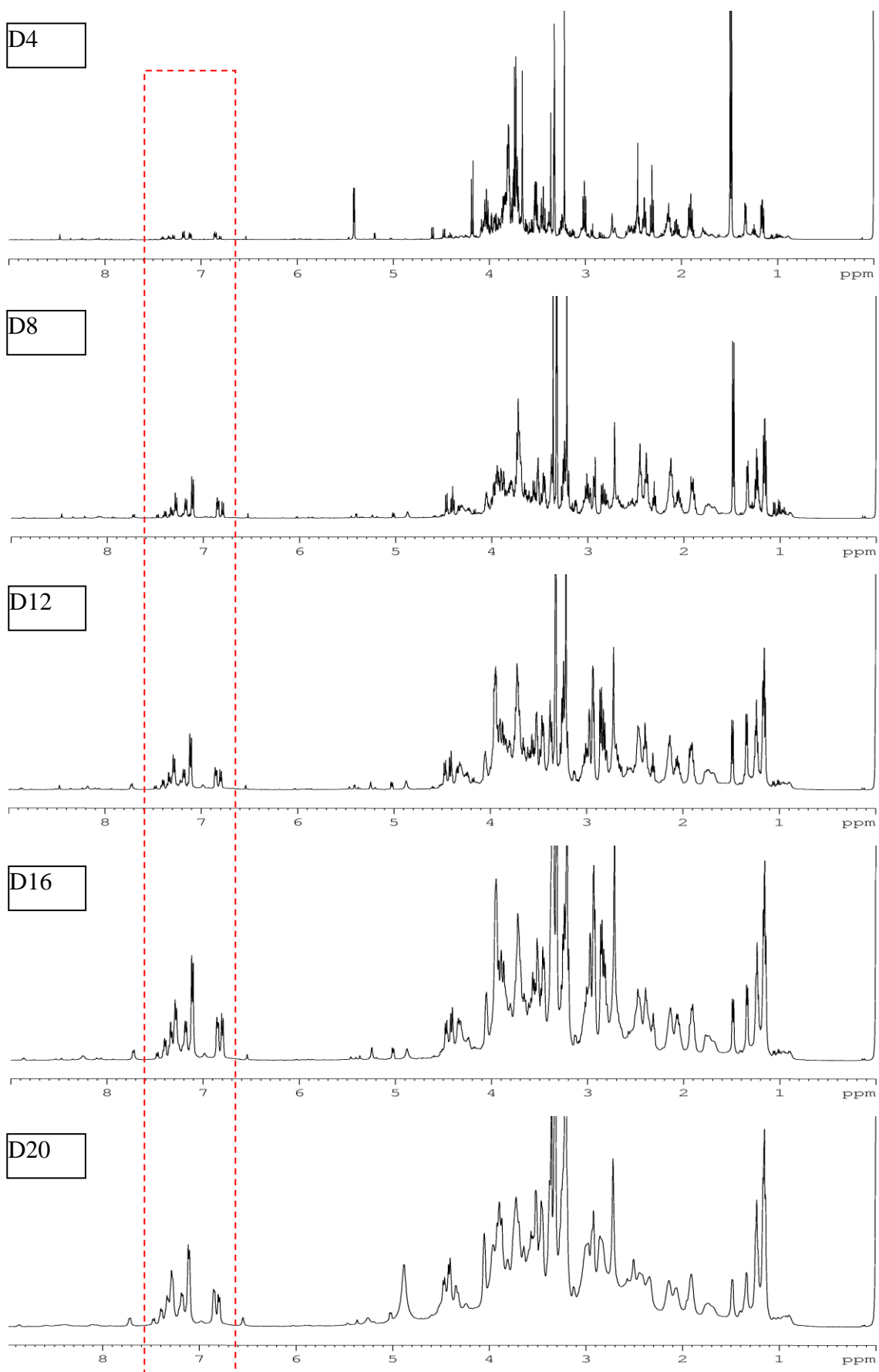

Pokračování Obr. 25: Rozšíření.



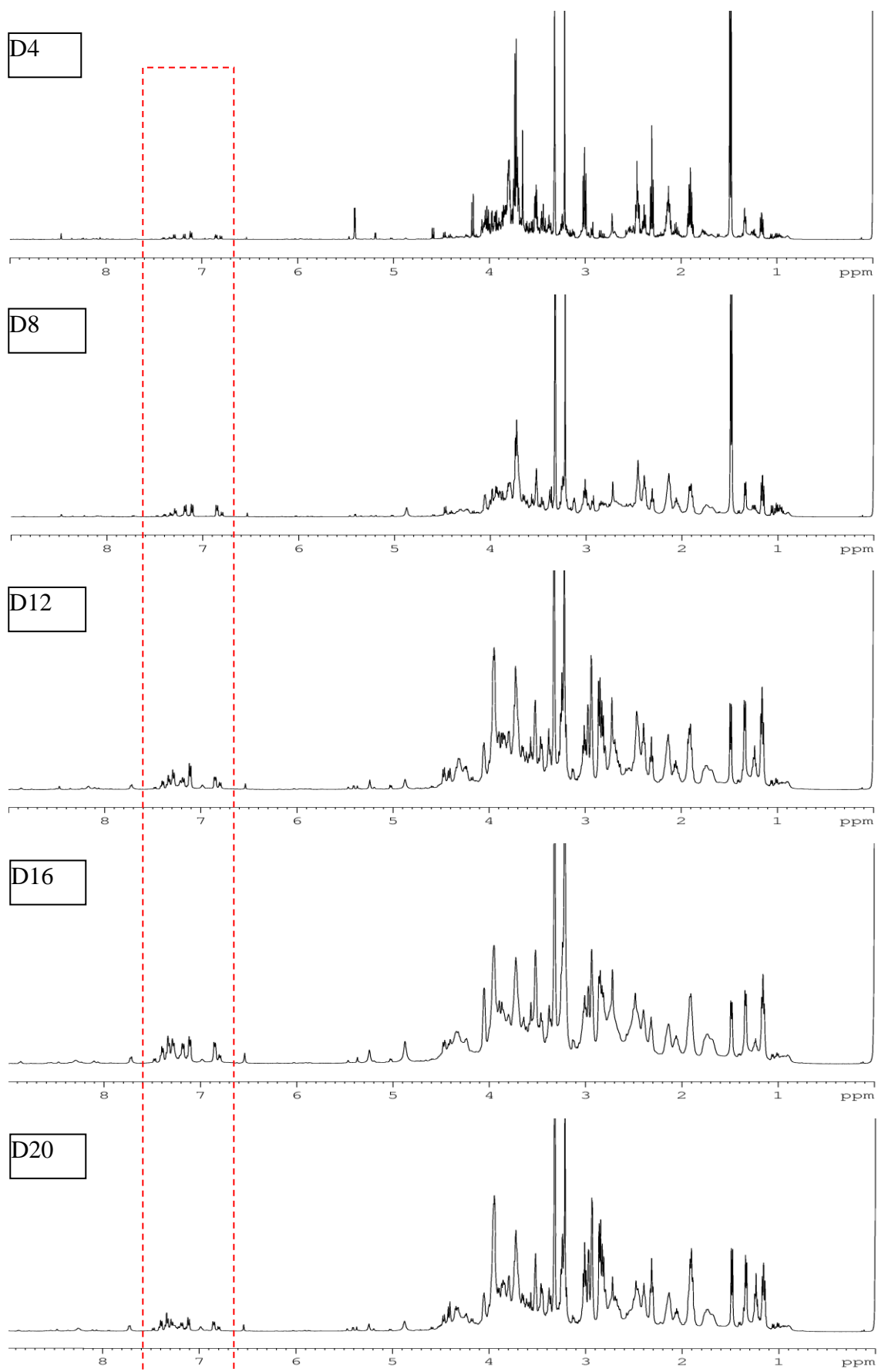
Obr. 26: ^1H NMR. Přehled; GB / kontrola:



Obr. 27: ^1H NMR. Přehled; GB / elicitace jasmonovou kyselinou:



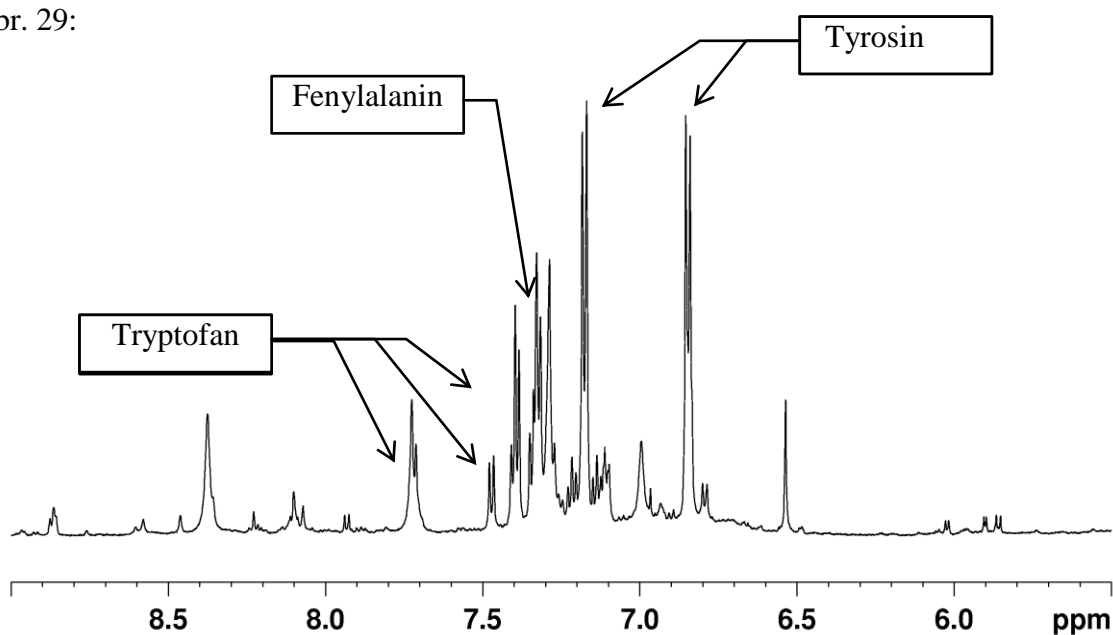
Obr. 28: ^1H NMR. Přehled; GB / elicítace pektinem:



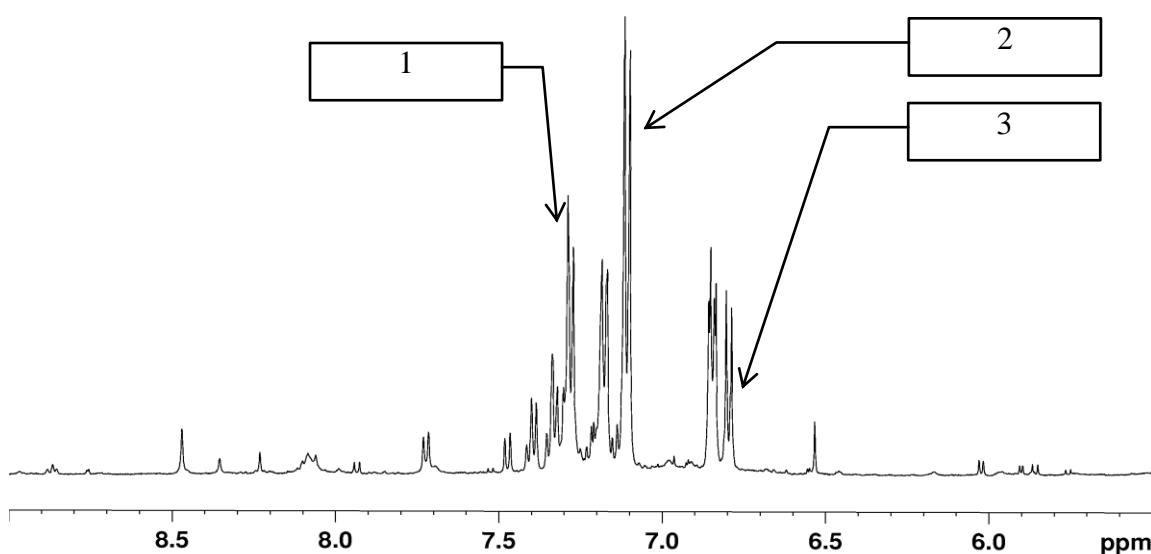
Určení struktury aromatických sloučenin z frakce metanol – voda a z média.

Během elicítace jasmonovou kyselinou bylo pozorováno zvýšení koncentrace aromatických aminokyselin v obou zkoumaných buněčných liniích. K známým signálům tyrosinu, fenylalaninu a tryptofanu (obr. 29) bylo ovšem nutné identifikovat další signály (1,2,3; obr. 30) reagující na elicítaci. Nejprve bylo změřeno 2D NMR HMBC celkového extraktu, které však vzhledem k překryvu signálů nebylo schopné rozlišit, zda jsou „1, 2 a 3“ (obr. 30) jedna či více sloučenin. Před dalším určováním struktury byla použita separační metoda na pevné fázi, přičemž byly získány dvě důležité frakce.

Obr. 29:



Obr. 30:

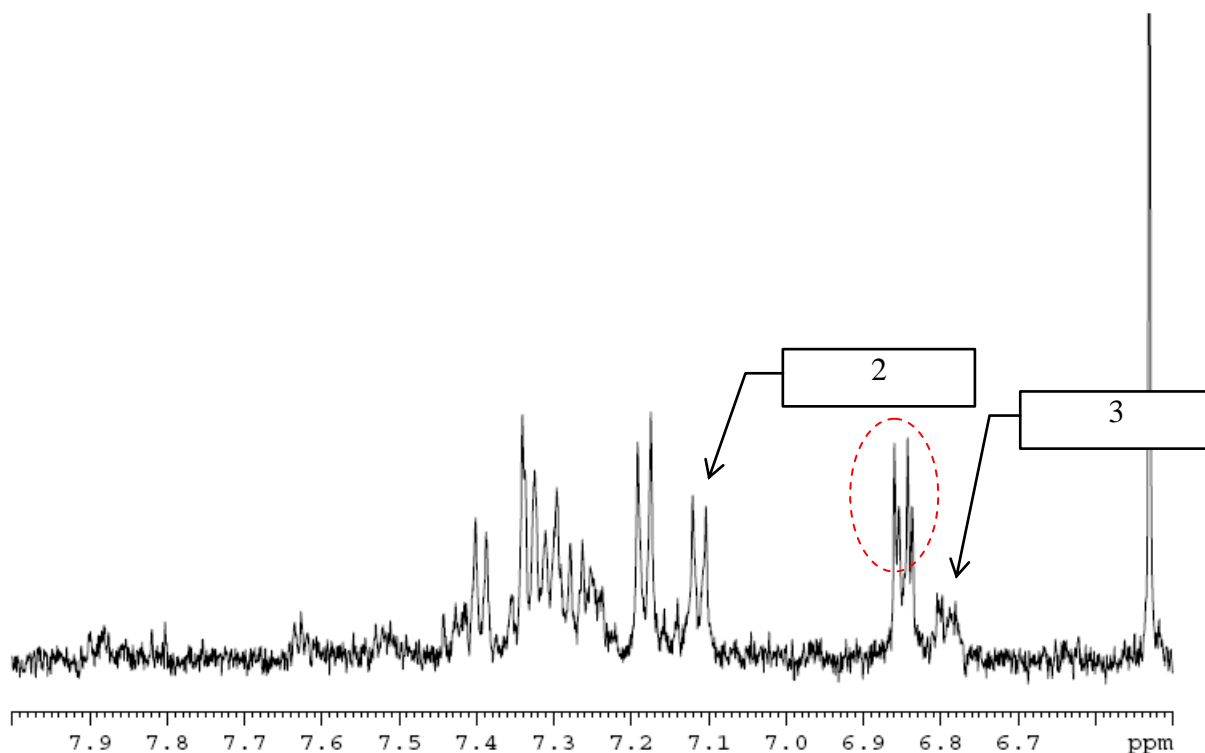


První frakce (obr. 31, eluce vodou) obsahovala fenylalanin a tyrosin, přičemž signál „3“ byl odseparován a signál „2“ zůstal zachován. V druhé frakci (obr. 32, eluce metanol-voda 1:1)

zůstal signál „3“ a ostatní dva signály „1 a 2“. Na základě této separace bylo zjištěno, že signál „2“ je tvořen překryvem dvou dubletů a jedná se o dvě sloučeniny typu *para*-substituovaných benzenových jader ($J = 8.4 \text{ Hz}$). Pro další identifikaci byly použity 2D spektra J-Res (Obr. 33), COSY (Obr. 34) a HMBC.

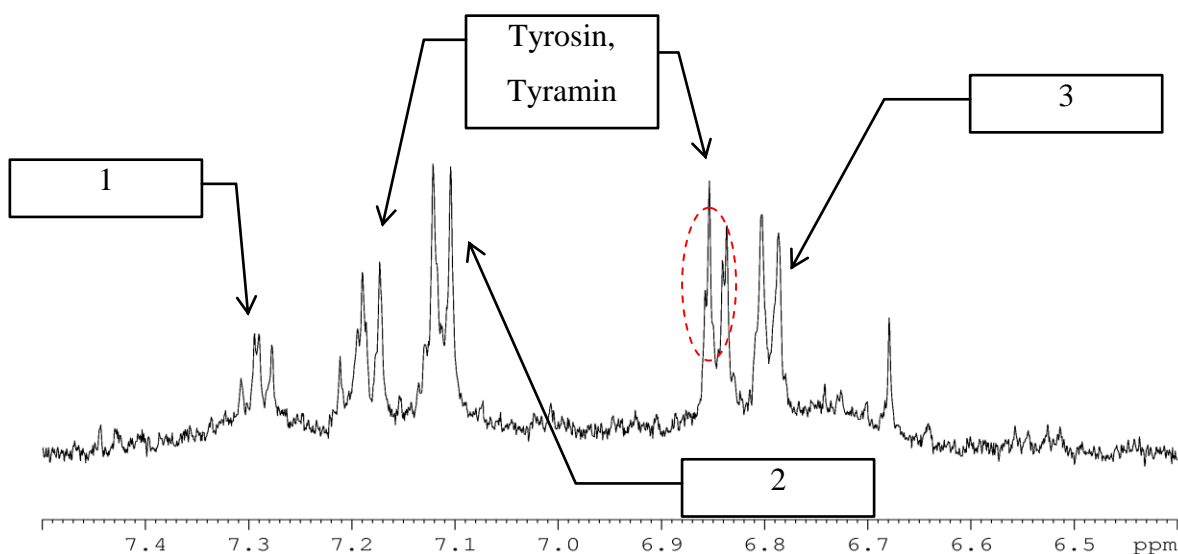
Obr. 31 ($^1\text{H-NMR}$):

Sepak 1 in MD6, Water elution

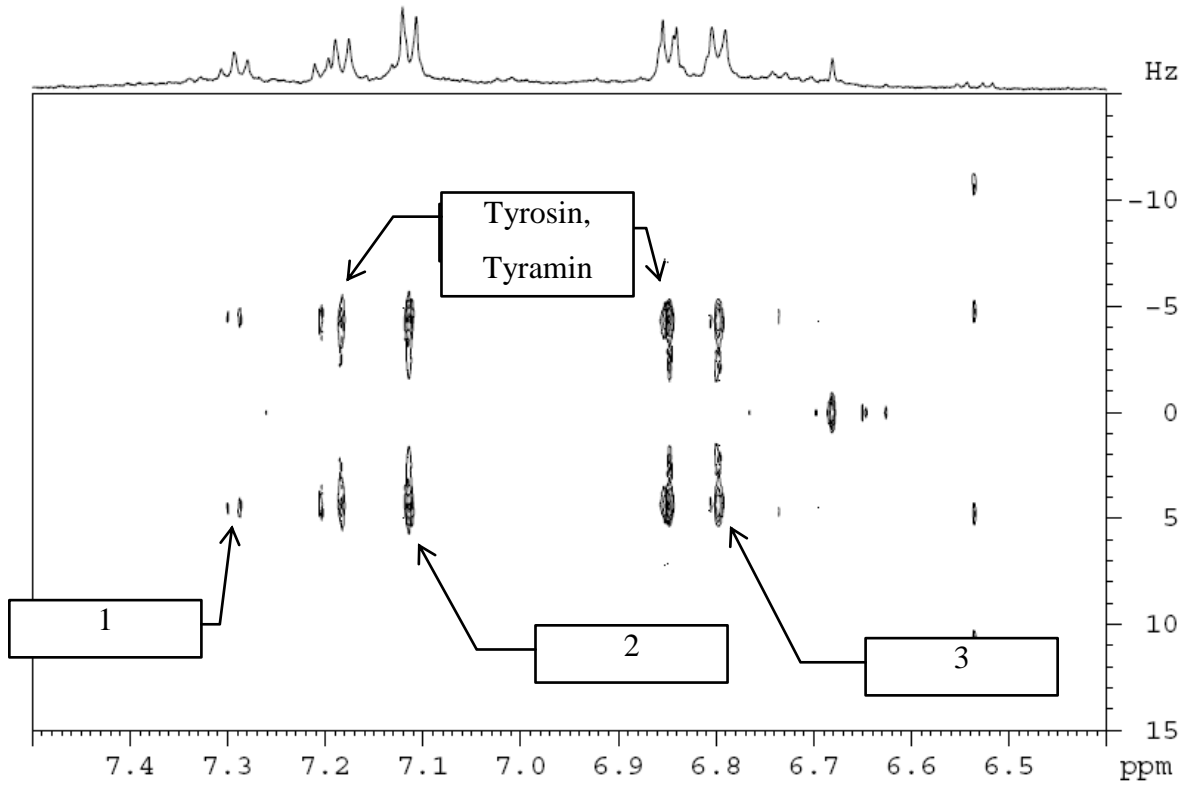


Obr. 32 ($^1\text{H-NMR}$):

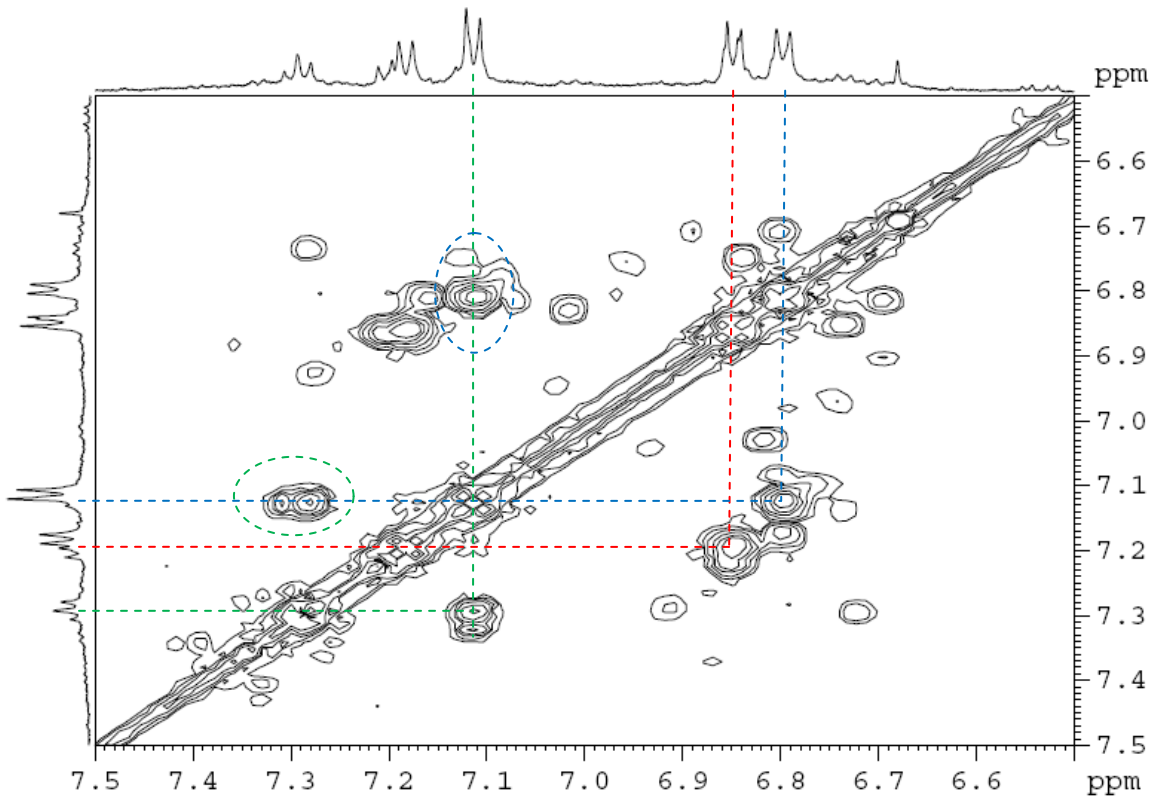
Sepak 2 in MD6, 50% MW elution



Obr. 33 (J-Res pro obr. 32):



Obr. 34 (COSY pro obr. 32):



Byly identifikovány následující metabolity:

- Tyrosin

¹ H-NMR	¹³ C-NMR
6.85 (H-3, H-5, d, 8.4)	119 (C-3, C-5)
7.18 (H-2, H-6, d, 8.4)	133 (C-2, C-6)
	159 (C-4)
	39.9 (C-β)
	60 (C-α)

- na obr. 34 vyznačen červenou barvou;
- překryv signálu δ6.85 s tyramin glykosidem.

- Tyrosol ²⁵⁶⁾

¹ H-NMR	¹³ C-NMR
6.80 (H-3, H-5, d, 8.4)	118 (C-3, C-5)
7.11 (H-2, H-6, d, 8.4)	133 (C-2, C-6)
	157 (C-4)
	37.0 (C-β)

- na obr. 34 vyznačen modrou barvou;
- na obr. 32 označen číslicemi 2 a 3.

- Tyramin

¹ H-NMR	¹³ C-NMR
6.85 (H-3, H-5, d, 8.4)	119 (C-3, C-5)
7.20 (H-2, H-6, d, 8.4)	130 (C-2, C-6)
	159 (C-4)
	35.0 (C-β)

- překryv signálu δ6.85 s tyrosinem.

- Tyramin glykosid

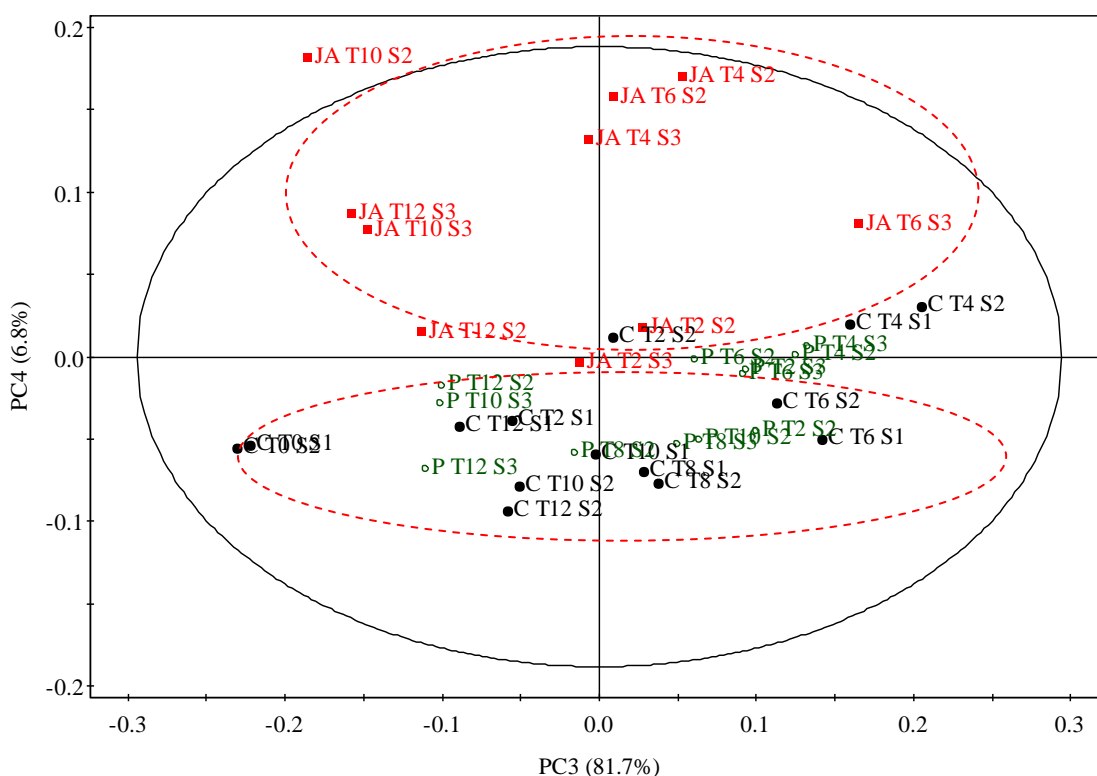
¹ H-NMR	¹³ C-NMR
7.11 (H-3, H-5, d, 8.4)	120 (C-3, C-5)
7.29 (H-2, H-6, d, 8.4)	130 (C-2, C-6)
	160 (C-4)
	35.0 (C-β)
5.02 (d) HMBC link na ¹³ C δ161ppm odpovídající uhlíku s navázanou fenolickou skupinou.	

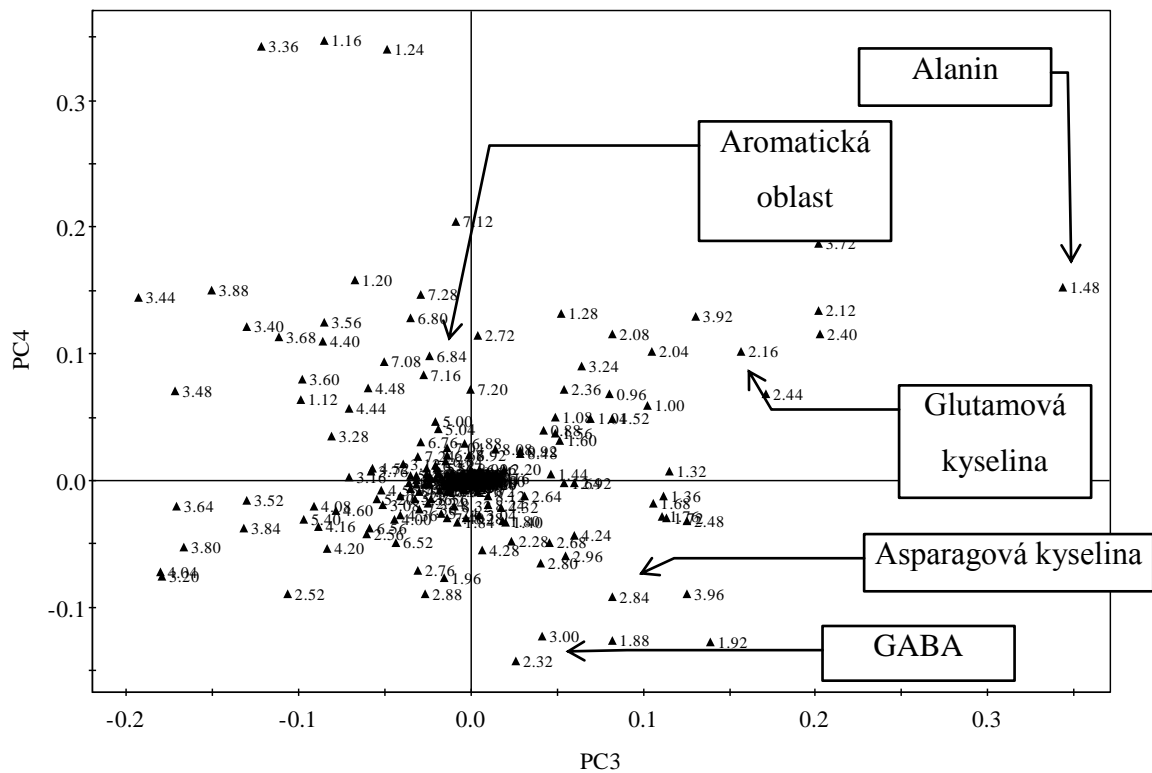
- na obr. 34 vyznačen zelenou barvou;
- na obr. 32 označen číslicemi 1 a 2.

Dále byla provedena PCA analýza. Separace elicitace jasmonovou kyselinou byla dosažena s využitím PC4 (obr. 35) a dále byl sestrojen sloupcový loading diagram této komponenty (obr. 37). Jasmonová kyselina opět výrazně zasáhla do metabolismu aromatických aminokyselin, zejména tyrosinu, tyrosolu a tyraminu, jejichž koncentrace byla zvýšena. Druhá použitá komponenta PC3 (obr. 36) dále rozdělila set vzorků podle časové

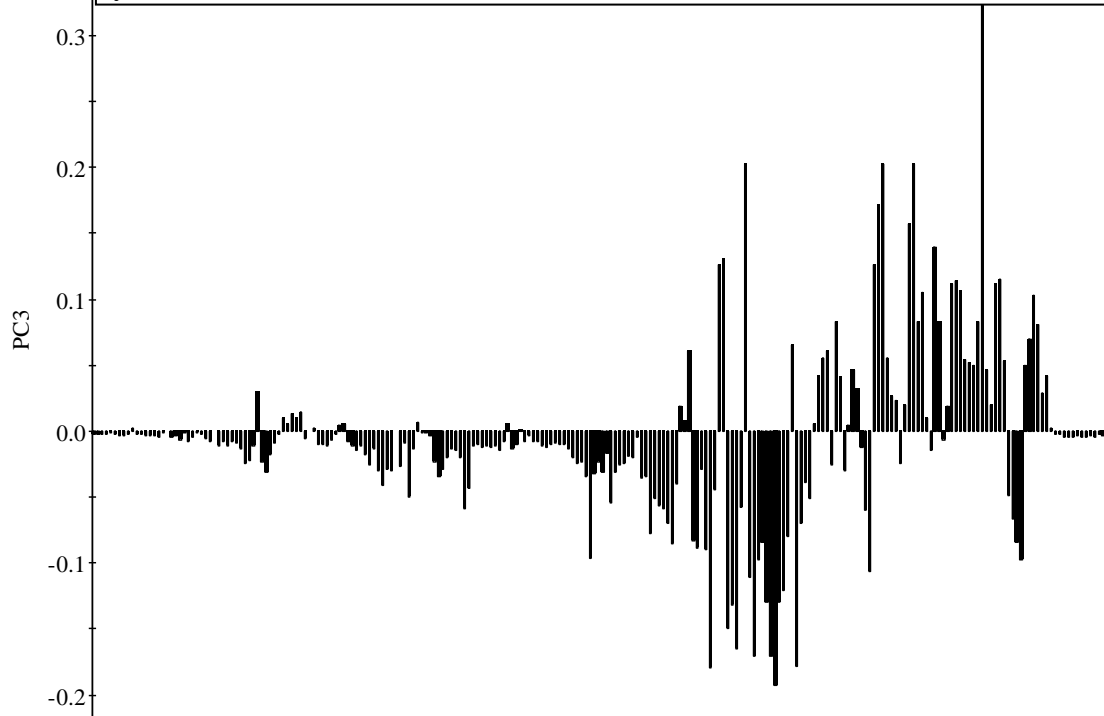
posloupnosti, kdy mladší kultury obsahovaly alifatické aminokyseliny alanin, valin nebo glutamovou kyselinu a u starších došlo k přesunu na aromatické aminokyseliny (tyrosin, fenylalanin, tryptofan a také tyrosol a tyramin). Kyselina asparagová a GABA pak byly charakteristické pro kontrolní vzorky a elicítaci pektinem, které ovšem nejsou dále rozdílné. Tak jako u GC kultury je také u GB elicítované jasmonovou kyselinou přítomný etanol glukosid. S využitím komponent PC2 a PC3 (obr. 38) bylo dosaženo separace elicítace jasmonovou kyselinou v závislosti na signálu tyrosolu, který byl dominantnější než v případě GC linie. Pro kontrolní vzorky po inokulaci je charakteristický signál alaninu ($\delta 1.24$).

Obr. 35: Skóre a loading diagram linie GB elicítované pektinem nebo jasmonovou kyselinou s kontrolou (PC 3 – 4).

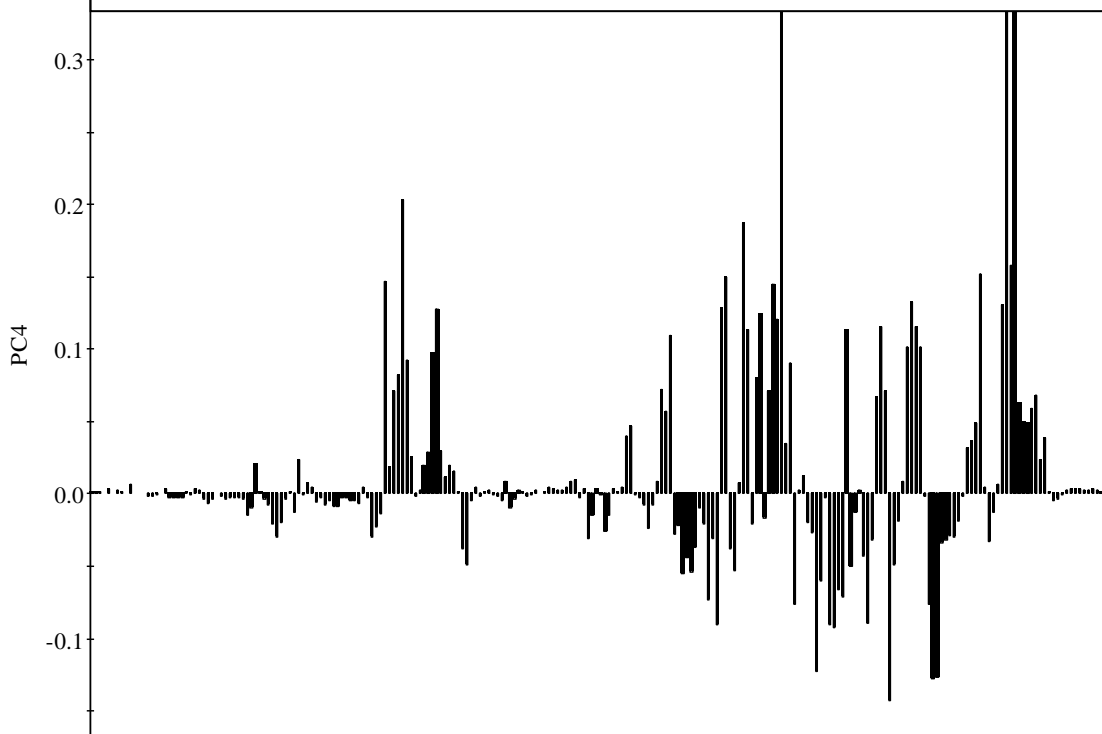




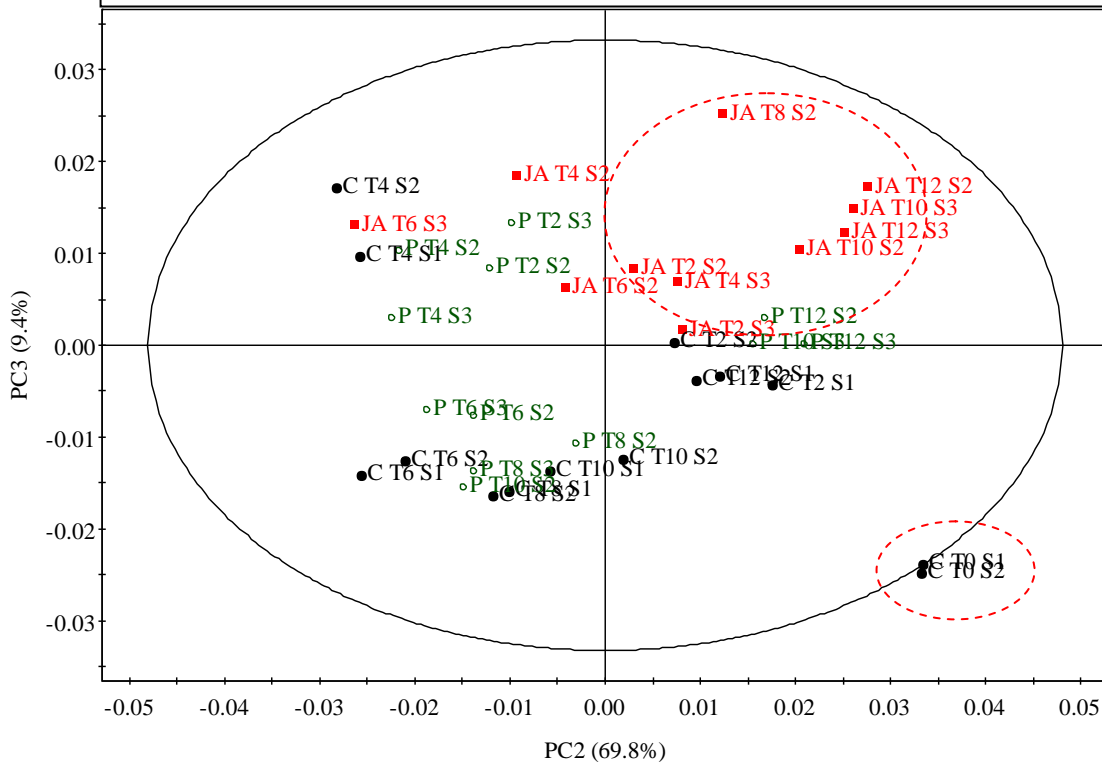
Obr. 36: Sloupcový loading diagram PC3; GB elicovaná pektinem a jasmonovou kyselinou s kontrolou.

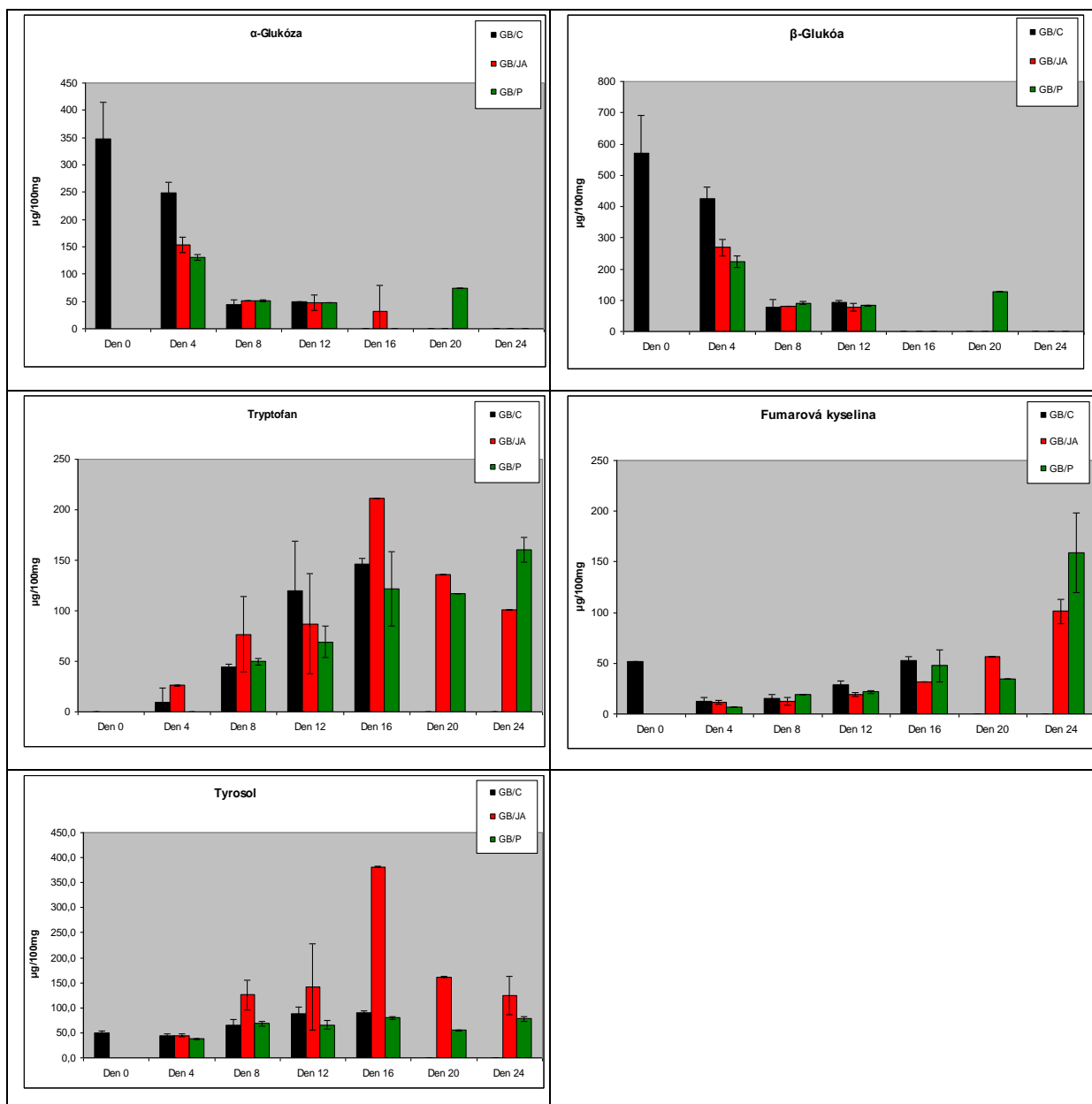


Obr. 37: Sloupcový loading diagram PC4; GB elicitovaná pektinem a jasmonovou kyselinou s kontrolou.



Obr. 38: Skóre a loading diagram linie GB elicitované pektinem nebo jasmonovou kyselinou s kontrolou (PC 2 – 3).





Vzhledem ke kvantifikaci byly zjištěny analogické výsledky jako u linie GC. Alanin byl hlavním metabolitem exponenciální fáze růstu a threonin s asparagovou kyselinou byly produkovány ve stacionární fázi. Avšak u asparagové kyseliny i threoninu došlo u ubou elicítací k nárůstu koncentrace po 20. dni kultivace. V koncentraci sacharózy a glukózy nebyly zjištěny žádné výrazné rozdíly. Fumarová kyselina byla také akumulována v terminálních stádiích růstu. Změna byla zaznamenána u aromatických sloučenin (zejména tyrosin, tyrosol, tyramin a fenylalanin), jejichž koncentrace byla v porovnání s kulturou GC vyšší v buněčném materiálu. V návaznosti na studiu metabolitů v médiu (viz. níže) byla zjištěna exkrece aromatických látek kulturou GC do média (především tyrosin, tyrosol a tyramin), přičemž u kultury GB k tomuto transportu nedocházelo.

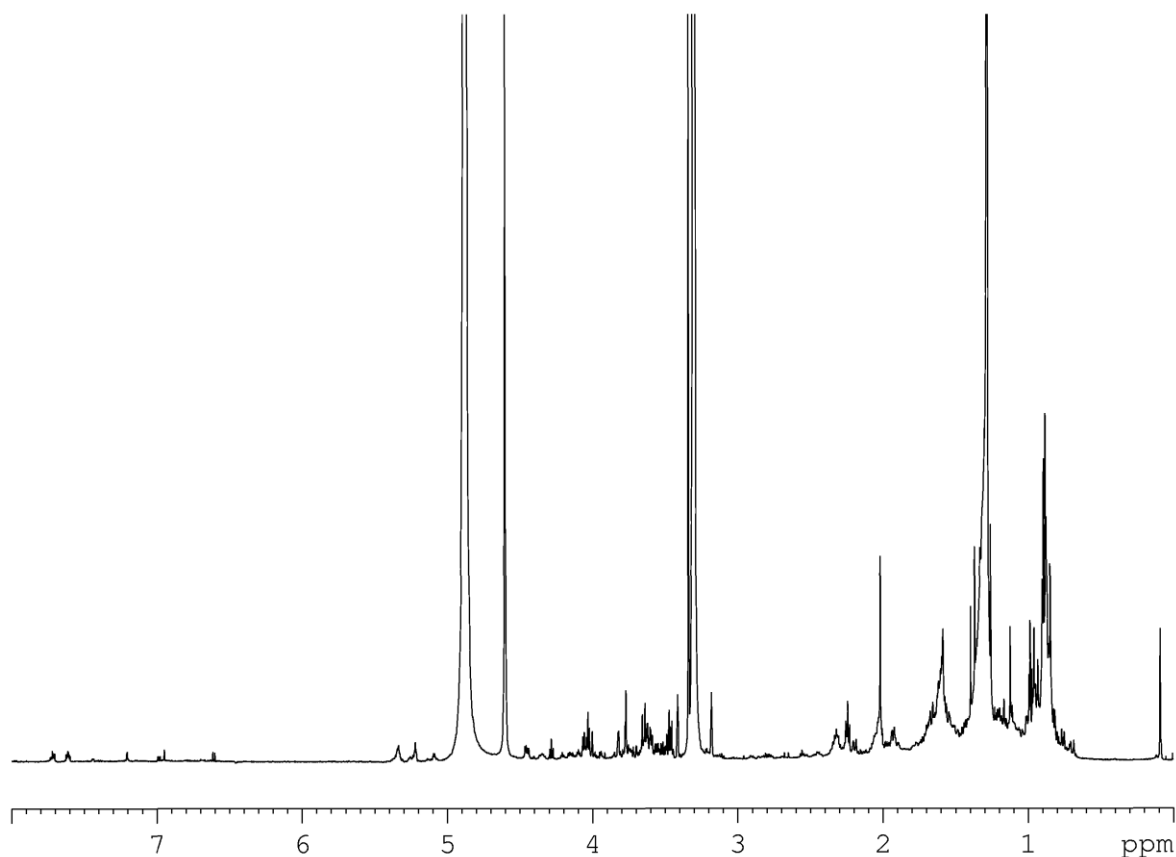
3. Frakce média

Obě kultury jsou posuzovány současně, vzhledem k podobnému spektru metabolitů. U frakce média bylo nezbytné velice přesné zarovnání základní linie u NMR spekter, tak aby nedocházelo k falešným výsledkům u PCA analýzy. Na obrázcích 47 – 50 jsou uvedeny přehledy ^1H NMR pro frakci médium.

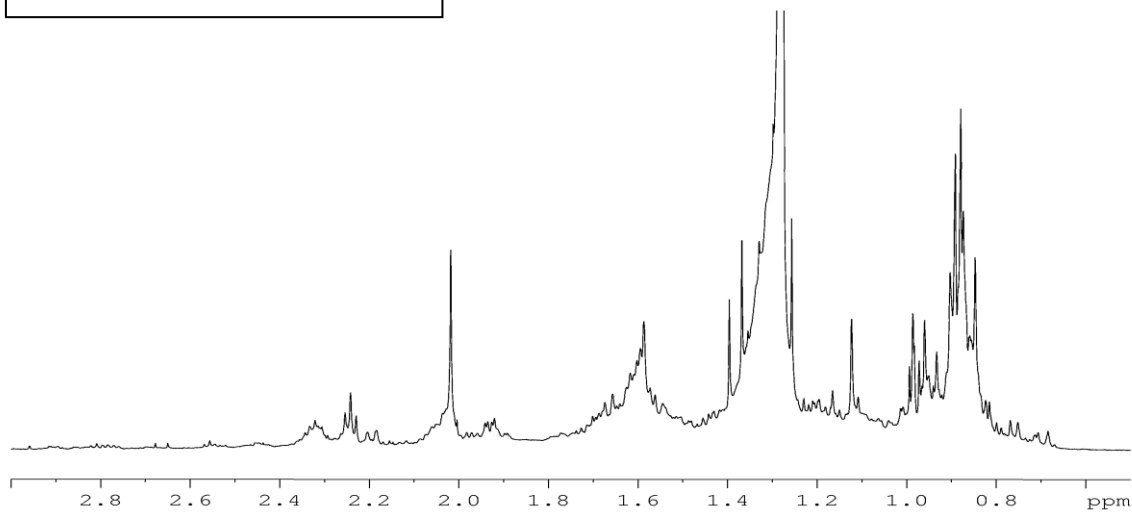
Byly identifikovány 3 významné oblasti spekter, u kterých byla určena chemická struktura:

- 1) Byla identifikována kyselina gentisová (2,5-dihydroxybenzoová) (obr. 40, 41, 42), která byla přítomná v médiu po celou dobu kultivace, avšak nereagovala na elicítace. V extraktu z buněčného materiálu nebyla identifikována.

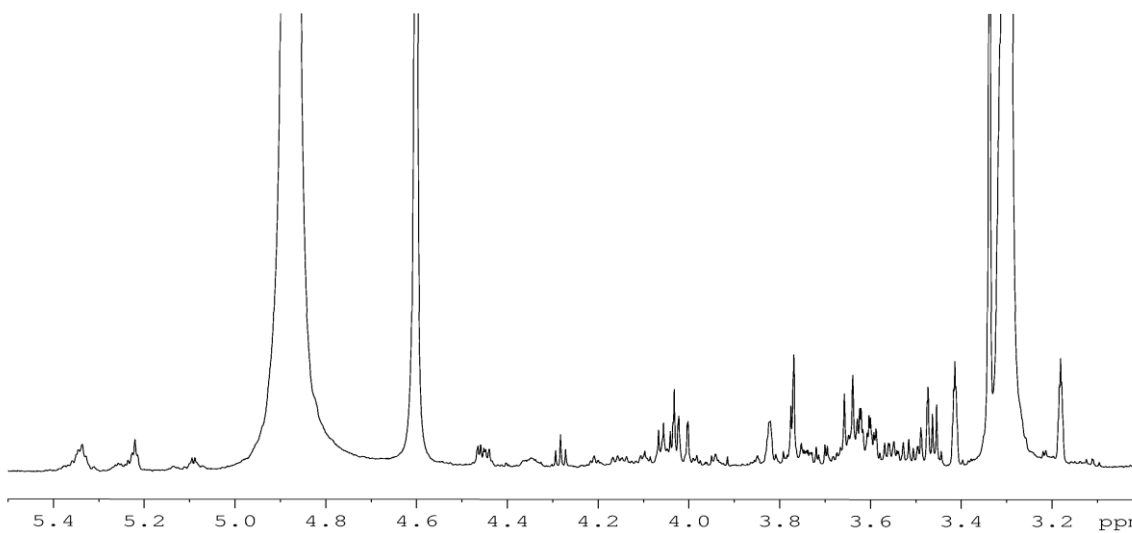
Obr. 40: ^1H NMR. Frakce média; linie GB; elicítace pektinem. Souhrn vzorků z dnů 4, 8, 12.



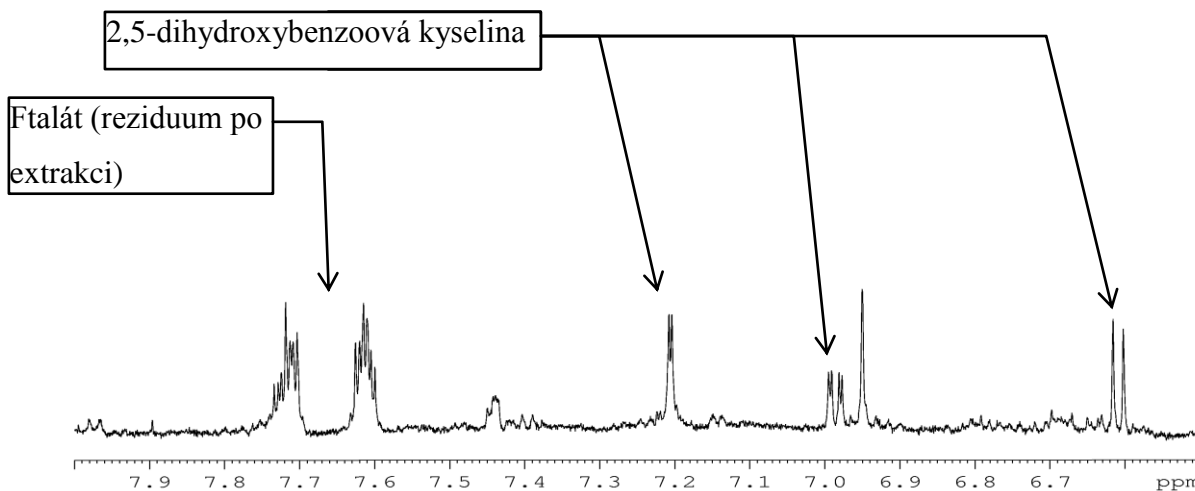
Pokračování Obr. 40: Rozšíření.



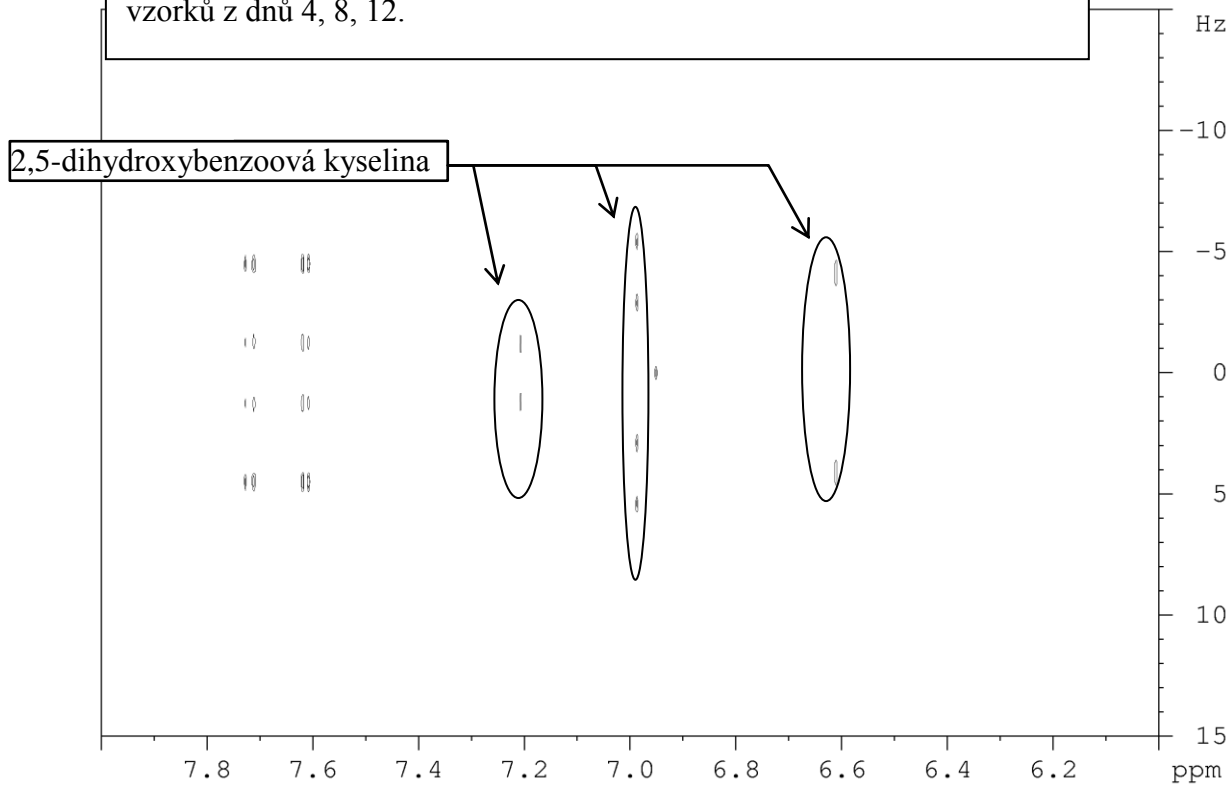
GB/P T2,4,6 Medium in MeOD
h-NEW MeOD /opt/topspin nmrafd 1



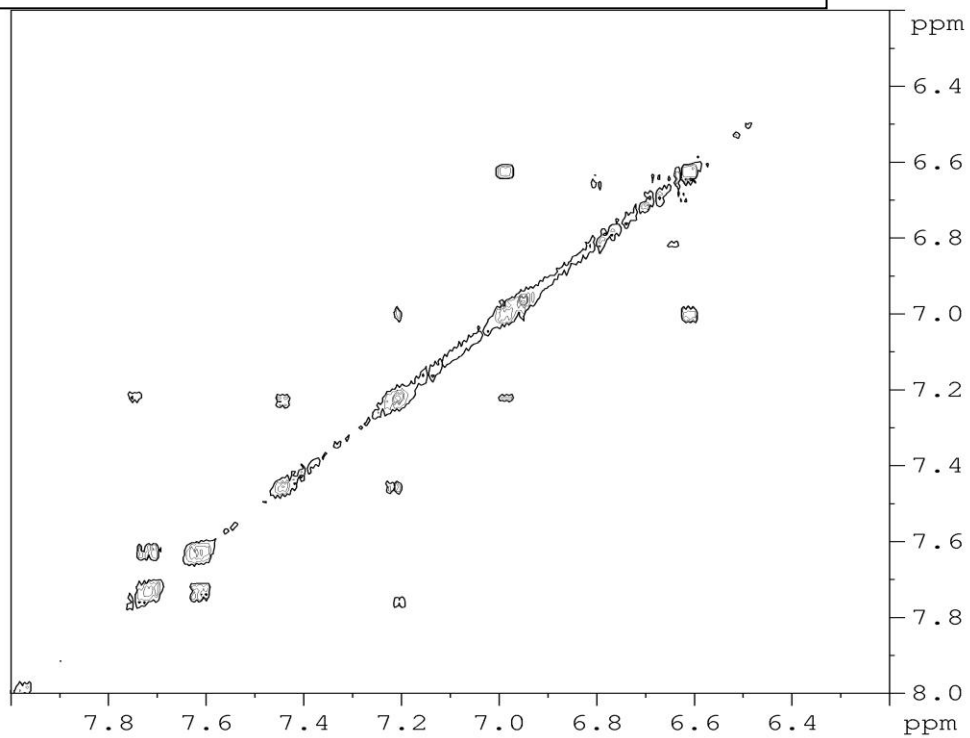
GB/P T2,4,6 Medium in MeOD
h-NEW MeOD /opt/topspin nmrafd 1



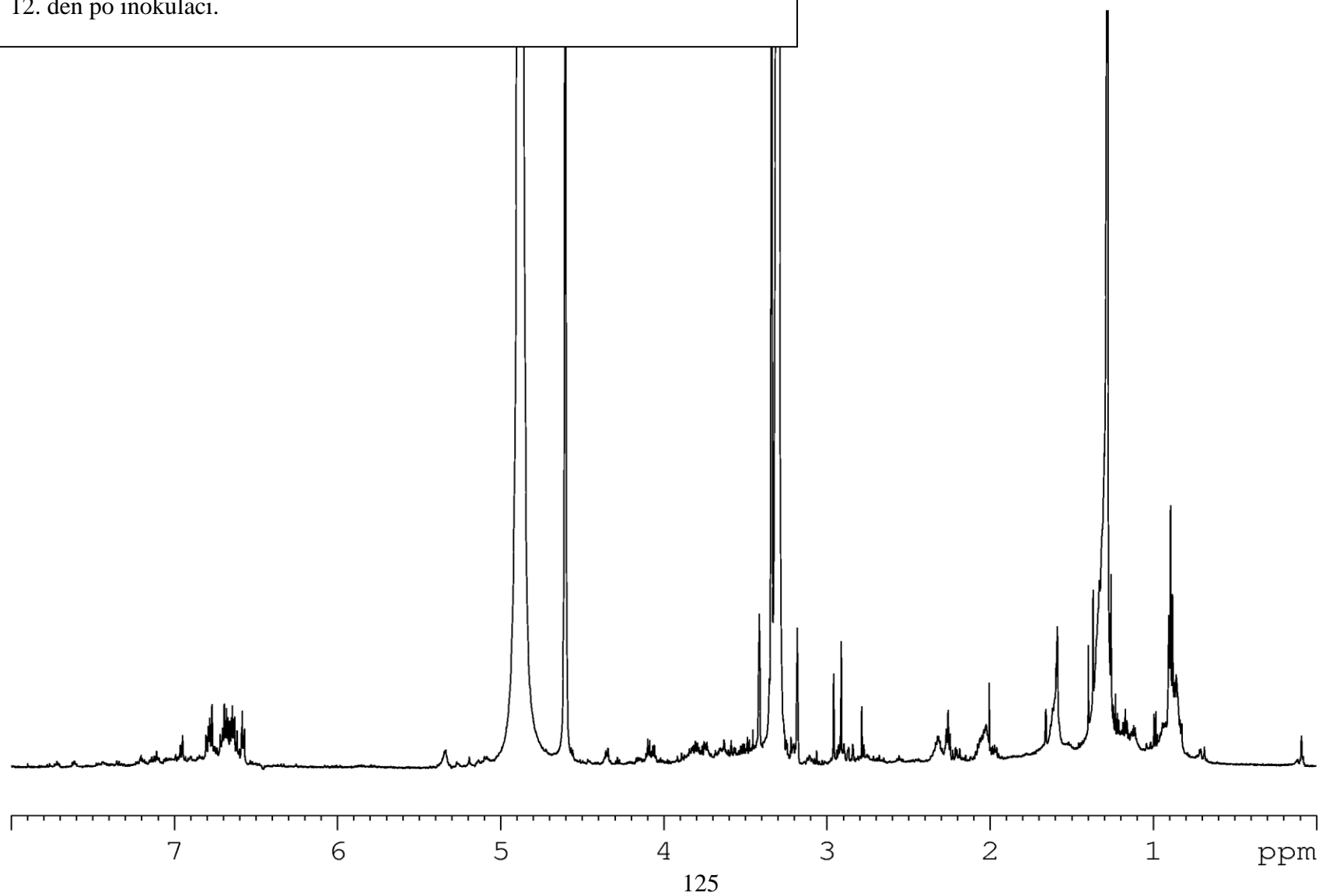
Obr. 41: J-Res NMR. Frakce média; linie GB; elicítace pektinem. Souhrn vzorků z dnů 4, 8, 12.



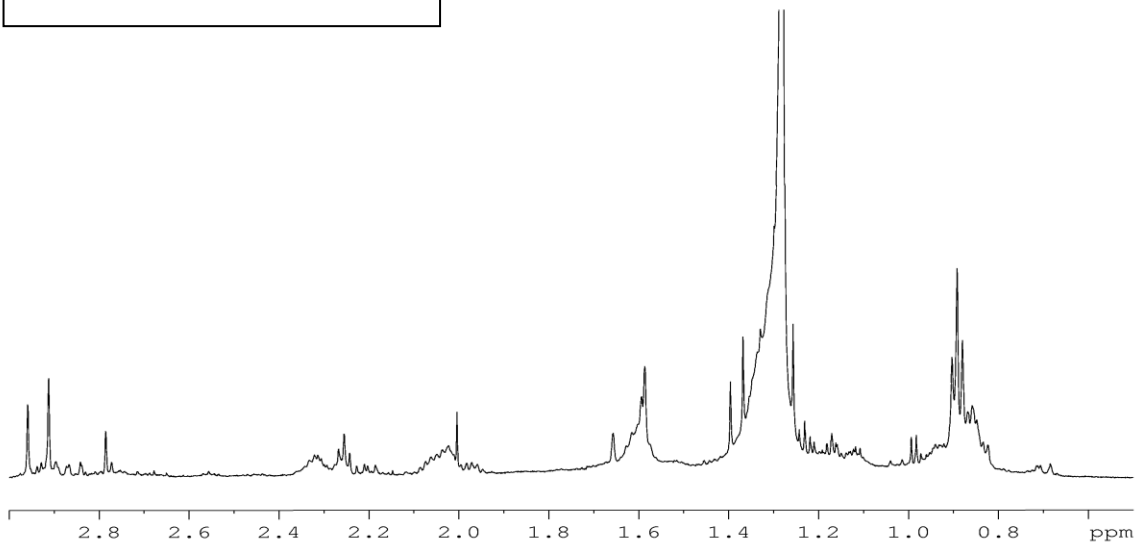
Obr. 42: COSY NMR. Frakce média; linie GB; elicítace pektinem. Souhrn vzorků z dnů 4, 8, 12.



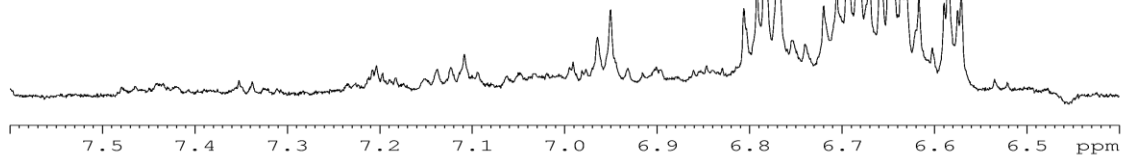
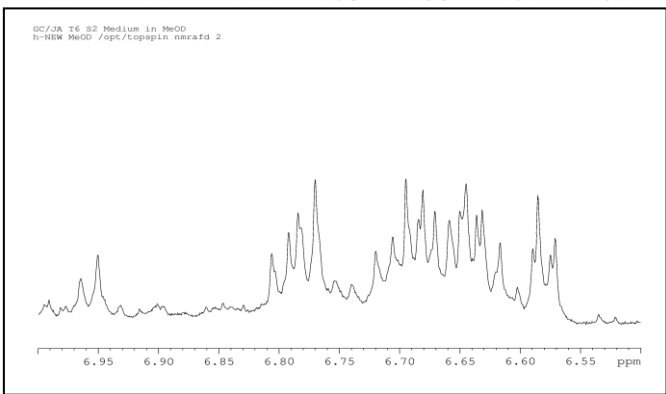
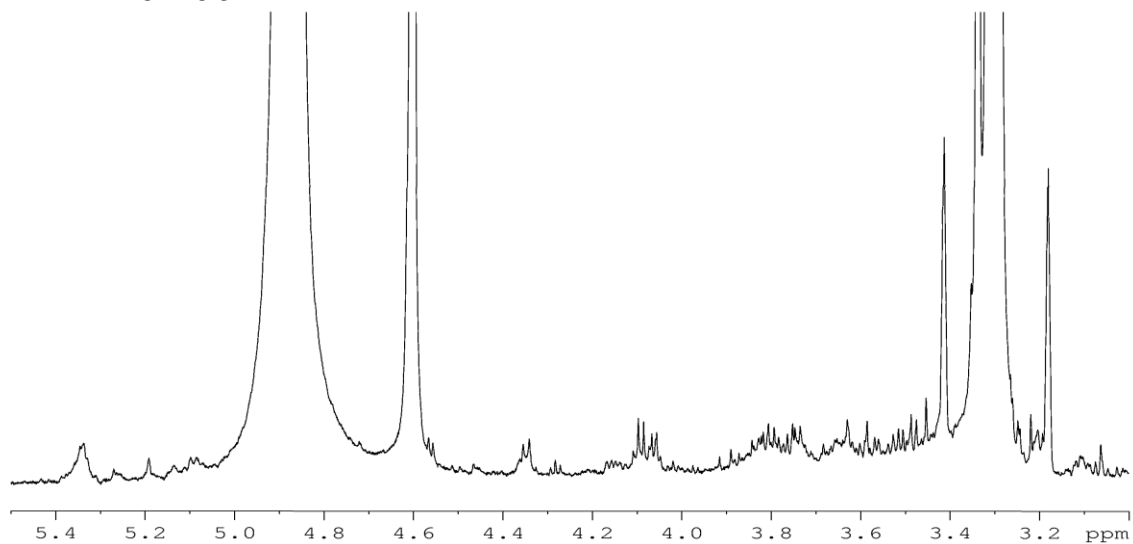
Obr. 43: ^1H NMR. Frakce média; linie GB; elicítace jasmonovou kyselinou.
12. den po inokulaci.



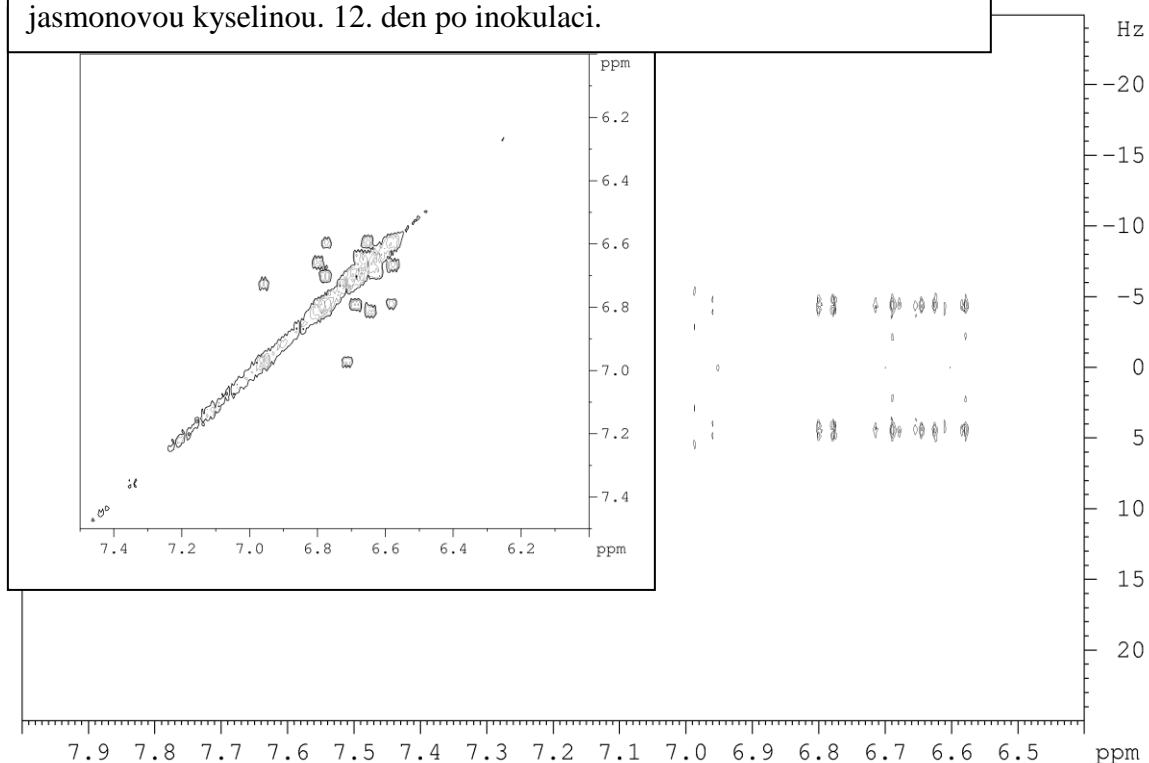
Pokračování Obr. 43: Rozšíření.



GC/JA T6 S2 Medium in MeOD
h-NEW MeOD /opt/topspin nmrfd 2



Obr. 44: J-res a COSY NMR. Frakce média; linie GB; elicítace jasmonovou kyselinou. 12. den po inokulaci.



- 2) Oblast $\delta 6.55 - \delta 6.80$ $^1\text{H-NMR}$ spektra média (obr. 43) byla významným impulzem pro identifikaci struktury, vzhledem ke komplexnosti signálu předpokládající strukturu sekundárního metabolitu. Ovšem po analýze 2D NMR spektry (J-Res, COSY, HSQC a HMBC) byla identifikována sada pěti vždy dvou navzájem korelovaných dubletů (obr. 44), odpovídající interakční konstantou *para*-substituovaným benzenovým jádrům. Po studiu HSQC a HMBC spekter byly tyto dublety přiřazeny již identifikovaným aromatickým sloučeninám z frakce metanol-voda. Jedná se o tyrosol, tyrosin a tyramin a dva další metabolity blíže nespécifikované kvůli nízké koncentraci v extraktu. Důležitým zjištěním byla exkrece těchto metabolitů kulturou GC do média, čímž se částečně snížila koncentrace v extraktech z buněčného materiálu (viz. výše). Na druhou stranu linie GB nevyučovala tyto metabolity do média, a tím se zachovala zvýšená koncentrace v buněčném materiálu. Tento transport je pravděpodobně nedílnou součástí jednotlivých kultur, přičemž elicítací a zvýšením aromatických sloučenin došlo pouze k zviditelnění tohoto efektu. Podobný jev byl sledován také ve vzorcích elicítovaných pektinem, ovšem v menším rozsahu. U kontrolních souborů nebyl tento transport pozorován vzhledem k nízkým koncentracím aromatických látek.

Pozn: Mezi frakcí média a metanol-voda nelze přímo srovnávat chemický posun jednotlivých metabolitů, kvůli použití dvou různých rozpouštědel.

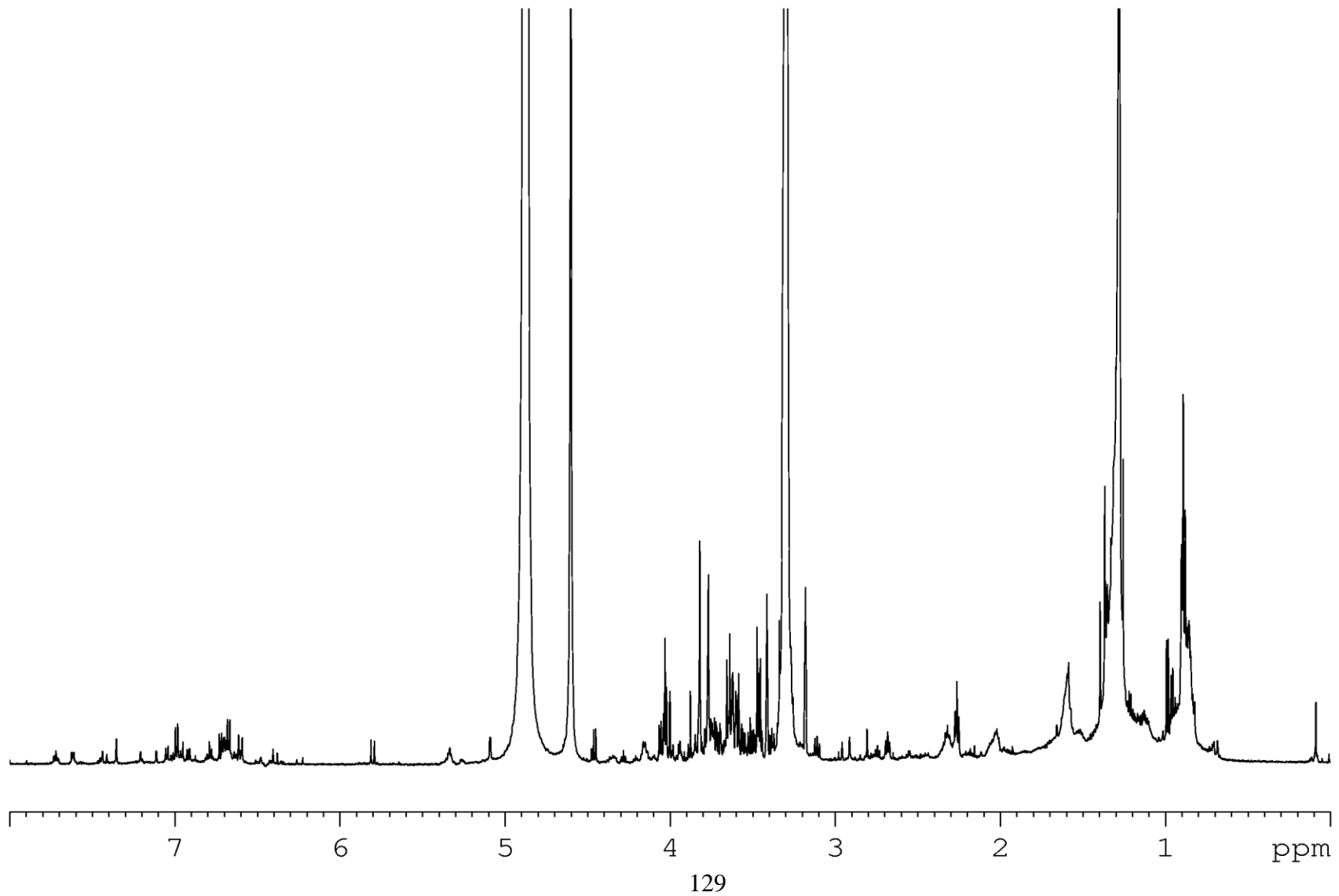
V následujícím přehledu jsou shrnuty jednotlivé identifikované metabolity:

- ^1H NMR byla ověřena pomocí J-Res a COSY, ^{13}C data pomocí HSQC a jsou uvedeny nalezené vazby v rámci HMBC. Všechny dublety mají stejnou interakční konstantu $J = 8.4$ Hz, která odpovídá aromatickým aminokyselinám z frakce metanol-voda.

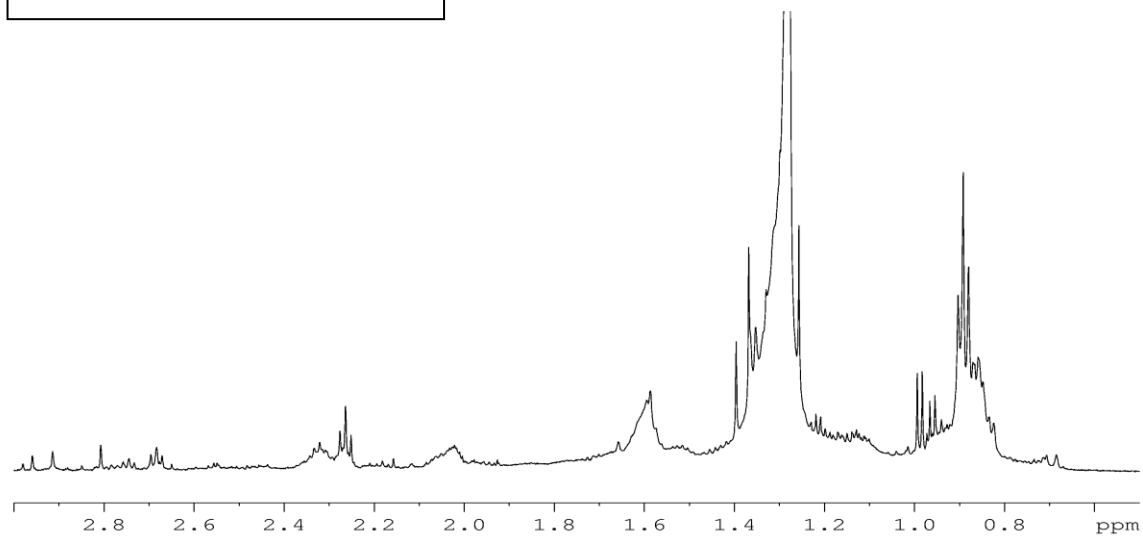
1. ^1H (6.58, 6.64)... ^{13}C (115.4, 130.4) ... HMBC ^{13}C (156.5) ... Tyrosol
2. ^1H (6.62, 6.80)... ^{13}C (115.7) ... HMBC ^{13}C (158.0) ... Tyrosin
3. ^1H (6.69, 6.78)... ^{13}C (115.9, 129.8) ... HMBC ^{13}C (157.0) ... Tyramin
4. ^1H (6.71, 6.95)... ^{13}C (130.4) ... HMBC ^{13}C (154.0)
5. ^1H (6.77, 6.58)... HMBC ^{13}C (157.0)

- 3) Jako poslední byly v kultuře GB (ne v GC) identifikovány signály blíže nespécifikovaného fenylypropanu (obr. 45, 46) a to na základě výrazného signálu konjugované dvojné vazby s aromatickým jádrem, typickým pro tento typ sloučenin. Tyto signály jsou pouze u GB kultur do 4. dne po inokulaci a poté již nebyly detekovány. Podle komplexnosti signálu se jedná o směs sloučenin, které ovšem nereagovaly na elicitace.

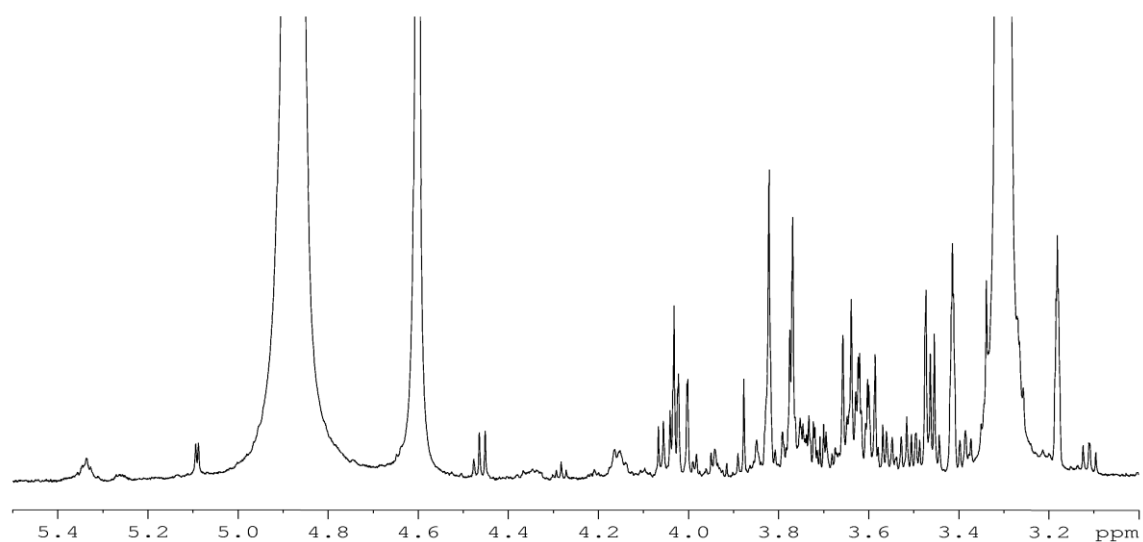
Obr. 45: ^1H NMR. Frakce média; linie GB; kontrola. 2. den po inokulaci.



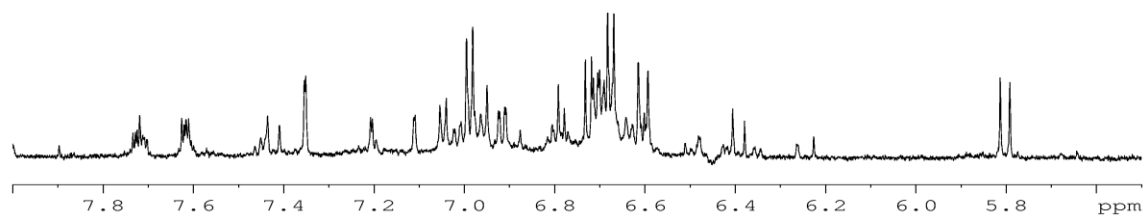
Pokračování Obr. 45: Rozšíření.



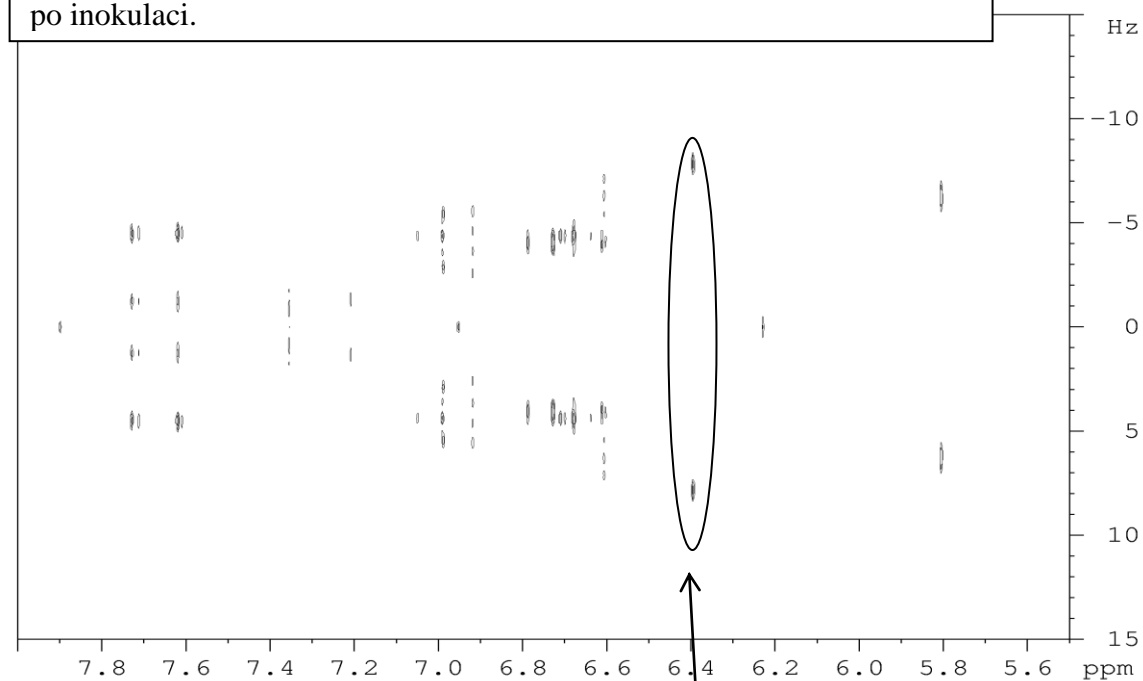
GB/C T1 S1 Medium in MeOD
h-NEW MeOD /opt/topspin nmrafd 3



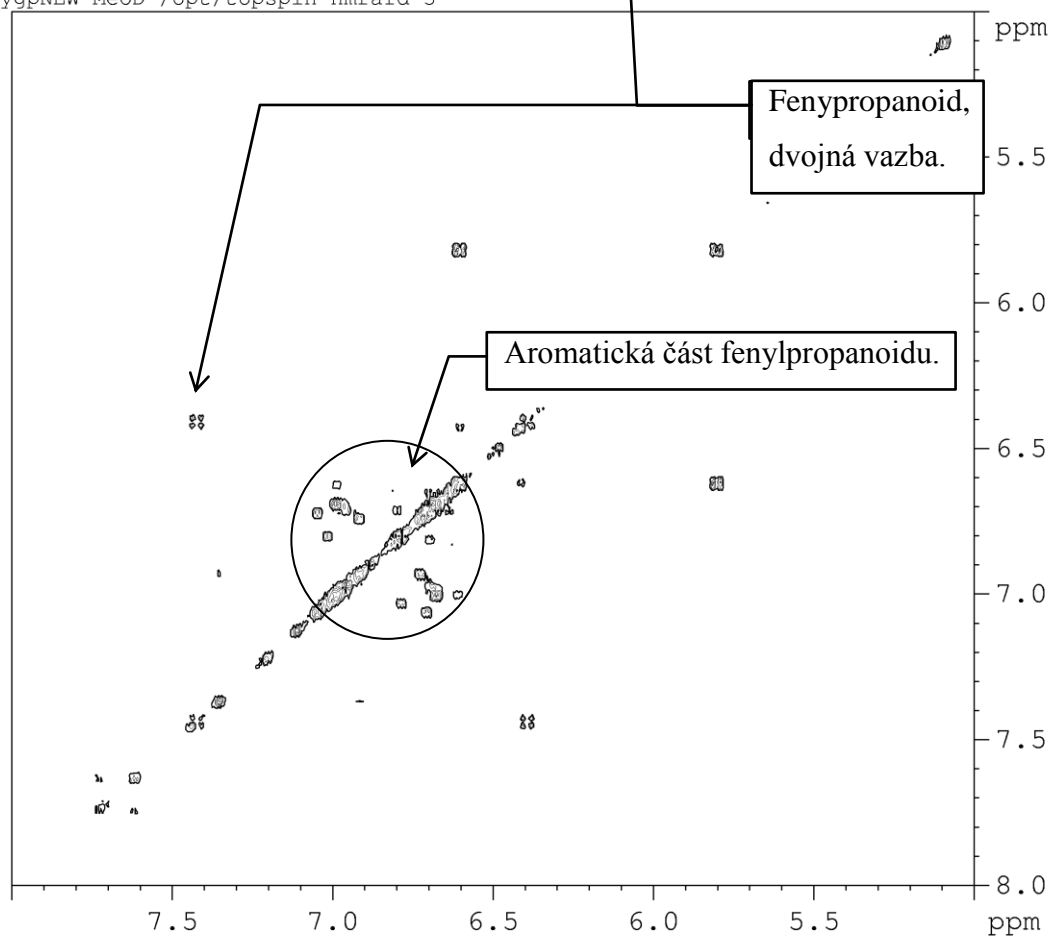
GB/C T1 S1 Medium in MeOD
h-NEW MeOD /opt/topspin nmrafd 3



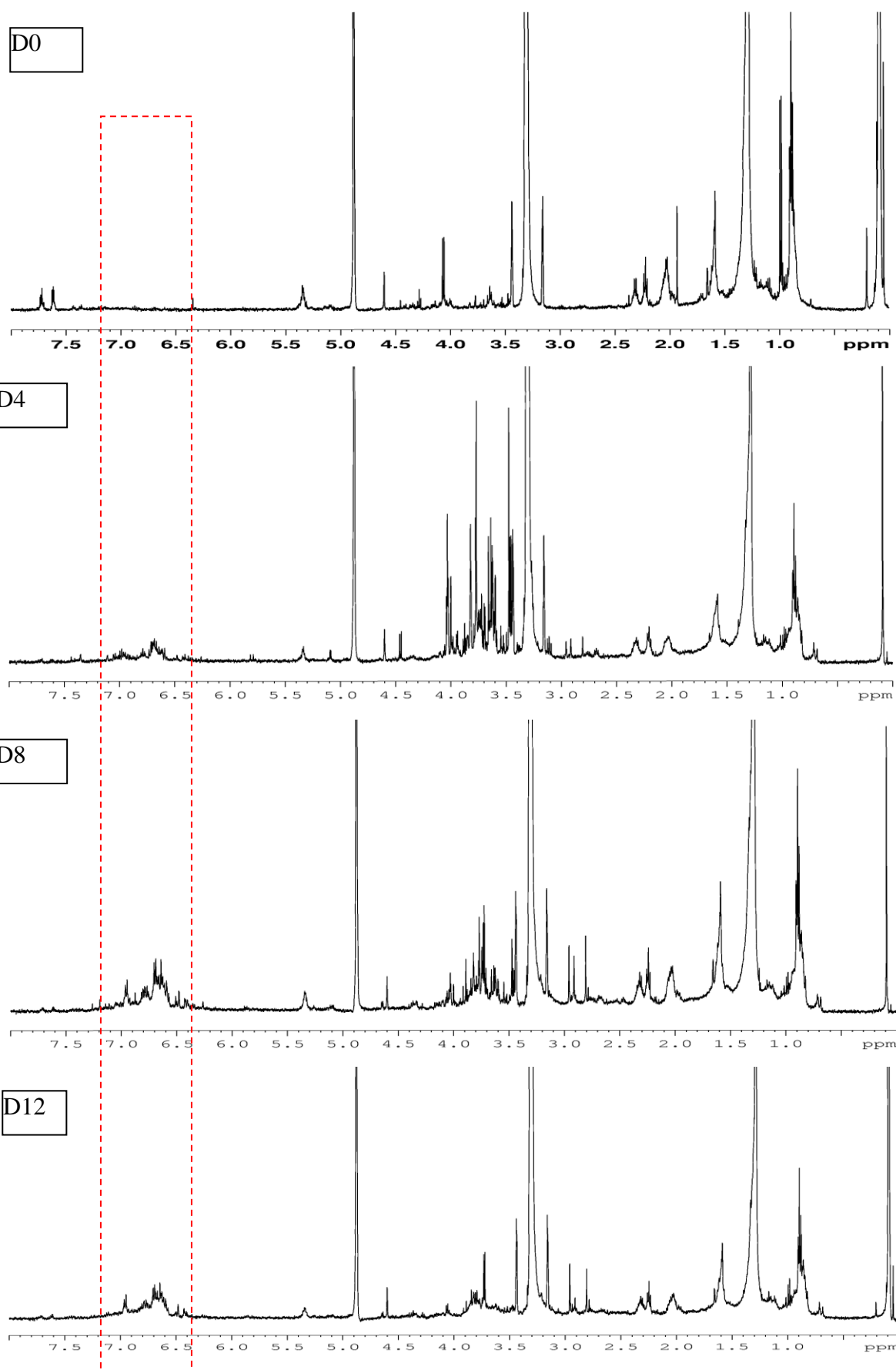
Obr. 46: J-Res a COSY NMR. Frakce média; linie GB; kontrola. 2. den po inokulaci.



l-cosygpNEW MeOD /opt/topspin nmrafd 3

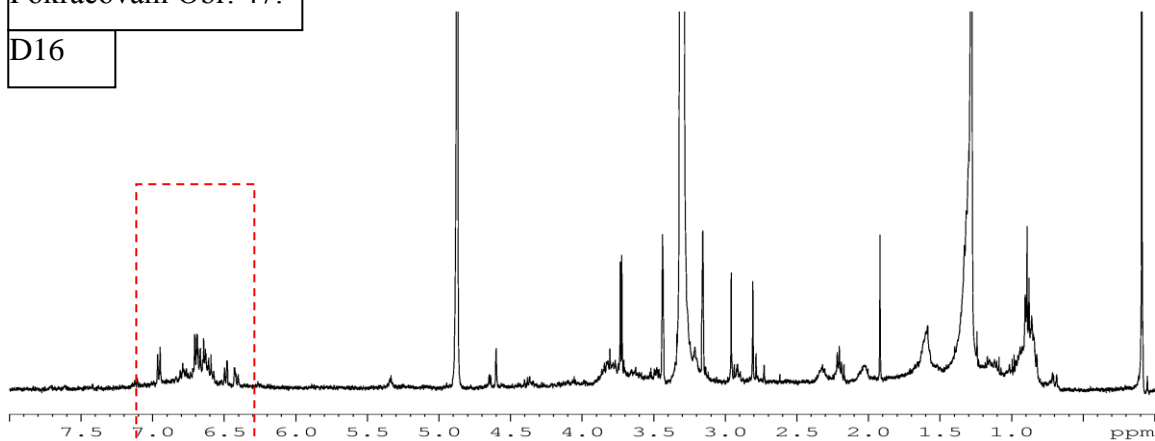


Obr. 47: ^1H NMR. Přehled; GC / kontrola z elicítace pektinem:

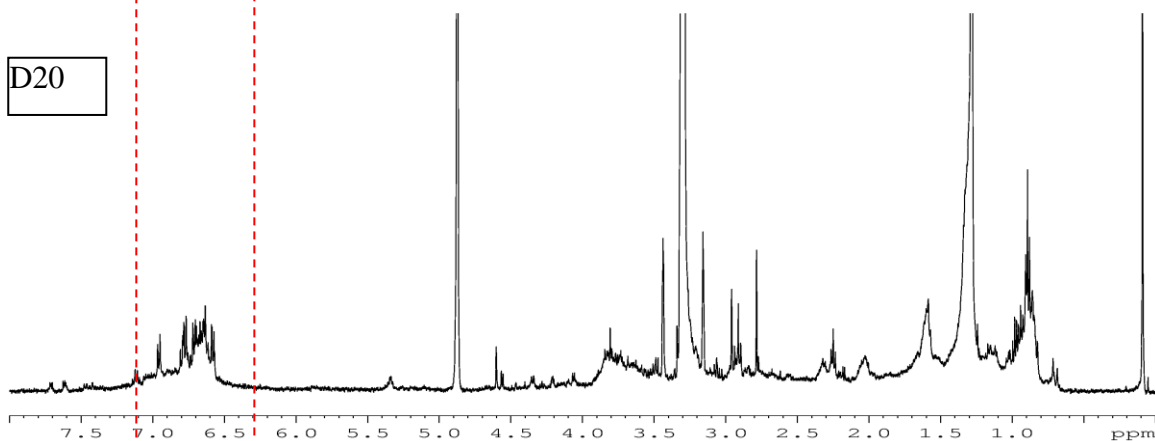


Pokračování Obr. 47:

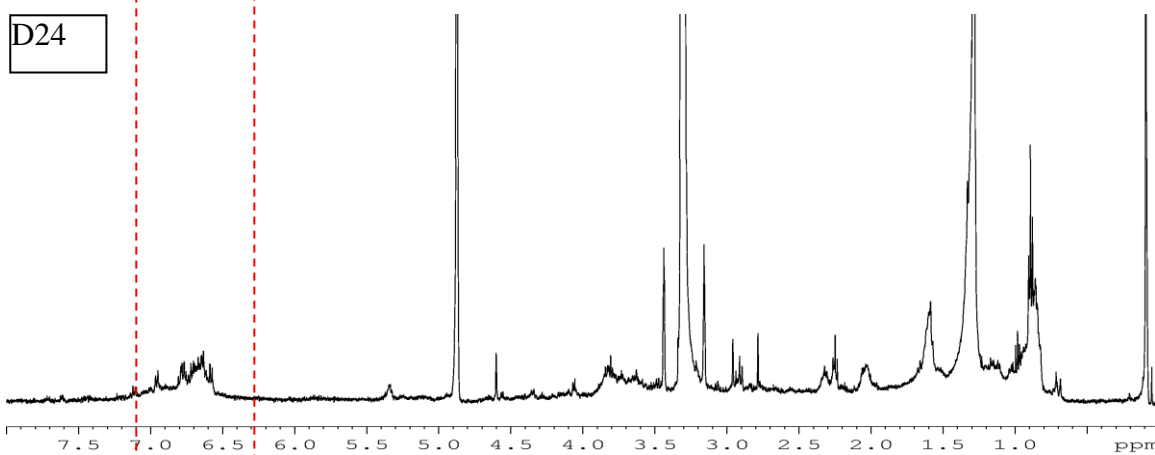
D16



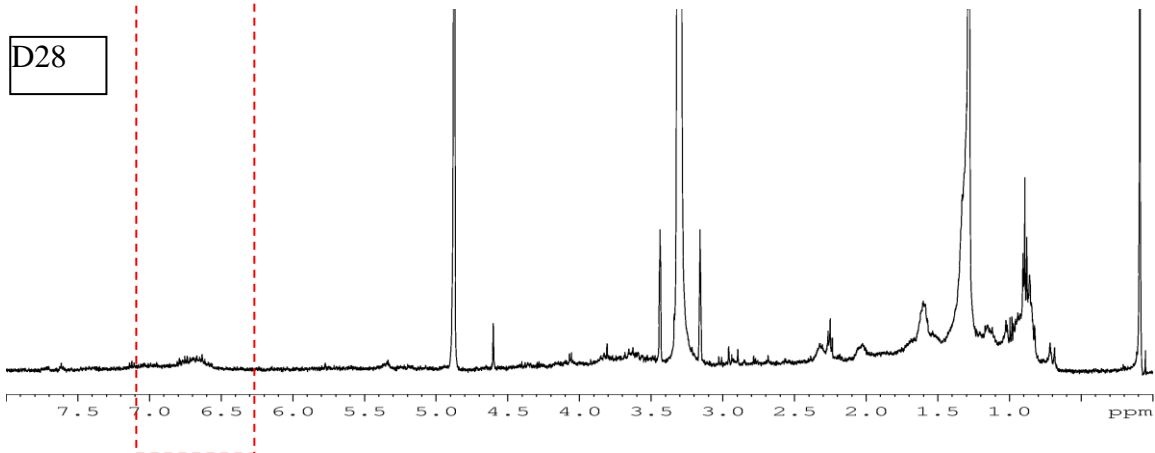
D20



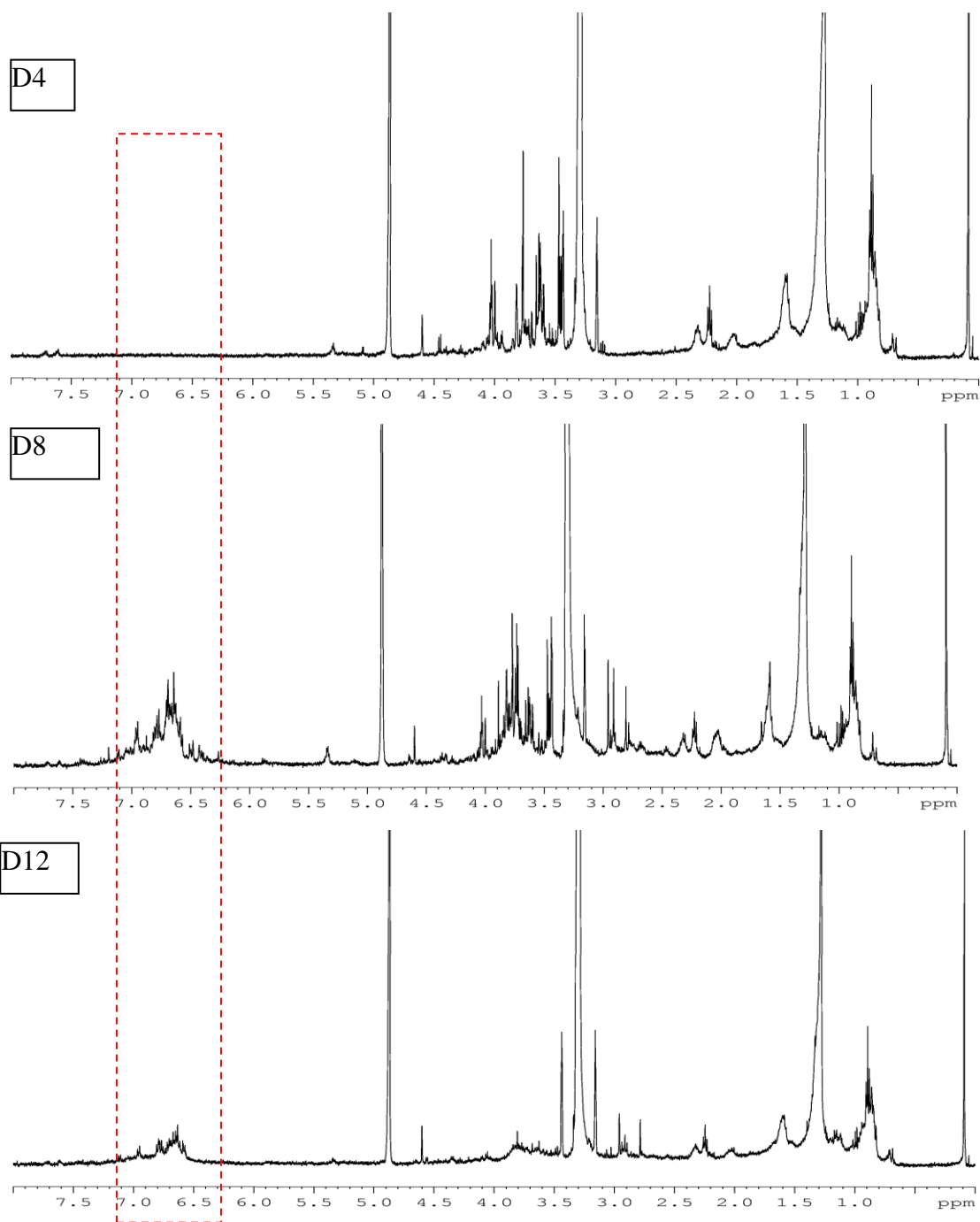
D24



D28

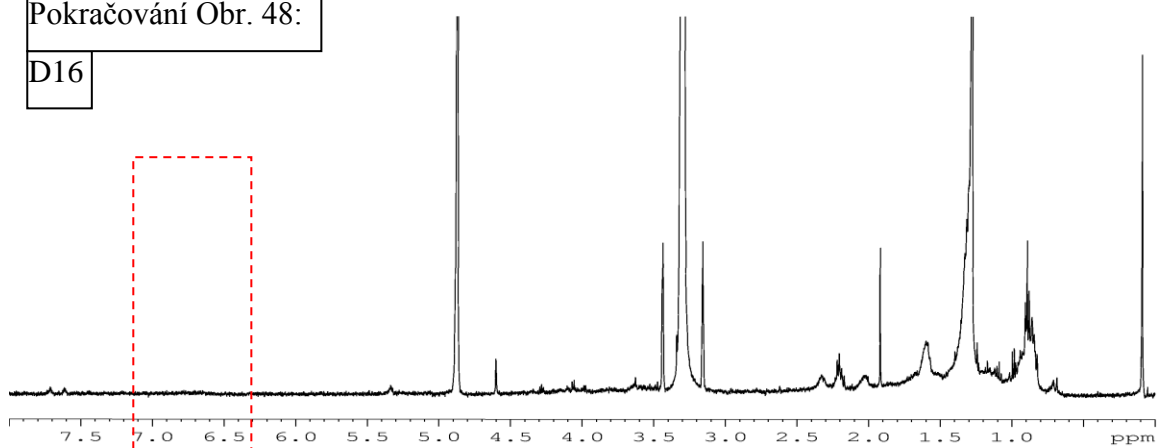


Obr. 48: ^1H NMR. Přehled; GC / elicítace pektinem:



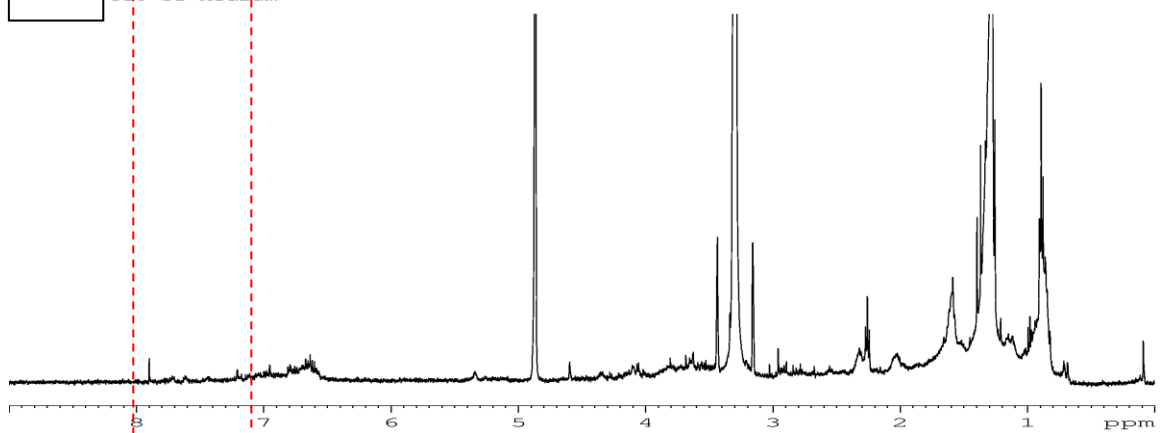
Pokračování Obr. 48:

D16

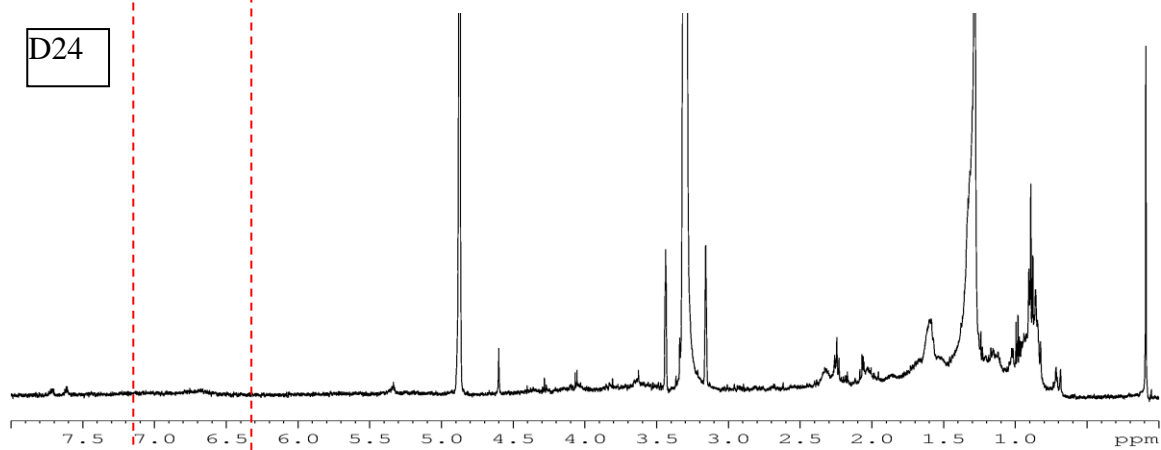


D20

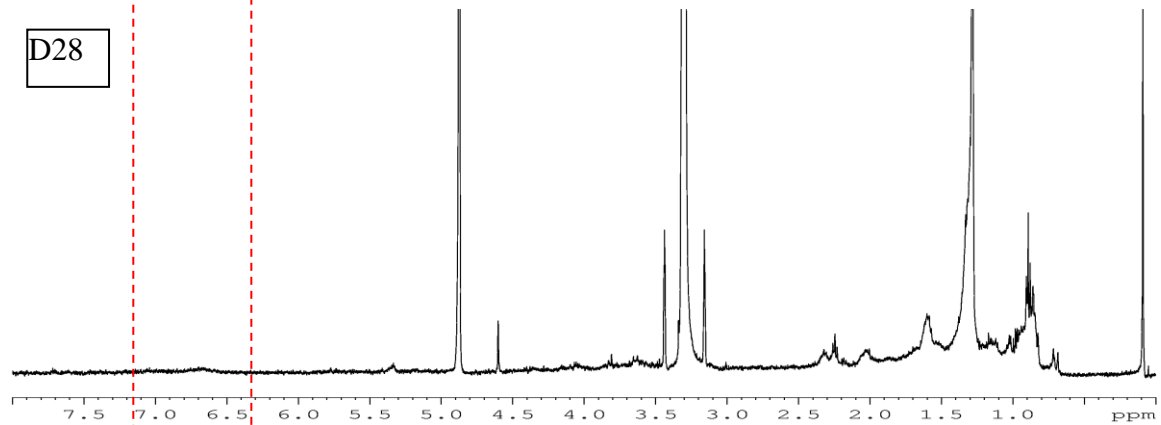
T110 S1 Medium



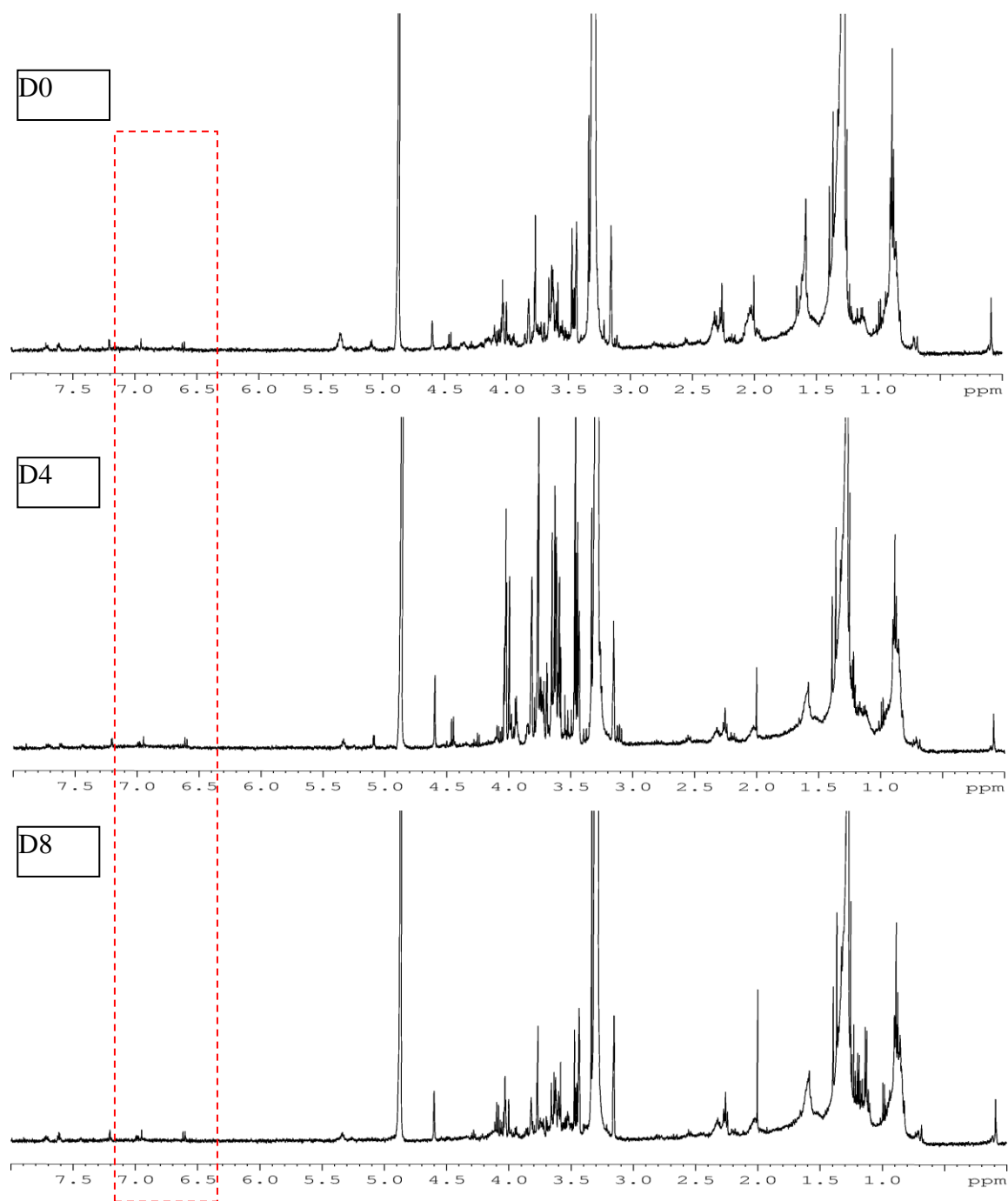
D24



D28

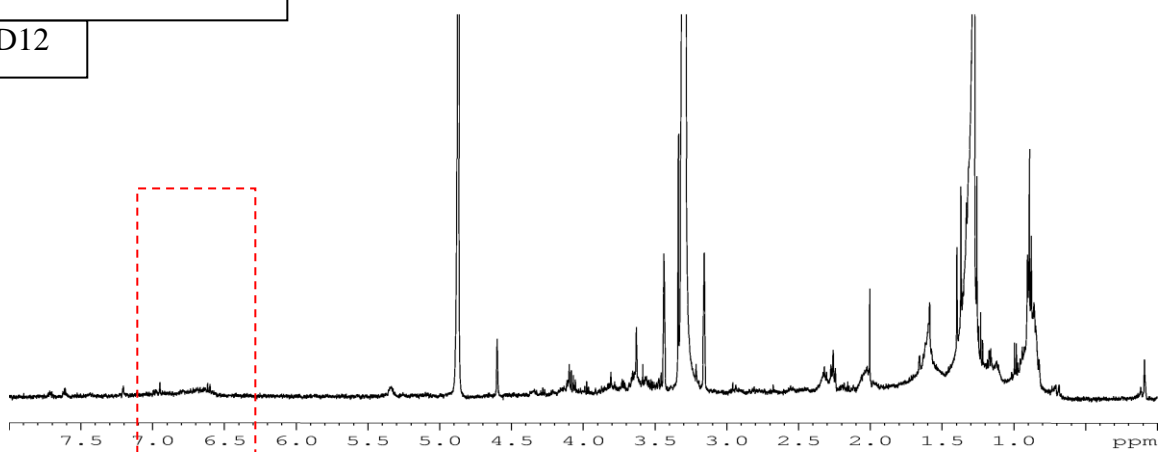


Obr. 49: ^1H NMR. Přehled; GC / kontrola z elicitace jasmonovou kyselinou:

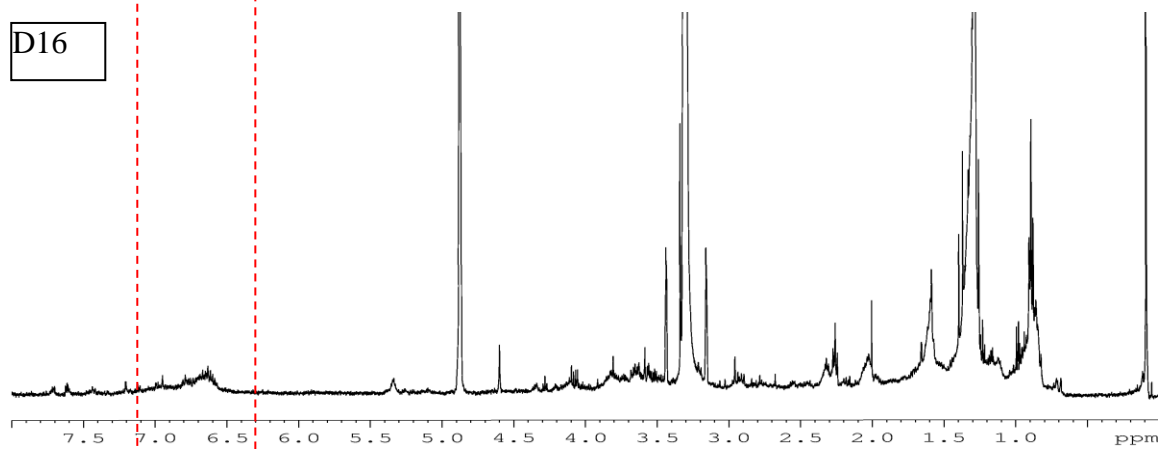


Pokračování Obr. 49:

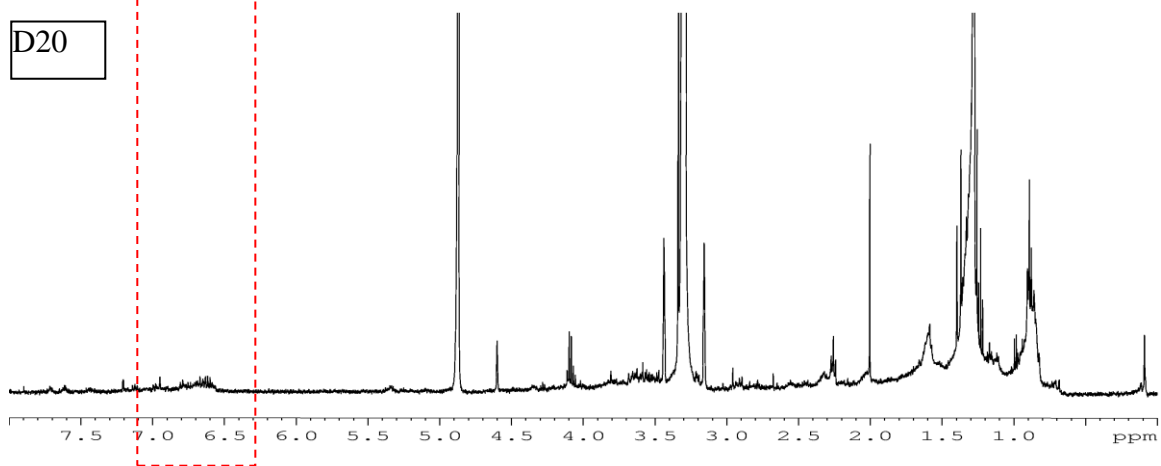
D12



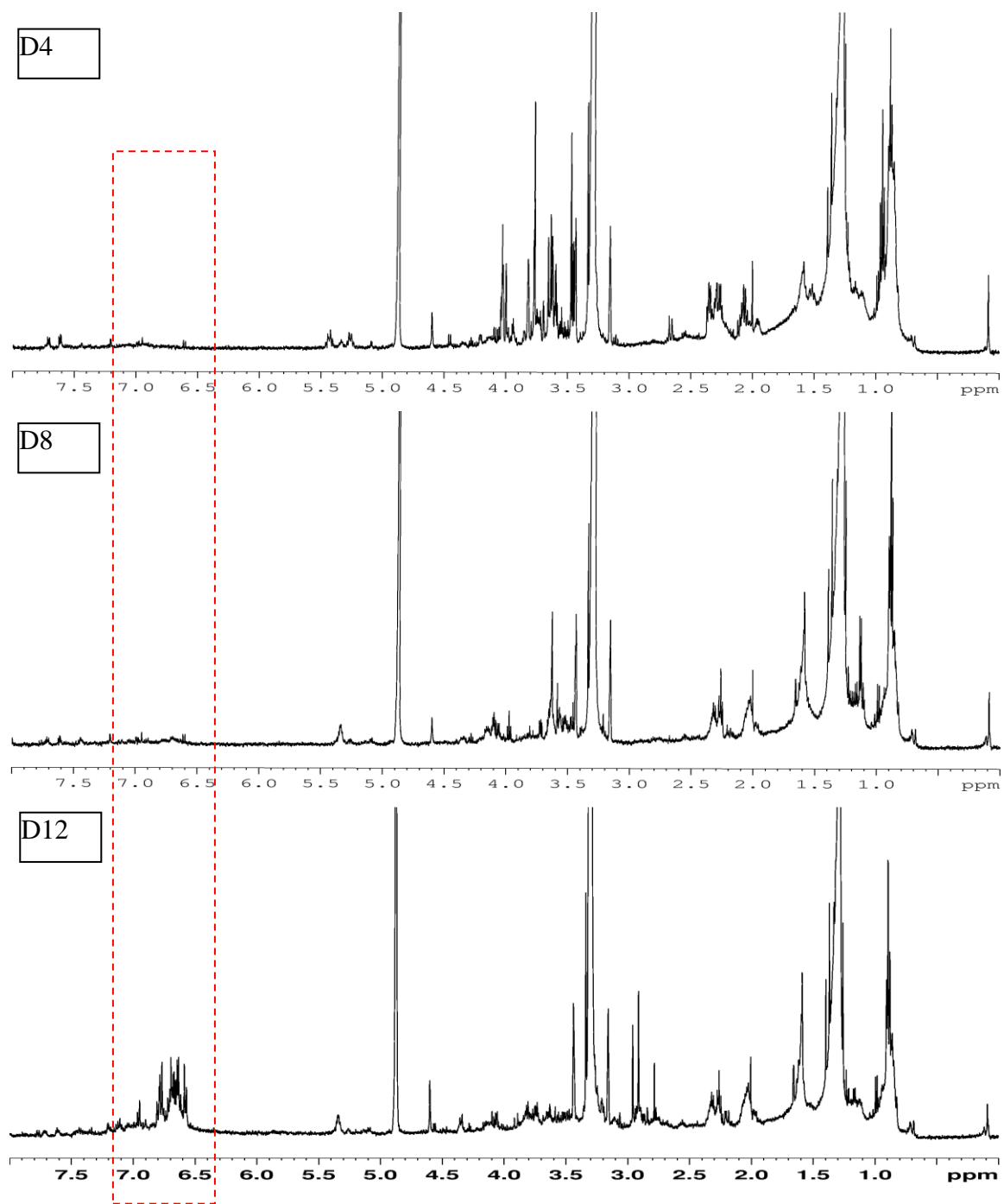
D16



D20

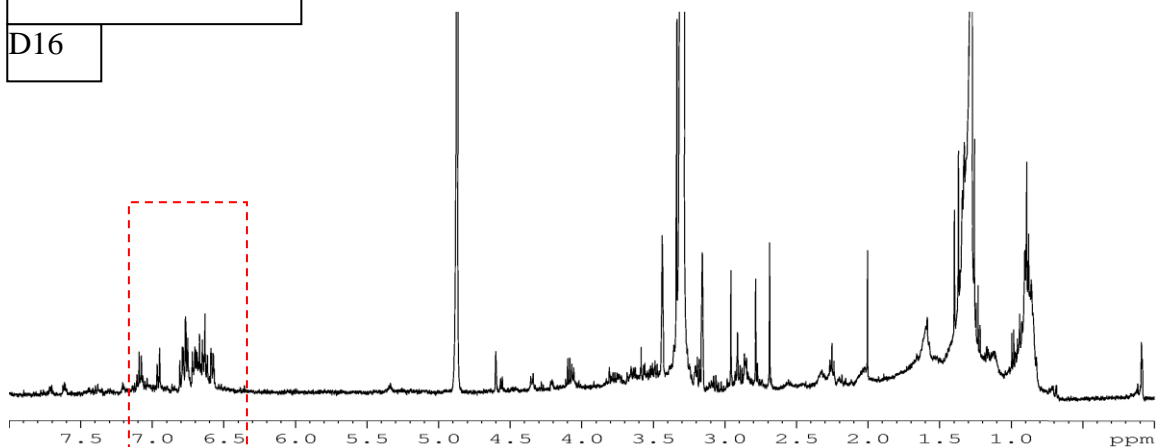


Obr. 50: ^1H NMR. Přehled; GC / elicítace jasmonovou kyselinou:

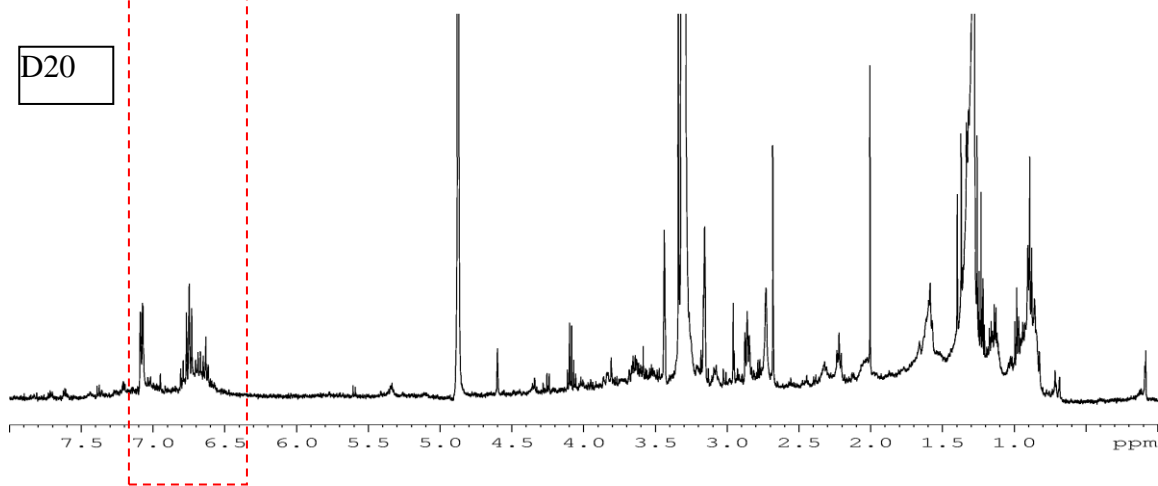


Pokračování Obr. 50:

D16



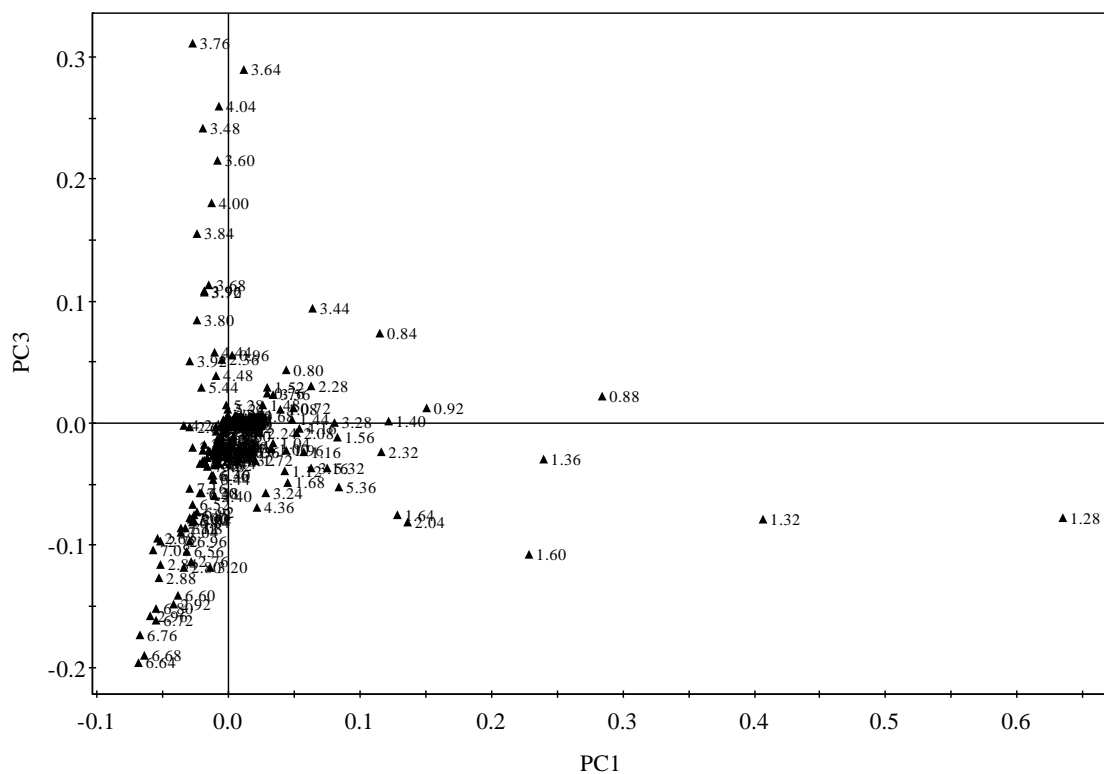
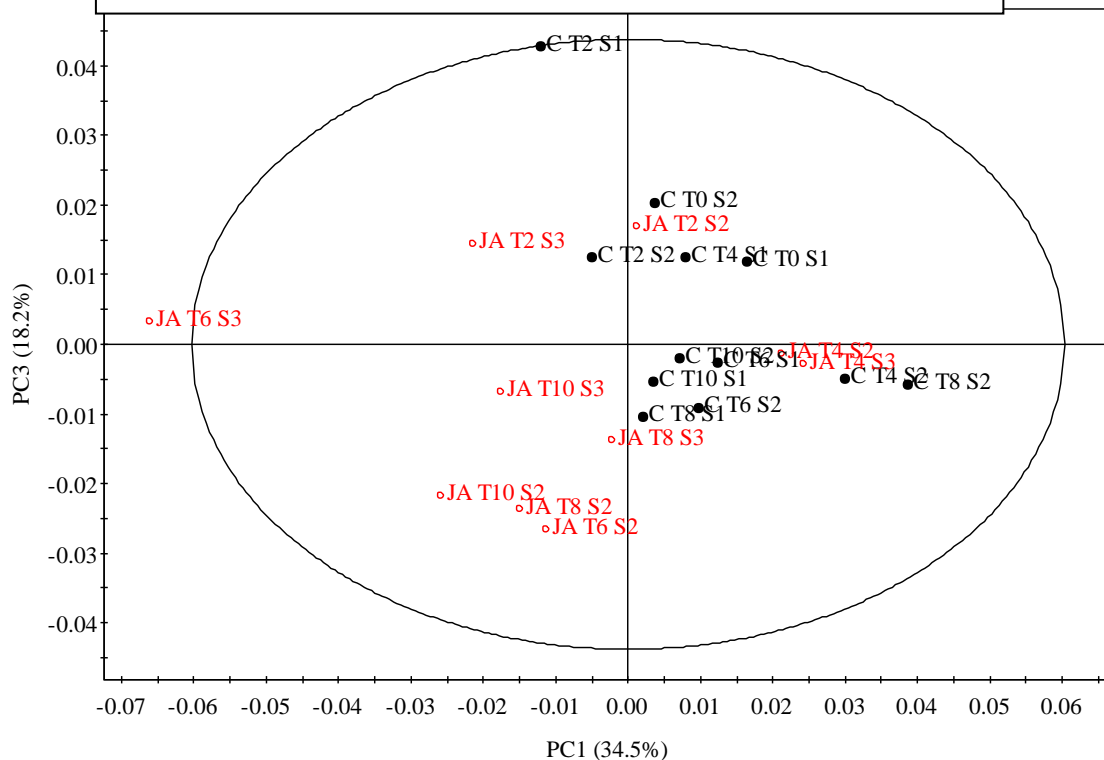
D20



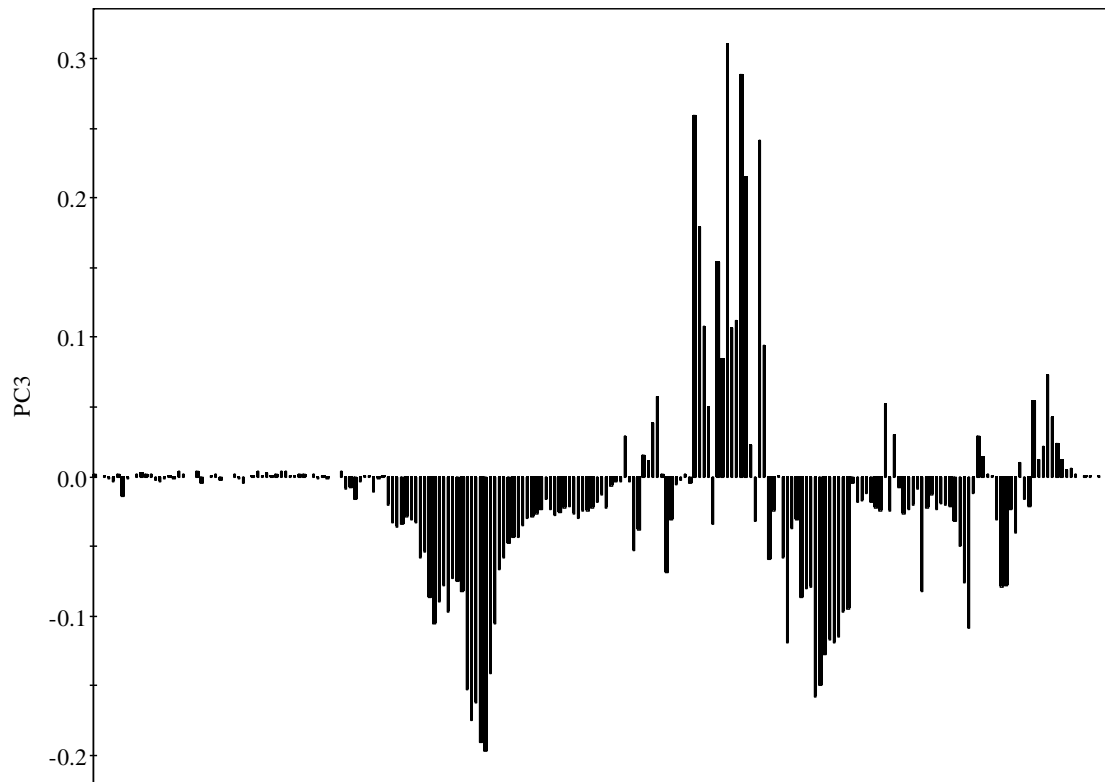
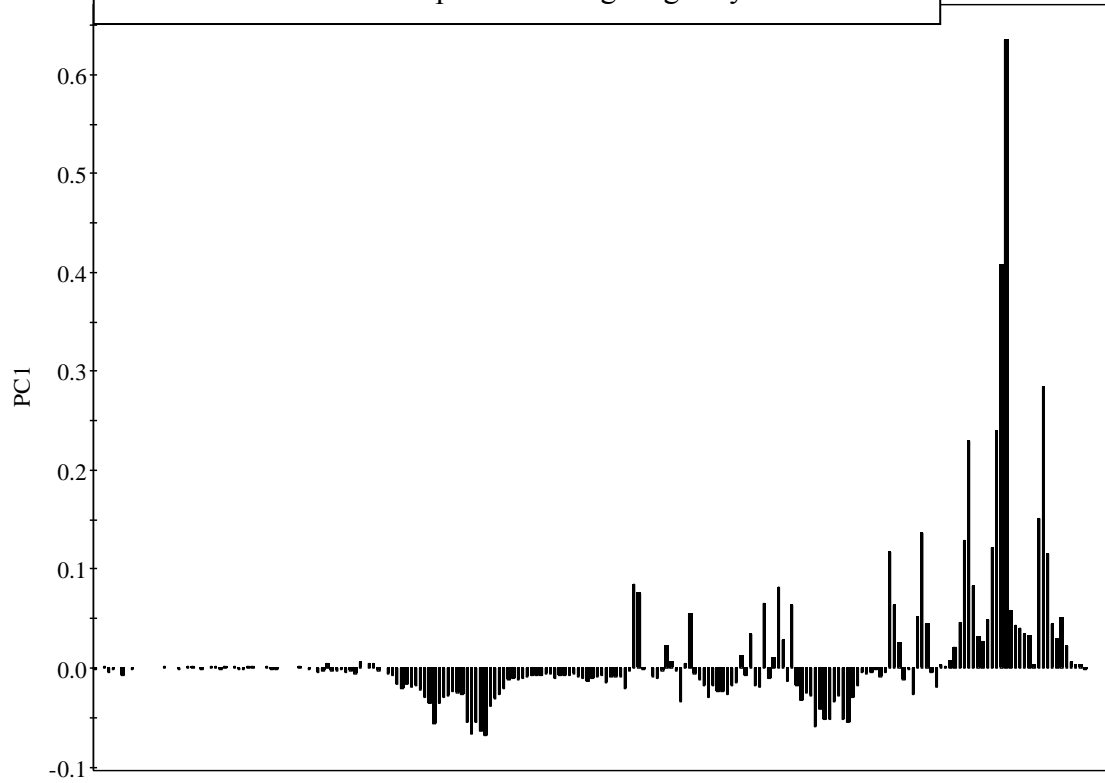
V rámci linie GC bylo pomocí statistické analýzy docíleno separace elicítace jasmonovou kyselinou od kontroly. Hlavní oblast zodpovědná za tuto separaci je $\delta 6.5 - \delta 7.0$ na obrázku 51 v levém dolním kvadrantu. Tato oblast odpovídá aromatickým sloučeninám (viz. určení struktury ve frakci média), které jsou u linie GC vylučovány do média, přičemž díky elicítaci jasmonovou kyselinou dochází k nárůstu koncentrace v jejich metabolismu.

U elicítace pektinem linie GC a v rámci PCA analýzy linie GB nebyla nalezena významná rozdílnost ve frakci média.

Obr. 51: Skóre a loading diagram linie GC elicitované jasmonovou kyselinou s kontrolou.



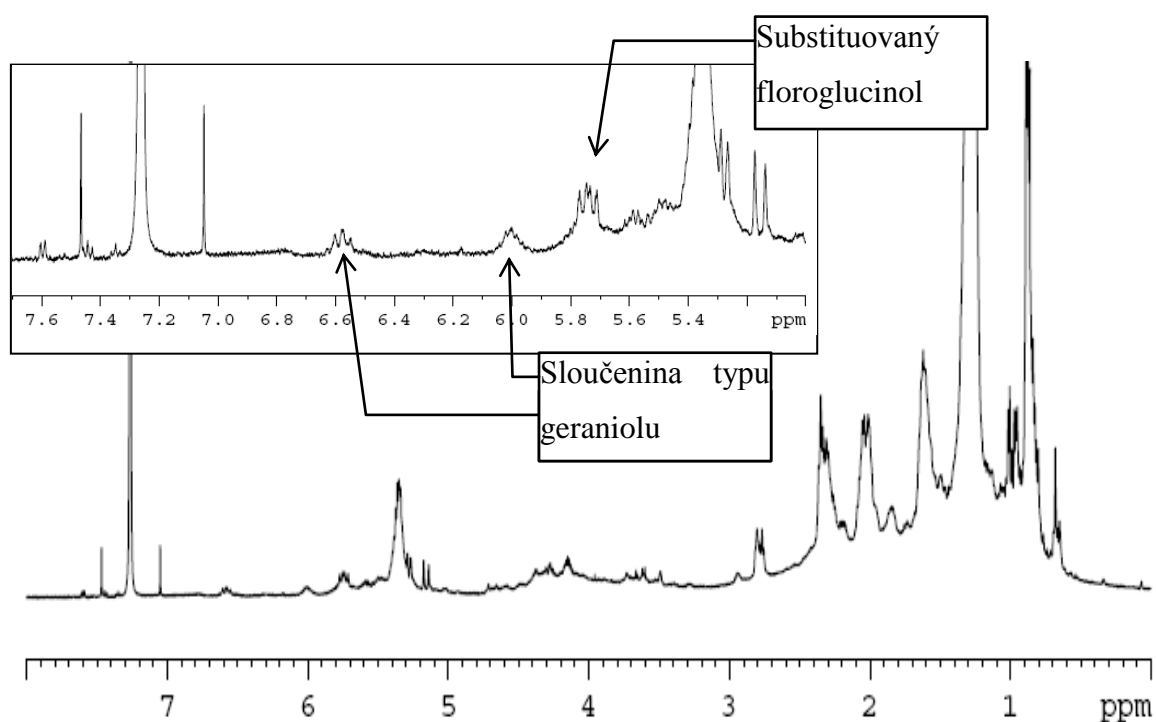
Pokračování Obr. 51: Sloupcové loading diagramy PC1 a 2.



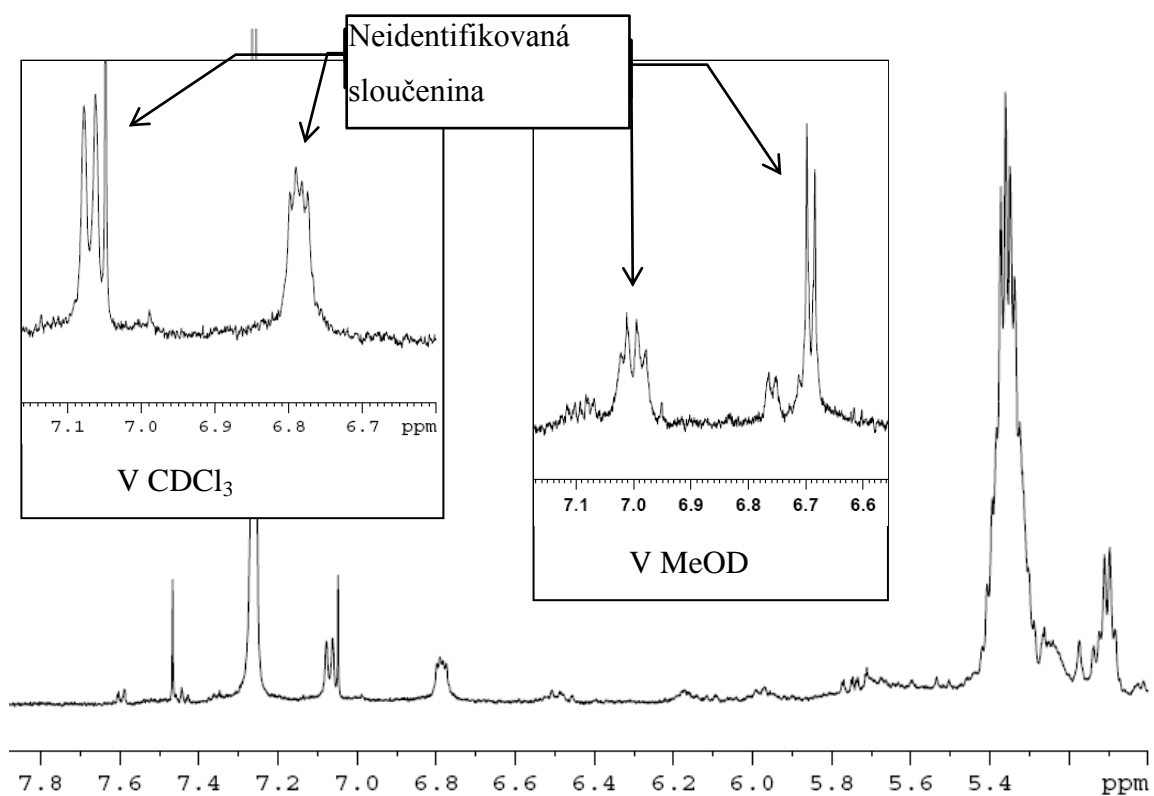
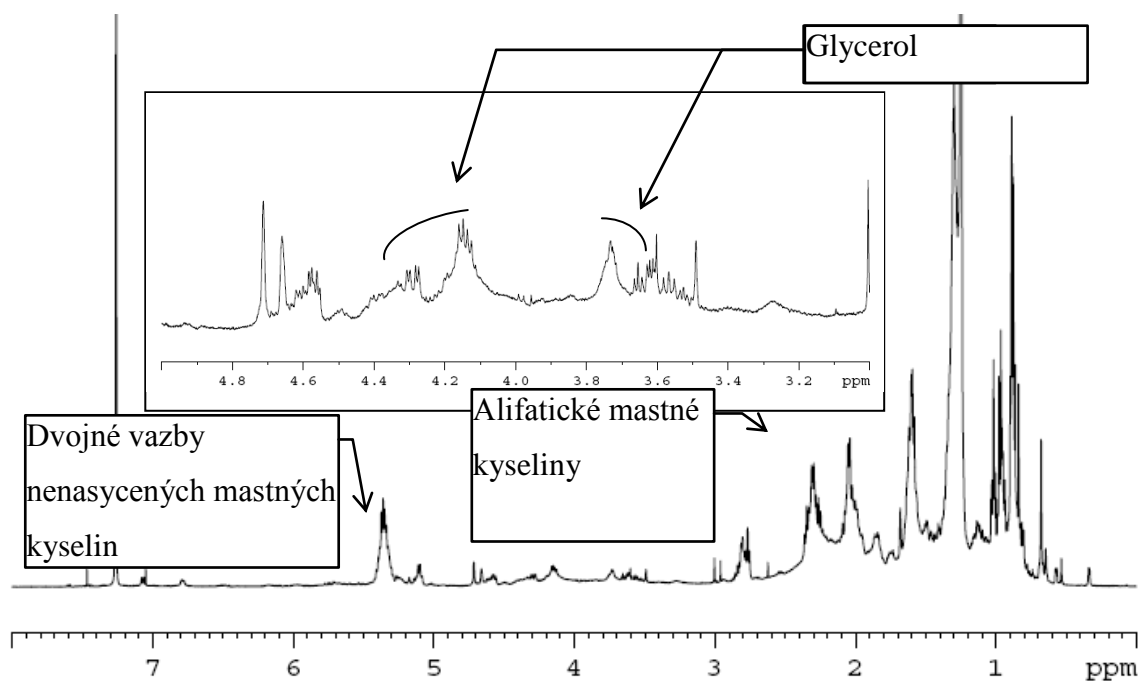
4. Frakce chloroform

Určení struktury u zajímavých signálů ve frakci chloroform bylo ztíženo vysokou koncentrací lineárních alifatických sloučenin ($\delta 0.6 - \delta 2.5$) a na druhou stranu nízkou koncentrací ostatních lipofilních metabolitů. Frakce chloroform byla nejdůležitější pro detekci kanabinoidů, které se projevují charakteristickými signály v oblasti $\delta 6.0$ až $\delta 6.5$, většinou dobře separované od ostatních částí spektra. Ukázky spekter THC a CBD jsou na obrázcích 54 a 55. Zajímavé signály frakce chloroform jsou zobrazeny na následujících dvou spektrech (obr. 52, 53).

Obr. 52: line GC v CDCl_3

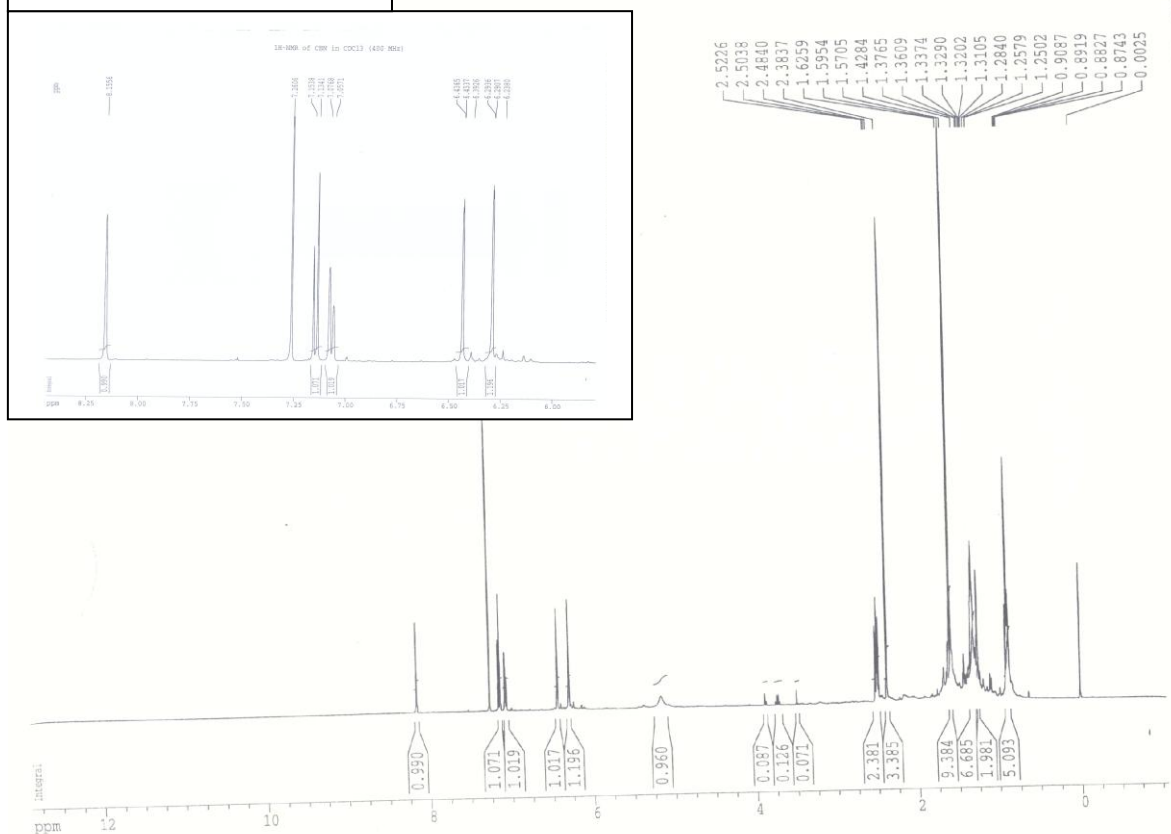


Obr. 53: linie GB v CDCl_3



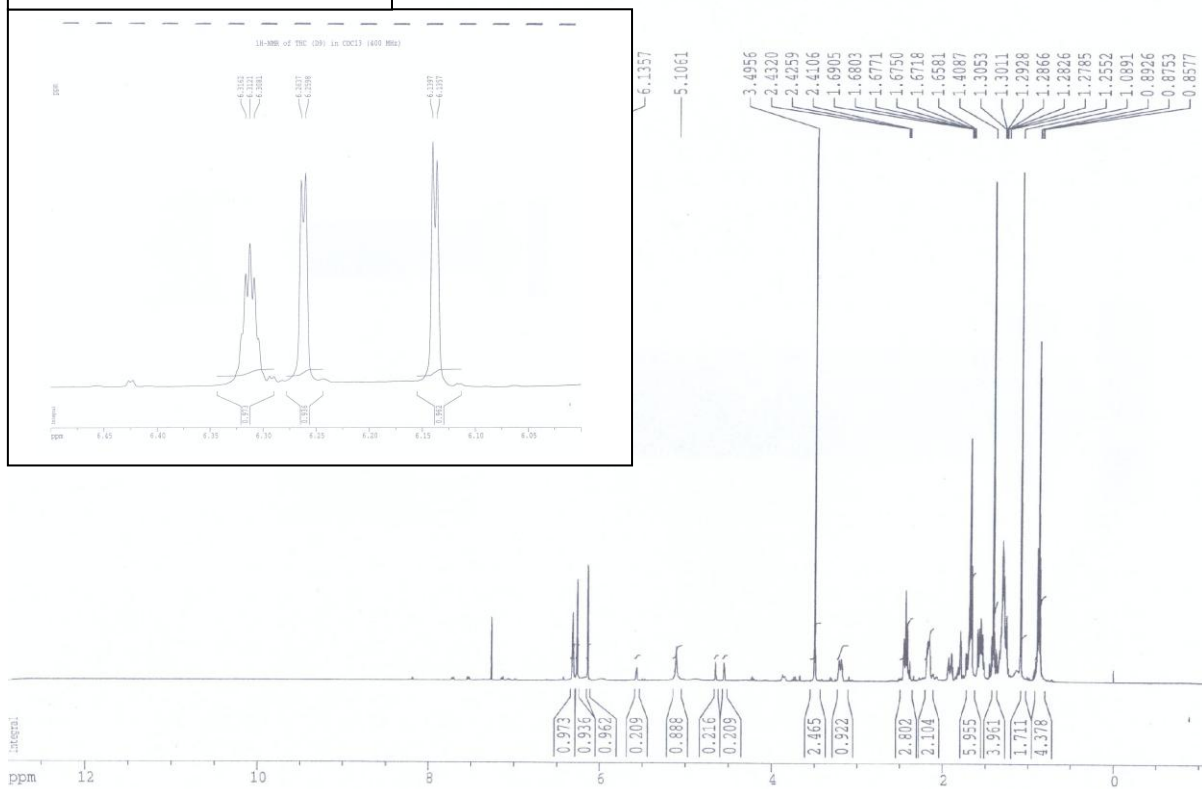
Obr. 54: ¹H-NMR, CBD

¹H-NMR of CBD in CDCl₃ (400 MHz)



Obr. 55: ¹H-NMR, THC

¹H-NMR of THC (D9) in CDCl₃ (400 MHz)



Multiplety (tripl dublety) typu geraniolu na obr. 52 (δ 6.0 a δ 6.6) představují důkaz aktivního terpenového metabolismu, který je v podobě geranyl-PP nezbytný pro produkci kanabinoidů. Identifikovaná sloučenina nepředstavuje přímo geranyl, jehož signály se vyskytují v δ 5.0 a δ 5.4, ale pravděpodobně je sloučenina obsahující dvě nekonjugované dvojně vazby substituována funkční skupinou (např. karboxylovou nebo karbonylovou) způsobující odstínění, s následným šifrováním signálu k nižšímu poli. Tato sloučenina byla nejvíce přítomna u ranných vývojových stádií linie GC.

Multiple δ 5.7 (obr. 52) představuje floroglucinol se substituovanou fenolickou skupinou, která způsobí rozklad původního singletu floroglucinolu na složitý aromatický multiplet. Může se jednat i o směs izomerů.

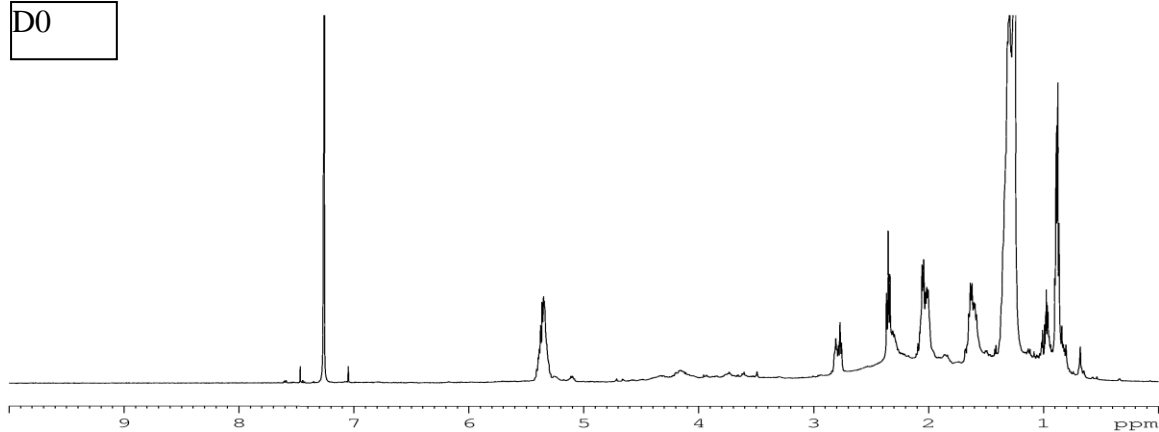
Obrázek 53 znázorňuje typický signál glycerolu a dále δ 5.3 signál dvojných vazeb nenasyčených mastných kyselin. Signály alifatické části jsou ve frakci chloroform dominantní mezi δ 1.0 až δ 2.0 a jsou přítomny také singlety v okolí δ 1.0 odpovídající steroidnímu jádru. Na obrázku 53 jsou dále znázorněny signály neidentifikované aromatické sloučeniny, která reagovala mírným zvýšením koncentrace po elicitaci jasmonovou kyselinou u linie GB. Ovšem kvůli velice nízké koncentraci nebyly úspěšné 2D NMR experimenty, a proto nebyla identifikována podrobnější struktura.

Pro úplnost je dále uveden výběr přehledu spekter u linie GB, kde jsou patrné mnohonásobně větší píky alifatických sloučenin v porovnání s ostatními signály nad δ 5.5 (obr. 56- 57).

Obr. 56: ^1H NMR. Přehled; GB / kontrola:

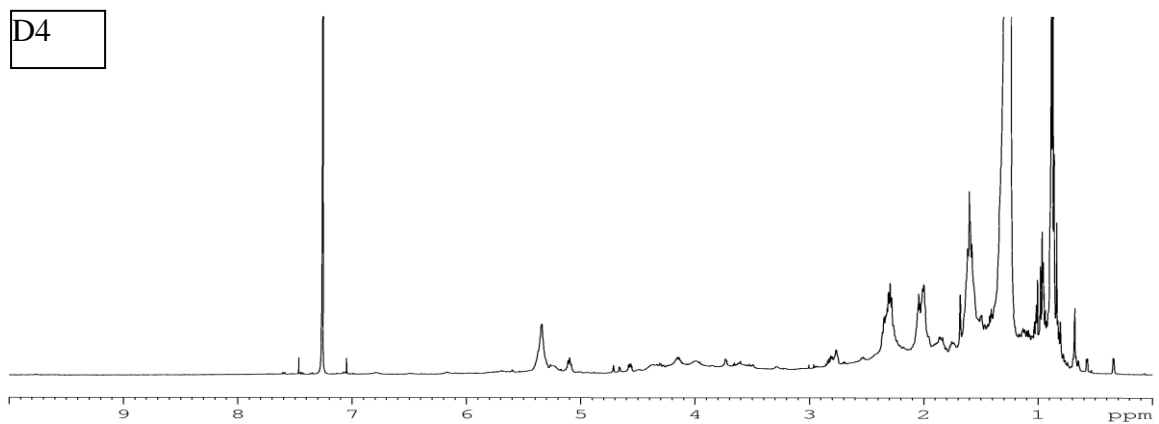
32-GB/C T0 S1 CDCl₃

D0



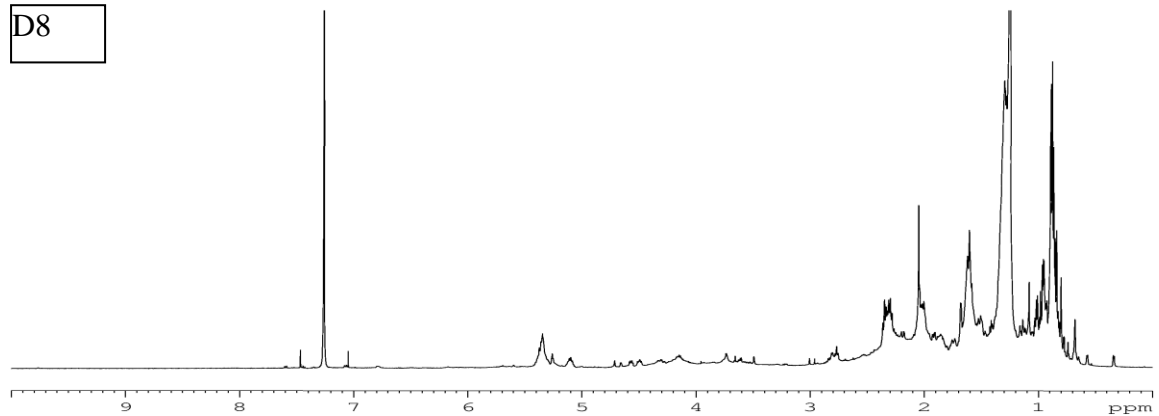
33-GB/C T2 S1 CDCl₃

D4



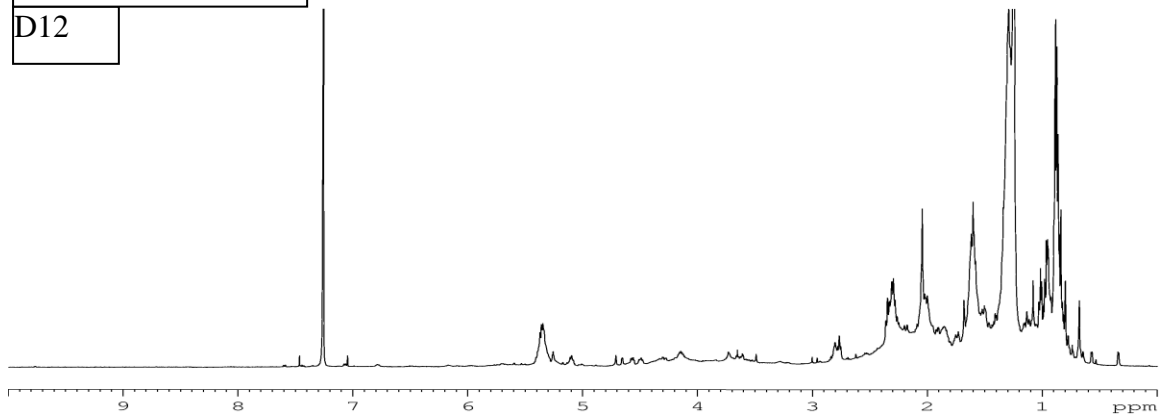
34-GB/C T4 S1 CDCl₃

D8



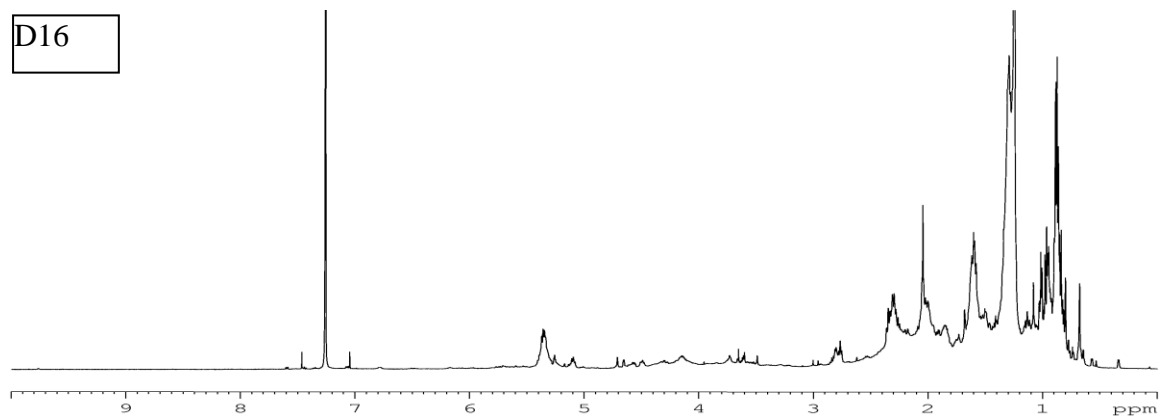
Pokračování Obr. 56:

D12



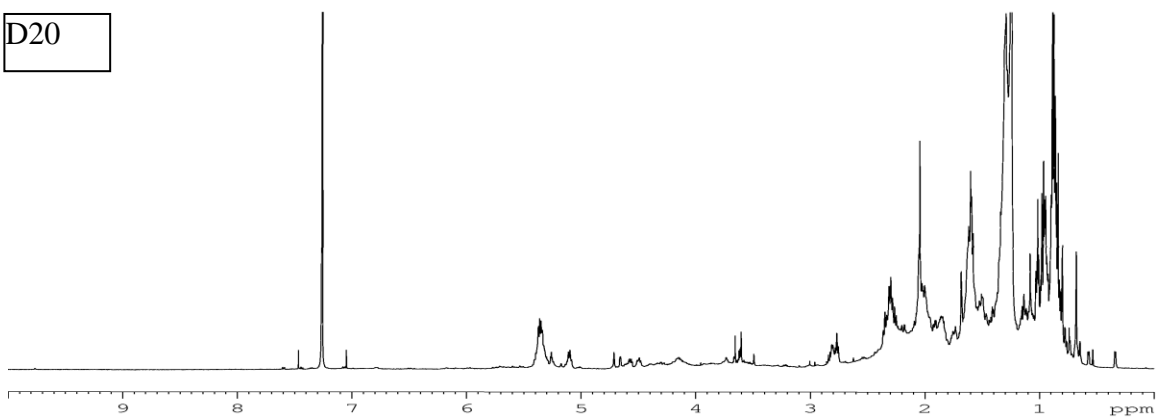
36-GB/C T8 S1 CDCl3

D16



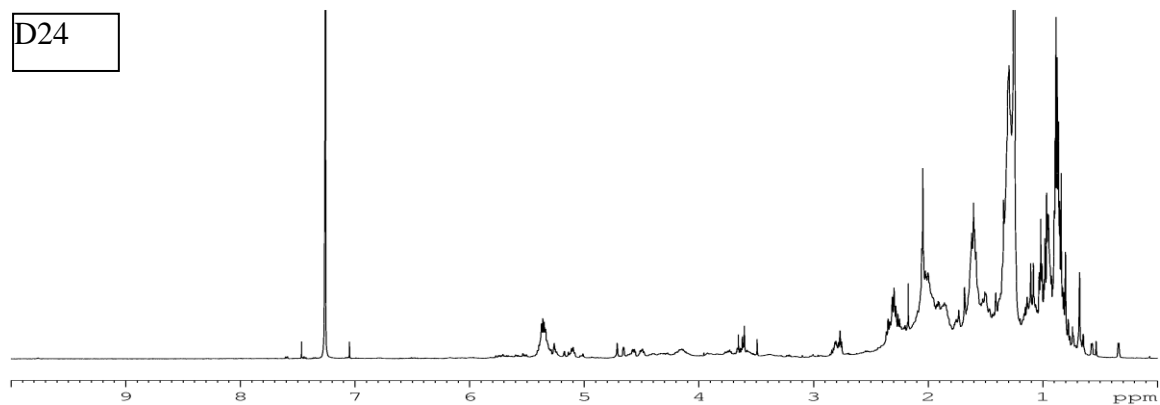
37-GB/C T10 S1 CDCl3

D20



38-GB/C T12 S1 CDCl3

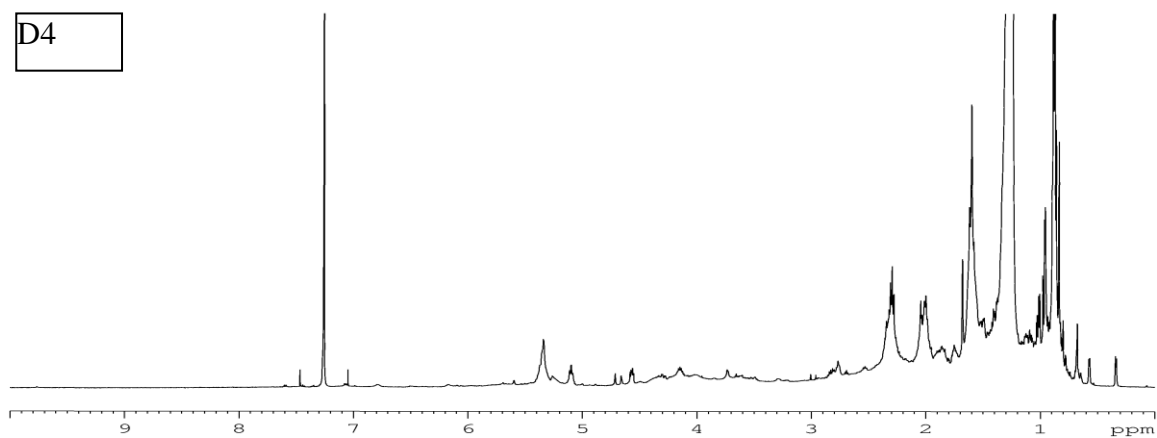
D24



Obr. 57: ^1H NMR. Přehled; GB / elicitace jasmonovou kyselinou:

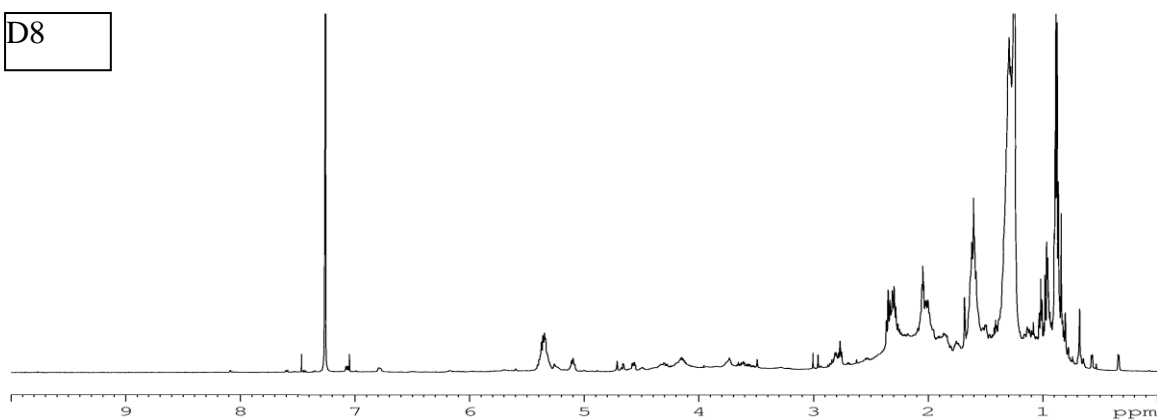
26-GB/JA T2 S2 CDC13

D4



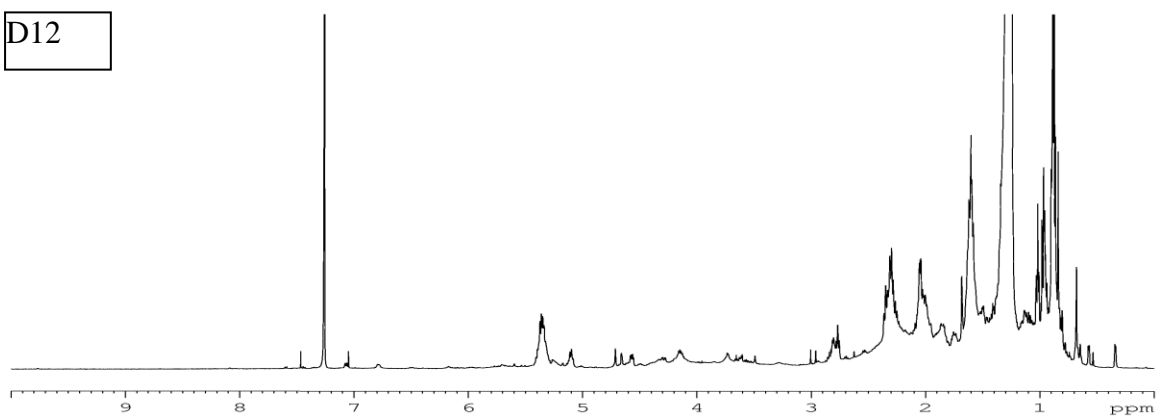
27-GB/JA T4 S2 CDC13

D8



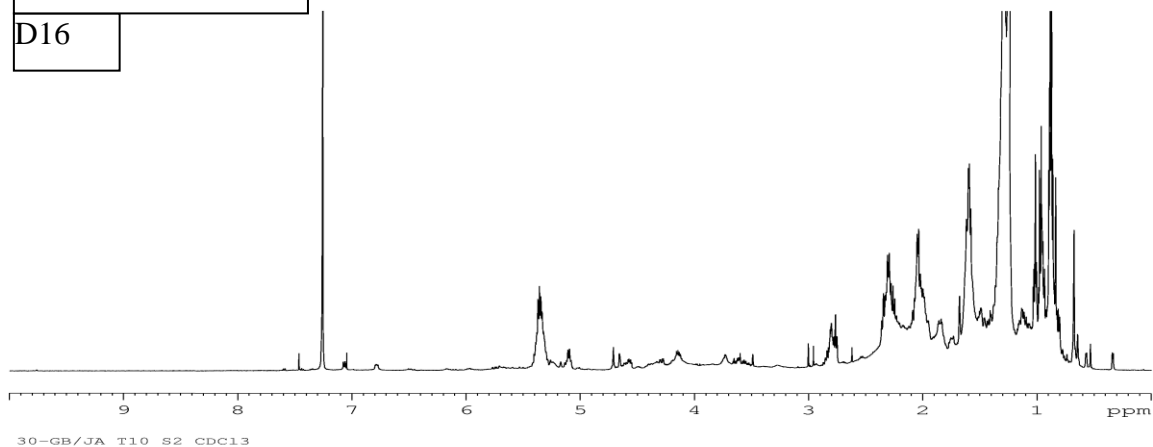
28-GB/JA T6 S2 CDC13

D12

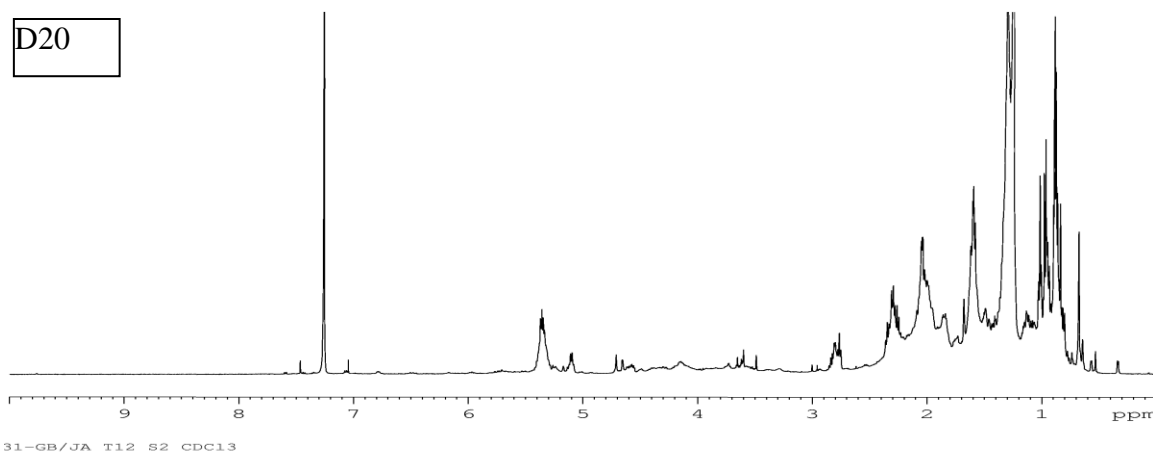


Pokračování Obr. 57:

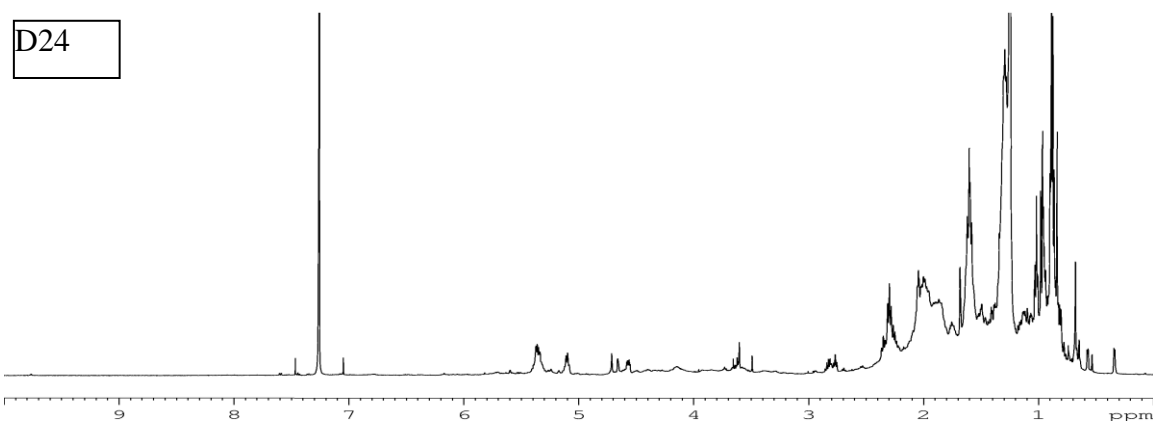
D16



D20



D24

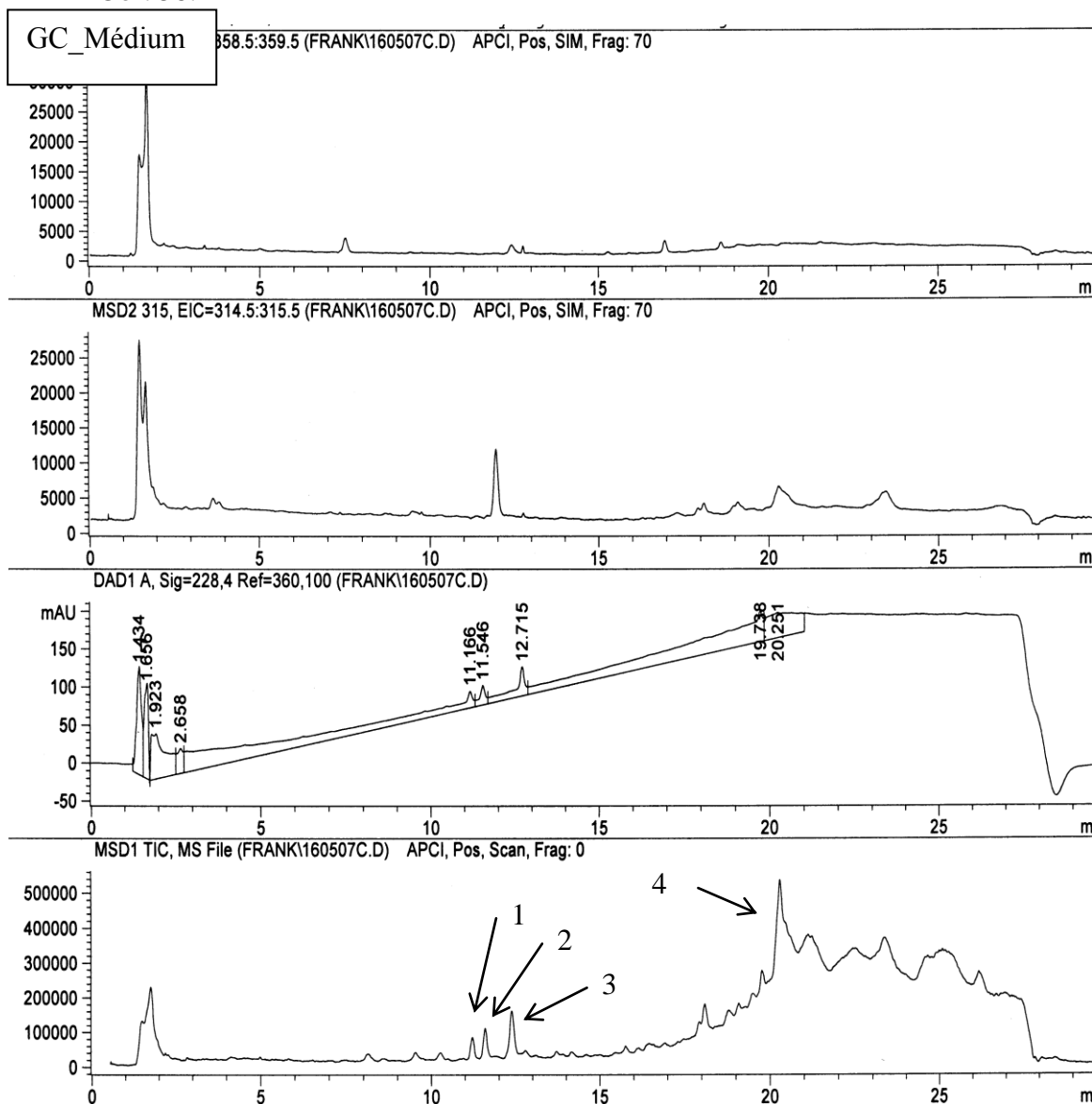


Analýza chloroformových spekter představuje porovnání velkých signálů alifatických sloučenin, jejichž profil ovšem nebyl blíže určen. Při porovnání obou linií byl zjištěn vyšší obsah nenasycených mastných kyselin u GC mladých kultur, naopak u linie GB se obsah nenasycených mastných kyselin zvyšuje se stářím kultury. U elicitovaných vzorků došlo u obou kultur k ovlivnění nasycených mastných kyselin, ovšem u každé kultury u jiných oblastí spektra (GC: δ 1.68-1.96; GB: δ 0.76-1.16).

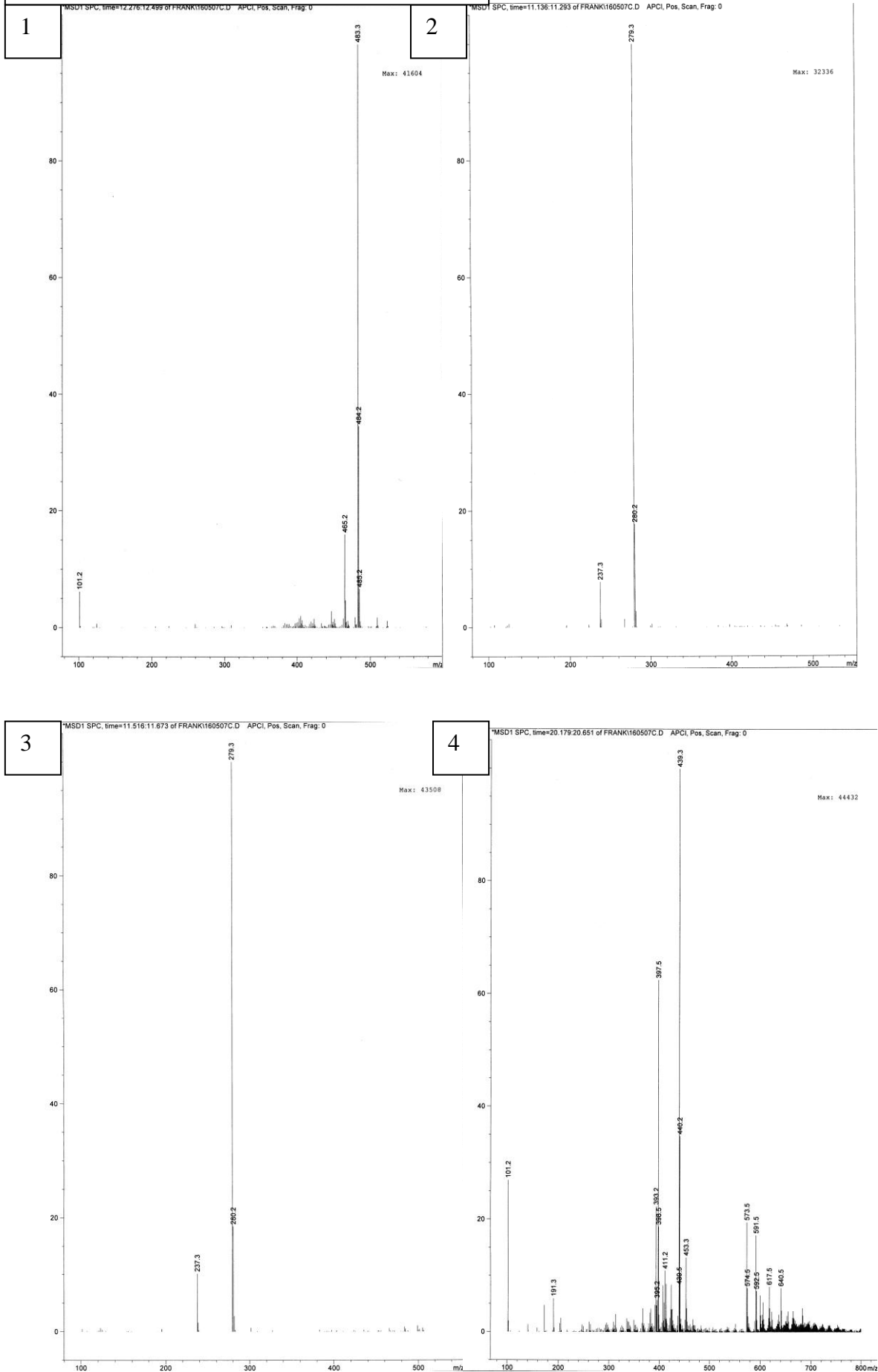
5. Chemická analýza hmotnostní spektrometrií.

NMR je silná analytická metoda schopná zachytit širokou škálu metabolitů, ovšem nevýhodou je nízká senzitivita. Vzhledem k nutnosti prokázat nebo vyvrátit přítomnost kanabinoidů ve zkoumaných kulturách, byla využita hmotnostní spektrometrie, představující v současné době nejcitlivější analytický detektor. Pro analýzu byl využit souhrn chloroformových extraktů a extraktů z média z předchozích NMR měření. Pro analýzu byl využit jak cílený tak i skenovací mód hmotnostního spektrometru a v kombinaci s HPLC systémem byl vytvořen citlivý cílený systém. Na následujících 4 obrázcích (obr. 58-61) jsou znázorněny HPLC a MS záznamy. Na obrázku 62 je uvedena analýza THC a THCA jako standardů.

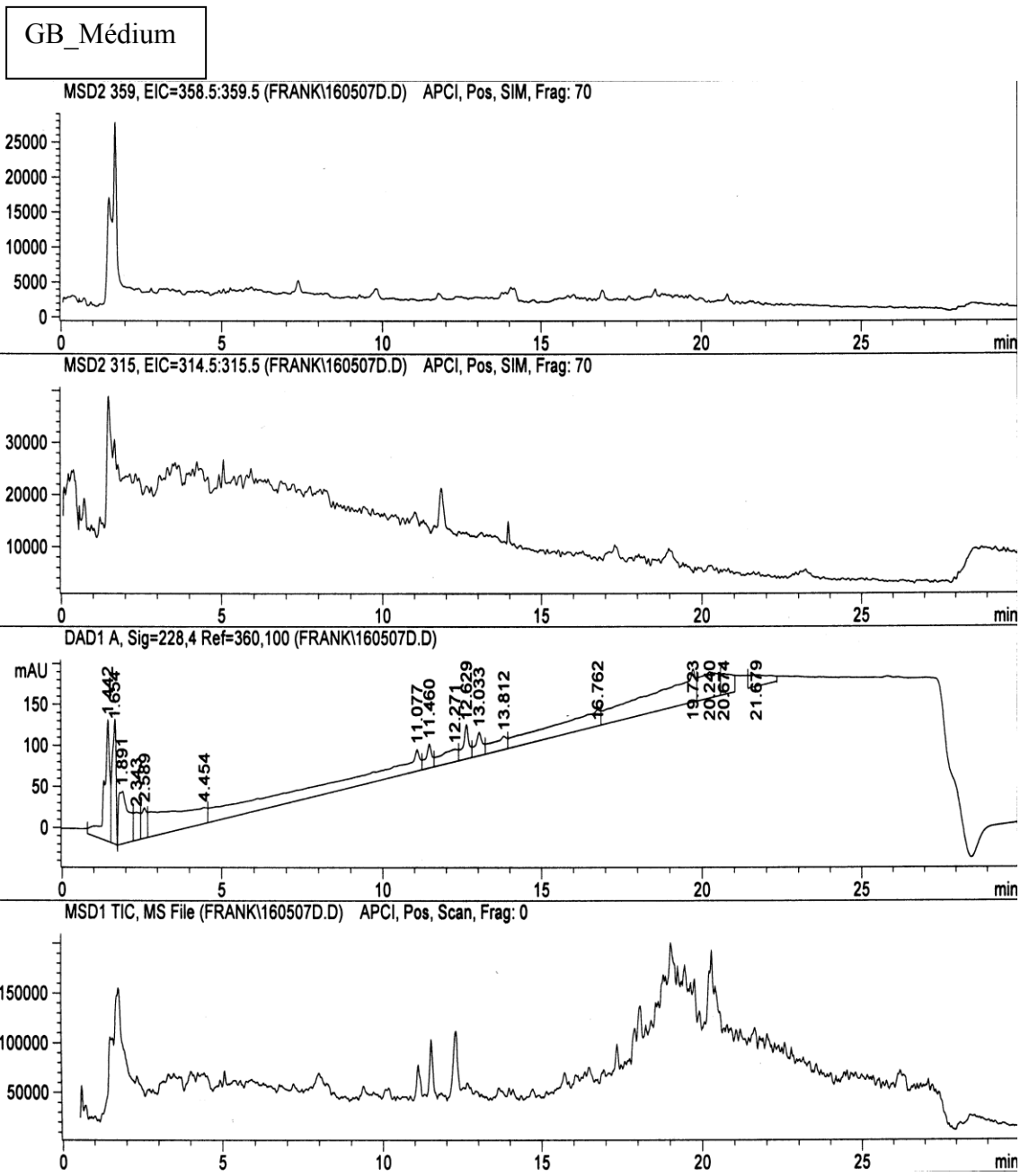
Obr. 58:



Pozn: čísla odpovídají MS záznamu na obr. 58:

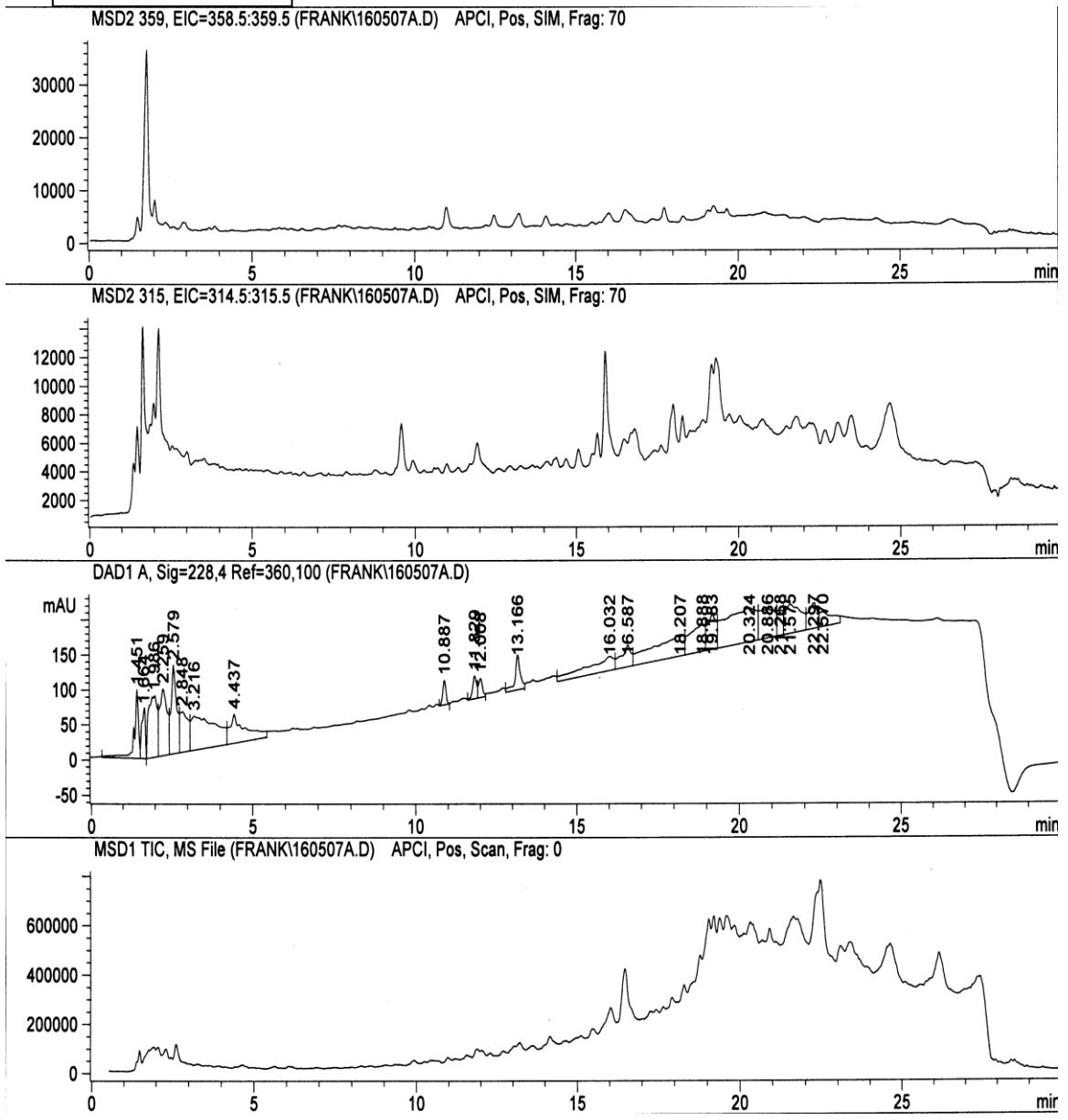


Obr. 59:



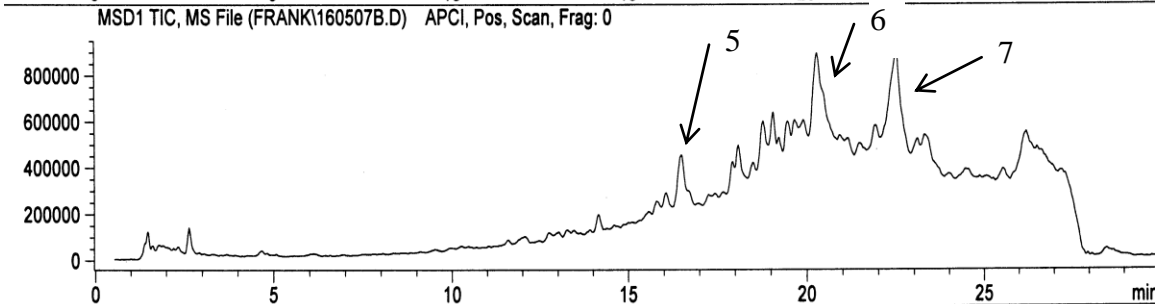
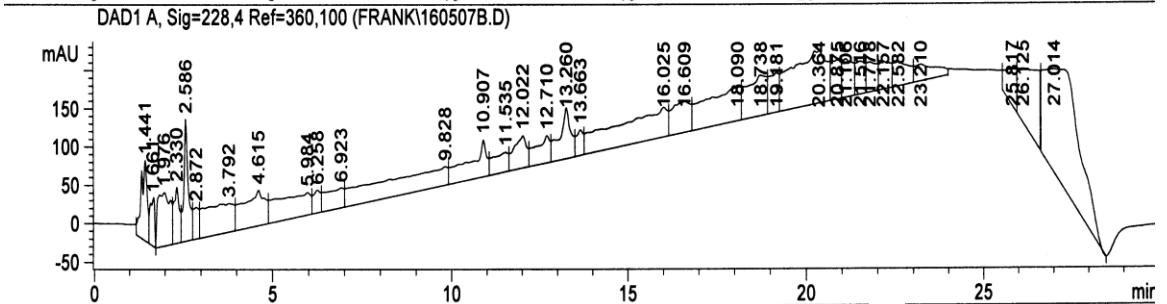
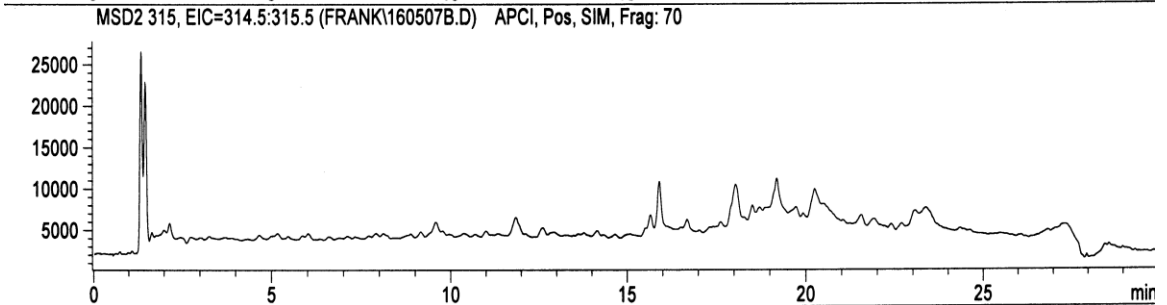
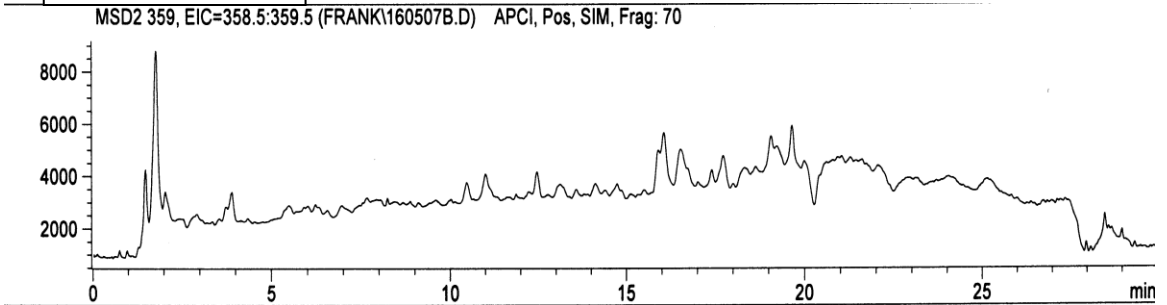
Obr. 60:

GC_Chloroform

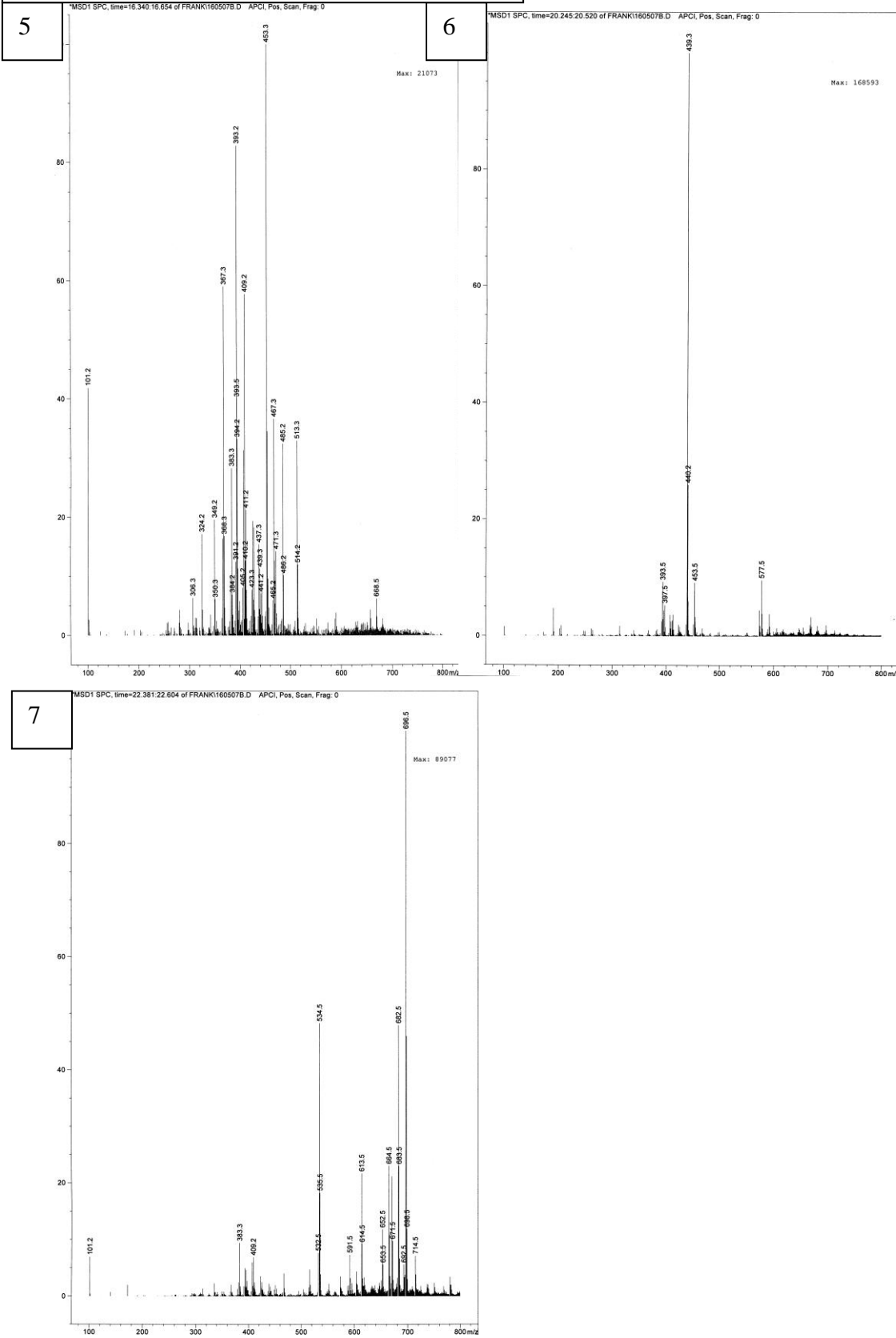


Obr. 61:

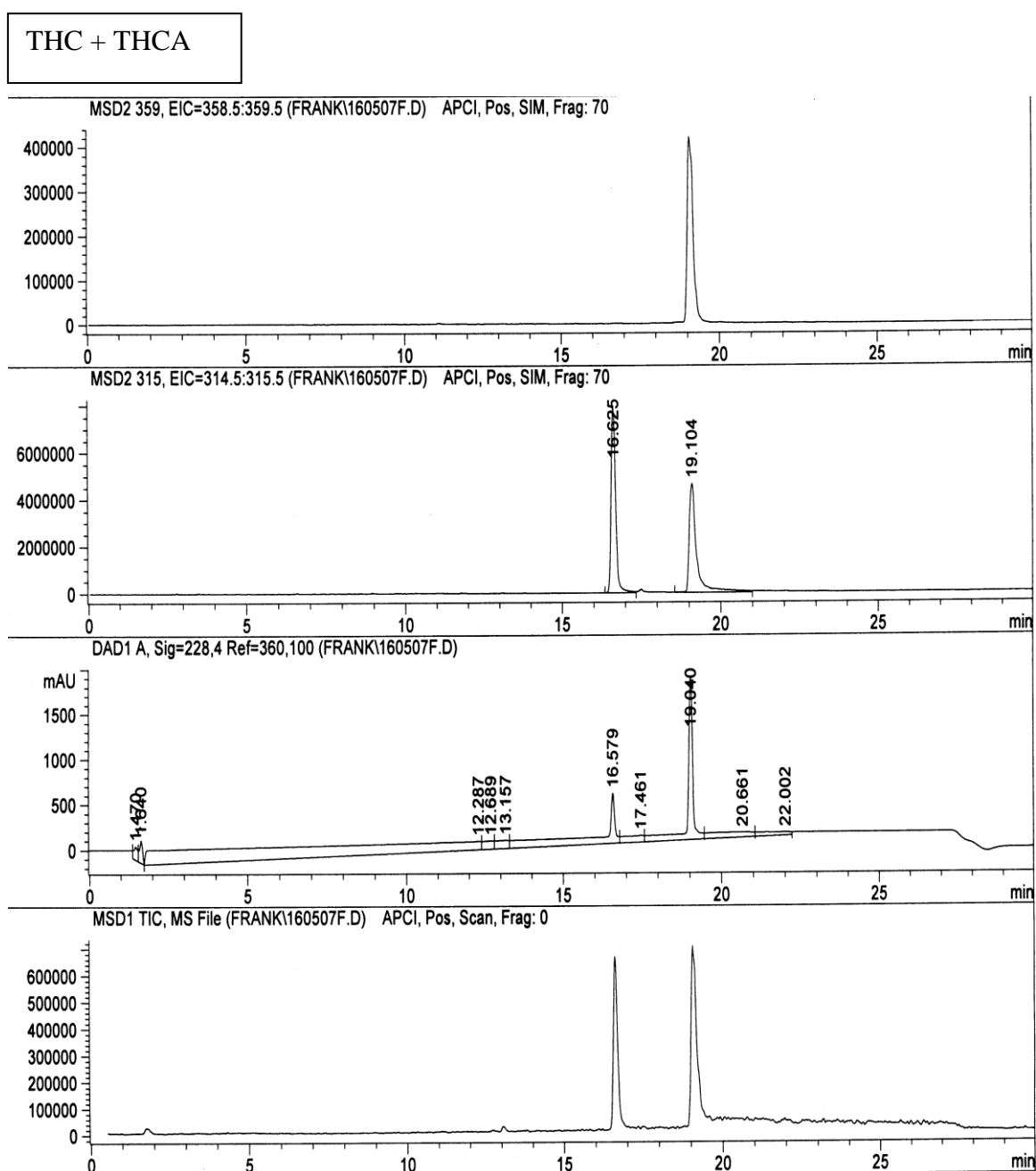
GB_Chloroform



Pozn: čísla odpovídají MS záznamu na obr. 61:



Obr. 62:



Hmotnostní spektrometrie neodhalila typické signály kanabinoidů, ani ve frakci média, ani v chloroformových extraktech. I když byly v rámci chloroformových extraktů zjištěny signály v rozmezí retenčních časů 15 až 20 minut pro specifickou molekulovou hmotnost kanabinoidů, nelze je vyhodnotit jako pozitivní kanabinoidní signály, vzhledem k nepatrné koncentraci (pravděpodobně se jedná o fragmenty jiných sloučenin). Skenovací mód pak v rozmezí uvedených retenčních časů odhalil tři signály (5, 6 a 7 na obr. 61) o vyšších molekulových hmotnostech (MW: 367 – 696), které neodpovídají kanabinoidům.

Ve frakci média byl detekován signál o molekulové hmotnosti 315, ovšem v retenčním čase 12 minut. HPLC analýza a skenovací MS mód je jak u média GC tak GB linie podobný se signály neodpovídajícími ani retenčním časem ani molekulovou hmotností kanabinoidům (obr. 58).

VI. Závěr

Z dostupných informačních zdrojů byl vypracován přehled obsahových látek rostliny *Cannabis sativa* L. se zaměřením na jejich biologickou aktivitu. Dále bylo zpracováno téma biotechnologické kultivace tkáňových kultur a aplikace moderních instrumentálních analytických metod v rámci rozvíjející se disciplíny metabolomiky.

Na základě NMR a MS výsledků nebyly detekovány kanabinoidy v kontrolních nebo elicitovaných suspenzních kulturách *Cannabis sativa* L.. Také ostatní sekundární metabolity nebyly zaznamenány pomocí NMR. Pro úplné vyhodnocení ostatních sekundárních metabolitů, pokud byly přítomny, by bylo nezbytné využít citlivější analytické metody a jejich kombinace. Lze shrnout, že v suspenzních, kalusových a embryonálních kulturách *Cannabis sativa* L. nebyla s využitím elicitace pektinem nebo jasmonovou kyselinou stimulována biosyntéza kanabinoidů.

Na základě kvantifikace produkovaných sloučenin a sestrojených růstových křivek byly vyhodnoceny metabolity jednotlivých růstových fází. S využitím statistické metody PCA byly vyhodnoceny důsledky elicitací s návazností na identifikaci případně objasnění struktury metabolitů. Bylo identifikováno maximum možných signálů ^1H NMR spekter a objasněny struktury u neznámých sloučenin s využitím 2D NMR.

Výsledky získané z NMR měření a PCA analýz předkládají ucelený obraz primárního metabolismu kultur, který však pravděpodobně nesměřuje v biosyntetických drahách ke složitějším strukturám sekundárních metabolitů. Jednoznačně byl elicitací aktivován metabolismus kyseliny šikimové vedoucí k aromatickým stavebním kamenům, který ovšem není součástí metabolické dráhy kanabinoidů. Na druhou stranu detekce signálů typických pro terpenové metabolity v chloroformové frakci dokládá aktivitu deoxyxylulózové a mevalonátové metabolické cesty vedoucí k C_5 isoprenovým jednotkám. Jednou z důležitých podmínek pro produkci sekundárních metabolitů je ovšem také kompartmentizace v rostlině, která může být u nediferencovaných buněčných kultur překážkou v úspěšnosti experimentu. V případě konopí je důležitou podmínkou tvorba specializovaných žlaznatých trichomů, ve kterých dochází k odblokování nezbytných enzymových systémů biosyntézy. Takto lze předpokládat, že i při dostatečném zásobení stavebními kameny nezbytnými pro kanabinoidní strukturu, není aktivován již brzký enzymový systém biosyntézy kanabinoidů představovaný olivetol syntázou a nedochází k tvorbě prekursoru olivetolové kyseliny. Ve stádiu výzkumů zůstává také charakterizace dalších izoform polyketidsyntáz, které mohou zajišťovat jak biosyntézu kanabinoidů, tak přesmykovat metabolickou dráhu na jiné sekundární

metabolity např. flavonoidy nebo stilbenoidy s využitím stavebních kamenů acetátového metabolismu ²⁵⁷⁾.

Předloženou analýzou byl důkladně prozkoumán metabolismus suspenzních kultur a NMR záznamy budou sloužit pro další experimenty s daným biologickým materiálem. Nedílnou součástí bude dále porovnání s extrakty intaktních rostlin, které představují z hlediska NMR analýzy nesrovnatelně složitější systém, který bude však s využitím údajů uvedených v této práci jednodušeji interpretovatelný. Uvedená data jsou také nezbytná pro další experimenty molekulárně biologického zaměření, zejména v dalších výzkumech týkajících se brzkých stádií metabolické dráhy kanabinoidů, jmenovitě studia polyketid syntáz ²⁵⁸⁾.

VII. Summary

The literature review concerning *Cannabis sativa* L. was prepared with focus on the biologically active compounds. The scope of cell cultures biotechnology and application of modern instrumental analytical methods in the field of metabolomics was discussed.

Based on the NMR and MS results, no cannabinoids were detected in the control or elicited cell suspension cultures of *Cannabis sativa* L. Also other secondary metabolites were not detected by NMR. Other more sensitive analytical methods and their combinations should be used for absolute evaluation of other secondary metabolites, if they are present. It can be concluded, that biosynthesis of the cannabinoids was not induced by pectin or jasmonic acid as elicitors in the suspension, callus or embryogenic tissue cultures of *Cannabis sativa* L.

Main metabolites of certain growth phases were evaluated based on the quantification of produced metabolites and prepared growth phase curves. The impacts of elicitations were interpreted by PCA statistical method, with subsequent metabolite identification or structure elucidation. Maxima of possible ^1H NMR signals were identified and 2D NMR experiments were applied for signals of unknown compounds.

The results from NMR measurements combined with PCA analysis brought comprehensive picture of the cultures' primary metabolism, which is not however directed through biosynthetic pathways to the complex structures of secondary metabolites. Unambiguously was induced metabolism of shikimic acid pathway leading to the aromatic building stones, which are indeed not part of the cannabinoids metabolism. On the other hand detection of terpene signals in chloroform fraction is proof of deoxyxylulose and mevalonate metabolic pathways leading to C_5 isoprene units. Compartmentization is also one of the major requirements for secondary metabolites production, which can be handicap of successful experiment in case of the nondifferentiated cell cultures. For cannabis the presence of glandular trichomes with specific enzymatic apparatus is necessary condition. Based on this knowledge we can expect that even with sufficient supply of the cannabinoids biosynthetic building stones, the necessary enzymatic apparatus representing by olivetolic synthase is not activated in early stages and therefore olivetolic acid as major precursor is not synthesized. In the field of research also remains characterization of other polyketide synthase isoforms, which could be involved in the biosynthesis of cannabinoids or rearrange metabolic pathway to the other secondary metabolites using acetate as building block like flavonoids or stilbenoids²⁵⁷).

By our analysis was comprehensively studied metabolism of the suspension cultures and achieved NMR results will be used in next experiments with the biological material. Integral part will be comparison of the data with intact plant extracts, which represent distinctively much more complex system from the ^1H NMR analysis point of view. Our data will be used in subsequent experiments of chemical or molecular biology way, especially concerning early stages of cannabinoids metabolism, namely in the study of polyketide synthase izoforms²⁵⁸).

VIII. Použité zkratky

2-AG	2-arachidonoyl glycerol
2,4-D	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
5-HT ₃	5-hydroxytryptamin, serotonin
11-OH-THC	11-hydroxytetrahydrokanabinol
AD	Alzheimerova choroba
ALS	amyotrofická laterální skleróza
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CB _{1,2}	kanabinoidní receptor typ 1 a 2
CBC	kanabichromen
CBD	kanabidiol
CBDV	kanabidivarin
CBG	kanbigerol
CBGM	kanabigerol monometyleter
CBN	kanabinol
CE	kapilární elektroforéza
CNS	centrální nervová soustava
CoA	koenzym A
COSY	correlation spectroscopy
COX-2	cyklooxygenáza 2
CYP 450	cytochrom P450
ČR	Česká republika
DHA	dokosahexaenová kyselina
EPA	eikosapentaenová kyselina
ES	endokanabinoidní systém
EU	Evropská unie
FAAH	hydroláza amidu mastných kyselin
FID	free induction decay
FT	fourierova transformace
GABA	γ-aminomáselná kyselina
GC	plynová chromatografie
HD	Huntingtonova chorea

HMBC	heteronuclear multiple bond coherence
HSQC	Heteronucler single quantum coherence
IAA	indol-3-octová kyselina
IČ	infračervená spektroskopie
IFN- γ	interferon γ
IgE	imunoglobulin E
IL	interleukin
IP ₃	inositol trifosfát
J-res	J - resolved
LC	kapalinová chromatografie (HPLC, UPLC)
LOX	lipoxygenáza
LSD	Dietylamid kyseliny lysergové
LTB ₄	leukotrien B ₄
MRSA	metycilyn rezistentní <i>Stafylokokus aureus</i>
NAA	naftyloctová kyselina
NK-1	neurokininový receptor
NMR	nuklární magnetická rezonance
MS	hmotnostní spektrometrie
OKTE	odbor kriminalisticko technických expertýz (Policie ČR)
PCA	analýza hlavních komponent, Principal component analysis
PD	Parkinsonova choroba
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PGI ₂	prostacyklin
PPAR- γ	metabolické jaderné receptory; receptory aktivované proliferátory peroxizomů
THCA	tetrahydrokanabinolová kyselina
THC	tetrahydrokanabinol
THC-9-COOH	11-nor- Δ^9 -tetrahydrokanabinol-9-karboxylové kyseliny
THCV	tetrahydrokanabivarin
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TNF- α	tumor nekrotizující faktor
TRPV	vaniloidní typ receptoru

IX. Seznam použité literatury

1. Jahodář, L.: Farmakobotanika, semenné rostliny. Praha, Karolinum, 2006, s. 87.
2. Tulp, M., Bohlin, L.: Bioorg. Med. Chem., 2005; 13, s. 5274-5282.
3. Verpoorte, R., Choi, Y., H., Kim, H., K.: J. Ethnopharmacol., 2005; 100, s. 53-56.
4. Heinrich, M.: Phytochem. Lett., 2008; 1, s. 1-5.
5. Peč, J., Riedingerová, E., Martin, J. et al.: Čes. Slov. Farm., 2008; 57, s. 195-207.
6. Canter, P., H., Thomas, H., Ernst, E.: Trends in Biotechnology, 2005; 23 (4), s. 180-185.
7. Vodrážka, Z.: Biotechnologie. Praha, Academia, 1992, s. 63-72
8. Hagel, J., M., Facchini, P., J.: Phytochem. Rev., 2008; 7, s. 479-497.
9. Verpoorte, R., Choi, Y., H., Mustafa, N., R. et al.: Phytochem. Rev., 2008; 7, s. 525-537.
10. Hejný, S., Slavík, B.: Květena České socialistické republiky, 1. díl. Praha, Academia, 1988, s. 528-530.
11. Guy, G., W., Whittle, B., A., Robson, P., J. eds.: The Medicinal Uses of Cannabis and Cannabinoids. London, Pharmaceutical Press, 2004, s. 71-79, 103-129, 141-197.
12. Brown, D., T. eds.: Cannabis: the Genus *Cannabis*. (Medicinal and aromatic plants: industrial profiles; v. 4). Amsterdam, Harwood Academic Publishers, 1998, s. 55-67, 253-272.
13. Dewick, P., M.: Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach. 2nd ed. Chichester, J. Wiley & Sons Ltd., 2001, s. 85-89.
14. Russo, E., B.: Chem. Biodiv., 2007; 4 (8), s. 1614-1648.
15. Aldrich, M., R.: History of therapeutic cannabis; In: Mathre, M., L. eds.: Cannabis in medical practise. Jefferson, McFarland, 1997, s. 35-55.
16. Drábek, P.: Čes. Slov. Farm., 2008; 57, s. 126-131.
17. Janick, J.: Horttechnology, 2003; 13 (2), s. 229-238.
18. Mathioli, P., O.: Herbář neboli bylinář. Svazek II. Olomouc, Fontána, 1999, s. 746-748.
19. Evans, W., C.: Trease and Evans Pharmacognosy. 15th ed. Edinburg, W. B. Saunders, 2002, s. 53-54, 65, 501-503, 530, 532, 537.
20. Specifications of cannabis varieties Bedrocan, Bedrobinol and Bediol; <http://www.cannabisoffice.nl/eng/index.html> (15. 10. 2008).
21. Ben Amar, M.: J. Ethnopharmacol., 2006; 105, s. 1-25.
22. Kolektiv autorů: Český lékopis 2005. Praha, Grada, 2005.
23. European Pharmacopoeia 6th Edition, 2008 (6.2); http://www.edqm.eu/site/Online_Publications-581.html (15. 10. 2008).

24. <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/marihuana/index-eng.php> (15. 10. 2008).
25. Bruneton, J.: *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants*. 2nd ed. Paris, Lavoisier Publishing Inc., 1999, s. 445-459.
26. <http://www.gwpharm.com> (15. 10. 2008).
27. <http://www.prairieplant.com/medicinal-marijuana.htm> (15. 10. 2008).
28. <http://www.medicalmarijuana.org> (15. 10. 2008).
29. Situační a výhledová zpráva len a konopí, červen 2008; <http://www.mze.cz> (15. 10. 2008).
30. Kabátová, N.: *Bulletin Národní referenční laboratoře*, 2005; IX(3), s. 33-58.
31. Zákon č. 167/1998 Sb. o návykových látkách a o změně některých dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů.
32. Grotenhermen, F.: *Chem. Biodiv.*, 2007; 4 (8), s. 1744-1769.
33. Hrdina, V., Hrdina, R., Jahodář, L. et al.: *Přírodní toxiny a jedy*. Praha, Galén a Karolinum, 2004, s. 87.
34. Di Forty, M., Morrison, P., D., Butt, A. et al.: *Curr. Opin. Psychiatry*, 2007; 20, s. 228-234.
35. Budney, A., J., Moore, B., A.: *J. Clin. Pharmacol.*, 2002; 42, s. 28S-33S.
36. McRae, A., L., Budney, A., L., Brady, K., T.: *J. Subst. Abuse Treat.*, 2003; 24, s. 369-376.
37. Benyamina, A., Lecacheux, M., Blecha, L. et al.: *Expert Rev. Neurother.*, 2008; 8 (3), s. 479-491.
38. Lachenmeier, D., W., Kroener, L., Musshoff, F. et al.: *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004; 378, s. 183-189.
39. Leson, G., Pless, P., Grotenhermer, F. et al.: *J. Anal. Toxicol.*, 2001; 25 (8), 691-698.
40. Yotoriyama, M., Ishiharajima, E., Kato, Y. et al.: *J. Health Sci.*, 2005; 51 (4), s. 483-487.
41. Holler, J., M., Bosy, T., Z., Dunkley, C., S. et al.: *J. Anal. Toxicol.*, 2008; 32 (6), s. 428-432.
42. Oomah, B., D., Busson, M., Godfrey, D., V. et al.: *Food Chem.*, 2002; 76, s. 33-34.
43. Deferne, J., L., Pate, D., W.: *J. Int. Hemp Assoc.*, 1996; 3 (1), s. 1-7.
44. Kriese, U., Schumann, E., Weber, W., E. et al.: *Euphytica*, 2004; 137, s. 339-351.
45. Ranalli, P., Venturi, G.: *Euphytica*, 2004; 140, s. 1-6.
46. Hazekamp, A.: *Cannabinoids*, 2006; 1, s. 1-9.
47. <http://www.sensiseeds.com> (15. 10. 2008).
48. <http://www.psp.cz/sqw/text/tiskt.sqw?O=5&CT=410&CT1=0> (15. 10. 2008).
49. http://www.drogy-info.cz/index.php/info/drogy_a_zakon (15. 10. 2008).

50. Dussy, F., E., Hamberg, C., Luginbühl, M. et al.: *Forensic. Sci. Int.*, 2005; 149, s. 3-10.
51. Raharjo, T., J., Verpoorte, R.: *Phytochem. Anal.*, 2004; 15, s. 79-94.
52. Lowe, R., H., Karschner, E., L., Schwilke, E., W. et al.: *J. Chromatogr. A*, 2007; 1163, s. 318-327.
53. Fernandez, M., R., De Boeck, G., Wood, M. et al.: *J. Chromatogr. B*, 2008; doi:10.1016/j.jchromb.2008.09.032.
54. Pil, K., Verstraete, A.: *Ther. Drug Monit.*, 2008; 30 (2), s. 196-202.
55. Huestis, M., A.: *Chem. Biodiv.*, 2007; 4 (8), s. 1770-1804.
56. Baptista, M., J., Monsanto, P., V., Marques, E., G., P. et al.: *Forensic Sci. Int.*, 2002; 128, s. 66-78.
57. Turner, C., E., ElSohly, M., A., Boeren, E., G.: *J. Nat. Prod.*, 1980; 43 (2), s. 169-234.
58. ElSohly, M., A., Slade, D.: *Life Sci.*, 2005; 78, s. 539-548.
59. Flores-Sanchez, I., J., Verpoorte, R.: *Phytochem. Rev.*, 2008; 7, s. 615-639.
60. Radwan, M., M., Ross, S., A., Slade, D. et al.: *Planta Med.*, 2008; 74 (3), s. 267-272.
61. Ahmed, S., A., Ross, S., A., Slade, D. et al.: *Tetrahedron Letters*, 2008; 49, s. 6050-6053.
62. Ahmed, S., A., Ross, S., A., Slade, D. et al.: *J. Nat. prod.*, 2008; 71, s. 536-542.
63. Fellermeier, M., Eisenreich, W., Bacher, A. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 2001; 268, s. 1596-1604.
64. Taura, F., Morimoto, S., Shoyama, Y.: *Phytochemistry*, 1995; 39 (2), s. 457-458.
65. Mechoulam, R., Hanuš, L.: *Chem. Phys. Lipids*, 2002; 121, s. 35-43.
66. Botta, B., Gacs-Baitz, E., Vinciguerra, V. et al.: *Phytochemistry*, 2003; 64, s. 599-602.
67. Toyota, M., Kinugawa, T., Asakawa, Y.: *Phytochemistry*, 1994; 37 (3), s. 859-862.
68. Raharjo, T., J., Chang, W., T., Choi, Y., H. et al.: *Plant Sci.*, 2004; 166, s. 381-385.
69. Ross, S., A., ElSohly, M., A.: *J. Pharm. Sci.*, 1995; 4 (2), s. 1-10.
70. Ross, S., A., ElSohly, M., A., Sultana, G., N., N. et al.: *Phytochem. Anal.*, 2005; 16, s. 45-48.
71. Bohm, B., A.: *Bot. J. Linn. Soc.*, 1979; 79, s. 249-257.
72. Segelman, A., B., Segelman, F., P., Star, A., E. et al.: *Phytochemistry*, 1978; 17, s. 824-826.
73. Vanhoenacker, G., van Rompaey, P., de Keukeleire, D. et al.: *Nat. Prod. Lett.*, 16(1), s. 57-63.
74. Choi, Y., H., Hazekamp, A., Peltenburg-Looman, A., M., G. et al.: *Phytochem. Anal.*, 2004; 15, s. 345-354.

75. Radwan, M., M., ElSohly, M., A., Slade, D. et al.: *Phytochemistry*, 2008; doi:10.1016/j.phytochem.2008.07.010.
76. Ngadjui, B., T., Abegaz, B., M., Dongo, E. et al.: *Phytochemistry*, 1998; 48 (2), s. 349-354.
77. Ngadjui, B., T., Kouam, S., F., Dongo, E. et al.: *Phytochemistry*, 2000; 55, s. 915-919.
78. Jang, J., Na, M., Thuong, P., T. et al.: *Chem. Pharm. Bul.*, 2008; 56 (1), s. 85-88.
79. Almeida, J., R., G., S., Barbosa-Filho, J., M., Cabral, A., G., S. et al.: *J. Braz. Chem. Soc.*, 2005; 16, s. 1454-1457.
80. Kamazawa, S., Ueda, R., Hamasaka, T. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2007; 55 (19), s. 7722-7725.
81. Hendrich, A., B., Malon, R., Pola, A. et al.: *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2002; 16, s. 201-208.
82. Crombie, L., Crombie, W., M., L.: *Tetrahedron Lett.*, 1978; 47, s. 4711-4714.
83. Crombie, L., Crombie, W., M., L., Jamieson, S., L.: *Tetrahedron Lett.*, 1979; 7, s. 661-664.
84. Crombie, L., Crombie, W., M., L., Jamieson, S., L.: *Tetrahedron Lett.*, 1980; 21, s. 3607-3610.
85. van der Bosch, J., J., K., Salemink, C., A.: *J. Royal Neth. Chem. Soc.*, 1978; 97, s. 221-222.
86. Majumder, P., L., Guha, S., Sen, S.: *Phytochemistry*, 1999; 52, s. 1365-1369.
87. Hammond, C., T., Mahlberg, P., G.: *Phytochemistry*, 1994; 37, s. 755-756.
88. Ross, S., A., ElSohly, M., A.: *J. Nat. Prod.*, 1996; 59, s. 49-51.
89. Novak, J., Franz, C.: *J. Ess. Oil Res.*, 2003; 15(3), s. 158-160.
90. ElSohly, M., A., Turner, C., E., Phoebe, C., H. et al.: *J. Pharm. Sci.*, 1978; 67, s. 124.
91. Turner, C., E., Hsu, M., H., Knapp, J., E. et al.: *J. Pharm. Sci.*, 1976; 65 (7), s. 1084-1085.
92. Sakakibara, I, Kotsuhara, T., Ikeya, Y. et al.: *Phytochemistry*, 1991; 30, s. 3013-1016.
93. Sakakibara, I, Ikeya, Y., Hayashi, K. et al.: *Phytochemistry*, 1992; 31, s. 1219-1223.
94. Sakakibara, I, Ikeya, Y., Hayashi, K. et al.: *Phytochemistry*, 1995; 38, s. 1003-1007.
95. Ge, F., Tang, C., P., Ye, Y.: *Helv. Chim. Acta*, 2008; 91, s. 1023-1030.
96. Henrici, A., Kaloga, M., Eich, E.: *Phytochemistry*, 1994; 37, s. 1637-1640.
97. Calder, P., C., Miles, E., A.: *Pediatr. Allergy. Immunol.*, 2000; Suppl 13, s. 29-36.
98. Callaway, J., C.: *Euphytica*, 2004; 140, s. 65-72.
99. Wang, X., Tang, C., Yang, X. et al.: *Food Chem.*, 2008; 107, s. 11-18.
100. Yu, L., L., Zhou, K., K., Parry, J.: *Food. Chem.*, 2005; 91, s. 723-729.

101. Leizer, C., Ribnicky, D., Poulev, A. et al.: *J. Nutraceuticals Funct. Med. Foods*, 2000; 2(4), s. 35-53.
102. Simopoulos, A., P.: *J. Am. Coll. Nutr.*, 2002; 21 (6), s. 495-505.
103. McPartland, J., M., Russo, E., B.: *J. Cannabis. Ther.*, 2001; 1 (3/4), s. 103-132.
104. Bisogno, T.: *J. Neuroendocrinol.*, 2008; 20 (Suppl. 1), s. 1-9.
105. Howlett, A., C., Barth, F., Bonner, T., I. et al.: *Pharmacol. Rev.*, 2002; 54, s. 161-202.
106. Viveros, M., P., Marco E., M., Llorente R. et al.: *Neural Plast.*, 2007; 2007, s. 1-12.
107. Sander, B., Flygare, J.: *Semin. Cancer Biol.*, 2008; 18 (3), s. 176-189.
108. Labar, G., Micheaux, C.: *Chem. Biodiv.*, 2007; 4 (8), s. 1882-1902.
109. Wang, J., Ueda, N.: *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 2008; 17, s. 1-10.
110. Kunos, G.: *Am. J. Med.*, 2007; 120 (9A), s. S18-S24.
111. Rea, K., Roche, M., Finn, D., M.: *Br. J. Pharmacol.*, 2007; 152, s. 633-648.
112. Costa, B.: *Chem. Biodiv.*, 2007; 4 (8), s. 1664-1677.
113. Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T., Kano, M.: *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2007; 17, s. 360-365.
114. Fišar, Z.: *Chem. Listy*, 2006; 100, s. 314-322.
115. Bisogno, T., Di Marzo, V.: *Pharmacol. Res.*, 2007; 56, s. 428-442.
116. Hohman, A., G., Suplita, R., L.: *AAPS J.*, 2006; 8 (4), s. E693-E708.
117. Klein, T., W., Newton, C., T.: *Therapeutic Potential of Cannabinoid-Based Drugs*. In: Shurin, M., R., Smolkin, Y., S. eds. *Immune Mediated Disease* vol. 601, New York, Springer, 2007, s. 395-413.
118. Pacher, P., Sándor, B., Kunos, G.: *Pharmacol. Rev.*, 2006; 58, s. 389-462.
119. Benito, C., Tolón, R., M., Pazos, M., R. et al.: *Br. J. Pharmacol.*, 2008; 153, s. 277-285.
120. Partwee, R., G.: *Br. J. Pharmacol.*, 2008; 153, s. 199-215.
121. Basavarajappa, B., S.: *Protein. Pept. Lett.*, 2007; 14 (3), s. 237-246.
122. Rouzer, C., A., Lawrence, J., M.: *J. Biol. Chem.*, 2008; 283 (13), s. 8065-8069.
123. Russo, E., B., Guy, G., F., Robson, P., J.: *Chem. Biodiv.*, 2007; 4 (8), s. 1729-1743.
124. Hayakawa, K., Mishima, K., Hazekawa, M. et al.: *Brain Res.*, 2008; 1188, s. 157-164.
125. Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E. et al.: *Chem. Biodiv.*, 2007; 4 (8), s. 1678-1692.
126. Micromedex[®] Healthcare Series, Thomson Micromedex, <http://www.thomsonhc.com> (20. 5. 2008).
127. Wright, K., L., Duncan, M., Sharkey, K., A.: *Br. J. Pharmacol.*, 2008; 153, s. 263-270.

128. Haney, M., Gunderson, E., W., Rabkin, J. et al.: *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.*, 2007; 45, s. 545-554.
129. Hradec, J.: *Remedia*, 2005; 2, s. 163-168.
130. Bellocchio, L., Vicennati, V., Cervino, C. et al.: *Am. J. Cardiol.*, 2007; 100 (suppl), s. 7P-17P.
131. <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php> (20. 5. 2008, Acomplia).
132. Mikro-verze AISLP – ČR, 2008.1 pro MS Windows.
133. Mitchel, P., B., Morris, M., J.: *Lancet*, 2007; 370, s. 1671-1672.
134. <http://www.sukl.cz/sukl-upozornuje-na-kontraindikace-u-pripravku-acomplia> (20. 5. 2008).
135. Pan, H., L., Wu, Z., Z., Zhou, H., Y. et al.: *Pharmacol. Ther.*, 2008; 117, s. 141-161.
136. Nurmikko, T., J., Serpell, M., G., Hoggart, B. et al.: *Pain*, 2007; 133, s. 210-220.
137. Lienau, F., S., Füllgraf, H., Moser, A. et al.: *Eur. J. Neurol.*, 2007; 14, s. 1162-1169.
138. <http://www.gwpharm.com/sativex.asp> (20. 5. 2008).
139. Docagne, F., Mestre, L., Loría, F. et al.: *Expert Opin. Ther. Targets*, 2008; 12 (2), s. 185-189.
140. Smith, P., F.: *Expert. Rev. Neurother.*, 2007; 7 (9), s. 1157-1163.
141. Papathanasopoulos, P., Messinis, L., Lyros, E. et al.: *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, 2008; 20, s. 36-51.
142. Centonze, D., Finazzi-Agró, A., Bernardi, G. et al.: *Trends Pharmacol. Sci.*, 2007; 28 (4), s. 180-187.
143. Micale, V., Mazzola, C., Drago, F.: *Pharmacol. Res.*, 2007; 56, s. 382-392.
144. Gilbert, G., L., Kim, H., J., Waataja, J., J. et al.: *Brain Res.*, 2007; 1128, s. 61-69.
145. Seamon, M., J., Fass, J., A., Maniscalco-Feichtl, M. et al.: *Am. J. Health-Syst. Pharm.*, 2007; 64, s. 1037-1044.
146. Lunn, C., A., Reich, E., Fine, J., S. et al.: *Br. J. Pharmacol.*, 2008; 153, s. 226-239.
147. Kunos, G., Gao, B.: *Gastroenterology*, 2008; 134 (2), s. 622-625.
148. Hézode, C., Zafrani, E., S., Roudot-Thoraval, F. et al.: *Gastroenterology*, 2008; 134 (2), s. 432-439.
149. Ricci, G., Cacciola, G., Altucci, L. et al.: *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2007; 153, s. 320-322.
150. Yzulla, S.: *Prog. Ret. Eye Res.*, 2008; 27, s. 501-526.
151. Haughey, H., M., Marshall, E., Schacht, J., P. et al.: *Addiction*, 2008; 103, s. 1678-1686.

152. Harkany, T., Guzmán, M., Galve-Roperh, I. et al.: *Trends. Pharmacol. Sci.*, 2006; 28, s. 83-92.
153. Solinas, M., Yasar, S., Goldberg, S., R.: *Pharmacol. Res.*, 2007; 56, s. 393-405.
154. Fattore, L., Fadda, P., Fratta, W.: *Pharmacol. Res.*, 2007; 56, s. 418-427.
155. Saario, S., M., Laitinen, J., T.: *Bas. Clin. Pharma. & Tox.*, 2007; 101, s. 287-293.
156. <http://www.cannabisoffice.nl/eng/index.html>, Information for physicians and pharmacists (15. 10. 2008).
157. Hall, W., Deghardt, L.: *World Psychiatry*, 2008; 7, s. 68-71.
158. Kalant, H.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2008; 83 (4), s. 517-519.
159. Aldington, S., Harwood, M., Cox, B. et al.: *Eur. Respir. J.*, 2008; 31, s. 280-286.
160. Aldington, S., Harwood, M., Cox, B. et al.: *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2008; 138 (3), s. 374-380.
161. Hazekamp, A., Ruhaak, R., Zuurman, L. et al.: *J. Pharm. Sci.*, 2006; 95, s. 1308-1317.
162. <http://www.storz-bickel.com/vaporizer/volcano-vaporization-system.html> (20. 5. 2008).
163. Dussy, F., E., Hamberg, C., Luginbühl, M. et al.: *Forensic. Sci. Int.*, 2005; 149, s. 3-10.
164. Williamson, E., M.: *Phytomed.*, 2001; 8 (5), s. 401-409.
165. Hazekamp, A., Bastola, K., Rashidi, H. et al.: *J. Ethnopharmacol.*, 2007; 113, s. 85-90.
166. Novak, J., Zitterl-Eglseer, K., Deans, S., G. et al.: *Flavour Fragr. J.*, 2001; 16, s. 259-262.
167. Tognolini, M., Barocelli, E., Ballabeni, V. et al.: *Life Sci.*, 2006; 78, s. 1419-1432.
168. Gersch, J., Leonti, M., Raduner, S. et al.: *PNAS*, 2008; 105 (26), s. 9099-9104.
169. Barrett, M., L., Scutt, A., M., Evans, F., J.: *Experientia*, 1986; 42 (4), s. 452-453.
170. Comelli, F., Giagnoni, E., Bettoni, I. et al.: *Phytother. Res.*, 2008; 22, s. 1017-1024.
171. Chi, Y., S., Jong, H., G., Son, K., H. et al.: *Biochem. Pharmacol.*, 2001; 62, s. 1185-1191.
172. Stevens, J., F., Page, J., E.: *Phytochemistry*, 2004; 65, s. 1317-1330.
173. Zhang, Y., Z., Xu, G., B., Zhang, T.: *J. Asian. Nat. prod. Res.*, 2008; 10 (7-8), s. 639-644.
174. Kosteckí, K., Engelmeier, D., Pacher, T. et al.: *Phytochemistry*, 2004; 65, s. 99-106.
175. Lin, L., Yang, X., Tang, C. et al.: *Phytochemistry*, 2008; 69, s. 457-463.
176. Boonphong, S., Puangsombat, P., Baramée, A. et al.: *J. Nat. Prod.*, 2007; 70, s. 795-801.
177. Apisantiyakom, S., Kittakoop, P., Manyum, T. et al.: *Chem. Biodiv.*, 2004; 1, s. 1694-1701.
178. Mu, F., Hamel, E., Lee, D., J. et al.: *J. Med. Chem.*, 2003; 46, s. 1670-1682.
179. Kovács, A., Forgo, P., Zupkó, I. et al.: *Phytochemistry*, 2007; 68, s. 687-691.

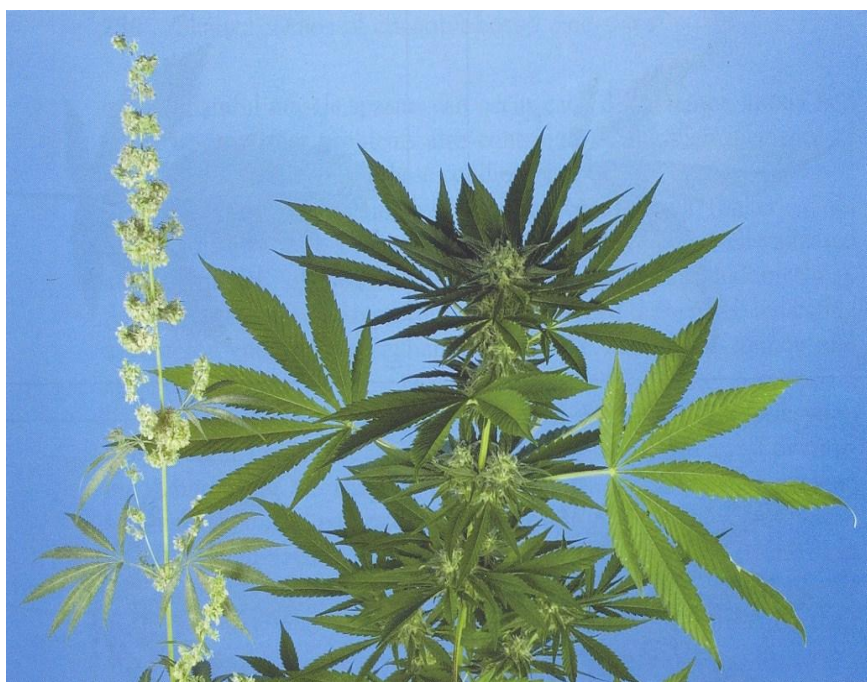
180. Morita, H., Koyama, K., Sugimoto, Y. et al.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005; 15, s. 1051-1054.
181. Lee, K., Y., Sung, S., H., Kim, Y., C.: *J. Nat. Prod.*, 2006; 69, s. 679-681.
182. Matsuda, H., Morikawa, T., Xie, H. et al.: *Planta Med.*, 2004; 70 (9), s. 847-855.
183. Ma, C., Y., Liu, W., K., Che, C., T.: *J. Nat. Prod.*, 2002; 65, s. 206-209.
184. Li, J., X., Shi, Q., Xiong, Q., B. et al.: *Planta Med.*, 1998; 64, s. 628-631.
185. Simopoulos, A., P.: *Biomed. Pharmacother.*, 2002; 56, s. 365-379.
186. Mayser, P., Grimm, H., Grimminger, F.: *Brit. J. Nutr.*, 2002; Suppl. 1, 87, s. S77-S82.
187. Wolters, M.: *Brit. J. Dermatol.*, 2005; 153, s. 706-714.
188. James, M., J., Gibson, R., A., Cleland, L., G.: *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000; Suppl 71, s. 343S-348S.
189. Mazza, M., Pomponi, M., Janiri, L. et al.: *Prog. Neuro-Psychoph.*, 2006; 31, s. 12-26.
190. Žák, A., Tvrzická, E., Zeman, M. et al.: *Čas. Lék. Čes.*, 2005; Suppl. 1, 144, s. 6-18.
191. Callaway, J., Schwab, U., Harvima, I. et al.: *J. Dermatol. Treat.*, 2005; 16, s. 87-94.
192. Focke, M., Sesztak-Greinecker, G., Brannath, W. et al.: *Wien Klin. Wochenschr.*, 2005; 117, s. 485-491.
193. van Gool, C., J., A., W., Thijs, C., Henquet, C., J., M.: *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003; 77, s. 943-951.
194. van Gool, C., J., A., W., Zeegers, M., P., A., Thijs, C.: *Brit. J. Dermatol.*, 2004; 150, s. 728-740.
195. Horrobin, D., F.: *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000; Suppl. 71, s. 367S-372S.
196. Schmiedbergerová, R.: *Prakt. Lékařen.*, 2006; 6, s. 257-260.
197. Calder, P., C.: *Clin. Sci.*, 2004; 107, s. 1-11.
198. Al-Khalifa, A., Maddaford, T., G., Chahine, M., N. et al.: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2007; 292, s. R1198-R1203.
199. Karimi, I., Hayatghaibi, H.: *Pakistan. J. Nutr.*, 2006; 5 (6), s. 585-588.
200. Schwab, U., S., Callaway, J., C., Erkkilä, A., T.: *Eur. J. Nutr.*, 2006; 45, s. 470-477.
201. Goetz, P.: *Phytothérapie*, 2005; 2, s. 72-76.
202. Kováč, J.: *Explantátové kultury rostlin*. Olomouc, Vydavatelství Univerzity Palackého, 1995, s. 13-18, 50-52, 54.
203. Sikyta, B., Dušek, J.: *Biotechnologie pro farmaceuty*. Praha, Karolinum, 2001, s. 75-82.
204. Dušek, J., Dušková, J., Tůmová, L. et al.: *Čes. Slov. Farm*, 1996; 45 (4), s. 204-212.

205. Cole, I., B., Saxena, P., K., Murch, S., J.: *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 2007; 43, s. 318-327.
206. Rout, G., R., Samantaray, S., Das, P.: *Biotechnol. Adv.*, 2000; 18, s. 91-120.
207. Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J. et al.: *Fyziologie rostlin*. Praha, Academia, 1998, s. 93, 328, 329.
208. Kolewe, M., E., Gaurav, V., Roberts, S., C.: *Mol. Pharm.*, 2008; 5 (2), s. 243-256.
209. Harvey, A., L.: *Drug Discov. Today*, 2008; doi:10.1016/j.drudis.2008.07.004.
210. Rishton, G., M.: *Am. J. Cardiol.*, 2008; 101, s. 43D-49D.
211. Ramachandra Rao, S., Ravishankar, G., A.: *Biotechnol. Adv.*, 2002; 20, s. 101-153.
212. Vanisree, M., Lee, C., Lo, S. et al.: *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 2004; 45, s. 1-22.
213. Pacifico, D., Miselli, F., Carboni, A. et al.: *Euphytica*, 2008; 160, s. 231-240.
214. Veliky, I., A., Ganest, K.: *Lloydia*, 1972; 35, s. 450-456.
215. Heitrich, A., Binder, M.: *Experientia*, 1982; 38, s. 898-899.
216. Braemer, R., Tsoutsias, Y., Hurabielle, M. et al.: *Planta Med.*, 1987; 53, s. 225-226.
217. Itokawa, H., Takeya, K., Mihashi, S.: *Chem. Pharm. Bul.*, 1977; 25, s. 1941-1946.
218. Loh, W., H., T., Hartsel, S., C., Robertson, L., W.: *Z. Pflanzenphysiol. Bd.*, 1983; 111, s. 395-400.
219. Loh, W., H., T., Hartsel, S., C., Robertson, L., W.: *Planta Med.*, 1983; 48, s. 17-19.
220. Verpoorte, R., van der Heijden, R., ten Hoopen, H., J., G. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 1999; 21, s. 467-479.
221. Vasconsuelo, A., Boland, R.: *Plant Sci.*, 2007; 172, s. 861-875.
222. Zhao, J., Davis, L., C., Verpoorte, R.: *Biotechnol. Adv.*, 2005; 23, s. 283-333.
223. Oskman-Caldentey, K., M., Inzé, D.: *Trends Plant Sci.*, 2004; 9, s. 433-440.
224. Sumner, L., W., Mendes, P., Dixon, R., A.: *Phytochemistry*, 2003; 62, s. 817-836.
225. Oldiges, M., Lütz, S., Pflug, S. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007; 76, s. 495-511.
226. Hollywood, K., Brison, D., R., Goodacre, R.: *Proteomics*, 2006; 6, s. 4716-4723.
227. Hall, D., R.: *New Phytol.*, 2006; 169, s. 453-468.
228. Rochfort, S.: *J. Nat. Prod.*, 2005; 68, s. 1813-1820.
229. Shulaev, V.: *Brief. Bioinform.*, 2006; 7, s. 128-139.
230. Fukusaki, E., Kobayashi, A.: *J. Biosci. Bioeng.*, 2005; 100, s. 347-354.
231. Choi, Y., H., Choi, H., Hazekamp, A. et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, 2003; 51 (2), s. 158-161.
232. Choi, Y., H., Kim, H., K., Wilson, E., G. et al.: *Anal. Chim. Acta*, 2004; 512, s. 141-147.
233. Hazekamp, A., Choi, Y., H., Verpoorte, R.: *Chem. Pharm. Bull.*, 2004; 52 (6), s. 718-721.

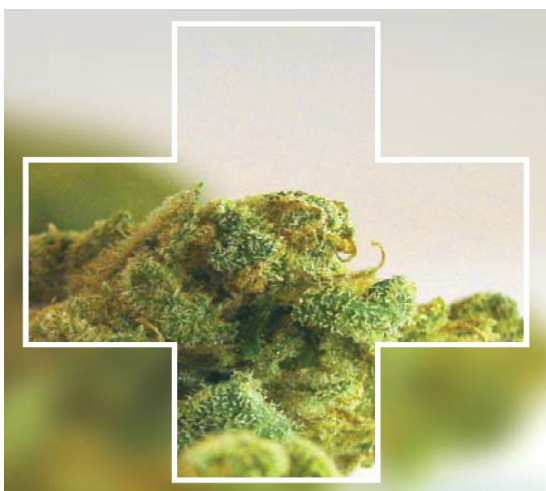
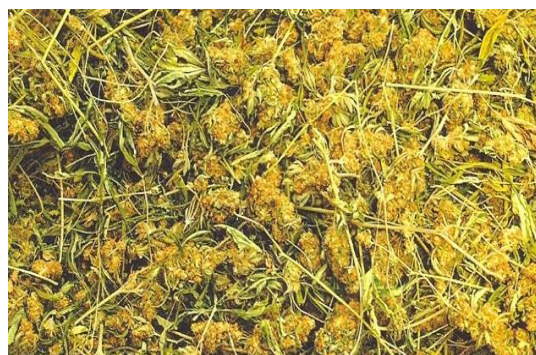
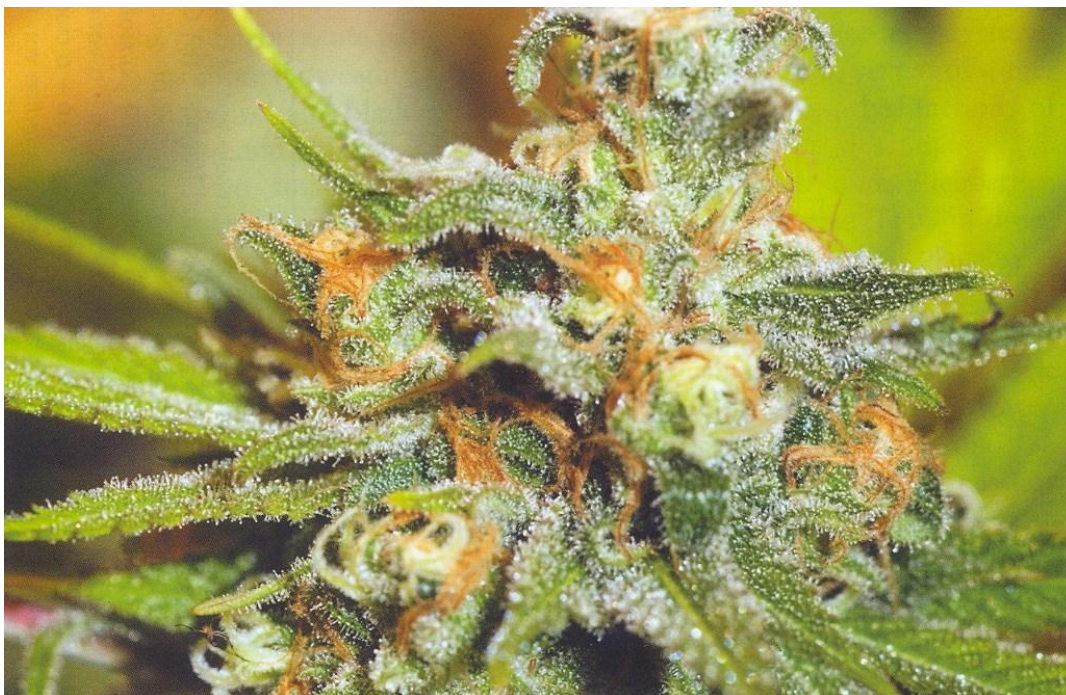
234. Politi, M., Peschel, W., Wilson, N. et al.: *Phytochemistry*, 2008; 69, s. 562-570.
235. Verpoorte, R., Choi, Y., H., Kim, H., K.: *Phytochem. rev.*, 2007; 6, s. 3-14.
236. Ward, J., L., Baker, J., M., Beale, M., H.: *FEBS J.*, 2007; 274, s. 1126-1131.
237. Eisenreich, W., Bacher, A.: *Phytochemistry*, 2007; 68, s. 2799-2815.
238. <http://www.genome.jp/kegg> (10.7.2009).
239. <http://www.hmdb.ca> (10.7.2009).
240. (<http://www.bmrw.wisc.edu/metabolomics> (10.7.2009).
241. <http://mmcd.nmrfa.wisc.edu> (10.7.2009).
242. Choi, Y., H., Kim, H., K., Hazekamp A. et al.: *J. Nat. Prod.*, 2004; 67, s. 953-957.
243. Eriksson, I., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N. et al.: *Multi- and Megavariate Data Analysis. Principles and Applications*. Umeå, Umeå University, 2001, s. 7-68.
244. Meloun, M., Militký, J.: *Kompndium statistického zpracování dat*. Praha, Academia, 2002, s.227-235.
245. Scuderi, C., De Filippis, D., Iuvone, T. et al.: *Phytother. Res.*, 2009; 23, s. 597-602.
246. Pisanti, S., Malfitano, A., M., Grimaldi, C. et al.: *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2009; 23, s. 117-131.
247. Stella, N.: *Neuropharm.*, 2009; 56, s. 244-253.
248. Akbas, F., Gasteygar, C., Sjödin, A. et al.: *Obes. Rev.*, 2009; 10, s. 58-67.
249. Murashige, T., Skoog, F.: *Physiol. Plant.*, 1962; 15, s. 473.
250. Gamborg, O., L., Miller, R., A., Ojima, K.: *Experimental cell research*, 1968; 50, s. 151-158.
251. Widholm, J., M.: *Stain tech.*, 1972; 47, s. 189-194.
252. Amano, T., Hirasawa, K., O'Donohue, M., J. et al.: *Anal. Biochem*, 2003; 314, s. 1-7.
253. Klemrová, V.: *Základy aplikované statistiky*. Praha, SPN, 1993, s. 30-31.
254. Gamborg, O., L., Philips, G., C.: *Plant cell, tissue and organ culture, Fundamental methods*. Berlin, Springer, 1995, s. 81-90.
255. Moriguchi, T., Masayuki, K., Tomono, Y. et al.: *Plant cell. Physiol.*, 1999; 40, s. 651-655.
256. Khatib, A., Wilson, E., G., Kim, H., K. et al.: *Anal. Chim. Acta*, 2006; 559, s. 264-270.
257. Flores-Sanchez, I., J., Verpoorte, R.: *Plant Cell. Physiol.*, 2008; 49(12), s. 1767-1782.
258. Flores-Sanchez, I., J., Peč, J., Fei, J. et al.: *J. Biotechnol.*, 2009; 143(2), s. 157-168.

X. Obrazová příloha

Příloha 1: Samčí a samičí rostlina *Cannabis sativa* L. ^{10, 11)}.

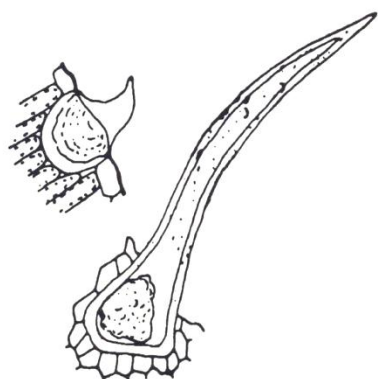


Příloha 2: Samičí květenství, sušená surová droga, farmaceutická droga ^{11, 20)}.

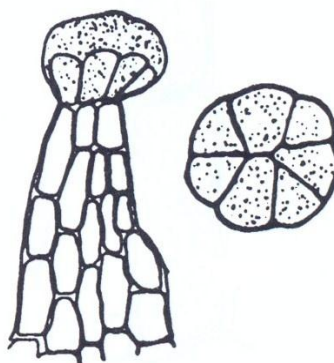


Příloha 3: Mikroskopická charakteristika konopí^{11, 19)}.

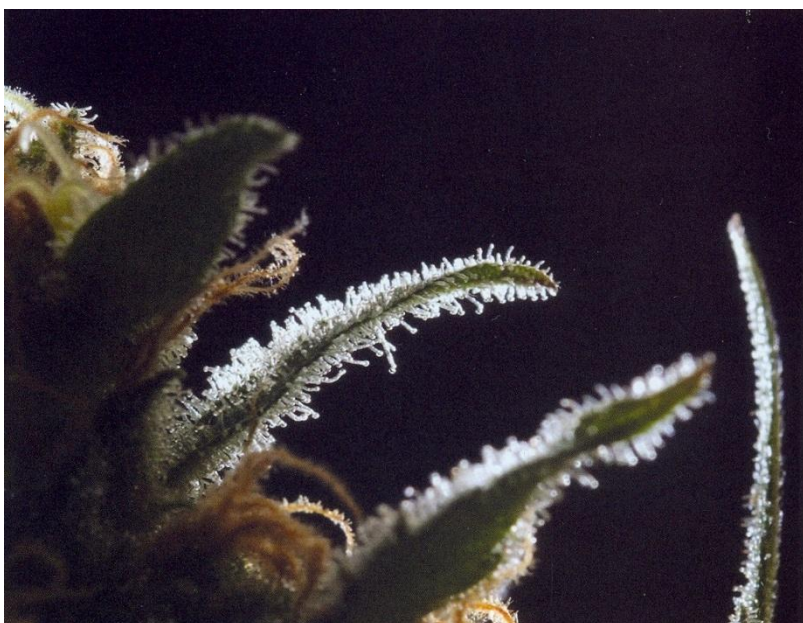
a) krycí trichomy



b) žlaznaté trichomy



Žlaznaté trichomy na samičím květenství v průsvitu.



XI. Seznam publikací a přednášek

Publikace:

Peč, J., Flores-Sanchez, I., J., Choi, Y., H., Dušek, J., Verpoorte R.: Metabolic analysis of elicited cell suspension cultures of *Cannabis sativa* L. by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. Odesláno do Biotechnol. Lett., 2010.

Peč, J., Dušek, J.: Konopí, konopná droga a související léčivé přípravky. Praktické lékárenství, 2009; 5(4), s. 189-193.

Flores-Sanchez, I., J., Peč, J., Fei, J., Choi, Y., H., Dušek, J., Verpoorte R.: Elicitation studies in cell suspension cultures of *Cannabis sativa* L. J. Biotechnol., 2009; 143(2), s. 157-168.

Peč, J., Riedingerová, E., Martin, J., Kršková, Z., Dušek, J.: Therapeutic potential of phytocannabinoids and synthetic derivatives affecting human endocannabinoid system. Čes. slov. Farm., 2008; 57, s. 195-207.

Kršková, Z., Martin, J., Peč, J., Dušek, J.: Effects of Mg-ATP on the flavonoid production in the *Scutellaria baicalensis* Georgii suspension cultures. Čes. slov. Farm., 2008; 57, s. 111-114.

Peč, J., Dušek, J.: Složení a využití konopného oleje se zaměřením na terapeutické účinky esenciálních mastných kyselin. Praktické lékárenství 2008; 4(2), s. 86-89.

Konference – postery:

Peč, J., Flores-Sanchez, I., J., Choi, Y., H., Martin, J., Dušek, J., Verpoorte, R.: NMR metabolic profiling of biomass and medium extracts of Jasmonate or Pectin treated *Cannabis sativa* L. cell suspension cultures. Kongres Natural products with pharmaceutical, nutraceutical and agrochemical interest, 3.8.-8.8. 2008, Atény, Řecko. In: Planta Med., 2008; 74, s. 1086.

Peč, J., Flores-Sanchez, I., J., Choi, Y., H., Dušek, J., Martin, J., Verpoorte, R.: NMR metabolomics of jasmonic acid and pectin treated *Cannabis sativa* L. cell suspension cultures. Kongres Plants for human health in the post-genome era, 26.8.-29.8.2007, Helsinky, Sborník abstraktů s. 61, Finsko.

Martin, J., Dušek, J., Peč, J.: Growth and flavonoid production in bioreactor culture of *Scutellaria baicalensis*. Joint Meeting 2006 of the Czech, German and Hungarian Pharmaceutical Societies, 4.10.-7.10.2006, Marburg, Sborník abstraktů s. 30, Německo.

Přednášky:

Peč, J.: Konopí a jeho současné postavení v medicíně a farmacii, LXXVII. Přednáškový večer Spolku moravskoslezských farmaceutů v Ostravě, ČFS, 15. 10. 2009, Dům techniky, Ostrava – Mariánské hory.

Peč, J.: Konopí, novodobý lék s tisíciletou historií, Hradecký den léčivých rostlin, ČFS, 3. 6. 2009, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové. In: Čes. slov. Farm., 2009; 3, s. 139-140.

XII. Poděkování

Na závěr této disertační práce bych rád ze srdce poděkoval lidem, bez kterých by nemohla nikdy vzniknout. Děkuji svým rodičům Jaroslavu a Evě Pečovým za nevyčerpatelnou náruč rodičovské podpory a zázemí, dále také za finanční podporu, bez kterých by má studia nemohla být realizována. Dále děkuji své sestře Ing. Evě Šachové a jejímu manželovi Jakubu Šachovi za pomoc a poskytnuté zázemí ve východních Čechách. Nejhlubší poděkování patří mé lásce a manželce MUDr. Evě Pečové za její podporu a shovívavost při mých zahraničních stážích a v rámci celého studia. Poděkování patří také jejím rodičům JUDr. Zdeňkovi Riedingerovi a MUDr. Vlastě Riedingerové za vlídnou podporu. Mé díky patří kolegům a přátelům z magisterského i doktorského studia, se kterými jsem mohl strávit příjemné roky na studentských kolejích v Hradci Králové (Ivan Šnajdr, Martin Doseděl, Miroslav Kovařík, René Šostý, František Hornák, Kristýna Zábranská, Patra Sehnalíková a ostatní, které všechny bohužel nemohu vyjmenovat).

Kolektivu Katedry farmakognosie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové velice děkuji za vytvoření kvalitních pracovních podmínek a přátelského kolektivu. S největší úctou děkuji svému školiteli, panu docentovi Jaroslavu Duškovi, za upoutání oboru farmakognosie již v průběhu magisterských studií a za odborné vedení a vždy vlídné přijetí a podporu v rámci doktorských studií. PharmDr. Janu Martinovi, PhD. děkuji za příjemné pracovní a přátelské prostředí v laboratoři Katedry farmakognosie v České republice, Mgr. Báře Pomahačové děkuji za podporu při stážích v Nizozemí a celému oddělení Farmakognosie Leidenské University děkuji za pěkné přijetí a vynikající pracovní a přátelský kolektiv (Kind Regards and Thank you Rob, Federica, Young, Kim, Ria, Alfi, Isvett, Ibrahim, Jahangir, Hassan, Sebastiano, Jose, Marica, Silvia, Sanimah, Roman, Alba, Hwan, Arno, Anneke, Renee, Sytze, Nancy, Claudia, Esther, Frank, Ichwan, Aziz).

Děkuji Vám všem! S Vámi bylo mé studium potěšením, život jednodušší a má práce se stala skutečností!