

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Autoreferát dizertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Dispozice a metabolismus kanabinoidů

Tomáš Hložek

2019

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor:

Farmakologie a toxikologie (5206V000)

Předseda oborové rady:

prof. MUDr. Ondřej Slanař, Ph.D.

Školící pracoviště:

Ústav soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VFN, Ke Karlovu 2, 128 00 Praha 2

Školitel:

doc. Ing. Marie Balíková, CSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	7
Seznam zkratek.....	10
1. Úvod.....	11
2. Cíl práce	13
3. Tematické okruhy.....	14
3.1 Farmakokinetika THC a CBD u potkanů v závislosti na způsobu podání.....	14
3.1.1 Metody	14
3.1.2 Výsledky	14
3.1.3 Diskuze.....	16
3.2 Časový profil THC u člověka po inhalační aplikaci	18
3.2.1 Metody	18
3.2.2 Výsledky	18
3.2.3 Diskuze.....	20
3.3 Farmakokinetika syntetických kanabinoidů.....	22
3.3.1 Metody	22
3.3.2 Výsledky	22
3.3.3 Diskuze.....	22
3.4 Extrakce a stanovení fytkanabinoidů v rostlinném materiálu	24
3.4.1 Metody	24
3.4.2 Výsledky	24
3.4.3 Diskuze.....	25
4. Závěr	27
Seznam publikací.....	29
5. Použitá literatura	31

Abstrakt

Předkládaná dizertační práce popisuje formou komentáře k vlastním originálním publikacím výsledky výzkumu problematiky kanabinoidů, tj. fytokanabinoidů a některých syntetických kanabinoidů, jejich farmakokinetiky a účinků.

Práce je složena ze čtyř tematických okruhů: farmakokinetika delta-9-tetrahydrokanabinolu (THC) a kanabidiolu (CBD) u potkanů v závislosti na způsobu podání; časový profil THC u člověka (po inhalační aplikaci) a implikace pro bezpečnost v dopravě; farmakokinetický profil syntetických kanabinoidů u potkanů; extrakce a stanovení fytokanabinoidů v rostlinném materiálu.

Předmětem prvního okruhu dizertační práce bylo stanovení farmakokinetických profilů THC, CBD po jejich jednotlivém a kombinovaném podání (váhový poměr 1:1) potkanům s ohledem na podání obvyklá u člověka, a to podání inhalační, perorální a subkutánní. V průběhu studie byl sledován časový profil hladin THC a jeho metabolitů (11-hydroxy-tetrahydrokanabinol, 11-OH-THC; kyselina 11-nor-delta-9-karboxytetrahydrokanabinolová, THCOOH) a/nebo CBD v séru a mozcích zvířat ve 24 hodinovém experimentálním intervalu. Kromě inhalačního podání, po aplikaci perorální a subkutánní administrace CBD inhibovala metabolismus THC, což vedlo k nárůstu koncentrací THC v séru i mozku pokusných potkanů, vzhledem ke kontrolním hodnotám po podání samotného THC. Překvapivým výsledkem studie byla skutečnost, že po perorální i subkutánní administraci samotného CBD byl THC prokázán v séru i mozku pokusných zvířat - tzn., že jde o in vivo potvrzení předchozích výsledků z in vitro experimentů dokumentujících také konverzi CBD na THC. Výsledky předkládané práce přináší nové poznatky pro případné nové lékové formulace kanabinoidů, zejména z hlediska možných metabolických interakcí. Samotná in vivo konverze CBD na THC bude podkladem pro detailnější výzkum v této oblasti, zejména s ohledem na případné terapeutické užití kanabidiolových přípravků člověkem a také na forenzní hodnocení nálezů psychotropních látek

Předmětem druhého oddílu bylo sledování časového profilu hladin THC v séru rekreačních a chronických uživatelů konopných drog. Interval sledování byl bezprostředně po užití běžné inhalační dávky drogy, tedy jedné cigarety/ jointa, a to až do 24 hodin po aplikaci. Naše studie potvrdila výsledky dřívějších kontrolovaných kinetických studií, a sice že u rekreačních uživatelů není THC detekovatelný běžnou metodou již v horizontu cca 4 hodin po užití, zatímco u chronických uživatelů je THC detekovatelný i po více než 24 hodinách abstinence. V tomto kontextu je nutné zdůraznit, že mnozí chroničtí uživatelé měli již před počátkem vlastního experimentu bazální hladinu THC z předchozích dávek, způsobenou redistribucí THC

z lipofilních depot zpět do krve. Konzumace konopných drog má individuální vliv na kognitivní a psychomotorické schopnosti uživatele. Praktickou forenzní otázkou zůstává, jak dlouho mohou přetrvávat psychotropní efekty THC u chroniků po poslední dávce drogy i po déle trvající abstinenci. U chronických uživatelů jsou dokumentovány případy dlouhodobého nepříznivého ovlivnění neurokognitivních funkcí. Krevní hladina THC u řidičů tak sama o sobě nemusí přímo korelovat s mírou ovlivnění CNS. V řadě zemí byla proto z preventivních důvodů a ve snaze snížit rizika v dopravě zavedena tzv. per se legislativa založená na analytickém principu s minimální tolerancí k nálezu drog v krvi řidiče, tedy i THC. Rozlišení akutní a chronické konzumace konopných drog při posuzování bezpečnostních rizik zejména v dopravě je stále předmětem mnoha studií.

Třetí oddíl byl věnován porovnání farmakokinetiky nových syntetických kanabinoidů (SK) a THC po subkutánním podání experimentálním potkanům. Syntetické kanabinoidy jsou látky původně vyvinuté pro výzkum a modulaci endokanabinoidního systému, v posledních letech se však ve velké míře objevují na drogovém trhu, jelikož mimikují účinky přírodních kanabinoidů. Studované SK jsou deriváty indolů (JWH-073 a JWH-210). Jde o lipofilní velmi potentní látky s vysokou afinitou k endogenním kanabinoidním receptorům CB1 a CB2 a v tomto ohledu je jejich užití spojeno s vysokou incidencí nežádoucích účinků. V průběhu experimentu byly stanoveny farmakokinetické profily JWH-073, JWH-210 v séru potkanů a THC v 24 hodinovém intervalu. U studovaných SK byl pozorován odlišný farmakokinetický průběh vzhledem k THC, vysvětlitelný zřejmě jejich rozdílnou lipofilitou, a tedy i následnou redistribucí v krvi. JWH-210 vykazoval bifázický profil se dvěma maximy, analogický se subkutánním podáním THC, zatímco JWH-073 dosáhl maxima v séru až 4 hodiny po aplikaci. Nami zjištěný časový průběh hladin studovaných SK koreluje dobře s publikovanými daty v jiných studiích, což dokládá konzistentnost nálezů.

Poslední okruh byl věnován extrakci fytoKANABINOIDŮ z rostlinného materiálu, konkrétně z květenství *Cannabis sativa*. Extrakce fytoKANABINOIDŮ (a následné stanovení jejich obsahu) má význam nejen forenzní při zjišťování potence THC v zabaveném rostlinném materiálu, ale s rozvojem lékařského využití marihuany i pro určení zastoupení jednotlivých kanabinoidů v konkrétních odrůdách s ohledem na jejich terapeutické indikace. V tomto směru jsou v praxi rozšířené extrakční postupy s využitím organických rozpouštědel, která jsou však často toxická, jak s ohledem na životní prostředí, tak i na lidské zdraví. Proto byla připravena série alternativních organických rozpouštědel, tzv. deep eutectic solvents (DES) na bázi netoxických výchozích látek, v tomto případě terpenů a přírodních organických kyselin a testována jejich extrakční účinnost pro vybrané fytoKANABINOIDY (THC, CBD a jejich karboxylované

homology). Nejvyšší extrakční účinnosti dosahovala eutektická kapalina na bázi mentolu a kyseliny octové, a to nejen mezi testovanými DES, ale především v porovnání s často využívanou extrakční směsí methanol/chloroform, kdy byly zaznamenány vyšší výtěžky až v řádu desítek procent. Vzhledem k povzbudivým výsledkům této pilotní studie mohou být eutektické kapaliny využity nejen v oblasti zelené analytické chemie, ale mají potenciál i pro farmaceutický průmysl (např. tinktury kanabinoidů na bázi těchto kapalin).

Klíčová slova

delta-9-tetrahydrokanabinol, kanabidiol, syntetické kanabinoidy, farmakokinetika, deep eutectic solvent, extrakce

Abstract

This thesis describes in the form of a commentary on own original publications a cross-sectional research on the problems of cannabinoids, ie. phytocannabinoids and some synthetic cannabinoids, their pharmacokinetics and effects.

The work consists of four thematic areas: the pharmacokinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) in rats, depending on the route of administration; THC concentration time profile in humans (after inhalation) and implications for transport safety; the pharmacokinetic profile of synthetic cannabinoids in rats; extraction and determination of phytocannabinoids in plant material.

Based on current knowledge of metabolic and behavioral interactions, the first part of the thesis was to determine pharmacokinetic profiles of THC, CBD and combination thereof (1: 1) in rats with respect to administration common in human medicine, i.e. inhalation, oral and subcutaneous administration. THC, its metabolites (11-hydroxy-tetrahydrocannabinol, 11-OH-THC; 11-nor-delta-9-carboxytetrahydrocannabinol, THCOOH) and CBD concentrations in serum and brains of animals were monitored at the 24 hours experimental interval during the study. Except in the case of inhalation, co-administration of CBD inhibited THC metabolism, resulting in an increase in peak THC concentrations in both serum and brain of the rats relative to THC alone. The surprising result of the study was that after oral and subcutaneous administration of CBD alone, THC was measured in both the serum and brain of experimental animals – it is an *in vivo* confirmation of previous *in vitro* experiments documenting the conversion of CBD to THC. The results of this work bring new findings for possible new drug formulations of cannabinoids, especially in terms of possible metabolic interactions. The *in vivo* conversion of CBD to THC itself will be the basis for further research in this field, especially with regard to forensic consequences for the therapeutic use of cannabidiol preparations in humans

The second section focused on monitoring THC levels in recreational and chronic cannabis users. The follow-up interval was immediately after the usual inhalation dose of the drug, i.e. one cigarette / joint, until 24 hours after application. These measurements confirmed the results of earlier controlled kinetic studies that THC is not detectable in recreational users as early as 4 hours after use, while in chronic users is THC detectable even after more than 24 hours of abstinence. In this context, it should be emphasized that many chronic users had basal THC levels before the start of the experiment, due to the redistribution of THC from lipophilic depots to blood. Consumption of cannabis has an individual influence on the cognitive and

psychomotor abilities of the user. The practical forensic question remains how long the psychotropic effects of THC can persist in chronic after the last dose of the drug and after persistent abstinence. Cases of long-term adverse effects on neurocognitive functions are documented in chronic users. Thus, the THC blood level in drivers does not in itself have to correlate directly with the degree of influence. Therefore, in a number of countries, per se legislation based on an analytical principle with minimal tolerance to drugs in the driver's blood was introduced for preventive reasons and in an effort to reduce traffic risks. The distinction between acute and chronic cannabis consumption in assessing safety risks, especially in traffic, is still the subject of many studies.

The third section was devoted to comparing the pharmacokinetics of new synthetic cannabinoids (SK) and THC following subcutaneous administration to experimental rats. Synthetic cannabinoids are substances originally developed for research and modulation of the endocannabinoid system, but in recent years they have largely appeared on the drug market as they mimic the effects of natural cannabinoids. The SKs studied are indole derivatives (JWH-073 and JWH-210). These are lipophilic and very potent substances with high affinity for endogenous cannabinoid CB1 and CB2 receptors, and in this respect their recreational use is associated with a high incidence of adverse events. Pharmacokinetic profiles of JWH-073, JWH-210 and THC were determined at 24 hours interval. In the SKs studied, different pharmacokinetic profiles were observed, especially with regard to their different lipophilicity and hence subsequent blood redistribution. JWH-210 showed a biphasic profile with two concentration maxima, analogous to subcutaneous administration of THC, while JWH-073 peaked up to 4 hours after administration. With respect to other published studies concerning the application of SK, the time course of the studied substances correlates with the published data, which shows the consistency of our findings.

The last section was devoted to the extraction of phytocannabinoids from plant material, namely from the inflorescence of *Cannabis sativa*. Extraction of phytocannabinoids (and their determination) is important not only for the monitoring of THC potency in seized plant material, but with the progress of medical use of marijuana also for the determination of individual cannabinoids in particular varieties. In this regard, organic solvent extraction processes are widespread, but they are often toxic, with respect to the environment and human health. Therefore, a series of alternative deep-eutectic solvents (DES) based on non-toxic starting materials, in this case terpenes and natural organic acids, were prepared and their extraction efficiency tested for selected phytocannabinoids (THC, CBD and their carboxylated homologs). Eutectic liquid based on menthol and acetic acid reached the highest extraction efficiency, not

only between the tested DES, but mainly compared to the often used methanol / chloroform extraction mixture, where higher yields of up to tens of percent were reached. Due to the encouraging results of this pilot study, eutectic liquids can be used not only in the field of green analytical chemistry, but they also have potential for the pharmaceutical industry (eg. tinctures of cannabinoids based on these liquids).

Keywords

delta-9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol, synthetic cannabinoids, pharmacokinetics, deep eutectic solvent, extraction

Seznam zkratek

11-OH-THC- d3	deuterovaný 11-hydroxy-tetrahydrokanabinol
11-OH-THC	11-hydroxy-tetrahydrokanabinol
CBD- d3	deuterovaný kanabidiol
CBD	kanabidiol
CBDA	kyselina kanabidiolová
cDNA	komplementární DNA
CYP 450	cytochrom P 450
DES	deep eutectic solvent
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografi ve spojení s hmotnostní spektrometrií
HBA	hydrogen bond donor
HBD	hydrogen bond acceptor
JWH-018	napfthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)metanon
JWH-073	naftalen-1-yl-(1-butylyndol-3-yl)metanon
JWH-210	4-ethylnaftthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)metanon
LC-MS	kapalinová chromatografi ve spojení s hmotnostní spektrometrií
log P	rozdělovací koeficient
NSD	nové syntetické drogy
SIM	single ion monitoring
SK	syntetické kanabinoidy
THC	delta-9-tetrahydrokanabinol
THCA	kyselina tetrahydrokanabinolová
THC-d3	deuterovaný delta-9-tetrahydrokanabinol
THCOOH- d3	deuterovaná 11-nor-delta-9-karboxytetrahydrokanabinolová kyselina
THCOOH	11-nor-delta-9-karboxytetrahydrokanabinolová kyselina

1. Úvod

Marihuana je nejrozšířenější rekreačně užívanou drogou v Evropě, přičemž její prevalence mezi uživateli ve věku 15–64 let je dle údajů evropského monitorovacího centra v Lisabonu (European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction) za poslední dekádu jedna z nejvyšších právě v České republice. Roli zde zřejmě hraje snadná dostupnost marihuany na domácím drogovém trhu a široká dostupnost prostředků pro domácí pěstování. Dalším faktorem mohou být mediální vlivy a snahy o plošnou legalizaci marihuany, částečně využívající argumenty o léčebných účincích konopí, kdy část veřejnosti již marihuanu nepovažuje de facto za ilegální drogu a srovnává ji s legálně dostupnými alkoholickými a tabákovými výrobky s poukazem na jejich vyšší zdravotní i sociální škodlivost.

Akutní zdravotní rizika pro konzumenty marihuany nedosahují rizik spojených s užíváním tvrdých drog typu heroinu, ale chronické užívání marihuany zejména od pubertálního věku může být u predisponovaných jedinců spouštěčem rozvoje různých psychických či respiračních poruch a jiných onemocnění (Kuepper, et al., 2011). Konzumace návykové látky, tedy i konopných drog, řidičem před a při jízdě a řízení pod vlivem návykové látky je však v ČR i v jiných zemích nezákonné. V případě konopných drog je intoxikující látkou ovlivňující behaviorální a kognitivní schopnosti řidiče psychoaktivní delta-9-tetrahydrokanabinol (THC) (Bondallaz, et al., 2016). Řada kontrolovaných experimentálních i epidemiologických studií dokazuje zvýšená rizika v dopravě po konzumaci marihuany a násobně zvýšená při kombinovaném užití s alkoholem. V souladu s legislativou v některých evropských zemích, a jinde ve světě, také v ČR nabyla účinnosti novela zákona o provozu na pozemních komunikacích ve znění zákona 233/2013 Sb. odkazující na nařízení vlády, podle něhož jsou určeny specifikované návykové látky a jejich mezní koncentrační hodnoty v krevním vzorku, při jejichž překročení se řidič považuje za ovlivněného specifikovanou návykovou látkou (Watson a Mann, 2016). U chronických uživatelů je situace složitější díky redistribučním dějům, kterým podléhá silně lipofilní THC v organismu. Nález THC v krvi u takového řidiče pak přímo nemusí dokumentovat akutní stav ovlivnění CNS při řízení (Skopp a Potsch, 2008). Praktickou forenzní otázkou je, jak dlouho mohou přetrvávat psychotropní efekty THC po poslední dávce drogy a kdy došlo k poslední dávce drogy.

V současnosti se do povědomí nejen odborné veřejnosti dostává ve spojitosti s medicínou využitím konopí další fytoakanabinoid, konkrétně kanabidiol (CBD), který má protizánětlivé, anxiolytické a antiepileptické účinky (Grant a Cahn, 2005). Pokud je CBD podán zároveň s THC, pozitivně moduluje některé jeho nežádoucí účinky jako například tachykardii, psychózy

a redukuje kognitivní deficit. CBD je považován za neintoxikující látku, avšak je také psychoaktivní a může indukovat alteraci mozkových funkcí, avšak protichůdně oproti působení THC a dále má i neuroprotektivní a antipsychotické vlastnosti. Studium farmakodynamických a farmakokinetických interakcí mezi THC a CBD je v současnosti předmětem intenzivního výzkumu, jelikož molekulární mechanismus těchto interakcí nemusí být primárně způsoben reakcí s kanabinoidovými receptory (Todd, et al., 2017).

Vzhledem k již zmíněnému medicínálnímu využití konopí roste i důraz na sledování obsahu jednotlivých kanabinoidů v kultivarech určených pro lékařské účely, přičemž základním kamenem pro toto je extrakce kanabinoidů z rostlinného materiálu. Mezi používaná organická rozpouštědla pro extrakci fyto-kanabinoidů z rostlinných materiálů patří methanol, ethanol, ethylacetát, chloroform či hexan. V současnosti je však trendem (pro naplnění cílů zelené chemie) výzkum, vývoj a příprava nových netoxických rozpouštědel, nejlépe na bázi látek z obnovitelných zdrojů, jelikož tradiční organická rozpouštědla představují významný podíl toxických odpadů v chemickém průmyslu, a tedy přispívají k environmentálnímu znečištění. V tomto ohledu bylo prezentováno nové médium s vysokým aplikačním potenciálem – tzv. deep eutectic solvents (DES) (Abbott, et al., 2003), přičemž aplikace různých DES pro extrakční účely je v současnosti hybnou silou jejich výzkumu a vývoje, a to nejen z pohledu analytické chemie, ale i farmaceutického a kosmetického průmyslu (Jeong, et al., 2017).

Od počátku 21. století se na světové drogové scéně objevil zcela nový fenomén zneužívání tzv. nových syntetických drog (NSD, legal highs, designer drugs). V tomto ohledu zažívají renesanci na ilegálních drogových trzích halucinogenní syntetické kanabinoidy (SK) (ElSohly, et al., 2014). V principu jsou tyto látky agonisté endogenních kanabinoidních receptorů CB1 a CB2, a farmakologicky tedy mimikují účinky THC, hlavní psychoaktivní látky konopí. U mnohých nových SK byla experimentálně prokázána podstatně větší účinnost než v případě fyto-kanabinoidů. Akutní i chronické užití těchto látek vede k paletě vedlejších nežádoucích účinků, především pak psychózám, křečím, poškození tkání, srdečním zástavám a úmrtí. Vzhledem k faktu, že pro nové generace SK nejsou dostupné jednoduché imunochemické testy, které by odhalily přítomnost SK či metabolitů v biologických vzorcích uživatelů, je další motivací psychotropní zážitek bez rizika odhalení zakázané konzumace, např. ve věznicích nebo při výkonu povolání či v dopravě. Farmakologické účinky, potence a toxicita těchto látek (zejména nových analogů SK) jsou ve většině případů neznámé, a proto je třeba kontrolovaných experimentálních studií s těmito látkami in vivo na pokusných zvířatech anebo in vitro se zaměřením na farmakokinetiku i dynamiku včetně studia biotransformace (Diao a Huestis, 2019).

2. Cíl práce

Cílem dizertační práce bylo studium farmakokinetiky vybraných fytoKANABINOIDŮ a syntetických KANABINOIDŮ, a to *in vivo* u lidských dobrovolníků a u laboratorních experimentálních potkanů. Pro účely stanovení hladin fytoKANABINOIDŮ a jejich metabolitů v biologickém materiálu byla vypracována metodika pro forenzní aplikace. S rostoucím zájmem o medicínální využití konopí je součástí práce i metodika pro extrakci fytoKANABINOIDŮ sloužící např. ke kontrole deklarovaného obsahu jednotlivých KANABINOIDŮ v konkrétních odrůdách. Dizertační práce byla řešena v rámci čtyřletého multioborového grantového projektu bezpečnostního výzkumu Ministerstva vnitra ČR (VG20122015080). Výsledky farmakokinetických studií byly korelovány s výsledky neurobehaviorálních pozorování, kterým se věnovali jako spoluřešitelé grantového projektu kolegové z Národního ústavu duševního zdraví v Klecanech a společné výsledky jsou součástí publikovaných sdělení.

3. Tematické okruhy

3.1 Farmakokinetika THC a CBD u potkanů v závislosti na způsobu podání

3.1.1 Metody

Použité metody jsou *in extenso* popsány v příložených publikacích.

Pro všechny farmakokinetické experimenty byly užití potkani (typ Wistar, samci). Podrobnosti o jejich ustájení, aklimatizaci, dietě před experimenty a počtu jedinců lze nalézt v publikaci stejně tak jako o přípravě kanabinoidů (ve smyslu lékových forem) pro jednotlivé způsoby aplikací (pulmonální, perorální a subkutánní podání); podání kanabinoidů (THC, CBD a jejich kombinace v poměru 1:1) a harmonogramu sběru biologického materiálu. Kvantifikace kanabinoidů v séru a mozku potkanů byla prováděna vyvinutou metodikou. Ve zkratce, k 1 ml séra nebo 5 ml homogenizovaného mozku (1 g mozku byl rozmixován v 5 ml metanolu) bylo přidáno 10 μ l deuterovaných standardů (THC-d₃, CBD-d₃, 11-OH-THC-d₃, THC-COOH-d₃; 5 ng/ μ l). Homogenát mozku byl následně vymražen na -20 °C v etanolové lázni po dobu 10 minut a následně centrifugován při 4200 otáčkách po dobu 2 minut. Supernatant (asi 4 ml) byl po centrifugaci následně odpařen na objem 200-300 μ l. Sérum a extrakt mozku byly naředěny octanovým pufrům o pH 4 (0,01 mol/l) a následně byly kanabinoidy extrahovány pomocí SPE kolonek. Výsledné extrakty byly odpařeny proudem vzduchu a derivatizovány pomocí silylačního činidla po dobu 20 minut při 80 °C. Stanovení kanabinoidů v jednotlivých extraktech bylo prováděno pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií v režimu SIM, přičemž limit detekce byl 1 ng/ml a limit kvantifikace 2 ng/ml pro všechny analyty.

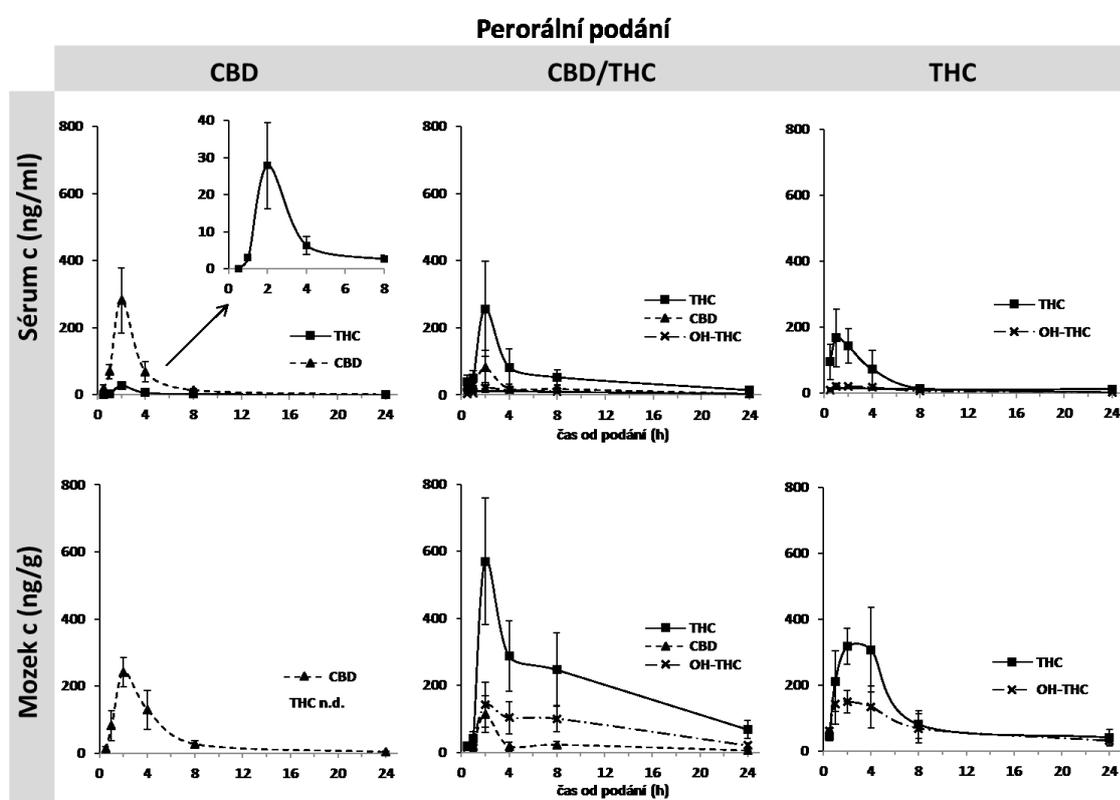
3.1.2 Výsledky

Získané výsledky jsou *in extenso* popsány v příložených publikacích, zde uvádím stručný výčet hlavních výsledků.

Po inhalační aplikaci kombinace THC a CBD nebyly pozorovány změny farmakokinetiky oproti podání jednotlivých kanabinoidů samostatně. Maximální sérové koncentrace jednotlivých kanabinoidů byly dosaženy do 15 minut po inhalační aplikaci, přičemž koncentrace jednotlivých kanabinoidů v mozku byly zhruba 3x nižší.

V případě subkutánního podání kombinace THC a CBD byly maximální koncentrace THC 4x vyšší a zároveň koncentrace CBD 2x nižší oproti koncentracím dosaženým po podání jednotlivých kanabinoidů samostatně (a to jak v séru, tak v mozku). Po podání samotného CBD bylo THC kvantifikováno po 4 a 8 hodinách od aplikace.

Perorální aplikace kombinace THC a CBD vedla k 2 až 3x nižším koncentracím CBD ve srovnání s podáním samotného CBD, zatímco koncentrace THC byly 2x vyšší než v případě podání samotného THC. Všeobecně byly maximální koncentrace kanabinoidů dosaženy po dvou hodinách od podání (a to jak v séru, tak v mozku). Po podání samotného CBD byl THC v séru zjištěn a kvantifikován v celém experimentálním intervalu od aplikace (Obr. 1).



Obr. 1 Farmakokinetické profily po perorálním podání CBD, THC a kombinace CBD/THC v séru a v mozku (dávka 10 mg/kg kanabinoidů, 6 potkanů na jeden časový bod). n. d. = nedetekováno.

3.1.3 Diskuze

Výsledky předkládané dizertační práce jsou in extenso diskutovány v příložených publikacích.

Pulmonální podání je typickým způsobem aplikace konopí u lidí, ať už jako rekreační drogy nebo v rámci medicínální indikace. Maximální koncentrace THC v séru u lidí jsou běžně dosahovány v řádu minut, často ještě během aplikace, stejně jako v případě našich experimentů na potkanech (Huestis, 2007). Zatímco sérové hladiny THC po aplikaci rychle klesaly, tak koncentrace v mozku, ač třikrát nižší oproti séru, klesaly mnohem pomaleji. Toto je v souladu s poznatkem, že vrcholné behaviorální a kognitivní účinky THC u lidí jsou dosahovány se zpožděním oproti krevním hladinám THC (Schwope, et al., 2012). Dále nebylo THC detekováno v séru ani mozcích po podání CBD, což je v souladu s předchozí prací, že nedochází k tvorbě THC z CBD v případech kouření marihuany s vysokým obsahem CBD, a to jak u lidských dobrovolníků (Huestis, 2007), tak u strojů na testování cigaret (Quarles, et al., 1973).

V případě subkutánního podání THC byla dosažena maximální hladina THC krátce po aplikaci a následně mírně klesající koncentrace byly zjištěny v séru i mozku v rámci celého experimentálního intervalu, tj. 24 hodin. Dosahované hodnoty byly ale o řád nižší než při pulmonální a perorální aplikaci. V případě podání THC a CBD, maximální sérová koncentrace THC byla 5x vyšší a CBD o polovinu nižší oproti aplikaci jednotlivých kanabinoidů, a to v séru i mozku. Toto poukazuje na inhibici metabolismu THC díky CBD, jak bude dále diskutováno v případě perorální aplikace. Stejně jako v případě perorální aplikace CBD, i po subkutánní aplikaci samotného CBD bylo THC měřitelné v jednotkách nanogramů. Je tedy možné, že k cyklizaci CBD na THC dochází i v podkožním tuku.

V případě perorálního podání kanabinoidů byl farmakokinetický profil THC i CBD v čase po dávce znatelně pozvolnější oproti pulmonální aplikaci s vrcholy v séru i krvi až po dvou hodinách. Ačkoli dosažené sérové koncentrace byly srovnatelné s hodnotami po pulmonálním podání, vrcholné hladiny v mozku byly 3 až 6x vyšší a zůstaly vysoké až po dobu čtyř hodin. To demonstruje, že se tyto látky akumulují v lipofilní mozkové tkáni a zároveň vysvětluje delší časové účinky podaných kanabinoidů. Perorální podání kanabinoidů vedlo ke dvěma zajímavým zjištěním. Za prvé, současné podání obou kanabinoidů modifikovalo farmakokinetický profil obou látek v porovnání s individuálním podání. Vrcholová průměrná sérová koncentrace CBD byla třikrát nižší po podání směsi THC a CBD oproti podání samotného CBD. Naproti tomu vrcholová průměrná sérová koncentrace THC byla dvakrát

vyšší oproti podání THC individuálně. Podobné farmakokinetické trendy byly pozorovány i v mozcích zvířat s tím, že maximální koncentrace kanabinoidů byly dvakrát vyšší než v krevním séru. Variace v koncentracích THC při koadministraci CBD jsou pravděpodobně způsobeny tím, že CBD je silným inhibitorem metabolismu cytochromu P450 (Jiang, et al., 2011) (Huestis, 2007). Příčina snížení hladin CBD po směsném podání THC a CBD není jednoznačná. CBD je taktéž metabolizován enzymovým systémem cytochrom P450, a přítomnost THC by mohla vyvolat indukci enzymů a zesílit jeho metabolickou přeměnu. Dále v naší studii po perorální aplikaci samotného CBD byly v séru zjištěny koncentrace THC v rozmezí 2,0 až 68,6 ng/ml. V mozkové tkáni nebyl však THC nalezen.

V předchozí experimentální práci bylo prokázáno, že CBD se v kyselém prostředí cyklizuje nejenom na THC, ale i na další hexahydrokanabinoidy, které byly taktéž spojeny s negativními behaviorálními účinky, tj. katalepsie nebo hypotermie u myší (Watanabe, et al., 2007). V navazující práci v prostředí simulujícím žaludeční prostředí byla opět prokázána cyklizace CBD, v tomto případě i na delta-8-THC (Merrick, et al., 2016).

Přítomnost THC v séru po perorální a subkutánní aplikaci CBD může mít důležité psychosociální nebo forenzní konsekvence. V práci Merricka bylo postulováno, že lidé léčení vysokými dávkami CBD (ve formě konopí bohatého na CBD) mohou zažívat pocity podobné intoxikaci THC, tedy např. sedaci, což bylo pozorováno u dětských pacientů léčených CBD na epilepsii (Merrick, et al., 2016). Tento závěr však vyvolal vlnu nevole ve vědecké komunitě a byl několikrát rozporován. Ačkoliv výše diskutovaná sedace mohla být způsobena jinými kanabinoidy a terpeny (v případě užití konopí bohatého na CBD), naše práce jednoznačně prokázala konverzi CBD na THC u potkanů, i když nález byl pozitivní jen při dávkách několikrát vyšších oproti běžnému medicínskému užití CBD u lidí. Vzhledem k diskuzi, zda dochází ke zmíněné konverzi in vivo, jiní autoři paralelně s naší prací provedli pokus s perorální aplikací CBD 50 mg/kg s prvním odběrem po třech hodinách od aplikace. Maximální sérová koncentrace CBD v tomto čase byla $354,64 \pm 71,5$ ng/ml, zatímco vrcholové koncentrace CBD v naší studii byly po dvou hodinách po aplikaci srovnatelné, avšak po podstatně nižší dávce CBD (10 mg/kg). V citované studii v tomto experimentálním nastavení nebyl THC ani jeho metabolity detekovány, a to jak po aplikaci CBD v oleji ani po aplikaci CBD v etanolu (Palazzoli, et al., 2018).

Vzhledem k faktu, že užívání samotného CBD je v různých formách v posledních letech na vzestupu, ať už jako potravinových doplňků či mastí, nemůže být eventuální pozitivní testování na THC u některých jedinců zcela vyloučeno i s případnými legálními dopady. Dále je třeba opět zmínit, že případná konverze CBD na THC v žaludku velmi závisí na formě a složení

podaného preparátu a je nutné brát v úvahu i náplň a stav žaludku při podání, kdy nejnižší pH bývá ráno po nočním hladovění.

3.2 Časový profil THC u člověka po inhalační aplikaci

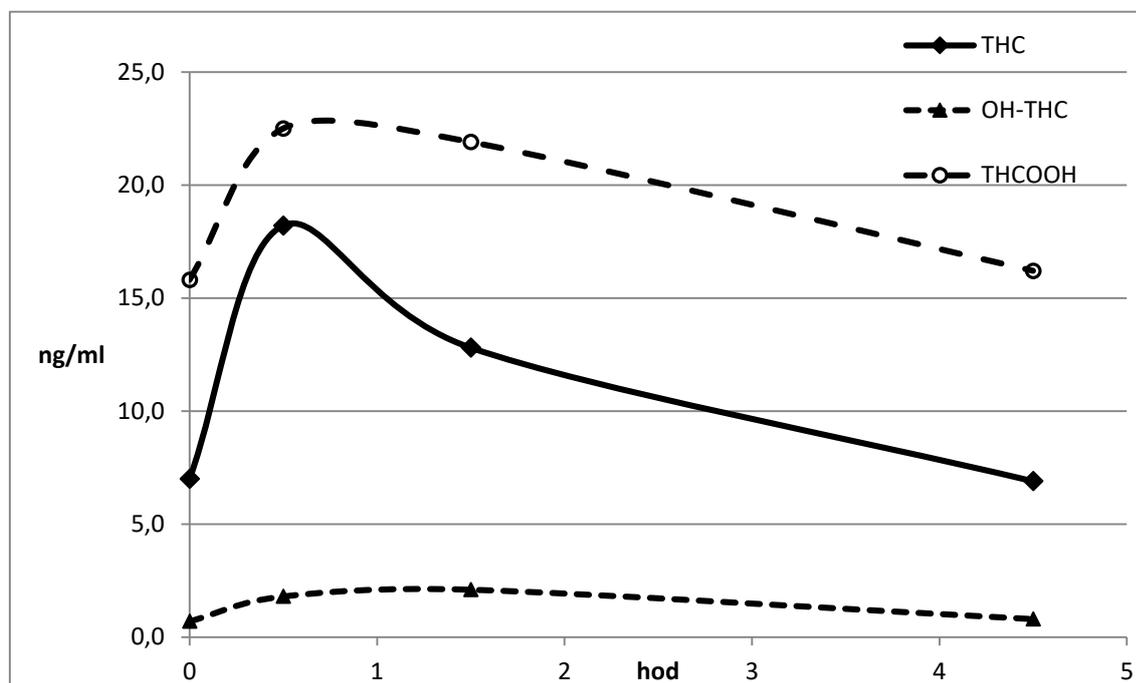
3.2.1 Metody

Studie byla schválena etickou komisí Psychiatrické centrum Praha (čj. 55/11) a byla součástí schváleného výzkumného projektu, kdy dobrovolníci - konzumenti marihuany s různou frekvencí dávek- podepsali informovaný souhlas a byli na počátku experimentu podrobeni rozhovoru za účelem zjištění anamnestických dat. Do studie bylo vzato 14 rekreačních uživatelů (10 M/ 4 Ž) a 11 chronických uživatelů (9 M/ 2 Ž). Bezprostředně před zahájením kinetického experimentu byl odebrán kontrolní počáteční vzorek krve. Účastníci si poté vykouřili svoji běžnou cigaretu a v odstupňovaných časových intervalech (30 min, 1,5 hod, 4,5 hod a 24,5 hod) byly postupně odebírány další vzorky krve. Obsah kanabinoidů v užitém vzorku (cigaretě/jointu) jednotlivých uživatelů byl stanoven chromatograficky (Kriminalistický Ústav Praha). Rekreační uživatelé kanabisu přitom byli instruováni tak, že v průběhu kinetického experimentu nesmí užít další dávku v průběhu minimálně dalších 24 hod, s čímž souhlasili. Kvantifikace THC a jeho metabolitů v séru byla prováděna metodikou viz kapitola 3.1.

3.2.2 Výsledky

Chroničtí uživatelé kanabisu v experimentu užili signifikantně větší množství THC, než-li rekreační uživatelé ($p < 0,001$). Množství užitého THC v experimentu se pohybovalo od 3,4 do 35,3 mg (průměr 15,7 mg) u rekreačních uživatelů a od 23,3 do 89 mg (průměr 40,8 mg) u chronických uživatelů. Výsledky analýzy pomocí testu ANCOVA odhalily rozdíl v bazální vstupní hladině obou skupin ($F(1,20)=5,9$, $p < 0,05$), dále byly prokázány signifikantní změny hladin v čase ($F(2,40)=23,7$, $p < 0,001$), nebyl však prokázán globální vliv na hladiny mezi skupinami a ani interakce faktorů. Následná analýza pomocí *post hoc* testů prokázala, že chroničtí uživatelé měli výrazně vyšší hladiny THC v séru už před začátkem měření, za 30 min a 4,5 hod po užití ($p < 0,001$), za jednu a půl hodinu po užití hodnoty téměř dosahovaly statistické významnosti ($p=0,07$). Nejvyšší průměrné hladiny THC v séru (tedy za 30 min po užití) dosahovaly 10,2 ng/ml u rekreačních uživatelů, u chronických pak zhruba dvojnásobek 21,3 ng/ml. Hladiny oproti bazální (ANOVA) byly signifikantně zvýšeny jak u rekreačních tak i u chronických uživatelů za 30 min ($p < 0,001$) a u rekreačních uživatelů i za 1,5 hod ($p < 0,01$).

Z hlediska celé skupiny (rekreační i chronici) hladiny v séru pozitivně korelovaly s množstvím užitého THC ($r=5,189$; $p<0,05$).



Obr. 2 Kinetický profil THC a jeho metabolitů v séru chronického uživatele.

Zatímco u rekreačních uživatelů nebyla před zahájením kinetického experimentu v žádném případě v kontrolním séru zjištěna detekovatelná hladina THC, někteří chronici měli významné hodnoty THC v kontrolním séru již před vstupem do kinetického experimentu (např. hodnoty 7 nebo 8 ng/ml). Typický kinetický profil THC a jeho metabolitů u chronického uživatele je znázorněn na Obr. 2. Hladiny THC v séru za 30 minut po jointu byly u obou skupin velmi individuálně variabilní s velkým rozptylem hodnot (1 - 23 ng/ml u rekreačních a 6 - 49 ng/ml u chronických uživatelů). U rekreačních uživatelů bylo experimentálně potvrzeno ve 12 případech, že již za 4,5 hodiny po konzumaci konopné drogy nebyla užitou metodou GC-MS zjištěna měřitelná hladina THC v krevním séru. Většina chronických uživatelů si však ještě po 4,5 hodinách stále udržovala významné koncentrace THC v séru. U některých chroniků, kteří setrvali po celou dobu v experimentu (4 osoby) byly významné hladiny THC v séru zjištěny i po 24,5 hodinách (dvě osoby s nálezem THC 4 ng/ml, anebo 16 ng/ml).

3.2.3 Diskuze

Hlavním zjištěním vyplývajícím z našich experimentů je, že zatímco u rekreačních uživatelů hladiny THC nejsou detekovatelné již po 4,5 hodinách po užití konopné drogy, u chronických uživatelů jsou za tuto dobu stále měřitelné. Z experimentu je zřejmé, že někteří chroničtí uživatelé si velmi pravděpodobně udržují bazální hladinu THC v krvi. Dalším dílčím zjištěním je, že chroničtí uživatelé užívají při jednorázovém podání větší množství drogy. Společně s aditivním efektem přetrvávajících hladin s tím velmi pravděpodobně souvisí vyšší dosahované hladiny THC v séru po nové dávce a jeho dlouhodobější detekovatelnost ve srovnání s rekreačními uživateli. I přes statisticky prokázanou korelaci hladin THC v séru s množstvím užitého THC v rámci celé skupiny dobrovolníků je nutné konstatovat, že vrcholové hodnoty hladin THC v séru po vykouření jointu jsou u obou skupin velmi individuálně variabilní a je tedy v podstatě nemožné jednoduše predikovat hladiny u jednotlivých uživatelů dle dávky, a naopak z hladin predikovat dávku. Je zřejmé, že zde hraje roli řada faktorů jako např. síla jointu, technika kouření, individuální tělesné parametry aj.

Naše nálezy korespondují s nálezy z jiných studií. Například v kontrolované studii s 37 dobrovolníky – kuřáky marihuany, abstinujícími pod dohledem v uzavřené jednotce 24 až 48 hodin, nebyl THC po této době detekován v krevním séru pouze u 22 osob, THC do výše 2 ng/ml byl zjištěn u 10 osob, a THC v rozmezí 2,2 a ž 6,4 ng/ml byl zjištěn u 5 osob (Skopp a Potsch, 2008). Naproti tomu při kontrolované abstinenci v jiné studii byl THC v krvi chronických kuřáků detekován ještě po 7 dnech abstinence v rozmezí od limitu detekce do 5,5 ng/ml, (n=18) (Karschner, et al., 2009).

Konzumace konopných drog u řidičů asociuje zvýšená bezpečnostní rizika v dopravě. Bylo doloženo, že častá konzumace konopných drog má za následek zhoršení neurokognitivních funkcí a častější výskyt psychotických reakcí (Kuepper, et al., 2011). Neurokognitivní zhoršení u chroniků může přetrvávat řadu dní i během kontrolované abstinence (Pope, et al., 2001). Navíc u fatálních případů bylo zjištěno, že THC může přetrvávat v mozkové tkáni, i když už THC není prokazatelný v krvi (Mura, et al., 2005). Na druhou stranu, v případě chronických uživatelů dochází vlivem tolerance k částečné, zdaleka však ne kompletní, behaviorální korekci akutního deficitu (např. zpomalení jízdy, dodržování větší vzdálenosti mezi vozidly apod.). Tato korekce se však zhoršuje s větší komplexností řešených krizových situací. Krevní hladina THC u řidiče tedy sama o sobě nemůže přímo dokumentovat míru zhoršení schopností k bezpečné jízdě, vztah je velmi individuální a komplexní. Z toho důvodu řada zemí z preventivních důvodů ve snaze snížit rizika v dopravě přechází na „per se legislativu“

s minimální tolerancí nálezu drog v krvi řidičů (Watson a Mann, 2016). Porovnáním našich nálezů s publikovanými daty lze shrnout, že je velmi obtížné identifikovat způsobilost jedince k řízení motorových vozidel pouze na základě stanovených hladin THC v krvi. Příkladem řešení může být již zmiňovaná legislativa s minimální tolerancí k hladinám THC v krvi, např. hladiny nad 2 ng/ml jsou již považovány za přestupek v zemích jako je Německo či Švýcarsko a od roku 2014 i v ČR. Vyšší hodnoty již odpovídají problematickému užití konopných drog bezprostředně před jízdou či během jízdy, anebo chronickému užívání. Hladiny 7-10 ng/ml u rekreačního uživatele jsou srovnatelné ve snížení řidičských schopností zhruba s 0,5 promile (g/kg) alkoholu v krvi, přičemž kombinovaná konzumace alkoholu a kanabis schopnost k řízení dramaticky zhoršuje (Grotenhermen, et al., 2007). Otázkou zůstává způsobilost k bezpečnému řízení u chronických uživatelů konopných drog. Toto téma začíná být aktuální především v souvislosti s problematikou terapeutického používání léčebného konopí v ČR (ale i v zahraničí). Je zřejmé, že jak léčení pacienti, tak chroničtí rekreační uživatelé budou vykazovat stále a měřitelné hladiny THC v krvi, byť bezprostředně před jízdou drogu neužijí.

3.3 Farmakokinetika syntetických kanabinoidů

3.3.1 Metody

Pro všechny farmakokinetické experimenty byly užity potkani (typ Wistar, samci). Podrobnosti k jejich ustájení, aklimatizaci, dietě před experimenty a počtu jedinců lze nalézt v příložené publikaci. Kvantifikace THC a jeho metabolitů v séru byla prováděna metodikou viz kapitola 3.1. Kvantifikace SK byla provedena na VŠCHT a je podrobně popsána v příslušné příloze.

3.3.2 Výsledky

Syntetické kanabinoidy JWH-073 a JWH-210 (oba 0,5 mg/kg) byly detekovatelné v séru potkanů po subkutánní aplikaci v celém 24 hodinovém experimentálním intervalu. Maximální sérové koncentrace JWH-073 ($1,84 \pm 0,06$ ng/ml) bylo dosaženo 4 hodiny po aplikaci. Maximální sérové koncentrace JWH-210 ($4,20 \pm 0,86$ ng/ml) bylo dosaženo po 1 hodině od aplikace, přičemž druhé lokální maximum bylo dosaženo 4 hodiny po aplikaci.

THC a jeho metabolity byly detekovatelné v séru potkanů po subkutánní aplikaci THC 3 mg/kg v celém 24 hodinovém experimentálním intervalu. Maximální sérové koncentrace THC a jeho metabolitů byly dosaženy hodinu po aplikaci THC (THC: $12,1 \pm 3,06$ ng/ml; 11-OH-THC: $2,08 \pm 1,21$ ng/ml; THC-COOH: $10,5 \pm 7,27$ ng/ml). Druhé maximum THC bylo pozorováno v čase 8 hodin od aplikace THC.

3.3.3 Diskuze

Syntetické kanabinoidy (SK) jsou širokou skupinou látek s různou strukturou vyznačující se kanabinomimetickými účinky na (aktivitou na endokanabinoidních receptorech CB1 i CB2). Přestože v současnosti je známo již více než 180 strukturních variant SK, látky z 1. generace na bázi aminoalkylindolů stále přetrvávají ve spektru uživatelů drog (ElSohly, et al., 2014). U těchto látek stále chybí dostatečné poznatky o jejich farmakokinetice, metabolismu i účincích, které jsou důležité při odhalení příčin intoxikací a pro účinnou terapii (Diao a Huestis, 2019).

Studiu farmakokinetiky SK se věnovalo již mnoho prací, zejména těm z první generace. V rámci studia farmakokinetiky (u lidských dobrovolníků; $n=6$) po inhalačním podání JWH-018 nanesených na interní rostlinný materiál (Toennes, et al., 2017) bylo dosaženo maximálních sérových koncentrací 5 min po podání s následnou fází extenzivní distribuce do tkání během

1,5 hod (u kontrolní skupiny dobrovolníků, kterým bylo podáno THC bylo distribuce dosaženo již během 1 hod). Paralelně s parentní látkou byly měřeny i sérové koncentrace jejich metabolitů, které však byly v maximu 10x nižší. Nejvíce zastoupeným metabolitem byla JWH-018 pentanová kyselina, a tedy konečným metabolitem je stejně jako v případě THC karboxylová kyselina (Diao a Huestis, 2019). Stejně jako po inhalační aplikaci/podání THC nebyla prokázána pozitivní korelace mezi sérovými a slinnými hladinami sledovaných látek (tj. THC a JWH-018). Po inhalační aplikaci kouře z produktu „Magic Gold“ obsahujícího 3,6 % JWH-018 a 5,7 % JWH-073 bylo v krvi potkanů po 20 minutách průměrně 88 ± 42 ng/ml JWH-018 a 134 ± 62 ng/ml JWH-073, a ve stejném časovém bodě bylo v mozcích naměřeno trojnásobné množství obou látek (Poklis, et al., 2012). Další skupina zvířat byla utracena 24 hod po aplikaci, přičemž koncentrace obou látek v krvi a mozku se pohybovala v jednotkách nanogramů, a tedy stejně jako v případě fytokanabionidů dochází k rychlému nárůstu koncentrací po aplikaci látek s následným rapidním poklesem koncentrací v rámci redistribuce do tkání. Dalším důvodem poklesu koncentrací těchto látek je jejich extenzivní metabolismus (analogický k THC). Avšak farmakologická aktivita metabolitů je stále málo prozkoumaná (tj. jejich aktivita na CB receptorech) (Gamage, et al., 2019).

Stejně jako v naší předchozí studii sledující farmakokinetické profily fytokanabinoidů po různých podáních, i zde subkutánní podání vedlo k bifazickému profilu THC (tedy distribuce do tkání a následné redistribuci do krevního řečiště). Podobný bifazický profil byl sledován i v případě podání JWH 210, zatímco v případě JWH 073 došlo vzhledem k jeho vyšší lipofilitě pomalejší distribuci do krve reprezentované dosažením první vrcholové koncentrace až po 4 hodinách od aplikace. Obdobný profil, skládající se z distribuce, eliminace a následného uvolnění látky zpět do krevního řečiště byl pozorován po intravenózní aplikaci 200 $\mu\text{g/kg}$ JWH-210, THC a RCS-4 (látky řazeny dle rostoucí clearance, a tedy klesající lipofility) v experimentech na prasatech (obdobný enzymový aparát jako u člověka) (Schaefer, et al., 2016). Výsledný kinetický profil po intravenózním podání THC se shoduje s experimentálními daty po intravenózním infuzním podání obdobného množství THC (5 mg) u lidských dobrovolníků (± 400 ng/ml) (Kelly a Jones, 1992). Stejně jako v případě naší studie dokumentující interakce mezi THC a CBD i v tomto případě byly aplikovány všechny tři látky současně s cílem odhalit případné alterace v metabolismu (tudíž i změny v rámci farmakokinetiky jednotlivých látek), jelikož uživatelé často kombinují syntetické kanabinoidy s marihuanou. V tomto případě nebyl prokázán vliv souběžného podání THC, JWH-210 a RCS-4 na farmakokinetiku oproti podání jednotlivých látek (Schaefer, et al., 2016).

3.4 Extrakce a stanovení fytoKANABINOIDŮ v rostlinném materiálu

3.4.1 Metody

Pro extrakci fytoKANABINOIDŮ z rostlinného materiálu bylo připraveno nové médium – tzv. deep eutectic solvents (DES), s obdobnými vlastnostmi jako mají iontové kapaliny (netěkavost, nehořlavost, vysoká teplotní a chemická stabilita, rozpustnost široké palety látek) a zároveň splňující principy zelené chemie.

Příprava DES byla založena na míchání dvojice výchozích látek v příslušném molárním poměru (HBA: HBD, 5:1 až 1:5) za konstantní teploty 80 °C do vzniku homogenní kapaliny po dobu max. 1 hodiny. Extrakce fytoKANABINOIDŮ z rostlinného materiálu (tj. sušina konopí *Cannabis sativa*) probíhala po dobu 10 minut v ultrazvukové lázni při teplotě 30 °C, přičemž zvolený poměr mezi sušinou a DES kapalinou byl 20 mg sušiny a 0,8 ml DES (navážka přírodního materiálu versus objem rozpouštědla vycházela z dříve publikovaných postupů pro extrakce přírodních látek pomocí DES). Po extrakci byl vzorek centrifugován po dobu 3 min při rychlosti 10 000 rpm a následně rozpuštěn v základním nevodném elektrolytu. Měření fytoKANABINOIDŮ (THC, tetrahydroKANABINOLOVÁ kyselina, THCA, CBD a KANABIDIOLOVÁ kyselina, CBDA) probíhalo na kapilární elektroforéze s UV detekcí a pro kvantifikaci byla použita metoda standardního přídatku.

3.4.2 Výsledky

Metodou zahřívání a míchání dvou výchozích komponent bylo úspěšně připraveno deset DES kapalin, kdy byl jako HBA zvolen mentol. Tyto DES byli čiré kapaliny (pouze DES s fenylacetovou kyselinou byla žlutá kapalina) a v průběhu jejich skladování při laboratorní teplotě po dobu třiceti dnů nedocházelo ke krystalizaci výchozích látek. Každá připravená DES tvořila dvoufázový systém s vodou v libovolném poměru. Na druhou stranu, řada karboxylových kyselin netvořila s mentolem DES (tedy nedocházelo ke vzniku kapaliny), a to ani při vyšších teplotách (80-90 °C).

Připravené DES byli následně testovány pro extrakci fytoKANABINOIDŮ z rostlinného materiálu. Extrakční účinnost jednotlivých DES závisí na povaze HBD (tedy kyseliny). Kyselina mravenčí poskytovala nejvyšší výtěžky pro THC ze všech testovaných HBD. Co se týče absolutní celkové sumy vyextrahovaných KANABINOIDŮ, byla v tomto ohledu nejlepší kyselina octová. Od kyseliny octové klesaly extrakční výtěžky THC a THCA v homologické

řadě po kyselinu hexanovou, avšak následně opět rostly s prodlužujícím se alifatickým řetězcem po kyselinu dodekanovou. Toto může být vysvětleno dvěma protichůdnými jevy. Jednak s rostoucí viskozitou DES může klesat extrakční výtěžek z důvodu nižšího přenosu hmoty, na druhou stranu rostoucí délka alifatického řetězce může zlepšit extrakci látek s vyššími log P (např. u THC log P 6,97, u CBD log P 5,79). Výše uvedené trendy byly platné i pro extrakci CBD a CBDA, avšak nižší log P těchto látek vedly k menším rozdílům v rámci homologické řady kyselin.

Pro ověření role jiných terpenů než mentolu jako HBA, byla připravena série DES, kdy byly kombinovány další terpeny (terpenol, borneol, geraniol, linalol) s kyselinou octovou jako HBD (vzhledem k její nejvyšší účinnosti pro extrakci kanabinoidů). Výsledné DES byly opět čiré kapaliny, avšak žádná z nich nedosahovala extrakční účinnost vyšší než DES na bázi mentolu a kyseliny octové.

Nakonec byla srovnána extrakční účinnost DES složené z mentolu a kyseliny octové s organickými rozpouštědly (metanol, etanol, metanol chloroform 9:1 v/v) běžně užívanými pro extrakci fyto-kanabinoidů. Extrakční účinnost DES byla v rozmezí 118,6 - 132,6 % pro jednotlivé kanabinoidy (za předpokladu, že extrakční účinnost směsi metanol chloroform 9:1 v/v je 100 %), celkový přehled výsledků je v Tabulce 1.

Tabulka 1. Porovnání extrakčních účinností běžných organických rozpouštědel a DES kapaliny složené z mentolu a kyseliny octové pro vybrané fyto-kanabinoidy (THC, THCA, CBD and CBDA). Jako referenční rozpouštědlo byla použita směs metanol: chloroform (9:1; v/v).

	Extrakční účinnost (%)			
	THC	THCA	CBD	CBDA
Mentol: kyselina octová	132,6 ± 5,3	128,8 ± 2,4	118,6 ± 5,7	122,7 ± 2,2
Metanol	112,0 ± 5,1	107,8 ± 2,7	97,7 ± 0,4	103,3 ± 1,6
Etanol	118,4 ± 2,7	110,1 ± 2,4	102,3 ± 2,0	106,3 ± 1,9
Metanol: chloroform (9:1; v/v)	100	100	100	100

3.4.3 Diskuze

Extrakce kanabinoidů z rostlinného materiálu je důležitá jednak pro sledování potence ve smyslu obsahu THC těchto rostlin zadržovaných bezpečnostními složkami na území ČR zejména v pěstírnách, ale především pro sledování obsahu jednotlivých tedy i nepsychoaktivních kanabinoidů v kultivarech určených pro medicínální účely. Význam a rozsah těchto měření bude nadále růst, zejména s ohledem na rozrůstající se počet zemí, kde je použití kanabinoidů pro medicínální účely povoleno, a zároveň rozrůstající se počet medicínálních indikací

(Abuhasira, et al., 2018). Vzhledem k nepolárnímu charakteru kanabinoidů, vyjádřenému vysokým rozdělovacím koeficientem oktanol voda, jsou k extrakci kanabinoidů vhodná organická rozpouštědla. V minulosti běžně užívaným rozpouštědlem byla směs metanolu s chloroformem 9:1 v/v, přičemž chloroform sloužil k rozpuštění tehdy užívaného vnitřního standardu di-n-oktylfthalátu (Hanus, et al., 2016). Chlorovaná rozpouštědla jsou však obecně toxická pro lidi i pro životní prostředí, a tedy jejich eliminace ze současných extrakčních postupů povede ke zvýšení jak laboratorní bezpečnosti, tak ke snížení jejich dopadů na životní prostředí. Ve srovnání s organickými rozpouštědly jsme v naší studii prokázali vyšší extrakční účinnost alternativního organického rozpouštědla hydrophobic deep eutectic solvent ve složení mentol: kyselina octová pro všechny testované kanabinoidy (Tabulka 1).

Z hlediska zelené chemie je také trendem (kromě zelených rozpouštědel) využití tzv. supercritical fluid extraction, jelikož extrakčním činidlem je superkritický CO₂, kapalina charakterizovaná nízkou kritickou teplotou a tlakem. Pro extrakci nepolárních látek, tj. kanabinoidů je však nutný přídavek organického polárního modifikátoru ethanolu k extrakčnímu činidlu (10 - 20 %), takto lze dosáhnout až o 50 % vyšší výtěžnosti v porovnání s čistým CO₂ (Attard, et al., 2018). Využití DES jako organického modifikátoru může být zajímavou alternativou pro zvýšení extrakční účinnosti. Superkritická fluidní extrakce se s výhodou užívá pro extrakce termolabilních látek, poskytuje čisté extrakty bez významných reziduí z organických modifikátorů a je využitelná pro extrakce v průmyslovém měřítku.

V budoucnosti může dojít k rozvoji využití DES i pro extrakce jiných skupin přírodních látek, půjde zejména o terpeny, které synergicky působí spolu s kanabioidy při léčbě konopím (Citti, et al., 2016). Pro stanovení terpenů z DES extraktu bude vhodnou instrumentální metodou headspace s plynovou chromatografií.

4. Závěr

Předkládaná dizertační práce se zabývala komplexní problematikou kanabinoidů, tj. fytoKANabinoidů (a jejich extrakcí z rostlinného materiálu), syntetických kanabinoidů, jejich farmakokinetiky a účinků. Nové poznatky plynoucí z našich experimentálních farmakokinetických a farmakodynamických studií na lidských dobrovolnících a na potkanech mají význam z farmakologického hlediska, ale přispívají i k interpretaci hladin kanabinoidů v klinické a forenzní toxikologii.

Závěrečné výsledky studie lze shrnout v následujících bodech:

1. Okruh: Farmakokinetika THC a CBD u potkanů v závislosti na způsobu podání

- Po inhalační aplikaci kombinace THC a CBD nebyly pozorovány změny farmakokinetiky oproti podání jednotlivých kanabinoidů samostatně.
- Perorální a subkutánní aplikace kombinace THC a CBD vedla k 2 až 3x nižším koncentracím CBD ve srovnání s podáním samotného CBD, zatímco koncentrace THC byly 2x vyšší než v případě podání samotného THC – tyto výsledky potvrzují alteraci metabolismu THC současným podáním CBD, tedy známého inhibitoru cytochromu P450.
- Po perorálním podání samotného CBD bylo THC kvantifikováno v celém experimentálním intervalu od aplikace, zatímco po subkutánním podání samotného CBD bylo THC kvantifikováno po 4 a 8 hodinách od aplikace. Jde tedy o in vivo potvrzení konverze (cyklizace) CBD na THC u potkanů typu Wistar.

2. Okruh: Časový profil THC u člověka po inhalační aplikaci

- U rekreačních uživatelů klesají hladiny THC v séru pod 2 ng/ml (limitní per se hodnota pro řízení pod vlivem marihuany) již po 4,5 hodinách od inhalační aplikace konopných produktů (marihuany nebo hašiše).
- U chronických uživatelů byly hodnoty THC v séru vyšší než 2 ng/ml nejen po 4,5 hodinách od inhalační aplikace konopných produktů (marihuany nebo hašiše), ale i po 24 hodinách. Důvodem jsou bazální hladiny THC chronických uživatelů před počátkem experimentu, které se odvíjejí od intenzity užívání konopných produktů.

- V rámci experimentů nebyla ani u jedné skupiny uživatelů prokázána korelace mezi užitou dávkou a následnou hladinou THC v séru – velká variabilita v topografii inhalace.

3. Okruh: Farmakokinetika syntetických kanabinoidů

- Subkutánní podání THC vedlo k bifazickému profilu THC (tedy distribuci do tkání a následné redistribuci do krevního řečiště), tento jev byl pozorován i v naší předchozí studii.
- Podobný bifazický profil byl sledován i v případě podání JWH 210, zatímco v případě JWH 073 došlo vzhledem k jeho vyšší lipofilitě pomalejší distribuci do krve reprezentované dosažením první vrcholové koncentrace až po 4 hodinách od aplikace.
- Stejně jako v případě fyto-kanabinoidů i syntetické kanabinoidy jsou vzhledem k jejich lipofilitě (a tedy distribuci a redistribuci do tkání) detekovatelné v séru (a následně i v moči ve formě metabolitů) v delším časovém oknu.

4. Okruh: Extrakce a stanovení fyto-kanabinoidů v rostlinném materiálu

- Byla připravena a testována série hydrofobních deep eutectic solvents pro extrakci fyto-kanabinoidů z rostlinného materiálu.
- Maximálního extrakčního výtěžku ve smyslu sumy kanabinoidů (THC, CBD, THCA a CBDA) bylo dosaženo použitím DES složené z mentolu a kyseliny octové, maximální extrakční výtěžek pro THC byl dosažen použitím DES složené z mentolu a kyseliny mravenčí.
- V porovnání s běžně organickými rozpouštědly (tj. methanol, ethanol a směs methanol/chloroform) užívanými pro extrakci fyto-kanabinoidů z rostlinného materiálu byly extrakční výtěžky při použití DES složené z mentolu a kyseliny octové vyšší o 10 až 20 % pro jednotlivé kanabinoidy.

Seznam publikací

1. Publikace *in extenso*, které jsou podkladem dizertační práce

s IF

Hložek, T., Uttl, L., Kaderabek, L., Balikova, M., Lhotkova, E., Horsley, R. R., Novakova, P., Sichova, K., Stefkova, K., Tyls, F., Kuchar, M., Palenicek, T. (2017). Pharmacokinetic and behavioural profile of THC, CBD, and THC plus CBD combination after pulmonary, oral, and subcutaneous administration in rats and confirmation of conversion *in vivo* of CBD to THC. *European Neuropsychopharmacology*, 27(12), 1223-1237. (IF 2019 = 4,129)

Uttl, L., Szczurowska, E., Hajkova, K., Horsley, R. R., Stefkova, K., Hložek, T., Sichova, K., Balikova, M., Kuchar, M., Micale, V., Palenicek, T. (2018). Behavioral and Pharmacokinetic Profile of Indole-Derived Synthetic Cannabinoids JWH-073 and JWH-210 as Compared to the Phytocannabinoid Delta(9)-THC in Rats. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 10. (IF 2019= 3,877)

Krizek, T., Bursova, M., Horsley, R., Kuchar, M., Tuma, P., Cabala, R., Hložek, T. (2018). Menthol-based hydrophobic deep eutectic solvents: Towards greener and efficient extraction of phytocannabinoids. *Journal of Cleaner Production*, 193, 391-396. (IF 2019 = 5,651)

bez IF

Balikova, M., Hložek, T., Palenicek, T., Tyls, F., Viktorinova, M., Melicher, T., Androvicova, R., Tomicek, P., Roman, M., Horacek, J. (2014). [Time profile of serum THC levels in occasional and chronic marijuana smokers after acute drug use - implication for driving motor vehicles]. *Soud Lek*, 59(1), 2-6.

2. Publikace *in extenso*, bez vztahu k tématu dizertační práce

s IF

Androvičová, R., Horáček, J., Tintera, J., Hlinka, J., Rydlo, J., Jezová, D., Balíková, M., Hložek, T., Miksatková, P., Kuchar, M., Roman, M., Tomicek, P., Tyls, F., Viktorinová, M., Palenicek, T. (2017). Individual prolactin reactivity modulates response of nucleus accumbens to erotic stimuli during acute cannabis intoxication: an fMRI pilot study. *Psychopharmacology*, 234(13), 1933-1943. (IF 2019 = 3,222)

Zaytseva, Y., Horáček, J., Hlinka, J., Fajnerová, I., Androvičová, R., Tintera, J., Salvi, V., Balíková, M., Hložek, T., Španiel, F., Páleníček, T. (2019). Cannabis-induced altered states of consciousness are associated with specific dynamic brain connectivity states. *Journal of Psychopharmacology*, doi:10.1177/0269881119849814 (IF 2019 = 4,738)

5. Použitá literatura

- Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*(1), 70-71.
- Abuhasira, R., Shbiro, L., Landschaft, Y. (2018). Medical use of cannabis and cannabinoids containing products - Regulations in Europe and North America. *European Journal of Internal Medicine*, 49, 2-6.
- Attard, T. M., Bainier, C., Reinaud, M., Lanot, A., McQueen-Mason, S. J., Hunt, A. J. (2018). Utilisation of supercritical fluids for the effective extraction of waxes and Cannabidiol (CBD) from hemp wastes. *Industrial Crops and Products*, 112, 38-46.
- Bondallaz, P., Favrat, B., Chtioui, H., Fornari, E., Maeder, P., Giroud, C. (2016). Cannabis and its effects on driving skills. *Forensic Science International*, 268, 92-102.
- Citti, C., Ciccarella, G., Braghiroli, D., Parenti, C., Vandelli, M. A., Cannazza, G. (2016). Medicinal cannabis: Principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 128, 201-209.
- Diao, X. X., Huestis, M. A. (2019). New Synthetic Cannabinoids Metabolism and Strategies to Best Identify Optimal Marker Metabolites. *Frontiers in Chemistry*, 7, 15.
- ElSohly, M. A., Gul, W., Wanas, A. S., Radwan, M. M. (2014). Synthetic cannabinoids: Analysis and metabolites. *Life Sciences*, 97(1), 78-90.
- Gamage, T. F., Farquhar, C. E., McKinnie, R. J., Kevin, R. C., McGregor, L. S., Trudell, M. L., Wiley, J. L., Thomas, B. F. (2019). Synthetic Cannabinoid Hydroxypentyl Metabolites Retain Efficacy at Human Cannabinoid Receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 368(3), 414-422.
- Grant, I., Cahn, B. R. (2005). Cannabis and endocannabinoid modulators: Therapeutic promises and challenges. *Clinical Neuroscience Research*, 5(2-4), 185-199.
- Grotenhermen, F., Leson, G., Berghaus, G., Drummer, O. H., Krueger, H. P., Longo, M., Moskowitz, H., Perrine, B., Ramaekers, J. G., Smiley, A., Tunbridge, R. (2007). Developing limits for driving under cannabis. *Addiction*, 102(12), 1910-1917.
- Hanus, L. O., Meyer, S. M., Munoz, E., Tagliatalata-Scafati, O., Appendino, G. (2016). Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Natural Product Reports*, 33(12), 1357-1392.

- Huestis, M. A. (2007). Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chemistry & Biodiversity*, 4(8), 1770-1804.
- Jeong, K. M., Ko, J., Zhao, J., Jin, Y., Yoo, D. E., Han, S. Y., Lee, J. (2017). Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products. *Journal of Cleaner Production*, 151, 87-95.
- Jiang, R. R., Yamaori, S., Takeda, S., Yamamoto, I., Watanabe, K. (2011). Identification of cytochrome P450 enzymes responsible for metabolism of cannabidiol by human liver microsomes. *Life Sciences*, 89(5-6), 165-170.
- Karschner, E. L., Schwilke, E. W., Lowe, R. H., Darwin, W. D., Herning, R. I., Cadet, J. L., Huestis, M. A. (2009). Implications of Plasma Delta(9)-Tetrahydrocannabinol, 11-Hydroxy-THC, and 11-nor-9-Carboxy-THC Concentrations in Chronic Cannabis Smokers. *Journal of Analytical Toxicology*, 33(8), 469-477.
- Kelly, P., Jones, R. T. (1992). METABOLISM OF TETRAHYDROCANNABINOL IN FREQUENT AND INFREQUENT MARIJUANA USERS. *Journal of Analytical Toxicology*, 16(4), 228-235.
- Kuepper, R., van Os, J., Lieb, R., Wittchen, H. U., Hofler, M., Henquet, C. (2011). Continued cannabis use and risk of incidence and persistence of psychotic symptoms: 10 year follow-up cohort study. *British Medical Journal*, 342, 8.
- Merrick, J., Lane, B., Sebree, T., Yaksh, T., O'Neill, C., Banks, S. L. (2016). Identification of Psychoactive Degradants of Cannabidiol in Simulated Gastric and Physiological Fluid. *Cannabis Cannabinoid Res*, 1(1), 102-112.
- Mura, P., Kintz, P., Dumestre, W., Raul, S., Hauet, T. (2005). THC can be detected in brain while absent in blood. *Journal of Analytical Toxicology*, 29(8), 842-843.
- Palazzoli, F., Citti, C., Licata, M., Vilella, A., Manca, L., Zoli, M., Vandelli, M. A., Forni, F., Cannazza, G. (2018). Development of a simple and sensitive liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of cannabidiol (CBD), Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC) and its metabolites in rat whole blood after oral administration of a single high dose of CBD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 150, 25-32.
- Poklis, J. L., Amira, D., Wise, L. E., Wiebelhaus, J. M., Haggerty, B. J., Poklis, A. (2012). Detection and disposition of JWH-018 and JWH-073 in mice after exposure to "Magic Gold" smoke. *Forensic Science International*, 220(1-3), 91-96.

- Pope, H. G., Gruber, A. J., Hudson, J. I., Huestis, M. A., Yurgelun-Todd, D. (2001). Neuropsychological performance in long-term cannabis users. *Archives of General Psychiatry*, 58(10), 909-915.
- Quarles, W., Ellman, G., Jones, R. (1973). TOXICOLOGY OF MARIHUANA - CONDITIONS FOR CONVERSION OF CANNABIDIOL TO THC UPON SMOKING. *Clinical Toxicology*, 6(2), 211-216.
- Schaefer, N., Wojtyniak, J. G., Kettner, M., Schlote, J., Laschke, M. W., Ewald, A. H., Lehr, T., Menger, M. D., Maurer, H. H., Schmidt, P. H. (2016). Pharmacokinetics of (synthetic) cannabinoids in pigs and their relevance for clinical and forensic toxicology. *Toxicology Letters*, 253, 7-16.
- Schwoppe, D. M., Bosker, W. M., Ramaekers, J. G., Gorelick, D. A., Huestis, M. A. (2012). Psychomotor Performance, Subjective and Physiological Effects and Whole Blood (9)-Tetrahydrocannabinol Concentrations in Heavy, Chronic Cannabis Smokers Following Acute Smoked Cannabis. *Journal of Analytical Toxicology*, 36(6), 405-412.
- Skopp, G., Potsch, L. (2008). Cannabinoid concentrations in spot serum samples 24-48 hours after discontinuation of cannabis smoking. *Journal of Analytical Toxicology*, 32(2), 160-164.
- Todd, S. M., Zhou, C., Clarke, D. J., Chohan, T. W., Bahceci, D., Arnold, J. C. (2017). Interactions between cannabidiol and Delta(9)-THC following acute and repeated dosing: Rebound hyperactivity, sensorimotor gating and epigenetic and neuroadaptive changes in the mesolimbic pathway. *European Neuropsychopharmacology*, 27(2), 132-145.
- Toennes, S. W., Geraths, A., Pogoda, W., Paulke, A., Wunder, C., Theunissen, E. L., Ramaekers, J. G. (2017). Pharmacokinetic properties of the synthetic cannabinoid JWH-018 and of its metabolites in serum after inhalation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 140, 215-222.
- Watanabe, K., Itokawa, Y., Yamaori, S., Funahashi, T., Kimura, T., Kaji, T., Usami, N., Yamamoto, I. (2007). Conversion of cannabidiol to Δ^9 -tetrahydrocannabinol and related cannabinoids in artificial gastric juice, and their pharmacological effects in mice. *Forensic Toxicology*, 25(1), 16-21.
- Watson, T. M., Mann, R. E. (2016). International approaches to driving under the influence of cannabis: A review of evidence on impact. *Drug and Alcohol Dependence*, 169, 148-155.

