

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Farmakologie a toxikologie (P5208)

Studijní obor: Farmakologie a toxikologie (5206V000)



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Mgr. Tomáš Hložek

Dispozice a metabolismus kanabinoidů

Disposition and metabolism of cannabinoids

Dizertační práce

Školitel: doc. Ing. Marie Balíková, CSc.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 5.7.2019

Tomáš Hložek

Podpis:

Identifikační záznam:

HLOŽEK, Tomáš.

Dispozice a metabolismus kanabinoidů. [Disposition and metabolism of cannabinoids].
Praha, 2019. 88 stran, 4 přílohy.

Dizertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav soudního lékařství a toxikologie.

Školitel Balíková, Marie.

Abstrakt

Předkládaná dizertační práce popisuje formou komentáře k vlastním originálním publikacím výsledky výzkumu problematiky kanabinoidů, tj. fyto-kanabinoidů 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 fyto-kanabinoidů 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 koadministrace 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 deletrvající 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 nálezům 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 experimentálními 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. Námi zjištěný časový průběh hladin studovaných SK koreluje dobře s publikovanými daty v jiných studiích, což dokládá konzistentnost nálezů.

Poslední okruh byl věnován extrakci fyto-kanabinoidů z rostlinného materiálu, konkrétně z květenství *Cannabis sativa*. Extrakce fyto-kanabinoidů (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 fyto-kanabinoidy (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 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.

The first part of the thesis was to determine pharmacokinetic profiles of THC, CBD and combination thereof (1:1 weight ratio) in rats with respect to administration common in humans, 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 for inhalation administration, co-administration of CBD inhibited THC metabolism (after both oral and subcutaneous), resulting in an increase in 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 therapeutic use of cannabidiolic preparations by humans and also with respect to the forensic evaluation of psychotropic substances

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. Our study confirmed the results of earlier controlled kinetic studies that THC is not detectable in recreational users with common instrumental equipment 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 from recent use 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 chronics 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 on central nervous system. 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, including THC. 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 in rat serum were determined at 24 hours interval. In the SKs studied, different pharmacokinetic profiles were observed with respect to THC, presumably 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. The time course of the studied substances established in our work 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 forensic

monitoring of THC potency in seized plant material, but with the progress of medical use of marijuana also for the determination of individual cannabinoid distribution in particular varieties with respect to their therapeutic indications. 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

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	7
Seznam zkratek.....	12
Seznam publikací.....	14
Poděkování.....	16
1. Úvod.....	17
2. Literární přehled.....	21
2.1 Fytokanabinoidy.....	21
2.2 Syntetické kanabinoidy	23
2.3 Endokanabinoidy a kanabinoidní receptory	25
2.4 Farmakodynamika kanabinoidů	28
2.4.1 Farmakodynamické interakce mezi THC a CBD	30
2.5 Farmakokinetika a metabolismus kanabinoidů	32
2.5.1 Dispozice a metabolismus	34
2.5.2 Eliminace	36
2.5.3 Farmakokinetické interakce THC a CBD s dopady na účinky	37
2.6 Detekce a stanovení kanabinoidů v biologických matricích.....	38
2.7 Extrakce fytokanabinoidů z rostlinného materiálu.....	40
2.8 Časový profil delta-9-THC a metabolitů v krvi a psychotropní efekty.....	42
2.9 Marihuana a způsobilost k řízení motorových vozidel	44
3. Cíl práce	46
4. Tematické okruhy.....	47
4.1 Farmakokinetika THC a CBD u potkanů v závislosti na způsobu podání... 47	
4.1.1 Metody	47
4.1.2 Výsledky	48

4.1.3	Diskuze	51
4.2	Časový profil THC u člověka po inhalační aplikaci	54
4.2.1	Metody	54
4.2.2	Výsledky	55
4.2.3	Diskuze	58
4.3	Farmakokinetika syntetických kanabinoidů.....	61
4.3.1	Metody	61
4.3.2	Výsledky	61
4.3.3	Diskuze	63
4.4	Extrakce a stanovení fytkanabinoidů v rostlinném materiálu	65
4.4.1	Metody	65
4.4.2	Výsledky	66
4.4.3	Diskuze	69
5.	Závěr.....	72
6.	Použitá literatura.....	74
	Seznam příloh.....	88

Seznam zkratek

11-OH-THC- d3	deuterovaný 11-hydroxy-tetrahydrokanabinol
11-OH-THC	11-hydroxy-tetrahydrokanabinol
AB-FUBINACA	N-[(2S)-1-amino-3-metyl-1-oxobutan-2-yl]- 1-[(4-fluorofenyl)metyl]indazol-3-carboxamid
ADB-CHMINACA	N-[(2S)-1-amino-3,3-dimetyl-1-oxobutan-2-yl]-1 (cyclohexylmetyl)indazol-3-carboxamid
ANCOVA	analýza kovariance
ANOVA	analýza rozptylu
APINACA	N-(1-adamantyl)-1-pentylindazol-3-carboxamid
B:AA	borneol: kyselina octová
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CB1	kanabinoidní receptor 1
CB2	kanabinoidní receptor 2
CBD- d3	deuterovaný kanabidiol
CBD	kanabidiol
CBDA	kyselina kanabidiolová
cDNA	komplementární DNA
CNS	centrální nervová soustava
CP 47,497	2-[(1S,3R)-3-hydroxycyclohexyl]-5-(2-metyloktan-2-yl)fenol
CYP 450	cytochrom P 450
DES	deep eutectic solvent
FUBIMINA	(1-(5-fluoropentyl)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl) (naftalen-1-yl)methanon
G:AA	geraniol: kyselina octová
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografi ve spojení s hmotnostní spektrometrií
HBA	hydrogen bond donor
HBD	hydrogen bond acceptor
HU	Hebrejská Univerzita
HU-210	1,1-dimetylheptyl- 11-hydroxy- tetrahydrokanabinol

HU-243	3-dimetylheptyl-11-hydroxyhexahydrokanabinol
JWH	John William Huffman
JWH-018	napfhalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)metanon
JWH-073	naftalen-1-yl-(1-butylyndol-3-yl)metanon
JWH-210	4-ethylnaftalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)metanon
JWH-250	2-(2-metoxyfenyl)-1-(1-pentylindol-3-yl)etanon
L:AA	linalol: kyselina octová
LC-MS	kapalinová chromatografi ve spojení s hmotnostní spektrometrií
log P	rozdělovací koeficient
M:AA	mentol: kyselina octová
M:BA	mentol: kyselina butanová
M:DA	mentol: kyselina dodekanová
M:FA	mentol: kyselina mravenčí
M:HA	mentol: kyselina hexanová
M:LA	mentol: kyselina mléčná
M:MA	mentol: kyselina mandlová
M:OA	mentol: kyselina oktanová
M:PA	mentol: kyselina propionová
M:PAA	mentol: kyselina fenylactová
NADES	natural deep eutectic solvent
NMR	nukleární magnetická rezonance
NSD	nové syntetické drogy
SEM	střední chyba průměru
SIM	single ion monitoring
SK	syntetické kanabinoidy
T:AA	terpineol: kyselina octová
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

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 marihuana smokers after acute drug use - implication for drivind 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., Tintěra, 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)

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval paní doc. Ing. Marii Balíkové, CSc. za odborné vedení, rady a připomínky při psaní této dizertační práce. Dík patří rovněž kolegyni RNDr. Miroslavě Bursové, PhD. za inspirativní spolupráci, a to nejen při sepisování publikací. Můj dík patří také všem kolegům, kteří spolupracovali na výzkumném projektu.

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 pro drogy a drogové závislosti 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. Pro legální zacházení s konopnými drogami platí v ČR zákonné normy o návykových látkách, ve forenzní praxi postihující především velkopěstitele, a sice zejména pro přečin šíření toxikománie.

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). Vzhledem k prevalenci užívání marihuany v populaci týká se její konzumace také některých řidičů motorových vozidel s dopady na bezpečnost dopravy. 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 (Drummer, et al., 2004). V praxi vyvstává otázka pravidel, jak správně a efektivně klasifikovat řidiče nacházejícího se pod vlivem návykové látky jiné než alkohol. 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 41/2014 Sb., 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.

Po jednorázovém užití marihuany hladina THC v krvi rychle klesá během pár hodin pod možnost detekce běžných analytických metod. U chronických uživatelů je však 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 další fyto-kanabinoid, 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 (Klein, et al., 2011). Vedlejším produktem šlechtění odrůd konopí s vysokým obsahem THC bylo snížení množství CBD v těchto rostlinách na minimum. Bylo postulováno, že tento minimální obsah CBD je důvodem pro častější prevalenci psychóz a výrazných kognitivních deficitů, a je tedy rizikem pro uživatele tohoto druhu konopí. Proto je uživatelům doporučováno užívat naopak konopí s vyváženým obsahem obou kanabinoidů, zejména s ohledem na redukci akutních rizik. Studium farmakodynamických a farmakokinetických interakcí mezi THC a CBD je v současnosti předmětem intenzivního výzkumu.

Vzhledem k již zmíněnému medicíněmu využití konopí roste i důraz na sledování obsahu jednotlivých kanabinoidů v kultivarech určených pro terapeutické účely, přičemž základním kamenem pro toto je účinná extrakce kanabinoidů z rostlinného materiálu. Volba způsobu extrakce a hodnocení její efektivity bude nadále nabývat na významu zejména s ohledem na rozrůstající se počet zemí, kde je použití kanabinoidů pro medicíně účely povoleno, a zároveň rozšiřující se počet medicíně indikací (Abuhasira, et al., 2018). Povolené rekreační legální užívání konopí v některých zemích je také spojeno s nutností deklarace obsahu minimálně THC v konopných produktech. Tento nárůst požadavků na kontrolu a sledování kvality konopných produktů s sebou nese i zvýšené nároky na extrakční postupy nutné pro stanovení obsahu jednotlivých složek.

Mezi používaná organická rozpouštědla pro extrakci fytoKANABINOIDŮ 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).

Na počátku 21. století se na světové drogové scéně objevil zcela nový fenomén zneužívání tzv. nových syntetických drog (NSD, legal highs, designer drugs). Řada těchto látek byla popsána již ve 20. století např. v rámci vývoje nových léčiv, ale pro jejich halucinogenní a jiné nežádoucí účinky byl další vývoj pro terapeutické cíle ukončen. 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 RECEPTŮ CB1 a CB2, a farmakologicky tedy mimikují účinky THC, hlavní psychoaktivní látky konopí. U mnohých nových SK byla experimentálně prokázána podstatně větší farmakologická účinnost než v případě fytoKANABINOIDŮ. Akutní i chronické užití těchto látek vede k paletě vedlejších nežádoucích účinků, především pak psychózám, křečím, poškození tkání, srdečním zástavám a úmrtí. Medializovaný a potvrzený výskyt intoxikací SK na severní Moravě v roce 2018 ilustruje vysokou rizikovost těchto látek a možné fatální následky jejich zneužívání. Šíření a nabízení těchto nových drog je usnadněno jejich opožděným zařazováním na seznamy kontrolovaných psychotropních látek.

Nejpopulárnější distribuce SK je sprejování těchto látek na inertní botanický materiál (např. marihuanu, šalvěj, tabák), případně jsou jejich roztoky užity jako náplně do e-cigaret. Uživatelé SK jako motivaci jejich zneužívání uvádějí, mimo jiné, zvědavost, snadnou dostupnost a nižší cenu ve srovnání s marihuanou a hašišem. Dalším faktorem pro jejich zvýšené užívání je fakt, že pro nové generace SK nejsou dostupné jednoduché imunochemické testy, které by rychle indikovaly možnou přítomnost SK či metabolitů

v biologických vzorcích uživatelů, a jejich uživatelé tak unikají pozornosti či postihu při různých kontrolách 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).

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

2. Literární přehled

2.1 Fytokanabinoidy

Konopí je široce rozšířená planá i člověkem pěstovaná rostlina, která s největší pravděpodobností pochází z centrální Asie, odkud se lidským přičiněním a svojí vysokou schopností adaptace dostala do celého světa. Konopí patří do čeledi konopovité, do této čeledi patří také chmel. Konopí poprvé odborně botanicky popsal Carl Linne v roce 1737 jako *Cannabis sativa*. V současnosti jsou popsány další dva druhy, *Cannabis indica* a *Cannabis ruderalis* (L. O. Hanus, et al., 2016b; Lynch, et al., 2016).

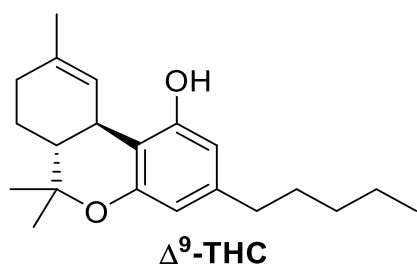
Konopí seté je jednoletou a dvoudomou rostlinou tvořící na jedné rostlině samičí a na druhé samčí květenství. Pro nelegální užití konopí jsou preferovány samičí rostliny, jejichž okvěti tvoří takzvané palice, kde je koncentrována většina rostlinného THC. Samičí rostliny marihuany, kterým bylo zabráněno v oplodnění, jsou označovány jako sinsemilla (ze španělského sin semilla – bez semen). Taková rostlina nevytváří semena a obsah THC v okvěti je vyšší. Dlouholetým šlechtěním byly získány také jednodomé varianty, jejichž význam v současném zemědělství převládá (L. O. Hanus, et al., 2016b).

Uváděné hodnoty obsahu THC v konopném materiálu jsou závislé na metodice stanovení, na tom, která část rostliny je analyzována. Policejní údaje týkající se zabavených ilegálních konopných drog pocházejí většinou z analýz samičích okvěti (tzv. „palice“). V Evropě se v poslední dekádě přibližné rozmezí obsahu THC v zabavených drogách (marihuaně) pohybovalo v rozmezí 3-16 % (L. O. Hanus, et al., 2016a). Při pěstování konopných rostlin v umělém skleníkovém prostředí je zastoupení jednotlivých kanabinoidů modifikováno a obsah THC se obvykle zvyšuje oproti venkovním kultivarům.

Vědecký výzkum kanabinoidů se datuje do počátku 19. století, tedy do doby, pro kterou byl typický zájem o získání čistých látek z přírodních materiálů. Šlo především o alkaloidy jako je kokain, morfin nebo strychnin, které lze snadno izolovat a vykrytalizovat jako příslušné sole pro medicínské využití. Nicméně terpeny z rostlin rodu *Cannabis* nebylo možné dost dobře izolovat soudobou technikou a uplynulo více než století do objasnění struktury hlavní psychotropní látky, delta-9-tetrahydrokanabinolu (THC). Ke konci 19. století skupina vědců z Cambridge zdařile destilovala etherový extrakt z indického hašiše a získala lepkavý olej. Při konzumaci tohoto oleje perorálně

docházelo ke stavům podobným jako po kouření hašiše, a proto se mělo za to, že obsahuje nějakou psychoaktivní látku z rostliny *Cannabis sativa* nebo *Cannabis indica* (Mechoulam, et al., 2014). Dalším pokrokem bylo zjištění, že tento olej není homogenní látkou a jeho další destilací a acetylací jedné z frakcí vykrytalizoval acetát, který po hydrolýze vytvořil pryskyřičný fenol o struktuře $C_{21}H_{28}O_2$. Tuto látku autoři Wood a jeho spolupracovníci pojmenovali kanabinol a vzhledem k jeho získání ve formě krystalu jde o první kanabinoid izolovaný v čisté formě (Mechoulam, et al., 2014). Kanabinol byl původně mylně považován za hlavní psychoaktivní složku rostliny. Tuto myšlenku podpořil fakt, že kanabinol byl izolován v relativně velkém množství, což mohlo být způsobeno prací s dlouhodobě skladovaným hašišem, přičemž mohlo dojít k oxidaci skutečné hlavní psychoaktivní látky tetrahydrokanabinolu na kanabinol. Mnoho výzkumných skupin se poté pokoušelo Woodovy experimenty zopakovat a rozšířit, ale neúspěšně, a proto byla Woodova práce dlouho ignorována. Teprve ve třicátých letech dvacátého století Cahn a o pár let později Todd v Anglii a Adams v USA obnovili chemický výzkum konopných látek a Loew a Walton prozkoumali farmakologii surové marihuany a efekty různých přečištěných frakcí z marihuany (L. O. Hanus, et al., 2016b; Mechoulam, et al., 2014). Struktura dříve izolovaného kanabinolu byla objasněna později. Práce se syntetickými látkami podobnými kanabinolu vedla k domněnce, že psychoaktivním konstituentem rostlin *Cannabis* bude dosud exaktně neidentifikovaný tetrahydrokannabinol. Toto se potvrdilo na syntetickém delta-6a, 10a-tetrahydrokanabinolu, který vykazoval podobné účinky jako marihuana při pokusech na psech, avšak UV spektrum vysoce koncentrované farmakologicky aktivní frakce izolované z rostliny se od této syntetické latky lišilo. Po téměř dvou dekadách byl výzkum konstituentů marihuany obnoven na Weizmannově institutu v Izraeli skupinou prof. Mecholauma (Mechoulam, et al., 2014). K izolaci čistého kanabidiolu (CBD) došlo teprve v roce 1964 hexanovou extrakcí hašiše a separací tohoto extraktu na neutrální a kyselou frakce. Opakovanou extrakcí neutrální frakce na florosilu, okyselené alumině, a alumině s 12 % nitritu stříbra byly získány tyto frakce kanabicyclol, kanabidiol, THC, kanabinol, kanabichromen, kanabigerol a jiné látky. Všechny kanabinoidy byly získány jako krystaly, kromě THC a kanabichromenu. Kanabidiol byl izolován již na počátku 40. let, avšak jeho struktura a stereochemie byla objasněna až v roce 1963, především díky nové metodě nukleární magnetické rezonance (NMR). Tato metoda měla také pro

objasnění struktury THC zásadní význam (Gaoni a Mechoulam, 1964). Finální potvrzení struktury THC bylo umožněno po převedení kanabinolu na THC mírnou acidifikací. Definitivní konfirmace strukturní konfigurace THC byla dokončena v roce 1967 (Mechoulam, et al., 2014), (Obr. 1).



Obr. 1 Struktura delta-9-tetrahydrokanabinolu (THC)

Struktura kanabigerolu, kanabichromenu, kanabicyklolu a dalších konstituentů konopí byla objasněna v další dekádě (Mechoulam, et al., 2014). V současné době jsou známy desítky různých struktur přírodních kanabinoidů. Obecně tedy můžeme konstatovat, že kanabinoidní látky izolované z rostliny *Cannabis sativa* jsou rodinou tricyklických kruhových struktur s charakteristickým fenolovým cyklem s meta polohou C5 alkylu vůči hydroxyskupině, centrálním pyranovým cyklem a mononenasyceným cyklohexanovým cyklem (L. O. Hanus, et al., 2016b; Lynch, et al., 2016).

2.2 Syntetické kanabinoidy

Syntetické kanabinoidy (SK) jsou synteticky připravené látky s různou strukturou, které mají společnou schopnost vázat se ke kanabinoidním receptorům. V principu jsou tyto látky agonisté endogenních kanabinoidních receptorů CB1 a CB2, a farmakologicky tedy mimikují účinky THC, hlavní psychoaktivní látky konopí (ElSohly, et al., 2014). S jejich přípravou se začalo po objasnění struktury THC a v dalších letech sloužily především pro výzkum endokanabinoidního systému. Jejich klasifikace v tomto období vycházela často ze zkratk laboratoří, univerzit či výzkumníků podílejících se na jejich přípravě například zkratka HU odkazuje k Hebrejské univerzitě nebo JWH ke skupině doktora Johna W. Huffmana (Kong, et al., 2018). U mnohých SK byla experimentálně

prokázána podstatně větší účinnost než v případě fytoKANABINOIDŮ, což vedlo k jejich renesanci na drogové scéně a řadí se tak mezi látky obecně označované jako nové syntetické drogy. Akutní i chronické užití těchto látek vede k paletě vedlejších nežádoucích účinků, především pak psychózám, křečím, poškození tkání, srdečním zástavám a úmrtí (Castaneto, et al., 2014). Závažné intoxikace SK na severní Moravě v roce 2018v ilustrují vysokou rizikovost těchto látek a možné fatální následky jejich zneužívání.

První generace SK byla odvozena od rostlinných KANABINOIDŮ, přičemž šlo zejména o modifikace postranního uhlíkového řetězce (např. HU-210), což bylo doprovázeno silnějším agonistickým účinkem na oba druhy endokanabinoidních receptorů v porovnání s THC (Dagon, et al., 2007). Dalšími zástupci byly cyklohexylfenoly (např. CP 47,497) a naftoylindoly (např. varianty JWH-018). Druhá generace sebou přinesla obměny substituentů připojených k základnímu indolovému strukturnímu motivu naftoylindolu, ale začaly se objevovat i benzoylindoly a fenylacetylindoly (např. RCS-4, JWH-250). Nejnovější třetí generace SK se vyznačuje náhradou indolového jádra indazolovým (APINACA) či benzimidazolovým jádrem (FUBIMINA). Další oblíbenou skupinou jsou indazolkarboxamidy, mezi něž patří AB-FUBINACA nebo ADB-CHMINACA (Diao a Huestis, 2019).

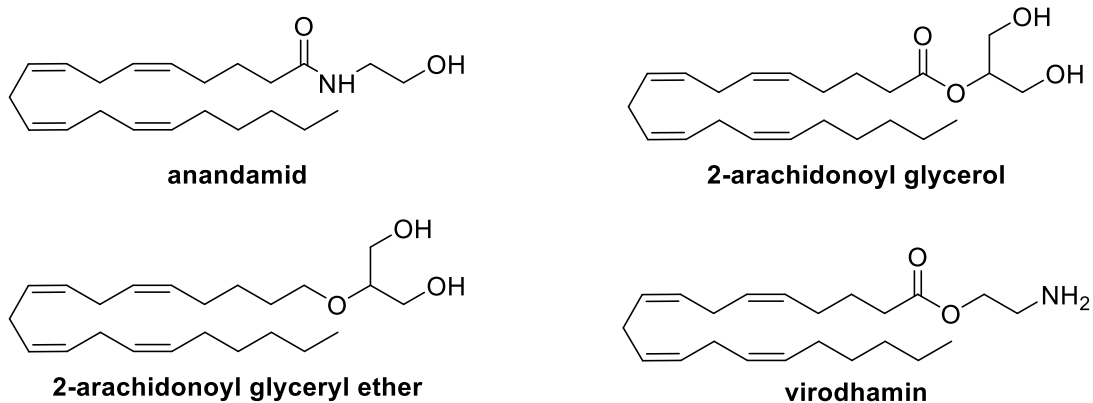
Nejpopulárnější distribuce SK je sprejování těchto látek na inertní botanický materiál (např. marihuanu, šalvěj, tabák), případně jsou jejich roztoky užity jako náplně do e-cigaret (Forrester, et al., 2012). Distribuce a abúzus SK jsou usnadněny nedostatky v legislativních opatřeních, a i v detekčních možnostech, pokud jde o biologický materiál konzumentů.

2.3 Endokanabinoidy a kanabinoidní receptory

Po objasnění chemických struktur jednotlivých konstituentů marihuany se vědecký zájem soustředil na farmakologii kanabinoidů a jejich buněčné působení. Byly popsány behaviorální účinky, neurochemie a neurofyziologie jednotlivých kanabinoidů, ale o mechanismu jejich působení na molekulární úrovni nebylo dlouho jasno. První spolehlivé potvrzení specifického působení kanabinoidů na receptory přinesla Howlettova skupina, která při práci s buňkami neuroblastomu N18TG2 zjistila, že kanabinoidy inhibují adenylátcyklázu jakožto druhého posla. Stereospecifita byla potvrzena i při práci se syntetickými enantiomery (-) HU-210 a (+) HU-210, kdy prvně jmenovaný inhiboval akumulaci cAMP (cykloadenosinmonofosfát) v buňce a aktivitu adenylátcyklázy. Výzkum v tomto směru kulminoval objevením specifických kanabinoidových vazebných míst v mozku, receptorů označovaných jako CB1 a CB2.

Standardním protokolem pro objevení nového receptorového agonisty je vytěsnění značené sondy (známé látky s kanabimimetickou aktivitou) navázané na kanabinoidový receptor. Prvně byla vyvinuta sonda na bázi (-) HU-210, s podobnou strukturou THC a s vysokou enantioselektivitou co se týče farmakologie i vaznosti na CB1 receptor (Devane, et al., 1992a). Vhodná sonda vznikla enantioselektivní redukcí dvojně vazby (-) HU-210 tritiem a vznikem látky H3-HU-243, jejíž neznačená forma vykazovala při testech dostatečně velkou kanabimimetickou aktivitu, a kterou lze dokonce snáze vytěsnit z vazby na receptor než původní látku (-) HU-210. Všechny rostlinné kanabinoidy jsou v tučích rozpustné látky, a proto se předpokládalo, že i endogenní konstituent bude mít obdobné fyzikálně-chemické vlastnosti. Prasečí mozky byly extrahovány organickými rozpouštědly a extrakty byly chromatograficky separovány podle standardních protokolů pro práci s lipidy. Získané frakce byly zkoumány z hlediska kanabinoidové aktivity, v tomto případě realizované jejich schopností vytěsnit z vazby na receptor sondu H3-HU-243. Nakonec byl izolován jediný aktivní konstituent, pojmenovaný anandamid (Devane, et al., 1992b). Komplikovaná izolace malého množství labilní přírodní látky z komplexní matrice způsobovala problémy s objasněním struktury, jednak kvůli interferujícím příbuzným látkám, ale i množství jiných stopových látek např. z laboratorního plastru. Potvrzení struktury anandamidu bylo provedeno hmotnostní spektrometrií a magnetickou nukleární rezonancí. Po objevení CB2 receptoru byl obdobný postup pro izolaci endogenních ligandů aplikován i na imunitní tkáň (slezina, střevo), což vedlo k objevení

dalšího ligandu, jmenovitě 2-arachidonoyl-glycerolu a o pár let později byl stejnou skupinou objeven i třetí ligand 2-arachidonoyl glycerol ether, pojmenovaný noladinether (L. Hanus, et al., 2001). Čtvrtým objeveným endokanabinoidem se stal *N*-arachidonoyl ethanolamid, pojmenovaný virodhamin (Porter, et al., 2002), (Obr. 2).



Obr. 2 Struktura endokanabinoidů

Existence kanabinoidových receptorů byla poprvé prokázána Howllettem (Howlett, et al., 2002). Následná charakterizace receptorů z mozku byla provedena imunohistochemickými a radioligandovými metodami. V současnosti jsou popsány dva endokanabinoidové receptory s ohledem na jejich primární strukturu, vazbu ligandů a signalizační dráhy (Howlett, et al., 2002). Receptory CB1 a CB2 patří do superrodiny heptahelikálních receptorů (obsahující sedm hydrofobních transmembránových segmentů spojených intra a extracelulárními smyčkami), u kterých transdukcí signálu zprostředkovává protein, který váže guanylnukleotid. Jsou negativně spojeny s adenylcyklázou a pozitivně s MAP kinázou, snižují produkci cAMP a v konečném efektu tedy hrají úlohu v regulaci uvolnění neurotransmiterů. Jednou z funkcí CB receptorů v imunitním systému je modulace uvolňování cytokininů. Aktivace CB1 a CB2 receptorů a T-lymfocytů kannabinoidy vede taktéž k inhibici adenylcyklázy a následně k redukované odpovědi na imunitní podnět (Howlett a Mukhopadhyay, 2000). Receptory CB1 byly popsány u mnoha živočišných druhů, konkrétně člověka, opice, prasete, psa, krysy a myši. Původně se mělo za to, že CB1 receptor je lokalizován výhradně v mozku,

zatímco CB2 receptor v periferních buňkách a tkáních imunitního systému (brzlík, slezina, mandle, žírné buňky, bílé krvinky) (Ameri, 1999), avšak poté byl CB1 receptor nalezen také v různých periferních tkáních, např. v kardiovaskulárním systému nebo gastrointestinálním traktu. Stejně tak CB2 receptor byl později objeven také v CNS, konkrétně mikrogliových buňkách či na neuronech (Ashton, et al., 2006; Szabo, et al., 2001). CB1 receptorová cDNA byla prvně izolována v roce 1990 z krysího cerebrálního kortexu za použití oligonukleotidové sondy odvozené od známého G-protein vázajícího receptoru (Matsuda, et al., 1990). Gen kódující lidský CB2 receptor byl naklonován v roce 1993. Lidské CB1 a CB2 receptory společně sdílejí 44 % aminokyselinové sekvence v rámci celého proteinu (Munro, et al., 1993). Distribuce CB1 receptorů byla charakterizována ve vztahu k behaviorálním efektům kanabinoidů (Tsou, et al., 1998). Exprese CB1 receptorů byla prokázána v oblastech mozku kontrolující množství klíčových funkcí, např. náladu, motoriku, autonomní funkce, paměť a kognici. Studie provedené elektronovou mikroskopií prokázaly, že CB1 receptory jsou lokalizovány převážně na postsynaptických výběžcích, ale byly nalezeny i na postsynaptických částech a neurogliích. Vysoká hustota CB1 receptorů byla nalezena v hippocampu, nucleu accumbens, substantia nigra pars reticularis, paleostriatu a dále v oblastech, které jsou součástí modulace bolesti. Právě vysoká hustota CB1 receptorů v hippocampu je dávána do souvislosti s účinkem kanabinoidů na krátkodobou paměť a kognici (Hohmann a Herkenham, 1999). Výskyt CB1 receptorů v bazálních gangliích a efekty kanabinoidů tamtéž poukazují na úlohu endokanabinoidů v motorickém naladění. Toto koresponduje s nálezy, které poukazují na poruchy exprese CB1 receptorů a jejich vaznost při neurologických onemocněních extrapyramidového systému, např. Parkinsonově a Huntingtonově chorobě (Sanudo-Pena, et al., 1998). Jiné části mozku, např. neokortex a bazální amygdala vykazují střední hustotu CB1 receptorů, zatímco thalamus nebo mozkový kmen malou hustotu. CB1 receptory hrají taktéž roli v regulaci příjmu potravy, akumulaci tuku a lipidovém a glukózovém metabolismu. Alterace těchto funkcí je spojována s hyperaktivitou právě CB1 receptorů jak v CNS, tak i v periferní oblasti (adipocyty, játra, gastrointestinální trakt). Stimulace hypothalamických CB1 receptorů vede k jejich interakci s neuropeptidy regulujícími homeostázu, příjem potravy a lipogenezi ve viscerálních tkáních. Aktivita CB1 receptorů roste se zvyšující se hladinou leptinu uvolněného z adipocytů (Cota, et al., 2003).

Endokanabinoidy jsou uvolňovány nikoliv konstantně v čase, ale v reakci na spouštěcí signál v případech potřeby regulace homeostázy. Toto otevírá cestu k výzkumu fyziologické a patofyziologické úlohy endokanabinoidového systému, konkrétně k hledání nových exogenních látek, které mohou modulovat jeho regulační cesty. Nově syntetizované substance s afinitou k endokanabinoidovým receptorům mohou fungovat jako jejich agonisté nebo jako jejich antagonisté a bránit tak v aktivitě tomuto systému. Agonisté endokanabinoidových receptorů nebo látky ovlivňující transport a metabolismus endokanabinoidů mají potenciál sloužit jako možná hypnotika, analgetika, antiemetika, antiepileptika, antiastmatika, antyhypertenziva, imunomodulátory, neuroprotektivní a protizánětlivé látky, látky pro léčbu glaukomu, spasticity a pohybových neurodegenerativních poruch až po léčbu poruch příjmu (Grant a Cahn, 2005).

2.4 Farmakodynamika kanabinoidů

V organismu je účinek biologicky aktivních složek konopí, tedy kanabinoidů, zprostředkován jejich spojením se specifickými vazebnými místy, kanabinoidními receptory (viz. kapitola 2.3). Kanabinoidní receptory jsou spřaženy s funkcí G proteinu tak, že jejich stimulace inhibuje adenylcyklázu a stimuluje mitogenem aktivovanou proteinkinázu, což především snižuje tvorbu cyklického adenosin monofosfátu a může regulovat i další buněčné pochody, např. ovlivňováním funkcí vápníkových a draslíkových kanálů buněčných membrán. Buňka vybavená těmito receptory tedy odpovídá příslušným efektem. Farmakologická aktivita delta-9-THC je stereoselektivní, přičemž přírodní (-)-trans isomer je 6-100 krát účinnější než (+)-trans isomer v závislosti na druhu testu. Kanabinoidy přes kanabinoidní receptory interagují s mnoha neurotransmitery, mimo jiné s acetylcholinem, dopaminem, kyselinou gamma-aminomáselnou, histaminem, serotoninem a prostaglandiny. Mnohé farmakologické účinky mohou být vysvětleny na základě těchto interakcí, např. tachykardie a sucho v ústech jsou způsobeny uvolněním acetylcholinu, zatímco pohybové a antispastické efekty mohou být připsány interakcí s gabaergní a dopaminergní mediací (Muller-Vahl, et al., 2003).

Kanabidiol, hlavní nepsychotropní složka marihuany má protizánětlivé, neuroprotektivní, antipsychotické, anxiolytické, antiepileptické účinky. Molekulární

mechanismus, kterým způsobuje tyto efekty je zatím neznámý, ale efekty zřejmě nejsou primárně způsobeny interakcí s kanabinoidovými receptory. Pokud je kanabidiol podán zároveň s THC, pozitivně moduluje některé jeho nežádoucí účinky jako například tachykardii, psychózy a redukuje kognitivní deficit (Morgan, et al., 2010).

Až do současnosti nebyly popsány fatální případy ve spojení s předávkováním marihuanou. Toto zřejmě souvisí s tím, že se kanabinoidové receptory téměř nevyskytují v mozgovém kmeni, kde je lokalizováno dýchací a oběhové centrum. Užití marihuany však může být impulsem pro vznik infarktu myokardu. K tomuto efektu je však nutná predispozice a u zdravých jedinců je toto nepravděpodobné. U lidí s různými srdečními chorobami může však ortostatická hypotenze nebo náhlé zvýšení srdečního rytmu představovat vážné zdravotní riziko (Mittleman, et al., 2001).

V souhrnu lze uvést, že podání kanabinoidů může vyvolat tyto účinky:

Psyché a vnímání: únava, euforie, dysforie, úzkost, a naopak zmírnění úzkosti, depersonalizace, zvýšené sensorické vnímání, halucinace, změny ve vnímání času, zhoršení psychotických stavů a poruchy spánku

Kognice a psychomotorika: fragmentované myšlení, zvýšená kreativita, porušená paměť, nejistá chůze, porucha koordinace pohybů-ataxie, slabost, zhoršení motoriky.

Nervový systém: analgesie (neuropatická bolest), svalová relaxace, neuroprotektce při ischemii a hypoxii.

Kardiovaskulární systém: tachykardie, zvýšená srdeční aktivita, zvýšený srdeční výdej, vazodilatace, ortostatická hypotenze, inhibice krevního srážení

Respirační systém: bronchodilatace, sucho v ústech a snížené slinění

Gastrointestinální trakt: zpomalené pohyby střev, zpomalené vyprazdňování žaludku, zlepšuje nauseu, stimulační apetitu, antiemetické působení

Imunitní systém: ovlivnění buněčné a humorální imunity, imunostimulace, protizánětlivé a antialergické účinky

Oči: snížení nitroočního tlaku, zarudnutí očí, redukce slzení

Akutní účinky kanabinoidů ovlivňující behaviorální a kognitivní schopnosti člověka jsou v popředí vědeckého zájmu z hlediska praktických dopadů na způsobilost k výkonu povolání, zejména ve vztahu k bezpečnosti řízení motorových vozidel. Experimentální studie ukázaly, že jedna dávka THC v rozmezí 40 - 300 µg/kg způsobuje pokles

výkonnosti při různých laboratorních testech zaměřených zejména na soustředěnost, reakční čas, motorické funkce, paměť (Ramaekers, et al., 2009). Tato zjištění platí pro příležitostné uživatele konopných drog, avšak u chronických uživatelů dochází k vědomému potlačení některých akutních projevů v důsledku vývoje tolerance, přesto však neuroadaptace není úplná. Chroničtí uživatelé vykazují horší kognitivní charakteristiky v abstinenční fázi než kontrolní skupiny příležitostných uživatelů. Při dostatečně dlouhé abstinenční fázi se však kognitivní výkonnost vrací k normálu. Výjimku tvoří chroničtí uživatelé s počátkem abuzu v adolescenci, kdy je ovlivnění dlouhodobé a konzumace u nedospělých jedinců může mít další nežádoucí účinky (Schwope, et al., 2012).

2.4.1 Farmakodynamické interakce mezi THC a CBD

Konopí s vysokým obsahem THC je důvodem vzniku psychotických symptomů u citlivých jedinců užívajících tuto drogu. CBD je považován za neintoxikující látku, avšak je také psychoaktivní a může indukovat alteraci mozkových funkcí, avšak protichůdně oproti působení THC a má i neuroprotektivní a antipsychotické vlastnosti (Broyd, et al., 2016). Vedlejším produktem šlechtění odrůd konopí s vysokým obsahem THC bylo snížení obsahu CBD v těchto rostlinách na minimum. Bylo postulováno, že tento minimální obsah CBD je důvodem pro častější prevalenci psychóz a výrazných kognitivních deficitů, a je tedy rizikem pro uživatele tohoto druhu konopí (Demirakca, et al., 2011). V tomto ohledu je uživatelům doporučováno užívat naopak konopí s vyváženým obsahem obou kanabinoidů, zejména s ohledem na redukci akutních rizik.

V mnoha studiích, jak na lidech, tak na zvířatech, bylo ilustrováno, že CBD může zmírňovat některé vedlejší účinky THC. V kohortě běžných uživatelů konopí byla zjištěna vyšší míra kognitivních výkonů (např. zlepšení paměti) a méně psychotických symptomů s rostoucí koncentrací CBD ve vzorcích marihuany. V kontrolovaných studiích bylo prokázáno, že perorální podání CBD před následnou intravenózní aplikací THC vedlo opět k redukci míry kognitivního ovlivnění a paranoi, a dále simultánní infuze THC a CBD snižovala úzkost a paranoiu spojovanou s užitím samotného THC (Englund, et al., 2017). Společné podání THC a CBD (3 mg každé látky denně) po dobu tří týdnů vedlo u adolescentních myší k blokaci rozvoje kognitivního a behaviorálního ovlivnění, očekávaného od podání samotného THC. V otevřené klinické studii s dlouhodobým

podáváním CBD lidem (200 mg denně) po dobu 10 dní došlo ke zlepšení psychologického stavu a kognice u dlouhodobých uživatelů konopí (Grotenhermen, 2003; Guimaraes, et al., 1990).

Zatímco se mnoho studií zaměřilo na studium CBD ve vztahu ke snížení vedlejších účinků konopí, existují i studie, které naopak poukazují na fakt, že CBD může i potencovat účinky THC. Střední a vysoké dávky CBD (10 a 50 mg/kg) zhoršovaly účinky malé dávky THC (1 mg/kg) na aktivitu, orientaci a hypertermii u myší (Hayakawa, et al., 2008). V jiné studii bylo podání CBD před THC spojováno s nárůstem hmotnosti a úzkosti, a zároveň se snížením lokomoce u potkanů v průběhu jednadvacetidenního experimentu, kdy bylo CBD podáváno 20 minut před intravenózní aplikací THC. Při studiu anxiety u potkanů bylo dokumentováno, že malé dávky CBD (2,5 až 10 mg/kg), nikoliv však vyšší úzkost snižovaly (Jones a Pertwee, 1972).

Interakce mezi THC a CBD jsou tedy velmi komplexní a schopnost CBD blokovat nebo potencovat účinky THC je vysvětlována řadou možných mechanismů, zejména na úrovni endokanabinoidního systému (Arnold, et al., 2012). Stejně tak rozdílné efekty CBD jsou závislé na dávce, poměru THC a CBD, způsobu a načasování podání (CBD před THC nebo spolu s THC), avšak definitivní závěry jsou stále v nedohlednu. Příkladem může být studie, ve které při pulmonální koadministraci THC a CBD došlo k nárůstu anxiety, vzhledem k aplikaci jednotlivých kanabinoidů, a naopak při perorální podání THC a CBD došlo k poklesu úzkosti, a to navzdory faktu, že po perorálním podání bylo dosaženo vyšších sérových koncentrací THC oproti podání samotného THC (Hložek, et al., 2017).

2.5 Farmakokinetika a metabolismus kanabinoidů

Farmakokinetika kanabinoidů je závislá na způsobu a frekvenci podání různých forem konopné drogy. Lipofilní charakter kanabinoidů předurčuje jejich distribuci v těle a při chronických dávkách způsobuje jejich akumulaci v tucích s pozvolným zpětným uvolňováním do krevního oběhu.

Kouření je nejběžnějším způsobem aplikace konopné drogy, při němž dochází k rychlému přechodu drogy z plic do krve a následně do mozku. Biologická dostupnost po kouření je uváděna v širokém rozmezí mezi 2 - 56 % z důvodu variabilní techniky kouření, což přispívá k nejasnostem ohledně přijaté dávky (Agurell, et al., 1986; Ohlsson, et al., 1986). Počet šluků, jejich trvání a prodleva mezi šluky, stejně jako objem vdechovaného kouře se značně podílí na individuální variabilitě farmakokinetiky. Kontinuální pumpa odebírající krev rychlostí 5 ml/min umožnila sledovat rychlou kinetiku THC v absorpční fázi stejně tak jako tvorbu 11-OH-THC a THCOOH během kouření (Huestis, et al., 1992). Dispozice a metabolismus THC a metabolitů byly sledovány v délce sedmi dnů po aplikaci marihuanových cigaret ve dvou variantách síly (1,75 a 3,55 %, tj. 16 a 34 mg THC). Průměrné koncentrace THC v plazmě dosahovaly hodnot $7,0 \pm 8,1$ ng/ml ($n = 7$) anebo $18,1 \pm 12,0$ ng/ml ($n = 7$) po jednom potáhnutí výše uvedených marihuanových cigaret a byly doprovázeny okamžitým nástupem psychotropních účinků. Vrcholové koncentrace v séru dosahovaly průměrných hodnot 84,3 ng/ml (rozmezí 50 – 129 ng/ml) a 162,2 ng/ml (rozmezí 76 - 267 ng/ml). V jiném experimentu byly naměřeny maximální průměrné koncentrace ve vzorcích séra odebraných po dokouření THC cigaret obsahujících 1,32, 1,97 a 2,54 % THC a dosahovaly hodnot 94,3 107,4 a 155,1 ng/ml. Kouření je preferovanou cestou většiny uživatelů marihuany pro rapidní nástup účinků ještě v průběhu kouření a možnosti dávkovat množství přijaté drogy v závislosti na subjektivních pocitech v průběhu aplikace, což např. v případě perorálního podání není dost dobře možné a nástup účinku je zpožděn v řádu hodin.

Pokud je THC podáno v perorální formě, absorpce je pomalejší v závislosti na obsahu žaludku a dosahované plazmatické koncentrace THC jsou nižší (Law, et al., 1984). K určení perorální biodostupnosti byl proveden experiment s dávkou THC obsažené v tzv. cookies (20 mg THC) a zjištěná biodostupnost byla v rozmezí 4 - 20 %.

Byly zkoumány i další možnosti administrace kanabinoidů jako oromukosonální nebo sublingvální, inhalace za využití vaporizéru či rektální administrace. Firma GW Pharmaceuticals uvedla na trh extrakt z rostlin konopí Sativex se standardizovaným zastoupením THC a CBD, a i jiných kanabinoidů pro jejich možnou komplexní účinnost. Sativex je aplikován ve formě spreje do dutiny ústní. Dále bylo zkoušeno několik čípkových přípravků na opicích z hlediska studia biodostupnosti a redukce first - pass efektu, přičemž hemisukcinát-THC poskytoval nejvyšší biodostupnost tj. 13,5 %. Hemisukcinát-THC byl testován z hlediska biodostupnosti společně s firemním Marinolem (10 mg THC v jedné kapsli, Solvay Pharmaceuticals, Inc.) u pacientů s indikací léčby spasticity. Koncentrace THC v plazmě po užití Marinolu kulminovaly v rozmezí 1-8 hodiny v koncentračním rozsahu 2,1 - 16,9 ng/ml, zatímco po rektální administraci THC-hemisukcinátu 2,5 - 5 mg došlo ke kulminaci během 2-8 hodin v koncentračním rozsahu 1,1 - 4,1 ng/ml. Biodostupnost byla po rektálním podání zhruba dvakrát vyšší než po perorálním podání z důvodu vyšší absorpce a nižšího first - pass metabolismu. Další možností, jak se vyhnout rychlému jaternímu metabolismu je transdermální aplikace. Léčiva prochází kůží na základě Fickova zákona prostou difuzí. Záleží tedy na rozpustnosti látky ve vodě a zároveň na jejím rozdělovacím koeficientu mezi vodou a oktánem (tedy její hydrofobnosti či hydrofilnosti), dále na koncentraci látky a ploše kůže vystavené látce. Dle pokusů na guinejských vepřích po aplikaci dermálních náplastí s obsahem THC bylo dosaženo rovnovážného stavu koncentrace 4,4 ng/ml THC v plazmě po 1,4 hodině po aplikaci a tato hladina byla udržována po dobu 48 hodin. V tomto experimentu bylo také pozorováno, že se v plazmě vyskytuje vysoké množství metabolitů THC (Valiveti, et al., 2004). Další výzkum směřuje k využití ethanolu jako nosiče THC pro zvýšení absorpce kůží. Kanabinoidové náplasti by byly pro uživatele mnohem pohodlnější vzhledem k ostatním formám dávkování a neexistenci protrahovaných perorálních forem THC. Intravenózní aplikace kanabinoidů je zajímavá především z hlediska výzkumu. Intravenózní aplikace byla využita k výzkumu možností asociace kanabinoidů a psychóz (D'Souza, et al., 2004). Ve studii byl sledován vliv THC po dvou různých dávkách (2,5 a 5 mg i. v.) na behaviorální, kognitivní a endokrinní efekty u zdravých dobrovolníků. Koncentrace THC v séru po 10 minutách dosahovaly hodnot v rozmezí $119,2 \pm 82,0$ ng/ml po dávce 2,5 mg a $166,5 \pm 87,4$ po dávce 5 mg. Koncentrace metabolitu THCOOH dosahovaly hodnot v rozmezí $43,8 \pm 26,1$ anebo $81,9 \pm 47,0$ ng/ml.

Někteří z účastníků ze studie odstoupili pro akutní paranoiu, paniku, hypotenzi a jiné. Dávka THC produkovala v různé míře příznaky schizofrenie, stejně jako nestandardní vzorce chování a kognitivní deficit.

2.5.1 Dispozice a metabolismus

Koncentrace THC v plazmě či séru ještě před ukončením kouření rychle klesají z důvodu masivní distribuce do tkání a intenzivního metabolismu v játrech působením enzymů cytochromu P450. THC je vysoce lipofilní a vstupuje zpočátku především do dobře prokrvených tkání jako jsou plíce, srdce, mozek a játra. Při pokusech na zvířatech s intravenózní aplikací radioaktivně značeného THC byla nejvyšší radioaktivita zjištěna v plicích. Distribuční studie THC jsou důležité pro pochopení vztahu mezi dávkou a případným behaviorálním nebo psychotickým účinkem. Po intramuskulární aplikaci delta-8-THC značeného ^{14}C myším byla maximální hladina radioaktivity v mozku dosažena po 2 - 4 hodinách a představovala 0,06 % aplikované dávky. THC se preferenčně ukládá v tukových buňkách po opakovaných podáních, což kontrastuje s relativně malým zastoupením v mozku (Nahas, et al., 2002). Poměr koncentrací mezi tukem a mozkovou tkání byl přibližně 21:1 po sedmidenním i. v. opakovaném podávání THC a až v poměru 64:1 po trojnásobné dávkovací periodě (Kreuz a Axelrod, 1973). Jiní autoři došli k závěru svých experimentálních studií, že mozek zadržuje po administraci THC méně než 1 % z podané látky. S dlouhotrvající expozicí se THC koncentruje v tukových tkáních, kde lze předpokládat konjugaci THC a jeho metabolitů s mastnými kyselinami, což může přispívat k větší stabilitě a retenci látky po mnoho dní (Grotenhermen, 2003).

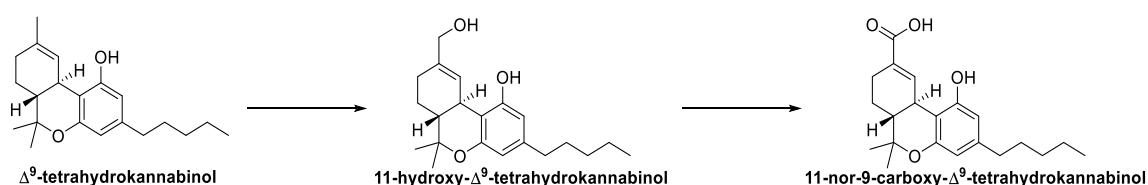
V jiné kontrolované distribuční studii bylo jako pokusné zvíře zvoleno prase z důvodu předpokládaného blízkého metabolismu s člověkem, včetně podobných biotransformačních enzymů a izoenzymů, a také pro podobnou váhu, výživové preference, trávení, funkčně podobné ledviny a krevní oběh (Brunet, et al., 2006). Po intrajugulární aplikaci 200 mg/kg THC byla pozorovaná farmakokinetika a distribuce obdobná jako u lidí. Studie zahrnovala osm prasat, která byla usmrcena v časech 30 min., 2, 6, 24 hodin po aplikaci. Vysoké koncentrace THC byly pozorovány v plicích, ledvinách, játrech, srdci a mozku. Po 30 minutách byla naměřena dvojnásobná koncentrace v mozku oproti krvi, s rychlejším poklesem v krvi oproti mozku v celém

sledovaném období, a tedy penetrace THC do mozkové tkáně je více akcentováno než v případě myši. Stejně tak byly vysoké koncentrace THC zaznamenány v tukové tkáni, a to i v čase 24 h po dávce po usmrcení zvířete. Této tkáňové retenci THC je stejně jako v předchozí studii (Mura, et al., 2005) přičítána dlouhá doba latence účinků THC. Distribuční objem THC u člověka je zhruba 10 l/kg, THC je z 95 - 99 % vázáno na krevní bílkoviny, především lipoproteiny plazmy (Kelly a Jones, 1992).

Ve studii z roku 1972 byl prvně popsán metabolismus THC u králíků a opic, kde jako hlavní metabolity byly identifikovány 11-OH-THC a THCOOH. Extenzivní metabolismus byl potvrzen i u dalších pokusných zvířat včetně myši, krysa a prasata s různými mezidruhovými odchylkami. Nesyntetické reakce I. fáze biotransformace THC zahrnují allylové a alkylové hydroxylace, oxidace alkoholů na ketony, aldehydy a kyseliny a degradaci pentylového řetězce. Konjugace s glukuronovou kyselinou je dominantní reakce II. fáze biotransformace za vzniku syntetických metabolitů. Oxidace THC na uhlíku v poloze 9 enzymovým komplexem jaterního cytochromu CYP 450 vede k produkci ekvipotentního metabolitu 11-OH-THC, který byl původně považován za původní psychoaktivní látku v marihuaně. Dosud bylo identifikováno více než sto různých metabolitů u člověka, např. di- a trihydroxymetabolity, ketony, aldehydy a různé karboxylové kyseliny (Matsunaga, et al., 1995). Vedle hlavního oxidačního metabolitu 11-OH-THC vzniká i značné množství 8-beta a 8-alfa-OH-THC. Jak již bylo zmíněno dříve, po perorálním podání jsou hladiny THC a 11-OH-THC téměř vyrovnané díky first-pass efektu, po inhalaci je poměr 90:10 ve prospěch THC. Dihydroxylací THC vzniká 8-beta-11-di-OH-THC. V hydrolyzované lidské moči byl tento metabolit monitorován, jeho hladiny klesaly pod měřitelné hodnoty po 22 hodinách po vykouření 2,64 % marihuanové cigarety. Dle autorů hodnoty tohoto metabolitu nad 15 - 20 ng/ml indikují užití poslední dávky před 4 - 6 h, což může tedy sloužit jako biomarker nedávného užití. Oxidací psychoaktivního 11-OH-THC vzniká neaktivní metabolit THCOOH (Obr. 3). THCOOH a její konjugát s kyselinou glukuronovou jsou konečnými metabolity u většiny živočišných druhů včetně člověka. Koncentrace THCOOH v plazmě převyšují hladiny THC za 30 - 45 min po inhalační aplikaci a po perorální aplikaci již po 1 hodině (Mason a McBay, 1985). Tvorba glukosiduronátů THCOOH v druhé fázi biotransformace není jedinou konjugací reakcí, v menší míře dochází ke konjugaci s glutathionem, k reakci s aminokyselinami a s mastnými kyselinami. Místem další biotransformace struktury

může být i přítomná fenolická skupina, avšak je obtížně stéricky dostupná. Tvorbou glukosiduronátů dochází ke zvýšení polariry metabolitů a podpoře eliminace látky z organismu. Po počáteční distribuční fázi je limitujícím faktorem v metabolismu THC jeho zpětné uvolňování z tkání a tukových depot zpět do krve. K metabolismu THC dochází i mimo játra. Z deseti savčích tříd CYP 450 systémů, třídy 1-4 primárně metabolizují xenobiotika a nacházejí se v játrech, tenkém střevě, kostní dřeni a minoritně i v mozku a ledvinách a slinných žlázách (Krishna a Klotz, 1994). U člověka nebyly dosud pozorovány významné rozdíly v metabolismu THC mezi pohlavími.

Metabolismus CBD je podobný metabolismu THC, primárně dochází k oxidaci uhlíku v poloze devět na alkohol a karboxylovou kyselinu, stejně tak dochází k oxidaci v postranním řetězci (Harvey a Mechoulam, 1990). Stejně jako THC podléhá first - pass efektu po perorálním podání, avšak na rozdíl od THC je podstatná část vyloučena nezměněna stolicí.



Obr. 3 Schéma biotransformace THC v první fázi metabolismu.

2.5.2 Eliminace

Po jednorázové inhalační aplikaci je 80 - 90 % resorbované dávky THC vyloučeno z organismu do pěti dnů, především ve formě hydroxy - a karboxymetabolitů. Více než 65 % je vyloučeno stolicí, kolem 20 % je vyloučeno močí (Wall, et al., 1983). V moči je více metabolitů kyselé povahy, hlavním metabolitem je THCOOH vylučovaný jako glukosiduronát, zatímco ve stolici převažuje 11-OH-THC (Williams a Moffat, 1980).

Deponování THC ve tkáních a pomalé zpětné uvolňování do krve ovlivňuje eliminaci THC z krve. U příležitostných kuřáků přibližně po 4 - 6 hodinách po dokončení kouření THC plazmatická koncentrace klesá k mezím detekce citlivé analytické metody.

U chronických kuřáků je plazmatický terminální poločas mnohem delší a jeho určení vyžaduje mnohem delší monitorovací interval a citlivou analytickou metodu.

Experimentální hodnoty poločasů bývají podhodnoceny, pokud je monitorovací interval nedostatečný. Vysoké dávky u chroniků a dlouhodobé monitorování plazmatických THC koncentrací vedou k vysokým hodnotám poločasů THC (Johansson, et al., 1989).

V kontrolované studii s chronickými uživateli byla hodnota eliminačního poločasu THC v plazmě stanovena jako 12,6 dní, jestliže bylo experimentální monitorování hladin zajištěno po dobu 4 týdnů po dávce (Johansson a Halldin, 1989). THCOOH koncentrace v moči bývají vysoké a po dávce mohou být monitorovány poměrně dlouho. Individuální variabilita je dána fyzickou konstitucí, frekvencí dávek. U chronických uživatelů dodržením dostatečného odběrového období byl stanoven i poločas THCOOH v moči a to 3 - 4 dny (v monitorovacím rozmezí 0,8 - 9,8 dne) (Johansson, et al., 1989).

2.5.3 Farmakokinetické interakce THC a CBD s dopady na účinky

V případě farmakodynamických hodnocení interakcí mezi THC a CBD je třeba vzít v potaz i farmakokinetiku těchto dvou látek. Pozorované interakce (především v experimentech na hlodavcích) závisí především na načasování podání CBD, tedy zda se podává v předstihu, anebo současně s THC (Zuardi, et al., 2012). V některých případech, když je CBD podáno 30 minut (ale až do 24 hodin) před THC myším či potkanům, je pozorována potenciace účinků THC, zatímco při současném podání je v popředí snížení až blokace účinků THC (Todd, et al., 2017). Na druhou stranu v podobném experimentálním uspořádání nebylo u opic pozorováno umocnění účinků THC bez ohledu na načasování podání. V případě potenciace účinků může být vysvětlením alterace farmakokinetiky THC předchozím podáním CBD, jelikož CBD je známým inhibitorem metabolismu THC na cytochromu P450, a tím dochází k nárůstu koncentrací THC v organismu, jak bylo mnohokrát reportováno (Bornheim, et al., 1995) (Bornheim a Correia, 1989). V případech perorální koadministrace obou látek (CBD 5,4 mg a THC 10 mg) lidem nebyla sledována změna koncentrací THC v porovnání s podáním samotného THC (Nadulski, et al., 2005). V jiné studii byly srovnávány hladiny THC v séru u lidských dobrovolníků jednak po perorální podání THC se sérovými hladinami THC po oromucosonální aplikaci THC a CBD v poměru 1:1, přičemž mezi podáními ve smyslu alterace farmakokinetiky způsobené CBD nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl (Karschner, et al., 2009a). Cílem těchto prací bylo dokumentovat, že současné podání obou látek nezpůsobuje minimálně u lidí alterace farmakokinetiky THC,

a tedy podávání preparátů s vyváženým složením THC a CBD nebude tímto mechanismem potencovat účinky THC. Na druhou stranu u potkanů způsobila koadministrace intravenózní THC a CBD skoro dvojnásobný nárůst koncentrací THC v porovnání s podáním samotného THC (Klein, et al., 2011), v jiné studii opět na potkanech bylo toto dokumentováno po perorální a subkutánní aplikaci, nikoliv však po pulmonální (Hložek, et al., 2017). Stejně jako v případech pozorovaných rozdílných farmakodynamických efektů po společném podání THC a CBD, je i v případě farmakokinetických experimentů generalizace výsledků stále obtížná.

2.6 Detekce a stanovení kanabinoidů v biologických matricích

V případě kanabinoidů je doba detekce v biologickém vzorku po poslední dávce silně ovlivněna frekvencí konzumace konopných drog, jejich tendencí vytvářet depa v tucích a postupně se zpětně vyplavovat do krevního řečiště. Neméně důležitá je citlivost použité metody. U příležitostných uživatelů je detekce a stanovení psychoaktivní látky – THC v krevním vzorku užitečná k posouzení stavu akutní intoxikace, zatímco detekce metabolitu THCOOH ve vzorku moče je vhodná k monitorování abstinence či konzumace. V neonatologii se někdy využívá k retrospektivnímu monitorování abstinence či průkazu abúzu v průběhu těhotenství novorozenecká smolka (meconium). K podobným účelům lze využít i analýzu kanabinoidů ve vlasech matky či dítěte (Moore, et al., 1998; Staub, 1999). V terénních situacích, např. při dopravních kontrolách v silničním provozu, je možné využít tzv. „on site testing“ a pomocí rychlých orientačních imunochemických testů ve slinách ověřovat přítomnost některých návykových látek, a tedy i kanabinoidů. Časový profil kanabinoidů ve slinách zhruba odpovídá časovému profilu kanabinoidů v krvi. Přestup kanabinoidů z krve do slin ovlivňuje řada faktorů a absolutní hodnoty jednotlivých kanabinoidů mohou být proti krvi mnohem nižší (Concheiro, et al., 2013; Laloup, et al., 2005). Výhodou testů ve slinách je však neinvazivnost odběru slin, a to i na veřejnosti a možnost pohodlného odběru pod dohledem zabraňujícím manipulaci se vzorkem, tedy falšování autenticity vzorku.

Moderní analytické metody pro specifickou stopovou analýzu kanabinoidů v biologických vzorcích jsou založeny na principu chromatografických metod v tandemu s hmotnostní spektrometrií, tj. kombinace plynové chromatografie s hmotnostní

spektrometrií (GC-MS) nebo kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) (Lacroix a Sausseureau, 2012; Manno, et al., 2001).

V případě stopových analýz pomocí GC-MS je nutné biologické vzorky před vlastní analýzou upravit pomocí různých extrakčních metod. Plynová chromatografie (GC) je vhodná pro látky termostabilní, které lze za definovaných podmínek převést kvantitativně do plynné fáze. Pro lepší chromatografické chování a pro zvýšení těkavosti lze nízkomolekulární polární látky upravit na jejich nepolární deriváty vhodnou chemickou reakcí zvanou derivatizace. V současnosti existuje mnoho derivatizačních technik pro GC, nejrozšířenější z nich jsou: silylace, acetylace, alkylace a esterifikace (Milman, et al., 2010). Aplikace kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) v toxikologických analýzách je novější a ve srovnání s GC-MS technologií má své přednosti i omezení, jejichž detailní popis je mimo rámec této práce. Kapalinová chromatografie nemá problém s termostabilitou a polaritou látek, je méně omezena velikostí molekul, má ovšem poněkud nižší separační účinnost a hmotnostní spektra více závisí na typu přístroje, z něhož pochází. Velkou předností LC je možnost analýzy vzorku již po jednoduché extrakci vzorku či po případném prostém rozpuštění vzorku (např. moče) v mobilní fázi. Tím odpadá nutnost mnohdy časově náročné a složité přípravy vzorku, jako tomu je u plynové chromatografie. Dalším nezanedbatelným benefitem LC jsou kratší časy jednotlivých analýz ve srovnání s GC, umožňující efektivnější využití přístroje. Naopak často diskutovaným problémem u kapalinové chromatografie jsou matriční efekty. Jde o interference balastních, endogenních a jiných látek přítomných v biologickém vzorku, které mohou modifikovat odezvu analytu a vést k deformaci spekter ztěžující správnou identifikaci analytu a hodnocení jeho koncentrace. Pokud jde o analýzu kanabinoidů v moči, pozornost je zaměřena zejména na finální metabolit THCOOH, který se do moče vylučuje volný i konjugovaný především s kyselinou glukuronovou (Niedbala, et al., 2001). Glukosiduronové konjugáty (glukuronidy či glukosiduronáty) jsou však pro přímou analýzu na GC-MS nevhodné, aglykony musí být předtím uvolněny hydrolyzou pomocí alkálie či enzymu. V případě LC-MS je možná jednoduchá simultánní analýza volných i konjugovaných metabolitů vedle parentních forem (Schwope, et al., 2012).

2.7 Extrakce fytoKANABINOIDŮ z rostlinného materiálu

Extrakce biologicky aktivních látek (např. sekundárních metabolitů) z rostlinného materiálu je důležitou součástí ať již získávání látek složitých na syntézu, případně pro zjištění obsahů látek při využití rostlinného materiálu jako nutraceutika nebo terapeutika (Casas, et al., 2009). V principu je proces extrakce přechodem jedné složky fázovým rozhraním mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami, popřípadě přechodem složky z jedné fáze (plynná, kapalná, pevná) do jiné. Extrakční proces by měl být kvantitativní a reprezentativní s ohledem na analyzované složky, a zároveň rychlý, jednoduchý a nenákladný. Z klasických metod se pro extrakce biologicky aktivních látek nejčastěji využívá macerace a Soxhletova extrakce (Azmir, et al., 2013). Mezi používaná rozpouštědla pro extrakci fytoKANABINOIDŮ z rostlinných materiálů patří methanol, ethanol, ethylacetát, chloroform či hexan. Všeobecný trend vývoje extrakčních metod je řízen snahou nahradit zdlouhavé postupy s využitím velkých objemů rozpouštědel moderními extrakčními technikami, mezi které řadíme zejména mikrovlnnou extrakci (microwave assisted extraction), extrakci organickým rozpouštědlem za zvýšené teploty a tlaku (pressurized fluid extraction, accelerated solvent extraction), extrakci kapalnou horkou vodou za zvýšeného tlaku (pressurized hot water extraction) nebo extrakci pomocí ultrazvuku (ultrasound assisted extraction) (Kaufmann a Christen, 2002) (Azmir, et al., 2013).

THC a ostatní KANABINOIDY jsou v rostlinném materiálu přítomny především ve formě karboxylovaných homologů těchto látek, které však snadno dekarboxylují za vyšších teplot. Pro extrakci těchto kyselin (společně s aktivními látkami) je tedy třeba provádět extrakce za laboratorních teplot a naopak, v případě extrakcí KANABINOIDŮ pro např. medicínské účely/extrakty je vhodné provádět extrakci za vyšších teplot, ve výsledném extraktu jsou tedy KANABINOIDY pouze v aktivní formě (Reekie, et al., 2018). Příkladem může být Soxhletova extrakce, která je však vzhledem k vysoké spotřebě rozpouštědel a časové náročnosti spíše obsoletní. S úspěchem lze provádět dekarboxylaci přímo v rostlinném materiálu před vlastní extrakcí, tj. sušením za teplot vyšších než 100 °C (L. O. Hanus, et al., 2016b).

Výzkum, vývoj a příprava nových netoxických rozpouštědel, nejlépe na bázi látek z obnovitelných zdrojů, je v současnosti trendem pro naplnění cílů zelené chemie, jelikož tradiční organická rozpouštědla představují významný podíl toxických odpadů

v chemickém průmyslu, která významně přispívají k environmentálnímu znečištění. V tomto ohledu bylo prezentováno nové médium s vysokým aplikačním potenciálem – tzv. deep eutectic solvents (DES). Koncept deep eutectic solvents byl poprvé popsán v roce 2003 a sice, při zahřívání směsi pevných látek s vysokými body tání (močovina a cholin chlorid) došlo ke vzniku kapaliny eutektické v širokém teplotním intervalu (Abbott, et al., 2003). Principem tohoto efektu je vznik nových vodíkových vazeb mezi jednotlivými komponentami (tzv. hydrogen bond donors; HBD a hydrogen bond acceptors; HBA), což vede ke snížení bodu tání výsledné směsi. V případě, že jsou výchozími látkami pro přípravu DES sekundární metabolity nebo jiné přírodní látky, např. cukry, alkoholy, aminokyseliny a přírodní organické kyseliny, byl zaveden termín natural deep eutectic solvents (NADES) (Dai, et al., 2013).

Výhodou při přípravě DES je tedy nepřeborné množství výchozích látek a jejich různých kombinací, čímž lze docílit přípravy DES cílené na míru jejich specifickému využití (Jeong, et al., 2017). V současnosti je nejběžnější metodou jejich přípravy míchání dvou a více výchozích látek v příslušném molárním poměru za konstantní teploty 80 °C za vzniku homogenní kapaliny (van Osch, et al., 2015). Výchozí komponenty lze i předem rozpustit ve vodě a za konstantní teploty odpařovat na rotační odparce a výslednou kapalinu následně vysoušet v exsikátoru. Fyzikálně-chemické vlastnosti a potvrzení struktury vzniklých DES se provádí např. pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací, NMR nebo diferenciální skenovací kalorimetrie (Liu, et al., 2018).

Vzhledem k povaze výchozích komponent se DES dělí na hydrofilní (tj. složené z polárních látek) a hydrofobní (převažuje příspěvek nepolární komponenty). V případě hydrofilních DES lze jejich vlastnosti (viskozita, vodivost, hustota) do jisté míry modifikovat přidávkem vody (5 - 20 %, v/v), kdy ještě nedochází k narušení supramolekulární struktury DES, tedy k rozrušení vodíkových vazeb (Liu, et al., 2018) (Dai, et al., 2013).

Díky jejich unikátním vlastnostem je využití DES studováno v mnoha chemických oblastech, od použití těchto rozpouštědel v organické syntéze, elektrochemii či při vývoji nových materiálů (Liu, et al., 2018). Avšak aplikace různých DES pro extrakční účely je v současnosti hybnou silou jejich výzkumu a vývoje, nejen z pohledu analytické chemie, ale i farmaceutického a kosmetického průmyslu. Předmětem zájmu jsou především

extrakce biologicky aktivních látek z rostlinného materiálu, např. flavonoidů, polyfenolů, karotenoidů a jiných, přičemž extrakční účinnost testovaných DES bývá až o 20 % vyšší ve srovnání s referenčními organickými rozpouštědly (Bajkacz a Adamek, 2017) (Jeong, et al., 2017).

V současnosti je většina využívaných DES hydrofilního charakteru, což zužuje spektrum extrahovatelných látek. Pro extrakci nepolárních látek jsou naopak vhodné hydrofobní DES. V tomto ohledu byly zatím představeny dva koncepty přípravy hydrofobních DES. První postup přípravy hydrofobních DES vychází z kombinace kvarterních amoniových solí a organických kyselin a alkoholů (van Osch, et al., 2015), a tyto byly využity pro extrakci bioaktivních látek z rostlinného materiálu např. artemisin z *Artemisia annua* (Cao, et al., 2017). Druhý přístup je založen na kombinaci mentolu a organických kyselin; extrakční potenciál těchto DES byl experimentálně ověřen na vybraných biomolekulách extrahovaných z vodných roztoků (Ribeiro, et al., 2015) a neonikotinoidů z odpadních vod (Florindo, et al., 2017). Této metodiky může být využito pro extrakci fytkanabinoidů, vzhledem k jejich nepolární povaze.

2.8 Časový profil delta-9-THC a metabolitů v krvi a psychotropní efekty

Z forenzního pohledu mají kanabinoidy, tj. hlavní psychotropní složka THC, v porovnání s alkoholem jinou a komplikovanější farmakokinetiku. Maximální hladiny THC jsou dosahovány v krvi po inhalační aplikaci marihuany během 3 až 10 minut. Zjištěné krevní hladiny THC nekorelují jednoznačně s behaviorálními projevy jedince, nelze tedy odvodit jednoduché vztahy hladina-účinek. V podmínkách klinických experimentů bylo prokázáno, že zkušební subjekty vykazují malou míru psychomotorického ovlivnění během prvních patnácti minut po inhalační aplikaci marihuany, navzdory tomu, že v tomto čase již bývá dosaženo vrcholu krevních hladin u všech participujících subjektů. Vrchol subjektivní euforie a fyziologických efektů (v případě THC tachykardie) bývá dosažen se zpožděním za vrcholem krevní koncentrace. Tento fenomén byl pojmenován jako "counter-clockwise hysteresis" (Schwope, et al., 2012). Fenomén zároveň poukazuje na dlouhou distribuční a redistribuční fázi z různých tělních kompartmentů a následnou dlouhodobou stimulaci endokanabinoidových mozkových receptorů. Maximální vliv inhalovaného THC na

kognici a psychomotoriku je dosahován v čase 20 - 60 minut po inhalaci, tedy v čase, kdy již krevní hladiny THC rapidně klesají. Po této době dochází i k postupnému slábnutí behaviorálních efektů. Dalším sledovaným analytem v krvi je 11-OH-THC, ekvipotentní metabolit mateřského THC. Maximální krevní koncentrace tohoto metabolitu jsou dosahovány 20 - 30 minut po inhalační aplikaci marihuany a jsou velmi nízké v relaci k mateřskému THC (Huestis, 2007). Tento metabolit je v krvi obvykle detekovatelný v krátkém časovém horizontu po dávce do šesti hodin, i když stopová množství mohou být detekována velmi citlivou metodou poněkud déle. Proto zjištěná množství 11-OH-THC v krevním vzorku mohou být indikátorem nedávného inhalačního užití marihuany. Po orální aplikaci THC dochází ke změně farmakokinetického profilu, uplatňuje se first pass metabolismus ve prospěch tvorby metabolitů a krevní koncentrace rostou pomaleji a dosahují maxima po 60 - 120 minutách (Huestis, 2007). Nástup psychotropních účinků je taktéž značně opožděn proti krevní koncentraci a zmíněná hystereze již není tak výrazná. Po aplikaci se THC akumuluje v tukovém depu v různých tkáních a poté se pomalu redistribuuje zpět do krve. Zatímco příležitostní uživatelé mají obtížně zjištěné hladiny THC v krvi za několik málo hodin po aplikaci, chroničtí uživatelé mohou mít v důsledku redistribuce depot THC měřitelné hladiny i po řadu dnů od poslední aplikace (Karschner, et al., 2009b) (Kelly a Jones, 1992). Výsledky experimentálních studií dokazují, že chroničtí uživatelé mohou mít během kontrolované abstinence nález THC v krvi i v období probíhající eliminační fáze (Karschner, et al., 2009b). Tato skutečnost staví forenzní toxikologii před nelehký praktický úkol, a sice určení doby poslední dávky drogy s možnými právními dopady na jedince.

2.9 Marihuana a způsobilost k řízení motorových vozidel

Současné vědecké poznatky o vlivu kanabinoidů na snížení schopnosti k řízení se opírají o experimentální a epidemiologické studie. Epidemiologická data ukazují, že riziko dopravní nehody je zhruba dvakrát vyšší po užití marihuany a vzrůstá s nárůstem krevní koncentrace THC. Krevní koncentrace vyšší než 2 ng/ml (cca 4 ng/ml v séru nebo plazmě) mohou být asociovány s rizikem dopravní nehody srovnatelným s rizikem u případů s krevní hladinou alkoholu kolem 0,5 promile (g/kg) (Drummer, et al., 2004). Současné užití alkoholu a marihuany má synergický a potenciační účinek a dopravní rizika se násobně zvyšují (Ramaekers, et al., 2011).

Data z experimentálních studií ukazují, že řidiči pod vlivem kanabinoidů si většinou uvědomují ovlivnění svých řídičských schopností a snaží se je kompenzovat pomalejší a opatrnější jízdou, přesto však jejich reakce na kritické dopravní situace může být nedostatečná (Ramaekers, et al., 2009; Ronen, et al., 2008). V reálném silničním provozu může být za touto snahou kompenzovat ovlivnění také potřeba na sebe neupoutat policejní pozornost.

Ramaekers a ostatní porovnávali neurokognitivní schopnosti po akutní dávce THC u příležitostných a chronických uživatelů marihuany v kontrolované studii (Ramaekers, et al., 2009). Došli k závěru, že u obou skupin konzumentů byl zvýšen reakční čas, u příležitostných uživatelů byly zhoršeny také další testované parametry.

U chronických uživatelů se vyvíjí tolerance k řadě akutních účinků a některé studie ukazují, že tento typ uživatelů vykazuje zvýšenou aktivitu v mozkových oblastech zejména zodpovědných za prostorovou orientaci (Kanayama, et al., 2004). U chroniků přetrvávající velká depa THC v organismu mají za následek zvýšenou stimulaci endogenního kanabinoidního systému vedoucí ke snížení hustoty CB1 receptorů v mozku a přechodnému zhoršení kognitivních funkcí ještě několik dnů i týdnů po dobu trvající abstinence (Pope, et al., 2001). Jinde je dokumentováno psychomotorické ovlivnění CNS u chronických uživatelů trvající tři týdny během abstinence (Bosker, et al., 2013). Užívání konopných drog je rizikovým faktorem také z hlediska vývoje náhodných psychotických symptomů a toto riziko se zvětšuje při chronické konzumaci (Kuepper, et al., 2011). Také abstinenci příznaky u chroniků mohou negativně ovlivňovat řídičské schopnosti (McClure, et al., 2012). Z uvedeného je zřejmé že akutní konzumace kanabinoidů u řidičů

může být problematická a řízení pod vlivem je z hlediska bezpečnosti riskantní a mělo by být z dopravy eliminováno. Forenzní otázka je, jak správně ovlivněného řidiče klasifikovat, rozpoznat. Ukazuje se, že neexistují jednoduché obecně platné korelace mezi krevní hladinou THC a mírou ovlivnění CNS v analogii s alkoholem. Toxikologický nález hladiny THC v krvi řidiče, příležitostného kuřáka marihuany, indikuje řízení pod vlivem psychotropní látky a její nedávnou konzumaci před jízdou či při jízdě. U chroniků jsou však hladiny THC v krvi zjistitelné i po dokumentované sedmidenní abstinenci (Karschner, et al., 2009b). Toxikologický nález THC v případě chronického konzumenta nemusí odpovídat akutní nedávné dávce a může být rozporován z hlediska akutního ovlivnění CNS, i když jsou poznatky o přetrvávajících neurokognitivních deficitech i při několikadenní abstinenci. Názory na vědecky podložené hraniční krevní koncentrace pro THC, od kterých nastává zhoršení schopností k řízení, jsou nejednoznačné, vztah je velmi individuální. Vyhodnocením experimentálních výsledků z několika studií bylo zjištěno, že nelze zobecnit hodnoty hladin THC ve vztahu k míře rizika dopravní nehody po užití THC. Např. Ramaekers a jeho kolegové (Ramaekers, et al., 2009) v kontrolované studii zjistili zhoršení řidičských schopností počínaje od hodnot 2 ng/ml THC v séru příležitostných kuřáků marihuany. V dopravní praxi u kontrolovaných řidičů bývá však stanovena krevní hladina se zpožděním, v době řízení bývá obvykle podstatně vyšší. Významný je také fakt, že po jednorázové dávce THC je vrchol euforických účinků zpožděn za krevní hladinou, a tedy behaviorální efekty mohou přetrvávat déle i při negativních nálezech THC v krvi (Bondallaz, et al., 2016). S cílem najít efektivní řešení, jak eliminovat ovlivněné řidiče z dopravy a preventivně snížit rizika, zavádí řada zemí v přestupkovém řízení legislativu typu per se, která se opírá o právní domněnku, že většinová populace řidičů-konzumentů marihuany řídí pod vlivem počínaje určitou krevní koncentrací THC. V kontinentální Evropě se per se limitní hodnoty pro THC v krvi řidičů pohybují nejčastěji v rozmezí 0,3 – 3 ng/ml (Watson a Mann, 2016). Hranice trestní odpovědnosti v dopravě s nálezem THC v krvi řidiče, srovnatelná s hranicí jedné promile alkoholu v krvi (která je obvykle aplikována v soudní praxi v ČR), je zatím předmětem odborných diskuzí a budoucích experimentálních studií.

3. Cíl práce

Cílem mé 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.

4. Tematické okruhy

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

4.1.1 Metody

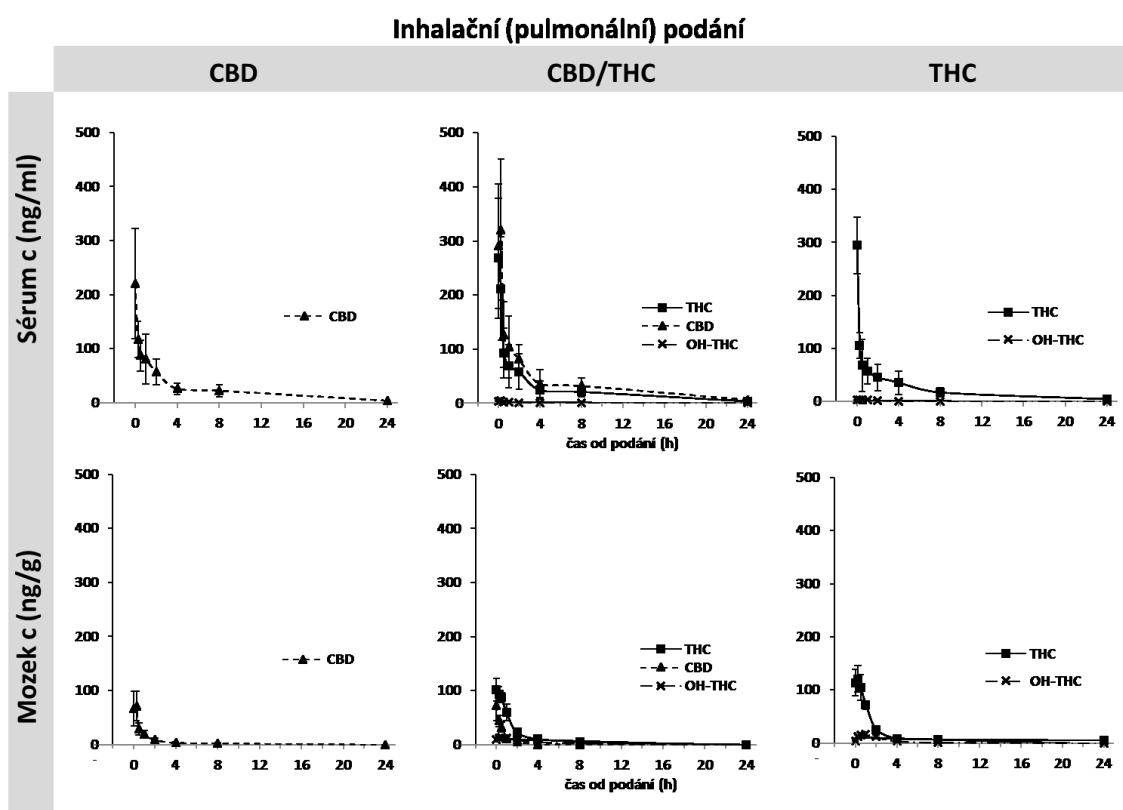
Použité metody jsou *in extenso* popsány v příložených publikacích.

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 pufrem 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.

4.1.2 Výsledky

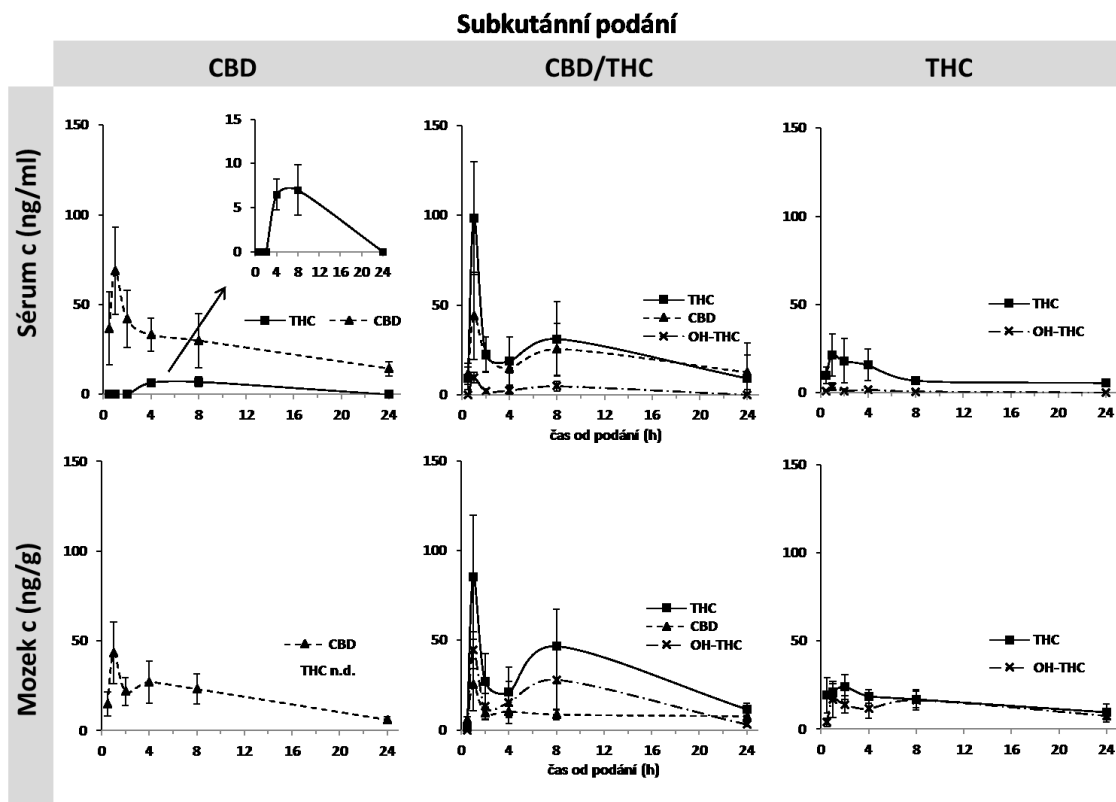
Získané výsledky jsou *in extenso* popsány v příložených publikacích, zde uvádím stručný výčet hlavních výsledků.

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 oproti séru (Obr. 4).



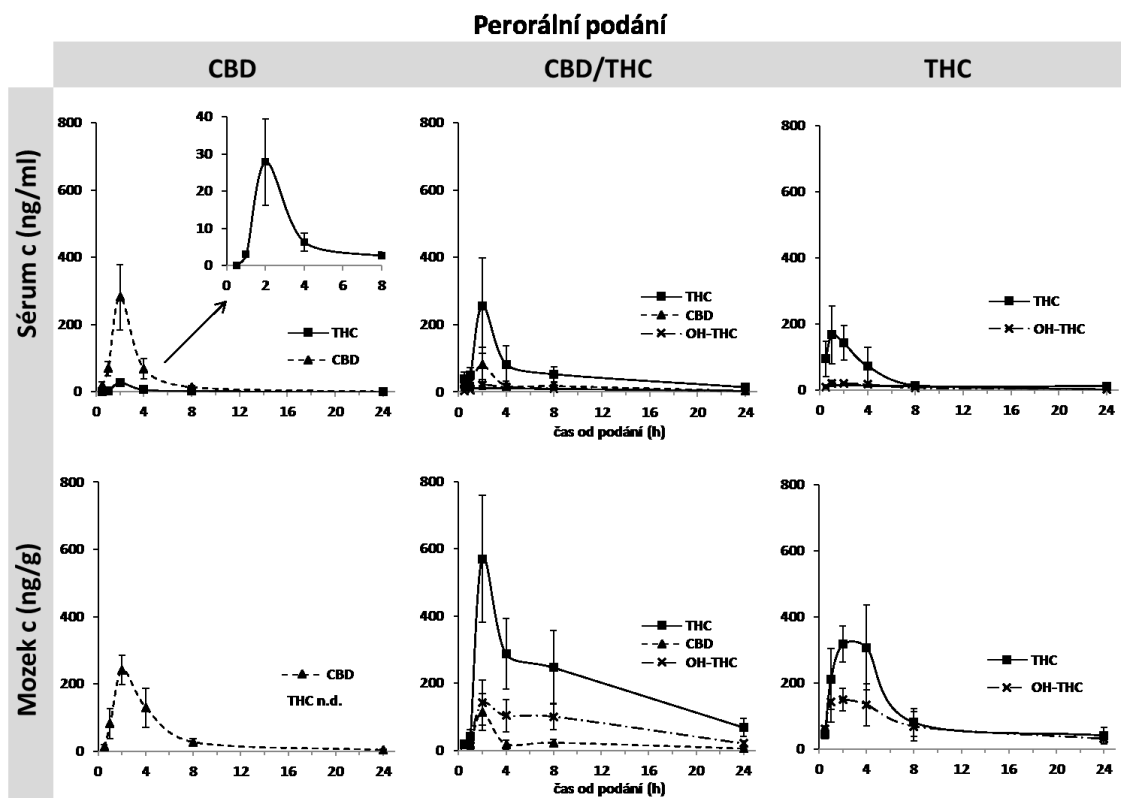
Obr. 4 Farmakokinetické profily po inhalačním podání CBD, THC a kombinace CBD/THC v séru a v mozku (dávka 20 mg kanabinoidů, doba inhalace 285 s, 6 potkanů na jeden časový bod).

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) (Obr. 5). Po podání samotného CBD bylo THC kvantifikováno po 4 a 8 hodinách od aplikace.



Obr. 5 Farmakokinetické profily po subkutánním 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

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. 6).



Obr. 6 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

Koncentrace a farmakokinetika metabolitů THC - tedy ekvipotentního metabolitu 11-OH-THC a inaktivního metabolitu THCOOH jsou komentovány pouze v příslušné příloze.

4.1.3 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). Biodostupnost CBD byla v rámci našich experimentů (tedy vaporizaci čistých kanabinoidů) pouze kolem dvou třetin oproti THC. Možným vysvětlením může být rozdílná teplota varu THC a CBD, přičemž CBD má mírně vyšší bod varu než THC, tedy 160 až 180 °C oproti 157 °C, což mohlo vést k nižšímu absolutnímu množství vaporizovaného CBD. Pulmonální administrace kombinace THC a CBD nevedla ke změně farmakokinetiky jednotlivých kanabinoidů oproti podání obou kanabinoidů samostatně. Dále nebylo THC detekováno v séru ani mozku 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 při používání kouřostrojů při 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 zjištěné 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. Zajímavým poznatkem bylo, že oproti publikovaným údajům o nízké biodostupnosti po perorálním podání (6 - 20 % pro THC a 6 - 19 % pro CBD), výsledky naší studie na potkanech ukazují na nejvyšší biodostupnost ze všech podání. K tomuto mohl přispět fakt, že kanabinoidy byly rozpuštěny v oleji a že pokusná zvířata byla vyhladovělá před administrací, oproti jiným podmínkám podání např. kapslí s kanabinoidy rozpuštěnými ve vodě (Huestis, 2007).

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, konkrétně enzymů CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4 (Jiang, et al., 2011) (Huestis, 2007). Ačkoliv byla koncentrace ekvipotentního metabolitu 11-OH-THC při tomto podání mnohem vyšší než v případě pulmonálního podání, nebyly pozorovány téměř žádné změny v jeho koncentraci ve vzorcích séra mezi podáním samotného THC a směsi THC a CBD. Tzn., že tedy tato konkrétní metabolická cesta THC nebyla spolu podáním CBD ovlivněna. 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. V literatuře v humánní studii je podobný nález, kdy po podání ekvivalentních dávek THC a CBD ve směsi různými cestami byly zjištěny rovněž nižší hladiny CBD oproti podání CBD samostatně.

Dále v naší studii po perorální aplikaci samotného CBD byly v séru jednoznačně zjištěny koncentrace THC v rozmezí 2,0 až 68,6 ng/ml. V mozkové tkáni nebyl však THC nalezen.

Za účelem dalšího prozkoumání možné konverze CBD na THC a případné penetrace THC do mozku bylo perorálně aplikováno dvěma potkanům 60 mg/kg CBD, tedy 6x vyšší dávka než v předchozích kinetických experimentech. Za těchto podmínek vysoké dávky byl již THC zjistitelný i v mozcích zvířat. 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 myši (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 potkanům s prvním odběrem po třech hodinách od aplikace (Palazzoli, et al., 2018). 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.

Dalším příspěvkem k ověření in vivo konverze CBD na THC byla studie s miniprasátky (n=3), jednak vzhledem k podobnosti funkcí jejich zažívacího traktu a dále i enzymové vybavenosti. Byla podávána dávka 15 mg/kg po dobu pěti dnů,

maximální průměrná koncentrace CBD v prvním dni byla 328 ng/ml a v pátém dni před ukončením experimentu 259 ng/ml, přičemž THC a jeho metabolity nebyly opět detekovány v žádném z odebraných sérových vzorků. Pro ověření konverze byla dále zvířata na konci pátého dne utracena, a bylo změřeno množství CBD v zažívacím traktu, respektive žaludečním obsahu 84 500 ng/ml a tenkém střevě 43 900 ng/ml, tedy koncentrace zhruba 200 až 300x vyšší než v séru, přesto v těchto vzorcích nebylo taktéž detekováno THC ani jeho metabolity. Tímto bylo dle autorů plně dokázáno, že in vitro experimenty s cyklizací CBD nejsou reprodukovatelné in vivo (Wray l. , 2017). Je nutno ovšem podotknout, že autoři jsou zaměstnanci GW Pharmaceuticals, tedy výrobce preparátů na bázi CBD. Pro ověření cyklizace in vivo je tedy třeba více experimentů a dále ověření reprodukovatelnosti výsledků jednotlivých autorů.

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 výsledek testování na THC u některých jedinců zcela vyloučen 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 řadu faktorů, jako např. i náplň a stav žaludku při podání, kdy nejnižší pH bývá ráno po nočním hladovění.

4.2 Časový profil THC u člověka po inhalační aplikaci

4.2.1 Metody

Studie byla schválena etickou komisí Psychiatrického centra 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). Hranice frekvence konzumace klasifikující obě skupiny uživatelů jako rekreační nebo pravidelní chroničtí na základě jejich výpovědí byla zvolena přibližně 12 jointů za měsíc s mírným překryvem (skupina střední rekreační). Někteří rekreační uživatelé uváděli jeden joint měsíčně, někteří chronici i více jointů denně.

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 odebrány další vzorky krve. Obsah kanabinoidů v užitém vzorku (cigaretě/jointu) jednotlivých uživatelů byl stanoven chromatograficky (Kriminalistický Ústav Praha). Rekreační i chroničtí uživatelé kanabisu přitom byli instruováni tak, že v průběhu kinetického experimentu nesmí užít další dávku v průběhu minimálně dalších 24 hod, s čímž souhlasili.

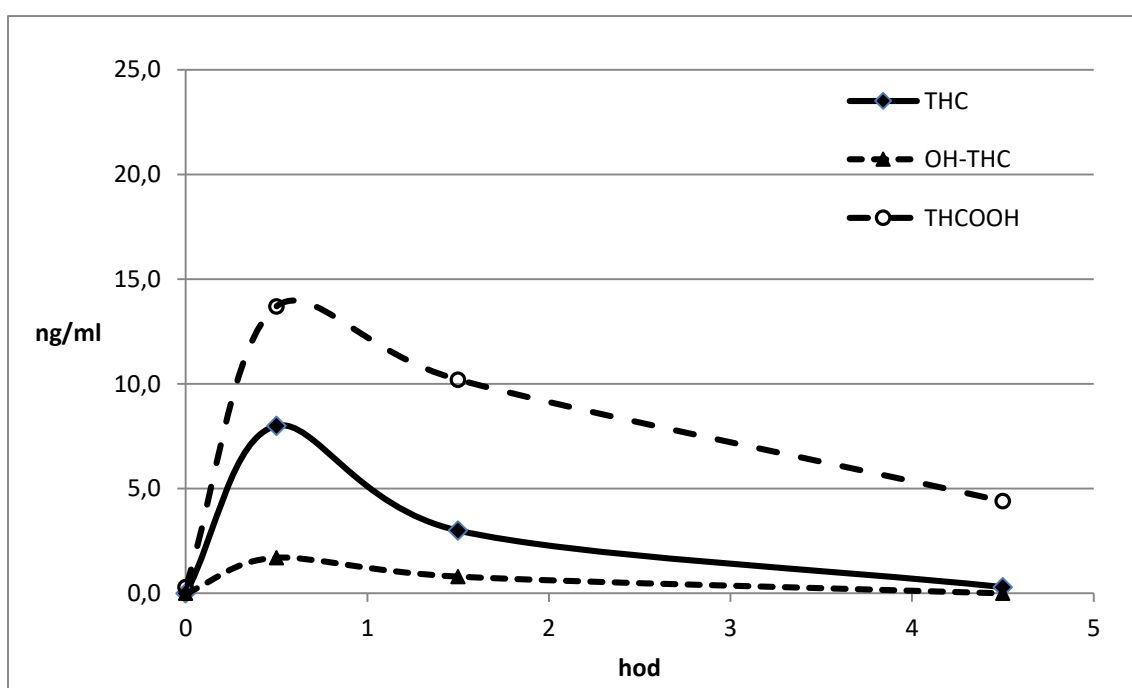
Kanabinoidy byly izolovány ze sérových vzorků uživatelů; v rámci přípravy vzorku, bylo k 1 ml séra přidáno příslušné množství deuterovaných vnitřních standardů (THC-d3, 11-OH-THC-d3 a THCOOH-d3) a poté byly kanabinoidy extrahovány pomocí SPE kolonek. Výsledné eluáty byly po odpaření a vysušení silylovány. K měření hladin THC a metabolitů v krevních sérech byla použita validovaná GC-MS metoda na přístroji Agilent 7890 A-5975 C. Kvantifikační mez metody pro THC byla 1 ng/ml séra.

Pro srovnání hladin THC v séru rekreačních a chronických uživatelů (bazální, za 30 min, 1,5 hod a 4,5 hod) byla použita dvoucestná ANCOVA pro opakovaná měření kdy bazální hladiny THC (kontrolní odběry) sloužily jako kovariáta. Faktor typ uživatele (rekreační vs chronik) byl nezávislou proměnnou, závislou proměnnou byly změřené hladiny THC v čase. Pro srovnání rozdílů mezi kontrolním odběrem a následnými odběry byla použita jednocestná ANOVA *s post hoc* Neuman-Keuls testem. Z důvodu téměř nulových hladin u rekreačních uživatelů byly hladiny za 4,5 hodiny po užití ještě navíc mezi skupinami porovnány pomocí *t-testu*. Hladiny THC za 30 min po užití byly dále korelovány pro všechny uživatele s množstvím užitého THC (Pearsonova korelace). Srovnání množství užitého THC rekreačními uživateli a chroniky bylo provedeno pomocí *t-testu*.

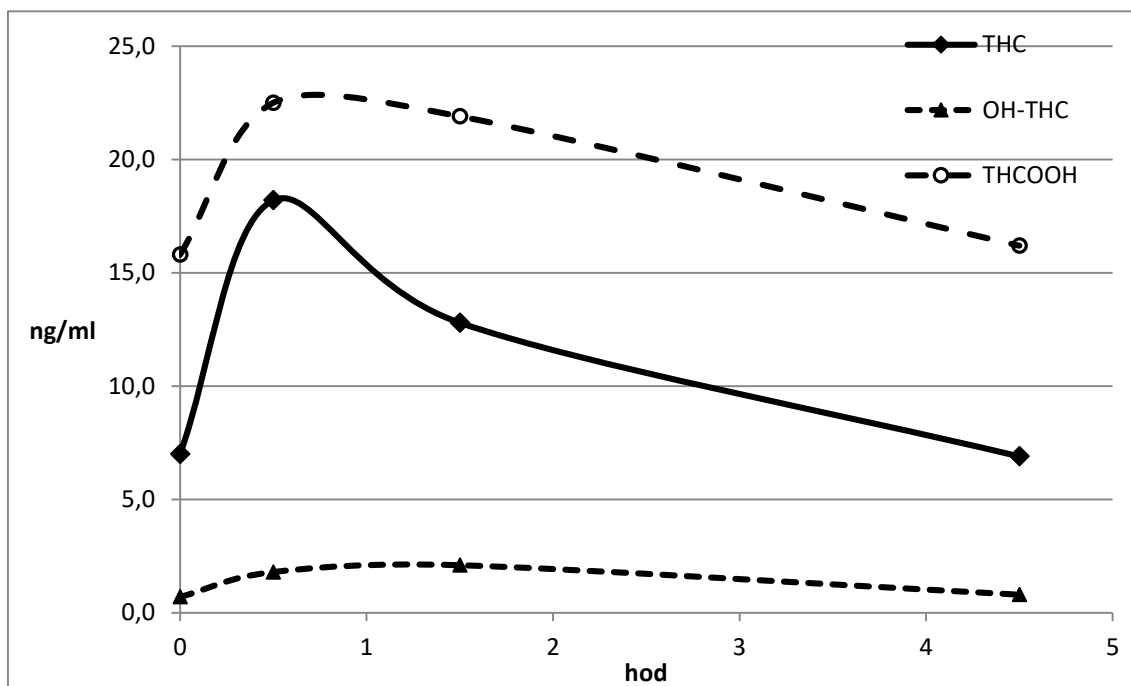
4.2.2 Výsledky

Chroničtí uživatelé kanabisu v experimentu užíli 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. 7 Kinetický profil THC a jeho metabolitů v séru rekreačního uživatele.



Obr. 8 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). Typické kinetické profily THC a jeho metabolitů u rekreačního a chronického uživatele jsou znázorněny na Obr. 7 a 8. 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).

4.2.3 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 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., 2009a).

Jako potenciální indikátory nedávného užití kanabinoidů byly zkoumány individuální poměry koncentrací THC a jeho metabolitů v čase po dávce. Huestis publikovala dva matematické modely schopné predikovat poslední dobu užití kanabinoidů (Huestis, et al., 1992). Model I. je založen na relaci hodnot sérových koncentrací THC a model II na poměru THCOOH a THC vzhledem k času po dávce. Model I. byl odvozen z lineární regresní analýzy sérových hladin THC a času uplynulého po kouření marihuany a vyjádřen rovnicí: $\log h = -0,698 \log [\text{THC ng/ml}] + 0,687$ ($r = 0,949$). Model II. byl taktéž odvozen z lineární regresní analýzy poměrů sérových hladin THCOOH a THC a času uplynulého po kouření marihuany a má výslednou formu: $\log h = 0,576 \log [\text{THCOOH ng/ml/THC ng/ml}] - 0,176$ ($r = 0,919$). V obou rovnicích parametr „h” značí čas

v hodinách. Oba modely byly ověřeny na datech z devíti klinických studií, kdy došlo k jednorázové aplikaci marihuany kouřením a následným měřením hladin kanabinoidů v sérových vzorcích (n = 168) metodou GC-MS. Oba modely predikovaly uplynulý čas od aplikace marihuany u příležitostných uživatelů s až 90 % přesností. U chronických uživatelů dochází ke snížení predikce uplynulé doby od požití marihuany obou modelů na 60 - 70 % a nejsou tedy vhodné pro odhad poslední doby užití kanabinoidů u chronických uživatelů v období jejich abstinence vzhledem k reziduálním hladinám kanabinoidů v krevním oběhu.

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 nekompletní, 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). V některých odborných kruzích se diskutuje výše tolerovatelné analytické meze pro THC v krvi, která by z dopravy separovala ovlivněné řidiče, přičemž návrhy tzv. „science based limits“ jsou zatím spíše kontroverzní a obtížně realizovatelné (Grotenhermen, et al., 2007). Navíc v době řízení bývá často koncentrace THC v krvi podstatně vyšší, než odpovídá době pozdější, kdy byl odebrán krevní vzorek (často s několika hodinovou prodlevou).

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. Hraniční nízké hodnoty pro THC v odebraném krevním vzorku blízké mezi detekce specifické toxikologické metody, které dokazují konzumaci konopné drogy, mají své oprávnění v účinné dopravní legislativě v zájmu prevence a

snížení rizik dopravních nehod. 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 stálé a měřitelné hladiny THC v krvi, byť bezprostředně před jízdou drogu neužijí. Exaktní klasifikace míry snížení způsobilosti k bezpečnému řízení u chronických uživatelů, která je žádoucí ve forenzní praxi, zůstává problémem. V tomto směru se legislativci často kloní k určité generalizaci ve snaze eliminovat rizika dopravních nehod, popř. zajistit bezpečnost při výkonu povolání.

4.3 Farmakokinetika syntetických kanabinoidů

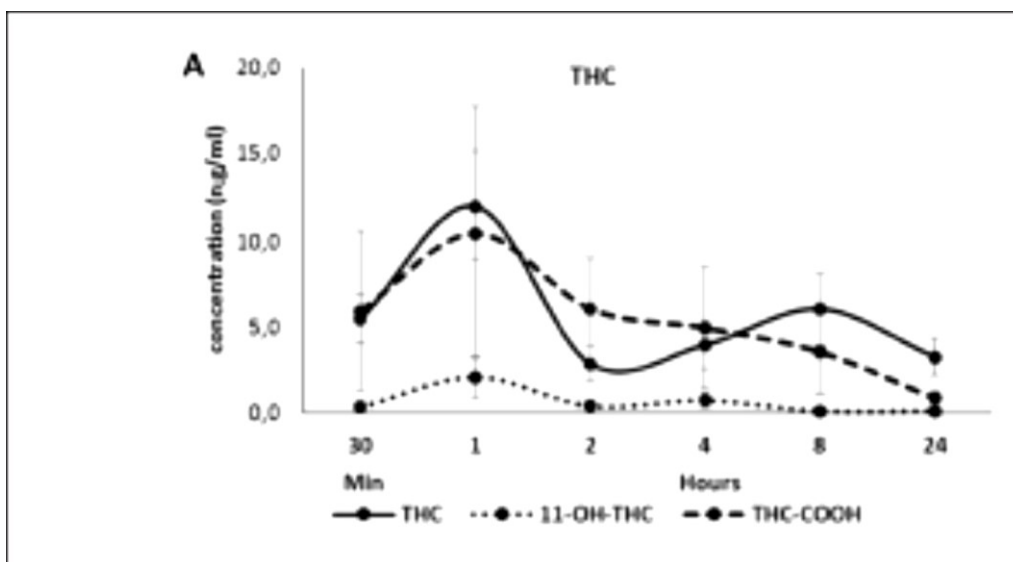
4.3.1 Metody

Pro všechny farmakokinetické experimenty byly užity potkani (typ Wistar, samci), kterým byl aplikován syntetický kanabinoid JWH-073 nebo JWH-210 (oba v dávce 0,5 mg/ml). Podrobnosti k ustájení, aklimatizaci, dietě před experimenty a počtu jedinců lze nalézt v příložené publikaci. Kvantifikace THC a jeho metabolitů v séru byla prováděna vyvinutou metodikou. Ve zkratce, k 1 ml séra bylo přidáno 10 μ l deuterovaných standardů (THC-d₃, CBD-d₃, 11-OH-THC-d₃, THC-COOH-d₃; 5 ng/ μ l). Sérum bylo naředěno octanovým pufrům o pH 4 (0,01 mol/l) a následně byli kanabinoidy extrahovány pomocí SPE kolonek. Výsledné extrakty byli odpařeny proudem vzduchu a v insertech 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. Kvantifikace SK byla provedena v grantové spolupráci na VŠCHT a je podrobně popsána v příslušné příloze.

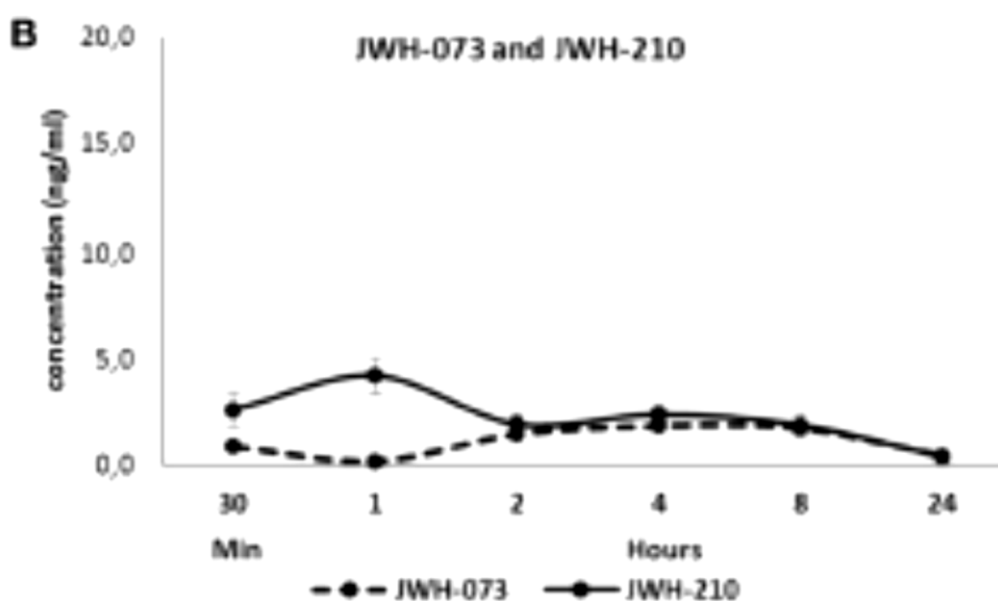
4.3.2 Výsledky

Syntetické kanabinoidy JWH-073 a JWH-210 (oba v dávce 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.



Obr. 9 Farmakokinetický profil THC (3 mg/kg, subkutanní podání) a jeho metabolitů 11-OH-THC a THCOOH v různých časových bodech (30 min, 1, 2, 4, 8, 24 h po aplikaci) Data reprezentují průměrné hodnoty \pm SEM (n = 6 zvířat na jeden bod) sérových hodnot vyjádřených v ng/ml.



Obr. 10 Farmakokinetický profil JWH-073 (0,5 mg/kg, subkutanní podání) a JWH-210 (0,5 mg/kg, subkutanní podání) v různých časových bodech (30 min, 1, 2, 4, 8, 24 h po aplikaci). Data reprezentují průměrné hodnoty \pm SEM (n = 8 zvířat na jeden bod) sérových hodnot vyjádřených v ng/ml.

4.3.3 Diskuze

Syntetické kanabinoidy (SK) jsou širokou skupinou látek s různou strukturou vyznačující se kanabinomimetickými účinky (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 jednotlivých SK se věnovalo již mnoho prací, zejména těm látkám z první generace (ElSohly, et al., 2014). V rámci studia farmakokinetiky (u lidských dobrovolníků; n= 6) po inhalačním podání JWH-018 nanesených na inertní 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 mateřskou podanou látkou byly měřeny i sérové koncentrace jejich metabolitů, které však byly v maximu 10x nižší proti látce původní. Nejvíce zastoupeným metabolitem byla JWH-018 pentanová kyselina, a tedy konečným metabolitem je stejně jako v případě THC karboxylová kyselina (Diao a Huestis, 2019). V rámci studie (Toennes, et al., 2018) byly zároveň odebrány i vzorky slin ve stejných časových intervalech jako krevní vzorky a podobně jako v případě séra, i ve slinách byly maximální koncentrace dosaženy 5 min po aplikaci (2-2036 ng/ml; průměr 25,7 ng/ml), přičemž po jedné hodině klesly koncentrace pod 2 ng/ml a po dvou hodinách již pod 1 ng/ml. Stejně jako po inhalační aplikaci THC nebyla prokázána korelace mezi sérovými a slinnými hladinami sledovaných látek (tj. THC a JWH-018). Ve slinách nebyly nalezeny žádné metabolity podané látky, což může být způsobeno malou aplikovanou dávkou a nedostatečným přestupem metabolitů z krve do slin a případným rychlým poklesem hladin metabolitů pod detekční meze analytické metody. Případný nález metabolitů SK ve slinách by mohl být indikátorem větší dávky či chronického užívání.

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 fytkanabionidů 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). Farmakologická aktivita metabolitů je však dosud málo prozkoumaná (tj. jejich aktivita na CB receptorech) (Gamage, et al., 2019).

Stejně jako v naší předchozí studii sledující farmakokinetické profily fytkanabinoidů po různých podáních, i zde subkutánní podání vedlo k bifazickému profilu THC (tedy distribuce do tkání a následné redistribuci do krevního řečiště) (Hložek, et al., 2017). 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 µg/kg JWH-210, THC a RCS-4 (látky řazené 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 (\pm 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).

4.4 Extrakce a stanovení fytoKANABINOIDŮ v rostlinném materiálu

4.4.1 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 dvojic 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. Výchozí látky a jejich kombinace jsou uvedeny v Tabulce 1. 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.

Tabulka 1. Přehled kombinací výchozích komponent pro přípravu DES.

Zkratka	HBA	HBD	Molární poměr	Teplota	Skupenství
M:FA	Mentol	Kyselina mravenčí	1:1	80 °C	čirá kapalina
M:AA		Kyselina octová	1:1	80 °C	čirá kapalina
M:PA		Kyselina propionová	1:1	80 °C	čirá kapalina
M:BA		Kyselina butanová	1:1	80 °C	čirá kapalina
M:HA		Kyselina hexanová	1:1	80 °C	čirá kapalina
M:OA		Kyselina oktanová	1:1	80 °C	čirá kapalina
M:DA		Kyselina dodekanová	1:1	80 °C	čirá kapalina
M:LA		Kyselina mléčná	1:1	80 °C	čirá kapalina
M:PAA		Kyselina fenylactová	1:1	80 °C	žlutá kapalina
M:MA		Kyselina mandlová	1:1	80 °C	čirá kapalina
	Mentol	Kyselina šťavelová	1:1 – 5:1	80 – 95 °C	pevná látka v kapalině
		Kyselina malonová	1:1 – 5:1	80 – 95 °C	pevná látka v kapalině
		Kyselina vinná	1:1 – 5:1	80 – 95 °C	pevná látka v kapalině
		Kyselina ftalová	1:1 – 5:1	80 – 95 °C	pevná látka v kapalině
		Kyselina glykolová	1:1 – 5:1	80 – 95 °C	nemísitelné kapaliny
		Kyselina jablečná	1:1 – 5:1	80 – 95 °C	pevná látka v kapalině
		Kyselina hipurová	1:1 – 5:1	80 – 95 °C	pevná látka v kapalině
		Kyselina pyrohroznová	1:1 – 5:1	80 – 95 °C	nemísitelné kapaliny
		Kyselina asparagová	1:1 – 5:1	80 – 95 °C	pevná látka v kapalině

4.4.2 Výsledky

Metodou zahřívání a míchání dvou výchozích komponent bylo úspěšně připraveno deset DES kapalin, kdy byl jako HBA zvolen mentol (Tabulka 1). Tyto DES byli čiré kapaliny (pouze DES s fenylactovou kyselinou byla žlutá kapalina) a v průběhu jejich skladování při laboratorní teplotě po dobu třiceti dnů nedocházelo ke krystalizaci výchozích látek. Některé fyzikálně chemické vlastnosti a identita DES z našeho souboru byly již dříve charakterizovány pomocí ¹H NMR a diferenciální skenovací kalorimetrie, ostatní DES byly použity pro extrakci bez této charakterizace. 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) (Tabulka 1).

Připravené DES byli následně testovány pro extrakci fytoKANABINOIDŮ z rostlinného materiálu. Jak je patrné z Obr. 11, extrakční účinnost jednotlivých DES závisí na povaze

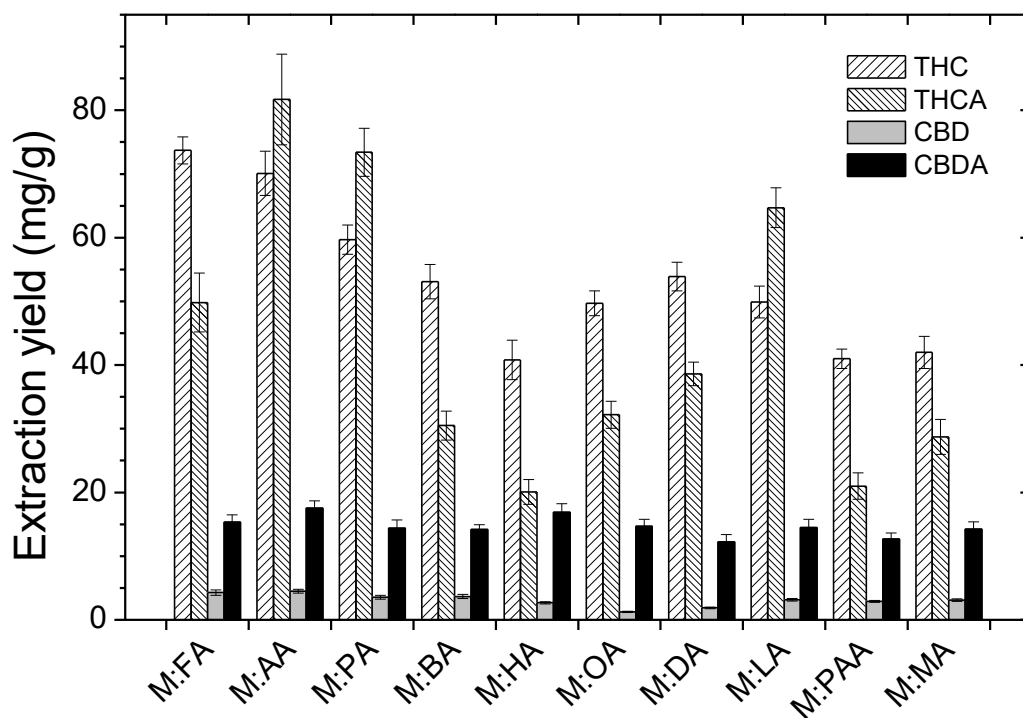
HBD (tedy kyseliny). Kyselina mravenčí poskytovala nejvyšší výtěžky pro THC ze všech testovaných HBD. Co se týče absolutní celkové sumy vyextrahovaných kanabinoidů, byla v tomto ohledu nejlepší kyselina octová. Od kyseliny octové klesaly extrakční výtěžky THC a THCA v homologické řadě po kyselinu hexanovou, 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 účinnosti vyšší než DES na bázi mentolu a kyseliny octové (Obr. 12).

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 2.

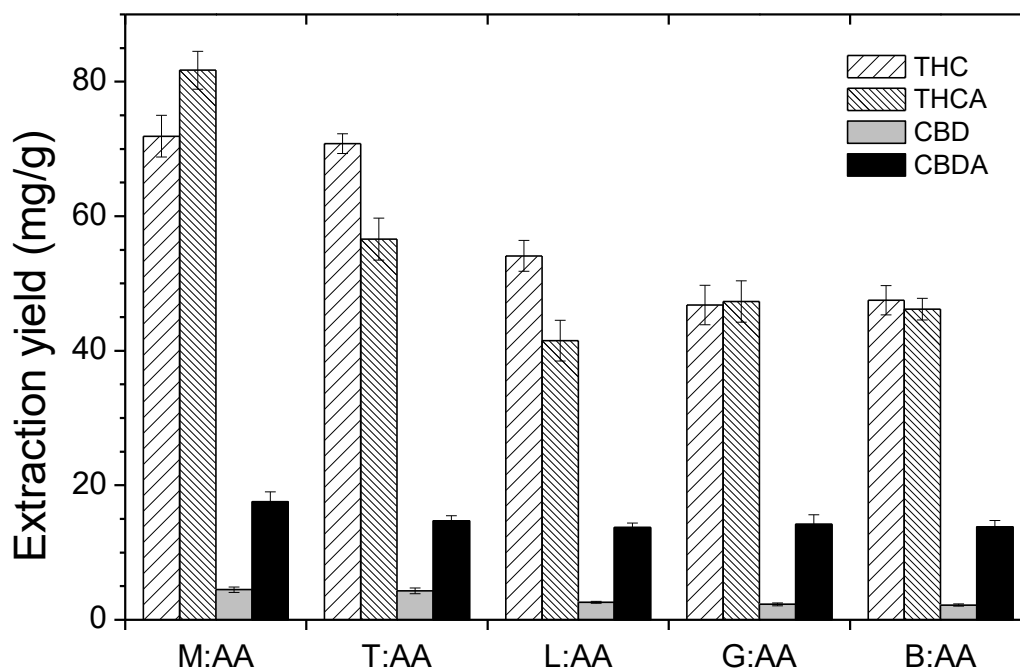
Tabulka 2. Porovnání hodnot extrakčních účinností běžných organických rozpouštědel a DES kapaliny složené z mentolu a kyseliny octové pro vybrané fyto-kanabinoidy (THC, THCA, CBD and CBDA). Jako referenční rozpouštědlo byla použita směs metanol: chloroform (9:1; v/v).

	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



Obr. 11 Porovnání extrakčních výtěžků (mg/g) jednotlivých fyto-kannabinoidů (THC, THCA, CBD a CBDA) v DES kapalinách připravených z mentolu a různých organických kyselin (počet opakování= 3).

M...mentol, FA...kyselina mravenčí, AA...kyselina octová, PA...kyselina propionová, BA...kyselina butanová, HA...kyselina hexanová, OA...kyselina oktanová, DA...kyselina dodekanová, LA...kyselina mléčná, PAA...kyselina fenylactová, MA...kyselina mandlová.



Obr. 12 Porovnání extrakčních výtěžků (mg/g) jednotlivých fyto-kannabinoidů (THC, THCA, CBD a CBDA) v DES kapalinách připravených z různých terpenů a kyseliny octové (AA) (počet opakování= 3). M...mentol, T...terpenol, B...borneol, G...geraniol, L...linalol).

4.4.3 Diskuze

Extrakce kanabinoidů z rostlinného materiálu je důležitá jednak pro sledování potence ve smyslu obsahu THC těchto rostlin ve forezních situacích, např. v ilegálních pěstírnách, ale i z hlediska sledování obsahu jednotlivých tedy i nepсихоaktivních kanabinoidů v kultivarech určených pro medicínální účely. Význam a rozsah těchto zkoumání bude nadále růst, zejména s ohledem na rozrůstající se počet zemí, kde je použití kanabinoidů pro medicínální účely povoleno, a zároveň rozrůstající se počet terapeutických indikací (Abuhasira, et al., 2018). V neposlední řadě je i rekreační legální užívání konopí v některých zemích spojeno s nutností deklarace obsahu THC v těchto produktech. Tento nárůst požadavků na kontrolu a sledování kvality produktů s sebou nese i zvýšené nároky na extrakční postupy potřebné pro analytické stanovení.

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 (L. O. Hanus, et al., 2016b). 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. Užívání chloroformu je v extrakčních postupech bohužel stále rozšířeno. Na druhou stranu jsou v současnosti rozšířeny extrakce založené pouze na nižších alkoholech, především metanolu a etanolu (Patel, et al., 2017). Užití jiných organických rozpouštědel bylo taktéž popsáno (ethylacetát, hexan), avšak vzhledem k jejich vyšší těkavosti a toxicitě je od nich postupně upouštěno.

V naší studii jsme prokázali vyšší extrakční účinnost alternativního organického rozpouštědla hydrophobic deep eutectic solvent ve složení mentol: kyselina octová pro všechny testované kanabinoidy (Tabulka 2). Využití tohoto extrakčního média je vhodné pro následné stanovení obsahu kanabinoidů v rostlinném materiálu, avšak nikoliv pro získání jednotlivých kanabinoidů a jejich další zpracování. Byly již sice publikované práce se zpětnou extrakcí DES extraktu na porézních pryskyřicích, ale opětovné použití metanolu pro tuto zpětnou extrakci snižuje efektivnost celé metodiky (Cao, et al., 2017). V literatuře bylo popsáno použití i hydrofilních DES pro extrakci kanabidiolu z technického konopí. Největšího extrakčního výtěžku bylo dosaženo pomocí DES vzniklé kombinací cholin chloridu a diethyl 2,3-dihydroxysukcinátu (1:1). Použití hydrofilní DES vedlo však k dramatickému nárůstu extrakčního času (55 min), zatímco použití hydrofobních DES pro extrakci nepolárních kanabinoidů je časově efektivnější (5 min) (Changyong C., 2019). Srovnání absolutních výtěžků CBD pomocí hydrofilních a hydrofobních DES je problematické s ohledem na variabilitu výchozího konopného materiálu (tj. různé procentuální zastoupení CBD v jednotlivých kultivarech a částech rostlin).

Z hlediska zelené chemie je aktuálním 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).

5. Závěr

Předkládaná dizertační práce je věnována experimentálnímu studiu fytkanabinoidů a syntetických kanabinoidů, sledování 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 nálezů kanabinoidů v klinické a forenzní toxikologii. S ohledem na terapeutické využití konopných produktů byla pozornost zaměřena také na testování a hodnocení vhodných extrakčních postupů kanabinoidů z rostlinného materiálu.

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 nebylo pozorováno ovlivnění farmakokinetiky oproti podání jednotlivých kanabinoidů samostatně.
 - Perorální a subkutánní aplikace kombinace THC a CBD vedla k 2 až 3x nižším sérovým hladinám 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 anebo i subkutánním podání samotného CBD byla prokázána jeho částečná konverze na THC. THC v séru i v mozku potkanů bylo prokazováno v celém sledovaném čase od aplikace, zatímco po subkutánním podání samotného CBD bylo THC detekováno až po 4 a 8 hodinách od aplikace. Jde tedy o in vivo potvrzení cyklizace CBD na THC u potkanů typu Wistar.
- 2. Okruh:** Časový profil THC u člověka po inhalační aplikaci
 - U souboru sledovaných rekreačních uživatelů klesly hladiny THC v séru pod 2 ng/ml (zákonná limitní per se hodnota v ČR pro zakázané řízení pod vlivem marihuany) již zhruba 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 i po 24 hodinách od inhalační aplikace konopných produktů (marihuany nebo hašiše).

Důvodem jsou přetrvávající bazální hladiny THC chronických uživatelů před počátkem experimentu, které se odvíjejí od intenzity předchozího užívání konopných produktů.

- V rámci experimentů nebyla ani u jedné skupiny uživatelů prokázána korelace mezi užitou dávkou a následnou hladinou THC v séru - mj. díky velké variabilitě fyziologických parametrů uživatelů a také díky variabilitě 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 fytkanabinoidů i syntetické kanabinoidy jsou vzhledem k jejich lipofilitě (a tedy distribuci a redistribuci do tkání) detekovatelné v séru po omezenou dobu v závislosti na dávce a dle citlivosti analytické metody.

4. **Okruh:** Extrakce a stanovení fytkanabinoidů v rostlinném materiálu

- Byla připravena a testována série hydrofobních deep eutectic solvents pro extrakci fytkanabinoidů z rostlinného materiálu mj. také v perspektivě definovat obsah konopných produktů pro terapeutické indikace.
- 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 běžnými organickými rozpouštědly (tj. methanol, ethanol a směs methanol/chloroform) užívanými pro extrakci fytkanabinoidů z rostlinného materiálu byly extrakční výtěžky při použití DES složené z mentolu a kyseliny octové vyšší o 10 až 20 % pro jednotlivé kanabinoidy, přičemž významná je i šetrnost DES pro životní prostředí.

6. 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.
- Agurell, S., Halldin, M., Lindgren, J. E., Ohlsson, A., Widman, M., Gillespie, H., Hollister, L. (1986). PHARMACOKINETICS AND METABOLISM OF DELTA-1 TETRAHYDROCANNABINOL AND OTHER CANNABINOIDS WITH EMPHASIS ON MAN. *Pharmacological Reviews*, 38(1), 21-43.
- Ameri, A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in Neurobiology*, 58(4), 315-348.
- Arnold, J. C., Boucher, A. A., Karl, T. (2012). The Yin and Yang of Cannabis-induced Psychosis: the Actions of Delta(9)-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol in Rodent Models of Schizophrenia. *Current Pharmaceutical Design*, 18(32), 5113-5130.
- Ashton, J. C., Friberg, D., Darlington, C. L., Smith, P. F. (2006). Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: An immunohistochemical study. *Neuroscience Letters*, 396(2), 113-116.
- 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.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.
- Bajkacz, S., Adamek, J. (2017). Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products. *Talanta*, 168, 329-335.

- 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.
- Bornheim, L. M., Correia, M. A. (1989). EFFECT OF CANNABIDIOL ON CYTOCHROME-P-450 ISOZYMES. *Biochemical Pharmacology*, 38(17), 2789-2794.
- Bornheim, L. M., Kim, K. Y., Li, J. M., Perotti, B. Y. T., Benet, L. Z. (1995). EFFECT OF CANNABIDIOL PRETREATMENT ON THE KINETICS OF TETRAHYDROCANNABINOL METABOLITES IN MOUSE-BRAIN. *Drug Metabolism and Disposition*, 23(8), 825-831.
- Bosker, W. M., Karschner, E. L., Lee, D., Goodwin, R. S., Hirvonen, J., Innis, R. B., Theunissen, E. L., Kuypers, K. P. C., Huestis, M. A., Ramaekers, J. G. (2013). Psychomotor Function in Chronic Daily Cannabis Smokers during Sustained Abstinence. *Plos One*, 8(1), 7.
- Broyd, S. J., van Hell, H. H., Beale, C., Yucel, M., Solowij, N. (2016). Acute and Chronic Effects of Cannabinoids on Human Cognition-A Systematic Review. *Biological Psychiatry*, 79(7), 557-567.
- Brunet, B., Doucet, C., Venisse, N., Hauet, T., Hebrard, W., Papet, Y., Mauco, G., Mura, P. (2006). Validation of Large White Pig as an animal model for the study of cannabinoids metabolism: Application to the study of THC distribution in tissues. *Forensic Science International*, 161(2-3), 169-174.
- Cao, J., Yang, M., Cao, F. L., Wang, J. H., Su, E. Z. (2017). Well-Designed Hydrophobic Deep Eutectic Solvents As Green and Efficient Media for the Extraction of Artemisinin from *Artemisia annua* Leaves. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(4), 3270-3278.
- Casas, L., Mantell, C., Rodriguez, M., Torres, A., Macias, F. A., de la Ossa, E. M. (2009). Extraction of natural compounds with biological activity from sunflower leaves using supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering Journal*, 152(2-3), 301-306.
- Castaneto, M. S., Gorelick, D. A., Desrosiers, N. A., Hartman, R. L., Pirard, S., Huestis, M. A. (2014). Synthetic cannabinoids: Epidemiology, pharmacodynamics, and clinical implications. *Drug and Alcohol Dependence*, 144, 12-41.

- 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.
- Concheiro, M., Lee, D., Lendoiro, E., Huestis, M. A. (2013). Simultaneous quantification of Delta(9)-tetrahydrocannabinol, 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol in oral fluid by microflow-liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1297, 123-130.
- Cota, D., Marsicano, G., Tschop, M., Grubler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., Auer, D., Yassouridis, A., Thone-Reineke, C., Ortman, S., Tomassoni, F., Cervino, C., Nisoli, E., Linthorst, A. C. E., Pasquali, R., Lutz, B., Stalla, G. K., Pagotto, U. (2003). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 112(3), 423-431.
- D'Souza, D. C., Perry, E., MacDougall, L., Ammerman, Y., Cooper, T., Wu, Y. T., Braley, G., Gueorguieva, R., Krystal, J. H. (2004). The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy individuals: Implications for psychosis. *Neuropsychopharmacology*, 29(8), 1558-1572.
- Dagon, Y., Avraham, Y., Link, G., Zolotarev, O., Mechoulam, R., Berry, E. M. (2007). The synthetic cannabinoid HU-210 attenuates neural damage in diabetic mice and hyperglycemic pheochromocytoma PC12 cells. *Neurobiology of Disease*, 27(2), 174-181.
- Dai, Y. T., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61-68.
- Demirakca, T., Sartorius, A., Ende, G., Meyer, N., Welzel, H., Skopp, G., Mann, K., Hermann, D. (2011). Diminished gray matter in the hippocampus of cannabis users: Possible protective effects of cannabidiol. *Drug and Alcohol Dependence*, 114(2-3), 242-245.

- Devane, W. A., Breuer, A., Sheskin, T., Jarbe, T. U. C., Eisen, M. S., Mechoulam, R. (1992a). A NOVEL PROBE FOR THE CANNABINOID RECEPTOR. *Journal of Medicinal Chemistry*, 35(11), 2065-2069.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R. (1992b). ISOLATION AND STRUCTURE OF A BRAIN CONSTITUENT THAT BINDS TO THE CANNABINOID RECEPTOR. *Science*, 258(5090), 1946-1949.
- Diao, X. X., Huestis, M. A. (2019). New Synthetic Cannabinoids Metabolism and Strategies to Best Identify Optimal Marker Metabolites. *Frontiers in Chemistry*, 7, 15.
- Drummer, O. H., Gerostamoulos, J., Batziris, H., Chu, M., Caplehorn, J., Robertson, M. D., Swann, P. (2004). The involvement of drugs in drivers of motor vehicles killed in Australian road traffic crashes. *Accident Analysis and Prevention*, 36(2), 239-248.
- ElSohly, M. A., Gul, W., Wanas, A. S., Radwan, M. M. (2014). Synthetic cannabinoids: Analysis and metabolites. *Life Sciences*, 97(1), 78-90.
- Englund, A., Freeman, T. P., Murray, R. M., McGuire, P. (2017). Can we make cannabis safer? *Lancet Psychiatry*, 4(8), 643-648.
- Florindo, C., Branco, L. C., Marrucho, I. M. (2017). Development of hydrophobic deep eutectic solvents for extraction of pesticides from aqueous environments. *Fluid Phase Equilibria*, 448, 135-142.
- Forrester, M. B., Kleinschmidt, K., Schwarz, E., Young, A. (2012). Synthetic cannabinoid and marijuana exposures reported to poison centers. *Human & Experimental Toxicology*, 31(10), 1006-1011.
- 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.
- Gaoni, Y., Mechoulam, R. (1964). ISOLATION, STRUCTURE, AND PARTIAL SYNTHESIS OF AN ACTIVE CONSTITUENT OF HASHISH. *Journal of the American Chemical Society*, 86(8), 1646-+.

- Grant, I., Cahn, B. R. (2005). Cannabis and endocannabinoid modulators: Therapeutic promises and challenges. *Clinical Neuroscience Research*, 5(2-4), 185-199.
- Grotenhermen, F. (2003). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(4), 327-360.
- 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.
- Guimaraes, F. S., Chiaretti, T. M., Graeff, F. G., Zuardi, A. W. (1990). ANTIANXIETY EFFECT OF CANNABIDIOL IN THE ELEVATED PLUS-MAZE. *Psychopharmacology*, 100(4), 558-559.
- Hanus, L., Abu-Lafi, S., Fride, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D. E., Kustanovich, I., Mechoulam, R. (2001). 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), 3662-3665.
- Hanus, L. O., Levy, R., De La Vega, D., Katz, L., Roman, M., Tomicek, P. (2016a). The main cannabinoids content in hashish samples seized in Israel and Czech Republic. *Israel Journal of Plant Sciences*, 63(3), 182-190.
- Hanus, L. O., Meyer, S. M., Munoz, E., Tagliabatella-Scafati, O., Appendino, G. (2016b). Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Natural Product Reports*, 33(12), 1357-1392.
- Harvey, D. J., Mechoulam, R. (1990). METABOLITES OF CANNABIDIOL IDENTIFIED IN HUMAN URINE. *Xenobiotica*, 20(3), 303-320.
- Hayakawa, K., Mishima, K., Hazekawa, M., Sano, K., Irie, K., Orito, K., Egawa, T., Kitamura, Y., Uchida, N., Nishimura, R., Egashira, N., Iwasaki, K., Fujiwara, M. (2008). Cannabidiol potentiates pharmacological effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol via CB1 receptor-dependent mechanism. *Brain Research*, 1188, 157-164.
- Hlozek, T., Uttl, L., Kaderabek, L., Balikova, M., Lhotkova, E., Horsley, R. R., Novakova, P., Sichova, K., Stefkova, K., Tyls, F., Kuchar, M., Plenicek, 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.
- Hohmann, A. G., Herkenham, M. (1999). Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience*, 92(4), 1171-1175.
- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R., Pertwee, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews*, 54(2), 161-202.
- Howlett, A. C., Mukhopadhyay, S. (2000). Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chemistry and Physics of Lipids*, 108(1-2), 53-70.
- Huestis, M. A. (2007). Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chemistry & Biodiversity*, 4(8), 1770-1804.
- Huestis, M. A., Henningfield, J. E., Cone, E. J. (1992). BLOOD CANNABINOIDS .1. ABSORPTION OF THC AND FORMATION OF 11-OH-THC AND THCCOOH DURING AND AFTER SMOKING MARIJUANA. *Journal of Analytical Toxicology*, 16(5), 276-282.
- Changyong C., W. Y., Chaoyun Wang, Lianglei Liu, Fenfang Li, Zhijian Tan. (2019). Green extraction of cannabidiol from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) using deep eutectic solvents coupled with further enrichment and recovery by macroporous resin, *Journal of Molecular Liquids*. *Journal of Molecular Liquids*, 287.
- 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.
- Johansson, E., Halldin, M. M. (1989). URINARY-EXCRETION HALF-LIFE OF DELTA-1-TETRAHYDROCANNABINOL-7-OIC ACID IN HEAVY MARIJUANA USERS AFTER SMOKING. *Journal of Analytical Toxicology*, 13(4), 218-223.

- Johansson, E., Halldin, M. M., Agurell, S., Hollister, L. E., Gillespie, H. K. (1989). TERMINAL ELIMINATION PLASMA HALF-LIFE OF DELTA-1-TETRAHYDROCANNABINOL (DELTA-1-THC) IN HEAVY USERS OF MARIJUANA. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 37(3), 273-277.
- Jones, G., Pertwee, R. G. (1972). METABOLIC INTERACTION IN-VIVO BETWEEN CANNABIDIOL AND DELTA1-TETRAHYDROCANNABINOL. *British Journal of Pharmacology*, 45(2), 375-&.
- Kanayama, G., Rogowska, J., Pope, H. G., Gruber, S. A., Yurgelun-Todd, D. A. (2004). Spatial working memory in heavy cannabis users: a functional magnetic resonance imaging study. *Psychopharmacology*, 176(3-4), 239-247.
- Karschner, E. L., Schwilke, E. W., Lowe, R. H., Darwin, W. D., Herning, R. I., Cadet, J. L., Huestis, M. A. (2009a). 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.
- Karschner, E. L., Schwilke, E. W., Lowe, R. H., Darwin, W. D., Pope, H. G., Herning, R., Cadet, J. L., Huestis, M. A. (2009b). Do Delta 9-tetrahydrocannabinol concentrations indicate recent use in chronic cannabis users? *Addiction*, 104(12), 2041-2048.
- Kaufmann, B., Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 13(2), 105-113.
- Kelly, P., Jones, R. T. (1992). METABOLISM OF TETRAHYDROCANNABINOL IN FREQUENT AND INFREQUENT MARIJUANA USERS. *Journal of Analytical Toxicology*, 16(4), 228-235.
- Klein, C., Karanges, E., Spiro, A., Wong, A., Spencer, J., Huynh, T., Gunasekaran, N., Karl, T., Long, L. E., Huang, X. F., Liu, K., Arnold, J. C., McGregor, I. S. (2011). Cannabidiol potentiates Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC) behavioural effects and alters THC pharmacokinetics during acute and chronic treatment in adolescent rats. *Psychopharmacology*, 218(2), 443-457.

- Kong, T. Y., Kim, J. H., Kim, D. K., Lee, H. S. (2018). Synthetic cannabinoids are substrates and inhibitors of multiple drug-metabolizing enzymes. *Archives of Pharmacol Research*, 41(7), 691-710.
- Kreuz, D. S., Axelrod, J. (1973). DELTA-9-TETRAHYDROCANNABINOL - LOCALIZATION IN BODY FAT. *Science*, 179(4071), 391-392.
- Krishna, D. R., Klotz, U. (1994). EXTRAHEPATIC METABOLISM OF DRUGS IN HUMANS. *Clinical Pharmacokinetics*, 26(2), 144-160.
- 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.
- Lacroix, C., Saussereau, E. (2012). Fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of cannabinoids in micro volume blood samples after dabsyl derivatization. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 905, 85-95.
- Laloup, M., Fernandez, M. D. R., Wood, M., De Boeck, G., Henquet, U., Maes, V., Samyn, N. (2005). Quantitative analysis of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1082(1), 15-24.
- Law, B., Mason, P. A., Moffat, A. C., Gleadle, R. I., King, L. J. (1984). FORENSIC ASPECTS OF THE METABOLISM AND EXCRETION OF CANNABINOIDS FOLLOWING ORAL INGESTION OF CANNABIS RESIN. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 36(5), 289-294.
- Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S. N., Pauli, G. F. (2018). Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *Journal of Natural Products*, 81(3), 679-690.
- Lynch, R. C., Vergara, D., Tittes, S., White, K., Schwartz, C. J., Gibbs, M. J., Ruthenburg, T. C., deCesare, K., Land, D. P., Kane, N. C. (2016). Genomic and Chemical Diversity in Cannabis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 35(5-6), 349-363.
- Manno, J. E., Manno, B. R., Kemp, P. M., Alford, D. D., Abukhalaf, I. K., McWilliams, M. E., Hagan, F. N., Fitzgerald, M. J. (2001). Temporal indication of marijuana use can be estimated from plasma and urine concentrations of Delta(9)-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-Delta(9)-tetrahydrocannabinol, and 11-nor-

- Delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid. *Journal of Analytical Toxicology*, 25(7), 538-549.
- Mason, A. P., McBay, A. J. (1985). CANNABIS - PHARMACOLOGY AND INTERPRETATION OF EFFECTS. *Journal of Forensic Sciences*, 30(3), 615-631.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., Bonner, T. I. (1990). STRUCTURE OF A CANNABINOID RECEPTOR AND FUNCTIONAL EXPRESSION OF THE CLONED CDNA. *Nature*, 346(6284), 561-564.
- Matsunaga, T., Iwawaki, Y., Watanabe, K., Yamamoto, I., Kageyama, T., Yoshimura, H. (1995). METABOLISM OF DELTA(9)-TETRAHYDROCANNABINOL BY CYTOCHROME-P450 ISOZYMES PURIFIED FROM HEPATIC MICROSOMES OF MONKEYS. *Life Sciences*, 56(23-24), 2089-2095.
- McClure, E. A., Stitzer, M. L., Vandrey, R. (2012). Characterizing smoking topography of cannabis in heavy users. *Psychopharmacology*, 220(2), 309-318.
- Mechoulam, R., Hanus, L. O., Pertwee, R., Howlett, A. C. (2014). Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(11), 757-764.
- 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.
- Milman, G., Barnes, A. J., Lowe, R. H., Huestis, M. A. (2010). Simultaneous quantification of cannabinoids and metabolites in oral fluid by two-dimensional gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(9), 1513-1521.
- Mittleman, M. A., Lewis, R. A., Maclure, M., Sherwood, J. B., Muller, J. E. (2001). Triggering myocardial infarction by marijuana. *Circulation*, 103(23), 2805-2809.
- Moore, C., Negrusz, A., Lewis, D. (1998). Determination of drugs of abuse in meconium. *Journal of Chromatography B*, 713(1), 137-146.
- Morgan, C. J. A., Schafer, G., Freeman, T. P., Curran, H. V. (2010). Impact of cannabidiol on the acute and psychotomimetic effects of smoked cannabis: naturalistic study. *British Journal of Psychiatry*, 197(4), 285-290.

- Muller-Vahl, K. R., Schneider, U., Prevedel, H., Theloe, K., Kolbe, H., Daldrup, T., Emrich, H. M. (2003). Delta(9)-Tetrahydrocannabinol (THC) is effective in the treatment of tics in Tourette syndrome: A 6-week randomized trial. *Journal of Clinical Psychiatry*, 64(4), 459-465.
- Munro, S., Thomas, K. L., Abushaar, M. (1993). MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A PERIPHERAL RECEPTOR FOR CANNABINOIDS. *Nature*, 365(6441), 61-65.
- 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.
- Nadulski, T., Pragst, F., Weinberg, G., Roser, P., Schnelle, M., Fronk, E. M., Stadelmann, A. M. (2005). Randomized, double-blind, placebo-controlled study about the effects of cannabidiol (CBD) on the pharmacokinetics of Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC) after oral application of THC verses standardized cannabis extract. *Therapeutic Drug Monitoring*, 27(6), 799-810.
- Nahas, G. G., Frick, H. C., Lattimer, J. K., Latour, C., Harvey, D. (2002). Pharmacokinetics of THC in brain and testis, male gametotoxicity and premature apoptosis of spermatozoa. *Human Psychopharmacology-Clinical and Experimental*, 17(2), 103-113.
- Niedbala, R. S., Kardos, K. W., Fritch, D. F., Kardos, S., Fries, T., Waga, J., Robb, J., Cone, E. J. (2001). Detection of marijuana use by oral fluid and urine analysis following single-dose administration of smoked and oral marijuana. *Journal of Analytical Toxicology*, 25(5), 289-303.
- Ohlsson, A., Lindgren, J. E., Andersson, S., Agurell, S., Gillespie, H., Hollister, L. E. (1986). SINGLE-DOSE KINETICS OF DEUTERIUM-LABELED CANNABIDIOL IN MAN AFTER SMOKING AND INTRAVENOUS ADMINISTRATION. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*, 13(2), 77-83.
- 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.
- Patel, B., Wene, D., Fan, Z. H. (2017). Qualitative and quantitative measurement of cannabinoids in cannabis using modified HPLC/DAD method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 146, 15-23.
- 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.
- Porter, A. C., Sauer, J. M., Knierman, M. D., Becker, G. W., Berna, M. J., Bao, J. Q., Nomikos, G. G., Carter, P., Bymaster, F. P., Leese, A. B., Felder, C. C. (2002). Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(3), 1020-1024.
- 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.
- Ramaekers, J. G., Kauert, G., Theunissen, E. L., Toennes, S. W., Moeller, M. R. (2009). Neurocognitive performance during acute THC intoxication in heavy and occasional cannabis users. *Journal of Psychopharmacology*, 23(3), 266-277.
- Ramaekers, J. G., Theunissen, E. L., de Brouwer, M., Toennes, S. W., Moeller, M. R., Kauert, G. (2011). Tolerance and cross-tolerance to neurocognitive effects of THC and alcohol in heavy cannabis users. *Psychopharmacology*, 214(2), 391-401.
- Reekie, T. A., Scott, M. P., Kassiou, M. (2018). The evolving science of phytocannabinoids. *Nature Reviews Chemistry*, 2(1), 12.
- Ribeiro, B. D., Florindo, C., Iff, L. C., Coelho, M. A. Z., Marrucho, I. M. (2015). Menthol-based Eutectic Mixtures: Hydrophobic Low Viscosity Solvents. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, 3(10), 2469-2477.

- Ronen, A., Gershon, P., Drobiner, H., Rabinovich, A., Bar-Hamburger, R., Mechoulam, R., Cassuto, Y., Shinar, D. (2008). Effects of THC on driving performance, physiological state and subjective feelings relative to alcohol. *Accident Analysis and Prevention*, 40(3), 926-934.
- Sanudo-Pena, M. C., Patrick, S. L., Khen, S., Patrick, R. L., Tsou, K., Walker, J. M. (1998). Cannabinoid effects in basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 248(3), 171-174.
- 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.
- Staub, C. (1999). Chromatographic procedures for determination of cannabinoids in biological samples, with special attention to blood and alternative matrices like hair, saliva, sweat and meconium. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 733(1-2), 119-126.
- Szabo, B., Nordheim, U., Niederhoffer, N. (2001). Effects of cannabinoids on sympathetic and parasympathetic neuroeffector transmission in the rabbit heart. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 297(2), 819-826.
- 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.
- Toennes, S. W., Geraths, A., Pogoda, W., Paulke, A., Wunder, C., Theunissen, E. L., Ramaekers, J. G. (2018). Pharmacokinetic properties of the synthetic cannabinoid JWH-018 in oral fluid after inhalation. *Drug Testing and Analysis*, 10(4), 644-650.
- Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M. C., Mackie, K., Walker, J. M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83(2), 393-411.
- Valiveti, S., Hammell, D. C., Earles, D. C., Stinchcomb, A. L. (2004). In vitro/in vivo correlation studies for transdermal Delta(8)-THC development. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(5), 1154-1164.
- van Osch, D., Zubeir, L. F., van den Bruinhorst, A., Rocha, M. A. A., Kroon, M. C. (2015). Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants. *Green Chemistry*, 17(9), 4518-4521.
- Wall, M. E., Sadler, B. M., Brine, D., Taylor, H., Perezreyes, M. (1983). METABOLISM, DISPOSITION, AND KINETICS OF DELTA-9-TETRAHYDROCANNABINOL IN MEN AND WOMEN. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 34(3), 352-363.
- 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.
- Williams, P. L., Moffat, A. C. (1980). IDENTIFICATION IN HUMAN-URINE OF "DELTA-9-TETRAHYDROCANNABINOL-11-OIC ACID GLUCURONIDE - A TETRAHYDROCANNABINOL METABOLITE. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 32(7), 445-448.

- Wray I. , C. S., Nicholas Jones, Stephen Wright. (2017). Cannabidiol Does Not Convert to Δ 9-Tetrahydrocannabinol in an In Vivo Animal Model. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2.
- Zuardi, A. W., Hallak, J. E. C., Crippa, J. A. S. (2012). Interaction between cannabidiol (CBD) and Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC): influence of administration interval and dose ratio between the cannabinoids. *Psychopharmacology*, 219(1), 247-249.

Seznam příloh

1. 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)
2. 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 marihuana smokers after acute drug use - implication for drivind motor vehicles]. *Soud Lek*, 59(1), 2-6.
3. 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)
4. 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)