

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



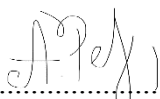
**Studium protinádorového účinku extraktu *Cannabis sativa L.* a jeho kombinace s radioterapií.**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

|                   |                                                  |
|-------------------|--------------------------------------------------|
| Autor:            | <b>Anastassiya Pedan</b>                         |
| Studijní program: | B0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství |
| Specializace:     | Biotechnologie a genové inženýrství              |
| Forma studia:     | Prezenční                                        |
| Vedoucí práce:    | <b>Mgr. Lucie Béresová, Ph.D.</b>                |
| Rok:              | 2023                                             |

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne: 09.05.2023

  
.....  
Podpis studenta

Chtěla bych vyjádřit poděkování své vedoucí bakalářské práce Mgr. Lucii Béresové Ph.D. za vstřícnost, cenné rady a nekonečnou trpělivost při zpracování této práce. Poděkování patří také všem pracovníkům Ústavu molekulární a translační medicíny za pomoc a čas, který mi věnovali. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině, přítelovi a kamarádům, kteří mi neváhali kdykoliv během studia pomoc a podpořit.

## Bibliografická identifikace

|                         |                                                                                                    |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Jméno a příjmení autora | Anastassiya Pedan                                                                                  |
| Název práce             | Studium protinádorového účinku extraktu <i>Cannabis sativa</i> L. a jeho kombinace s radioterapií. |
| Typ práce               | Bakalářská                                                                                         |
| Pracoviště              | Ústav molekulární a translační medicíny                                                            |
| Vedoucí práce           | Mgr. Lucie Béresová, Ph.D.                                                                         |
| Rok obhajoby práce      | 2023                                                                                               |

Abstrakt: Rakovina je onemocnění, které může postihnout jakýkoliv orgán lidského těla. Standardní léčba, jako je chirurgický zákrok, radioterapie a chemoterapie, není vždy úspěšná a často způsobuje nežádoucí účinky. Proto jsou stále testovány nové léčebné postupy, jako například kombinace léčby s různými rostlinnými látkami, mezi které patří i fytoKANABINOIDY. Tématem této bakalářské práce je studium vlivu samotných fytoKANABINOIDŮ, jako je CBD, CBG, THC a komplexních extraktů na buněčné linie MO59K, U-2-O-S a HT-29 a ověření, zda mají synergický nebo aditivní účinek v kombinaci s radioterapií. Teoretická část je složena z popisu endokanabinoidního systému, mechanismu vlivu fytoKANABINOIDŮ na vybrané rakovinné linie. Dále byla popsána problematika poškození DNA ionizujícím zářením a opravy dvouvláknových zlomů, stejně jako vliv ozáření spolu s fytoKANABINOIDY. V experimentální části byl sledován cytotoxický účinek jednotlivých fytoKANABINOIDŮ, ale i jejich komplexních směsí v extraktech *Cannabis sativa* L. Pomocí krátkodobého testu cytotoxicity – metody krystalové violeti byly stanoveny hodnoty IC<sub>50</sub> pro fytoKANABINOIDY i jejich směsi. Metodou testu tvorby kolonií (CFA) a western blotem bylo pozorováno, zda došlo k synergickému nebo aditivnímu účinku při kombinaci ozáření s fytoKANABINOIDY. Výsledky této práce ukazují, že fytoKANABINOIDY mají cytotoxický a buněčně specifický účinek na vybrané buněčné linie. Nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi fytoKANABINOIDY a komplexními extrakty. Stejně tak nebyl pozorován synergický nebo aditivní účinek IR a fytoKANABINOIDŮ.

|               |                                                                                                        |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Klíčová slova | FytoKANABINOIDY, rakovina, ionizující ozáření, DNA poškození, Western blot, CFA, test životoschopnosti |
| Počet stran   | 49                                                                                                     |

Počet příloh

0

Jazyk

Český

## Bibliographical identification

|                                |                                                                                                            |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Autor's first name and surname | Anastassiya Pedan                                                                                          |
| Title                          | Study of anticancer effect of <i>Cannabis sativa</i> L. extract alone or in combination with radiotherapy. |
| Type of thesis                 | Bachelor                                                                                                   |
| Department                     | Institute of Molecular and Translational Medicine                                                          |
| Supervisor                     | Mgr. Lucie Béresová, Ph.D.                                                                                 |
| The year of presentation       | 2023                                                                                                       |

### Abstrakt:

Cancer is a disease that can affect any organ in our body. Standard treatments such as surgery, radiotherapy, and chemotherapy are not always successful and often cause unwanted side effects. Consequently, new treatment approaches, such as the combination of treatment with various plant substances, including phytocannabinoids, are still being tested. The topic of this bachelor's thesis is the study of the effect of phytocannabinoids themselves, such as CBD, CBG, THC, and complex extracts, on cell lines MO59k, U-2-O-S, and HT-29, and to verify whether they have synergistic or additive effects in combination with radiotherapy. The theoretical part consists of a description of the endocannabinoid system and the mechanism of the effect of phytocannabinoids on different cancer cell lines. Furthermore, the issue of DNA damage caused by ionizing radiation and the repair of double-strand breaks were described, as was the effect of radiation together with cannabinoids. In the experimental part, phytocannabinoids and complex extracts were tested for their cytotoxic effect on selected cell lines, IC50 values were determined, and Western blot and colony formation assay (CFA) were used to observe whether there was a synergistic or additive effect when combining radiation with phytocannabinoids. The results of this work show that phytocannabinoids have a cytotoxic effect on selected cell lines; however, their effectiveness is cell-specific. There was no significant difference observed between phytocannabinoids and complex extracts, and there was no synergistic or additive effect of radiation and phytocannabinoids.

|          |                                                                                                                      |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Keywords | phytocannabinoids, cancer, ionizing radiation, DNA damage, double-strand breaks, Western blot, CFA, viability assay. |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Number of pages      | 49    |
| Number of appendices | 0     |
| Language             | Czech |

## OBSAH

|          |                                                                                                                         |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>ÚVOD.....</b>                                                                                                        | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....</b>                                                                           | <b>2</b>  |
| 2.1      | Konopí seté ( <i>Cannabis sativa</i> L.).....                                                                           | 2         |
| 2.1.1    | Fytoanabinoidy a jejich chemické složení.....                                                                           | 3         |
| 2.1.2    | Endokanabinoidní systém.....                                                                                            | 4         |
| 2.2      | Cytotoxický účinek fytoanabinoidů na nádorové linie.....                                                                | 5         |
| 2.2.1    | Účinek fytoanabinoidů na nádor mozku-glioblastom.....                                                                   | 7         |
| 2.2.2    | Účinek fytoanabinoidů na nádor kosti-osteosarkom.....                                                                   | 8         |
| 2.2.3    | Účinek fytoanabinoidů na kolorektální karcinom.....                                                                     | 8         |
| 2.3      | Využití radioterapie v léčbě rakoviny.....                                                                              | 9         |
| 2.3.1    | Odpověď buňky na poškození DNA ionizujícím zářením.....                                                                 | 9         |
| 2.3.2    | Mechanismus opravy dvouvláknových zlomů DNA.....                                                                        | 10        |
| 2.4      | Kombinace radioterapie a fytoanabinoidů.....                                                                            | 14        |
| <b>3</b> | <b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>                                                                                         | <b>15</b> |
| 3.1      | Materiály.....                                                                                                          | 15        |
| 3.1.1    | Biologické materiály.....                                                                                               | 15        |
| 3.1.2    | Chemikálie.....                                                                                                         | 15        |
| 3.1.3    | Roztoky a média.....                                                                                                    | 17        |
| 3.1.4    | Přístroje.....                                                                                                          | 17        |
| 3.1.5    | Software.....                                                                                                           | 18        |
| 3.2      | Metody.....                                                                                                             | 19        |
| 3.2.1    | Kultivace buněčné kultury.....                                                                                          | 19        |
| 3.2.2    | Rozmrazování a zamrazování buněčné kultury.....                                                                         | 19        |
| 3.2.3    | Test životaschopnosti buněk – metoda krystalové violeti.....                                                            | 20        |
| 3.2.4    | Test tvorby kolonií (CFA; Colony forming assay).....                                                                    | 20        |
| 3.2.5    | Stanovení koncentrace proteinů v lyzátech (Bradford assay).....                                                         | 20        |
| 3.2.6    | Elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE).....                                             | 21        |
| 3.2.7    | Western blot.....                                                                                                       | 22        |
| <b>4</b> | <b>VÝSLEDKY.....</b>                                                                                                    | <b>24</b> |
| 4.1      | Stanovení cytotoxického účinku vybraných fytoanabinoidů na nádorové linie HT-29, U-2-OS a MO59K.....                    | 24        |
| 4.2      | Studium vlivu kombinace ionizujícího ozáření s fytoanabinoidů na nádorové linie HT-29, U-2-OS, MO59K.....               | 27        |
| 4.3      | Studium vlivu fytoanabinoidů na schopnost buněčné odpovědi na poškození DNA.....                                        | 32        |
| 4.4      | Studium vzájemného působení fytoanabinoidů a ionizujícího záření testem tvorby kolonií (CFA; colony forming assay)..... | 33        |
| <b>5</b> | <b>DISKUSE.....</b>                                                                                                     | <b>35</b> |
| <b>6</b> | <b>ZÁVĚR.....</b>                                                                                                       | <b>37</b> |
| <b>7</b> | <b>LITERATURA.....</b>                                                                                                  | <b>38</b> |
| <b>8</b> | <b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>                                                                                    | <b>47</b> |

# CÍLE PRÁCE

## Teoretická část

- 1) Vypracování literární rešerše shrnující dosavadní poznatky o fytoKANABINOIDECH a jejich využití zejména v oblasti protinádorové léčby.
- 2) Shrnutí poznatků o účincích jednotlivých fytoKANABINOIDŮ případně jejich komplexních extraktů na nádory kosti, kolorektální karcinom a glioblastom. Zpracování dostupných informací o vzájemném působení KANABINOIDŮ s radioterapií. Součástí je také kapitola o poškození DNA ionizujícím zářením a mechanismech jejich opravy.

## Praktická část

- 1) Získání základních dovedností práce s buněčnými kulturami (pasážování a kultivace buněk, rozmražení/zamražení buněčné kultury, příprava kultivačního media).
- 2) Testování cytotoxického účinku fytoKANABINOIDŮ samostatně, případně v komplexním extraktu *Cannabis sativa L.*
- 3) Sledování, zda kombinace fytoKANABINOIDŮ s ionizujícím zářením vede k protektivnímu účinku nebo naopak potenciaci cytotoxicity.
- 4) Zvládnutí základních laboratorních dovedností jako je testování cytotoxicity KANABINOIDŮ (metoda krystalové violeti, test tvorby kolonií), detekce proteinů buněčné odpovědi na poškození DNA pomocí western blot analýzy.

# 1 ÚVOD

Rakovina je onemocnění, které může postihnout jakékoliv orgány a systémy lidského těla. Na jejím vzniku se mohou podílet jak vnější faktory (záření, kouření nebo různé chemikálie), tak i vnitřní vlivy (náhodné nebo zděděné mutace, hormonální změny nebo snížená imunita). Největším problémem tohoto onemocnění je nekontrolované dělení buněk a vznik nádoru. Nádory mohou být benigní (lokalizované) anebo maligní, u nichž dochází ke vzniku tzv. metastáz a šíření do různých tkání lidského těla (Baram et al., 2019). Dle statistik v roce 2020 bylo zaregistrováno 19,3 milionů nových případů rakoviny a kolem 10 milionů úmrtí spojených s tímto onemocněním (Sung et al., 2021).

V současné době se k léčbě rakoviny používá zejména chemoterapie případně radioterapie. Tyto postupy jsou někdy nedostačující a mnohdy doprovázené řadou vedlejších účinků jako je poškození dalších orgánů, nevolnost, nechutenství, nespavost a úzkosti. Do popředí zájmu se tak dostává studium alternativních léčiv, které mohou v kombinaci s chemo/radioterapií zmírnit projevy vedlejších účinků, případně zlepšit už známé léčebné postupy (Alfonzetti et al., 2021).

Fytokanabinoidy jsou skupinou sloučenin, které lze extrahovat z konopí setého - *Cannabis indica* L. anebo *Cannabis sativa* L. (Baram et al., 2019). Tyto látky jsou ve společnosti známy především jako nelegální drogy zneužívané pro své psychoaktivní účinky, avšak v posledních desetiletích dochází k jejich postupné dekriminalizaci a zkoumání z hlediska medicínského využití. Jedná se o látky prospěšné nejen během paliativní léčby, ale také látky s prokázanými protizánětlivými a protirakovinnými účinky (Dariš et al., 2019a; Hart et al., 2004; Zhu et al., 2000). Vzhledem k tomu, že nádory vykazují heterogenní charakter dochází i k odlišnému cytotoxickému účinku fytokanabinoidů (Velasco et al., 2016).

V bakalářské práci jsme se věnovali studiu účinku jednotlivých fytokanabinoidů a komplexních extraktů *Cannabis sativa* L. na buněčnou linii rakoviny tlustého střeva HT-29, nádoru mozku MO59K a kosti U-2-OS. Sledován byl cytotoxický vliv samotných fytokanabinoidů a celkových extraktů na vybrané linie, a také jejich spolupůsobení v kombinaci s ionizujícím zářením.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Konopí seté (*Cannabis sativa* L.)

Konopí seté je dvouděložná, jednoletá rostlina z čeledi *Cannabaceae*. Předpokládaný původ této rostliny je podhůří Himalájí odkud se rozšířilo do dalších částí světa včetně Indie a na Střední východ. Konopí seté může během několika měsíců dosáhnout výšky až 6 metrů (Meyer C, 2022). Charakteristickým znakem jsou zelené a dlanité listy, jejichž velikost a tvar se liší v závislosti na genetickém původu. Samčí květy se skládají z pěti kališních lístků, pěti tyčinek s tenkými nitkami a prašníky. Samičí květy se obvykle vyskytují po dvou. Plodem je nažka, která obsahuje esenciální mastné kyseliny (Clarke, 1981; Farag & Kayser, 2017; Fišar, 2005).

V poslední době se popularita konopí setého výrazně zvýšila, ale první zmínky o jeho využití pro lékařské účely byly přibližně před 4000 lety (Mechoulam, 1986). Také v Číně byl nalezen starobylý spis pocházející z roku 2600 př. n. l., kde se konopí doporučuje používat ke zmírnění příznaků nemocí, jako je dysmenorea, malárie a revmatické bolesti (Grinspoon & Bakalar, 1993).

Rostlina je pěstována zejména pro výrobu různých potravin, látek, provazů a papíru (Dariš et al., 2019a). Od konce 90. let je konopí v mnoha zemích běžně dostupné na černém trhu a lidé ho používají jako přírodní prostředek proti bolesti (Dariš et al., 2019a). V současné době je na území České republiky pěstování konopí nelegální, s výjimkou osobního užití nebo léčebných účelů (Výhláška MZ č. 235/2022 Sb). Nicméně existuje řada zemí, jako je například Thajsko, Mexiko, Kanada a některé státy USA, které povolují plné využívání rostliny konopí pro medicínské i rekreační účely. V posledních několika desetiletích se dostalo konopí seté také do popředí zájmu i ze strany vědecké komunity, která v konopí vidí potenciál pro léčbu různých onemocnění (Robson, 2005).

Dosud bylo nalezeno více než 100 druhů fytokanabinoidů, kde například  $\Delta$ -9-tetrahydrokanabinol (THC) patří mezi psychoaktivní látky. Mezi známé kanabinoidy patří také kanabidiol (CBD) a kanabigerol (CBG), které nemají psychoaktivní účinky na člověka, ale i tak ukazují značný terapeutický účinek (Dong et al., 2019).

Kanabinoidy lze rozdělit dle původu vzniku na fytokanabinoidy, které jsou produkovány přímo v rostlinách rodu *Cannabis*, endokanabinoidy regulující endokanabinoidní systém živočichů a syntetické kanabinoidy, které byly vyvinuty

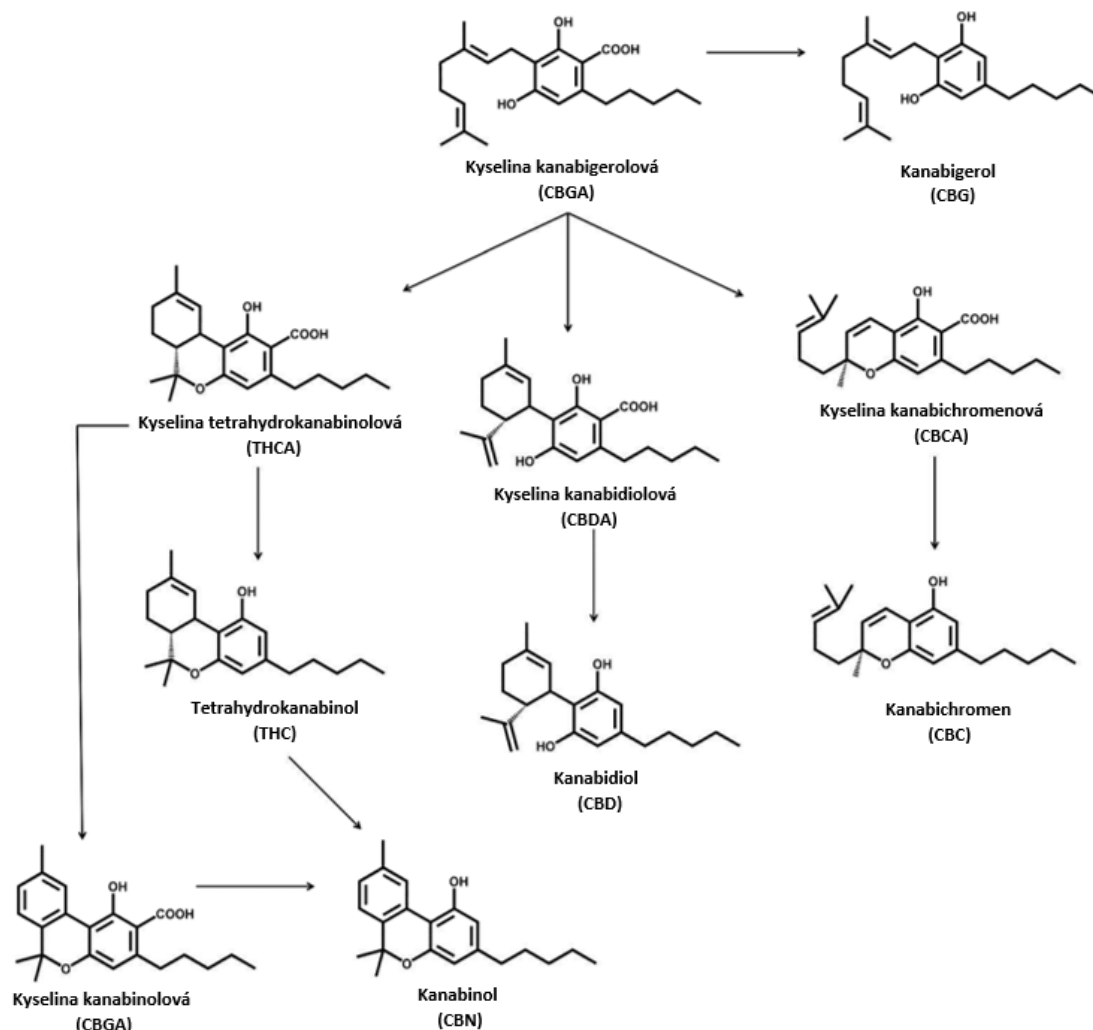
zejména k prozkoumání endogenního kanabinoidního systému (Castaneto et al., 2014; Dariš et al., 2019b).

### **2.1.1 Fytokanabinoidy a jejich chemické složení**

V konopím setém bylo dosud nalezeno více než 554 různých sloučenin, včetně 113 typů fytokanabinoidů a 120 typů terpenů, které dodávají rostlině její vůni a také se využívají k výrobě olejů (Aizpurua-Olaizola et al., 2016). Nejvyšší obsah fytokanabinoidů se nachází v mladých listech kolem květů a v kvetoucích vrcholcích rostliny (Andre et al., 2016).

Fytokanabinoidy jsou molekuly s polyfenolickou strukturou, které podléhají několika typům chemických reakcí, jako je dekarboxylace, ke které dochází za přítomnosti tepla a světla anebo oxidace (Aizpurua-Olaizola et al., 2016).

Prvním krokem syntézy fytokanabinoidů je spojení kyseliny olivetolové a geranylpyrofosfatu za vzniku kyseliny kanabigerolové (CBGA), která je prekurzorem mnoha dalších kanabinoidů. Enzymatickými reakcemi dochází k její přeměně na kyselinu kanabichromenovou (CBCA), kyselinu kanabidiolovou (CBDA) a kyselinu tetrahydrokanabinolovou (THCA) (Nachnani et al., 2021). Dekarboxylací zmíněných kyselin dochází ke vzniku příslušných kanabinoidů: kanabigerolu (CBG), kanabidiolu (CBD), tetrahydrokanabinolu (THC). Kanabinol (CBN) lze získat oxidací THC a dekarboxylací kyseliny kanabinolové (Nachnani et al., 2021; Aizpurua-Olaizola et al., 2016; Yang et al., 2020) (viz. obr.1).



Obrázek 1: Schematické znázornění biosyntetické dráhy fytoKANABINOIDŮ (převzato z Aizpurua-Olaizola et al., 2016).

## 2.1.2 Endokanabinoidní systém

Důležitou roli při udržování homeostázy a regulace trávicího, imunitního, nervového a kardiovaskulárního systému hraje endokanabinoidní systém (ECS) (Malhotra et al., 2021; McAllister et al., 2015). ECS je tvořen systémem receptorů, endokanabinoidů a enzymů jejich degradace nebo biosyntézy (Rachel & Roger, 2002).

K nejznámějším endokanabinoidům patří derivát kyseliny arachidonové N-arachidonoyletanolamid, známý též jako anandamid a 2-arachidonoylglycerol (2-AG) (Devane et al., 1992; Sugiura et al., 1995). Kanabinoidní receptory CB1 a CB2 patří do skupiny transmembránových receptorů spřažených s G-proteinem (Rodríguez et al., 2004). Receptory CB1 jsou primárně exprimovány v centrální nervové soustavě a v menší míře v některých periferních tkáních a buňkách gastrointestinálního traktu, slezině anebo

plicích (Matsuda et al., 1990; Rice et al., 1997; Schatz et al., 1992). Receptory CB2 se nachází na povrchu buněk imunitního systému, mozku a také v kosti (Dariš et al., 2019). Přítomnost CB1 a CB2 receptorů byla prokázána také v intracelulárních organelách, jako jsou například mitochondrie anebo Golgiho aparát (Malhotra et al., 2021). CB1 a CB2 receptory se vyznačují rozdílnými signalizační mechanismy a odlišnou citlivostí na různé látky (Howlett et al., 2002).

Jednotlivé fytokanabinoidy vykazují různou míru afinity vůči CB1 a CB2 receptorům. THC je agonistou obou receptorů s vysokou vazební afinitou k CB1 receptoru. Důsledkem této interakce jsou psychoaktivní účinky THC (Pertwee, 2008; Russo & Guy, 2006). Naopak CBD je částečným agonistou receptoru CB2 a antagonistou CB1 receptoru (McPartland et al., 2007; Thomas et al., 2007). Na rozdíl od CBD a THC, CBG má velmi malou afinitu jak k CB1, tak k CB2 receptoru (Navarro et al., 2018). Účinky fytokanabinoidů nejsou omezeny pouze na CB1 a CB2 receptory. K dalším kanabinoidním receptorům patří také receptory spřažené s G-proteinem, receptory iontových kanálů (např. přechodný receptorový potenciální kationtový kanál (TRPV)) a jaderné receptory (receptor aktivovaný peroxisomovým proliferátorem (PPAR)) (Console-Bram et al., 2012).

## **2.2 Cytotoxický účinek fytokanabinoidů na nádorové linie**

Současná literatura uvádí celou řadu *in vitro*, ale také *in vivo* studií zabývajících se cytotoxickým účinkem fytokanabinoidů na nádorové linie (Dariš et al., 2019b; Scott et al., 2014). Mechanismy, které tyto účinky zprostředkovávají byly zhruba rozděleny do tří kategorií: (1) mechanismy inhibující buněčnou proliferaci a indukující apoptózu, (2) antiangiogenní mechanismy a (3) mechanismy indukující autofagii (Dumitru et al., 2018a).

V progresi rakoviny hraje kritickou roli zvýšená buněčná proliferace, která může být způsobena změnou aktivity proteinů souvisejících s buněčným cyklem. Změna v regulaci buněčného cyklu vytváří vhodné podmínky pro neoplastickou progresi, a proto je většina strategií léčby rakoviny zaměřena na její inhibici (Hosami et al., 2021; Shen & Tower, 2009). Apoptóza je proces programované buněčné smrti. Inhibice proliferace s následnou aktivací apoptózy byla pozorována v mnoha případech ošetření rakovinných buněk právě fytokanabinoidmi (Ligresti et al., 2006; Marcu et al., 2010a; Whynot et al., 2023). Také bylo prokázáno, že kombinace CBD s THC výrazně posiluje protinádorové účinky a

snižuje rychlost proliferace v buňkách glioblastomu anebo karcinomu močového měchýře, kde spouští aktivaci proteinu kaspázy 3 (Marcu et al., 2010a, Whynot et al., 2023). Další studie ukázaly, že CBD zvyšuje hladinu vápníku a reaktivních forem kyslíku v buňkách rakoviny prsu, což taktéž vede k indukci apoptózy (Ligresti et al., 2006).

Dalším procesem spojeným se šířením nádoru je angiogeneze, což je proces tvorby nových kapilárních cév, které poskytují tkáním kyslík a živiny, zejména glukózu (Hanahan & Folkman, 1996; Li et al., 2018). Angiogeneze je nutná pro růst a vývoj nádoru, a proto je potlačování tohoto procesu jedním z možných způsobů léčby rakoviny. Existuje řada studií ukazujících, že fytokanabinoidy mají antiangiogenní účinky (Chang et al., 2018; Solinas et al., 2012). Například bylo prokázáno, že THC je schopný inhibovat angiogenní procesy tím, že blokuje RhoA/MLC dráhu v buněčné linii HUVEC (Chang et al., 2018). Také CBD vykazuje antiangiogenní účinek tím, že snižuje hladiny proteinů MMP9, TIMP1 a ET-1 v té samé linii (Solinas et al., 2012).

Další buněčný mechanismus, který lze regulovat pomocí fytokanabinoidů je autofagie. Jedná se o proces samodegradace, který umožňuje buňkám využívat zdroje energie v kritických obdobích vývoje, a také čistit poškozené orgány či odstraňovat špatně složené proteiny (Glick et al., 2010). Existuje řada studií ukazujících, že fytokanabinoidy mohou indukovat tento proces v rakovinných buňkách (Nabissi et al., 2015; Salazar et al., 2009; Torres et al., 2011). Například studie uvádí, že fytokanabinoid THC je schopný spustit akumulaci ceramidu a následnou fosforylaci eIF2 $\alpha$ , což vede ke zvýšení stresu endoplazmatického retikulu a indukci autofagie v rakovinné buněčné linii U87MG (Salazar et al., 2009). V dalších studiích bylo zjištěno, že CBD zvyšuje hladinu proteinu Beclin-1, který je jedním z hlavních markerů autofagie, a snižuje tak životaschopnost glioblastomu (Nabissi et al., 2015).

Na druhou stranu existují i studie, ve kterých fytokanabinoidy nevykazují žádné protinádorové účinky, a naopak zvyšují proliferaci rakovinových buněk (Hart et al., 2004; Zhu et al., 2000).

V současné době, kdy roste zájem o využití fytokanabinoidů nejen pro medicínské, ale i rekreační účely dochází k stále většímu zájmu vědecké společnosti odhalit mechanismy jejich účinku a potenciálního využití k léčebným účelům.

### 2.2.1 Účinek fytoKANABINOIDŮ na nádor mozku-glioblastom

K nejzávažnějším nádorům mozku patří glioblastom, který tvoří 80 % všech primárních maligních nádorů mozku (Ostrom et al., 2015). Vyznačuje se zejména zvýšenou proliferací a angiogenezí (Dumitru et al., 2018 a). Standardním způsobem léčby je chirurgické odstranění nádoru doplněné adjuvantní léčbou. Nicméně glioblastomy jsou velmi heterogenní nádory a často jsou rezistentní k chemo/radioterapii a to kvůli přítomnosti subpopulaci gliomových kmenových buněk (Hohmann et al., 2019; Louis et al., 2016).

Jelikož jsou gliomy buňky bohaté na kanabinoidní receptory CB1 a CB2, existuje řada studií zabývajících se cytotoxickým účinkem vybraných kanabinoidů na glioblastomy (Velasco et al., 2007; Ladin et al., 2016; Moreno et al., 2014; Sánchez et al., 2001). K nejčastěji zkoumaným fytoKANABINOIDŮM s předpokládaným terapeutickým účinkem na glioblastomy patří THC a CBD. Jedním z mechanismů účinku THC na glioblastomy, který byl prokázán v „*in vitro*“ studii, je aktivace CB1 receptoru a následná akumulace lipidu ceramidu v rakovinných buňkách, což vede k jejich apoptóze (Costas-Insua & Guzmán, 2022; Galve-Roperh et al., 2000; Velasco et al., 2007).

Další studie vyzdvihuje protinádorový účinek CBD na buněčnou linii U87MG a jeho schopnost zvýšit cytotoxickou aktivitu chemoterapeutických léčiv pomocí aktivace kanálu TRPV2 (Nabissi et al., 2013).

Stejně jako v případě THC byl prokázán pro-apoptický účinek i při ošetření glioblastomů pomocí CBD samostatně, případně v kombinaci s chemoterapeutiky, u nichž CBD potencoval cytotoxický účinek (Torres et al., 2011). Mimo potenciace účinku CBD a chemoterapie byl prokázán aditivní účinek i mezi samotnými kanabinoidy CBD a THC (Marcu et al., 2010b).

Kromě inhibice proliferace a aktivace apoptózy byl u výše zmíněných fytoKANABINOIDŮ pozorován vliv na snížení invazivnosti a migrace buněk glioblastomu, z čehož lze předpokládat protekci tvorby metastáz (Blázquez et al., 2008; Marcu et al., 2010c). Stejně tak kanabichromen (CBC) snižuje hladinu metaloproteinázy-9 a metaloproteinázy-2, čímž snižuje schopnost nádorových buněk pronikat extracelulární prostorem, a tím jejich invazivnost (Nabissi et al., 2016)

Anti-angiogenní účinek THC byl pozorován v krysích gliomových buňkách a je spojen se snížením exprese vaskulární endotelového růstového faktoru a matrix metaloproteinázy-2 (Blázquez et al., 2008).

### **2.2.2 Účinek fytoKANABINOIDŮ na nádor kosti-osteosarkom**

Osteosarkom je maligní kostní nádor, který se tvoří v meristematických tkáních (Messerschmitt et al., 2009; Zhao et al., 2021). Jedná se o velmi agresivní onemocnění, jehož léčba zahrnuje nejen chirurgické odstranění nádoru, ale také následnou chemoterapii anebo radioterapii. Dostupné způsoby léčby jsou mnohdy nedostatečné a vykazují vysokou toxicitu (Messerschmitt et al., 2009; Zhao et al., 2021). Jedním s nežádoucích vedlejších účinků radioterapie u rostoucích dětí je například kyfoskolóza, výskyt chrupavčitého nádoru nebo deformace dolních končetin (González-Herranz et al., 1995).

Cytotoxický účinek fytoKANABINOIDŮ na buňky nádoru kosti byl zkoumán v několika *in vitro* i *in vivo* studiích. Bylo prokázáno, že CBD v buněčných liniích MG63 a HOS inhiboval životaschopnost buněk ovlivněním dráhy SP1-CBX2, kdy vazba SP1 k promotoru proteinu CBX2 vedla k snížení jeho hladiny a zvýšení proteinu BAX a kaspázy-3 s následnou apoptózou rakovinných buněk. Stejný efekt účinku byl pozorován také v myších tkáních, což bylo doprovázeno snížením velikosti nádoru (Fangxing et al., 2022).

Další studie uvádí, že syntetický KANABINOID WIN-55,212-2 vykazuje anti-angiogenní účinek na buněčnou linii MG-63. Tento účinek byl dosažen snížením exprese vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF), který je hlavní signalizační molekulou při procesu angiogeneze (Niu et al., 2015).

Kombinovaná léčba CBD a doxorubicinu prokázala synergický účinek na inhibici růstu a migrace osteosarkomu jak v *in vitro* tak v *in vivo* experimentech (Li et al., 2023).

### **2.2.3 Účinek fytoKANABINOIDŮ na kolorektální karcinom**

Kolorektální karcinom je třetím z nejčastěji se vyskytujících typů rakoviny a druhým nejsmrtelejnějším nádorem na světě (Granados-Romero et al., 2017). Rakovina tlustého střeva vzniká kvůli řadě molekulárních a histopatologických změn v organismu, v důsledku, kterých dochází k přeměně zdravých epitelálních buněk tlustého střeva na rakovinu (Aviello et al., 2012; Orrego-González et al., 2020).

Ve studiích byl demonstrován protinádorový účinek fytokanabinoidů, zejména THC a CBD, na buněčnou linii HT-29, který se projevil zvýšením množství apoptických a nekrotických buněk po ošetření fytokanabinoidy. Také bylo pozorováno, že ošetření CBD u této linie vedlo k poklesu poměru GSH/GSSG, což ukazuje na výskyt oxidačního stresu způsobeného výskytem reaktivních forem kyslíku, které mohou být částečně odpovědné za protinádorový účinek CBD. Nicméně, při ošetření jinými fyto- nebo syntetickými kanabinoidy nebyl tento stav pozorován (Cerretani et al., 2020).

Studia také prokázaly, že CBD má chemopreventivní účinky a zpomaluje proces karcinogeneze v buňkách kolorektálního karcinomu u myši. Dále pomocí detekce exprese proteinů bylo prokázáno, že tento účinek byl spojen s upregulací kaspázy-3 a downregulací pAKT, které hrají důležitou roli v regulaci apoptózy (Aviello et al., 2012). Také byl prokázán protinádorový účinek standardizovaného extraktu obsahujícího CBD, THC a dalších fytokanabinoidů na myši buňky kolorektálu (Romano et al., 2014).

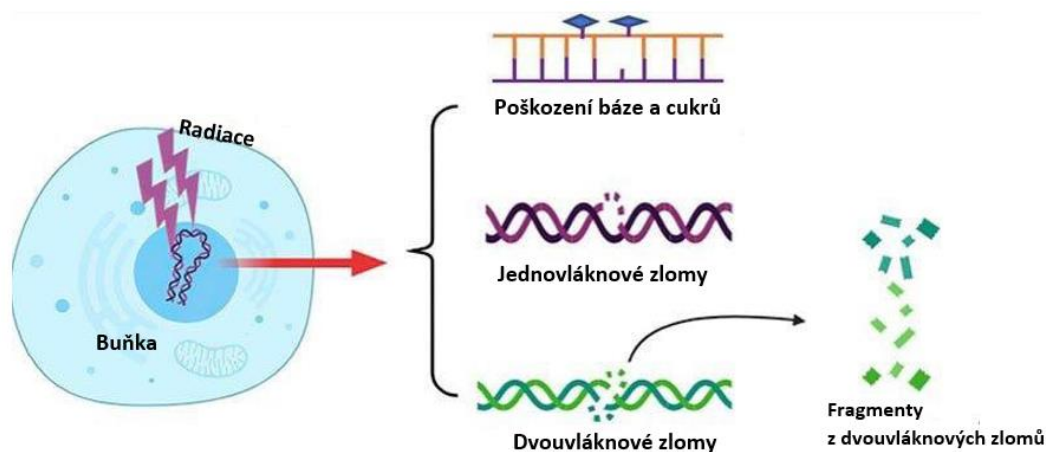
## **2.3 Využití radioterapie v léčbě rakoviny**

Radioterapie je jedna z nejpoužívanějších metod onkologické léčby, kterou lze použít k léčbě přibližně 50 % všech pacientů s rakovinou. Používá se buď samostatně, nebo v kombinaci s jinými způsoby léčby, jako je například chemoterapie, chirurgie a imunoterapie (Olivares-Urbano et al., 2020).

Současné postupy radioterapie umožňují cílit přímo na oblast výskytu nádoru, a tím minimalizovat škodlivý dopad na zdravé tkáně. Ozařování může probíhat externě, kdy je zdroj záření mimo tělo a působí na konkrétní zvolené místo, anebo lze využít interního ozařování, kdy jsou do těla vpraveny radioaktivní materiály, které cílí na nádory. Přetrvávajícím problémem radioterapie je častá recidiva nádorového bujení a vznik radiorezistence (Olivares-Urbano et al., 2020).

### **2.3.1 Odpověď buňky na poškození DNA ionizujícím zářením**

Na buněčné úrovni může ionizující záření (IR) vyvolávat různé poškození DNA. Dle intenzity záření dochází k poškození bázi nebo cukrů, vzniku jednovláknových zlomů (SSB, z angl. single-stranded break) anebo častěji dvouvláknových zlomů v DNA struktuře (DSB, z angl. double-stranded break) (de Massy, 2013; Kobayashi et al., 2008) (viz obr. 2).



Obrázek 2: Typy poškození DNA způsobených ionizujícím zářením (převzato a upraveno od Huang & Zhou, 2020).

DSB mohou vzniknout nejenom působením exogenních činidel, jako je ionizující záření, ale i působením různých chemikálií, jako je například mitomycin C a deriváty platiny (Aparicio et al., 2014; de Massy, 2013).

Vznik DSBs je pro buňku závažným poškozením, které může mít vliv na celou řadu buněčných mechanismů jako replikace a transkripce s následnou translací. Nesprávná oprava takovýchto poškození DNA vede k nestabilitě genomu a může být důsledkem řady mutací (Blackford & Stucki, 2020). Buňka disponuje opravnými a kontrolními mechanismy, které jsou zodpovědné za rozpoznání DNA poškození, spuštění signalizačních drah vedoucích k jeho opravě, regulaci kontrolních bodů buněčného cyklu a případně spuštění drah programované buněčné smrti (Biau et al., 2019; Ciccia & Elledge, 2010; Huang & Zhou, 2020; Kouranti & Peyroche, 2012; Schuch et al., 2013).

### 2.3.2 Mechanismus opravy dvouvláknových zlomů DNA

Na opravě DSB se podílejí dvě hlavní dráhy opravy, a to homologní rekombinace (HR), při které se používá rozsáhlá nepoškozená homologní sekvence, a nehomologní spojování konců (NHEJ), při kterém dochází k změně sekvence v bodě zlomu bez potřeby homologního templátu (Huang & Zhou, 2020; Zhang & Powell, 2005)(viz obr.3). Výběr mechanismu opravy závisí na fázi buněčného cyklu a dostupnosti homologního templátu (Moynahan & Jasin, 2010).

### *Homologní rekombinace*

HR je opravný mechanismus probíhající v S a G2 fázi buněčného cyklu, a to v přítomnosti sesterské chromatidy, která slouží jako templát pro bezchybnou opravu poškozeného místa DNA (Huang & Zhou, 2020; Lodovichi et al., 2020). Proteiny pomáhající detekovat poškození se navzájem regulují a během několika sekund po ozáření se lokalizují do místa DSB. Protein 53BP1 a histonový protein  $\gamma$ H2AX patří k prvním proteinům, které lze detekovat v místě poškozené DNA, a proto se tyto proteiny využívají k detekci radiací-indukovaného poškození a vzniku DSB (Huang & Zhou, 2020).

Počáteční fází opravy DNA je rozpoznání poškození a výběr odpovídajícího opravného mechanismu (Huang & Zhou, 2020). Následuje nukleolytické štěpení poškozeného místa za účasti proteinového komplexu MRN (Mre11-Rad50-Nbs1). Po štěpení poškozeného místa se do okolí uvolňuje single-stranded DNA (ssDNA), což vede k aktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu ATM-Chk2 a ATR-Chk1 (Smith et al., 2010, Gnügge & Symington, 2021.; Tauchi et al., 2001, Matsuoka et al., 2000). Konce DNA jsou stabilizovány vazbou RPA proteinu, aby nedošlo ke vzniku sekundárních struktur nebo k mikrohomologickému nasedání, v důsledku, kterého může dojít k nekontrolované výměně genetického materiálu (Chen et al., 2013; Deng et al., 2014).

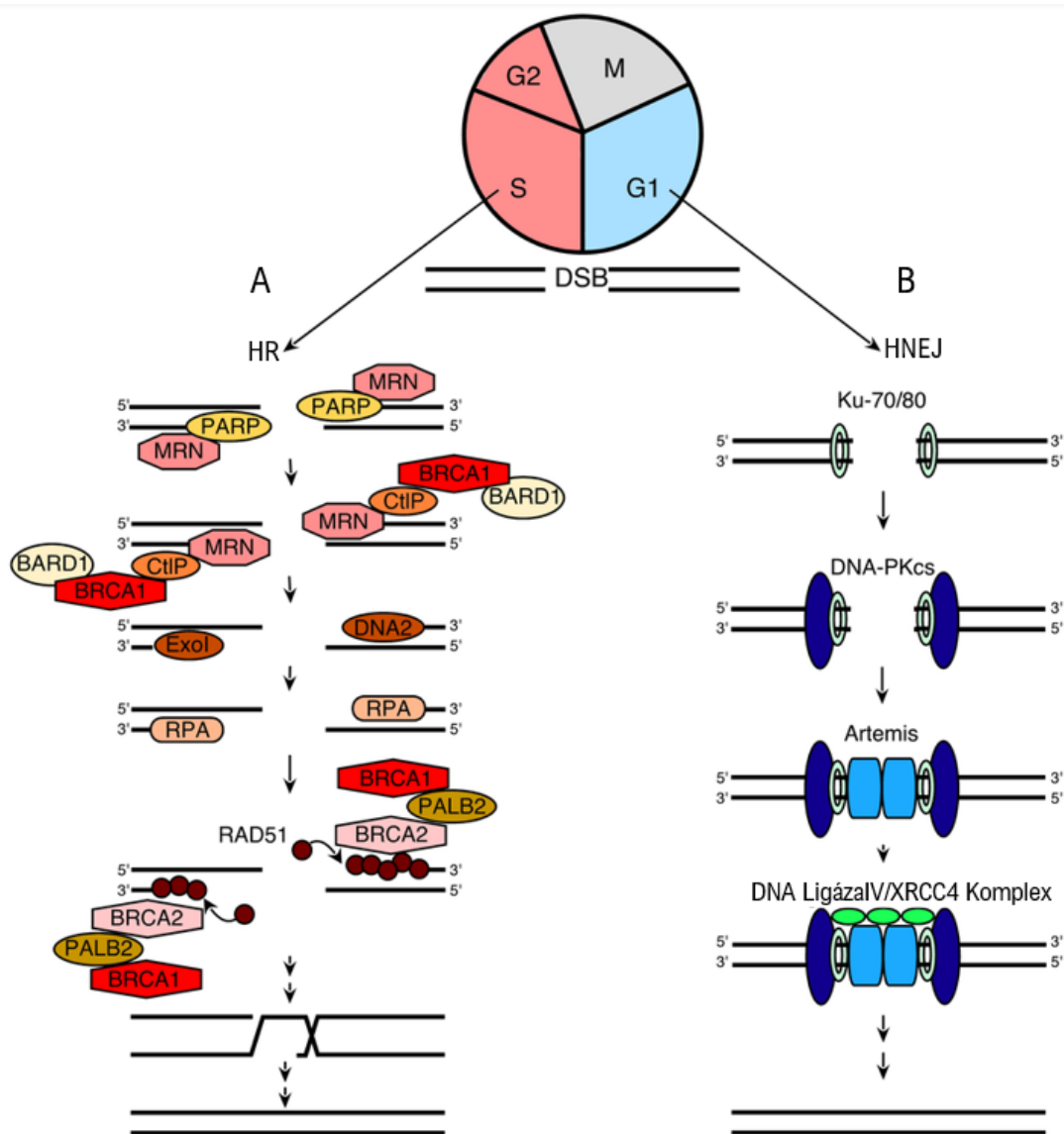
Protein BRCA1 hraje klíčovou roli při přenosu informací o poškození DNA ze senzorů do efektorů opravy. Konkrétně BRCA 1 indukuje vytěsnění RPA z konců a pomáhá při napojení RAD51 na ssDNA. Vazba proteinu RAD51 k místu poškození zahajuje samotnou opravu dle homologního templátu (Scully & Chen, 1997; Zhang & Powell, 2005). To se provádí tak, že vlákno ssDNA-RAD51 vyhledává homologické místo a vstupuje do neporušené sekvence. Invazní konec je pak prodloužen syntézou DNA a opravný proces je dokončen opětovným spojením s druhým koncem DSB (Gnügge & Symington, 2021).

Existuje mnoho procesů přenosu signálu o poškození DNA, jedním z nich je tzv. ATM-CHK2 kontrolní dráha. Působením záření dochází k vzniku DSB a následné aktivaci ATM kinázy, což vede k další fosforylaci a tím aktivaci jejích cílových proteinů včetně CHK2 (Matsuoka et al., 2000) Aktivovaná CHK2 fosforyluje další proteiny, jako jsou fosfatázy Cdc25A, Cdc25C a p53 (Ou et al., 2005; Smith et al., 2020; Weber & Ryan,

2015). Tento proces vede k zastavení buněčného cyklu v G1 a G2 fázích, kdy následuje proces opravy poškození DNA (Smith et al., 2020).

#### *Nehomologní spojování konců (NHEJ)*

Další hlavní cesta při opravě DSB je nehomologní spojování konců. Tento proces je potenciálně mutagenní a může vést k různým chybám v genomu. Na rozdíl od HR, která využívá identickou sekvenci jako templát a je omezena pouze na S a G2 fázi, NHEJ nepotřebuje templát a probíhá nezávisle na fázi buněčného cyklu (Biau et al., 2019; Huang & Zhou, 2020; Nogueira et al., 2019). Prvním krokem při NHEJ je přesun Ku70/Ku80 a její vazba na konce DNA. Dochází tak ke vzniku DNA-dependentní proteinkinázy (DNA-PKcs), která je dále zodpovědná za interakci mezi konci DNA. Díky dalším proteinům XRCC4 a LIG4 dochází k ligaci příslušných konců DNA a spojení Ku70/Ku80 konce s DNA-PKcs (Biau et al., 2019; Huang & Zhou, 2020; Ranjha et al., 2018).



Obrázek 3: Hlavní cesty při opravě dvouvláknových zlomu v DNA. (A) Homologní rekombinace (HR). Prvním krokem je navázání proteinu PARP a MRN komplexu na místo poškození DNA. Následuje štěpení DNA konců a jejich stabilizace vazbou RPA proteinu. Protein BRCA1 poté nahradí RPA proteinem RAD51. Nakonec dochází k opravě, při které se homologická sekvence využívá jako templát pro úpravu poškozeného místa. (B) Nehomologní spojování konců (NHEJ). Prvním krokem je navázání Ku70/Ku80 na poškozené místo a vznik komplexu DNA-PKcs. Fosforylace tohoto komplexu přispívá k aktivaci proteinu Artemis. Nakonec LIG4 a XRCC4 komplex katalyzuje ligaci a spojení poškozených konců DNA (De Lorenzo et al., 2013)(převzato a upraveno od (De Lorenzo et al., 2013)).

## 2.4 Kombinace radioterapie a fytokanabinoidů.

Radioterapie (RT) je léčba rakoviny, která využívá vysokoenergetického záření k zastavení růstu nádoru a ničení nádorových buněk. K zvýšení úspěchu léčby je RT často kombinována s jinými metodami léčby rakoviny jako je imunoterapie, chemoterapie anebo je aplikovaná po chirurgickém odstranění nádoru (Mondini et al., 2020; Alterio et al., 2019).

Některé studie, zejména na nádorech mozku, vyzdvihují synergický účinek radioterapie v kombinaci s užitím CBD a THC samostatně anebo jako součást celkového rostlinného extraktu (Alfonzetti et al., 2021; Scott et al., 2014; Yasmin-Karim et al., 2018). Tyto fytokanabinoidy ve vyšších koncentracích snižují aktivaci proteinkináz aktivovaných mitogenem (MAPK), což je zesíleno v kombinaci s ozařováním. Dochází také k snížení schopnosti buněk opravit dvouvláknové zlomy DNA, což bylo detekováno pomocí proteinu  $\gamma$ -H2AX (Scott et al., 2014). Stejného synergického účinku cytotoxicity CBD a RT bylo dosaženo v *in vitro* experimentech na buňkách rakoviny slinivky (Alfonzetti et al., 2021; Yasmin-Karim et al., 2018). Naopak studie na melanomových buňkách neprokázala synergický protinádorový účinek při kombinaci RT s fytokanabinoidy ve formě celkového extraktu z *Cannabis sativa* L. (Naderi et al., 2020).

Zajímavým poznatkem je také fakt, že optimálním postupem k dosažení synergického cytotoxického účinku RT a fytokanabinoidů je ošetření fytokanabinoidem a následné ozaření. V opačném případě radioterapie s následným ošetřením fytokanabinoidem vykazuje nižší účinnost (Ivanov et al., 2017; Scott et al., 2014).

Většina zmiňovaných prací, které potvrzují synergický účinek RT a fytokanabinoidů testuje ve svých *in vitro* experimentech vysoké koncentrace fytokanabinoidů (10-20  $\mu\text{g/ml}$ ). Nicméně otázkou zůstává, jaká je dosažitelná koncentrace fytokanabinoidů v krvi (Ivanov et al., 2017). Farmakokinetika fytokanabinoidů závisí na spoustě faktorů jako je způsob a množství užití, ale také individuální faktory jako je tělesná hmotnost, tolerance a metabolismus. Současné studie uvádí maximální dosažená množství v rozmezí 30-200  $\text{ng/ml}$  (Anizan et al., 2013).

Vzhledem ke kontroverzním výsledkům ve studiu cytotoxického účinku fytokanabinoidů v kombinaci s radioterapií na rakovinové buňky, zůstává tato otázka velmi aktuální (Alfonzetti et al., 2021; Ivanov et al., 2017; Naderi et al., 2020; Scott et al., 2014; Yasmin-Karim et al., 2018).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1.1 Biologický materiály

V praktické části této práce byly použity 3 adherentní nádorové buněčné linie: lidský adenokarcinom tlustého střeva (HT-29), lidský osteosarkom (U-2-OS) a lidský glioblastom (MO59K).

Extrakty *Cannabis sativa* L. chemotyp III (CBD vyšší než THC) a chemotyp I (THC vyšší než CBD) byly poskytnuty Vědeckým ústavem rostlinné výroby v.v.i. v Olomouci.

### 3.1.2 Chemikálie

30% Akrylamid/Bis Solution 29:1 (161-0156; BIO-RAD)

Dimetylsulfoxid (A3672,0250; AppliChem)

Dodecylsírán sodný (71729-500G; Sigma Aldrich)

Dulbeccovo modifikované Eagleovo médium (DMEM) High Glucose 500ml (LM-D1110/500, BioSera)

Fetální bovinní sérum (10270-106; Gibco®; Thermo Fisher Scientific)

Glycin (23391.02; Serva)

Chlorid sodný (7647-14-5, Sigma-Aldrich)

Isopropanol (20120-91221, Penta)

Krystalová violet (C6158-50G, Sigma)

Kyselina octová (19990-11000; Penta)

N,N,N',N'-Tetrametyletyléndiamín; TEMED (T9281-25ML, Sigma Aldrich)

Nitrocelulózová membrána 0,2 µm (IB23002, Invitrogen)

Penicilín-Streptomycín (P4333-100ML; Sigma Aldrich)

Peroxodisírán amónny (215589-100G; Sigma Aldrich)

Pierce Detergent Compatible Bradford Assay Reagent (23246, Thermo Scientific™)

Ponceau S (P3504-10G; Sigma Aldrich)

Precision Plus Protein Dual Color Standard (161-0374; BIO-RAD)

Protilátky, viz.

Tabulka 1

ReBlot Plus Mild Solution 10x (2502; EMD Millipore)

SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (34095; Thermo Fisher Scientific)

SuperSignal® West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate (34580; Thermo Fisher Scientific)

Sušené mlieko odtučnené (Laktino)

Tris (37180.04; SERVA)

Tween 20/Polysorbate 20 (9005-64-5; MP Biomedicals)

Trypsin TrypLE Express (+) Phenol Red (12605-028; Thermo Fisher Scientific)

Tabulka 1: Seznam použitých protilátek.

| Protilátka                               | Původ  | Ředění | Výrobce         | Katalogové číslo |
|------------------------------------------|--------|--------|-----------------|------------------|
| <b>Primární protilátky</b>               |        |        |                 |                  |
| <b>ATM</b>                               | koza   | 1:1000 | Bethyl          | A300-136A        |
| <b>p-ATM (Ser1981)</b>                   | králík | 1:250  | Cell signalling | 5883S            |
| <b>CHK 2</b>                             | myš    | 1:500  | Santa Cruz      | sc9064           |
| <b>p-CHK 2</b>                           | králík | 1:500  | Cell signalling | 2661S            |
| <b>SMC1</b>                              | králík | 1:500  | Abcam           | ab9262           |
| <b>Sekundární protilátky</b>             |        |        |                 |                  |
| <b>Peroxidase linked anti rabbit IgG</b> | ovce   | 1:1000 | GE Healthcare   | NA931V           |
| <b>Peroxidase linked anti mouse IgG</b>  | osel   | 1:1000 | GE Healthcare   | NA934V           |
| <b>Peroxidase linked anti goat IgG</b>   | osel   | 1:1000 | Abcam           | Ab6885           |

### 3.1.3 Roztoky a média

**10x Fosfátový pufr (PBS):** 27 mmol·l<sup>-1</sup> KCl, 1,37 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl, 100 mmol·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, mmol·l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O

**10x Tris-pufr (TBS):** pH 7,6; 1,37 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl, 200 mmol·l<sup>-1</sup> Tris, H<sub>2</sub>O

**4x Vzorkovací pufr (LSB):** 0,5 mmol·l<sup>-1</sup> DDT, 50 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH= 6,8), 0,01 % Bromphenol blue, 10 % glycerol, 2 % SDS, H<sub>2</sub>O

**10x Tris-Glycin-SDS pufr pro elektroforetickou separaci:** 192 mmol·l<sup>-1</sup> glycin, 25 mmol·l<sup>-1</sup> Tris, 0,1 % SDS, H<sub>2</sub>O

**10x Tris Glycin transferový pufr:** 192 mmol·l<sup>-1</sup> glycin, 25 mmol·l<sup>-1</sup> Tris, 10 % methanol, H<sub>2</sub>O

**0,5 M Tris Pufr (pH 6,8):** 49,5 mmol·l<sup>-1</sup> Tris, H<sub>2</sub>O

**1,5 M Tris Pufr (pH 6,8):** 149,88 mmol·l<sup>-1</sup> Tris, H<sub>2</sub>O

**Blokační roztok:** 5% sušené mléko v TBS pufru s 0,1 % Tweenem 20

**Krystalová violet:** 0,012 mmol·l<sup>-1</sup> Krystalová violet, 98 % ethanol, H<sub>2</sub>O

**Ponceau S:** 0,1 % Ponceau S v 5 % kyselině octové

**Promývací roztok:** TBS s 0.1 % Tweenem 20

**Reblotovací roztok:** 10 % ReBlot v H<sub>2</sub>O

**Kultiváční médium:** Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) obohacené o 10 % fetalní bovinní sérum (FBS) a 1 % penicilin/streptomycin

**Roztok pro zamražení buněk:** FBS s 10 % dimethylsulfoxid (DMSO)

### 3.1.4 Přístroje

Automatické pipety (Eppendorf Research plus; Discovery Comfort)

Automatický pipetor (MBI Smart Pipettor, MBI63919991)

Biologický iradiátor (RS225; Xstrahl LTD)

Centrifuga (Scanspeed 1236R; LaboGene)

Zobrazovací systém (ChemiDoc™ MP Imaging System; BioRad)

Elektroforetická aparatura (Mini-PROTEAN® Tetra Cell; Biorad)

Inkubátor (HERAcell 150i CO2 Incubator; Trigon-Plus®)

Laminární box (HERAsafe KS; Trigon-Plus®)

Mikrocentrifuga (Smart 15 Micro Centrifuge; Hanilbiomed Co., Ltd.)

Mikroskop (CKX41 Inverted Cell Culture Microscope, Olympus)

Mraznička (Innova® U725; Eppendorf)

Napájecí zdroj pro elektroforézu (EV202 Electrophoresis power supply; Consort)

Orbitální třepačka (PSU-10i Orbital Shaker; Grant-bio)

Přístroj na počítání buněk (Vi-Cell XR; Beckman Coulter®)

Termotřepačka (Thermo-Shaker TS-100C; BioSan)

Přístroj na měření absorbance (Infinite 200Pro NanoQuant, Tecan)

Vodní lázeň (WNB 45; Memmert)

Vortex (Vortex Genius 2; IKA)

Zařízení pro WB (iBlot™ 2 Gel Transfer Device, Invitrogen)

### **3.1.5 Software**

GraphPad Prism (verze 9, Dotmatics)

Vi-cell XR Software (verze 2.03, Beckman Coulter®)

I-control (Tecan)

ImageLab (verze 6.0.1, BioRad)

## **3.2 METODY**

### **3.2.1 Kultivace buněčné kultury**

Buněčné linie byly kultivovány v Dulbeccovu modifikovaném Eagleovu médiu (DMEM) doplněném o 10 % fetální bovinní sérum (FBS) a 1 % penicilin-streptomycin. Kultivace probíhala v inkubátoru při standardním nastavení (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C).

Při plné konfluenci buněčné kultury bylo třeba provést její pasážování. Pasážování bylo provedeno trypsinizací a to tak, že do kultivační láhve velikosti 75cm<sup>3</sup> bylo po odsátí média přidáno 2 ml trypsinu. Trypsinizace probíhala 3-5 minut v inkubátoru. Pod mikroskopem bylo zkontrolováno, zda došlo k odlepení všech buněk. Následovala neutralizace trypsinu pomocí média a pasážování kultury na požadovanou konfluenci. Obsah láhve byl šetrně promíchán a přebytečná buněčná suspenze byla odstraněna do odpadu. Směs buněčné kultury v kultivační láhvi byla doplněna na požadovaný objem 10 ml.

### **3.2.2 Rozmrazování a zamrazování buněčné kultury**

Buněčné linie byly uchovávány v tekutém dusíku při teplotě -196°C. Rozmrazená kultura byla nejprve promyta kultivačním médiem v 15 ml centrifugační zkumavce. Po stočení buněčné kultury (200G, 5 min., laboratorní teplota) byl odsát supernatant a buněčný pelet resuspendován v kultivačním médiu. Následovalo převedení buněk do kultivační láhve a doplnění na požadovaný objem 10 ml/ 75 cm<sup>3</sup> kultivační láhev. Kultivace probíhala za standardních podmínek v inkubátoru (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C).

Zamrazení buněčné linie bylo provedeno tak, že nejprve byla provedena trypsinizace buněk. Po neutralizaci trypsinu kultivačním médiem byly buňky přepipetovány do centrifugační zkumavky a stočeny (200G, 5 min, laboratorní teplota). Po odsátí supernatantu byl buněčný pelet resuspendován v 3 ml roztoku pro zamražení (FBS +10 % DMSO). Vzniklá směs byla rozpipetována do třech kryozkumavek, které byly popsány a byly uloženy do mrazáku (-80 °C). Další den byly kryozkumavky přinášeny do tekutého dusíku (-196 °C).

### **3.2.3 Test životaschopnosti buněk – metoda krystalové violeti**

Buněčné linie byly vysazeny do 96jamkové destičky v hustotách  $5 \cdot 10^3$  buněk na jamku, množství buněk bylo počítáno pomocí přístroje na počítání buněk Vi-Cell XR. Za 24 h od vysazení byly buňky ošetřeny (5-40  $\mu\text{M}$ ) kanabinoidu nebo extraktu a za dalších 24 h byly ozářeny rentgenovým zářením (6 Gy). Následovala 72 h inkubace v inkubátoru za standardních podmínek. Po uplynutí doby inkubace byly buňky promyty v 100  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru (PBS) a následně fixovány v 100  $\mu\text{l}$  70 % mrazeného ethanolu po dobu 20 minut. Fixované buňky byly dále obarveny 100  $\mu\text{l}$  Krystalové violeti po dobu 30 min. Za 24 h byly buňky rozpuštěny v 100  $\mu\text{l}$  20% kyseliny octové a další den byla měřena absorbance při 590 nm pomocí přístroje Tecan Infinite 200Pro. Stanovení hodnoty poloviny maximální inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>) bylo provedeno v softwaru GraphPad Prism.

### **3.2.4 Test tvorby kolonií (CFA; colony forming assay)**

Buněčné linie byly vysazeny do 12jamkové destičky v hustotách  $3 \cdot 10^2$  buněk na jamku a za 24 h byly ošetřeny (0,6-5  $\mu\text{M}$ ) kanabinoidu nebo extraktu. Za dalších 24 h buňky byly ozářeny rentgenovým zářením (2 Gy). Následovala inkubace v inkubátoru ze standardních podmínek (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) do doby viditelných kolonií (7-10 dní, dle typu linie). Po vzniku viditelných kolonií buňky byly promyty v 1 ml fosfátového pufru (PBS) a následně fixovány v 1 ml 70 % mrazeného ethanolu po dobu 20 minut. Fixované buňky byly dále obarveny 1 ml Krystalové violeti po dobu 30 min.

12jamkové destičky s obarvenými koloniemi byly vyplněny cukrem pro větší kontrast a poté nafoceny udělaný snímky destiček. Počet kolonií a jejich plocha byly vyhodnocovány pomocí příslušného softwaru.

### **3.2.5 Stanovení koncentrace proteinů v lyzátech (Bradford assay)**

Metoda byla provedena podle protokolu uvedeného v Pierce Detergent Compatible Bradford Assay Kit. Lyzáty pro WB byly naředěny 2x a to je tak, že do mikrozkušavek bylo napipetováno 25  $\mu\text{l}$  lyzátu a 25  $\mu\text{l}$  destilované vody. Do 96-jamkové destičky bylo postupně napipetováno 10  $\mu\text{l}$  standardního roztoku bovinního sérového albuminu (BSA) o koncentrační řadě (125-2000  $\mu\text{g/ml}$ ) a také jednotlivých vzorků lyzátu pro WB. Následoval přídavek 300  $\mu\text{l}$  barviva Coomassie Brilliant blue G250 a inkubace po dobu 10 min při pokojové teplotě. Nakonec byla měřena absorbance při 595 nm pomocí

přístroje Tecan Infinite 200Pro. Na základě kalibrační křivky standardního proteinu BSA byla určena koncentrace proteinu v lyzátech.

### **3.2.6 Elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)**

Nejprve byly udělány lyzáty pro elektroforetickou separaci. Buňky byly vysazeny do 35 mm misek v hustotách  $5 \cdot 10^6$  buněk na jamku 24 h před ošetřením (0,6-10  $\mu\text{M}$ ) kanabinoidu. Za dalších 24 h buňky byly ozářeny rentgenovým zářením (2 Gy). Následovala inkubace buněk a za 1 h byl připraven buněčný lýzat a to přímou lyzí do vzorkovacího pufru (LSB; loading sample buffer). Lyzáty byly protřepány na termotřepačce (98°C) po dobu 8 min.

Pro elektroforetickou separaci proteinů SDS-PAGE byly připraveny gely o různé hustotě (12 % a 6 %), složení je uvedeno v Tabulka 2

Nejprve byl namíchán dělicí gel, který byl rychle nanesen mezi elektroforetická skla, a převrstven isopropanolem. Dále následovala polymerizace gelu po dobu 20-30 min při laboratorní teplotě. Po zatuhnutí gelu byl isopropanol odsán pomocí filtračního papíru. Dělicí gel byl převrstven zaostřovacím, do kterého byl opatrně vsunut hřebínek pro tvorbu jamek. Zatuhnutý gel byl přenesen do elektroforetické vany naplněné pufrem pro elektroforetickou separaci. Po šetrném odstranění hřebínku byly do příslušných jamek nanесeny vzorky o koncentraci 20  $\mu\text{g}$ . Pro sledování separace bylo nanесeno 10  $\mu\text{l}$  markeru molekulových hmotností. Elektroforetická separace proběhla v Tris-Glycin-SDS pufru při laboratorní teplotě. Při separaci v zaostřovacím gelu byl nastaven konstantní proud 10 mA/1 gel. Separace dělicím gelu byla změněna na 40 mA/1 gel. Jakmile standard dosáhl konce gelu elektroforetická separace byla ukončena.

Tabulka 2: Složení dělicích a zaostřovacího gelů

| Chemikálie (ml)            | Dělicí gel |       | Zaostřovací gel |
|----------------------------|------------|-------|-----------------|
|                            | 6 %        | 12 %  |                 |
| <b>Celkový objem</b>       | 15         | 15    | 4               |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>      | 8          | 5     | 2,7             |
| <b>30 % Acrylamide mix</b> | 3          | 6     | 0,67            |
| <b>1,5 M Tris (pH 8,8)</b> | 3,8        | 3,8   | -               |
| <b>0,5 M Tris (pH 6,8)</b> | -          | -     | 0,5             |
| <b>10 % SDS (μl)</b>       | 0,15       | 0,15  | 0,04            |
| <b>10 % APS (μl)</b>       | 0,15       | 0,15  | 0,04            |
| <b>TEMED (μl)</b>          | 0,012      | 0,006 | 0,004           |

### 3.2.7 Western blot

Po elektroforetickou separaci proteinů následoval přenos gelu na nitrocelulózovou membránu pomocí přístroje I-Blot. Proteiny s molekulovou hmotností v rozmezí 150-10 kDa (12 % gel) byly přeneseny na membránu programem P0 s třemi kroky změny ukládaného napětí (20V během 1 min, 23V během 4 min, 25V během 2 min) a proteiny s molekulovou hmotností nad 150 kDa (6 % gel) ze konstantního napětí 23V po dobu 10 min.

Po ukončení blotování byla nitrocelulózová membrána obarvena roztokem Ponceau-S pro vizualizaci separace. Následovalo nařezání membrány na jednotlivé části dle molekulové hmotnosti proteinů, které měly být pozorovány. Nařezané membrány byly promyty v roztoku TBS s 0,1% Tweenem 20 a blokovány v blokovacím roztoku (1x TBS s 0,1% Tweenem 20 + 5% sušené mléko) po dobu 1 h.

Po blokování byly membrány promyty v roztoku TBS s 0,1% Tweenem 20. Primární protilátky specifické proti detekovaným proteinům byly naředěny v blokovacím roztoku a nanášeny na membrány. Membrány byly inkubovány v ledničce přes noc. Původ a ředění protilátek je uvedeno v tabulce 1.

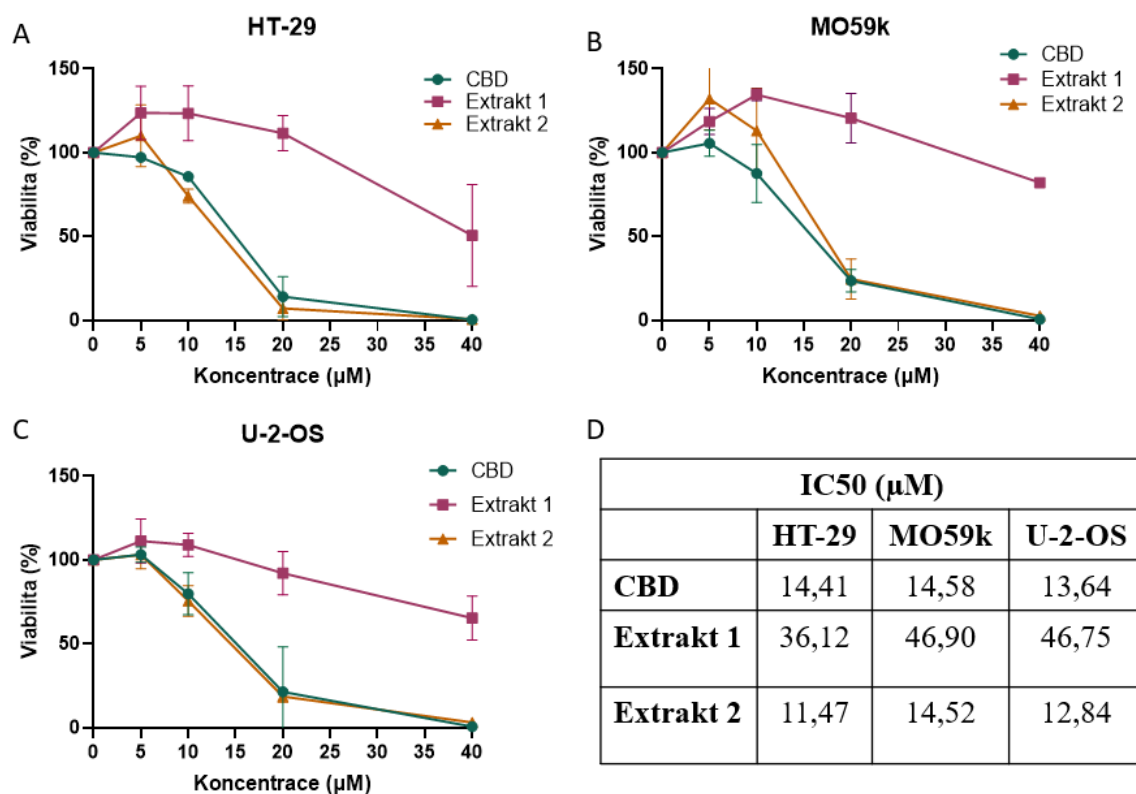
Následovalo odstranění primární protilátky a promytí v roztoku TBS s 0,1% Tweenem 20 3x po dobu 10 min pro odstranění nespecificky navázaných protilátek. Následně byly nanesené sekundární protilátky, které byly naředěny v blokovacím roztoku. Původ a ředění protilátek je uveden v tabulce 1. Membrány se sekundárními protilátkami byly inkubovány 1 h při laboratorní teplotě. Po ukončené inkubaci byly sekundární protilátky odstraněny a membrány promyty v roztoku TBS s 0,1% Tweenem 20 3x po dobu 20 min. Vizualizace proteinů byla provedena pomocí vyvolávacího roztoku SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate nebo SuperSignal® West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate. Signál byl vizualizován pomocí ChemiDoc™ MP systému a analyzován pomocí programu ImageLab.

## 4 VÝSLEDKY

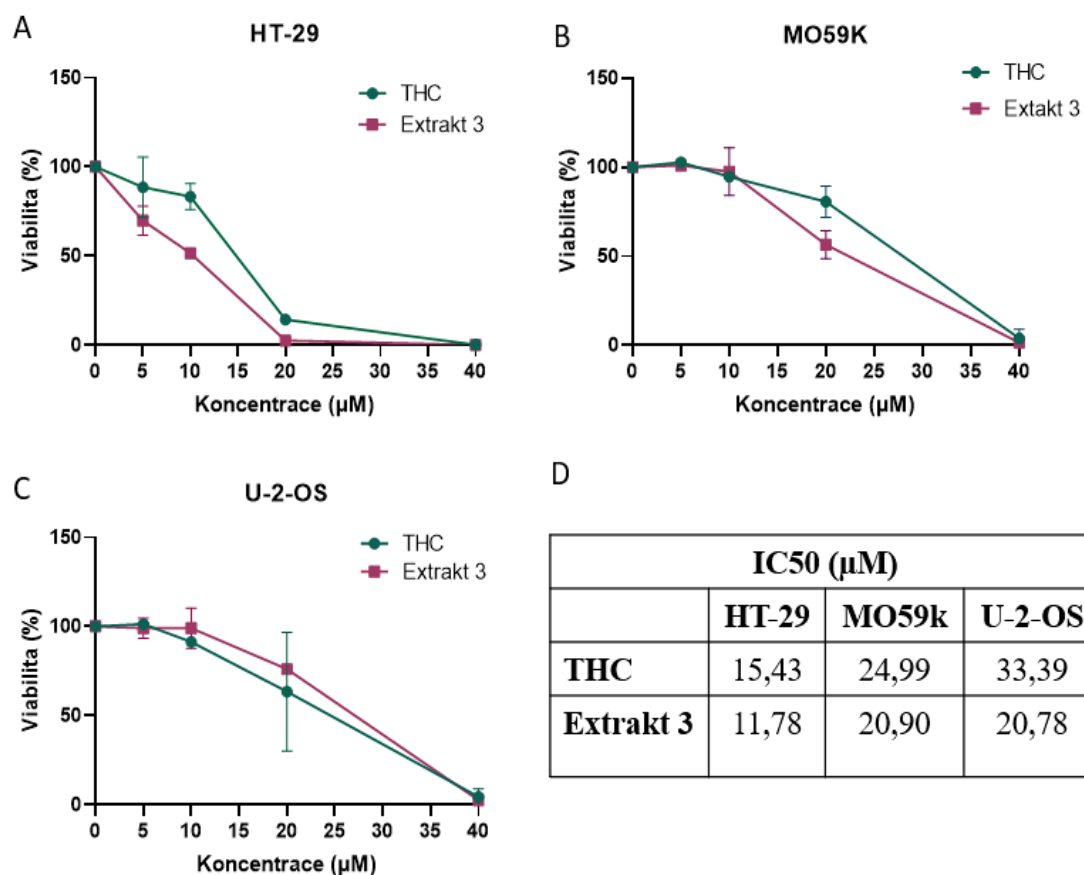
### 4.1 Stanovení cytotoxického účinku vybraných fytoKANABINOIDŮ na nádorové linie HT-29, U-2-OS a MO59K

V první části experimentální práce byl testován cytotoxický účinek jednotlivých standardních fytoKANABINOIDŮ a jejich směsi v komplexních extraktech *Cannabis Sativa* L. Testovány byly tři lidské rakovinné linie: adenokarcinom tlustého střeva (HT-29), osteosarkom (U-2-OS) a glioblastom (MO59K). Buňky byly ošetřeny v koncentračním rozmezí 5 - 40  $\mu$ M standardního fytoKANABINOIDU a komplexního extraktu. V případě extraktů byla koncentrace stanovena dle obsahu majoritního fytoKANABINOIDU. Majoritní složkou Extraktu 1 byla CBDA, Extrakt 2 obsahoval zejména CBD a Extrakt 3 především THC. Cytotoxicita byla stanovena metodou krystalové violeti viz. 3.2.3 Stanovení hodnoty poloviny maximální inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>) v pozorovaných liniích bylo provedeno v softwaru GraphPad Prism.

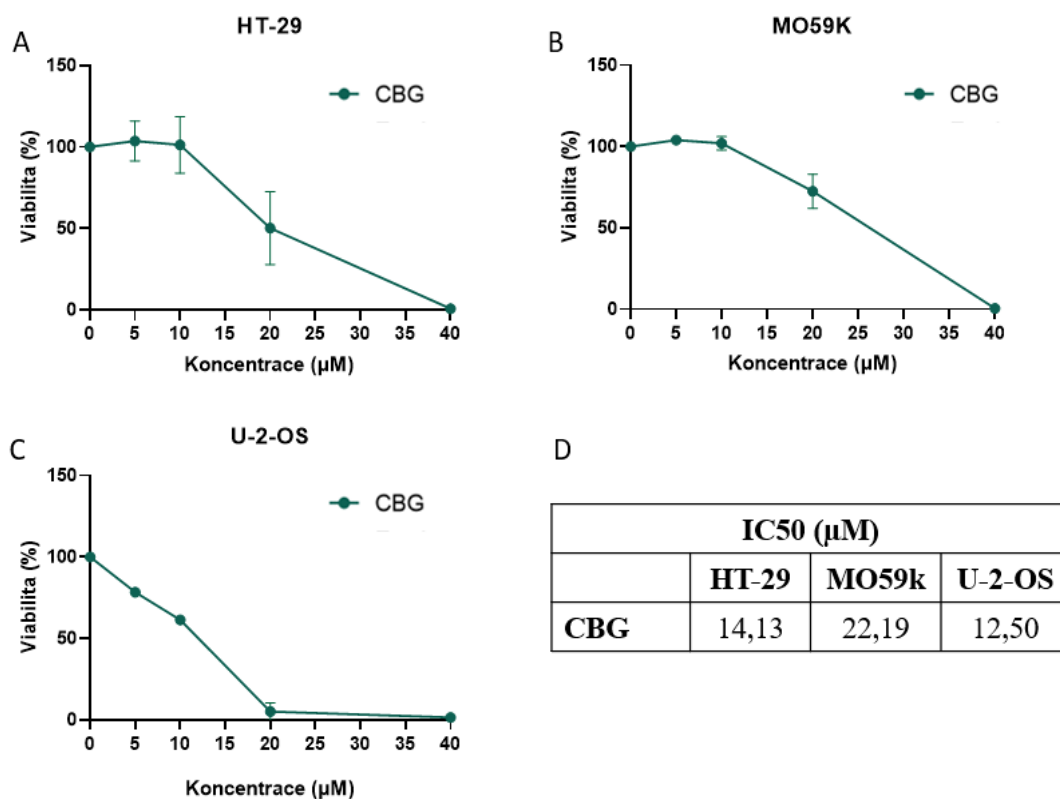
Cytotoxický účinek standardních fytoKANABINOIDŮ, ale i jejich směsi v extraktu byl pozorován na všech testovaných liniích (Obr. č. 4, 5, 6). Ze získaných hodnot IC<sub>50</sub> vyplývá, že účinnost fytoKANABINOIDŮ je buněčně specifická. Za nejcitlivější linii vůči fytoKANABINOIDŮM lze považovat buněčnou linii HT-29. Všechny testované linie vykazovaly nejnižší míru citlivosti k Extraktu 1, který obsahoval zejména CBDA (Obr. č. 1). Porovnání standardního CBD s Extraktem 2 anebo THC s Extraktem 3 neprokázalo signifikantní rozdíl v protinádorovém účinku. Při porovnání hodnot IC<sub>50</sub> bylo zjištěno, že Extrakt 2 byl nejúčinnější pro linie HT-29 (IC<sub>50</sub> 11,47  $\mu$ M) a MO59K (IC<sub>50</sub> 14,52  $\mu$ M), zatímco pro linie U-2-OS byl nejúčinnější standardní CBG (IC<sub>50</sub> 12,50).



**Obrázek 4: Stanovení cytotoxického účinku CBD, Extraktu 1 a Extraktu 2.** Vybrané buněčné linie A–HT-29, B–MO59K a C–U-2-OS byly ošetřeny standardním roztokem CBD, Extraktem 1 s majoritním obsahem CBDA a Extraktem 2 s majoritním obsahem CBD po dobu 72 h. Metodou krystalové violeti a pomocí softwaru GraphPad Prism byla stanovena hodnota IC<sub>50</sub> pro jednotlivé linie. Experimenty byly provedeny ve třech biologických opakováních.



**Obrázek 5: Stanovení cytotoxického účinku THC a Extraktu 3.** Vybrané buněčné linie A–HT-29, B–MO59k a C–U-2-OS byly ošetřeny standardním roztokem THC a Extraktem 3 s majoritním obsahem THC po dobu 72 h. Metodou krystalové violeti a pomocí softwaru GraphPad Prism byla stanovena hodnota IC<sub>50</sub> pro jednotlivé linie. Experimenty byly provedeny ve třech biologických opakováních.

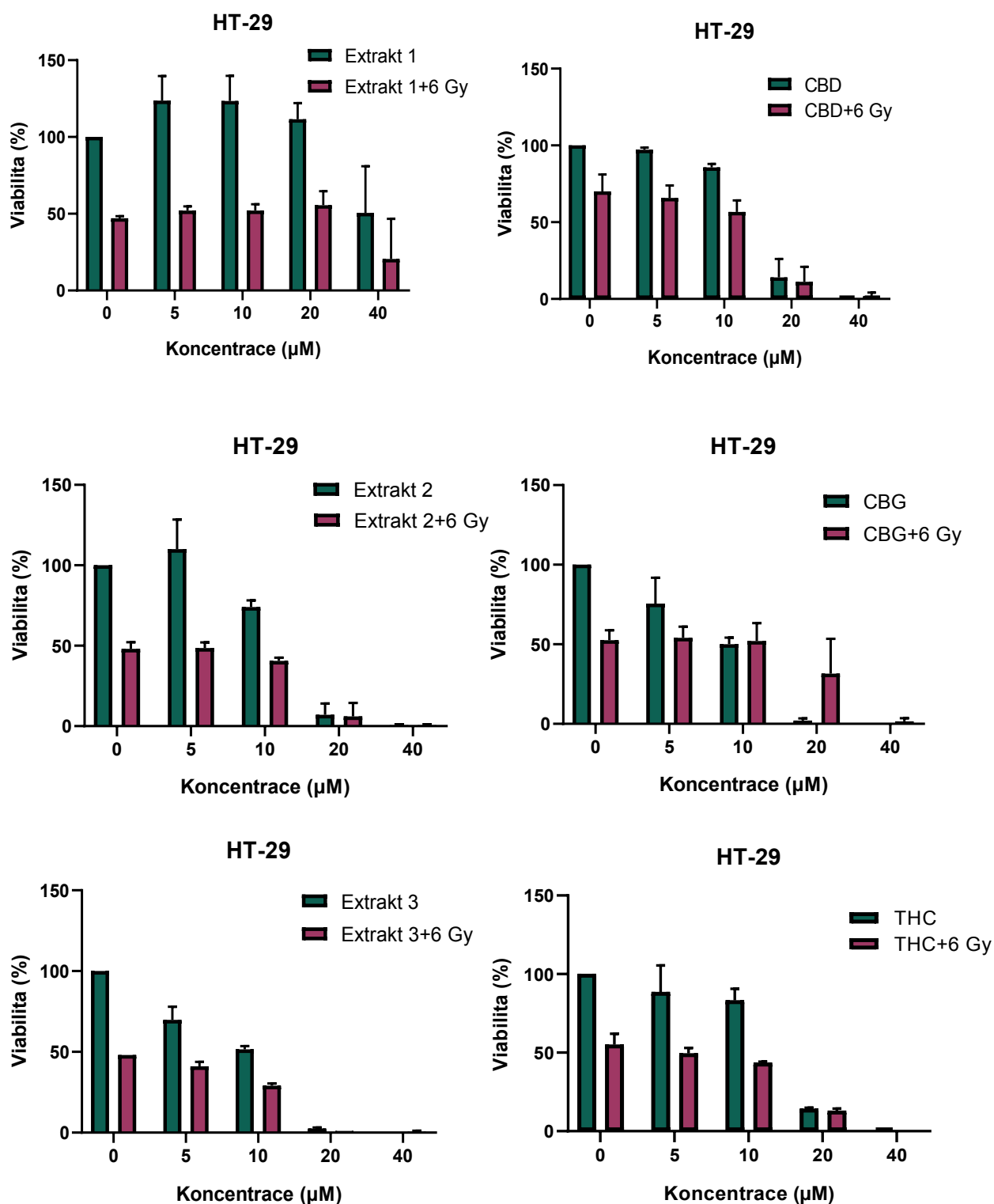


**Obrázek 6: Stanovení cytotoxického účinku CBG.** Vybrané buněčné linie A–HT-29, B–MO59K a C–U-2-OS byly ošetřeny standardním roztokem CBG po dobu 72 h. Metodou krystalové violeti a pomocí softwaru GraphPad Prism byla stanovena hodnota IC50 pro jednotlivé linie. Experimenty byly provedeny ve třech biologických opakováních.

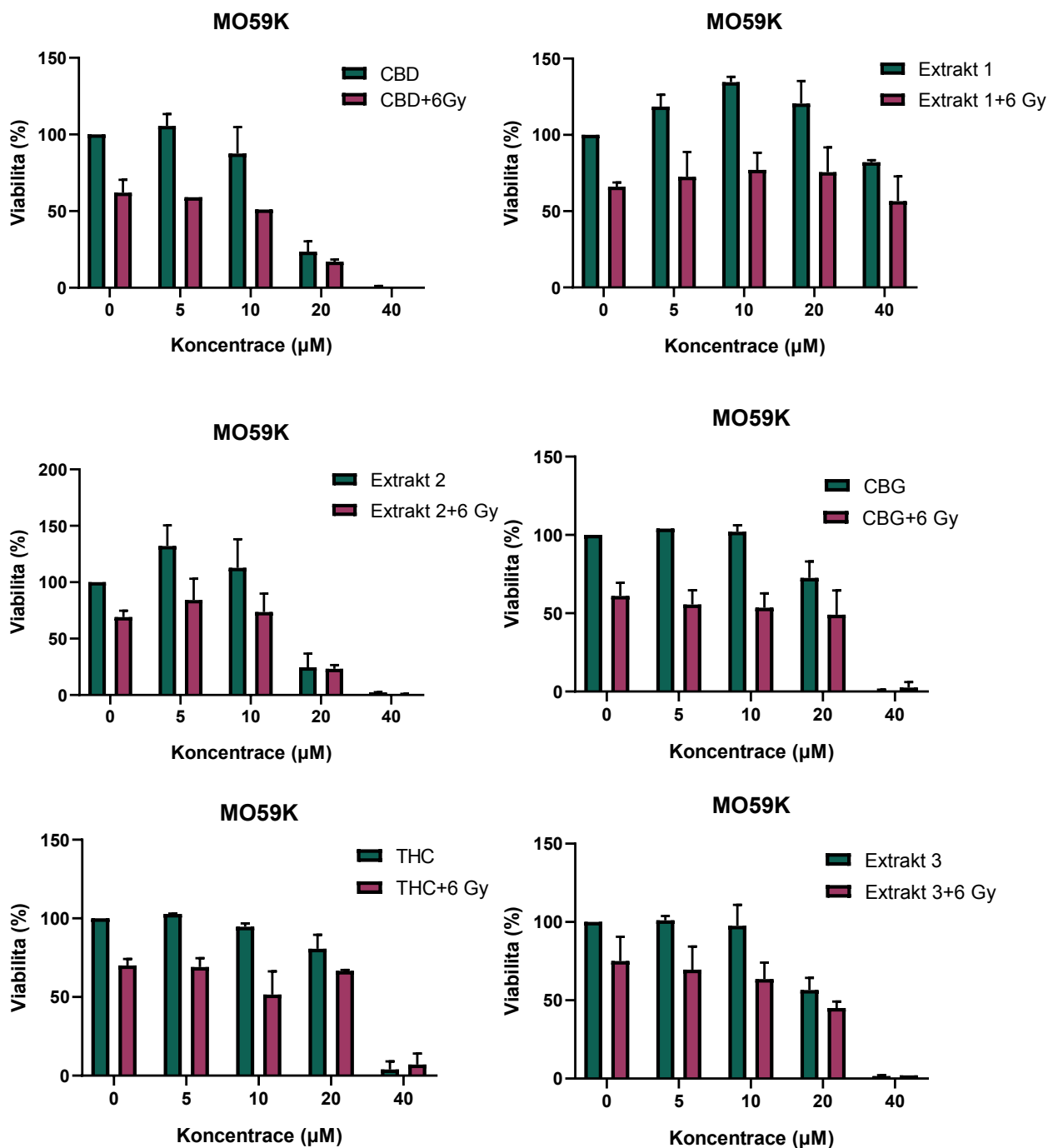
## 4.2 Studium vlivu kombinace ionizujícího ozáření s fytoKANABINOIDMI na nádorové linie HT-29, U-2-OS, MO59K

Současné postupy léčby rakoviny využívají zejména chemoterapii případně radioterapii, a proto jsme se v další části práce zaměřili na studium vlivu fytoKANABINOIDŮ na radioterapii. Zajímalo nás, zda spolupůsobení fytoKANABINOIDŮ a radioterapie může mít aditivní anebo inhibiční vliv na její účinnost. Porovnávali jsme míru přežití testovaných linií při ošetření samotnými fytoKANABINOIDMI s mírou přežití při kombinaci s ionizujícím zářením o intenzitě 6 Gy. Testované buněčné linie byly ošetřeny v koncentračním rozmezí 5–40 μM standardního fytoKANABINOIDU a komplexního extraktu samotně nebo v kombinaci s ionizujícím zářením (ozáření 6 Gy bylo provedeno 24 h po ošetření fytoKANABINOIDMI).

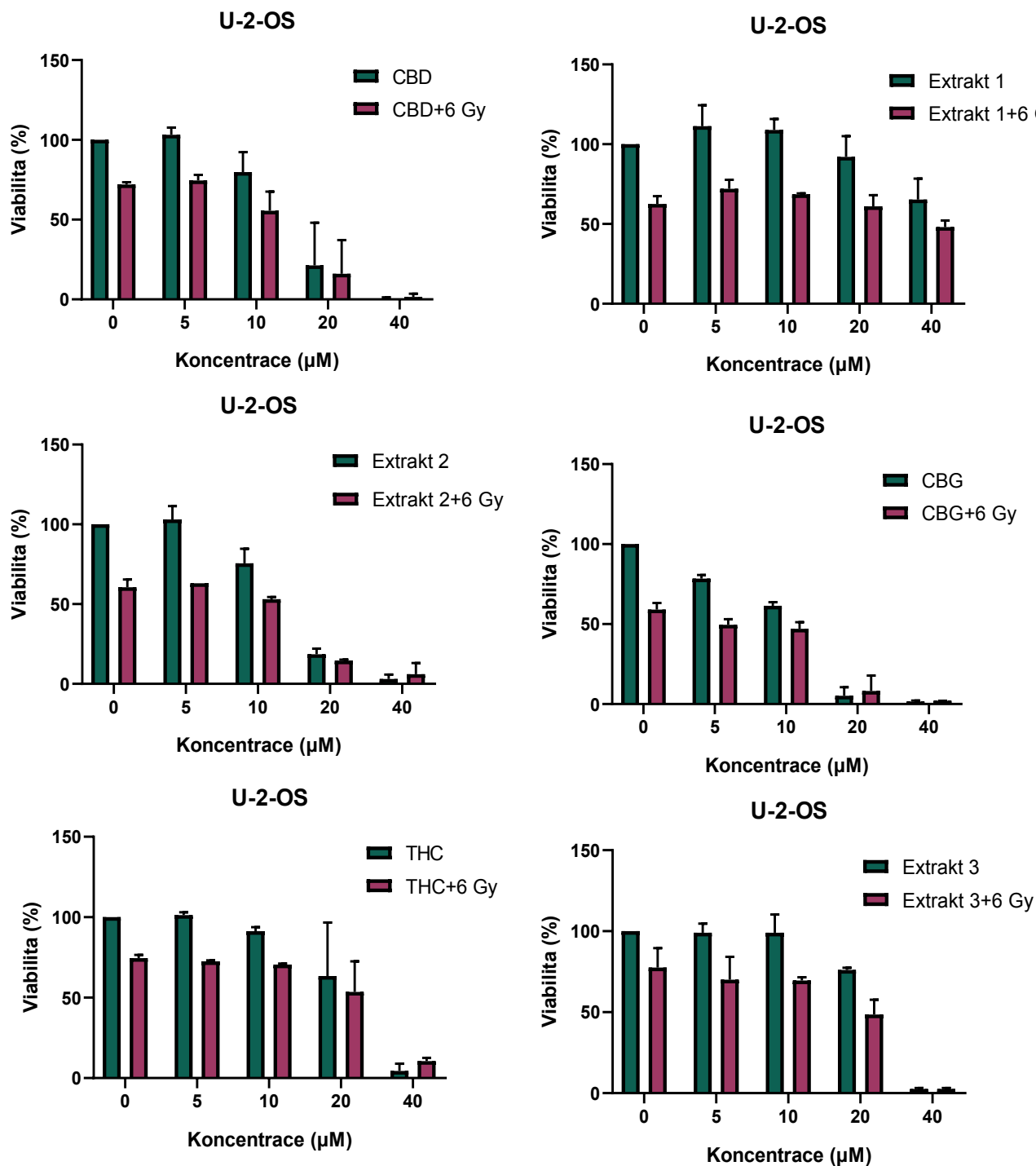
Ze získaných dat vyplývá, že při ozáření došlo ke snížení životaschopnosti buněk v pozorovaných buněčných liniích, avšak nelze pozorovat aditivní ani synergický efekt spolupůsobení s fytokanabinoidmi samotnými případně jejich extrakty obr. č. 7, 8, 9.



**Obrázek 7: Studium vlivu fytokanabinoidů a komplexních extraktů v kombinaci s ionizujícím zářením na nádorovou linii HT-29.** Buňky byly ošetřeny fytokanabinoidmi případně jejich extrakty 24 h před vystavením ionizujícímu záření o intenzitě 6 Gy. Cytotoxický vliv spolupůsobení fytokanabinoidů a ionizujícího záření byl vyhodnocen 72 h po ozáření metodou krystalové violeti. Experimenty byly provedeny ve třech biologických opakováních.



**Obrázek 8: Studium vlivu fytokannabinoidů a komplexních extraktů v kombinaci s ionizujícím zářením na nádorovou linii MO59K.** Buňky byly ošetřeny fytokannabinoidmi případně jejich extrakty 24 h před vystavením ionizujícímu záření o intenzitě 6 Gy. Cytotoxický vliv spolupůsobení fytokannabinoidů a ionizujícího záření byl vyhodnocen 72 h po ozáření metodou krystalové violeti. Experimenty byly provedeny ve třech biologických opakováních.

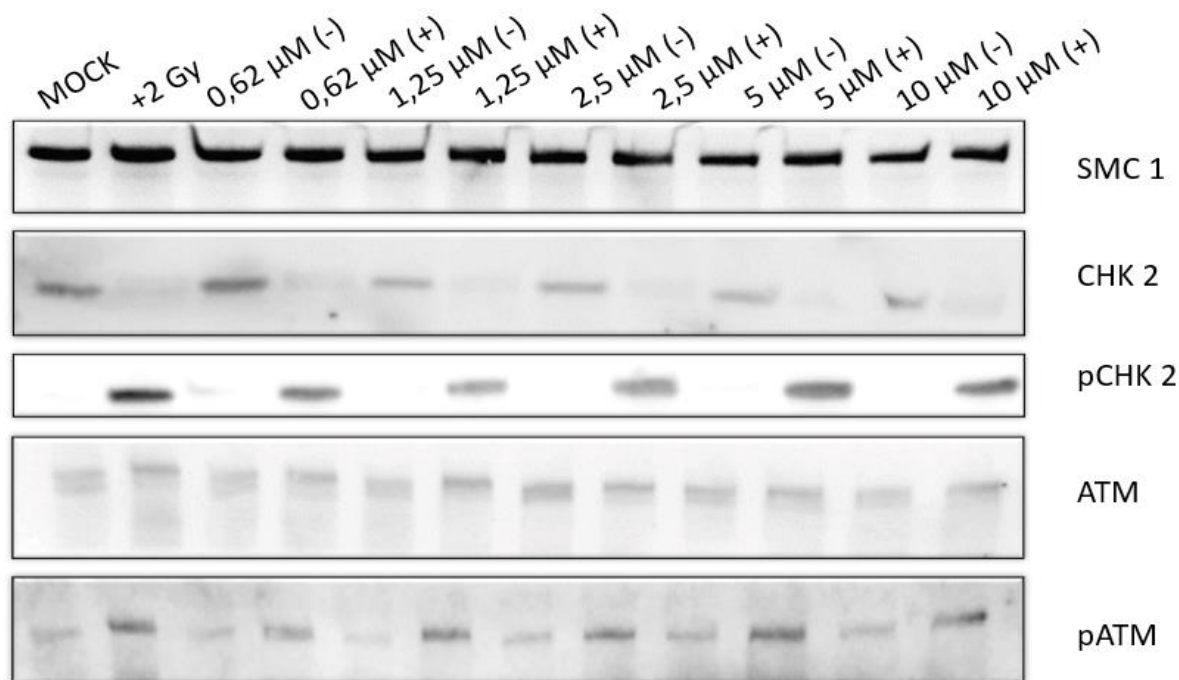


**Obrázek 9: Studium vlivu fytokanabinoidů a komplexních extraktů v kombinaci s ionizujícím zářením na nádorovou linii U-2-OS.** Buňky byly ošetřeny fytokanabinoidy nebo jejich extrakty 24 h před vystavením ionizujícímu záření o intenzitě 6 Gy. Cytotoxický vliv spolupůsobení fytokanabinoidů a ionizujícího záření byl vyhodnocen 72 h po ozáření metodou krystalové violeti. Experimenty byly provedeny ve třech biologických opakováních.

### **4.3 Studium vlivu fytokanabinoidů na schopnost buněčné odpovědi na poškození DNA**

Z předchozích experimentů studia cytotoxického účinku fytokanabinoidů samostatně případně v kombinaci s ionizujícím zářením metodou krystalové violeti byla pozorována mírně zvýšená viabilita buněčné linie HT-29 a MO59K při ošetření buněk nízkou koncentrací Extraktu 2 (Obr. č. 4A a 4B, Obr. č. 7, 8). Předpokládali jsme, že Extrakt 2 obsahující zejména CBD v koncentraci 5  $\mu\text{M}$  a nižší může naopak buněčnou linii chránit před vnějšími vlivy, a tím zlepšovat její životaschopnost. K ověření tohoto předpokladu byla provedena western blot analýza proteinů buněčné odpovědi na poškození DNA způsobeného ionizujícím zářením v buněčné linii HT-29. Buněčná linie HT-29 byla ošetřena Extraktem 2 v koncentracích (0.62–10  $\mu\text{M}$ ) a to 24 h před expozicí ionizujícímu záření o intenzitě 2 Gy. Aktivace proteinů buněčné odpovědi byla sledována po 1 h od ozáření.

ATM-Chk2 proteiny jsou součástí dráhy podílející se na opravě dvouvláknových zlomů DNA způsobených ionizujícím zářením (J. Smith et al., 2010). Zvýšená hladina fosforylované kinázy ATM, a stejně tak zvýšená fosforylace jejího cílového proteinu Chk2 v ozářených buňkách potvrzuje správnost provedení experimentu a aktivaci opravných drah DNA poškození (Obr. č. 7). Nicméně v buňkách ošetřených nižší koncentrací Extraktu 2 (0.6–2.5  $\mu\text{M}$ ) je vidět jen velmi mírné snížení aktivace ATM-Chk2 kináz po ozáření ve srovnání s kontrolními buňkami. Se zvyšující se koncentrací Extraktu 2 (5 a 10  $\mu\text{M}$ ) lze pozorovat pozvolný nárůst fosforylované formy ChK2 kinázy a předpokládat zvýšené poškození DNA se zahájením opravných mechanismů buňky.



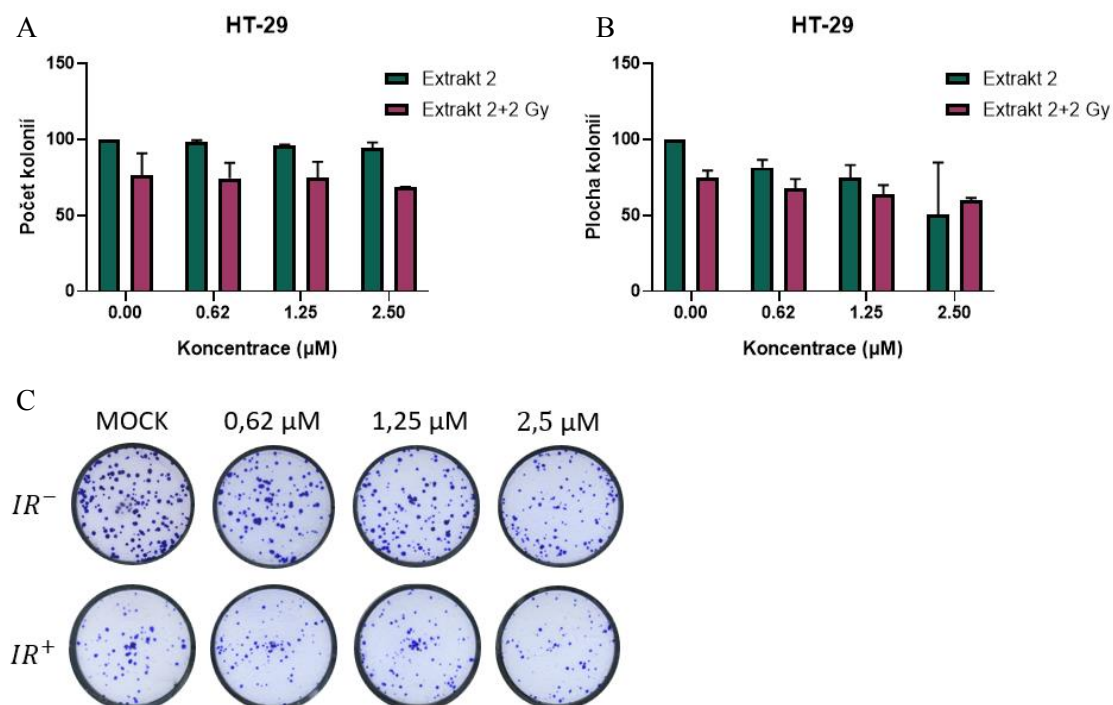
**Obrázek 10: Detekce proteinů buněčné odpovědi na ionizující záření v buněčné linii HT-29 pomocí western blot analýzy.** Buněčná linie byla ošetřena Extraktem 2 v koncentračním rozmezí (0,62-10  $\mu\text{M}$ ) a vystavena ionizujícímu záření o intenzitě 2 Gy. Detekce proteinů byla provedena 1h po ozáření.

#### 4.4 Studium vzájemného působení fytokanabinoidů a ionizujícího záření testem tvorby kolonií (CFA; colony forming assay)

Vzhledem k tomu, že western blot analýza neumožnila přesvědčivě ověřit, zda nižší koncentrace Extraktu 2 může mít protektivní účinek vůči ionizujícímu záření, rozhodli jsme se pro provedení testu tvorby kolonií. Tento test je založen na schopnosti buněčné linie tvořit kolonie po vystavení cytotoxickému působení látek případně ionizujícímu záření. Ve srovnání s metodou krystalové violeti se však jedná o metodu, která umožňuje sledovat dlouhodobý efekt spolupůsobení fytokanabinoidů a ionizujícího záření.

Buněčná linie HT-29 byla ošetřena Extraktem 2 v koncentracích (0,62-2,5  $\mu\text{M}$ ) a to 24 h před expozicí ionizujícímu záření o intenzitě 2 Gy. Po 7 dnech kultivace byl stanoven a porovnán počet a plocha kolonií v HT-29 linii vystavené působení pouze Extraktu 2 a jeho spolupůsobení s ionizujícím zářením. Získaná data nám pomohla vyvrátit předpoklad protektivního účinku Extraktu 2 vůči ionizujícímu záření. Z výsledků vyplývá, že samotné ozáření vede ke snížení počtu a velikosti kolonií a zvyšující se

koncentrace Extraktu 2 vede k snížení plochy kolonií, nikoliv k zvýšení proliferace (Obr. č. 11). Ani v tomto případě nebyl pozorován aditivní nebo synergický účinek cytotoxicity fytokanabinoidů s ionizujícím zářením.



**Obrázek 11: Spolupůsobení fytokanabinoidů a ionizujícího záření na HT-29 buněčné linii – test tvorby kolonií.** Buňky byly ošetřeny různými koncentracemi Extraktu 2 (0,62, 1,25, 2,5 μM) a ozářeny dávkou 2 Gy. Po 7 dnech kultivace byl vyhodnocen počet a plocha kolonií. A) Srovnání počtu kolonií v ozářených a neozářených buňkách. B) Srovnání velikosti kolonií v ozářených a neozářených buňkách. C) Vizuální znázornění počtu a velikosti kolonií po barvení krystalovou violetí.

## 5 DISKUZE

V této práci jsme se zaměřili na studium cytotoxického účinku fytoKANABINOIDŮ a komplexních extraktů na rakovinné buňky, a to, jak samotně, tak i v kombinaci s ionizujícím zářením. Naše výsledky potvrdily protinádorový účinek těchto látek na pozorované buněčné linie HT-29, MO59K a U-2-OS, což je v souladu s řadou již známých studií (McAllister et al., 2015; Velasco et al., 2007, 2016). Ukázalo se, že účinnost testovaných fytoKANABINOIDŮ je buněčně specifická. Na linii HT-29 a MO59K měl největší protinádorový účinek Extrakt 2, zatímco na linii U-2-OS to byl CBG.

Předpokládali jsme, že komplexní extrakty, které jsou obohaceny o řadu minoritních látek, jako jsou terpeny či flavonoidy budou vykazovat větší protinádorový účinek než standardní fytoKANABINOIDY samostatně. Tento předpoklad vycházel z řady studií potvrzujících protinádorové účinky flavonoidů a terpenů (Cheng et al., 2017; Hou et al., 2019; C. Li et al., 2019; Qiu et al., 2019). Avšak v našem případě nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v cytotoxickém účinku mezi standardy fytoKANABINOIDŮ a komplexními extrakty. Zároveň jsme testovali účinnost CBDA, tedy KANABINOIDU v jeho karboxylované formě. CBDA, jako majoritní složka Extraktu 1, vykazovala mnohem nižší protinádorový účinek na všech testovaných liniích oproti KANABINOIDŮM v dekarboxylované formě. Tento jev mohl být způsoben také tím, že CBDA vykazuje nižší afinitu k endokanabinoidním receptorům CB1 a CB2 než ostatní fytoKANABINOIDY (Bisogno et al., 2001; Takeda et al., 2012).

V současné literatuře lze najít práce, které vyzdvihují spolupůsobení cytotoxického účinku fytoKANABINOIDŮ společně s radioterapií. Zvýšená cytotoxicita je potvrzena především větší aktivací apoptózy při společném ošetření buněk a také sníženou schopností opravit poškozenou DNA (Alfonzetti et al., 2021; Scott et al., 2014). Na druhou stranu existují i práce, které tento synergický účinek vyvracejí (Naderi et al., 2020). Námi dosažené výsledky neprokázaly synergický ani aditivní cytotoxický účinek kombinace ionizujícího záření s fytoKANABINOIDY. Pozorovali jsme pouze účinek samotného ozáření, nicméně přidání fytoKANABINOIDŮ nezpůsobilo žádné další změny.

Pozorovali jsme, že použití nižší koncentrace Extraktu 2 (5  $\mu$ M) na buněčné linie HT-29 a především MO59K vede k mírnému zvýšení životaschopnosti buněk stanovené metodou krystalové violeti. Na základě toho jsme předpokládali, že by fytoKANABINOIDY v nižších koncentracích mohly vykazovat protektivní účinek na zmíněné buněčné linie.

V dalších částech práce jsme se tedy zaměřili na zkoumání účinků nižších koncentrací Extraktu 2, který obsahoval zejména CBD. Zajímala nás především schopnost aktivovat proteiny buněčné odpovědi na poškození DNA ionizujícím zářením, k čemuž jsme využili metodu western blottingu. Nicméně v buňkách ošetřených nižší koncentrací Extraktu 2 (0.6-2.5 $\mu$ M) je vidět jen velmi mírné snížení aktivace ATM-Chk2 kináz po ozáření ve srovnání s kontrolními buňkami. Získaná data by tedy mohla naznačovat, že nižší koncentrace Extraktu 2 má na buňky protektivní účinek před ozářením. Na druhou stranu western blot analýza byla provedena pouze v jednom opakování s ne příliš přesvědčivým výsledkem, a proto by bylo třeba experiment zopakovat. Vhodnější by bylo vyzkoušet také linii MO59K, kde lze pozorovat větší nárůst buněk po ošetření Extraktem 2 v koncentraci 5  $\mu$ M, a to i v ozářené linii (Obr. č. 5). Histon  $\gamma$ H2AX anebo 53BP1 protein jsou jedny z prvních proteinů putujících do místa poškození DNA a signalizujících dvouvláknové zlomy (Huang & Zhou, 2020). Průkaznějším experimentem by tedy mohla být detekce těchto proteinů v místě poškození DNA pomocí imunofluorescenční mikroskopie. Snížená/zvýšená detekce těchto proteinů by potvrdila/vyvrátila protektivní účinek nízké koncentrace Extraktu 2 vůči ionizujícímu záření.

Dalším experimentem vyvracejícím předpoklad protektivního účinku Extraktu 2 samostatně, ale i vůči ionizujícímu záření je test tvorby kolonií. Tímto testem lze sledovat především dlouhodobý efekt cytotoxického účinku fytokanabinoidů v kombinaci s ionizujícím zářením. Snížený počet kolonií lze pozorovat pouze v případě vystavení buněk ionizujícímu záření. Snížení velikosti plochy kolonií, a tedy i proliferace lze pozorovat již v nízkých koncentracích Extraktu 2. Spolupůsobení cytotoxického účinku Extraktu 2 a ionizujícího záření nebylo prokázáno.

## 6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo testování cytotoxického účinku fytoKANABINOIDŮ a komplexních extraktů, a ověření, zda spolupůsobení fytoKANABINOIDŮ a ionizujícího záření může vést k synergickému nebo aditivnímu protinádorovému účinku. Cytotoxický účinek byl ověřen na třech vybraných nádorových liniích, a to adenokarciomu tlustého střeva (HT-29), osteosarkomu (U-2-OS) a glioblastomu (MO59k).

Metodou krystalové violeti byla na testovaných liniích stanovena hodnota IC<sub>50</sub> pro standardní fytoKANABINOIDY a jejich směsi v extraktech *Cannabis Sativa* L. Bylo zjištěno, že protinádorový účinek fytoKANABINOIDŮ je buněčně specifický. Na linii HT-29 a MO59K měl největší protinádorový účinek Extrakt 2, který obsahoval především CBD. V případě linie U-2-OS měl nejvyšší účinnost CBG. FytoKANABINOIDY vykazovali nejvyšší účinek především ve své dekarboxylované formě. Nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi účinností standardního fytoKANABINOIDU a jeho výskytu v komplexním extraktu.

Synergický nebo aditivní cytotoxický účinek fytoKANABINOIDŮ a ionizujícího záření nebyl prokázán jak v krátkodobých experimentech metodou krystalové violeti, tak i při dlouhodobé kultivaci buněk testem tvorby kolonií (CFA).

## 7 LITERATURA

- Aizpurua-Olaizola, O., Soydaner, U., Öztürk, E., Schibano, D., Simsir, Y., Navarro, P., Etxebarria, N., & Usobiaga, A. (2016). Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of Cannabis sativa Plants from Different Chemotypes. *Journal of Natural Products*, 79(2), 324–331. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00949>
- Alfonzetti, T., Yasmin-Karim, S., Ngwa, W., & Avery, S. (2021). Phytoradiotherapy: An Integrative Approach to Cancer Treatment by Combining Radiotherapy With Phytomedicines. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.624663>
- Alterio, D., Marvaso, G., Ferrari, A., Volpe, S., Orecchia, R., & Jereczek-Fossa, B. A. (2019). Modern radiotherapy for head and neck cancer. *Seminars in oncology*, 46(3), 233–245. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2019.07.002>
- Andre, C. M., Hausman, J. F., & Guerriero, G. (2016). Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Frontiers in plant science*, 7, 19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019>
- Anizan, S., Milman, G., Desrosiers, N., Barnes, A. J., Gorelick, D. A., & Huestis, M. A. (2013). Oral fluid cannabinoid concentrations following controlled smoked cannabis in chronic frequent and occasional smokers. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(26), 8451–8461. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7291-5>
- Aparicio, T., Baer, R., & Gautier, J. (2014). DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA Repair*, 19, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.014>
- Aviello, G., Romano, B., Borrelli, F., Capasso, R., Gallo, L., Piscitelli, F., Di Marzo, V., & Izzo, A. A. (2012). Chemopreventive effect of the non-psychotropic phytocannabinoid cannabidiol on experimental colon cancer. *Journal of Molecular Medicine*, 90(8), 925–934. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0856-x>
- Baram, L., Peled, E., Berman, P., Yellin, B., Besser, E., Benami, M., Louria-Hayon, I., Lewitus, G. M., & Meiri, D. (2019). The heterogeneity and complexity of Cannabis extracts as antitumor agents. *Oncotarget*, 10(41), 4091–4106. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26983>
- Biau, J., Chautard, E., Verrelle, P., & Dutreix, M. (2019). Altering DNA Repair to Improve Radiation Therapy: Specific and Multiple Pathway Targeting. *Frontiers in oncology*, 9, 1009. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01009>
- Bisogno, T., Hanus, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D. E., Brandi, I., Moriello, A. S., Davis, J. B., Mechoulam, R., & Di Marzo, V. (2001). Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *British journal of pharmacology*, 134(4), 845–852. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704327>
- Blackford, A. N., & Stucki, M. (2020). How Cells Respond to DNA Breaks in Mitosis. *Trends in biochemical sciences*, 45(4), 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.12.010>
- Blázquez, C., Salazar, M., Carracedo, A., Lorente, M., Egia, A., González-Feria, L., Haro, A., Velasco, G., & Guzmán, M. (2008). Cannabinoids inhibit glioma cell invasion by down-regulating matrix metalloproteinase-2 expression. *Cancer Research*, 68(6), 1945–1952. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5176>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2014.08.005>
- Cerretani, D., Collodel, G., Brizzi, A., Fiaschi, A. I., Menchiari, A., Moretti, E., Moltoni, L., & Micheli, L. (2020). Cytotoxic effects of cannabinoids on human ht-29 colorectal

- adenocarcinoma cells: Different mechanisms of THC, CBD, and CB83. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms21155533>
- Chang, X., Li, H., Li, Y., He, Q., Yao, J., Duan, T., & Wang, K. (2018). RhoA/MLC signaling pathway is involved in  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-impaired placental angiogenesis. *Toxicology Letters*, 285, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.12.031>
- Chen, H., Lisby, M., & Symington, L. S. (2013). RPA Coordinates DNA End Resection and Prevents Formation of DNA Hairpins. *Molecular Cell*, 50(4), 589–600. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.04.032>
- Cheng, Y., Dai, C., & Zhang, J. (2017). SIRT3-SOD2-ROS pathway is involved in linalool-induced glioma cell apoptotic death. *Acta Biochimica Polonica*, 64(2), 343–350. [https://doi.org/10.18388/abp.2016\\_1438](https://doi.org/10.18388/abp.2016_1438)
- Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell*, 40(2), 179–204. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>
- Emboden W. A. (1981). Marijuana Botany. An Advanced Study: The Propagation and Breeding of Distinctive Cannabis. *Journal of psychoactive drugs*, 13(4), 395. <https://doi.org/10.1080/02791072.1981.10471901>
- Emboden W. A. (1981). Marijuana Botany. An Advanced Study: The Propagation and Breeding of Distinctive Cannabis. *Journal of psychoactive drugs*, 13(4), 395. <https://doi.org/10.1080/02791072.1981.10471901>
- Costas-Insua, C., & Guzmán, M. (2023). Endocannabinoid signaling in glioma. *Glia*, 71(1), 127–138. <https://doi.org/10.1002/glia.24173>
- Dariš, B., Verboten, M. T., Knez, Ž., & Ferk, P. (2019a). Cannabinoids in cancer treatment: Therapeutic potential and legislation. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(1), 14–23. <https://doi.org/10.17305/BJBMS.2018.3532>
- Dariš, B., Verboten, M. T., Knez, Ž., & Ferk, P. (2019b). Cannabinoids in cancer treatment: Therapeutic potential and legislation. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(1), 14–23. <https://doi.org/10.17305/BJBMS.2018.3532>
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., & Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5090), 1946–1949. <https://doi.org/10.1126/science.1470919>
- De Lorenzo, S. B., Patel, A. G., Hurley, R. M., & Kaufmann, S. H. (2013). The Elephant and the Blind Men: Making Sense of PARP Inhibitors in Homologous Recombination Deficient Tumor Cells. *Frontiers in oncology*, 3, 228. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00228>
- de Massy B. (2013). Initiation of meiotic recombination: how and where? Conservation and specificities among eukaryotes. *Annual review of genetics*, 47, 563–599. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155423>
- Deng, S. K., Gibb, B., De Almeida, M. J., Greene, E. C., & Symington, L. S. (2014). RPA antagonizes microhomology-mediated repair of DNA double-strand breaks. *Nature Structural and Molecular Biology*, 21(4), 405–412. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2786>
- Dong, W., Liang, J., Barnett, I., Kline, P. C., Altman, E., & Zhang, M. (2019). The classification of Cannabis hemp cultivars by thermal desorption direct analysis in real time mass spectrometry (TD-DART-MS) with chemometrics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(30), 8133–8142. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02200-7>

- Dumitru, C. A., Sandalcioğlu, I. E., & Karsak, M. (2018). Cannabinoids in Glioblastoma Therapy: New Applications for Old Drugs. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 159. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00159>
- Xu, F., Sun, G., Peng, Z., Liu, J., Li, Z., & Yan, J. (2022). Cannabidiol promotes apoptosis of osteosarcoma cells in vitro and in vivo by activating the SP1-CBX2 axis. *American journal of translational research*, 14(2), 1188–1203.
- Farag, S., & Kayser, O. (2017). The Cannabis Plant: Botanical Aspects. In *Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment*, Elsevier Inc, 3–12. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00001-6>
- Fišar Zdeněk. (2005). Fytokannabinoidy. *Chemické Listy*, 100, 233–242.
- Galve-Roperh, I., Sánchez, C., Cortés, M. L., Gómez del Pulgar, T., Izquierdo, M., & Guzmán, M. (2000). Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nature medicine*, 6(3), 313–319. <https://doi.org/10.1038/73171>
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 221(1), 3–12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>
- Gnügge, R., & Symington, L. S. (2021). DNA end resection during homologous recombination. *Current opinion in genetics & development*, 71, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2021.07.004>
- González-Herranz, P., Burgos-Flores, J., Ocete-Guzmán, J. G., López-Mondejar, J. A., & Amaya, S. (1995). The management of limb-length discrepancies in children after treatment of osteosarcoma and Ewing's sarcoma. *Journal of pediatric orthopedics*, 15(5), 561–565. <https://doi.org/10.1097/01241398-199509000-00002>
- Granados-Romero, J. J., Valderrama-Treviño, A. I., Contreras-Flores, E. H., Barrera-Mera, B., Herrera Enríquez, M., Uriarte-Ruiz, K., Ceballos-Villalba, J. C., Estrada-Mata, A. G., Alvarado Rodríguez, C., & Arauz-Peña, G. (2017). Colorectal cancer: a review. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 5(11), 4667. <https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20174914>
- Grinspoon L, & Bakalar J. (1993). *Marihuana: The Forbidden Medicine*.
- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353–364. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80108-7)
- Hart, S., Fischer, O. M., & Ullrich, A. (2004). Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer research*, 64(6), 1943–1950. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-3720>
- Hohmann, T., Feese, K., Greither, T., Ghadban, C., Jäger, V., Dehghani, F., & Grabiec, U. (2019). Synthetic Cannabinoids Influence the Invasion of Glioblastoma Cell Lines in a Cell- and Receptor-Dependent Manner. *Cancers*, 11(2), 161. <https://doi.org/10.3390/cancers11020161>
- Hosami, F., Ghadimkhah, M. H., Salimi, V., Ghorbanhosseini, S. S., & Tavakoli-Yaraki, M. (2021). The strengths and limits of cannabinoids and their receptors in cancer: Insights into the role of tumorigenesis-underlying mechanisms and therapeutic aspects. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 144, 112279. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112279>
- Hou, J., Zhang, Y., Zhu, Y., Zhou, B., Ren, C., Liang, S., & Guo, Y. (2019). A-Pinene induces apoptotic cell death via caspase activation in human ovarian cancer cells. *Medical Science Monitor*, 25, 6631–6638. <https://doi.org/10.12659/MSM.916419>

- 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. <https://doi.org/10.1124/pr.54.2.161>
- Huang, R. X., & Zhou, P. K. (2020). DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 60. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0150-x>
- Ivanov, V. N., Wu, J., & Hei, T. K. (2017). Regulation of human glioblastoma cell death by combined treatment of cannabidiol,  $\gamma$ -radiation and small molecule inhibitors of cell signaling pathways. *Oncotarget*, 8(43), 74068–74095. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18240>
- Kobayashi, J., Iwabuchi, K., Miyagawa, K., Sonoda, E., Suzuki, K., Takata, M., & Tauchi, H. (2008). Current topics in DNA double-strand break repair. *Journal of radiation research*, 49(2), 93–103. <https://doi.org/10.1269/jrr.07130>
- Kouranti, I., & Peyroche, A. (2012). Protein degradation in DNA damage response. *Seminars in cell & developmental biology*, 23(5), 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.02.004>
- Ladin, D. A., Soliman, E., Griffin, L., & Van Dross, R. (2016). Preclinical and Clinical Assessment of Cannabinoids as Anti-Cancer Agents. *Frontiers in pharmacology*, 7, 361. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00361>
- Li, C., Wang, Q., Shen, S., Wei, X., & Li, G. (2019). HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling-mediated epithelial–mesenchymal transition and angiogenesis is critically involved in anti-metastasis effect of luteolin in melanoma cells. *Phytotherapy Research*, 33(3), 798–807. <https://doi.org/10.1002/ptr.6273>
- Li, J., Jiang, W., Shan, W., Luo, A., Qu, G., Zhang, J., Luo, X., & Xia, J. (2023). The synergistic anticancer effect of CBD and DOX in osteosarcoma. *Clinical and Translational Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s12094-023-03119-3>
- Li, T., Kang, G., Wang, T., & Huang, H. (2018). Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer. *Oncology letters*, 16(1), 687–702. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8733>
- Ligresti, A., Moriello, A. S., Starowicz, K., Matias, I., Pisanti, S., De Petrocellis, L., Laezza, C., Portella, G., Bifulco, M., & Di Marzo, V. (2006). Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 318(3), 1375–1387. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.105247>
- Lodovichi, S., Bellè, F., Cervelli, T., Lorenzoni, A., Maresca, L., Cozzani, C., Caligo, M. A., & Galli, A. (2020). Effect of BRCA1 missense variants on gene reversion in DNA double-strand break repair mutants and cell cycle-Arrested cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutagenesis*, 35(2), 189–195. <https://doi.org/10.1093/mutage/gez043>
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathologica*, 131(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Malhotra, P., Casari, I., & Falasca, M. (2021). Therapeutic potential of cannabinoids in combination cancer therapy. *Advances in Biological Regulation*, 79. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2020.100774>
- Marcu, J. P., Christian, R. T., Lau, D., Zielinski, A. J., Horowitz, M. P., Lee, J., Pakdel, A., Allison, J., Limbad, C., Moore, D. H., Yount, G. L., Desprez, P. Y., & McAllister, S. D. (2010). Cannabidiol enhances the inhibitory effects of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol on human glioblastoma cell proliferation and survival. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(1), 180–189. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0407>

- 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. <https://doi.org/10.1038/346561a0>
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K., & Elledge, S. J. (2000). Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(19), 10389–10394. <https://doi.org/10.1073/pnas.190030497>
- McAllister, S. D., Soroceanu, L., & Desprez, P. Y. (2015). The Antitumor Activity of Plant-Derived Non-Psychoactive Cannabinoids. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 10(2), 255–267. <https://doi.org/10.1007/s11481-015-9608-y>
- McPartland, J. M., Glass, M., & Pertwee, R. G. (2007). Meta-analysis of cannabinoid ligand binding affinity and receptor distribution: interspecies differences. *British journal of pharmacology*, 152(5), 583–593. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707399>
- Mechoulam, R. (Ed.). (1986). *Cannabinoids As Therapeutic Agents* (1st ed.). Chapman and Hall/CRC. <https://doi.org/10.1201/9780429260667>
- Messerschmitt, P. J., Garcia, R. M., Abdul-Karim, F. W., Greenfield, E. M., & Getty, P. J. (2009). Osteosarcoma. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 17(8), 515–527. <https://doi.org/10.5435/00124635-200908000-00005>
- Meyer C., ed. sc., 2023, Dictionnaire des Sciences Animales. URL : <http://dico-sciences-animales.cirad.fr/> (13.1.2023)
- Mondini, M., Levy, A., Meziani, L., Milliat, F., & Deutsch, E. (2020). Radiotherapy-immunotherapy combinations - perspectives and challenges. *Molecular oncology*, 14(7), 1529–1537. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12658>
- Moreno, E., Andradas, C., Medrano, M., Caffarel, M. M., Pérez-Gómez, E., Blasco-Benito, S., Gómez-Cañás, M., Pazos, M. R., Irving, A. J., Lluís, C., Canela, E. I., Fernández-Ruiz, J., Guzmán, M., McCormick, P. J., & Sánchez, C. (2014). Targeting CB2-GPR55 receptor heteromers modulates cancer cell signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 289(32), 21960–21972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.561761>
- Moynahan, M. E., & Jasin, M. (2010). Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(3), 196–207. <https://doi.org/10.1038/nrm2851>
- Nabissi, M., Morelli, M. B., Amantini, C., Liberati, S., Santoni, M., Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., & Santoni, G. (2015). Cannabidiol stimulates AML-1a-dependent glial differentiation and inhibits glioma stem-like cells proliferation by inducing autophagy in a TRPV2-dependent manner. *International Journal of Cancer*, 137(8), 1855–1869. <https://doi.org/10.1002/ijc.29573>
- Nabissi, M., Morelli, M. B., Santoni, M., & Santoni, G. (2013). Triggering of the TRPV2 channel by cannabidiol sensitizes glioblastoma cells to cytotoxic chemotherapeutic agents. *Carcinogenesis*, 34(1), 48–57. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs328>
- Nabissi, M., Morelli, M. B., Santoni, M., Santoni, G., & Amantini, C. (2016). Cannabichromene inhibits human glioma cell invasion and stimulates autophagy. *Onkotarget*, 7(12), 1–13.
- Nachnani, R., Raup-Konsavage, W. M., & Vrana, K. E. (2021). The Pharmacological Case for Cannabigerol. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 376(2), 204–212. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000340>
- Naderi, J., Dana, N., Javanmard, S. H., Amooheidari, A., Yahay, M., & Vaseghi, G. (2020). Effects of standardized Cannabis sativa extract and ionizing radiation in melanoma cells in vitro.

*Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 16(6), 1495–1499.  
[https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT\\_1394\\_16](https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_1394_16)

- Navarro, G., Varani, K., Reyes-Resina, I., Sánchez de Medina, V., Rivas-Santisteban, R., Sánchez-Carnerero Callado, C., Vincenzi, F., Casano, S., Ferreiro-Vera, C., Canela, E. I., Borea, P. A., Nadal, X., & Franco, R. (2018). Cannabigerol Action at Cannabinoid CB1 and CB2 Receptors and at CB1-CB2 Heteroreceptor Complexes. *Frontiers in pharmacology*, 9, 632.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00632>
- Niu, F., Zhao, S., Xu, C. Y., Sha, H., Bi, G. Bin, Chen, L., Ye, L., Gong, P., & Nie, T. H. (2015). Potentiation of the antitumor activity of adriamycin against osteosarcoma by cannabinoid WIN-55,212-2. *Oncology Letters*, 10(4), 2415–2421. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3525>
- Nogueira, A., Fernandes, M., Catarino, R., & Medeiros, R. (2019). RAD52 Functions in Homologous Recombination and Its Importance on Genomic Integrity Maintenance and Cancer Therapy. *Cancers*, 11(11), 1622. <https://doi.org/10.3390/cancers11111622>
- Olivares-Urbano, M. A., Griñán-Lisón, C., Marchal, J. A., & Núñez, M. I. (2020). CSC Radioresistance: A Therapeutic Challenge to Improve Radiotherapy Effectiveness in Cancer. *Cells*, 9(7), 1651. <https://doi.org/10.3390/cells9071651>
- Orrego-González, E., Londoño-Tobón, L., Ardila-González, J., Polania-Tovar, D., Valencia-Cárdenas, A., & Velez-Van Meerbeke, A. (2020). Cannabinoid Effects on Experimental Colorectal Cancer Models Reduce Aberrant Crypt Foci (ACF) and Tumor Volume: A Systematic Review. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2020, 2371527. <https://doi.org/10.1155/2020/2371527>
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2015). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-oncology*, 17(4), iv1–iv62. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov189>
- Ou, Y.-H., Chung, P.-H., Sun, T.-P., & Shieh, S.-Y. (2005). p53 C-Terminal Phosphorylation by CHK1 and CHK2 Participates in the Regulation of DNA-Damage-induced C-Terminal Acetylation. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 1684–1695. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04>
- Pertwee, R. G. (2008). The diverse CB 1 and CB 2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids:  $\Delta$  9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and  $\Delta$  9-tetrahydrocannabivarin. In *British Journal of Pharmacology*, 153 (2), 199–215. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707442>
- Qiu, J. G., Wang, L., Liu, W. J., Wang, J. F., Zhao, E. J., Zhou, F. M., Ji, X. B., Wang, L. H., Xia, Z. K., Wang, W., Chia-Mi Lin, M., Liu, L. Z., Huang, Y. X., & Jiang, B. H. (2019). Apigenin inhibits IL-6 transcription and suppresses esophageal carcinogenesis. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01002>
- Ranjha, L., Howard, S. M., & Cejka, P. (2018). Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. *Chromosoma*, 127(2), 187–214. <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0658-1>
- Rice, W., Shannon, J. M., Burton, F., & Fiedeldey, D. (1997). Expression of a brain-type cannabinoid receptor (CB1) in alveolar Type II cells in the lung: regulation by hydrocortisone. *European journal of pharmacology*, 327(2-3), 227–232. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(97\)89665-3](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(97)89665-3)
- Robson P. (2005). Human studies of cannabinoids and medicinal cannabis. *Handbook of experimental pharmacology*, (168), 719–756. [https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2\\_25](https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_25)
- Rodríguez de Fonseca, F., Del Arco, I., Bermudez-Silva, F. J., Bilbao, A., Cippitelli, A., & Navarro, M. (2005). The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 40(1), 2–14. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agh110>

- Romano, B., Borrelli, F., Pagano, E., Cascio, M. G., Pertwee, R. G., & Izzo, A. A. (2014). Inhibition of colon carcinogenesis by a standardized Cannabis sativa extract with high content of cannabidiol. *Phytomedicine*, 21(5), 631–639. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.11.006>
- Russo, E., & Guy, G. W. (2006). A tale of two cannabinoids: The therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Medical Hypotheses*, 66(2), 234–246. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.08.026>
- Salazar, M., Carracedo, A., Salanueva, Í. J., Hernández-Tiedra, S., Lorente, M., Egia, A., Vázquez, P., Blázquez, C., Torres, S., García, S., Nowak, J., Fimia, G. M., Piacentini, M., Cecconi, F., Pandolfi, P. P., González-Feria, L., Iovanna, J. L., Guzmán, M., Boya, P., & Velasco, G. (2009). Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *Journal of Clinical Investigation*, 119(5), 1359–1372. <https://doi.org/10.1172/JCI37948>
- Sánchez, C., de Ceballos, M. L., Gomez del Pulgar, T., Rueda, D., Corbacho, C., Velasco, G., Galve-Roperh, I., Huffman, J. W., Ramón y Cajal, S., & Guzmán, M. (2001). Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer research*, 61(15), 5784–5789.
- Schatz, A. R., Lee, M., Condie, R. B., Pulaski, J. T., & Kaminski, N. E. (1997). Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicology and applied pharmacology*, 142(2), 278–287. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.8034>
- Schuch, A. P., Garcia, C. C., Makita, K., & Menck, C. F. (2013). DNA damage as a biological sensor for environmental sunlight. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 12(8), 1259–1272. <https://doi.org/10.1039/c3pp00004d>
- Scott, K. A., Dalgleish, A. G., & Liu, W. M. (2014). The combination of cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol enhances the anticancer effects of radiation in an orthotopic murine glioma model. *Molecular cancer therapeutics*, 13(12), 2955–2967. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0402>
- Shen, J., & Tower, J. (2009). Programmed cell death and apoptosis in aging and life span regulation. *Discovery medicine*, 8(43), 223–226.
- Smith, H. L., Southgate, H., Tweddle, D. A., & Curtin, N. J. (2020). DNA damage checkpoint kinases in cancer. *Expert reviews in molecular medicine*, 22 (2). <https://doi.org/10.1017/erm.2020.3>
- Smith, J., Tho, L. M., Xu, N., & Gillespie, D. A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advances in cancer research*, 108, 73–112. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380888-2.00003-0>
- Solinas, M., Massi, P., Cantelmo, A. R., Cattaneo, M. G., Cammarota, R., Bartolini, D., Cinquina, V., Valenti, M., Vicentini, L. M., Noonan, D. M., Albin, A., & Parolaro, D. (2012). Cannabidiol inhibits angiogenesis by multiple mechanisms. *British Journal of Pharmacology*, 167(6), 1218–1231. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02050.x>
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., & Waku, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and biophysical research communications*, 215(1), 89–97. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2437>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide

- for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Takeda, S., Okajima, S., Miyoshi, H., Yoshida, K., Okamoto, Y., Okada, T., Amamoto, T., Watanabe, K., Omiecinski, C. J., & Aramaki, H. (2012). Cannabidiolic acid, a major cannabinoid in fiber-type cannabis, is an inhibitor of MDA-MB-231 breast cancer cell migration. *Toxicology Letters*, 214(3), 314–319. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.08.029>
- Tauchi, H., Kobayashii, J., Morishima, K. I., Matsuura, S., Nakamura, A., Shiraishi, T., Ito, E., Masnada, D., Delia, D., & Komatsu, K. (2001). The forkhead-associated domain of NBS1 is essential for nuclear foci formation after irradiation but not essential for hRAD50·hMRE11·-NBS1 complex DNA repair activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(1), 12–15. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000578200>
- Thomas, A., Baillie, G. L., Phillips, A. M., Razdan, R. K., Ross, R. A., & Pertwee, R. G. (2007). Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB 1 and CB 2 receptor agonists in vitro. *British Journal of Pharmacology*, 150(5), 613–623. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707133>
- Torres, S., Lorente, M., Rodríguez-Fornés, F., Hernández-Tiedra, S., Salazar, M., García-Taboada, E., Barcia, J., Guzmán, M., & Velasco, G. (2011). A combined preclinical therapy of cannabinoids and temozolomide against glioma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(1), 90–103. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0688>
- Velasco, G., Carracedo, A., Blázquez, C., Lorente, M., Aguado, T., Haro, A., Sánchez, C., Galve-Roperh, I., & Guzmán, M. (2007). Cannabinoids and gliomas. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 36, Issue 1, pp. 60–67). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12035-007-0002-5>
- Velasco, G., Carracedo, A., Blázquez, C., Lorente, M., Aguado, T., Haro, A., Sánchez, C., Galve-Roperh, I., & Guzmán, M. (2007). Cannabinoids and gliomas. *Molecular neurobiology*, 36(1), 60–67. <https://doi.org/10.1007/s12035-007-0002-5>
- Vyhláška č. 235/2022 Sb. (2022) o pěstování a zpracování rostlin konopí pro léčebné použití. ISSN 1211-1244
- Weber, A. M., & Ryan, A. J. (2015). ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacology & therapeutics*, 149, 124–138. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.12.001>
- Whynot, E. G., Tomko, A. M., & Dupré, D. J. (2023). Anticancer properties of cannabidiol and Δ9-tetrahydrocannabinol and synergistic effects with gemcitabine and cisplatin in bladder cancer cell lines. *Journal of Cannabis Research*, 5(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s42238-023-00174-z>
- Yang, Y., Vyawahare, R., Lewis-Bakker, M., Clarke, H. A., Wong, A. H. C., & Kotra, L. P. (2020). Bioactive Chemical Composition of Cannabis Extracts and Cannabinoid Receptors. *Molecules*, 25(15), 3466. <https://doi.org/10.3390/molecules25153466>
- Yasmin-Karim, S., Moreau, M., Mueller, R., Sinha, N., Dabney, R., Herman, A., & Ngwa, W. (2018). Enhancing the Therapeutic Efficacy of Cancer Treatment With Cannabinoids. *Frontiers in oncology*, 8, 114. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00114>
- Zhang, J., & Powell, S. N. (2005). The role of the BRCA1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair. *Molecular cancer research*, 3(10), 531–539. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0192>
- Zhao, X., Wu, Q., Gong, X., Liu, J., & Ma, Y. (2021). Osteosarcoma: a review of current and future therapeutic approaches. *Biomedical engineering online*, 20(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s12938-021-00860-0>
- Zhu, L. X., Sharma, S., Stolina, M., Gardner, B., Roth, M. D., Tashkin, D. P., & Dubinett, S. M. (2000). Δ-9-Tetrahydrocannabinol Inhibits Antitumor Immunity by a CB2 Receptor-Mediated,

Cytokine-Dependent Pathway. *The Journal of Immunology*, 165(1), 373–380.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.1.373>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|          |                                                       |
|----------|-------------------------------------------------------|
| 2-AG     | 2-arachidonoylglycerol                                |
| 53BP1    | p53 vázající protein                                  |
| APS      | amonium persulfát                                     |
| ATM      | ataxia-telangiektazie mutovaná kináza                 |
| BAX      | protein asociovaný s Bcl-2, typ X                     |
| BRCA1    | gen pro rakovinu prsu 1                               |
| BSA      | bovinní sérový albumin                                |
| CB1      | kanabinoidní receptor 1                               |
| CB2      | kanabinoidní receptor 2                               |
| CBCA     | kyselina kanabichromenová                             |
| CBD      | kanabidiol                                            |
| CBDA     | kyselina kanabidiolová                                |
| CBG      | kanabigerol                                           |
| CBGA     | kyselina kanabigerolová                               |
| CBN      | kanabinol                                             |
| CBX2     | homolog chromoboxového proteinu 2                     |
| Cdc25A   | fosfatáza 25A buněčného cyklu                         |
| Cdc25C   | fosfatáza 25C buněčného cyklu                         |
| CFA      | test tvorby kolonií                                   |
| DMEM     | Dulbecco modifikované Eagleové médium                 |
| DMSO     | dimethylsulfoxid                                      |
| DNA-PKcs | katalytická podjednotka DNA-dependentní proteinkinázy |

|               |                                                  |
|---------------|--------------------------------------------------|
| DSB           | dvouvláknový zlom                                |
| ECS           | endokanabinoidní systém                          |
| eIF2 $\alpha$ | eukaryotický iniciační faktor 2 $\alpha$         |
| ET-1          | endotelin-1                                      |
| FBS           | fetální bovinní sérum                            |
| HR            | homologní rekombinace                            |
| Chk2          | kontrolní kináza 2                               |
| pChk2         | fosforilovaná forma kontrolní kinázy 2           |
| IR            | ionizující záření                                |
| LIG4          | DNA ligáza 4                                     |
| MMP9          | matrix metalloproteináza 9                       |
| NHEJ          | nehomologní spojování konců                      |
| p-AKT         | fosforylovaná proteinová kináza B                |
| PARP          | Poly(ADP-ribóza) polymeráza                      |
| PBS           | fosfátový pufr                                   |
| PPAR          | receptor aktivovaný peroxisomovým proliferátorem |
| RAD51         | protein opravující DNA                           |
| RPA           | replikační protein A                             |
| SDS           | dodecylsulfát sodný                              |
| SMC1          | strukturální údržba chromozomů 1                 |
| SSB           | jednovláknový zlom                               |
| ssDNA         | jednovláknová DNA                                |
| TEMED         | N,N,N',N'-tetramethylethylenediaminu             |
| THC           | $\Delta$ -9-tetrahydrokanabinol                  |

|               |                                                    |
|---------------|----------------------------------------------------|
| THCA          | kyselina tetrahydrokanabinolová                    |
| TIMP1         | tkáňový inhibitor metaloproteináz-1                |
| TRPV          | přechodný receptorový potenciální kationtový kanál |
| VEGF          | vaskulární endotelový růstový faktor               |
| WB            | western blot                                       |
| XRCC4         | protein spojující konec chromozomu 4               |
| $\gamma$ H2AX | fosforylovaná forma histonu H2AX                   |