

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS  
FARMACIJOS FAKULTETAS  
ANALIZINĖS IR TOKSIKOLOGINĖS CHEMIJOS KATEDRA

KAROLINA MICKUTĖ

**PLUOŠTINIŲ KANAPIŲ (*CANNABIS SATIVA* L.) EKSTRAKTO  
ANTIOKSIDACINIO AKTYVUMO ĮVERTINIMAS  
LABORATORINIŲ PELIŲ KRAUJYJE IR ORGANUOSE**

**Magistro baigiamasis darbas**

**Darbo vadovas**

Doc. dr. Asta Kubilienė

**Konsultantas**

Prof. dr. Ilona Sadauskienė

KAUNAS, 2019

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS  
FARMACIJOS FAKULTETAS  
ANALIZINĖS IR TOKSIKOLOGINĖS CHEMIJOS KATEDRA

**TVIRTINU:**

Farmacijos fakulteto dekanė prof. dr. Ramunė Morkūnienė

Data

**PLUOŠTINIŲ KANAPIŲ (*CANNABIS SATIVA* L.) EKSTRAKTO  
ANTIOKSIDACINIO AKTYVUMO ĮVERTINIMAS  
LABORATORINIŲ PELIŲ KRAUJYJE IR ORGANUOSE**

**Magistro baigiamasis darbas**

Konsultantas

Prof. dr. Ilona Sadauskienė

Data

Darbo vadovas

Doc. dr. Asta Kubilienė

Data

Recenzentas

Data

Darbą atliko

Magistrantė

Karolina Mickutė

Data

KAUNAS, 2019

## TURINYS

SANTRAUKA .....	5
SUMMARY .....	6
PADĖKA.....	7
SANTRUMPOS.....	8
ĮVADAS.....	9
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	11
1.1. Kanapių ( <i>Cannabis</i> L.) paplitimas ir morfologiniai požymiai .....	11
1.2. Cheminė <i>Cannabis sativa</i> L. sudėtis .....	12
1.3. Kanabidiolis – farmakologinės bei fizikocheminės savybės.....	14
1.4. Nekanabinoidiniai fenoliniai junginiai - farmakologinės bei fizikocheminės savybės.....	14
1.5. Laisvieji radikalai, jų susidarymo šaltiniai ir vaidmuo ląstelėje .....	15
1.6. Oksidacinis stresas ir jo biologinis vaidmuo .....	16
1.7. Antioksidacinė ląstelės sistema ir jos mechanizmas .....	17
1.8. Katalazės vaidmuo antioksidacinėje sistemoje.....	18
1.9. Redukuoto glutationo vaidmuo antioksidacinėje sistemoje .....	18
1.10. Aliuminis ir jo sukeltos pažeidimai.....	19
1.11. Etanolis ir jo sukeltos pažeidimai.....	20
2. TYRIMO METODIKA .....	21
2.1. Tyrimo objektas .....	21
2.2. Tyrimo metu naudoti reagentai.....	21
2.3. Tyrimo metu naudota aparatūra.....	22
2.4. <i>Cannabis sativa</i> L. žaliavos kokybinis įvertinimas .....	22
2.5. <i>Cannabis sativa</i> L. ekstraktų paruošimas .....	23
2.6. Kanabidiolio kokybinis ir kiekybinis įvertinimas dujų chromatografijos metodu.....	23
2.7. Bendro fenolinių junginių kiekio <i>Cannabis sativa</i> L. ekstrakto nustatymas.....	25
2.8. Tyrimo su laboratorinėmis pelėmis modelis .....	26
2.9. Kraujo, smegenų ir kepenų mėginių paruošimas.....	26
2.10. Redukuoto glutationo koncentracijos nustatymas pelių kraujyje .....	27
2.11. Malondialdehido koncentracijos nustatymas pelių smegenyse ir kepenyse.....	27
2.12. Katalazės aktyvumo nustatymas pelių smegenyse ir kepenyse.....	28
2.13. Statistinė duomenų analizė .....	28
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	29

3.1. <i>Cannabis sativa</i> L. žaliavos kokybinis įvertinimas .....	29
3.2. Kanabidiolio identifikavimas <i>Cannabis sativa</i> L. ekstraktuose .....	29
3.3. Kanabidiolio ir bendro fenolinių junginių kiekio įvairavimo nustatymas <i>Cannabis sativa</i> L. ekstraktuose .....	29
3.4. <i>Cannabis sativa</i> L. poveikis redukuoto glutationo koncentracijai pelių kraujyje .....	31
3.5. <i>Cannabis sativa</i> L. ekstrakto poveikis malondialdehido koncentracijai pelių smegenyse.....	32
3.6. <i>Cannabis sativa</i> L. ekstrakto poveikis malondialdehido koncentracijai pelių kepenyse .....	33
3.7. <i>Cannabis sativa</i> L. ekstrakto poveikis katalazės aktyvumui pelių smegenyse .....	35
3.8. <i>Cannabis sativa</i> L. ekstrakto poveikis katalazės aktyvumui pelių kepenyse .....	37
4. IŠVADOS.....	39
5. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS.....	40
6. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	41
7. MAGISTRO DARBO TEMA SKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS .....	46
8. PRIEDAI.....	47

## SANTRAUKA

K. Mickutės magistro baigiamasis darbas „Pluoštinių kanapių (*Cannabis sativa* L.) ekstrakto antioksidacinio aktyvumo įvertinimas laboratorinių pelių kraujyje ir organuose“. Mokslinė vadovė doc. dr. A. Kubilienė; Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Farmacijos fakulteto Analizinės ir toksikologinės chemijos katedra. Kaunas, 2019.

**Darbo tikslas** - įvertinti pluoštinių kanapių (*Cannabis sativa* L.) etanolinio ekstrakto antioksidacinį poveikį pelių, kraujyje ir organuose

**Darbo uždaviniai:** parinkus tinkamiausias pluoštinių kanapių ekstrakcijos sąlygas įvertinti kanabidiolio ir bendrą fenolinių junginių kiekį; įvertinti *Cannabis sativa* L. ekstrakto poveikį redukuoto glutationo koncentracijai pelių kraujyje; nustatyti *Cannabis sativa* L. ekstrakto poveikį lipidų peroksidacijai pelių smegenyse ir kepenyse; įvertinti *Cannabis sativa* L. ekstrakto įtaką katalazės aktyvumui pelių smegenyse ir kepenyse.

**Darbo objektas.** Laboratorinių pelių, paveiktų pluoštinių kanapių (*Cannabis sativa* L.) ekstraktu, kraujas, smegenys ir kepenys.

**Tyrimo metodai.** Kanabidiolio identifikavimui ir kiekio nustatymui *Cannabis sativa* L. etanoliniuose ekstraktuose naudotas dujų chromatografijos metodas. Bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas Folin – Ciocalteu metodu. Eksperimentai atlikti su nelinijinėmis 4–6 savaičių amžiaus baltosiomis laboratorinėmis pelėmis. Pluoštinių kanapių 10 proc. etanolinis ekstraktas įvedamas tiesiai į skrandį 21 dieną ir vertinama glutationo koncentracija pelių kraujyje, malondialdehido koncentracija ir katalazės aktyvumas pelių smegenyse ir kepenyse spektrofotometriniu metodu. Kontrolinės pelės paveiktos prooksidantu aliuminiu. Duomenų patikimumas vertintas pagal Studento t-testą.

**Rezultatai.** Didžiausias kanabidiolio kiekis nustatytas ekstrahuojant žaliavą 30 proc. etanoliu, o bendram fenolinių junginių kiekiui statistiškai reikšmingų skirtumų, naudojant skirtingų koncentracijų etanolio tirpalus, nenustatyta. *Cannabis sativa* L. ekstraktas statistiškai reikšmingai sumažino redukuoto glutationo koncentraciją pelių, paveiktų aliuminio jonais, kraujyje 26,81 proc. ir stabilizavo oksidacinio streso rodiklio kiekį iki kontrolinių pelių kraujyje aptinkamų šių parametų lygio. *Cannabis sativa* L. ekstraktas statistiškai reikšmingai sumažino malondialdehido koncentraciją pelių, paveiktų aliuminio jonais, smegenyse ir kepenyse, atitinkamai 82,12 proc. ir 53,5 proc. *Cannabis sativa* L. ekstraktas statistiškai reikšmingai padidino katalazės aktyvumą 56,44 proc. kontrolinių pelių bei 64,79 proc. pelių, paveiktų aliuminio jonais, smegenyse ir atitinkamai 34,53 proc. bei 72,37 proc. kepenyse

**Išvados.** *Cannabis sativa* L. ekstraktas normalizuoja nekontroliuojamą redukuoto glutationo sintezę, sukeltą aliuminio jonais, apsaugo smegenų ir kepenų lipidus nuo peroksidacijos bei pasižymi stipriu stimuliuojančiu poveikiu, kepenų ir smegenų antioksidacinės apsaugos sistemai.

## SUMMARY

Master thesis of K. Mickutė “Evaluation of antioxidant activity of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) extract in blood and organs of laboratory mice”. Scientific supervisor: doc. Dr. Asta Kubilienė; Lithuanian university of health sciences Faculty of medicine Department of analytical and toxicological chemistry. Kaunas, 2019.

The **aim** of the research was to evaluate the antioxidant effect of ethanolic extract of *Cannabis sativa* L. on mice, blood and organs.

**Objectives:** selecting the most appropriate conditions for industrial hemp extraction to assess the amount of cannabidiol and total phenolic compounds; to evaluate the effect of *Cannabis sativa* L. extract on reduced glutathione concentration in mice blood; determine the effect of *Cannabis sativa* L. extract on lipid peroxidation in the brain and liver of mice; to evaluate the effect of *Cannabis sativa* L. extract on catalase activity in the brain and liver of mice.

**Object of the study:** Blood, brain and liver of laboratory mice affected by industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) extract.

**Methods.** Gas chromatography was used for the identification and quantification of cannabidiol in *Cannabis sativa* L. extracts. The total amount of phenolic compounds was determined by Folin - Ciocalteu method. Experiments were done on 4-6 weeks old outbred mice. *Cannabis sativa* L. herb 10 perc. ethanolic extracts were administered intragastrically to mice via a stomach tube for 21 days and glutathione concentration in mice blood, malondialdehyde concentration and catalase activity in the brain and liver of mice were determined spectrophotometrically. Control mice was affected with prooxidant aluminum. Results were evaluated by Student's t-test.

**Results.** The highest amount of cannabidiol was determined by extracting raw material with 30 perc. ethanol and no statistically significant differences in the amount of total phenolic compounds using ethanol solutions of different concentrations were found. *Cannabis sativa* L. extract statistically significantly decreased the concentration of reduced glutathione in blood of mice affected with aluminum ions by 26.81 perc. and stabilized the level of oxidative stress indicator to the level of these parameters in the control mice. *Cannabis sativa* L. extract statistically significantly reduced malondialdehyde concentration in brain and liver of mice affected by aluminum ions, respectively, by 82.12 perc. and 53.5 perc. *Cannabis sativa* L. extract statistically significantly increased catalase activity in brain of control mice by 56.44 perc. and mice affected by aluminum by 64.79 perc. and, respectively, in liver by 34.53 perc. and 72.37 perc.

**Conclusions.** *Cannabis sativa* L. extract normalizes uncontrolled synthesis of reduced glutathione caused by aluminum ions, protects brain and liver lipids from peroxidation, and has a strong stimulating effect on the brain and liver antioxidant protection system.

## **PADĖKA**

Nuoširdžiai dėkoju visiems, kurie padėjo rengti magistro baigiamąjį darbą. Už visokeriopą pagalbą, naudingus patarimus rengiant magistro baigiamąjį darbą esu dėkinga darbo vadovei doc. Dr. Astai Kubilienei. Dėkoju konsultantei prof. Dr. Ilonai Sadauskienei už pagalbą atliekant tyrimus su pelėmis, naudingus patarimus ir kantrybę. Dėkoju analizinės ir toksikologinės chemijos katedros lekt. Mindaugui Marksai už nuoširdžią pagalbą, patarimus, atliekant tyrimus ir analizuojant turimus duomenis. Už pagalbą atliekant eksperimentus su pelėmis ir analizuojant turimus duomenis, esu dėkinga dr. Arūnui Liekiui.

## SANTRUMPOS

**ADJ** – aktyvūs deguonies junginiai

**CAT** – katalazė

**CBD** – kanabidiolio

**DNR** – deoksiribonukleorūgštis

**DTNB** – 5'5-ditio-bis-(2-nitrobenzoinė rūgštis) (Elmano reagentas)

**GSH** – redukuotas glutationas

**JAV** – Jungtinės Amerikos Valstijos

**HF** – viršutinis centrifugato sluoksnis (supernatantas)

**LD<sub>50</sub>** – vidutinė mirtina dozė; dozė nuo kurios žūva 50 proc. tiriamųjų gyvūnų

**LPO** – lipidų peroksidacija

**MDA** – malondialdehidas

**NADP** – oksiduotas nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas

**NADPH** – redukuotas nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas

**SOD** – superoksido dismutazė

**TBR** – tiobarbituro rūgštis

**TChA** – trichloracto rūgštis

**THC** – tetrahidrokanabinolis



## IVADAS

Kasdieninėje aplinkoje vis daugėja egzogeninių laisvųjų radikalų šaltinių, tokių kaip aplinkos tarša, jonizuojančioji spinduliuotė, UV spinduliuotė, ozonas, ksenobiotikai, pesticidai ir įvairūs metalai [1]. Aliuminis yra plačiai naudojamas įvairiuose gaminiuose nuo buitinių virtuvės reikmenų ir indų iki apdorotų maisto produktų, kaip maisto priedas, ir vandens valymo sistemų, todėl randamas geriamajame vandenyje, nes jis veikia kaip flokulantas. Aliuminis pasižymi prooksidaciniu aktyvumu ir skatina biologinį oksidavimą tiek *in vitro*, tiek *in vivo* [2]. Oksidacinis stresas gali lemti aterosklerozės, širdies nepakankamumo, Parkinsono, Alzheimerio, vėžio ir kitų ligų etiologiją. Todėl didėja susidomėjimas antioksidantais, nes žmogaus organizmo antioksidacinė sistema nėra pajėgi apsaugoti nuo prooksidantų. Didžiausias dėmesys skiriamas natūraliems antioksidantams, nes dauguma sintetinių antioksidantų yra veiksmingi mažomis koncentracijomis, o vartojimas didesnėmis koncentracijomis gali sukelti prooksidantinį poveikį [3].

Kanapė yra vienas iš seniausių augalų pasaulyje ir jau daugelį metų naudojamas medicininiais ar rekreaciniais tikslams, tekstilės ir maisto reikmėms. 2017 m. Europos Sąjungoje yra teisėta auginti pluoštines kanapes, kurių augaluose tetrahidrokanabinolio (THC) kiekis neviršija 0,2 proc. ir yra paskelbtos Bendrajame žemės ūkio augalų rūšių veislių kataloge [4]. Šiuo metu daugiausiai skiriama dėmesio kanapės rūšims, kurios pasižymi gydomoju poveikiu, bet nepasižymi psichiką veikiančiu poveikiu.

*Cannabis sativa* L. rūšis pasižymi dideliais kanabidiolio (CBD) kiekiais ir mažais THC kiekiais. CBD, lyginant su THC, yra mažai giminingas kanabinoidiniams receptoriams, todėl nepasižymi psichiką veikiančiu poveikiu [5]. Tyrimai *in vitro* parodė, kad pluoštinėje kanapėje esantis kanabidiolis pasižymi antioksidaciniu veikimu [6, 7]. Klinikiniuose tyrimuose įrodyta, kad kanabidiolis moduliuoja euforišką THC poveikį ir yra veiksmingas gydant tokias ligas, kaip epilepsija, Parkinsono ligą, išeminę sklerozę, Alzheimerio ligą, reumatoidinį artritą, širdies bei kraujagyslių ligas, pasižymi priešūždegiminiu, priešvėžiniu poveikiu [8]. Taip pat kanapėse yra nustatoma nekanabinoidinių fenolių iš kurių 20 yra flavonoidai, daugiausia priklausančių flavono ir flavonolio poklasiams. Šie fenoliai pasižymi priešūždegiminių, priešvėžinių, anksiolitinių ir nervų sistemą apsaugančių savybių [9]. Tačiau nėra įrodytas tikslus antioksidacinio poveikio mechanizmas ir antioksidacinis aktyvumas organizmo ląstelėse.

Atsižvelgiant į didėjantį laisvųjų radikalų kiekį ir didėjantį natūralių antioksidantų poreikį, šio darbo tikslas - įvertinti pluoštinės kanapės ekstrakto antioksidacinį poveikį *in vivo*, įvertinant redukuoto glutationo, malondialdehido koncentracijas ir katalazės aktyvumą pelių kraujyje, smegenyse ir kepenyse.

## DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

### Darbo tikslas:

Įvertinti pluoštinių kanapių (*Cannabis sativa L.*) etanolinio ekstrakto antioksidacinį poveikį pelių, kraujyje ir organuose

### Darbo uždaviniai:

1. Parinkus tinkamiausias pluoštinių kanapių ekstrakcijos sąlygas įvertinti kanabidiolio ir bendrą fenolinių junginių kiekį.
2. Įvertinti *Cannabis sativa L.* ekstrakto poveikį redukuoto glutationo koncentracijai pelių kraujyje.
3. Nustatyti *Cannabis sativa L.* ekstrakto poveikį lipidų peroksidacijai pelių smegenyse ir kepenyse.
4. Įvertinti *Cannabis sativa L.* ekstrakto įtaką katalazės aktyvumui pelių smegenyse ir kepenyse.

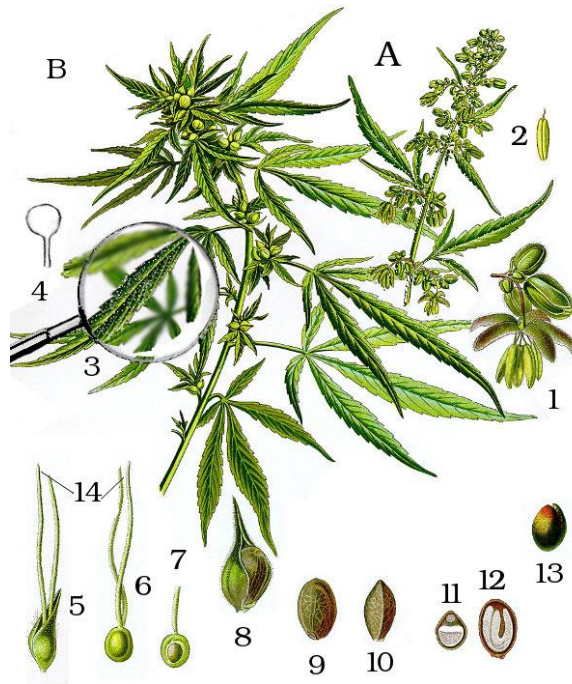
# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Kanapių (*Cannabis L.*) paplitimas ir morfologiniai požymiai

*Cannabis L.* yra vienmetis žolinis augalas priskiriamas magnolijūnų (*Magnoliophyta*) genčiai bei kanapinių (*Cannabaceae*) šeimai, kuris yra plačiai paplitęs visame pasaulyje. *Cannabis L.* augalo kilmės vietovė yra Centrinė Azija [10]. Kanapės gentis padalyta į tris pagrindines rūšis: *Cannabis sativa* – pluoštinė kanapė, *Cannabis indica* – indinė kanapė ir *Cannabis ruderalis* – šiukšlyninė kanapė [11]. Indinė kanapė priskiriama narkotiniams augalams, nes kaupia daug psichiką veikiančio kanabinoido  $\Delta^9$ -trans-tetrahidrokanabinolio ( $\Delta^9$  – THC) ir yra naudojama medicininiais ar rekreaciniais tikslams. Pluoštinė kanapė priskiriama pluoštiniais augalams, nes beveik nekaupia  $\Delta^9$ -THC, o daugiausiai kaupia kanabidiolio todėl naudojama tekstilės ar maisto reikmėms. Šiukšlyninė kanapė kartais priskiriama pluoštinės kanapės porūšiui, nes nustatytas mažiausias  $\Delta^9$ -THC kiekis, todėl nenaudojama rekreaciniais tikslams bei lyginant su pluoštine, šiukšlyninė kanapė yra mažesnė, todėl retai naudojama pluošto gamyboje.

*Cannabis sativa L.* stiebas yra stačias, žalias, tuščiaviduris, siekiantis 0,9 – 4,5 m, paprastas arba šakotas, briaunuotas, gausiai lapuotas, padengtas gana trumpais, standžiais plaukeliais, viršutinė dalis šakota. Pluoštinės kanapės lapai yra sudėtiniai, pirštuoti, 2,5-15 cm ilgio ir 0,35-2 cm pločio, plaukuoti, siaurai lancetiški, kraštai dantyti, išsidėstymas ant stiebo priešinis, pleištiškas pagrindas ir sudaro 25 proc. viso augalo masės. Šaknis liemeninė. Vaisius – šviesiai pilkos-rusvos spalvos riešutėlis su dviem sėklaskiltėmis.

Pluoštinė kanapė yra dvinamis augalas, brandinantis vyriškus ir moteriškus žiedus ant atskirų augalų, retai ant to paties augalo. Žydėjimo metu skleidžiantis stiprų aromatą. Vegetacijos metu vyriškus ir moteriškus augalus atskirti yra sunku, tačiau moteriškas augalas pražįsta pirmiau, o vyriškas po 2-10 dienų, priklausomai nuo tipo [12]. Vyriškas augalas yra aukštesnis ir plonesnis, netrukus po žydėjimo miršta. Moteriškas augalas storesnis ir gyvena kelis mėnesius po apdulkinimo [13]. Kanapės kuokeliniai, rausvi žiedai susitelkę į ilgus šluotelinius žiedynus. Vyriškai žiedai sudaryti iš 5 gelsvai-žalių žiedlapių ir 5 kuokelių su dulkinėmis, žiedynai padengti plaukeliais, žiedlapiai nuo baltos iki gelsvai žalios spalvos be vainiklapių. Vienintelė vyriškųjų žiedų funkcija yra apdulinti moteriškus žiedus. Moteriški žiedai yra smulkesni, retesni, sutelkti kompaktiškuose žiedynuose. Moterišką žiedą sudaro žaliu apvalkalėliu (iš 5 suaugusių lapelių) apgaubta mezginė, turinti piestelę, kurios purka padengta smulkiais žiedadulkių gaudikliais (1 pav.).



**1 pav. A – vyriškas augalas B - moteriškas augalas 1 - vyriškas žiedynas 2 - dulkinė 3 - trichomai ant lapo, padidinta detalė 4 - trichoma 5 – moteriškas žiedas su žiedlapiiais 6 – moteriškas žiedas be žiedlapių 7 – moteriškas žiedas, be žiedlapių, išilginis pjūvis 8 - vaisius (sėkla) su (taurele) 9 - sėkla, priekinis vaizdas 10 - sėkla, šoninis vaizdas 11 - sėklos skerspjūvis 12 - sėklos išilginis pjūvis 13 - sėkla be kevalo 14 - purka**

2019 metų Europos Bendrajame žemės ūkio augalų rūšių veislių kataloge yra 66-ios *Cannabis sativa* L. veislės [4]. Lietuvoje registruota „Austa SK“ veislė. Kanapė auga įvairiomis sąlygomis, tačiau Europoje yra išskiriami 3 pagrindiniai klimato tipai, kurie reikšmingai skiriasi temperatūra ir kritulių kiekiu: atlantinis; mediteraninis; žemyninis. Lietuvoje registruota „Austa SK“ veislė yra adaptuota Lietuvos klimatui. Atlanto tipo kanapės yra aukštos, turi daugiau pluošto, taip pat didesnis CBD kiekis, tokiam tipui priklauso FELINA 32, FUTURA 75 veislės.

## 1.2. Cheminė *Cannabis sativa* L. sudėtis

*Cannabis sativa* L. pasižymi įvairia chemine sudėtimi išskiriant angliavandenius, terpenus, riebalų rūgštis ir jų esterius, aminos, amidus, fitosterolius, fenolinius junginius ir specifinius šio augalo junginius – kanabinoidus [9]. Bendras cheminių junginių, identifikuotų arba išskirtų iš *Cannabis sativa* L. skaičius 2015 metais - 565 [14], iš kurių 120 junginių sudaro kanabinoidai. Kanabinoidai savo struktūroje turi 21 C atomą ir priskiriami terpenofenoliniams junginiams. Šie junginiai yra suskirstyti į 11 pagrindinių struktūrinių tipų:  $\Delta^9$ -trans-tetrahidrokanabinolio grupė ( $\Delta^9$ -THC),  $\Delta^8$ -trans-tetrahidrokanabinolio grupė ( $\Delta^8$ -THC), kanabigerolio grupė (CBG), kanabichromeno grupė (CBC), kanabidiolio grupė (CBD), kanabinodiolio grupė (CBND), kanabielsoino grupė (CBE), kanabiciklolio grupė (CBL), kanabinolio (CBN), kanabitriolio grupė (CBT) ir įvairus. Augalų audiniuose

kannabinoidai yra biosintezuojami rūgštinėje (karboksilintoje) formoje. Dažniausiai aptinkami rūgštiniai kanabinoidų yra: tetrahidrokanabinolinė rūgštis (THCA), kanabidiolinė rūgštis (CBDA), kanabigerolinė rūgštis (CBGA), kanabichromeninė rūgštis (CBCA) [15]. THC rūgštis yra dviejų formų: THCA-A ir THCA-B. Tačiau pagrindinė forma yra THCA-A. CBGA yra tiesioginis THCA, CBDA ir CBCA pirmtakas. Karboksilo grupė nėra labai stabili, todėl veikiant karščiui ar šviesai vyksta dekarboksilinimo procesas ir rūgštiniai kanabinoidai virsta neutraliais, atitinkamai: tetrahidrokanabinoliu, kanabidioliu, kanabigeroliu ir kanabichromenu. Jie daugiausia sintezuojami liaukinėse trichomose, kurios dažniau yra moteriškuose žiedynuose [14].

Skirtingai nuo medicininės kanapės, kurioje gausu psichiką veikiančio kanabinoido  $\Delta^9$  – THC, šiuolaikinė pluoštinė kanapė buvo selektyviai veisiama, kad būtų maži  $\Delta^9$  – THC kiekiai ir dideli CBD. Todėl *Cannabis* genties augalai gali būti klasifikuojami pagal  $\Delta^9$  – THC ir CBD kiekį į penkis chemotipas: I - chemotipas apima narkotines kanapes, kuriuose vyrauja  $\Delta^9$  – THC kanabinoidas, II - vidutinio tipo kanapės su pereinamomis savybėmis tarp narkotinio ir pluoštinio tipo augalų, III - pluoštinio tipo kanapės, kuriuose gausu psichiką neveikiančio kanabinoido CBD ir mažai psichiką veikiančio -  $\Delta^9$  – THC, IV - kanabigerolį kaupiančios kanapės, V - ne kanabinoidinio tipo [11]. Kanabinoidų (tetrahidrokanabinolio ir kanabidiolio) koncentracijos chemotipuose nurodytos 1 lentelėje.

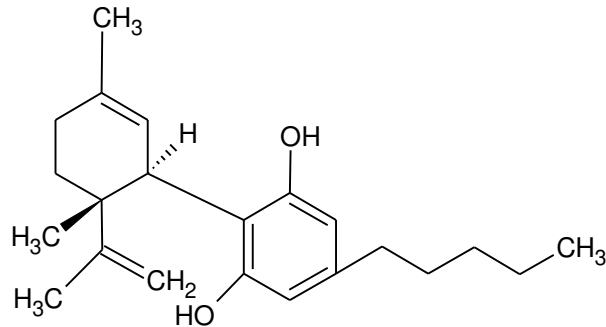
**1 lentelė. *Cannabis L.* chemotipai pagal kanabinoidų koncentracijas; sudaryta pagal [11]**

<b>Chemotipas</b>	<b>THC</b>	<b>CBD</b>
I (narkotinio tipo)	0,5 – 15 proc.	0,01 – 0,16 proc.
II (vidutinio tipo)	0,5 – 5 proc.	0,9 – 7,3 proc.
III (pluoštinio tipo)	0,05 – 0,7 proc.	1,0 – 13,6 proc.
IV (CBG tipo)	< 0,05 proc.	< 0,5 proc.
V (ne kanabinoidinio tipo)	0 proc.	0 proc.

*Cannabis sativa L.* žaliavoje yra nustatoma nekanabinoidinių fenolinių junginių iš kurių 20 yra flavonoidai, daugiausiai flavono ir flavonolio tipo anglikonų: apigenino, luteolino, kvercetino ir kaempferolio C-glikozidai ir O-glikozidai. Orientinas, vitexinas, luteolinas-7-O-gliukozidas ir apigenin-7-O-gliukozidas pagrindiniai flavonoidiniai glikozidai, aptinkami kanapėse, kuriuose yra maži THC kiekiai. Taip pat nustatyti unikalūs *Cannabis* flavonai – kanflavinas A ir kanflavinas B [9,14].

### 1.3. Kanabidiolis – farmakologinės bei fizikocheminės savybės

*Cannabis sativa* L. priskiriamas pluoštinio tipo kanapių chemotipui, kurio sudėtyje yra dideli CBD kiekiai ir maži THC kiekiai. Kanabidiolis yra vienas iš natūraliai nustatomų kanabinoidų kanapių augaluose (2 pav.). Tai C<sub>21</sub> terpenofenolinis junginys, kuris susidaro dekarboksilinant kanabidiolio rūgštį.



2 pav. Kanabidiolio formulė

Yra du pagrindiniai kanabinoidiniai (CB) receptoriai: CB<sub>1</sub>, kuris yra centrinėje nervų sistemoje ir maža dalis periferiniuose audiniuose; CB<sub>2</sub> receptorius, kuris yra ląstelių, turinčių imuninę funkciją periferijoje, virškinimo trakte ir maža dalis centrinėje nervų sistemoje. CBD lyginant su  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinoliu pasižymi mažu giminingumu šiems receptoriams, todėl nepasižymi psichiką veikiančiu poveikiu [5]. Kanabidiolis veikia kitus receptorių: 5-hidroksitriptaminą (5-HT<sub>1a</sub>), vaniloidinį 1 tipo receptorių (TRPV<sub>1</sub>), peroksisomų proliferatorių aktyvuojamą receptorių (PPAR) ir su G baltymu susietą receptorių (GPR55). Priešingai nei THC, CBD nedaro įtakos širdies susitraukimų dažniui ar kraujospūdžiui normaliomis sąlygomis, tačiau tyrimai su gyvūnais parodė, kad sukėlus stresą, CBD sumažina širdies susitraukimų dažnį ir kraujospūdį [16].

Literatūros duomenimis CBD pasižymi farmakologiniu veiksmingumu gydant: epilepsiją, Parkinsono ligą, išeminę sklerozę, Alzheimerio ligą, reumatoidinį artritą, širdies ir kraujagyslių ligas, pasižymi priešuždegiminiu, priešvėžiniu poveikiu [8]. *In vitro* tyrimuose nustatytas pluoštinėje kanapėje esančio kanabidiolio poveikis antioksidacinei apsaugos sistemai [6, 7].

### 1.4. Nekanabinoidiniai fenoliniai junginiai - farmakologinės bei fizikocheminės savybės

Fenoliniai junginiai yra antriniai augalų metabolitai, kurie turi hidroksilo grupę prijungtą prie aromatinio žiedo. Literatūros duomenimis šie junginiai pasižymi stipriu antioksidaciniu poveikiu ir yra

įrodyta, kad ilgalaikis augalų, kuriuose nustatyti dideli fenolinių junginių kiekiai, vartojimas apsaugo nuo vėžio, širdies ir kraujagyslių ligų, diabeto, osteoporozės ir neurodegeneracinių ligų vystymosi [17].

Fenolinių junginių antioksidacinio poveikio stiprumas priklauso nuo hidroksilo grupių skaičiaus ir išsidėstymo aromatiniame žiede. Fenoliniai junginiai pasižymi redukuojančiomis savybėmis, todėl geba inaktyvuoti laisvuosius radikalus. Šie junginiai pasižymi skirtingais antioksidacinio poveikio veikimo mechanizmais: kaip vandenilio elektronų donoriai (ir tai siejama su fenolinių junginių redukcijos potencialu); kaip reduktoriai, (kurie stabilizuoja ir perneša nesuporuotą elektroną); kaip metalų chelatoriai ir veikia sinergistiškai su kitais antioksidantais [18].

Flavonoidai yra fenolinių junginių grupė, kurių struktūra susideda iš dviejų aromatinių žiedų, sujungtų trijų anglies atomų, kurie dažniausiai yra susijungę į heterociklinį žiedą. Literatūros duomenimis, pluoštinės kanapės sudėtyje esantys flavonai ir flavonoliai pasižymi antioksidacinėmis savybėmis bei priešūždegiminėmis, priešvėžinėmis ir neuroprotektinėmis savybėmis [9].

### **1.5. Laisvieji radikalai, jų susidarymo šaltiniai ir vaidmuo ląstelėje**

Laisvieji radikalai yra atomai, molekulės arba jonai, kurie savo išorinėje orbitalėje turi vieną ar daugiau nesuporuotų elektronų, todėl yra labai chemiškai nestabilūs ir reaktyvūs, reaguoja su kitomis molekulėmis. Jie gaunami iš trijų elementų: deguonies, azoto ir sieros, taip sukuriant aktyvius deguonies junginius (ADJ), aktyvius azoto junginius (ANJ) ir aktyvius sieros junginius (ASJ). ADJ apima laisvuosius radikalus, pvz., singulentinį molekulinį deguonį ( $^1\text{O}_2$ ), superoksido anijono radikalą ( $\text{O}_2^-$ ), vandenilio peroksidą ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hidroksilo radikalą (OH), hidroperoksilo radikalą ( $\text{HO}_2$ ), hipochlorinę rūgštį ( $\text{HOCl}$ ), peroksinitritą ( $\text{ONOO}^-$ ) ir azoto oksidą (NO) [19]. Pagrindinė ADJ gamybos vieta ląstelėje – tai mitochondrijų elektronų transporto grandinėje, endoplazminėje retikulinėje sistemoje, plazminėje membranoje, peroksisomose bei fermentinė sistema formuojanti  $\text{O}_2$  yra oksidazių kompleksas NADPH.

Laisvųjų radikalų šaltiniai gali būti skirstomi į tris grupes: endogeniniai, egzogeniniai ir fiziologiniai veiksniai. Endogeniniais šaltiniais gali būti fermentinės reakcijos. Tai reakcijos, kurios yra susijusios su prostaglandinų sinteze, kvėpavimo grandinės fagocitoze ir citochromo P450 sistema. Kai kurie vidiniai laisvųjų radikalų susidarymo šaltiniai yra mitochondrijų kvėpavimo grandinė, autooksidacija, uždegiminės reakcijos. Egzogeniniai šaltiniai apima nefermentines reakcijas tarp deguonies ir organinių junginių. Kiti išoriniai veiksniai yra rūkymas, aplinkos tarša, jonizuojančioji spinduliuotė, UV spinduliuotė, ozonas, ksenobiotikai, pesticidai ir pramoniniai tirpikliai. Fiziologiniai veiksniai, dėl kurių gali atsirasti laisvieji radikalai, yra stresas, emocijos, ligos [1].

## 1.6. Oksidacinis stresas ir jo biologinis vaidmuo

Oksidacinis stresas - tai organizmo būseną, kurios metu sutrinka pusiausvyra tarp aktyvių deguonies junginių ir antioksidantų. Normaliomis sąlygomis ląstelėse yra palaikomas mažas ADJ lygis įvairių fermentinių sistemų, dalyvaujančių *in vivo* redokso homeostazėje. Pusiausvyra gali sutrikti dėl keleto priežasčių: padidėjus endogeninių ir egzogeninių junginių kiekiui, kurie patenka į autooksidaciją; išsekvojus mažos molekulinės masės antioksidantų atsargas; inaktyvuojant antioksidacinius fermentus; sumažėjus antioksidacinių fermentų ir mažos molekulinės masės antioksidantų gamybai [20]. Oksidacinio streso poveikis organizmui priklauso nuo oksidatoriaus rūšies, gamybos vietos, intensyvumo ir įvairių antioksidantų veikimo bei gebėjimo inaktyvuoti [21]. Kai organizme didėja aktyvių deguonies junginių kiekiai, kurie nėra inaktyvuojami, atsiranda oksidaciniai baltymų, lipidų ir deoksiribonukleorūgštis (DNR) pažeidimai, kurie gali sukelti citotoksiškumą, genotoksiškumą ir net karcinogenezę, kai pažeistos (mutavusios) ląstelės dauginasi. Tai lemia ir tokių ligų, kaip aterosklerozės, širdies nepakankamumo, Parkinsono, Alzheimerio, vėžio ir kitų ligų etiologiją [22].

ADJ gali sukelti DNR modifikacijas keliais būdais: DNR ir ribonukleino rūgštis (RNR) bazių modifikacijos; viengubos ar dvigubos DNR spiralės suardymas; deoksiribozės pakitimai; grandinių trūkiai; sutrikdoma DNR reparacijos sistema. Dauguma šių DNR modifikacijų gali sukelti kancerogenezę, senėjimą ir neurodegeneracines, širdies ir kraujagyslių bei autoimunines ligas [23]. Taip pat ADJ gali sukelti lipidų peroksidaciją ir suardyti ląstelių membranos dvigubą lipidų sluoksnį, tai gali inaktyvuoti membranos receptorių ir fermentus ir padidinti audinių pralaidumą. Lipidų peroksidacijos produktai yra alkoholiai, aldehidai ir malondialdehidai (MDA), kurie gali inaktyvuoti ląstelių baltymus, suformuodami baltymų kryžmines jungtis. Oksidacinio streso metu sukelti baltymų pažeidimai: polipeptidinės grandinės fragmentacija, baltymų elektros krūvio pakeitimai, baltymų kryžminį susiejimą ir specifinių aminorūgščių oksidaciją, todėl padidėja jautrumas proteolizei, skaidant specifinėmis proteazėmis. Cisteino ir metionino likučiai baltymuose yra ypač jautrūs oksidacijai. Sulfhidrilo grupių ar baltymų oksidavimas sukelia konformacinius pokyčius, baltymų išsiskleidimą ir skaidymą. Dėl oksidacinių pažeidimų fermentiniai baltymai praranda aktyvumą ir pakinta vidiniai ląstelės procesai.

Lipidų peroksidaciją (LPO) galima apibūdinti kaip procesą, kurio metu laisvieji radikalai atakuoja lipidus, ypač polinesočiąsias riebalų rūgštis, susidarant lipidų hidroperoksidams (LOOH) ir lipidų peroksidų radikalams (LOO•). Susidarę LOO• toliau reaguoja su kitomis lipidų molekulėmis ir susidaro galutinis LPO produktas - malondialdehidai (MDA) [24]. Malondialdehidai – antrinis lipidų peroksidacijos produktas. MDA yra laikomas labiausiai mutageninis ir plačiai naudojamas kaip lipidų peroksidacijos žymuo, dėl paprastos reakcijos su tiobarbitūro rūgštimi (TBR). TBR testas yra paremtas



reaktyvumo su MDA principu, kurio kiekis nustatomas spektrofotometrijos būdu ties 540 nm ilgio banga [25].

## 1.7. Antioksidacinė ląstelės sistema ir jos mechanizmas

Antioksidantai yra bet kuri medžiaga, kuri tiesiogiai inaktyvuoja ADJ arba netiesiogiai veikia apsauginę antioksidacinę sistemą arba slopina ADJ gamybą [26]. Antioksidantai gali atiduoti vieną ar daugiau elektronų laisviesiems radikalams ir juos inaktyvuoti, taip apsaugodami ląsteles nuo oksidacinio streso [27].

Yra skirtingi antioksidacinio poveikio veikimo mechanizmai: kaip laisvųjų radikalų oksidacijos reakcijų inhibitoriai, inhibuojantys laisvųjų lipidų radikalų susidarymą; autooksidacinę grandininę reakciją nutraukiantys; kaip reduktoriai, kurie hidroperoksidus paverčia stabiliais junginiais; metalų chelatoriai, konvertuojantys metalo prooksidantus (geležį ir vario darinius) į stabilius produktus; kaip prooksidacinių fermentų (lipooksigenazių) inhibitoriai ir sinergistiškai veikia su kitais antioksidantais [19].

Remiantis jų veikimu, antioksidantai gali būti suskirstomi į dvi pagrindines grupes: fermentinius ir nefermentinius antioksidantus [3]. Fermentiniai antioksidantai dar išskiriami į dvi grupes, pagal veikimo mechanizmą: pirminiai ir antriniai. Pirminiai antioksidantai užkerta kelią laisvųjų radikalų susidarymui ar juos neutralizuoja. Šiai grupei priklauso trys svarbūs fermentai: superoksido dismutazė (SOD), katalazė (CAT) ir glutationo peroksidazė (GSHPX). SOD, nustatoma citozolyje ir mitochondrijose, konvertuoja superoksido anijonus į vandenilio peroksidą ir deguonį. Katalazė, nustatoma peroksisomose, vandenilio peroksidą verčia vandeniu ir molekulinio deguonimi. Glutationo peroksidazė, nustatoma praktiškai visuose žmogaus audiniuose, suskaido vandenilio peroksidą į vandenį ir deguonį, taip pat suskaido ROOH į atitinkamą alkoholį ir deguonį.

Nefermentiniai antioksidantai yra skirstomi į metabolinius - endogeninius ir maistinių medžiagų - egzogeninius. Metaboliniai antioksidantai yra redukuotas glutationas (GSH), lipoinė rūgštis, L-argininas, kofermentas Q10, melatoninas, šlapimo rūgštis, bilirubinas, metalus sujungiantys baltymai ir kiti. Maistinių medžiagų: tokoferolis (vitaminas E), askorbo rūgštis (vitaminas C), mineralai (Zn, selenas (Se)), omega-3 ir omega-6 riebalų rūgštys, kurie yra gaunami su maistu. Didelis dėmesys skiriamas natūraliems antioksidantams, kaip karotenoidams, flavonoidams, fenolinėms rūgštims, kurie yra metaboliniai antioksidantai ir nustatomi augalinėse žaliavose [28, 13]. Taip pat vis daugiau tyrimų atliekama su *Cannabis* augalu, siekiant įrodyti kanabinoidų, kaip THC ir CBD, antioksidacines savybes [6].

## 1.8. Katalazės vaidmuo antioksidacinėje sistemoje

Katalazė (CAT) yra keturias porfirino hemo grupes turintis homotetramerinis fermentas, kuris katalizuoja  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  reakciją, taip padėdamas aerobinėms ląstelėms gintis nuo  $\text{H}_2\text{O}_2$  sukkelto oksidacinio ląstelių pažeidimo [29]. Šio fermento molekulinė masė yra 240 kDa. Katalazė yra nustatoma aerobiniuose organizmuose, įskaitant beveik visus žinduolių audinius, o didžiausias šio fermento aktyvumas yra kepenyse (Kupferio ląstelėse) ir kraujyje. Daugiausiai šio fermento nustatoma ląstelių peroksisomose, nes šioje vietoje yra daug  $\text{H}_2\text{O}_2$  gaminančių fermentų, ir mitochondrijose, tirpioje ir su membrana susietoje formoje [30]. Katalazė organizme yra nuolatos gaminama ir aktyvuojama superoksido.

CAT veikimo mechanizmo reakcija vyksta per dvi stadijas [31]. Fermentas yra oksiduojamas į didelio valentingumo geležies tarpinį junginį: I – oksoferilo porfirino katijono radikalą ( $\text{Por}_\bullet^+ - \text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ). Šis junginys susidaro vandenilio peroksidui patekus į aktyviąją fermento vietą, geležies centrą hemo grupėje:  $\text{Fe(III)-E} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Por}_\bullet^+ - \text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ .

( $\text{Por}_\bullet^+ - \text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ) molekulė reaguoja su antrąja  $\text{H}_2\text{O}_2$  molekule, reformuodama  $\text{Fe(III)-E}$  ir išskirdama vandenį ir deguonį:  $\text{Por}_\bullet^+ - \text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + \text{Fe(III)-E}$ .

Literatūros duomenimis, kad katalazės trūkumas pelių audiniuose, gali lemti nutukimą, 2 tipo cukrinį diabetą ir rie kepenų suriebėjimą [32], o pelėms su pernelyg išreikštu šio fermento kiekiu, nuo amžiaus priklausomas oksidacinis stresas mažiau išreikštas, nei laukinio tipo pelėms [33].

Katalazės aktyvumo nustatymas naudojamas kaip cheminės taršos poveikio rodiklis. Auksinėms žuvims suleidus herbicido 3-amino-1,2,4-triazolo (AMT), katalazės aktyvumas audiniuose reikšmingai sumažėjo, lyginant su žuvimis, kurioms buvo suleistas fiziologinis tirpalas [34].

Kaip jau buvo minėta, katalazė yra nustatoma beveik visuose gyvūnų organuose ir ląstelėse, todėl šio fermento aktyvumo nustatymas yra plačiai naudojamas. Katalazės aktyvumo nustatymas remiasi susidariusios kompleksu, reaguojant vandenilio peroksidui su amoniomolibdatu, šviesos absorbcijos matavimu esant 410 nm bangos ilgiu. Katalazės aktyvumo nustatymas yra svarbus antioksidacinės organizmo sistemos rodiklis.

## 1.9. Redukuoto glutationo vaidmuo antioksidacinėje sistemoje

Glutathionas (GSH) yra nefermentinis viduląstelinis antioksidantas, kuris nustatomas visose organizmo ląstelėse, citoplazmoje, citozolyje, branduolyje, endoplazminiame tinkle ir mitochondrijose, 1 - 10 mM koncentracijomis [35, 36]. Smegenyse GSH kiekis yra mažesnis nei kituose audiniuose, nes didelės jo prekursorių koncentracijos gali būti toksiškos [37]. GSH yra sudarytas iš glutamato, cisteino ir glicino.

Glutacionas tiesiogiai veikia laisvuosius radikalus ir neutralizuoja aktyvius deguonies junginius. Jis veikia kaip substratas reakcijose, katalizuojamose GPx ir glutationo-S-transferazės (GST) fermentų. GST fermentų pagalba GSH konjuguojasi su įvairiais elektrofiliniais endogeniniais junginiais ir ksenobiotikais ir tai lemia jų saugų ir efektyvų pašalinimą iš organizmo. ADJ pašalinamos nefermentinės redukcijos su GSH metu, o hidroperoksidų šalinimas reikalauja fermentinės katalizės, naudojant glutationo peroksidazę [29]. Glutacionas veikia ne tik kaip antioksidantas, bet yra įrodyta, kad jis dalyvauja kituose fiziologiniuose procesuose, įskaitant nukleotidų metabolizmą, lipidų antrinių pasiuntinių susidarymą, azoto oksido homeostazės reguliavimas, ir baltymų funkcijos moduliavimas redokso modifikacija. Glutacionas atlieka daugybę nefermentinių reakcijų, kurių pagrindas yra tiolo – disulfido mainai. Taip pat dalyvauja glutationilinio procese, kai tarp GSH ir baltymų -SH grupių susiformuoja disulfidai ir taip apsaugomos baltymų –SH grupės nuo oksidacijos. Šis nefermentinis antioksidantas sugeba regeneruoti tokius antioksidantus kaip vitaminą C ir E į jų aktyvias formas.

### **1.10. Aliuminis ir jo sukeltos pažaidos**

Aliuminis yra vienas iš gausiausių elementų, esančių žemės plutoje. Gamtoje aliuminis randamas  $Al^{3+}$  formoje ir nedalyvauja oksidacijos redukcijos reakcijose. Šis elementas į organizmą gali patekti su maistu, vandeniu ir oru [38]. Šiomis dienomis aliuminis nustatomas geriamajame vandenyje, nes jis veikia kaip flokuliantas ir naudojamas vandens valymo sistemose, apdorotose maisto produktuose kaip maisto priedas, dedamas į kosmetikos produktus ir vaistinius preparatus. Dėl to vis dažniau aliuminis aptinkamas žmogaus organizme [39]. Didžioji dalis aliuminio patenka per virškinamąjį traktą. Aliuminis yra blogai absorbuojamas virškinimo trakte, todėl beveik visas pašalinamas iš organizmo per inkstus. Tačiau esant inkstų funkcijos sutrikimams aliuminis iš organizmo nepašalinamas ir akumuliuojasi. Taip pat aliuminis gali patekti per odą ar kvėpavimo takus [40]. Yra įrodyta, kad aliuminis kaupiasi smegenų audiniuose. Dėl šios priežasties aliuminis yra neurotoksinis [39]. Tyrimai rodo, kad aliuminis daro įtaką prie Alzheimerio ligos, sukeldamas latentinius neurofiziologinius pokyčius [40]. Tyrimų su Swiss pelėmis duomenimis, lėtinis aliuminio vartojimas 29 dienas mažomis dozėmis yra siejamas su atminties sutrikimais [41]. Be neurologinių pokyčių, aliuminis padidina aktyvių deguonies junginių kiekį ir sukelia oksidacinius pažeidimus smegenyse, veikia neurotoksiškai ir sumažina hipokampo piramidines ląsteles [42]. Didelis aliuminio kiekis yra nustatytas ir Parkinsono liga sergančių pacientų smegenyse. Taip pat yra nustatyta sąsaja tarp didelio aliuminio kiekio ir tokių ligų, kaip osteomaliacija ir mikrocitinė anemija, kuri atsiranda dėl aliuminio sukulto hematokrito ir hemoglobino kiekio sumažėjimo, taip pat hemolizės. Esant inkstų ar kepenų funkcijos sutrikimams, aliuminis kaupiasi inkstuose ir kepenyse, taip sukeldamas atitinkamai

nefrotoksinį poveikį, skatindamas inkstų kanalėlių ląstelių degeneraciją arba hepatotoksinį poveikį [43, 44].

Aktyvus aliuminis padidina aktyvių deguonies junginių - superoksido anijono radikalo ( $O^2$ ), vandenilio peroksido ( $H_2O_2$ ), hidroksilo radikalo (OH) – susidarymą. Aliuminis gali sukelti oksidacinius pažeidimus keliais mechanizmais: 1) prisijungdamas prie neigiamai įkrautų smegenų fosfolipidų, kuriuose yra polinesočiųjų riebalų rūgščių, kurios yra lengvai paveikiamos aktyvių deguonies junginių; 2) skatindamas Fentono reakcijos metu geležies inicijuotą lipidų peroksidaciją, kuri sukelia ADJ gamybą ir  $Fe^{3+}$  susidarymą; 3) neutralizuodamas superoksidą ir sudarydamas Al- $O^2$  kompleksą, kuris padidina  $O^2$  oksidacinį poveikį [45].

### 1.11. Etanolis ir jo sukeltos pažeidimai

Etanolis yra dažnai naudojamas ekstrahentas ekstraktų gamyboje. Pagrindinis etanolio metabolizmas vyksta pirmojo prasiskverbimo per kepenis metu. Etanolis veikiamas alkoholdehidrogenazės fermento skykla, sudarydamas acetaldehidą, kuris toliau oksiduojamas nuo  $NAD^+$  priklausomo aldehiddehidrogenazė iki acetato. Susidarius  $NADH$  pertekliui, ima trūkti  $NAD^+$  ne tik šioms, bet ir kitoms oksidoreduktazėms, todėl sutrinka oksidacijos-redukcijos procesai ląstelėse [46]. Kepenų ląstelėje sumažėjęs  $NAD^+/NADH$  santykis yra pagrindinė metabolinių pokyčių, atsiradusių kepenų ląstelėse, priežastis, įskaitant ir trigliceridų akumuliaciją (suriebėjusios kepenys). Vis daugiau tyrimų rodo, kad oksidacinis stresas atlieka pagrindinį vaidmenį kepenų cirozės patogenezėje [47]. Alkoholio vartojimas skatina citochromo P450 2E1 (CYP2E1) fermento ekspresiją ir aktyvumą, kuris katalizuoja konversiją iš etanolio į acetaldehidą. Šis katalizinis CYP2E1 fermento aktyvumas reikalauja deguonies aktyvinimo, dėl kurio susidaro per daug ADJ, pvz.: vandenilio peroksidas ( $H_2O_2$ ), superoksido anijono radikalas ( $O_2$ ) ir hidroksilo radikalas (OH). Padidėjęs ADJ kiekis dėl etanolio vartojimo gali sukelti oksidacinius pažeidimus kepenų ląstelėse.

Etanolis praeina kraujo-smegenų barjerą ir gali būti metabolizuojamas smegenyse. Etanolio oksidacija į acetaldehidą smegenyse vyksta veikiant katalazės, citochromo CYP2E1 ir alkoholdehidrogenazės fermentams. Tyrimų su žiurkėmis metu nustatyta, kad etanolis yra metabolizuojamas smegenyse ir susidaro acetatas, glutamatas, glutaminas ir gama-amino sviesto rūgštis.

## 2. TYRIMO METODIKA

### 2.1. Tyrimo objektas

Tyrimo objektas – Lietuvoje auginama FUTURA 75 veislės pluoštinės kanapės (*Cannabis sativa* L.) susmulkinta antžeminė dalis, gauta iš Lietuvos Sveikatos Mokslų Universiteto (LSMU) Analizinės ir toksikologinės chemijos katedros. Veislė pasirinkta remiantis tyrimais, kurių metu nustatyta, kad didžiausias kanabidiolio kiekis ir didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymi FUTURA 75 veislės pluoštinių kanapių žolės mėginiai [48, 7].

Eksperimentams naudojome nelinijines 4–6 savaičių amžiaus baltąsias laboratorines peles, sveriančias 20–25 g. Bendras pelių skaičius 40. Eksperimentams naudotos pelės atsivežtos iš LSMU Veterinarijos akademijos vivariumo. Gyvūnai laikyti atsižvelgiant į geros laboratorijos praktikos (GLP) reikalavimus. Po atvežimo į laboratoriją, pelės 7 dienas laikytos karantino sąlygomis. Patelės ir patinai atskirti į skirtingus narvelius ir laikomi sudarant optimalias laikymo sąlygas: patalpų optimali temperatūra ~20 °C, santykinė oro drėgmė 55±10 proc., natūralus šviesos (diena/naktis) režimas. Laboratorinės pelės šertos pilnaverčiu maistu ir girdomos vandentiekio vandeniu *ad libidum*. Pakratams naudotas šienas ir medienos drožlės, kurie buvo keičiami kiekvieną dieną.

Moksliniai tyrimai su laboratorinėmis pelėmis atlikti vadovaujantis šiuose įstatymuose bei įsakymuose nurodytais reikalavimais: 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva (ES) Nr. 2010/63 „Dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos“, Lietuvos Respublikos Gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymu, Lietuvos Respublikos Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2012 m. spalio 31 d. įsakymu Nr. B1-866 „Dėl mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų patvirtinimo“, Europos konvencija dėl eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų stuburinių gyvūnų apsaugos. Lietuvos laboratorinių gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos gautas leidimas atlikti mokslinius eksperimentus su laboratoriniais gyvūnais (leidimo Nr. 0221) (žr. Priedas Nr. 1).

### 2.2. Tyrimo metu naudoti reagentai

- Amonio molibdatas („Sigma-Aldrich“, Scnelldorf, Vokietija);
- Chloroformas ≥99 proc. („Sigma-Aldrich“, Missouri, JAV)
- Etanolis 96 proc. (Vilniaus degtinė);
- Folin – Ciocalteu reagentas (Merck, Vokietija);

- Galo rūgštis (>99 proc., Fluka, Lenkija);
- Kanabidiolis 99,8 proc. (THC Pharm, Vokietija)
- Kalio chloridas, vandenilio peroksidas, fosforo rūgštis („Merck“, Vokietija);
- Metanolis 99,9 proc. („Sigma-Aldrich“, Scnelldorf, Vokietija);
- Natrio karbonatas (bevandenis, CHEMPUR, Lenkija);
- Trichloracto rūgštis (TChA), n-butanolis (Lietuva);
- Tris- HCl buferis, tiobarbitūro rūgštis (TBR), 5,5`-ditio-bis-(2-nitrobenzoinė rūgštis) (DTNB) („Serva“, Vokietija);
- Tirpalų gamybai naudojamas išgrynintas vanduo, dejonizuotas vanduo ir fiziologinis tirpalas.

### **2.3. Tyrimo metu naudota aparatūra**

- Ultragarso vonelė (WiseClean);
- Vandens gryninimo sistema Millipore (Millipore, Bedford, JAV);
- Dujų chromatografas – Shimadzu (SHIMADZU GC - 2010 PLUS, Japonija);
- Laboratorinis malūnėlis D – 47906 Clatronic (Kempen, Vokietija);
- Drėgmės analizatorius – KernandSohn, DBS-60-3, Balingen, Vokietija);
- Analitinės svarstyklės (Shimadzu AUW120D, Bellinghen, Vokietija);
- Automatinės pipetės (Eppendorf Research, Eppendorf, JAV);
- Centrifuga „Beckman J2-21“ (JAV);
- Spektrofotometras (LAMBDA 25, JAV);
- Bandiniams tirti panaudotos 1 cm skersmens kiuvetės.

### **2.4. *Cannabis sativa* L. žaliavos kokybinis įvertinimas**

Pluoštinių kanapių tiriamosios augalinės žaliavos kokybė įvertinta vizualiai ir nustatčius drėgmės kiekį. Vizualiai vertina žiedų, lapų, stiebų ir sėklų spalva. Drėgmės kiekis nustatomas vertinant nuodžiūvį. Nuodžiūvio rodiklis nustatomas džiovinant žaliavą iki pastovios masės ir skaičiuojamas masės procentais (m/m). Nuodžiūvis apskaičiuotas, naudojant drėgmės analizatorių. Atsvertas 1g susmulkintos pluoštinių kanapių žaliavos subertas ant analizatoriaus lėkštutės. Kiekviena žaliava džiovinta nuo 6 iki 8 minučių, esant 103 °C temperatūrai. Atlikus analizę, pluoštinių kanapių nuodžiūvis atitiko M. ElSholy (2013 m.) reglamentuojamas maksimalaus nuodžiūvio kiekio leistinas ribas, kurios neturi viršyti 15 proc. [49].

## 2.5. *Cannabis sativa* L. ekstraktų paruošimas

Literatūros duomenimis net mažos etanolio koncentracijos gali sukelti prooksidantinį poveikį pelių organizmui, todėl svarbu parinkti tinkamiausias pluoštinių kanapių ekstrakcijos sąlygas.

Sudžiovintos kambario temperatūroje šviežios augalinės žaliavos lapai, stiebai, žiedai ir sėklos sudedami į maišyklę IKA basic (Vokietija) ir smulkinami apie 5 minutes, kol gaunami miltelių konsistencijos mėginiai, kuriuose nesimato didelių, heterodispersinių dalelių.

Ekstrakcija atlikta remiantis ElSohly M. ir kt. (2013) monografija [49]. Ekstraktai ruošiami iš 9 svėrinų (2 lentelė) susmulkintų pluoštinių kanapių antžeminės dalies.

2 lentelė. *Cannabis sativa* L. žaliavos svėriniai ir etanolio koncentracijos

Etanolio koncentracija (proc.)	Žaliavos svėrinys (g)		
	10 proc.	0,103	0,515
20 proc.	0,106	0,509	1,013
30 proc.	0,108	0,521	1,009

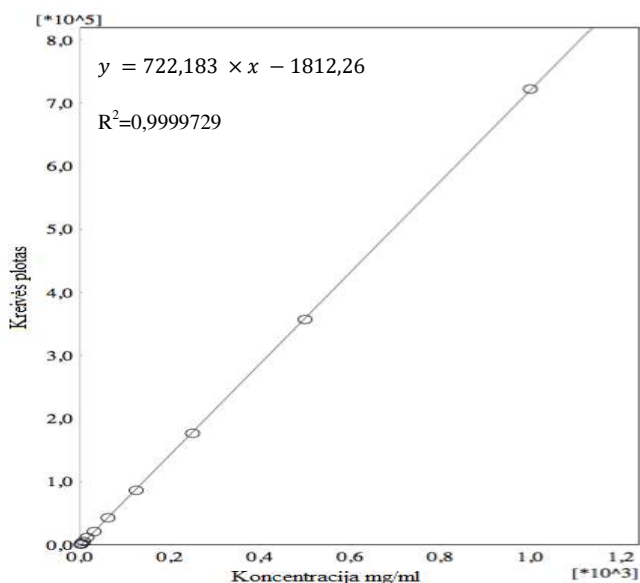
Žaliava atsverta ant aliuminio folijos, suberta į 10 ml tūrinę kolbutę ir užpilta pusė tūrio atitinkamos koncentracijos (2 lentelė) (v/v) etanoliumi. Ekstrahentu pasirinktas etanolis (vietoj metanolio ir chloroformo mišinio) dėl jo mažesnio toksiškumo [50]. Kolbutė užkemšama plastikiniu kamščiu ir dedama į ultragarso vonelę 30 minučių. Baigus ekstrakciją ultragarsu, ekstraktai atvėsinausiai ir praskiedžiamai ekstrahentu iki tikslaus tūrio. Gautas ekstraktas filtruojamas pro Albet 400 (Dublinas, Airija) filtravimo popierių (porų dydis 38-43 μm) į stiklainį. Nufiltruotas ekstraktas filtruotas pro 0,45 μm filtrą į chromatografijai skirtus buteliukus.

## 2.6. Kanabidiolio kokybinis ir kiekybinis įvertinimas dujų chromatografijos metodu

Kanabidiolio kokybiniam ir kiekybiniam nustatymui pasirinktas dujų chromatografijos metodas su liepsnos jonizacijos detektoriumi. Dujų chromatografo sąlygos parinktos remiantis UNODC (2009) rekomendacijomis [51]. Analizė atliekama Shimadzu GC - 2010 PLUS su AOC – 5000 Plus autosampleriu, kapiliarine kolonėle Restek Rxi – 5 ms (Restek Corporation), 30 m ilgio, 0,25 mm išorinio diametro, 0,25 μm vidinio diametro. Stacionari fazė sudaryta iš 5 proc. difenilo ir 95 proc. polisiloksano. Mobilioji fazė (dujos nešiklės) – helis.

Dujų chromatografijos metodo sąlygos: pradinė kolonėlės temperatūra 80°C, injektoriaus temperatūra 290°C, liepsnos jonizacijos detektoriaus temperatūra 330 °C. Injekcija atliekama taikant srauto skirstymą santykiu 1:20. Injekuojamojo bandinio kiekis – 1 µl, tėkmės greitis 1,2 ml/min. Temperatūra keliama palaipsniui nuo 80°C iki 250°C 10°C/min greičiu, nuo 250°C iki 310°C 30°C/min greičiu ir palaikoma 7 min. Bendras vieno bandinio analizės laikas 20 min.

Tiesiškumui įvertinti sudaroma kalibracinė kreivė, kurios koreliacijos koeficientas  $R^2$  turi būti ne mažesnis negu 0,98. CBD koncentracija pluoštinių kanapių ekstraktuose apskaičiuota, naudojant kalibracinę kreivę, kuriai sudaryti buvo naudojami žinomos koncentracijos etaloniniai tirpalai. Standartinis CBD tirpalas buvo naudotas etaloniniams tirpalams gaminti ir kalibracinei kreivei sudaryti. Buvo pagaminti 5 skirtingų, proporcingai didėjančių koncentracijų etaloniniai tirpalai, iš kurių sudaryta kalibracinė kreivė (3 pav.).



3 pav. Kanabidiolio kalibracinė kreivė

Gauta kanabidiolio kalibracinės kreivės lygtis:

$$y = 722,183 \times x - 1821,26$$

y = chromatografinės smailės plotas,

x = kanabidiolio koncentracija išreikšta mg/ml.

$R^2 = 0,9999729$ , kalibracinės kreivės koreliacijos koeficientas yra artimas vienetui, todėl galima daryti išvadą, kad metodikos tiesiškumas yra tinkamas ir kiekybinis kanabidiolio nustatymas pluoštinių kanapių ekstraktuose yra tikslus.

Kanabidiolio tapatybė nustatyta pagal sulaikymo laiką kolonėleje. Šis parametras lyginamas su CBD standartinio mėginio duomenimis.

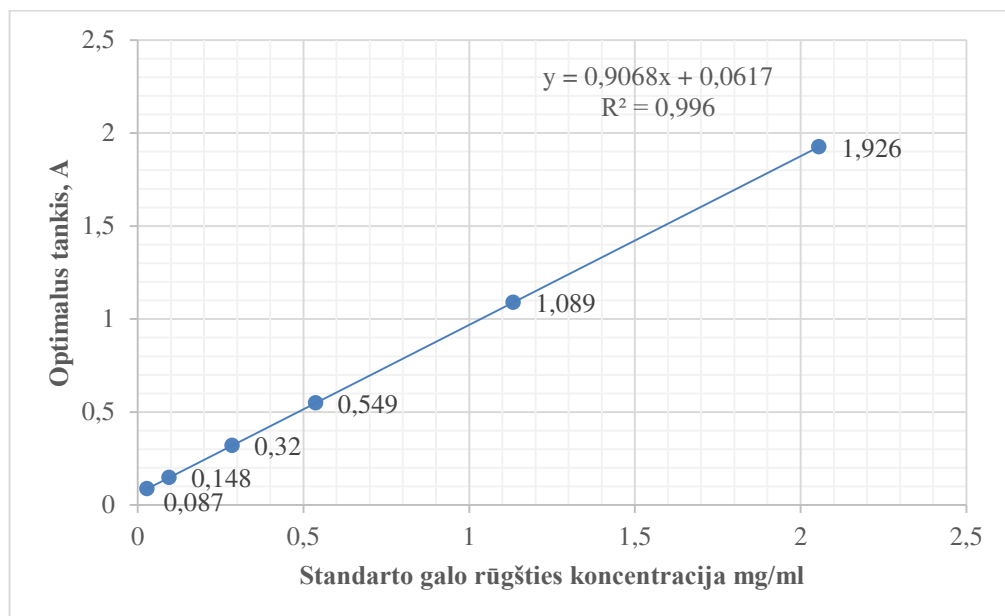


## 2.7. Bendro fenolinių junginių kiekio *Cannabis sativa* L. ekstrakto nustatymas

Bendras fenolinių junginių kiekis pluoštinių kanapių ekstrakto nustatytas Folin – Ciocalteu metodu. Pirmiausia yra paruošiamas 7 proc. natrio karbonato tirpalas. Jis ruošiamas: 7 g medžiagos tirpinama 100 ml distiliuoto vandens. Analizei imamas 0,4 ml augalinės žaliavos etanolinio ekstrakto, kuris yra sumaišomas su 0,4 ml Folin – Ciocalteu reagento, 3,6 ml distiliuoto vandens. Po 5 minučių įpilama 4 ml 7 proc. natrio karbonato tirpalo ir praskiedžiama iki 10 ml. Gautas mišinys gerai sumaišomas ir paliekamas 90 minučių kambario temperatūroje, tamsioje vietoje. Praėjus duotam laikui spektrofotometru matuojama tirpalo absorbcija 750 nm šviesos bangos ilgyje. Atliekami trys matavimų pakartojimai.

Lyginamasis tirpalas ruošiamas lygiai tokiomis pačiomis sąlygomis, kaip ir tiriamasis tirpalas, vietoje pluoštinių kanapių augalinės žaliavos ekstrakto pilant 0,4 ml distiliuoto vandens.

Tiesiškumui nustatyti, sudarytos galo rūgšties standartų kalibracinė kreivė, kurios koreliacijos koeficientas  $R_2$  turi būti nemažesnis negu 0,98. Etaloniniai galo rūgšties tirpalai ruošiami pagal tą pačią metodiką, tik vietoje ekstrakto pilami 0,4 ml žinomų koncentracijų galo rūgšties tirpalai. Naudojant 70 proc. metanolinį tirpalą, buvo paruošti penkių skirtingų koncentracijų galo rūgšties tirpalai: 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2,0 mg/ml, 2,5 mg/ml ( 4 pav.).



4 pav. Galo rūgšties kalibracinis grafikas bendrai fenolinių junginių koncentracijai nustatyti

Gauti duomenys vertinami pagal galo rūgšties kalibracinio grafiko tiesinės regresijos lygtį.

$$y = 0,9068x + 0,0617;$$

$y$  = absorbcijos dydis;

$x$  = bendra fenolinių junginių koncentracija, išreikšta GRE (galo rūgšties ekvivalentu) mg/ml.

$R^2 = 0,996$ , kalibracinės kreivės koreliacijos koeficientas yra artimas vienetui, todėl galima daryti išvadą, kad metodikos tiesiškumas yra tinkamas ir kiekybinis bendro fenolinių junginių nustatymas pluoštinių kanapių ekstrakto yra tikslus.

## 2.8. Tyrimo su laboratorinėmis pelėmis modelis

Laboratorinės pelės atsitiktinai suskirstytos į 5 grupes: (kontrolinę,  $AlCl_3$ , etanolio, kanapės ekstrakto, kanapės ekstrakto +  $AlCl_3$ ), po 8 peles kiekvienoje grupėje. Pelės sužymėtos pikrino rūgštimi ir buvo sveriamos kas antrą dieną. Kiekvienai pelei tiriama tirpalo tūris perskaičiuotas atsižvelgiant į kūno masę (20 g pelės kūno masei atitinkamai 0,1 ml tiriamo tirpalo). Tiriamų medžiagų įvedimui tiesiai į skrandį naudotas 1 ml švirkštas su specialiai paruošta adata – zondų, o tiriamų medžiagų įvedimui į pelės pilvo ertmę naudotas 1 ml insulininis švirkštas. Pelės gavo atitinkamus tirpalus 21 dieną. Kontrolinės grupės pelėms tiesiai į skrandį instiliuotas atitinkamas kiekis fiziologinio (0,9 proc. NaCl) tirpalo.  $AlCl_3$  grupės pelėms į pilvo ertmę įšvirkšta  $AlCl_3$  ištirpinto fiziologiniame tirpale (0.15  $LD_{50}$  Al vienam kūno masės kilogramui). Aliuminio vidutinė mirtina dozė ( $LD_{50}$ ) nustatoma remiantis I. Stanevičienės ir bendraautorių gautais rezultatais [52]. Etanolio grupės pelėms tiesiai į skrandį instiliuojamas atitinkamas kiekis 10 proc. etanolio. Kanapės ekstrakto grupės pelėms tiesiai į skrandį instiliuojamas atitinkamas kiekis *Cannabis sativa* L. ekstrakto. Kanapės ekstrakto +  $AlCl_3$  grupės pelėms tiesiai į skrandį instiliuojamas atitinkamas kiekis *Cannabis sativa* L. ekstrakto ir po 20 minučių į pilvo ertmę įšvirkščiamas  $AlCl_3$  ištirpintas fiziologiniame tirpale (7,5 mg arba 0,278 mmol arba 0.15  $LD_{50}$  Al vienam kūno masės kilogramui).

## 2.9. Kraujo, smegenų ir kepenų mėginių paruošimas

Po 21 tyrimo dienos laboratorinėms pelėms atlikta dekapitacija, cervikalinė dislokacija ir kraujo surinkimas, vadovaujantis Europos konvencija dėl eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų stuburinių gyvūnų apsaugos.

Kraujas surinktas į atskirus centrifuginius, heparinu apdorotus mėgintuvėlius.

Išpreparuoti organai (kepenys ir smegenys) plauti fiziologiniu tirpalu ir dedami į Petri lėkšteles, kurios nedelsiant atšaldomos ant ledo. Laboratorinių pelių organai pasveriami ir pridedama 9 kartus didesnis tūris (lyginant su organo mase) 1,15 proc. KCl tirpalo, kad gauti 10 proc. homogenatus, ir homogenizuojami, naudojant audinių smulktuvą. Kiekvieno homogenato paimama 0,5 ml į atskirus centrifuginius mėgintuvėlius, o likę homogenizatai centrifuguojami 10000 x g greičiu 15

minučių „Beckman J2-21“ centrifuga. Viršutinis centrifugatų sluoksnis (supernatantas arba „HF“) atsargiai nupilamas, išpilstomas į Eppendorf tipo mėgintuvėlius ir saugojimui užšaldomi -40 °C temperatūroje.

## 2.10. Redukuoto glutationo koncentracijos nustatymas pelių kraujyje

GSH koncentracija pelių kraujyje nustatyta pagal J. Sedlak ir bendraautorių pasiūlytą metodiką [53]. Reakcijos mišinį sudarė: 200 µl heparinizuoto kraujo, 1,8 ml dejonizuoto vandens ir 2 ml 0,6 M HClO<sub>4</sub>. Gautas mišinys centrifuguojamas 3000×g pagreičiu 10 minučių „Beckman J2-21“ centrifuga. Po centrifugavimo nusiurbtą viršutinį vandens sluoksnį (supernatanto frakciją) naudojome GSH koncentracijai nustatyti. GSH koncentracijos nustatymui į 1 ml supernatanto įpylėme 3,0 ml 0,4 M Tris-HCl buferinio tirpalo (pH 9,2) ir 50 µl DTNB. GSH koncentraciją gautame mišinyje nustatėme spektrofotometriškai matuojant sugertį ties 412 nm ilgio banga. Lyginamasis tirpalas ruošiamas lygiai tokiomis pačiomis sąlygomis, kaip ir tiriamasis tirpalas, vietoje heparinizuoto kraujo pilant 0,2 ml distiliuoto vandens. GSH koncentracija pelių kraujyje išreikšta µmol/l.

Apskaičiuojama pagal formulę:

$$C_{\mu mol/l} = D \times 1488,9705 \times V_0, \text{ kur } 1488,9705 - \text{koeficientas};$$

D – supernatanto sugerties reikšmė ties 412 nm ilgio banga;

V<sub>0</sub> – supernatanto viršutinio vandens sluoksnio tūris.

## 2.11. Malondialdehido koncentracijos nustatymas pelių smegenyse ir kepenyse

MDA koncentracijai pelių kepenyse ir smegenyse nustatyta pagal Uchiyama ir bendraautorių pasiūlytą metodiką [25]. Į 0,5 ml paruošto (kepenų ar smegenų) 10 proc. homogenato įpilta 3 ml 1 proc. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ir 1 ml 0,6 proc. TBR vandeninio tirpalo ir viskas gerai išmaišoma stikline lazdele. Gautas mišinys 45 min. inkubuojamas verdančio vandens vonioje ir po inkubacijos 10 min. šaldomas ledo vonioje. Į atšaldytą mišinį įpilama 4 ml *n*-butanolio ir stipriai sumaišoma. Butanolio sluoksnis atskiriamas centrifuguojant 10 min. 8000 x g pagreičiu „Beckman J2-21“ centrifuga. Po centrifugavimo viršutinis butanolio sluoksnis nusiurbiamas ir spektrofotometriškai matuojama sugertis ties 535 ir 520 nm ilgio banga. Lyginamasis tirpalas – TBR. MDA koncentracija pelių kepenyse ir smegenyse išreiškiama µmol/ vienam gramui kepenų ar smegenų masės.

Apskaičiuojama pagal formulę:

$$C_{\mu mol/g} = \frac{\Delta O.V. \times 100000}{113}, \text{ kur}$$

O.V. - optinių vienetų skirtumas

100000/113 – koeficientas

## 2.12. Katalazės aktyvumo nustatymas pelių smegenyse ir kepenyse

Katalazės aktyvumas pelių kepenų ir smegenų homogenatuose nustatytas remiantis Rachmanovos ir bendraautorių metodika [54]. Šis metodas pagrįstas spektrofotometriniu amonio molibdato komplekso su nesuskaidytu vandenilio peroksidu įvertinimu. Reakcijos mišinys sudarytas iš buferio-substrato mišinio („B-S“), pagaminto iš 10 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) ir 30 ml 0,08 proc. vandenilio peroksido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ir pridėdant 100 µl homogenato. Reakcijos mišinys inkubuotas 3 min. su smegenų homogenatu ir 1 min. su kepenų homogenatu 37 °C vandens vonioje. Fermentinė reakcija sustabdyta su 2 ml 4,5 proc. amonio molibdato tirpalu.

Susidariusio geltonos spalvos molibdato ir vandenilio peroksido komplekso absorbcija matuota spektrofotometru prie 410 nm bangos ilgio. Lyginamojo tirpalo sudėtis: 1 ml „B-S“ + 3 ml dejonizuoto vandens + 100 µl „HF“ ir inkubuoto 3 min. 37 °C vandens vonioje.

Katalazės aktyvumas skaičiuotas pagal formulę:

$$A = \frac{(E_k - E_b) \times 12 \times 10^3 \times 4,1 \times 10^6}{22,2 \times 10^6 \times 3(t)}, kur$$

A – katalazės aktyvumas (vnt./mg baltymo), Vnt. – tai katalazės kiekis, skaidantis 1 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per 1 min.;

12x10<sup>3</sup> – praskiedimo faktorius;

4,1x10<sup>6</sup> – perskaičiavimo į mikromolius koeficientas;

22,2x10<sup>6</sup> – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molinės ekstinkcijos koeficientas;

3(t) – inkubacijos laikas min. Inkubacijos laikas priklauso nuo „HF“ šaltinio (kepenų „HF“ atveju – 1 min., o smegenų „HF“ atveju – 3min.).

## 2.13. Statistinė duomenų analizė

Eksperimentų metu gauti duomenys analizuoti naudojant SPSS 20.0 (SPSS Inc., JAV) statistinį paketą ir Microsoft Office Excel (Microsoft, JAV). Eksperimentai kartoti tris kartus. Duomenys išreikšti vidurkais ± standartinis nuokrypis (SN). Apskaičiuotas tyrimo duomenų standartinis santykinis nuokrypis (SSN). Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp skirstinių nustatyti naudojant porinį „Stjudento t“ kriterijų ir neparametrinį Wilkoxono kriterijų priklausomoms imtims. Skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, jeigu reikšmingumo lygmuo lygus arba mažesnis nei 0,05 (p≤0,05).

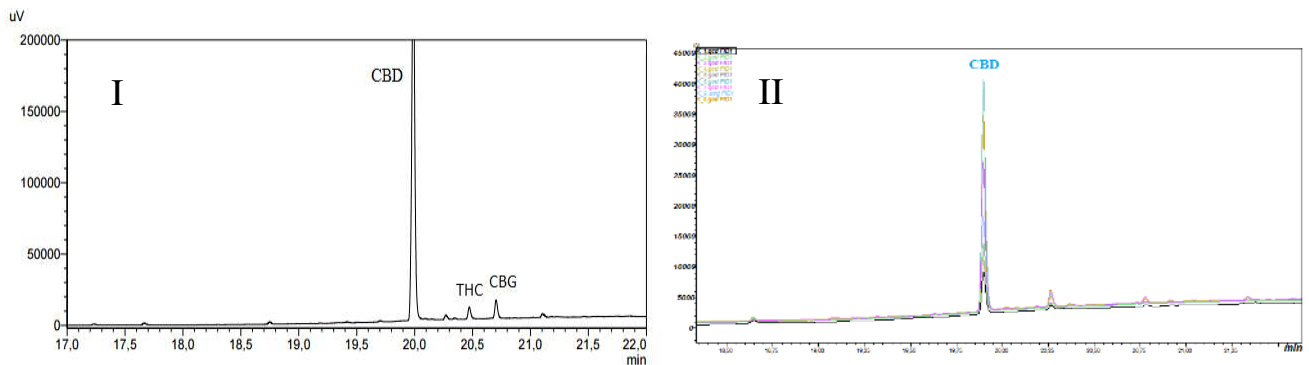
### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. *Cannabis sativa* L. žaliavos kokybinis įvertinimas

Vizualiai įvertinus sudžiovintos augalinės žaliavos kokybę nustatyta, kad lapai ir žiedai buvo tamsiai žalios spalvos, stiebai – šviesiai rudi, sėklos – pilkos/rusvos spalvos. Taip pat nustatytas sudžiovintos augalinės žaliavos likutinis drėgmės kiekis 6,09 proc.  $\pm$ 0,42 proc., kuris neviršijo 15 proc. žaliavos masės, t.y. maksimalios leidžiamos nuodžiūvio kiekio reikšmės, kurią rekomenduoja M. ElSholy ir kt. (2013 m.) [49].

#### 3.2. Kanabidiolio identifikavimas *Cannabis sativa* L. ekstraktuose

Kanabidiolis FUTURA 75 veislės pluoštinių kanapių ekstrakte identifikuotas dujų chromatografijos metodu pagal sulaikymo laiką. 5 paveiksle pateikti pluoštinių kanapių ekstrakto mėginio ir CBD standartinio tirpalo dujų chromatografijos chromatogramos. Ekstraktų mėginiuose nustatyto CBD sulaikymo laikai sutapo su standartu – 19,9 min.



5 pav. *Cannabis sativa* L. mėginių chromatograma. I – CBD standartinio tirpalo chromatograma; II – *Cannabis sativa* L. mėginių chromatograma.

#### 3.3. Kanabidiolio ir bendro fenolinių junginių kiekio įvairavimo nustatymas *Cannabis sativa* L. ekstraktuose

Vertinant kanabidiolio kiekio įvairavimą pluoštinių kanapių FUTURA 75 veislės ekstraktuose, nustatyta, kad didžiausias ( $p \leq 0,05$ ) CBD kiekis gaunamas ekstrahuojant 1,0 g tiriamos

medžiagos svėrinį su 30 proc. etanolium, o mažiausias ( $p \leq 0,05$ ) - ekstrahuojant 0,1 g su 10 proc. etanolium (3 lentelė).

**3 lentelė. Kanabidiolio kiekio ( $\mu\text{g/g}$ ) įvairavimas skirtingų pluoštinių kanapių svėrinų ir etanolio koncentracijų ekstraktuose.**

<b>Etanolio koncentracija/ žaliavos svėrinys</b>	<b>0,1 g žaliavos</b>	<b>0,5 g žaliavos</b>	<b>1,0 g žaliavos</b>
<b>10 proc. etanolis</b>	18,532	21,718	22,639
<b>20 proc. etanolis</b>	26,625	28,227	37,564
<b>30 proc. etanolis</b>	57,245	73,008	84,662

Pagal galo rūgšties ekvivalentą apskaičiavus bendrą fenolinių junginių kiekį pluoštinių kanapių ekstraktuose (4 lentelė) nustatyta, kad mažiausias fenolinių junginių kiekis gautas ekstrahuojant 0,1 g su 10 proc. etanolium, o didžiausias - 1,0 g tiriamos medžiagos svėrinį su 30 proc. etanolium, tačiau bendro fenolinių junginių kiekio skirtumas, ekstrahuojant 30 proc., 20 proc. ir 10 proc. etanolium, pluoštinių kanapių ekstraktuose buvo statistiškai nereikšmingas.

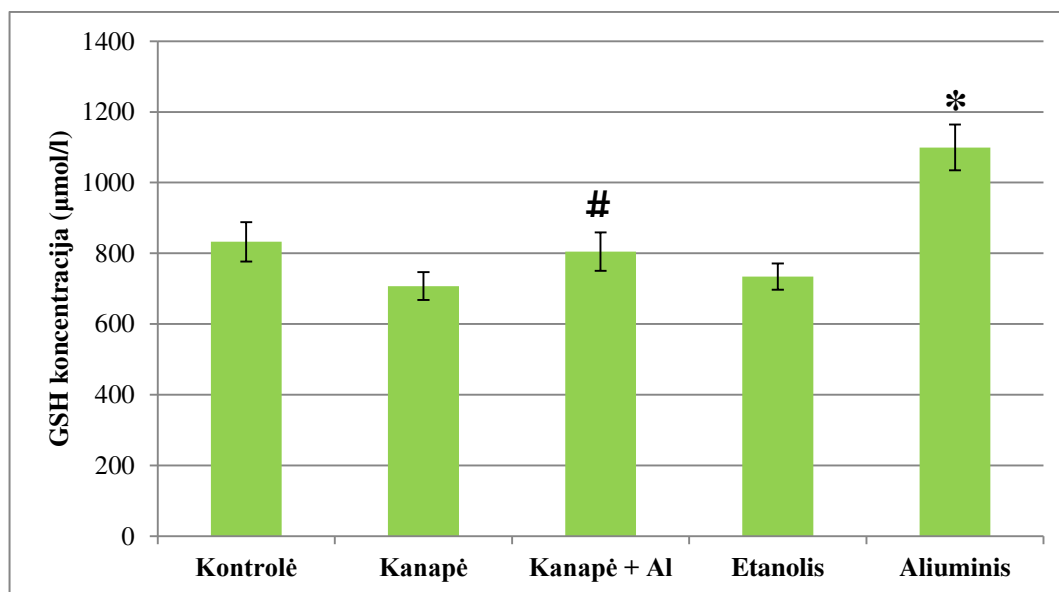
**4 lentelė. Bendras fenolinių junginių kiekio ( $\text{mg GRE/g}$ ) įvairavimas skirtingų pluoštinių kanapių svėrinų ir etanolio koncentracijų ekstraktuose.**

<b>Etanolio koncentracija/ žaliavos svėrinys</b>	<b>0,1 g</b>	<b>0,5g</b>	<b>1,0g</b>
<b>10 proc.</b>	0,216	1,182	1,688
<b>20 proc.</b>	0,256	1,206	1,712
<b>30 proc.</b>	0,275	1,228	1,755

Literatūroje yra duomenų, kad 10 dienų peles girdant 5 proc. etanolium nustatyta kepenų pažaida bei steatozė [55]. Taip pat yra duomenų, kad pelėms tiesiai į skrandį instilijuojant 10 proc. etanolį, nustatyti statistiškai reikšmingi antioksidacinės sistemos fermentų pokyčiai [56]. Kadangi trūksta duomenų apie didesnių etanolio koncentracijų ilgalaikio vartojimo poveikį pelių organizmui ir dėl galimo žalingo poveikio pelių organizmui, kuris turėtų reikšmės tyrimui, o bendras fenolinių junginių kiekis statistiškai reikšmingai nesiskyrė tarp 10 proc. 20 proc. 30 proc. etanolio koncentracijų pluoštinių kanapių ekstraktuose, eksperimentams su pelėmis pasirinkta tiriamąjį ekstraktą gaminti imant 1,0 g žaliavos svėrinį ir jį ekstrahuoti 10 proc. etanolium.

### 3.4. *Cannabis sativa* L. poveikis redukuoto glutationo koncentracijai pelių kraujyje

Redukuoto glutationo koncentracija pelių kraujyje vertinta po 21 dienos *Cannabis sativa* L. žaliavos ekstrakto įvedimo tiesiai į pelės skrandį. Gauti kontrolinės pelių grupės kraujo GSH koncentracijų rezultatai ( $\mu\text{mol/l}$ ) prilyginti 100 proc., o kitų tiriamųjų grupių rezultatai taip pat išreikšti procentais, juos paskaičiuojant nuo kontrolės rezultatų. Antioksidanto GSH koncentracija kontrolinės grupės pelėms siekė  $832,52 \pm 55,81$  ( $\mu\text{mol/l}$ ). Kanapės ekstrakto grupės pelėms GSH koncentracija siekė  $707,4 \pm 39,05$   $\mu\text{mol/l}$  ir lyginant su kontrolinės grupės pelėmis, GSH koncentracija sumažėjo 15,03 proc. ( $p > 0,05$ ). Kanapės ekstrakto +  $\text{AlCl}_3$  grupės pelėms nustatyta GSH koncentracija  $804,52 \pm 54,4$   $\mu\text{mol/l}$  ir buvo 3,36 proc. ( $p > 0,05$ ) mažesnė už kontrolinę grupę bei 26,81 proc. ( $p \leq 0,05$ ) mažesnė už  $\text{AlCl}_3$  grupę. Taip pat GSH koncentracija pelių kraujyje, kurioms buvo sušvirktas 10 proc. etanolis siekė  $733,87 \pm 37,17$   $\mu\text{mol/l}$  ir lyginant su kontrolinės grupės pelėmis koncentracija sumažėjo 11,85 proc. ( $p > 0,05$ ). GSH koncentracija aliuminio grupės pelių smegenyse siekė  $1099,29 \pm 64,85$   $\mu\text{mol/l}$ , tai reiškia buvo statistiškai reikšmingai didesnė 32,03 proc. Rezultatai pateikti 6 paveiksle.



6 pav. Redukuoto glutationo koncentracija ( $\mu\text{mol/l}$  baltymo) pelių kraujyje

\* - statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su kontrolinių pelių grupe

# - statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su  $\text{AlCl}_3$  paveiktų pelių grupe

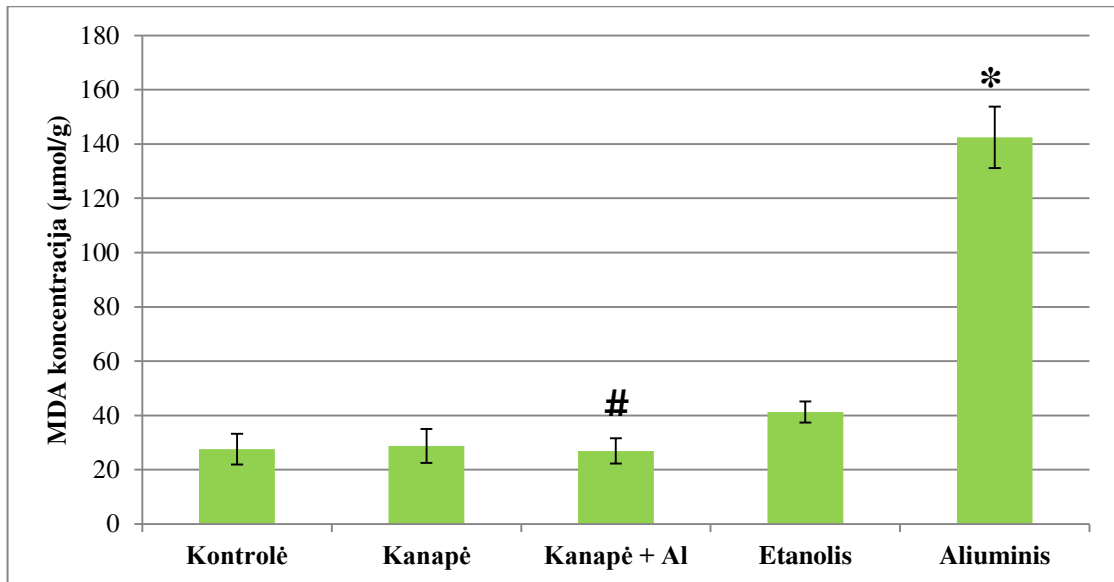
Tyrimo metu nustatyta, kad 21 dieną trukusi intoksikacija aliuminiu sukėlė statistiškai reikšmingą GSH koncentracijos padidėjimą pelių kraujyje. Literatūros duomenimis, aliuminis sumažina GSH koncentracija kepenyse ir smegenyse [57]. Šio nefermentinio antioksidanto padidėjimas kraujyje gali būti siejamas su tuo, kad aliuminis daugiausia absorbuojamas virškinimo

trakte ir akumuliuojasi kūno audiniuose, daugiausiai smegenyse bei kepenyse, ir mažai kraujyje [43]. Tiriant Alzheimerio liga sergančius pacientus, nustatytos statistiškai reikšmingai didesnės plazmos, eritrocitų ir leukocitų GSH koncentracijos nei sveikų pacientų [58]. Pelių grupėje, kurioms girdytas tik kanapės ekstraktas, nustatytas GSH koncentracijos sumažėjimas buvo statistiškai nereikšmingas, todėl galime daryti išvadą, kad kanapės ekstraktas neturi įtakos antioksidacinio fermento pokyčiams pelių kraujyje. Pelių grupė, kuriai buvo suleista aliuminio tirpalo oksidacinio streso sukėlimui ir po 20 min. į pilvo ertmę švirksčiama kanapės ekstrakto po 21 dienos neparodė reikšmingų GSH koncentracijos pokyčių ir beveik nesiskyrė nuo kontrolinės grupės pelių, tačiau lyginant su aliuminio grupės pelėmis GSH koncentracija statistiškai reikšmingai sumažėjo. Iš šių rezultatų galima spręsti, kad kanapės ekstraktas atstato nekontroliuojamo redukuoto glutationo sintezę, sukkelto pelių kraujo autooksidacinei apsaugos sistemai aliuminio jonais, iki kontrolinių pelių kraujyje nustatomo kiekio. Etanolio grupės pelių kraujyje nustatytas GSH koncentracijos sumažėjimas nebuvo statistiškai reikšmingas, todėl galima daryti prielaidą, kad 10 proc. etanolis įtakos rezultatams neturėjo.

### **3.5. *Cannabis sativa* L. ekstrakto poveikis malondialdehido koncentracijai pelių smegenyse**

Malondialdehido koncentracija pelių smegenyse vertinta po 21 dieną trukusio kasdieninio *Cannabis sativa* L. žaliavos ekstrakto įvedimo tiesiai į pelės skrandį. Gauti kontrolinės pelių grupės MDA koncentracijų smegenyse rezultatai ( $\mu\text{mol/g}$ ) prilyginti 100 proc., o kitų tiriamųjų grupių rezultatai taip pat išreikšti procentais, juos paskaičiuojant nuo kontrolės rezultatų. Kontrolinėje pelių grupėje lipidų peroksidacijos galutinio produkto MDA koncentracija smegenyse siekė  $27,58 \pm 5,67 \mu\text{mol/g}$ . Kanapės ekstrakto grupės pelių smegenyse MDA koncentracija padidėjo 4,28 proc. ( $p > 0,05$ ), lyginant su kontroline grupe, ir siekė  $28,76 \pm 6,23 \mu\text{mol/g}$ . Tuo tarpu girdant peles 10 proc. etanoliniu tirpalu nustatyta  $41,26 \pm 3,9 \mu\text{mol/g}$  MDA koncentracija pelių smegenyse, kuri buvo 49,60 proc. didesnė nei kontrolinėje grupėje, tačiau statistiškai reikšmingo skirtumo taip pat nesudarė. Injekuojant  $\text{AlCl}_3$  tirpalą pelėms į pilvą 21 dieną, nustatyta, kad MDA koncentracija pelių smegenyse statistiškai reikšmingai padidėjo (416,64 proc.), lyginant su kontroline grupe ir siekė  $142,49 \pm 11,32 \mu\text{mol/g}$ , o po  $\text{AlCl}_3$  sukkelto prooksidantinio poveikio sugirdytas kanapės ekstraktas statistiškai reikšmingai (82,12 proc.) sumažina šią koncentraciją iki  $26,90 \pm 3,90 \mu\text{mol/l}$  ir pasiekia kontrolinėje pelių grupėje nustatytą MDA koncentraciją. Rezultatai pateikti 7 paveiksle.





**7 pav. Malondialdehido koncentracija (µmol/g baltymo) pelių smegenyse**

\* - statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su kontrolinių pelių grupe

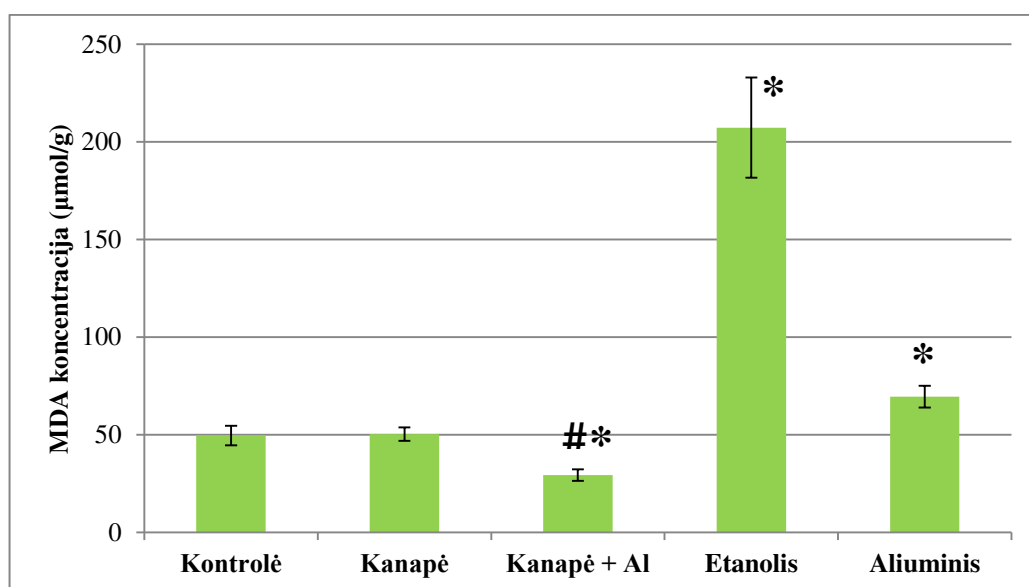
# - statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su AlCl<sub>3</sub> paveiktų pelių grupe

Tyrimo metu nustatyta, kad 21 dieną trukusi intoksikacija aliuminiu sukėlė statistiškai reikšmingą MDA koncentracijos padidėjimą pelių smegenyse ir tai sutampa su kitų mokslininkų gautais rezultatais, įrodančiais AlCl<sub>3</sub> sugebėjimą sukelti oksidacinį stresą smegenyse [57]. Mūsų tyrimo metu nustatytas reikšmingas MDA koncentracijos padidėjimas smegenyse taip pat gali būti siejamas su prieš tai minėta aliuminio akumuliacija smegenų audiniuose ir jo neurotoksinis poveikiu [58, 43]. Pelių grupėje, kurioje gyvūnai girdyti tik kanapės ekstraktu, reikšmingų MDA koncentracijos pokyčių nenustatyta ir ji praktiškai išliko tokia pati, kaip kontrolinėje grupėje, o tai leidžia teigti, kad nesukėlus oksidacinio streso kanapės ekstraktas nedaro įtakos antrinio lipidų peroksidacijos produkto gamybai. Tuo tarpu po AlCl<sub>3</sub> sukulto prooksidantinio poveikio tirta ekstrakto statistiškai reikšmingas MDA koncentracijos sumažinimas leidžia teigti, kad kanapės ekstraktas apsaugo smegenų lipidus nuo peroksidacijos. Etanolio grupės pelių smegenyse nustatytas MDA koncentracijos padidėjimas nebuvo statistiškai reikšmingas, todėl galima daryti prielaidą, kad 10 proc. etanolis įtakos rezultatams neturėjo.

### **3.6. *Cannabis sativa* L. ekstrakto poveikis malondialdehido koncentracijai pelių kepenyse**

Malondialdehido koncentracija pelių kepenyse vertinta po 21 dieną trukusio kasdieninio *Cannabis sativa* L. žaliavos ekstrakto įvedimo tiesiai į pelės skrandį. Gauti kontrolinės pelių grupės MDA koncentracijų kepenyse rezultatai (µmol/g) prilyginti 100 proc., o kitų tiriamųjų grupių rezultatai

taip pat išreikšti procentais, juos paskaičiuojant nuo kontrolės rezultatų. Kontrolinėje pelių grupėje lipidų peroksidacijos galutinio produkto MDA koncentracija kepenyse siekė  $49,59 (\pm 5,01) \mu\text{mol/g}$ . Kanapės ekstrakto grupės pelių kepenyse MDA koncentracija padidėjo 1,94 proc. ( $p > 0,05$ ), lyginant su kontroline grupe, ir siekė  $48,63 \pm 4,63 \mu\text{mol/g}$ . Tuo tarpu girdant peles 10 proc. etanoliniu tirpalu nustatyta  $207,21 \pm 25,63 \mu\text{mol/g}$  MDA koncentracija pelių kepenyse, kuri buvo 317,85 proc. didesnė ir šis skirtumas tarp grupių yra statistiškai reikšmingas. Injekuojant  $\text{AlCl}_3$  tirpalą pelėms į pilvą 21 dieną, nustatyta, kad MDA koncentracija pelių smegenyse statistiškai reikšmingai padidėjo (39,99 proc.), lyginant su kontroline grupe ir siekė  $69,42 \pm 5,52 \mu\text{mol/g}$ , o po  $\text{AlCl}_3$  sukkelto prooksidantinio poveikio sugirdytas kanapės ekstraktas statistiškai reikšmingai (53,5 proc.) sumažina šią koncentraciją iki  $32,28 \pm 2,88 \mu\text{mol/l}$ , taip pat statistiškai reikšmingai (34,35 proc.) sumažina MDA koncentraciją lyginat su kontroline grupe. Rezultatai pateikti 8 paveiksle.



**8 pav. Malondialdehido koncentracija ( $\mu\text{mol/g}$  baltymo) pelių kepenyse**

\* - statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su kontrolinių pelių grupe

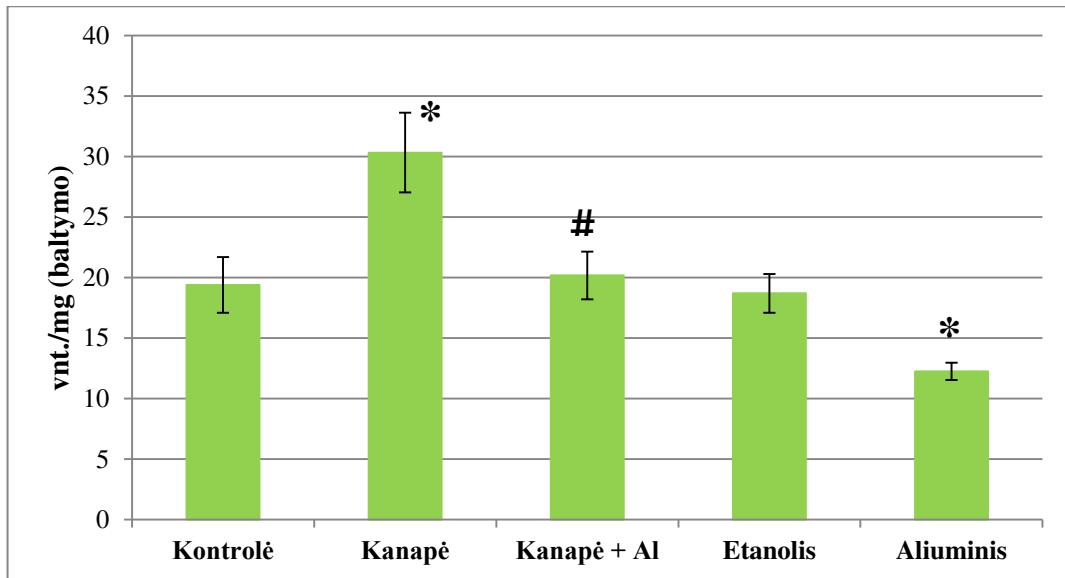
# - statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su  $\text{AlCl}_3$  paveiktų pelių grupe

Tyrimo metu nustatyta, kad 21 dieną trukusi intoksikacija aliuminiu sukėlė statistiškai reikšmingą MDA koncentracijos padidėjimą pelių kepenyse ir tai sutampa su kitų mokslininkų gautais rezultatais, įrodančiais  $\text{AlCl}_3$  sugebėjimą sukelti prooksidantinį poveikį kepenyse bei jo hepatotoksišką poveikį, tačiau aliuminio silpnesnis poveikis kepenyse lyginant su poveikiu smegenyse grindžiamas tuo, kad aliuminis esantis lizosomose pašalinamas hepatocitų su tulžimi [59, 44]. Pelių grupėje, kurioje gyvūnai girdyti tik kanapės ekstraktu, reikšmingų MDA koncentracijos pokyčių nenustatyta ir ji praktiškai išliko tokia pati, kaip kontrolinėje grupėje, o tai leidžia teigti, kad nesukėlus oksidacinio streso kanapės ekstraktas nedaro įtakos antrinio lipidų peroksidacijos produkto gamybai. Pelių grupė, kuriai buvo suleista aliuminio tirpalo prooksidantinio poveikio sukėlimui ir po 20 min. į pilvo ertmę

švirksčiama kanapės ekstrakto po 21 dienos neparodė reikšmingų MDA koncentracijos pokyčių ir beveik nesiskyrė nuo kontrolinės grupės pelių, tačiau lyginant su  $AlCl_3$  grupės pelėmis MDA koncentracija statistiškai reikšmingai sumažėjo, todėl galima teigti, kad kanapės ekstraktas apsaugojo kepenų lipidus nuo peroksidacijos. Etanolio grupės pelių kepenyse nustatytas MDA koncentracijos padidėjimas buvo reikšmingas, o tai leidžia teigti, kad 10 proc. etanolis sukėlė prooksidantinį poveikį kepenų ląstelėse. Tyrime, kuriame tirtas lėtinis etanolio poveikis ir pelės girdytos 5 proc. etanoliumi 10 dienų, nustatytas reikšmingas MDA koncentracijos padidėjimas ir kepenų pažeidimai bei steatozė [55]. Kadangi pagrindinis etanolio metabolizmo kelias yra per kepenis, tai galėjo lemti tokį didelį MDA koncentracijos skirtumą lyginant su kontrolinės grupės pelėmis. Remiantis šiais rezultatais galima daryti prielaidą, kad kanapės ekstraktas taip pat sumažino neigiamą etanolio poveikį.

### **3.7. *Cannabis sativa* L. ekstrakto poveikis katalazės aktyvumui pelių smegenyse**

Katalazės aktyvumas pelių smegenyse vertintas po 21 dieną trukusio kasdieninio *Cannabis sativa* L. žaliavos ekstrakto įvedimo tiesiai į pelės skrandį. Gauti kontrolinės pelių grupės CAT aktyvumo smegenyse rezultatai ( $\mu\text{mol/g}$ ) prilyginti 100 proc., o kitų tiriamųjų grupių rezultatai taip pat išreikšti procentais, juos paskaičiuojant nuo kontrolės rezultatų. Kontrolinėje pelių grupėje katalazės aktyvumas smegenyse siekė  $19,38 \pm 2,3$  vnt./mg. Kanapės ekstrakto grupės pelių smegenyse katalazės aktyvumas padidėjo 56,44 proc. ( $p \leq 0,05$ ) lyginant su kontroline grupe ir siekė  $30,32 \pm 3,29$  vnt./mg. Tuo tarpu girdant peles 10 proc. etanoliniu tirpalu nustatytas  $18,69 \pm 1,59$  vnt./mg CAT aktyvumas pelių smegenyse, kuris buvo 3,56 proc. mažesnis nei kontrolinėje grupėje, tačiau statistiškai reikšmingo skirtumo taip pat nesudarė. Injekuojant  $AlCl_3$  tirpalą pelėms į pilvą 21 dieną, nustatyta, kad CAT aktyvumas pelių smegenyse statistiškai reikšmingai sumažėjo (36,84 proc.), lyginant su kontroline grupe ir siekė  $12,24 \pm 0,71$  vnt./mg, o po  $AlCl_3$  sukulto prooksidantinio poveikio sugirdytas kanapės ekstraktas statistiškai reikšmingai (64,79 proc.) padidina šį aktyvumą iki  $20,17 \pm 1,97$  vnt./mg ir pasiekia kontrolinėje pelių grupėje nustatytą CAT aktyvumą. Rezultatai pateikti 9 paveiksle.



**9 pav. Katalazės aktyvumas (vnt./mg baltymo) pelių smegenyse**

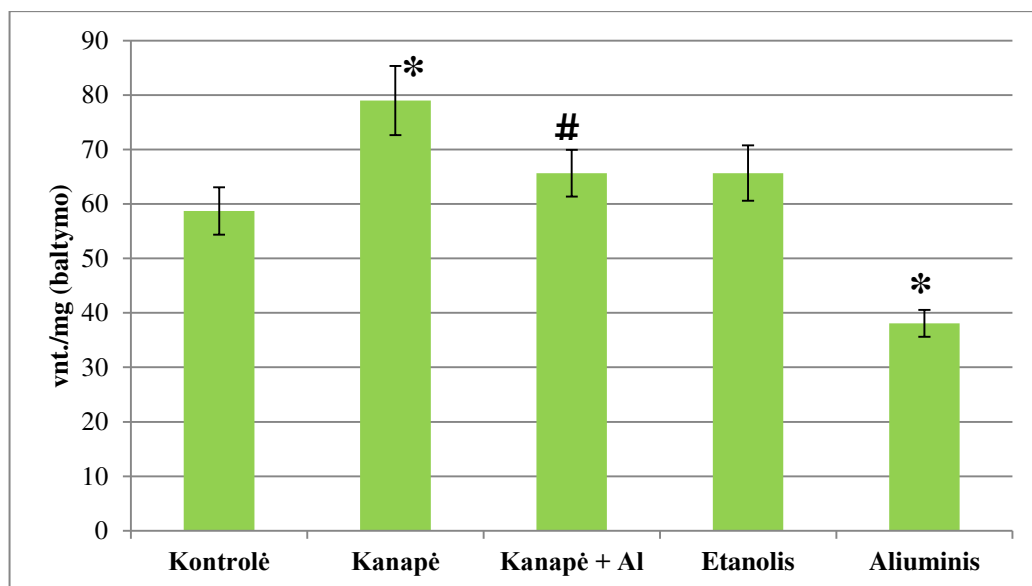
\* - statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su kontrolinių pelių grupe

# - statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su  $AlCl_3$  paveiktų pelių grupe

Tyrimo metu nustatyta, kad 21 dieną trukusi intoksikacija aliuminiu sukėlė statistiškai reikšmingą CAT aktyvumo sumažėjimą pelių smegenyse ir tai sutampa su kitų mokslininkų gautais rezultatais, įrodančiais, kad aliuminis sukėlė oksidacinius pažeidimus [57]. Pelių grupėje, kurioje gyvūnai girdyti tik kanapės ekstraktu, nustatytas reikšmingas CAT aktyvumo padidėjimas lyginant su kontroline grupe ir tai sutampa su kitų mokslininkų gautais rezultatais, kur vertintas antioksidacinis aktyvumas pelių smegenyse, įrodantis, kad kanapės ekstraktas aktyvuoja antioksidacinę sistemą [42]. Pelių grupė, kuriai buvo suleista aliuminio tirpalo prooksidantinio poveikio sukėlimui ir po 20 min. į pilvo ertmę švirkščiamas kanapės ekstraktas po 21 dienos neparodė reikšmingų CAT aktyvumo pokyčių ir beveik nesiskyrė nuo kontrolinės grupės pelių, tačiau lyginant su  $AlCl_3$  grupės pelėmis CAT aktyvumas statistiškai reikšmingai padidėjo, todėl galima teigti, kad kanapės ekstraktas apsaugojo smegenų ląsteles nuo neigiamo aliuminio jonų poveikio. Literatūros duomenimis fenoliniai junginiai padidina CAT aktyvumą ir sumažina aliuminio sukeltus oksidacinius pažeidimus, taip apsaugodami smegenų ląsteles nuo neurotoksinio  $AlCl_3$  poveikio [57]. Etanolio grupės pelių smegenyse nustatytas CAT aktyvumo padidėjimas nebuvo statistiškai reikšmingas, todėl galima daryti prielaidą, kad 10 proc. etanolis įtakos rezultatams neturėjo.

### 3.8. *Cannabis sativa* L. ekstrakto poveikis katalazės aktyvumui pelių kepenyse

Katalazės aktyvumas pelių kepenyse vertintas po 21 dieną trukusio kasdieninio *Cannabis sativa* L. žaliavos ekstrakto įvedimo tiesiai į pelės skrandį. Gauti kontrolinės pelių grupės CAT aktyvumo kepenyse rezultatai ( $\mu\text{mol/g}$ ) prilyginti 100 proc., o kitų tiriamųjų grupių rezultatai taip pat išreikšti procentais, juos paskaičiuojant nuo kontrolės rezultatų. Kontrolinėje pelių grupėje katalazės aktyvumas kepenyse siekė  $58,70 \pm 4,34$  vnt./mg. Kanapės ekstrakto grupės pelių kepenyse katalazės aktyvumas padidėjo 34,53 proc. ( $p \leq 0,05$ ) lyginant su kontroline grupe ir siekė  $78,97 \pm 6,36$  vnt./mg. Tuo tarpu girdant peles 10 proc. etanoliniu tirpalu nustatytas  $65,67 \pm 5,09$  vnt./mg CAT aktyvumas pelių kepenyse, kuris buvo 11,87 proc. didesnis nei kontrolinėje grupėje, tačiau statistiškai reikšmingo skirtumo taip pat nesudarė. Injekuojant  $\text{AlCl}_3$  tirpalą pelėms į pilvą 21 dieną, nustatyta, kad CAT aktyvumas pelių kepenyse statistiškai reikšmingai sumažėjo (35,13 proc.), lyginant su kontroline grupe ir siekė  $38,08 \pm 2,46$  vnt./mg, o po  $\text{AlCl}_3$  sukulto prooksidantinio poveikio sugirdytas kanapės ekstraktas statistiškai reikšmingai (72,37 proc.) padidina šį aktyvumą iki  $65,64 \pm 4,30$  vnt./mg ir pasiekia kontrolinėje pelių grupėje nustatytą CAT aktyvumą. Rezultatai pateikti 10 paveiksle.



**10 pav. Katalazės aktyvumas (vnt./mg baltymo) pelių kepenyse**

\* - statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su kontrolinių pelių grupe

# - statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su  $\text{AlCl}_3$  paveiktų pelių grupe

Tyrimo metu nustatyta, kad 21 dieną trukusi intoksikacija aliuminiu sukėlė statistiškai reikšmingą CAT aktyvumo sumažėjimą pelių kepenyse todėl galima teigti, kad aliuminis sukėlė oksidacinius pažeidimus. CAT aktyvumo sumažėjimas kepenų ląstelėse nustatytas mokslininkų

tyrime, kuriame po 30 dienų trukusios intoksikacijos aliuminiu nustatyti histologiniai kepenų pokyčiai bei kepenų funkcijos sutrikimas [59]. Pelių grupėje, kurioje gyvūnai girdyti tik kanapės ekstraktu, nustatytas reikšmingas CAT aktyvumo padidėjimas lyginant su kontroline grupe ir tai sutampa su kitų mokslininkų gautais rezultatais, įrodančiais, kad kanapės ekstraktas aktyvuoja antioksidacinę sistemą [60]. Pelių grupė, kuriai buvo suleista aliuminio tirpalo prooksidantinio poveikio sukėlimui ir po 20 min. į pilvo ertmę švirkščiamas kanapės ekstrakto po 21 dienos neparodė reikšmingų CAT aktyvumo pokyčių ir beveik nesiskyrė nuo kontrolinės grupės pelių, tačiau lyginant su  $AlCl_3$  grupės pelėmis CAT aktyvumas statistiškai reikšmingai padidėjo, todėl galima teigti, kad kanapės ekstraktas apsaugojo kepenų ląsteles nuo neigiamo aliuminio jonų poveikio. Etanolio grupės pelių smegenyse nustatytas CAT aktyvumo padidėjimas nebuvo statistiškai reikšmingas, todėl galima daryti prielaidą, kad 10 proc. etanolis įtakos rezultatams neturėjo.

## 4. IŠVADOS

1. Įvertinus pluoštinių kanapių etanoliniuose ekstraktuose kanabidiolio ir bendrą fenolinių junginių kiekį, didžiausias kanabidiolio kiekis nustatytas ekstrahuojant žaliavą 30 proc. etanoliu, o bendram fenolinių junginių kiekiui statistiškai reikšmingų skirtumų, naudojant skirtingų koncentracijų etanolio tirpalus, nenustatyta.
2. *Cannabis sativa* L. ekstraktas statistiškai reikšmingai sumažino redukuoto glutationo koncentraciją pelių, paveiktų aliuminio jonais, kraujyje ir stabilizavo oksidacinio streso rodiklio kiekį iki kontrolinių pelių kraujyje nustatomo kiekio, todėl galima teigti, kad jis normalizuoja nekontroliuojamą redukuoto glutationo sintezę, sukeltą aliuminio jonais.
3. *Cannabis sativa* L. ekstraktas statistiškai reikšmingai sumažino MDA koncentraciją pelių, paveiktų aliuminio jonais, kepenyse ir smegenyse ir apsaugojo šių organų lipidus nuo peroksidacijos. Nustatytas stiprus prooksidantinis poveikis etanolinio ekstrahento kepenų lipidų peroksidacijai. Todėl galima teigti, kad ekstraktas pasižymi antioksidaciniu aktyvumu.
4. *Cannabis sativa* L. ekstraktas statistiškai reikšmingai padidino katalazės aktyvumą kontrolinių pelių bei pelių, paveiktų aliuminio jonais, kepenyse ir smegenyse, tai rodo ekstrakto stiprų stimuliuojantį poveikį, kepenų ir smegenų antioksidacinės apsaugos sistemai.

## **5. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS**

Tyrimo metu nustatyta, kad tinkamiausios pluoštinių kanapių ekstrakcijos sąlygos, norinti išekstrahuoti didžiausią kanabidiolio kiekį, yra naudojant ekstrahentą 30 proc. etanolį, tačiau literatūros duomenimis didelės etanolio koncentracijos turi neigiamą poveikį pelių organizmui, todėl vertėtų atlikti tolimesnius tyrimus taikant liofilizacijos metodą etanoliniams ekstraktams.



## 6. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Tegeli V, Karpe P, Katve V. Importance of free radical and antioxidant on human health. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*. 2014;4(4).
2. Mujika JI, Ruipérez F, Infante I, Ugalde JM, Exley C, Lopez X. Pro-oxidant activity of aluminum: stabilization of the aluminum superoxide radical ion. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2011;115(24):6717-23.
3. Atta EM, Mohamed NH, Abdelgawad AA. Antioxidants: an overview on the natural and synthetic types. *European Chemical Bulletin*. 2017;6(8):365-75.
4. 3D-867 Dėl pluoštinių kanapių auginimo priežiūros ir pluoštinių kanapių produktų tiekimo rinkaikontrolės tvarkos aprašo patvirtinimo. E-seimas.lrs.lt [Prieiga per internetą]. [cituojama pagal 2019 m. kovo 20 d.] <https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/TAIS.463416/asr>
5. McPartland JM, Duncan M, Di Marzo V, Pertwee RG. Are cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. *British journal of pharmacology*. 2015;172(3):737-53.
6. Borges R, Batista J, Viana R, Baetas A, Orestes E, Andrade M, Honório K, da Silva A. Understanding the molecular aspects of tetrahydrocannabinol and cannabidiol as antioxidants. *Molecules*. 2013;18(10):12663-74.
7. Kubilienė A, Marksa M, Barauskaite J. Antioxidant properties of *Cannabis sativa* L. by FRAP and CUPRAC spectrophotometry. Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин : матеріали III міжнародної науково-практичної internet-конференції м. Харків (Україна), 26-28 листопада 2018 р. Вид-во НФаУ: 2018. p. 17.
8. Pisanti S, Malfitano AM, Ciaglia E, Lamberti A, Ranieri R, Cuomo G, Abate M, Faggiana G, Proto MC, Fiore D, Laezza C. Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. *Pharmacology & therapeutics*. 2017;175:133-50.
9. Andre CM, Hausman JF, Guerriero G. *Cannabis sativa*: the plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in plant science*. 2016;7:19.
10. *Cannabis sativa* L. Plants of the World Online. Kew Science [Prieiga per internetą]. [cituojama pagal 2019 m. kovo 18 d.] <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:306087-2>
11. Hartsel JA, Eades J, Hickory B, Makriyannis A. *Cannabis sativa* and Hemp. In *Nutraceuticals* Academic Press. 2016. pp. 735-754.
12. Jankauskienė Z, Gruzdevienė E. Physical parameters of dew retted and water retted hemp (*Cannabis sativa* L.) fibres. *Zemdirbyste-Agriculture*. 2013;100(1):71–80.

13. Pollastro F, Minnasi A, Fresu L. Cannabis phenolics and their bioactivities. *Current Medicinal Chemistry*, 2017; 24(10): 1-42.
14. ElSohly MA, Radwan MM, Gul W, Chandra S, Galal A. *Phytochemistry of Cannabis sativa L. InPhytocannabinoids 2017* (pp. 1-36). Springer, Cham.
15. De Backer B, Debrus B, Lebrun P, Theunis L, Dubois N, Decock L, Verstraete A, Hubert P, Charlier C. Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *Journal of Chromatography B*. 2009;877(32):4115-24.
16. Sultan SR, Millar SA, England TJ, O'Sullivan SE. A systematic review and meta-analysis of the haemodynamic effects of Cannabidiol. *Frontiers in pharmacology*. 2017;8:81.
17. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2009;2(5):270-8
18. Banjarnahor SD, Artanti N. Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia*. 2015;23(4):239-44.
19. Carocho M, Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*. 2013;51:15-25.
20. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*. 2014;224:164-75.
21. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*. 2014.
22. Gagné F. Oxidative stress. *Biochemical Ecotoxicology. Principles and Methods*. 2014.
23. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*. 2012;5(1):9.
24. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014;2014.
25. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursors in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 1978;86:271-8.
26. Nimse SB, Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Rsc Advances*. 2015;5(35):27986-8006.
27. Suci NT, Farida T, Khairuddin D, Anni A, Arifin S, Nasrum M. (2017) Protective Effect of Cocoa Extract on Malondialdehyde Level in Ultraviolet B Induced - Albino Mice Skin. *American Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2, 41-45.

28. Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and cancer*. 2009;62(1):1-20.
29. Thimraj TA, George L, Asrafuzzaman S, Upadhyay S, Ganguly K. Oxidative Signaling in Chronic Obstructive Airway Diseases. In *Immunity and Inflammation in Health and Disease* Academic Press. 2018. pp. 79-98.
30. Blondet NM, Messner DJ, Kowdley KV, Murray KF. Mechanisms of hepatocyte detoxification. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Sixth Edition)*. 2018. pp. 981-1001.
31. Alfonso-Prieto M, Vidossich P, Rovira C. The reaction mechanisms of heme catalases: an atomistic view by ab initio molecular dynamics. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2012;525(2):121-30.
32. Heit C, Marshall S, Singh S, Yu X, Charkoftaki G, Zhao H, Orlicky DJ, Fritz KS, Thompson DC, Vasiliou V. Catalase deletion promotes prediabetic phenotype in mice. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017;103:48-56.
33. Selvaratnam J, Robaire B. Overexpression of catalase in mice reduces age-related oxidative stress and maintains sperm production. *Experimental gerontology*. 2016;84:12-20.
34. Vasylykiv OY, Kubrak OI, Storey KB, Lushchak VI. Catalase activity as a potential vital biomarker of fish intoxication by the herbicide aminotriazole. *Pesticide biochemistry and physiology*. 2011;101(1):1-5.
35. Chen Y, Dong H, Thompson DC, Shertzer HG, Nebert DW, Vasiliou V. Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;60:38-44.
36. Mazzetti AP, Fiorile MC, Primavera A, Bello ML. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochemistry international*. 2015;82:10-8.
37. Martin HL, Teismann P. Glutathione a review on its role and significance in Parkinson's disease. *The FASEB journal*. 2009;23(10):3263-72.
38. Kumar V, Gill KD. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in aluminium neurotoxicity and its amelioration: a review. *Neurotoxicology*. 2014;41:154-66.
39. Exley C, House ER. Aluminium in the human brain. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*. 2011;142(4):357-63.
40. Tomljenovic L. Aluminum and Alzheimer's disease: after a century of controversy, is there a plausible link?. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2011;23(4):567-98.
41. Abdulmalek S, Suliman M, Omer O. Possible Neuroprotective Role of Pomegranate Juice in Aluminum Chloride Induced Alzheimer's Like Disease in Mice. *J Alzheimers Dis Parkinsonism*. 2015;5(188):2161-0460.

42. Singh T, Goel RK. Neuroprotective effect of *Allium cepa* L. in aluminium chloride induced neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 2015;49:1-7.
43. Kumar V, Gill KD. Aluminium neurotoxicity: neurobehavioural and oxidative aspects. *Archives of toxicology*. 2009;83(11):965-78.
44. Yang Y, Wang H, Guo Y, Lei W, Wang J, Hu X, Yang J, He Q: Metal Ion Imbalance-Related Oxidative Stress Is Involved in the Mechanisms of Liver Injury in a Rat Model of Chronic Aluminum Exposure. *Biol Trace Elem Res* 2016;173:126-131.
45. Yuan CY, Lee YJ, Hsu GS. Aluminum overload increases oxidative stress in four functional brain areas of neonatal rats. *Journal of biomedical science*. 2012;19(1):51.
46. Comporti M, Signorini C, Leoncini S, Gardi C, Ciccoli L, Giardini A, Vecchio D, Arezzini B. Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge. *Genes & nutrition*. 2010 Jun;5(2):101. (40)
47. Leung TM, Nieto N. CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*. 2013;58(2):395-8.
48. Lukošius L, Ivanauskas L, Marksa M, Lukošius A, Vitkevičius K. Quantitative analysis of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. plants grown in Lithuania using gas chromatography. In: 7th International Pharmaceutical Conference - Science and Practice 2016, Dedicated to the 240th Anniversary of Prof. Johann Friedrich Wolfgang. 2016 October 20-21; Kaunas (Lithuania), Book of Abstracts: 2016. p. 32-33.
49. ElSohly M, Chandra S, Lata H, Williamson E, Upton R, Slade D. Cannabis inflorescence. *American Herbal Pharmacopoeia*. 2013.
50. Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013;21(2):143-52.
51. United Nations Office on drugs and crime. Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products [Internet]. New York: United Nations Office on Drugs and Crime; 2009 [cited 2019 April 20]. Available from: [https://www.unodc.org/documents/scientific/ST-NAR-40-Ebook\\_1.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/ST-NAR-40-Ebook_1.pdf)
52. Staneviciene I, Ivanov L, Kursvietiene L, Viezeliene D. Short-term effects of aluminum and selenium on redox status in mice brain and blood. *Trace Elements and Electrolytes*. 2017;34(2):74.
53. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman reagent. *Anal Biochem*. 1968;25:192-205.
54. Rachmanova TI, Matasova LV, Semenichina AV, Safonova OA, Makeeva AV, Popova TN. Oxidative status evaluation methods. Publishing and Printing Center of Voronezh State University. 2009, 62.

55. Nagappan A, Jung D, Kim JH, Lee H, Jung M. Gomisin N Alleviates Ethanol-Induced Liver Injury through Ameliorating Lipid Metabolism and Oxidative Stress. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(9):2601.
56. Sadauskiene I, Liekis A, Bernotiene R, Sulinskiene J, Kasauskas A, Zekonis G. The Effects of Buckwheat Leaf and Flower Extracts on Antioxidant Status in Mouse Organs. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018;2018.
57. Li L, Jiao Y, Jin T, Sun H, Li S, Jin C, Hu S, Ji J, Xiang L. Phenolic alkaloid oleracein E attenuates oxidative stress and neurotoxicity in AlCl<sub>3</sub>-treated mice. *Life sciences*. 2017;191:211-8.
58. Cristalli DO, Arnal N, Marra FA, de Alaniz MJ, Marra CA. Peripheral markers in neurodegenerative patients and their first-degree relatives. *Journal of the neurological sciences*. 2012;314(1-2):48-56.
59. Abdel-Wahab WM. AlCl<sub>3</sub>-induced toxicity and oxidative stress in liver of male rats: protection by melatonin. *Life Sci J*. 2012;9(4):1173-82.
60. Chen P, Chen Y, Wang Y, Cai S, Deng L, Liu J, Zhang H. Comparative evaluation of hepatoprotective activities of geniposide, crocins and crocetin by CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in mice. *Biomolecules & therapeutics*. 2016;24(2):156.

## 7. MAGISTRO DARBO TEMA SKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. Mickutė K, Pavalkytė P, Kubilienė A, Sadauskienė I, Liekis A, Marksa M. The effect of *Cannabis sativa* L. extracts on malondialdehyde (MDA) in mice livers. 9th International Pharmaceutical Conference - Science and Practice 2018; 2018 November 9; Kaunas (Lithuania). Book of Abstracts: 2018. p. 89.
2. Mickutė K, Kubilienė A, Sadauskienė I, Liekis A, Marksa M. The effect of *Cannabis sativa* L. extract on Malondialdehyde (MDA) Level in Mice Brain. 22nd Annual International Scientific-practical Conference - BaltPharm Forum 2019; 2019 April 13-14; Kaunas (Lithuania), Book of Abstracts: 2019. p. 21.

## 8. PRIEDAI

1 priedas. Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas atlikti eksperimentus su gyvūnais.

### VALSTYBINĖ MAISTO IR VETERINARIJOS TARNYBA

#### LEIDIMAS ATLIKTI BANDYMO SU GYVŪNAIS PROJEKTĄ

2018-03-21 Nr. G2-80

Vilnius

Vadovaujantis Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymo 16 straipsnio 4 dalimi, Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimais, patvirtintais Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2012 m. spalio 31 d. įsakymu Nr. B1-866 „Dėl Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų patvirtinimo“, Europos konvencija dėl eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų stuburinių gyvūnų apsaugos (OL 2004 m. specialusis leidimas, 15 skyrius, 4 tomas, p. 325) ir remiantis Lietuvos bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos 2018-03-19 išvada Nr. 4 „Dėl leidimo atlikti bandymus su gyvūnais“,

l e i d ž i a m a š i a m ū k i o s u b j e k t u i a t l i k t i b a n d y m o s u g y v ū n a i s p r o j e k t ā:

**duomenys apie ūkio subjektą:**

**pavadinimas** Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Neuromokslų instituto Molekulinės neurobiologijos laboratorija,

**adresas** Sukilėlių g. 13-046, Kaunas,

**kodas Juridinių asmenų registre** 302536989;

**duomenys apie bandymo su gyvūnais projektą:**

**pavadinimas** „Ląstelės antioksidacinės sistemos fermentų aktyvumo įvertinimas bei oksidacinio streso žymenų nustatymas oksidacinio streso sukkelto senėjimo procese“,

**vadovas** Ilona Sadauskienė,

**naudojami gyvūnai** 270 pelių;

**duomenys apie bandymo su gyvūnais projekto atlikimo vietą:**

**pavadinimas** Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Neuromokslų instituto Molekulinės neurobiologijos laboratorija,

**adresas** Sukilėlių g. 13-046, Kaunas.

**Duomenys apie veterinarinius vaistus, vaistinius preparatus ar kitas medžiagas (toliau – vaistai), kurie bus naudojami vykdant bandymo su gyvūnais projektą\*:** „Nenaudojama“.

---

Leidimas atlikti bandymo su gyvūnais projektą (toliau – leidimas) galioja iki 2021 m. gruodžio 31 d.

Direktorius



Darius Remeika

\* – Nurodomi naudojamo (-ų) vaisto (-ų) pavadinimas (-ai), gamintojas (-ai), vaistinė (-ės) forma (-os), kiekis, reikalingas vykdant bandymo su gyvūnais projektą. Jei vykdant bandymo su gyvūnais projektą vaistai gyvūnams nenaudojami, leidime įrašomas žodis „Nenaudojama“.

2 priedas. 9-oje tarptautinėje konferencijoje „Science and practice 2018“, vykusioje Kaune 2018 metų lapkričio 9 d. pristatytas žodinis pranešimas „The effect of *Cannabis sativa* L. extracts on malondialdehyde (MDA) in mice livers“. Pridedama dalyvavimą patvirtinančio sertifikato kopija.



9<sup>th</sup> International Pharmaceutical Conference  
 “SCIENCE AND PRACTICE 2018”  
 dedicated to the 100<sup>th</sup> anniversary of independent  
 Lithuania's pharmacy  
 Friday, November 9, 2018

## Certificate of Attendance

Organising Committee hereby certifies that  
 Karolina Mickutė, Gintarė Pavalkytė, Ilona  
 Sadauskienė, Arūnas Liekis, Asta Kubilienė  
 presented an oral presentation

*The effect of Cannabis sativa L. extracts on  
 malondialdehyde (MDA) in mice livers*

In the International Conference, held on November 9<sup>th</sup>,  
 2018, Kaunas, Lithuania

On behalf of the Organising Committee

Prof. Ramune Morkuniene



Atkurtai  
 Lietuvai





3 priedas. 22-oje tarptautinėje konferencijoje „BaltPharm Forum 2019“, vykusioje Kaune 2019 metų balandžio 13 d. pristatytas žodinis pranešimas „The effect of *Cannabis sativa* L. extract on malondialdehyde (MDA) level in mice brain“. Pridedama dalyvavimą patvirtinančio sertifikato kopija.

**International Conference BaltPharm Forum 2019**





**Certificate of Attendance**

Lithuanian Pharmaceutical Association (LFS) hereby declares that

**KAROLINA MICKUTĖ**  
from  
**Lithuania**

has attended the 22nd International Conference of  
**BaltPharm Forum 2019,**  
held on 13 April 2019 in Kaunas, Lithuania

The participant has obtained 9 continuing education hours



Prof. Eduardas Tarasevičius  
Lithuanian Pharmaceutical Association  
President



Kaunas, Lithuania, 13 April 2019