

Summary in Polish

Streszczenie

Nadtlenek wodoru (H_2O_2) i promieniowanie ultrafioletowe (UV), w tym UVA i UVB, to dwa rodzaje zewnętrznych prooksydacyjnych czynników stresogennych, chemicznego i fizycznego, szeroko stosowanych w praktyce klinicznej z uwagi na ich działanie antyseptyczne i unieczyniające komórki/hamujące proliferację komórek. Oba czynniki wywołują stres oksydacyjny i towarzyszący mu przewlekły stan zapalny komórek skóry, w szczególności keratynocytów, które są najbardziej narażone na czynniki zewnętrzne. Jednakże nadprodukcja reaktywnych form tlenu (RFT) indukuje zmiany w metabolizmie komórkowym, powodujących zaburzenia w różnicowaniu komórek lub szlakach sygnalizacyjnych prowadzących do śmierci komórki.

Wyniki niniejszych badań wskazały, że H_2O_2 i promieniowanie UV przesuwając równowagę redoks w kierunku stresu oksydacyjnego, nasilając proces peroksydacji lipidów, skutkujący zmianami w strukturze i funkcjach fosfolipidów błonowych. Procesowi temu towarzyszą również zmiany w składzie białkowym błon komórkowych, co ostatecznie wpływa na integralność tych błon. Stwierdzono, że H_2O_2 wpływa głównie na poziom białek zaangażowanych w regulację sieci proteostazy, natomiast promieniowanie UVA/B indukuje przede wszystkim zmiany w zawartości białek zaangażowanych głównie w regulację sygnalizacji apoptotycznej i zapalnej.

Aby zapobiec szkodliwemu wpływowi H_2O_2 i promieniowania UV na komórki skóry, potrzebne są związki ochronne, zwłaszcza pochodzenia naturalnego, przeciwdziałające niekorzystnym przemianom metabolicznym. Dlatego oceniono wpływ kannabidiolu (CBD), głównego niepsychoaktywnego fitokannabinoidu występującego w *Cannabis sativa* L., na zmiany metaboliczne w keratynocytach skóry. Głównym celem niniejszej pracy była ocena wpływu CBD na metabolizm komórkowy związany z homeostazą redoks, szczególnie w odniesieniu do zmian profilu fosfolipidowego i białkowego błony komórkowej, w warunkach środowiska oksydacyjnego wywołanego ekspozycją na H_2O_2 lub promieniowanie UV. Porównano również dwa warianty działania CBD: krótkoterminowy (przy podaniu CBD po ekspozycji na czynniki stresogenne) i długoterminowy (przy zastosowaniu CBD przed i po ekspozycji na czynniki stresogenne).

Wyniki uzyskane metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) oraz chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (LC-MS) wskazują na ochronne działanie CBD, polegające na przeciwdziałaniu powstawaniu stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem H_2O_2 i promieniowania UVA/B. Wykazano, że CBD zapobiega nadprodukcji ROS i produktów

peroksydacji lipidów oraz ich adduktów z białkami, takich jak addukty MDA/4-HNE/4-ONE-białka, oceniane z wykorzystaniem spektrometrii mas w połączeniu z nano-chromatografią cieczą (nanoHPLC-QorbiTrap). Na podstawie wyników analiz

profilu fosfolipidowego ocenianego przy użyciu GC-MS stwierdzono, że CBD poprzez zahamowanie procesów peroksydacji fosfolipidów zapobiega zmianom w strukturze oraz funkcji tych związków, co pomaga w utrzymywaniu integralności błon keratynocytów poddanych prooksydacyjnemu działaniu H_2O_2 i promieniowania UV. Efekt ten potwierdzony został ograniczonym wyciekaniem dehydrogenazy mleczanowej (LDH) z keratynocytów będący wynikiem działania CBD.

Wyniki przeprowadzonych badań pokazują ponadto, że długie stosowanie CBD jest bardziej skuteczne w zapobieganiu stresowi oksydacyjnemu w porównaniu z krótkim stosowaniem CBD, ze względu na bardziej efektywne hamowanie oksydacyjnych modyfikacji lipidów i zachowanie integralności błon. Ponadto wyniki analiz proteomicznych wykazały, że długie stosowanie CBD, poprzez zapobieganie zmianom ekspresji białek wywołanym działaniem H_2O_2 lub UVB, jest bardziej skuteczne w utrzymywaniu homeostazy białek błonowych.

W celu oceny realnego, z punktu widzenia medycznego wpływu ochronnego działania CBD, sprawdzono skuteczność CBD stosowanego *in vivo* na skórę bezwłosych szczurów poddanych 4-tygodniowej terapii UVA/UVB, często stosowanej w leczeniu chorób skóry. Badania przeprowadzono aby ocenić zmiany w proteomie błon i cytozolu. Porównanie poziomu białek uzyskanego za pomocą nanoHPLC-QorbiTrap pokazuje, że CBD znacząco zapobiega wywołanej przez UVA/B nadekspresji białek biorących udział w regulacji równowagi redoks, zapaleniu i apoptozie.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań wskazują na dwa potencjalne efekty działania CBD na keratynocyty w warunkach stresu oksydacyjnego będącego skutkiem ekspozycji na działanie H_2O_2 lub UV. Pierwszy to zwiększenie przeżywalności keratynocytów poddanych działaniu H_2O_2 związane z zahamowaniem stresu oksydacyjnego i utrzymaniem proteostazy. Drugi efekt działania CBD związany jest z modulowaniem homeostazy redoks w keratynocytach wystawionych na działanie promieni UV. Zatem uzyskane dane sugerują, że CBD może być wykorzystany w roli związku chroniącego komórki skóry przed szkodliwymi skutkami stresu oksydacyjnego wywołanego wystawieniem skóry na działanie H_2O_2 lub UVB.