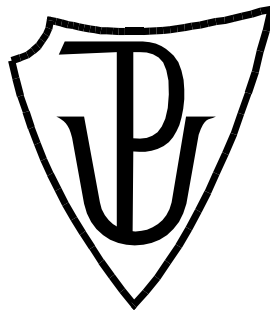


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochemie



Ovplyvnenie procesov v koži fytoKANABINOIDMI

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:	Bc. Nina Kucháriková
Študijný program:	B1406 Biochemie
Študijný obor:	Biochémia
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	doc. RNDr. Jitka Vostálová, Ph.D.
Rok:	2020

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením diplomovej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som zoznamovaná s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa

Bc. Nina Kucháriková

Pod'akovanie

Touto cestou by som rada pod'akovala vedúcej svojej diplomovej práce pani doc. RNDr. Jitke Vostálovej, Ph.D. za odborné rady, pripomienky, láskavý prístup, trpezlivosť a čas, ktorý mi venovala pri práci v laboratóriu a pri spísaní predloženej diplomovej práce.

Pod'akovanie patrí aj Mgr. Denise Škařupovej za cenné rady, ústretovosť a pomoc pri práci v laboratórii.

Rovnako by som sa chcela pod'akovať aj DiS. Zite Školařovej za ochotu a pomoc pri prevedení experimentu (foto)stability.

Ďakujem pani prof. RNDr. Jitke Ulrichovej, CSc. za možnosť vypracovať experimentálnu časť v Ústave lekárskej chémie a biochémie, za poskytnutie všetkých potrebných pomôcok k experimentom a rovnako aj celému kolektívu za vytvorenie príjemných pracovných podmienok. Ďakujem taktiež za finančnú podporu grantu IGA_LF_2019_015, IGA_LF_2020_022 a inštitucionálnu podporu Univerzity Palackého v Olomouci - RVO 61989592.

V neposlednom rade by som sa rada pod'akovala svojej rodine a priateľom za trpezlivosť a podporu počas celého štúdia.

Bibliografická identifikácia

Meno a Priezvisko autora	Nina Kucháriková
Názov práce	Ovplyvnenie procesov v koži fytoKANABINOIDMI
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Ústav lekárskej chémie a biochémie, Lekárska fakulta
Vedúci práce	doc. RNDr. Jitka Vostálová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt: Nadmerná expozícia kože slnečnému žiareniu je spojená so zvýšenou tvorbou reaktívnych druhov kyslíka (ROS), ktoré vyvolávajú oxidačný stres vedúci k predčasnému starnutiu (photoaging). Kanabinoidy, obsahové zložky *Cannabis sativa* (konopa siata), sú známe svojimi protizápalovými účinkami. Cieľom diplomovej práce bolo zistiť či vybrané kanabinoidy - kanabichromen (CBC), kanabidiol (CBD), kanabigerol (CBG) a kanabinol (CBN) majú schopnosť tlmiť negatívne dopady UV žiarenia na ľudské kožné bunky. U žiadneho z testovaných kanabinooidov nebola preukázaná fototoxická. CBD vykazoval najvyššie UV-A/UV-B fotoprotektívne vlastnosti na normálnych ľudských dermálnych fibroblastoch (NHDF). CBG vykazoval najlepšiu ochranu na keratinocytoch línie HaCaT. Všetky kanabinoidy, okrem CBC boli schopné potlačiť aktiváciu kaspázy-3 pôsobením UV-A žiarenia. Ochranné vlastnosti kanabinooidov boli potvrdené znížením UV-A stimulovanej hladiny hemoxygenázy-1, pričom na hladinu katalázy mali len minimálny vplyv. Všetky kanabinoidy, okrem CBD boli (foto)stabilné. Faktor ochrany pred slnečným žiarením (SPF) bol stanovený iba u CBC a CBN, ostatné kanabinoidy neabsorbujú v oblasti 290-320 nm. SPF CBC a CBN bol nízky v porovnaní s kyselinou ferulovou, ktorá bola použitá ako štandard. Kanabinoidy nepôsobia ako UV filtre. Ich fotoprotektívny účinok je spojený s iným ochranným mechanizmom, a to pravdepodobne s moduláciou niektorej zo signálnych dráh, napr. drahou riadenou komplexom transkripčného faktora Nrf2. Študované kanabinoidy znížili negatívne účinky UV žiarenia a mohli by sa stať súčasťou dermatologických prípravkov s ochranou v celej oblasti slnečného UV žiarenia.

Kľúčové slová: kanabinoidy, UV žiarenie, oxidačný stres, koža, normálne ľudské kožné fibroblasty, línia keratinocytov HaCaT, UV-A a UV-B protekcia, hemoxygenáza-1, kataláza, kaspáza-3, fotostabilita, SPF

Počet strán: 94

Počet príloh: 0

Jazyk: Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Nina Kucháriková
Title	Effect of phytocannabinoids on processes in the skin
Type of thesis	Diploma
Department	The Department of Medicinal Chemistry and Biochemistry, The Faculty of Medicine and Dentistry
Supervisor	doc. RNDr. Jitka Vostálová, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract: Overexposure of human skin to solar radiation is associated with the formation of reactive oxygen species (ROS) that may result in oxidative stress leading to skin premature ageing (photoaging). Cannabinoids, components of *Cannabis sativa*, are known for their anti-inflammatory properties. The main aim of the Diploma Thesis was to determine possible protective effects of selected cannabinoids – cannabichromene (CBC), cannabidiol (CBD), cannabigerol (CBG) and cannabinol (CBN) on UV damaged human skin cells. None of selected cannabinoids was phototoxic. CBD was the most potent against UV-A and UV-B radiation in normal human dermal fibroblasts (NHDF). CBG was the most effective in keratinocyte line HaCaT. Apart from CBC all of the cannabinoids were able to reduce the UV-A induced caspase-3 level. Protective properties of cannabinoids were confirmed by lowering UV-A stimulated levels of heme oxygenase-1, however minimal effect was observed on the catalase level. All studied cannabinoids were (photo)stable except for CBD. Sun protection factor (SPF) was estimated only for CBC and CBN, other cannabinoids did not absorb at 290-320 nm. SPFs of CBC and CBN were lower in comparison to ferulic acid chosen as a standard. Cannabinoids do not work as UV filters. Their photoprotective properties are probably linked with other protective mechanism for example with modulation of some signalling pathways e.g. Nrf2-signalling pathway. In summary, studied cannabinoids decreased negative effects of UV radiation and could be active components of dermatological preparations with protection in the whole area solar UV radiation.

Keywords	cannabinoids, UV radiation, oxidative stress, skin, normal human dermal fibroblasts, keratinocyte line HaCaT, UV-A and UV-B protection, heme oxygenase-1, catalase, caspase-3, photostability, SPF
Number of pages	94
Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

1. Úvod	12
2. Súčasný stav problematiky	14
2.1 Ľudská koža.....	14
2.1.1 Anatómia kože	14
2.1.1.1 Kožné vrstvy	15
2.1.1.1.1 Epidermis (pokožka)	15
2.1.1.1.2 Dermis (škára)	16
2.1.1.1.3 Hypodermis (podkožné väzivo)	16
2.1.1.2 Kožné deriváty	17
2.1.2 Fyziológia kože.....	17
2.2 Vplyv endogénnych a exogénnych faktorov na ľudskú kožu	18
2.2.1 Endogénne faktory	18
2.2.2 Exogénne faktory	18
2.2.2.1 Slnéčné žiarenie	18
2.2.2.1.1 UV oblasť slnečného žiarenia	20
2.2.2.2 Odpoveď bunky na oxidačný stres.....	23
2.3 Protekcia kože	25
2.3.1 Endogénne obranné mechanizmy	25
2.3.1.1 Enzýmové antioxidanty.....	25
2.3.1.2 Neenzýmové antioxidanty.....	26
2.3.2. Endogénne reparačné mechanizmy	27
2.3.2.1. Oprava poškodenej DNA	27
2.3.2.2. Oprava poškodených lipidov	29
2.3.2.3. Oprava poškodených proteínov	29
2.3.3 Exogénna fotoprotekcia kože.....	30
2.4 Prírodné látky v dermatológii.....	30
2.4.1 Konopa siata (<i>Cannabis sativa L.</i>).....	31
2.4.1.1 Fytokanabinoidy.....	32
2.4.1.1.1 Biosyntéza fytokanabinoidov	33
2.4.1.2 Endokanabinoidný systém	35
3. Experimentálna časť	37
3.1 Materiál a metódy.....	37
3.1.1 Chemikálie.....	37
3.1.2 Metódy	44
3.1.2.1 Príprava biologického materiálu	44
3.1.2.2 Stanovenie cytotoxicity látok metódou neutrálnej červene	47

3.1.2.3 Stanovenie fototoxicity látok metódou neutrálnej červene	48
3.1.2.4 Stanovenie UV-A a UV-B fotoprotekcie látok metódou neutrálnej červene	50
3.1.2.5 UV-A fotoprotektívne účinky kanabinoidov na aktivitu vybraných enzýmov v NHDF	51
3.1.2.6 Stanovenie aktivity laktátdehydrogenázy	52
3.1.2.7 Metódy stanovenia proteínu	53
3.1.2.7.1 Stanovenie proteínu bicinchoninovou kyselinou.....	53
3.1.2.7.2 Stanovenie proteínu Bradfordoveho metódou.....	53
3.1.2.8 Stanovenie aktivity kaspázy-3.....	54
3.1.2.9 SDS-PAGE elektroforéza.....	54
3.1.2.9.1 Western blotting	56
3.1.2.11 Testovanie fotostability látok	57
3.1.2.12 Spektrofotometrické stanovenie faktoru ochrany pred slnečným žiarením	58
3.1.2.13 Štatistická analýza	59
4. Výsledky	60
4.1 Testovanie cytotoxicity látok	60
4.2 Testovanie fototoxicity látok	61
4.3 Testovanie fotoprotektívnych účinkov	62
4.3.1 UV-A fotoprotektívne účinky	62
4.3.2 UV-B fotoprotektívne účinky	64
4.4 Vplyv kanabinoidov a UV-A žiarenia na vybrané parametre	65
4.4.1 Toxicita kanabinoidov a UV-A.....	65
4.4.2 Vplyv kanabinoidov a UV-A žiarenia na hladinu katalázy a hemoxygenázy-1	68
4.5 Testovanie fotostability kanabinoidov	71
4.6 Stanovenie faktoru ochrany pred slnečným žiarením	76
5. Diskusia	77
6. Záver.....	83
7. Literatúra.....	84
8. Zoznam použitých skratiek	91

CIELE PRÁCE

Teoretická časť

Cieľom teoretickej časti diplomovej práce bolo spracovanie literárnej rešerše zameranej na stavbu, fyziológiu kože a vplyvu vonkajších faktorov, predovšetkým UV žiarenia, na kožu. Ďalej boli spracované poznatky týkajúce sa endogénneho a exogénneho ochranného systému, fotoprotekcie a kanabinoidov, konkrétne ich klasifikácie, syntézy a funkcie.

Experimentálna časť

V experimentálnej časti bola práca zameraná na:

1. Zistenie toxicity a fototoxicity vybraných fytoKANABIONODOV na normálnych ľudských dermálnych fibroblastoch (NHDF) a línii keratinocytov (HaCaT)
2. Otestovanie UV-A a UV-B ochranných vlastností fytoKANABINOIDOV na NHDF a HaCaT
3. Študovanie vplyvu fytoKANABINOIDOV na kaspázu-3, hemoxygenázu-1 a katalázu v NHDF
4. Overenie schopnosti fytoKANABINOIDOV ovplyvniť UV-A modulovanú aktivitu kaspázy-3, hemoxygenázy-1 a katalázy v NHDF
5. Zistenie (foto)stability fytoKANABINOIDOV
6. Stanovenie faktora ochrany pred slnečným žiarením

1. Úvod

Ľudská koža, najväčší orgán tela, predstavuje hlavnú styčnú plochu s vonkajším prostredím. Jej stav a vzhľad sú dôležitými indikátormi zdravia každého ľudského jedinca. Koža je každodenne vystavená pôsobeniu faktorov biologického, chemického či fyzikálneho charakteru. Tieto faktory môžeme taktiež rozdeliť na endogénne, ktorými sú hormóny, dedičnosť, rôzne ochorenia a exogénne, medzi ktoré patrí slnečné žiarenie, teplota či chemické látky (Junqueira *et al.*, 1999). Práve slnečné žiarenie je v súčasnosti najčastejšie diskutovaným faktorom v spojitosti s predčasným starnutím kože a s výskytom závažných kožných ochorení vrátane rakoviny kože.

Slnečné žiarenie je tvorené kontinuálnym spektrom elektromagnetického vlnenia a oblasť UV žiarenia predstavuje zhruba 5% všetkého slnečného svetla, ktoré dopadá na zemský povrch. Delí sa na tri časti: UV-A (315-400 nm), UV-B (280- 315 nm) a UV-C (<280 nm) (Svobodová a Vostálová, 2010). UV-C a väčšina UV-B (280 a 295 nm) je zachytená ozónovou vrstvou a na zemský povrch teda nedopadá. UV-A predstavuje 95– 99 % dopadajúceho UV žiarenia v porovnaní s UV-B, ktorého na zemský povrch dopadá len 1 – 5 %. UV-A žiarenie preniká do hlbších vrstiev kože – dermis a je spojené s nadmernou produkciou reaktívnych foriem kyslíka (ROS), organických radikálov a oxidačne modifikovaných molekúl. UV-B žiarenie je nevyhnutné k produkcii aktívnej formy vitamínu D v koži, je však považované za silný karcinogén. Väčšina UV-B žiarenia je absorbovaná v najvrchnejšej vrstve kože - epidermis. Hlavným mechanizmom toxicity tohto žiarenia je priama reakcia s aromatickými molekulami (napr. báze nukleových kyselín, aromatické aminokyseliny) a vznik fotoproduktov. Nie len pôsobenie UV-A, ale aj UV-B žiarenia je sprevádzané vznikom ROS, ktoré oxidačne poškodzujú makromolekuly (bielkoviny, fosfolipidy a nukleové kyseliny). V dôsledku čoho dochádza k štruktúrnym a funkčným zmenám v koži, ktoré sa súhrnne označujú ako predčasné starnutie kože. Vyznačuje sa zníženou syntézou zložiek extracelulárnej matrix (kolagén, elastín) a ich zvýšenou degradáciou z dôvodu zvýšenej proteolytickej aktivity metaloproteináz (Halder a Chappell., 2009).

Pred negatívnymi účinkami slnečného žiarenia, predovšetkým ROS, je naša koža chránená endogénnym protektívnym systémom. Medzi formy endogénnej ochrany kože zahrňame predovšetkým enzýmové či neenzýmové antioxidanty. Hemoxygenáza-1 (Ho-1) predstavuje jeden z enzýmových antioxidantov s cytoprotektívnym účinkom. Plní esenciálnu funkciu v čase bunkového stresu udržiavaním pomeru antioxidantov/oxidantov

(Itoh *et al.*, 2003). Ďalším antioxidačným enzýmom je kataláza, ktorá zmierňuje oxidačný stres odbúravaním peroxidu vodíka. Jej aktivita hrá významnú rolu pri spomalení predčasného starnutia kože (Rhie *et al.*, 2001). Endogénnymi neenzýmovými antioxidantami sú látky prevažne nízkomolekulárnej povahy ako napríklad glutatión (GSH), tioredoxíny (Trx) či koenzým Q (CoQ). Ďalej medzi endogénne ochranné systémy patrí syntéza kožného pigmentu melanínu a proces keratinizácie, čo znamená zosilnenie rohovej vrstvy kože (Shetty a Gokul, 2012).

Endogénna ochrana pred slnečným žiarením však nie je dostatočná. Je preto dôležité, aby sme sa vyvarovali dlhodobému pôsobeniu slnečného žiarenia. Najúčinnějšíe formy exogénnej ochrany sú najmä ochranné odevy, tienenie, slnečné okuliare či opaľovacie krémy. Opaľovacie krémy obsahujú chemické a fyzikálne UV filtre, ktorých úlohou je znižovať množstvo fotónov UV žiarenia prenikajúceho do kože a predĺžiť tak dobu pobytu na slnku bez toho, aby došlo k poškodeniu kože (Gies, 2007).

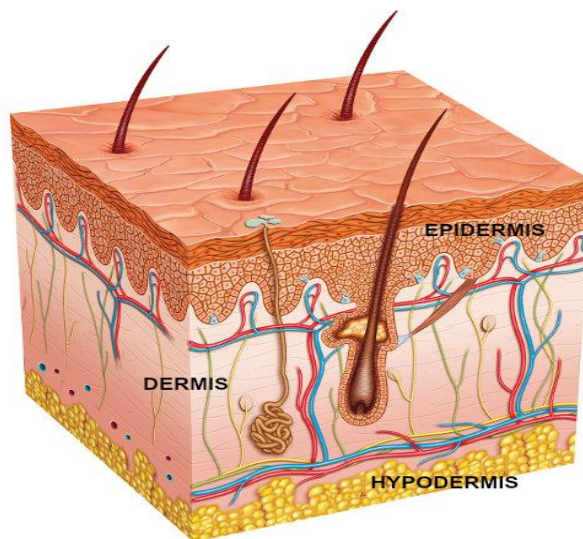
S cieľom znížiť nežiaduce účinky slnečného žiarenia na kožu sa v poslednej dobe uprednostňuje využívanie rady čistých prírodných látok alebo extraktov izolovaných predovšetkým z rastlín ako napríklad kurkumovník dlhý (Chan *et al.*, 2003), sladovka hladkoplodá (Kühnl *et al.*, 2015) či obsahových zložiek zeleného čaju (Silverberg *et al.*, 2011). Rastlina konopa siata (*Cannabis sativa L.*) je tiež známa pre svoje regeneračné a protizápalové účinky na kožu, ktoré sú dôležité pri liečbe kožných ochorení (alergickej kontaktnej dermatitídy, psoriázy, atopického ekzému a melanómu) (Robinson *et al.*, 2017). Za svoje účinky vďaka predovšetkým svojim sekundárnym metabolitom, ktoré sú známe ako kanabinoidy. Zo 100 doposiaľ objavených je najznámejších 5 kanabinoidov, ktorými je psychoaktívna zložka tetrahydrokanabinol (THC) a nepsychoaktívne zložky kanabidiol (CBD), kanabichromen (CBC), kanabigerol (CBG) a kanabinol (CBN), ktorý vzniká z THC pri spracovaní konopy, predovšetkým pri sušení (Aizpurua-Olaizola *et al.*, 2016). V súčasnosti sú používané nielen dermatologické a kozmetické prípravky obsahujúce konopu a jej obsahové pri kožných ochoreniach, ale taktiež pre svoje protizápalové a analgetické účinky pri ochoreniach pohybového aparátu. Aj napriek masívnemu používaniu je stále mnoho účinkov, ktoré nepoznáme, ako je napríklad využitie vo fotoprotekcii a spomalení procesu predčasného starnutia kože.

2. Súčasný stav problematiky

2.1 Ľudská koža

2.1.1 Anatómia kože

Až 15 % z celkovej telesnej hmotnosti dospelého jedinca predstavuje práve koža (*derma*), orgán, zohrávajúci rolu v mnohých životne dôležitých funkciách. Spolu so sliznicami tvorí spojitý a nepretržitý povrch tela. Ľudská koža pozostáva z troch vrstiev: epidermis, dermis a hypodermis (Obr.1), pričom každá vrstva plní špecifickú úlohu a je tvorená konkrétnymi bunkami (Kanitakis, 2002). Jednotlivé vrstvy sa od seba líšia hrúbkou v závislosti od regiónu.



Obr. 1 Štruktúra ľudskej kože. Ľudská koža pozostávajúca z troch vrstiev – epidermis (pokožka), dermis (škára) a hypodermis (podkožné väzivo). Upravené podľa Emedicine Health (2020).

2.1.1.1 Kožné vrstvy

2.1.1.1.1 Epidermis (pokožka)

Epidermis je vonkajšia skvamózna vrstva kože pozostávajúca prevažne z dvoch typov buniek, a to keratinocytov a dendritických buniek. Od dendritických buniek sa keratinocyty líšia obsahom farbiteľnej cytoplazmy a prítomnosťou medzibunkových mostíkov (Kolarsick *et al.*, 2011). Predstavujú konšteláciu buniek, ktoré sú významné pre syntézu dlhého vláknitého proteínu s ochrannou funkciou – keratínu. Proces, pri ktorom keratinocyty prechádzajú najskôr syntetickou a potom degradačnou fázou, pri ktorých sa mení metabolická aktivita a zloženie buniek, sa nazýva keratinizácia. Tento proces je sprevádzaný migráciou buniek z bazálnej vrstvy k povrchu kože (Chu, 2008). Každých 20-30 dní v závislosti od veku dochádza k obnove epidermis.

Epidermis je tvorená zhruba z 5 morfoloicky odlišných vrstiev. Vrstva bazálna (*Stratum basale*) je od dermis oddelená bazálnou laminou. Je tvorená mitoticky aktívnymi bunkami, ktoré sa neustále delia, produkujú nové keratinocyty, a tak doplňujú keratinocyty (Kolarsick *et al.*, 2011).

Ostnatá vrstva (*Stratum spinosum*) je tvorená 4-8 vrstvami polygonálnych buniek s nepravidelnými výbežkami nazývanými aj „ostne“, ktoré sú so susednými bunkami v spojení prostredníctvom desmozómov. Tieto bunky sú ešte mitoticky aktívne a prebieha v nich intenzívna proteosyntéza (Kolarsick *et al.*, 2011).

Vrstva zrnitá (*Stratum granulosum*) je tvorená 3-5 vrstvami sploštených polygonálnych buniek. V cytoplazme sa nachádzajú granule, ktoré dodávajú granulovaný charakter. Keratohyalínové granule obsahujú prekursor keratínu a lamerálne granule tvoria glykolipidy, ktoré sa vylučujú na povrch buniek. Pôsobia ako „lepidlo“, ktoré sprostredkováva prepojenie buniek a chráni pred prenikaním cudzorodých látok (Chu, 2008). Svetlá vrstva (*Stratum lucidum*) je tenkou svetlou vrstvou, ktorá je bohatá na proteín eleidín – produkt transformácie keratohyalínu. Táto vrstva je tvorená bunkami, v ktorých cytoplazme sú nezreteľné organely, obsahuje veľa filament a bunky sú spojené dezmozómami.

Vrstva rohová (*Stratum corneum*) je tvorená 15-20 vrstvami pevne spojených sploštených odumretých keratinocytov, nazývaných korneocyty. Tieto bunky majú cytoplazmu vyplnenú skleroproteínom keratínom a ďalšími proteínmi. Korneocyty spolu s medzibunkovou hmotou (cholesterolom a mastnými kyselinami) hrajú významnú rolu v priepustnosti kože.

Epidermis však obsahuje aj mnoho iných bunkových populácií ako napríklad melanocyty. Nachádzajú sa v *Stratum basale* a *spinosum* a sú zodpovedné za produkciu kožného pigmentu melanínu a jeho prenos do keratinocytov. Produkcia melanínu prebieha za účasti enzýmu tyrozinázy v okrúhlejšej organelle, ktorá sa nazýva melanosóm (Kolarsick *et al.*, 2011). Ďalšími nekeratinocytovými štruktúrami sú Langerhansove a Merkelové bunky. Primárnou funkciou Langerhansových buniek je rozpoznať a spracovať rozpustné antigény v epidermálnej vrstve (O'Connell a Rusby, 2015). Merkelové bunky vysielajú chemický signál vytvárajúci akčný potenciál v susediacom neuróne, ktorý následne prenáša signál do mozgu. V určitých oblastiach tela, ako sú napríklad končeky prstov, sa nachádza vysoká koncentrácia týchto buniek (Mescher, 2016).

2.1.1.1.2 Dermis (škára)

Škára predstavuje strednú vrstvu kože tvoriacu integrovaný systém spojivového tkaniva. Prilieha k epidermis, kde má spevňujúcu funkciu a spojuje ju s podkožím. Najdôležitejšou funkciou škáry je zabezpečiť pevnosť v ťahu, pružnosť, elasticitu, mechanickú ochranu a termoreguláciu (Chu, 2008). Je hojne prestúpená krvnými a lymfatickými cievami, ktoré plnia úlohu vo výžive kože a udržovaní telesnej teploty. Skladá sa z dvoch vrstiev - povrchová vrstva (*stratum papillare*) je tvorená riedkym kolagénovým väzivom a je bohatá na fibroblasty, žirne bunky a makrofágy. Vytvára mnoho výbežkov (dermálne papily), ktoré sú zakliesnené do epidermálnych výbežkov (papil) a vytvára tak pevné spojenie oboch vrstiev. Hlbšia vrstva (*stratum reticulare*) je naopak silnejšia, je tvorená neusporiadaným hustým väzivom a obsahuje menší počet buniek. Fibroblasty sa podieľajú na syntéze retikulárnych, elastických, kolagénových vlákien a kyslých mukopolysacharidov. Kolagén je rodina zhruba 15-tich geneticky odlišných vláknitých proteínov. Je vysoko obohatený aminokyselinami ako hydroxyprolín, glycín a hydroxylyzín (James *et al.*, 2006).

2.1.1.1.3 Hypodermis (podkožné väzivo)

Hypodermis predstavuje najspodnejšiu vrstvu kože. Je tvorená riedkym väzivom a často obsahuje tukové bunky, nie je ostro ohraničená od škáry, ale od prilahlých tkanív a orgánov je oddelená väzivovou blanou. Hypodermis je pretkaná sieťou nervov a ciev.

Z embryologického hľadiska sa v hypodermis začínajú vyvíjať tukové bunky, adipocyty, ku koncu piateho mesiaca života. Sú zodpovedné za produkciu hormónu leptínu, ktorý reguluje telesnú hmotnosť a teplotu prostredníctvom hypotalamu (James *et al.*, 2006). Okrem zhromažďovania energie má aj funkciu mechanickú, a to predovšetkým v zmysle ochrany voči vonkajším fyzikálnym nárazom.

2.1.1.2 Kožné deriváty

Súčasťou kože sú aj kožné deriváty, medzi ktoré patria vlasy, chlpy, nechty a mazové žľazy. Chlpy sú dlhé keratinizované útvary, pričom každý chlp vyrastá z vlasového folikulu. Nechty sú dôležité najmä v ochrane hrotu prstov a uľahčení uchopenia. Pozostávajú z doštičky husto zaobaleného tvrdého keratínu. Mazové žľazy sa vyskytujú v spojení s vlasovými folikulmi a sú tvorené z buniek, ktoré pochádzajú z epidermy a produkujú mastný potný maz (Gawkrodger, 1997).

2.1.2 Fyziológia kože

Kožné tkanivo sa vyznačuje radou dôležitých funkcií, medzi ktoré zahŕňame funkciu: ochrannú, vylučovaciu, termoregulačnú či syntetickú. Prostredníctvom kože je naše telo chránené pred pôsobením vonkajších fyzikálnych (žiarenie, teplo, chlad), chemických (ťažké kovy, toxíny, jedy) či biologických činiteľov (mikroorganizmy). Vďaka prítomnosti dlaždicového epitelu je vnútorné prostredie oddelené od vonkajšieho. Prienik látok z vonkajšieho prostredia je za normálnych okolností obmedzený, avšak v čase poškodenia či ochorenia kože sa jej priestupnosť zvyšuje. Negatívne účinky mikroorganizmov sú tlmené vrstvou hydrolipidového filmu na povrchu pokožky. Funkcia vylučovacia sa uplatňuje najmä pri detoxikácii a exkrécii odpadových látok. Pre správny priebeh biochemických pochodov je nutné udržiavať aj stálu telesnú teplotu, a to prostredníctvom kožných ciev, tukového tkaniva či potných žliaz. Esenciálnu rolu zohráva kožné tkanivo aj v syntéze kožného pigmentu melanínu v melanocytoch a vitamínu D produkovaného v keratinocytoch (Junqueira *et al.*, 1999).

2.2 Vplyv endogénnych a exogénnych faktorov na ľudskú kožu

Ľudská koža je denne vystavená pôsobeniu mnohých stresových faktorov a to endogénnych a exogénnych. V prípade, že je dostatočne vyživovaná a hydratovaná dokáže stlmiť negatívne dopady týchto činiteľov.

2.2.1 Endogénne faktory

Jednou skupinou endogénnych faktorov sú hormóny, ktorých hladina počas života každého jedinca značne kolíše. V období tehotenstva je bežná hyperpigmentácia kože, ktorá je úplne benígna. Bolo zistené, že táto hyperpigmentácia súvisí so zvýšenou produkciou estrogénov, progesterónu a hormónu stimulujúceho melanocyty (Blereau, 2002). Genetická výbava taktiež vo veľkej miere ovplyvňuje stav kože a navyše predikuje biologické starnutie kože, ktoré zahŕňa pokles v regenerácii a obnove buniek, degeneráciu spojivového tkaniva a elastických vlákien s následkom zníženia kožnej elasticity. Tretím dôležitým indikátorom zdravia našej kože je celkový zdravotný stav; rôzne ochorenia ako napríklad diabetes mellitus či ochorenie pečene môžu vplývať na stav kože (Demirseren *et al.*, 2014).

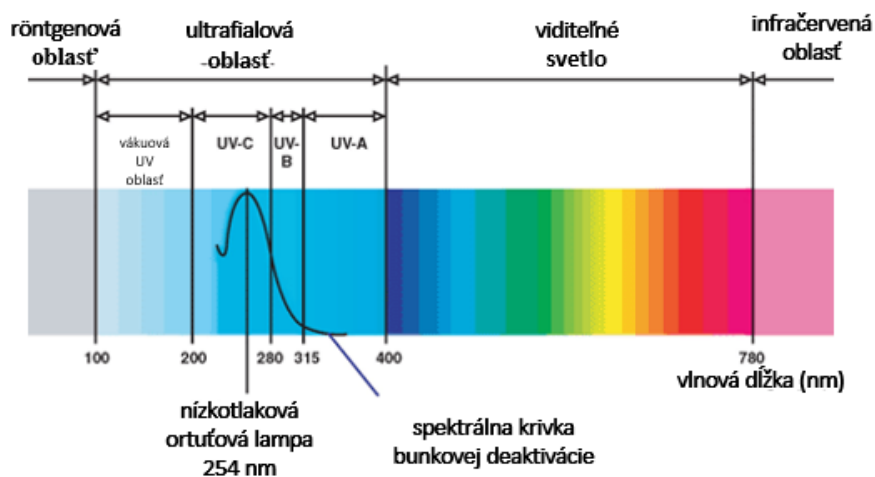
2.2.2 Exogénne faktory

Exogénne faktory môžu byť dvojakého charakteru a to chemického (chemikálie, toxíny, jedy, detergenty) či fyzikálneho (teplo, žiarenie). Rôzne čistiace prípravky s príliš vysokým alebo nízkym pH môžu zvyšovať senzitivitu kože, pretože fyziologické rozmedzie pH kože sa pohybuje v rozmedzí 4,75 – 5,75 (Lambers *et al.*, 2006). Spomedzi fyzikálnych vonkajších faktorov má pomerne veľký dopad na kožu extrémna teplota. Príliš nízke teploty redukovujú sekréciu mazových žliaz a spôsobujú vysychanie pokožky. Naopak pri vysokých teplotách je pokožka náchylnejšia na akné vzhľadom k tomu, že mazové žľazy produkujú viac potu. K najvýznamnejším exogénnym faktorom však patrí slnečné žiarenie.

2.2.2.1 Slnečné žiarenie

Slnečné žiarenie predstavuje kontinuálne spektrum elektromagnetického vlnenia pozostávajúce z týchto oblastí: gama, UV, viditeľnej (VIS) a infračervenej (IR) (Obr. 2).

Žiarenie, ktoré dopadá na zemský povrch predstavuje oblasť UV, VIS a IR. Vo všeobecnosti je slnečné žiarenie nevyhnutné pre priebeh životných procesov všetkých živých organizmov, jednotlivých pochodov v atmosfére aj na Zemi dodávaním tepelnej energie. Je nutné k syntéze biologicky aktívnej formy vitamínu D a rovnako ovplyvňuje vyplavovanie hormónov, a to konkrétne serotoninu a melatonínu, ktoré majú pozitívny vplyv na ľudskú psychiku (Svobodová a Vostálová, 2010). Svetová zdravotnícka organizácia dokonca potvrdila liečivé účinky slnečného žiarenia - fototerapie pri prevencii mnohých kožných ochorení ako ekzém, psoriáza či akné (Lim *et al.*, 2012; Hawk *et al.*, 2013; Lucas *et al.*, 2015). Avšak popri pozitívnych účinkoch je známe značné množstvo negatívnych vlastností slnečného žiarenia. Za negatívne dopady slnečného žiarenia na kožu je predovšetkým zodpovedná UV oblasť. V menšej miere vykazuje negatívny efekt VIS a IR oblasť (Cho *et al.*, 2009; Maddodi *et al.*, 2012).



Obr. 2 Slnečné žiarenie ako kontinuálne spektrum elektromagnetického vlnenia. Upravené podľa Britannica (2019).

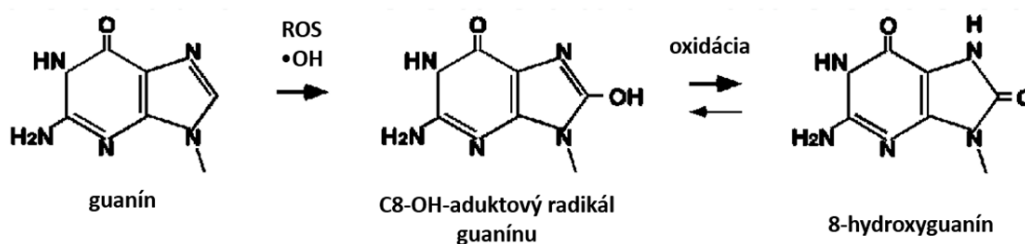
2.2.2.1.1 UV oblasť slnečného žiarenia

Ultrafialové svetlo, objavené nemeckým fyzikom Johannom Wilhelmom Ritterom, je elektromagnetickým žiarením, ktorého vlnová dĺžka sa pohybuje od 100-400 nm (Hermann, 1987). Dvomi hlavnými zdrojmi UV žiarenia sú slnko a UV lampy. Slnko je jeho prirodzeným zdrojom, a preto sa teda UV žiarenie považuje za všadeprítomné. Poznáme 3 základné typy UV žiarenia: UV-A (315-400 nm), UV-B (280- 315 nm) a UV-C (<280 nm) (Situm *et al.*, 2014).

UV-A žiarenie má schopnosť prenikať hlboko do kože, konkrétne až k rozhraniu epidermis – dermis (až 80 %) a do dermis, pričom dlhodobá expozícia spôsobuje predčasné starnutie kože. Toto žiarenie preniká aj cez okenné sklo a je zodpovedné za bezprostrednú alebo okamžitú pigmentáciu našej kože. Jeho negatívny dopad spočíva predovšetkým v nepriamej reakcii s endogénnymi chromoformi (fotosintetizérmi), ktoré sa aktivujú pôsobením UV-A žiarenia, po excitácii predajú energiu na kyslík a vznikajú tak reaktívne druhy kyslíka (ROS). Medzi tieto molekuly radíme NAD koenzýmy, riboflavín a bázy nukleových kyselín (Laurent-Applegate a Schwarzkopf, 2001). V prípade, že dochádza ku vzniku nerovnováhy medzi hladinou ROS a antioxidantov, vzniká oxidačný stres. Je spojený s oxidačným poškodením makromolekúl, dochádza k oxidácii a fragmentácii DNA, bielkovín, lipidov. Medzi produkty oxidačne poškodenej molekuly DNA patrí 8-hydroxyadenín, 8-hydroxyguanín (Obr. 3), 5-hydroxycytozín, 5-hydroxyuracil či tymínglykol a mnohé ďalšie (Sinha a Häder, 2002). Tieto poškodené biomolekuly sa akumulujú, čím môže dôjsť k apoptóze buniek, ich predčasnému starnutiu, prípadne až k vzniku ochorenia kože či kožných nádorov (Poljšak a Dahmane, 2012). Najnebezpečnejšie vlnové dĺžky UV-B žiarenia v rozmedzí od 280-294 nm sú síce absorbované ozónovou vrstvou, no zvyšné UV-B žiarenie (294-315 nm) je i tak považované za silný karcinogén. Je omnoho účinnejšie než UV-A žiarenie, napr. jeho schopnosť vyvolať erytém je 1000 krát vyššia v porovnaní s UV-A. Neprechádza do takej hĺbky kože ako UV-A žiarenie, je absorbované hlavne v epidermis a predstavuje kľúčový faktor v priamom poškodzovaní DNA. Medzi hlavné oxidačné fotoprodukty DNA patria pyrimidínové diméry, cyklobután pyrimidínové diméry (CPDs) a 6-4 fotoprodukty (6-4 pyrimidín-pyrimidón, 6-4 pyrimidín-pyrimidinón) (Cadet *et al.*, 2005). Poškodením DNA vznikajú tiež aj dvojvláknové zlomy prípadne DNA cross-linky. UV-B žiarenie je nevyhnutné pre syntézu vitamínu D a ide o typ žiarenia, ktoré je zodpovedné za dlhodobú pigmentáciu, syntézu melanínu a tmavnutie pokožky.

UV-C žiarenie je úplne absorbované ozónovou vrstvou, preto má veľmi malý dopad na zdravie človeka. UV-C je považované za najtoxickejšiu oblasť UV žiarenia. V praxi sa využíva k usmrteniu mikróbov (dezinfekcii/sterilizácii priestorov), pretože jeho vlnové dĺžky spadajú do oblasti absorpčného maxima DNA (260-265 nm) (Hussein a Elhassaneen, 2014).

UV žiarenie vyvoláva aj tzv. fototoxické reakcie, kedy je látka aktivovaná po absorpcii UV žiarenia a následne vznikajú rôzne poškodenia kože. Za fototoxickú reakciu je zodpovedné hlavne UV-A žiarenie, ale v menšej miere aj UV-B žiarenie a viditeľné svetlo. Podmienkou fototoxickéj reakcie je, aby bola látka fotoaktívna, čo znamená, že absorbuje svetelné žiarenie a následne dochádza k produkcii ROS, ktoré poškadzujú okolité bunkové štruktúry. Najčastejšími fototoxickými liekmi sú antibiotiká a antihistaminiká. Príznaky fototoxickéj reakcie môžu byť spočiatku spojené s pocitom pálenia a pichania; sčervenanie kože nastáva približne po 24 hodinách od expozície slnečného žiarenia (Kim *et al.*, 2015). Menej častá v porovnaní s fototoxickou je reakcia fotoalergická, ktorá vzniká na imunitnom podklade. K fotoalergickej reakcii dochádza, keď je kožný alergén aktivovaný svetlom a následne po naviazaní na biomolekulu sa stáva antigénom/alergénom. Tento proces zahŕňa bunkovo sprostredkovanú hypersenzitívnu odpoveď na alergén, ktorý po aktivácii svetlom vyvoláva okamžitú reakciu (Lim *et al.*, 2007).



Obr. 3 Tvorba 8-hydroxyguanínu. Produkt oxidačne poškodenej DNA hydroxylovými radikálmi. Upravené podľa Kasai (1986).

Predčasné starnutie kože (photoaging)

Jedným z dôsledkov opakovaných expozícií UV žiarenia zo slnečných lúčov, ale aj umelých zdrojov je predčasné kožné starnutie (photoaging) (Obr. 4). Biologické starnutie je naopak podmienené dedičnosťou a dochádza k nemu znížením imunity, zhoršením regulačných, reparačných a adaptačných mechanizmov. Photoaging sa súhrnne označuje ako štruktúrne a funkčné zmeny v koži, a to na častiach nášho tela, ktoré sú vystavené slnečnému žiareniu, najmä na tvári, krku a chrbte rúk. Závisí predovšetkým od miery expozície slnečnému žiareniu a od množstva melanínu. Ľudí žijúcich v geografických oblastiach, ktoré sú známe vysokou expozíciou slnečného žiarenia, postihne výraznejšie predčasné starnutie kože (Fisher *et al.* 2002; Jenkins, 2002). Medzi vonkajšie klinické príznaky patrí suchá zvráskavená pokožka, hyper alebo hypopigmentácia, strata kožného tonusu, hlboké ryhy či prekancerogénna lézia (Yaar *et al.*, 2002).



Obr. 4 Predčasné kožné starnutie ako následok kumulatívneho poškodenia priamou expozíciou UV žiarenia, ktorého primárnym zdrojom je slnečné žiarenie, ale aj umelé zdroje. Prevzaté z Isdin (2020).

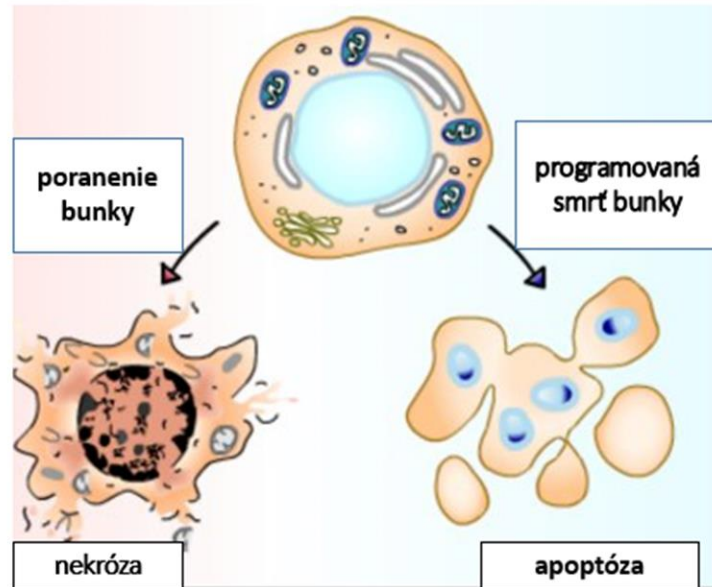
2.2.2.2 Odpoveď bunky na oxidačný stres

Pôsobením stresových faktorov je bunka schopná aktivovať rôzne mechanizmy obrany. Vysoká produkcia ROS môže prevýšiť celkovú antioxidačnú kapacitu či schopnosť endogénnych reparačných procesov. Dochádza ku kumulácii oxidačne modifikovaných biomolukúl, čo môže viesť k bunkovej smrti. K bunkovej smrti môže dochádzať dvomi cestami, a to regulovanou/programovanou (apoptickou) a nefyziologickou (nekrotickou) cestou (Obr. 5).

Apoptóza je najčastejšou formou programovanej bunkovej smrti. Kontrolovaná degradácia bunkových komponentov je regulovaná rodinou proteáz, ktoré sa nazývajú kaspázy. V zdravých bunkách existujú kaspázy vo svojich inaktívnych formách. Apoptická signalizácia aktivuje kaskádu iniciátorových kaspáz (kaspáza -2,-8,-9 a -10), ktoré sa následne štiepia a aktivujú efektorové kaspázy (kaspáza -3, -6 a -7). Spomedzi efektorových kaspáz, má najdôležitejšiu úlohu kaspáza-3 (EC 3.4.22.56), ktorá koordinuje deštrukciu bunkových štruktúr ako je fragmentácia DNA alebo degradácia cytoskeletálnych proteínov (McIlwain *et al.*, 2013). Stimuly, ktoré iniciujú apoptózu môžu byť vnútorné (napr. poškodenie endoplazmatického retikula, DNA alebo bunkové defekty počas mitózy) či vonkajšie (UV žiarenie, ROS, chemikálie), kde receptory plazmatickej membrány detekujú extracelulárne stimuly. Pre externe indukovanú apoptózu existujú tzv. receptory smrti (TNF, Fas), ktoré viažu svoje extracelulárne ligandy, čo vedie k následnej aktivácii intracelulárnych kaspáz (Locksley *et al.*, 2001). Vnútorne indukovaná apoptóza je sprostredkovaná proteínmi BAX a BAK z rodiny Bcl-2 asociovanými s mitochondriami (Cory a Adams, 2002). Typickými znakmi pre apoptózu je zmršťovanie buniek, vznik apoptických teliesok, kondenzácia chromatinu či potenciálne zmeny v membráne.

Druhou cestou bunkovej smrti je nekróza, kde sa jedná o neregulované poškodenie buniek mechanickým a chemickým stresom či patogénmi. Proces nekrózy je zvyčajne rýchly, dochádza k zdureniu buniek (onkóza) a prasknutiu stratou osmotického tlaku. Bunkový obsah uniká do extracelulárneho prostredia v dôsledku zvýšenej permeability plazmatickej membrány a dochádza k zápalovým reakciám (Proskuryakov *et al.*, 2003). Tento jav možno kvantifikovať na základe merania obsahu enzýmu laktátdehydrogenázy (LDH) (EC 1.1.1.27). Patrí do skupiny cytozolárnych enzýmov, jeho extracelulárna aktivita sa zvyšuje pri narušení integrity cytoplazmatickej membrány a dochádza k uvoľneniu do okolia. Považuje sa za marker nekrózy všeobecného poškodenia buniek

(Artiukhova *et al.*, 1996). Ďalšími významnými znakmi nekrózy je napr. fragmentácia buniek, náhodná degradácia genómovej DNA či dezintegrácia jadra.



Obr. 5 Programovaná bunková smrť (apoptóza) a nekróza. Základný rozdiel spočíva v zmrštení bunky a vzniku apoptických teliesok pri procese apoptózy, zatiaľ čo pri nekróze dochádza k strate integrity membrány a uvoľneniu bunkového obsahu. Upravené podľa Priante *et al.* (2019).

2.3 Protekcia kože

Dlhodobé a opätovné vystavovanie našej kože slnečným lúčom môže spôsobiť poškodenie biomolekúl. Koža je preto vybavená celou radou prirodzených ochranných mechanizmov, ktoré znižujú alebo eliminujú toto poškodenie. Jedná sa o proces, do ktorého sú zapojené jednotlivé ochranné a opravné mechanizmy. Prirodzené ochranné mechanizmy sú dopĺňované tzv. exogénnymi ochrannými mechanizmami, ktoré pomáhajú endogénnemu mechanizmu.

2.3.1 Endogénne obranné mechanizmy

Ľudská koža obsahuje sieť účinných ochranných endogénnych systémov. Jedným z nich je keratinizácia (rohovatenie kože), čo je proces, kedy sa keratinocyty vyprodukované v najspodnejšej, bazálnej vrstve epidermis, posúvajú smerom k povrchu kože. Proces keratinizácie je dôležitý v zabezpečení mechanickej odolnosti, udržiavaní štruktúrálnej integrity, v ochrane pred zmenami hydrostatického tlaku, ale predovšetkým bráni prieniku UV žiarenia, čo sa odráža na zrohovatej vrstve našej kože (Shetty a Gokul, 2012). Keratínové proteíny tiež regulujú reakcie na proapoptické signály a podieľajú sa na hojení rán (Gu a Coulombe, 2007). Ďalšou formou ochrany je kožný pigment melanín, ktorého tvorba je stimulovaná absorpciou fotónov UV-A a UV-B žiarenia. Redukuje tak množstvo žiarenia, ktoré preniká do epidermis a dermis, čím bráni UV-indukovanému poškodeniu DNA (Chen *et al.*, 2007). Tiež má schopnosť vychytávať voľné radikály. Melanín je uskladnený v melanozóme a následne transportovaný do susedných keratinocytov, kde dáva pokožke charakteristickú farbu a zabezpečuje fotoochranu (Hearing, 2005). Ďalšou zložkou endogénneho ochranného systému sú antioxidanty, ktoré môžu byť enzýmovej či neenzýmovej povahy.

2.3.1.1 Enzýmové antioxidanty

Medzi enzýmové antioxidanty patrí napríklad superoxiddismutáza (SOD) (EC 1.15.1.1), glutatiónpoxidáza (GPx) (EC 1.11.1.9) a kataláza (Cat) (EC 1.11.1.6). SOD je enzýmom vyskytujúcim sa jednak v mitochondriách, ale aj v cytoplazme. Vo svojom aktívnom mieste obsahuje redoxné kovy (Mn, Fe) a podieľa sa na odbúravaní toxického superoxidového radikálu ($O_2 \cdot^-$) za vzniku peroxidu vodíka (H_2O_2). Gpx katalyzuje reakciu, kde redukovaná forma glutatiónu (GSH) reaguje s H_2O_2 , ktorý je detoxikovaný

na H₂O za tvorby oxidovaného glutatiónu – glutatióndisulfidu (GSSG). Glutatióntreduktáza (GR) (EC 1.8.1.7) následne redukuje GSSG za vzniku GSH (Aktaş *et al.*, 2005). Po SOD je Cat druhým najhojnejším enzymatickým antioxidantom, ktorý katalyzuje rozklad H₂O₂ na kyslík a vodu (Vendemiale *et al.*, 1999). Predpokladá sa, že nedostatok alebo porucha Cat súvisí s rozvojom degeneratívnych ochorení ako je diabetes mellitus, hypertenzia, vitiligo či Alzheimerova choroba (Habib *et al.*, 2010).

S týmito enzýmami úzko spolupracujú aj ďalšie antioxidačné enzýmy ako sú hemoxygenáza-1 (Ho-1) (EC 1.14.99.3), glutatión-S-transferáza (GST) (EC 2.5.1.18) a NAD(P)H chinón:oxidoreduktáza-1 (NQO1) (EC 1.6.99.2). Ho-1 je enzým patriaci do skupiny izoenzýmov s celou radou biologických funkcií (Itoh *et al.*, 2003). Katalyzuje oxidáciu porfyrínového kruhu hemu v heteroproteínoch za tvorby bilirubínu za súčasného uvoľnenia Fe a CO. Antioxidačné vlastnosti sa Ho-1 pripisujú najmä vďaka bilirubínu, ktorý je silným antioxidantom a pôsobením ROS sa prevádza späť na biliverdín a CO, ktorý pri nízkych koncentráciách pôsobí antioxidačne. Enzým Ho-1 predstavuje jeden z najdôležitejších cytoprotektívnych mechanizmov, ktoré sú aktivované v časoch bunkového stresu ako je ischemia, hypoxia, zápal či radiácia (Choi a Alam, 1996, Abraham a Kappas, 2008). Expresiu génov antioxidačnej a detoxikačnej odpovede reguluje transkripčný faktor NF-E2-related factor 2 (Nrf-2). Signálna dráha, ktorá je riadená komplexom transkripčného faktoru Nrf-2 s jeho represorom Keap-1 je jedným z najdôležitejších obranných mechanizmov chrániacich bunku pred oxidačným stresom. Po tom, ako dôjde k uvoľneniu proteínu Keap1 z komplexu Nrf-2-Keap-1 je Nrf-2 prenesený do jadra, kde pozitívne reguluje expresiu cytoprotektívnych génov naviazaním na špecifickú oblasť DNA – ARE (element antioxidačnej odpovede). Týmto spôsobom je riadená syntéza Ho-1, GST a NQO1 (Kansanen *et al.*, 2012).

2.3.1.2 Neenzýmové antioxidanty

Do neenzýmovej antioxidačnej ochrany sú zapojené izoformy vitamínu E (tokoferoly), vitamín C (kyselina askorbová), karotenoidy, GSH, kyselina močová, ubichinol, Trx, urokanová kyselina, lipoová kyselina (Shindo *et al.*, 1994). Sú nevyhnutné v širokom spektre dejov vrátane hojenia rán, modulácii imunitného systému či starnutia a ochrane proti slnečnému žiareniu. GSH ako substrát Gpx sa podieľa na regenerácii ostatných antioxidantov a je tiež zapojený do reparácie DNA či apoptózy. Dôležitú funkciu plnia taktiež aj proteíny Trx spolu s tioredoxínperoxidázou (TPx) (EC 1.11.1.15), ktoré sa

podieľajú na redukcii H_2O_2 aj $\text{O}_2^{\cdot -}$ a pri oxidačnom strese sa presúvajú z cytoplazmy do jadra (Yoshida *et al.*, 2003). Štúdia Didier *et al.* z roku 2001 sledovala expresiu Trx v ľudských kožných fibroblastoch ožiarených dávkou UV-A žiarenia, pričom po expozícii boli zaznamenané zvýšené intracelulárne hladiny Trx. Karotenoidy vrátane β -karoténu a lykopenú sú rovnako účinnými antioxidantami, ktoré zachytávajú singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) a peroxylové radikály vznikajúce pri fotooxidácii (Stahl a Sies, 2002). Silné antioxidantné ale aj protizápalové vlastnosti sú pripisované kyseline askorbovej, ktorá pomáha oddialiť predčasné starnutie kože. UV žiarenie vyvoláva zápalové stavy, ktoré môžu byť potlačené účinkami kyseliny askorbovej. Mechanizmus jej účinnosti spočíva v deaktivácii jadrového faktoru $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$), proteínu, ktorý zvyšuje tvorbu zápalových cytokínov či chemokínov. Jeho deaktiváciou nie je iniciovaná kaskáda pre zápalové cytokíny (Burke, 2017). Medzi účinné fenolové antioxidanty patria tokoferoly, ktoré inhibujú peroxidáciu lipidov sprostredkovanú voľnými radikálmi. α -Tokoferol nachádzajúci sa v rastlinných olejoch dokáže inhibovať účinky $^1\text{O}_2$, ktorý vzniká počas fotooxidácie (Niki, 2009).

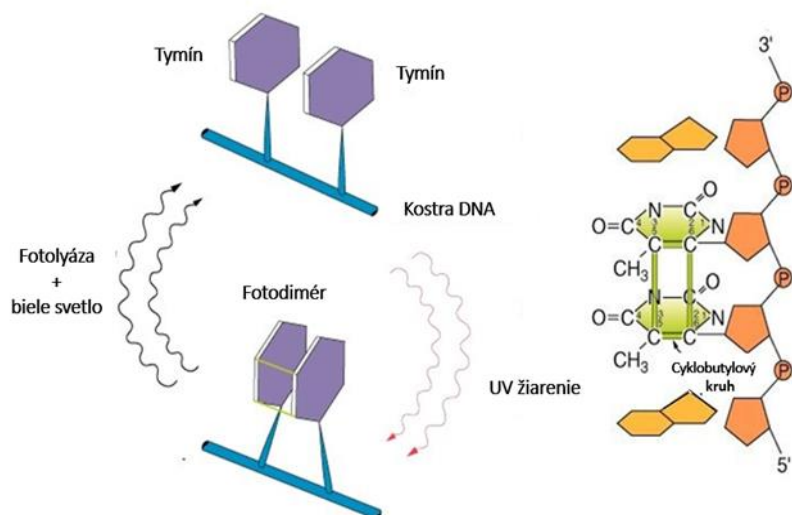
2.3.2. Endogénne reparačné mechanizmy

2.3.2.1. Oprava poškodenej DNA

K poškodeniam DNA môže dochádzať dvomi mechanizmami. Priamy mechanizmus zahŕňa absorpciu fotónov UV-B žiarenia, kedy vznikajú pyrimidínové diméry alebo (6-4) fotoprodukty. Nepriama cesta poškodenia sa spája s masívnou produkciou ROS a vznikom oxidačne modifikovaných bází (8-hydroxyadenín, 8-hydroxyguanín, 5-hydroxycytozín) či dvojvláknových DNA zlomov. Pri menších poškodeniach jednej bázy sa uplatňuje reparačný mechanizmus - bázová excízna oprava, kedy je poškodená báza rozpoznaná a odstránená. Pri nukleotidovej excíznej oprave sa opravujú väčšie jednoreťazové poškodenia (pyrimidínové diméry). Ďalší mechanizmus zahŕňa reparáciu chybného zaradenia báz (mismatch repair), kedy sa opravujú nesprávne zaradené bázy, ktoré vznikli pri chybách DNA replikácie a rekombinácie. K oprave dvojvláknových zlomov sa najčastejšie využíva homológna rekombinácia, pri ktorej sa homologická sekvencia využíva ako templát alebo nehomologické spájanie koncov s priamym spojením zlomených koncov (Cooper, 2000).

Enzýmová cesta reparácie DNA poškodenej UV žiarením zahŕňa viaceré enzýmy

ako napríklad fotolyázu (EC 4.1.99.3). Tento enzým konvertuje pyrimidínové diméry na normálne pyrimidínové bázy a k jeho aktivácii je potrebné viditeľné svetlo (Obr. 6) (Yamamoto *et al.*, 2017). Ďalšími enzýmami sú glykozyláza, ktorá štiepi N-glykozidickú väzbu a odstraňuje poškodené bázy, nukleázy (exo/endo), ktoré štiepia fosfodiesterové väzby medzi nukleotidmi DNA alebo helikázy, ktoré oddeľujú dve komplementárne vlákna.



Obr. 6 Pyrimidínové diméry sa typicky tvoria medzi susednými tymínovými bázami, keď je DNA vystavená UV žiareniu. Kovalentná väzba medzi susednými tymínovými zvyškami je reverzibilná fotoreaktiváciou prostredníctvom enzýmu fotolyázy. Upravené podľa Memorial University (2020).

2.3.2.2. Oprava poškodených lipidov

UV žiarenie môže ovplyvňovať lipidy na povrchu kože, a to najmä polynenasýtené mastné kyseliny (PUFA) s tvorbou aktívnych lipoperoxidov. Peroxidácia lipidov je dej pozostávajúci zo sady reťazových reakcií, ktoré sú iniciované reakciou ROS s PUFA, vznikom radikálu PUFA, ktorý po premene na konjugovaný dién reaguje s kyslíkom (Yin *et al.*, 2011). Vzniknuté lipidové peroxylové radikály (LOO^{*}) sa môžu následne rozkladať na niekoľko reaktívnych druhov ako napríklad lipidové alkoxylové radikály, epoxidy, alkanály či alkoholy (Yin *et al.*, 2011). Oxidované lipidové dvojvrstvy sa stávajú substrátmi pre fosfolipázu A₂ (EC 3.1.1.4). Uvoľňuje mastné kyseliny z fosfolipidov v pozícii dva, kde sú nenasýtené mastné kyseliny, a teda možné oxidované PUFA. Ďalšími produktami, ktoré vznikajú radikálovou reťazovou reakciou sú hydroperoxydy, stávajú sa substrátmi pre Gpx, ktorá ich detoxikuje (Van Kuijk *et al.*, 1987). Jeden z protektívnych mechanizmov, ktorý je indukovaný UV žiarením je autofagia. Ide o recykláciu oxidačne modifikovaných lipidov či proteínov v cytozole (Kroemer *et al.*, 2010).

2.3.2.3. Oprava poškodených proteínov

Ďalšie z hlavných bunkových komponentov náchylných k oxidačnému poškodeniu sú proteíny. Väčšina proteínových poškodení vyvolaných UV žiarením je sprostredkovaná ¹O₂, ktorý reaguje prednostne s postrannými reťazcami Trp, His, Tyr, Met a Cys (Shacter, 2000). Degradácia poškodených proteínov je vykonávaná prostredníctvom dvoch hlavných mechanizmov, a to proteazómu a lyzozómu. Proteazóm je proteínový komplex, ktorý degraduje nepotrebné a poškodené proteíny proteolýzou, chemickou reakciou, ktorá narušuje peptidové väzby prostredníctvom enzýmov nazývaných proteázy. Proteíny určené k degradácii sú značené malým proteínom ubikvitínom katalýzou ubikvitin ligázy (EC 6.3.2.19) (Lodish *et al.*, 2004). Druhou dráhou proteínovej degradácie eukaryotických buniek je príjem proteínov lyzozómom. Lyzozóm je sférická organela s jednoduchou membránou, ktorá vzniká v Golgiho aparáte a obsahuje tráviace enzýmy vrátane niekoľkých proteáz. V porovnaní s proteazómom, lyzozóm degraduje široké spektrum štruktúrne rozmanitých látok, vrátane proteínov. Poškodené alebo chybné zložené proteíny sa do lyzozómu dopravujú prostredníctvom dráh makroautofágie, chaperónom sprostredkovanej autofágie a endocytózy (Ciechanover, 2005).

2.3.3 Exogénna fotoprotekcia kože

V priebehu dňa, hlavne v letných mesiacoch, je naša koža častejšie vystavená pôsobeniu slnečných lúčov. Negatívne dopady pôsobenia slnečného žiarenia je možné potlačiť niekoľkými spôsobmi ako napríklad obmedzením pobytu na slnku v obedných hodinách (v čase od 11. do 13. hod.), tienením či využitím ochranných odevov (klobúky, dlhý rukáv, dlhé nohavice). Je však dôležité poznamenať, že slnečné lúče dopadajú na zemský povrch aj cez mraky, a to až 70% - 85%, odrážajú sa aj od piesku a snehu a tak zvyšujú expozíciu našej pokožky (Canada, 2020). Najčastejšie používanou ochranou pred pôsobením slnečného žiarenia je fotoprotektívna kozmetika obsahujúca UV filtre tzv. sunscreens, ktoré delíme podľa mechanizmu účinku na 2 typy: fyzikálne a chemické. Fyzikálne filtre (blokátory) predstavujú nerozpustné anorganické látky ZnO a TiO₂. Podľa veľkosti častíc dochádza k odrazu, rozptylu alebo absorpcii žiarenia. Chemické UV filtre sú organické látky so schopnosťou pohlcovať UV fotóny. Patria medzi ne deriváty kyseliny škoricovej, salicylovej, aminobenzoáty či benzofenóny. U chemických filtrov môže dochádzať k ich rozkladu a po absorpcii žiarenia. UV filtre sa aplikujú vo forme krémov, olejov, gélov či sprejov, súhrnne označovaných ako dermatologické prípravky (Montenegro a Santagati, 2019).

2.4 Prírodné látky v dermatológii

Ďalšou možnosťou ochrany kože pred pôsobením slnečného žiarenia je využívanie prírodných látok, ich zmesí a extraktov. Ľudia sa inšpirujú prírodou, a preto je použitie prírodných látok veľmi populárne. V porovnaní s chemickými opaľovacími prípravkami môžu mať potenciálne menej vedľajších účinkov. Niektoré prírodné látky, ich zmesi alebo extrakty majú okrem antioxidantných, protizápalových a imunostimulačných vlastností aj schopnosť reagovať s fotónmi UV žiarenia. Medzi ne patrí napríklad kurkumín ako hlavná účinná zložka kurkumovníka dlhého (Chan *et al.*, 2003), extrakt zo zeleného čaju a jeho obsahové zložky epigalokatechingalát, epikatechingalát, epikatechíny, flavanoly, flavonoidy (Silverberg *et al.*, 2011), extrakt z rastliny sladovky hladkoplodej likochalkón A (Fowler *et al.*, 2010), extrakt z granátového jablka (Gil *et al.*, 2000), resveratrol obsiahnutý v hrozne (Aggarwal *et al.*, 2004) alebo sekundárne metabolity rastliny konopy siatej, ktoré sa nazývajú fytoKANABINOIDY (Pertwee, 2015).

2.4.1 Konopa siata (*Cannabis sativa* L.)

Konopa siata je pozoruhodná rastlina, ktorá obsahuje veľa cenných prírodných látok. Pestuje sa po celom svete a je využívaná v mnohých odvetviach vrátane medicíny.

Z taxonomického hľadiska je zaradená do čeľade konopovité (*Cannabaceae*). Konopa je jednoročná dvojdomá bylina, s vysokou stonkou a dlaňovito zloženými listami, ktoré sú pílkovité po okrajoch (Obr. 7).

Konopa siata sa považuje za všestranný liek a v posledných rokoch je čoraz viac vyhľadávaná vďaka vysokému obsahu omega-3-mastných kyselín. Nedostatkom omega-3-mastných kyselín dochádza k rozvoju neurodegeneratívnych ochorení ako Parkinsonova choroba a Alzheimerova choroba, a preto by mohli byť sľubné v ich liečbe. Konopa môže významne prispievať aj k liečbe aterosklerózy, zápalových ochorení a preukázateľne pozitívne účinky boli potvrdené aj v oblasti dermatológie, konkrétne pri liečbe uremického pruritu (Szepietowski *et al.*, 2005), v liečbe psoriázy (Wilkinson a Williamson, 2007) či atopickej a kontaktnej dermatitády (Mounessa *et al.*, 2017). Za pozitívne účinky vďaka predovšetkým svojim sekundárnym metabolitom známym ako fytokanabinoidy.



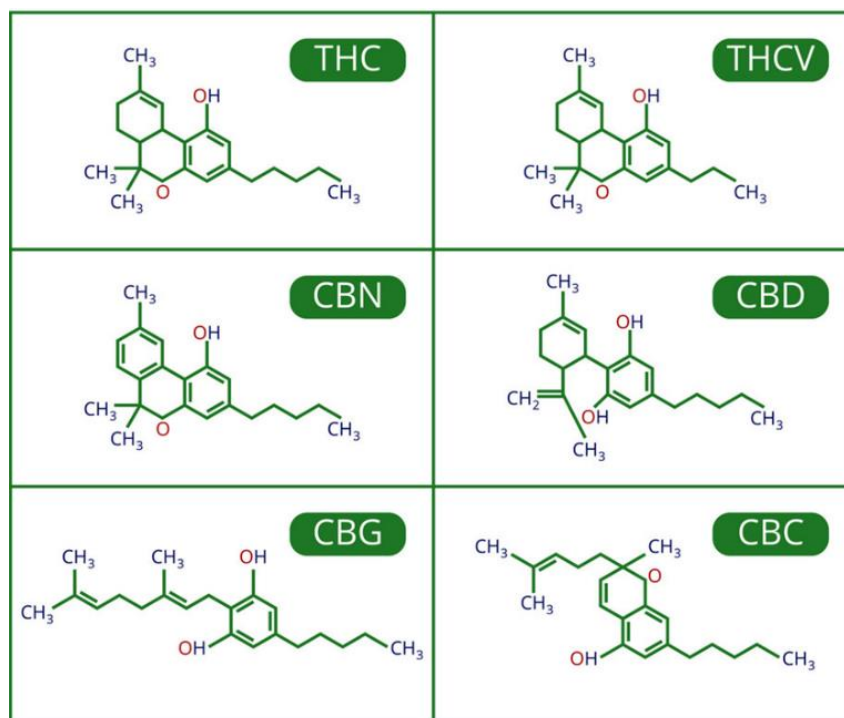
Obr. 7 Konopa siata (*Cannabis sativa* L.) z čeľade konopovité (*Cannabaceae*). Prevzaté z Leafly (2019).

2.4.1.1 Fytokanabinoidy

Kanabinoidy sú rozsiahlou skupinou štruktúrne rozmanitých chemických zlúčenín, ktoré sa členia do troch hlavných skupín: prírodné kanabinoidy (fytokanabinoidy), endokanabinoidy a syntetické kanabinoidy. Fytokanabinoidy sa vyskytujú výlučne v rastline konope satej a nachádzajú sa konkrétne v jej žľazových trichómoch (Potter, 2004). Jedná sa o prírodné produkty, ktoré vykazujú typický terpenofenolový skelet C₂₁ (obr. 8). Konope sate obsahuje vyše 100 doposiaľ objavených druhov fytokanabinoidov, pričom piatimi najznámejšími fytokanabinoidmi sú Δ^9 -tetrahydrokanabinol (THC), ktorý predstavuje hlavnú psychoaktívnu zložku konope, štruktúrne podobnými sú kanabichromen (CBC), kanabigerol (CBG) a kanabidiol (CBD) (Pertwee, 2015). Z THC vzniká pri spracovávaní konope kanabinol (CBN). Konope sate (potravinárska/technická) sa líši niekoľkonásobne nižším množstvom THC od konope psychoaktívnej. Používanie konope nie je zo zákona povolené, avšak zákonnosť jej používania na lekárske a terapeutické účely sa v jednotlivých krajinách sa líši.

THC pôsobí čiastočne ako agonista na kanabinoidných receptoroch CB1 a CB2 (Munro *et al.*, 1993). Je známe mnohými pozitívnymi účinkami ako napríklad potlačenie bolesti pri chemoterapii alebo potlačení zápalu (Guzman, 2003). Protizápalové vlastnosti boli pripísané aj CBN, ktorý je mierne psychoaktívnym kanabinoidom a v konope sa nachádza len v stopových množstvách. Jeho pozitívny účinok bol sledovaný aj pri potlačení kolagénom-indukovanej artritídy (Zurier a Burstein, 2016).

Izomérom THC je CBD, ktorého je približne 40 % rastlinného extraktu (Campos *et al.*, 2012). Vďaka svojim protizápalovým, antioxidantným a neuroprotektívnym vlastnostiam je v posledných rokoch intenzívne študovaná jeho biologická aktivita (Lastres-Becker *et al.*, 2005). V porovnaní s THC je jeho afinita k receptorom CB1 a CB2 omnoho nižšia, čím sa vysvetľuje aj jeho nepsychoaktívny charakter, podobne ako aj u ostatných zložiek konope (Jones *et al.*, 2010). CBC sa v konope satej vyskytuje prevažne ako kyselina kanabichromenová (CBCA). Podobne ako aj ostatné fytokanabinoidy vykazuje CBC, spolu s jeho homológmi a izomérmi protizápalové a antibakteriálne vlastnosti. Bolo dokázané, že CBC pôsobí aj ako účinné analgetikum a antidepresívum (El-Alfy *et al.*, 2010). CBG sa vo väčšine odrôd konope vyskytuje len v nízkom množstve, a to približne pod 1%. Kyselina kanabigerolová (CBGA) je prekursorom syntézy troch kanabinoidov CBD, CBG a CBD (Healtheuropa, 2020).

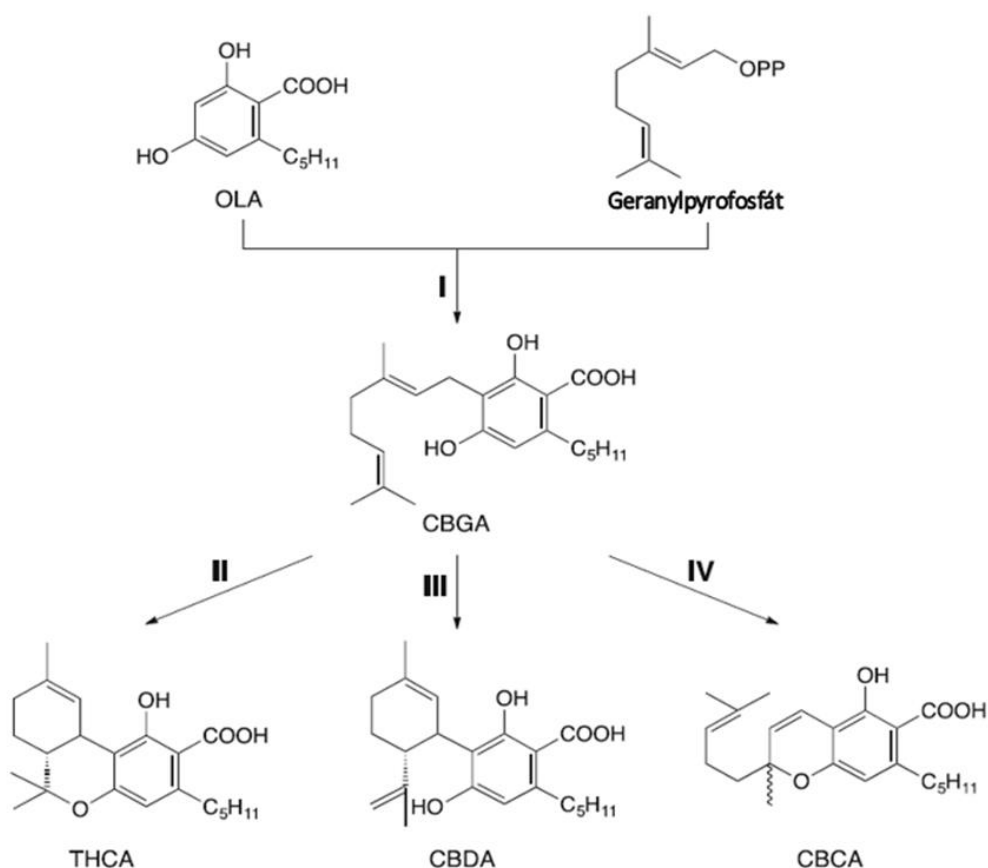


Obr. 8 Chemické vzorce najznámejších druhov kanabinoidov. Psychoaktívnu zložku predstavuje tetrahydrokanabinol (THC) a tetrahydrokanabivarín (THCV) ako homológ THC s propylovým postranným reťazcom. Nepsychoaktívne zložky sú kanabinol (CBN), ktorý je metabolitom THC; kanabidiol (CBD), kanabigerol (CBG) a kanabichromen (CBC). Upravené podľa Hazekamp a Fisedick (2012).

2.4.1.1.1 Biosyntéza fytokanabinoidov

Kanabinoidy sú prenylované polyketidy, ktoré sú syntetizované z mastných kyselín a izoprenoidných prekursorov. V biosyntetickej dráhe kanabinoidov (Obr. 9) sú zapojené skupiny kondenzujúcich enzýmov, ktoré katalyzujú počiatočné kľúčové reakcie mnohých sekundárnych metabolitov. Biosyntetická dráha kanabinoidov začína mastnou kyselinou s krátkym reťazcom – kyselinou hexánovou. Mastná kyselina je aktivovaná koenzýmom A (CoA) pomocou acyl-Coa-syntetázy (AAE1) (EC 6.2.1.1) (Stout *et al.*, 2012). Následne je hexanoyl-CoA a tri molekuly malonyl-CoA pôsobením polyketidsyntázy III (PKS) (EC 2.3.1.260) a cyklázy kyseliny olivetolovej (EC 4.4.1.26) aldolovou cyklizáciou premenený na kyselinu olivetolovú (OLA) (Raharjo *et al.*, 2004; Gagne *et al.*, 2012). Kyselina olivetolová reaguje s geranyldifosfátom (GPP) za katalýzy enzýmu geranyl-pyrofosfát:olivetolát geranyltransferáza (syntéza kyseliny kanabigerolovej (EC 2.5.1.102) za tvorby kyseliny kanabigerolovej (CBGA) (Andre *et al.*, 2016). Nakoniec, tri odlišné cyklázy katalyzujú oxidatívnu cyklizáciu monoterpénového zvyšku kyseliny kanabigerolovej za vzniku kyseliny Δ^9 – tetrahydrokanabinolovej (THCA),

kanabidiolovej (CBDA) a kanabichromenovej (CBCA) (Sirikantaramas *et al.*, 2007). Výsledkom neenzymatickej dekarboxylácie THCA vzniká THC, z CBDA sa tvorí CBD a dekarboxyláciou CBCA vzniká CBC. K tejto neenzymatickej reakcii zvyčajne dochádza počas skladovania rastlinného materiálu, po vystavení teplu alebo slnečnému žiareniu (de Meijer *et al.*, 2003).



Obr. 9 Biosyntetická dráha hlavných kanabinooidov. Biosyntetické enzýmy zahŕňajú geranylpyrofosfát:olivetolát geranyltransferázu (I), syntázu kyseliny tetrahydrokanabinolovej (THCA) (II), syntázu kyseliny kanabidiolovej (CBDA) (III) a syntázu kyseliny kanabichromenovej (CBCA) (IV). Kyselina olivetolová (OLA), kyselina kanabigerolová (CBGA). Upravené podľa Fellermeier a Zenk (1998).

2.4.1.2 Endokanabinoidný systém

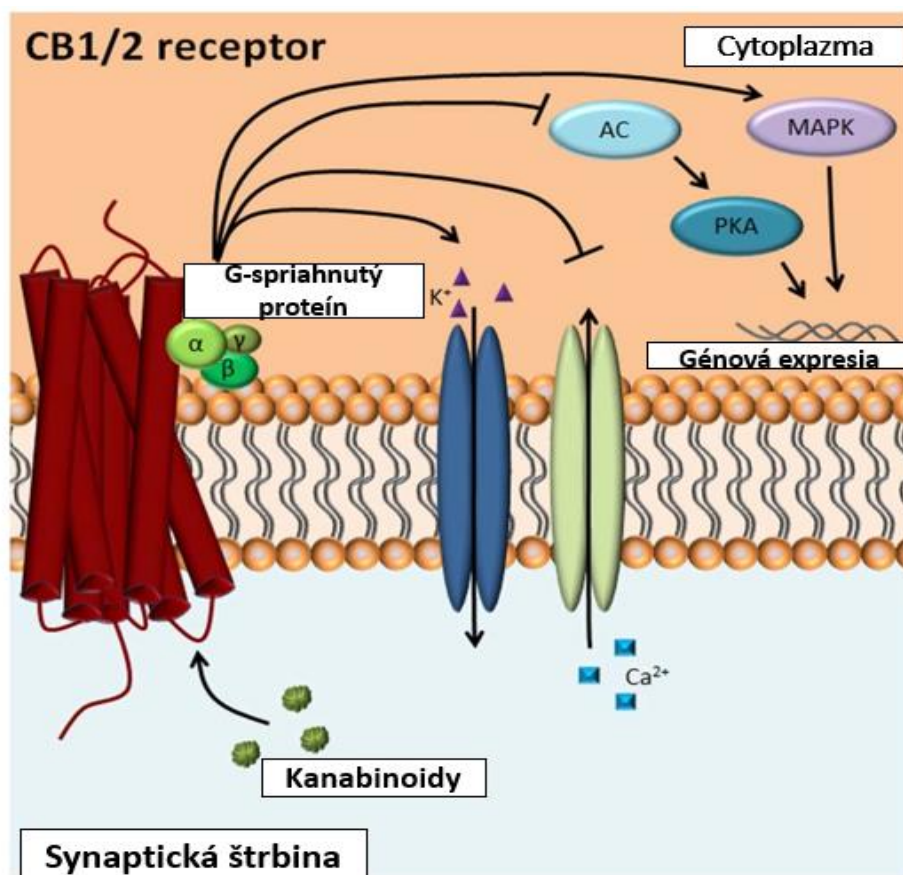
Endokanabinoidný systém je komplexný bunkový signalizačný systém, ktorý tvoria kanabinoidné receptory (CB1, CB2), endogénne ligandy viažuce sa na kanabinoidné receptory (napr. 2-arachidonoyl-glycerol a anandamid (AEA)) a enzýmy, ktoré sa podieľajú na degradácii a produkcii endogénnych ligandov (napr. hydroláza mastných kyselín, monoacylglycerol lipáza) (Sarfaraz *et al.*, 2008, Basu a Dittel, 2011).

Endogénne ligandy – endokanabinoidy sú prirodzene produkované bunkami ľudského tela. Jedná sa o triedu lipofilných signalizačných molekúl, ktoré fungujú ako neuromodulátory. Sú uvoľňované postsynaptickými neurónmi a viažu sa na presynaptické receptory (CB1). Zmierňujú tak uvoľňovanie neurotransmitterov ako je kyselina gama-aminomaslová (GABA), glutamát a dopamín (Di Marzo *et al.*, 2004). Iné endokanabinoidy sa môžu viazať na receptory v imunitných bunkách (CB2), čo ukazuje zapojenie do zápalovej reakcie (McKallip *et al.*, 2002).

Kanabinoidné receptory (CB) sú známe dva, a to CB-1 a CB-2, ktoré sú spojené s G-proteínom (Obr. 10) alebo receptorom typu nešpecifických iónových kanálov (napr. receptor TRPV1 prenášajúci vápnik) (Howlett, 2002). Receptor CB-1 sa nachádza v centrálnom nervovom systéme, CB-2 bol identifikovaný v imunitnom systéme a následne bolo zistené, že je prítomný vo všetkých periférnych tkanivách (Pacher *et al.*, 2006). Prítomnosť ECS bola potvrdená aj v koži. Receptory CB-1 a CB-2 boli nájdené v kožných nervových vláknach, žírnych bunkách, epidermálnych keratinocytoch, fibroblastoch a melanocytoch (Casanova *et al.*, 2003; Bíró *et al.*, 2009). ECS je zapojený v akútnych a chronických zápalových ochoreniach, ovplyvňuje proliferáciu a diferenciáciu kožných buniek, ktorej rovnováha je kľúčovým determinantom správnej kožnej homeostázy (Pacher *et al.*, 2006). Štúdia z roku 2007 podľa Karsak *et al.* potvrdila protektívnu úlohu ECS pri alergickom zápale kože.

THC má vysokú afinitu k receptoru CB1. Na základe štúdií bolo zistené, že CBD (v závislosti od dávky) naopak inhibuje ECS signalizáciu pravdepodobne väzbou na alosterické miesto receptoru CB1. Zmení sa tak účinnosť receptoru pre iné primárne ligandy (THC, endokanabinoidy) a môže byť potlačený psychoaktívny efekt (Tham *et al.*, 2018). CBD, ale aj ostatné fytoKANabinoidy (CBC, CBG alebo CBN) majú len veľmi nízku afinitu k CB receptorom, a teda nereagujú s nimi priamo. Majú však schopnosť nepriamej interakcie a ovplyvňovania hladín endokanabinoidov alebo iných agonistov (Bitencourt *et al.*, 2008). Ovplyvňovanie aktivity ECS fytoKANabinoidmi sa využíva

terapeuticky, napr. pri liečbe porúch duševného zdravia, pohybového ústrojenstva alebo autoimunitných ochorení (Andre *et al.*, 2016). Pretože sa ECS nachádza aj v bunkách kože a hrá dôležitú rolu v protizápalovej reakcii sa fytokanabinoidy javia ako vhodní kandidáti pri ochrane kože pred nežiaducimi účinkami slnečného žiarenia.



Obr. 10 Kanabinoidné receptory (CB) sú receptory spojené s G-proteínom umiestnené v presynaptickej bunkovej membráne. Po aktivácii kanabinoidmi CB receptory inhibujú Ca^{2+} kanály a aktivujú dovnútra smerujúce K^+ kanály, čo vedie k hyperpolarizácii a zníženiu uvoľňovania neurotransmitterov. CB receptory môžu navyše regulovať bunkové funkcie prostredníctvom bunkovej expresie aktiváciou mitogénom aktivovaných proteínkináz (MAPK) a inhibíciou adenylátcyklázy (AC) a cyklickej AMP-proteínkinázy A (PKA). Upravené podľa di Marzo *et al.* (2015).

3. Experimentálna časť

3.1 Materiál a metódy

3.1.1 Chemikálie

BioRad (USA): 5x prenosový pufor - Blot® Turbo™

Carl Roth (Nemecko): tris(hydroxymetyl)aminometán (Tris) (C₄H₁₁NO₃)

Cell signaling (USA): primárna králičia protilátka - β-tubulín (2146)

Lach-Ner (ČR): dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), etanol (C₂H₆O, p.a., 80%, v/v), kyselina chlorovodíková (HCl), chlorid sodný (NaCl), chlorid draselný (KCl), metanol (CH₃OH, 99,8%, v/v), kyselina octová (C₂H₄O₂, p.a., 99%, v/v), chlorid vápenatý (CaCl₂), hydroxid draselný (KOH)

Gibco (USA): trypsín-EDTA (0,25%, v/v)

Merck (USA): akrylamid/N,N' metylenbisakrylamid (AA, 29:1, 40%, v/v), Signal Boost™ Immuno-reaction Enhancer Kit, pyruvát sodný (C₃H₃NaO₃)

Penta (USA): izopropanol (C₃H₈O), formaldehyd (CH₂O, 36-38%, v/v), glukóza (C₆H₁₂O₆)

Roche (Nemecko): proteázový inhibítor Complete™

Santa Cruz (USA): primárne králičie protilátky - kataláza (sc-50508), hemoxygenáza-1 (sc-10789), sekundárna protilátka - IgG-chrenová peroxidáza (goat antirabbit IgG-HRP, sc-2004), reagent A a B k detekcii proteínov (Imunocruz)

Serva (Nemecko): hovädzí sérový albumín-frakcia (BSA), N,N,N',N'-tetrametyletyléndiamín (TEMED), Coomassie Brilliant blue G-250

Siad (Slovensko): oxid uhličité (CO₂)

Sigma-Aldrich (ČR): dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Na₂HPO₄.12H₂O), dimetylsulfoxid (DMSO, 99%, v/v), fetálne hovädzie sérum (FBS), L-glutamín (C₅H₁₀N₂O₃), etyléndiamíntetraoctová kyselina (EDTA, 0,5 mol.l⁻¹), Dulbecco's modified Eagle médium (DMEM), zmes penicilínu (PNC 10 mg.ml⁻¹) so streptomycínom (STR 100 U/ml), ditiotreitól (DTT), kyselina N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-

etansulfonová (HEPES), peroxodisíran amonný (APS) $((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8)$, Ponceau S, Triton X-100, Tween® 20, trypanová modrá (0,4%, v/v), glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$), reagent A a reagent B (roztoky k stanoveniu proteínu metódou bicinchoninovou), kyselina bicinchoninová, fluorid sodný (NaF), kyselina etylénglykol-di-(2-aminoethyléter)-tetraoctová (EGTA), vanadičnan trisodný (Na_3VO_4), glycerol fosfát ($\text{C}_3\text{H}_9\text{O}_6\text{P}$), kyselina ferulová ($\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$), Ac-DEVD-AMC (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metylkumarín) (fluorogénny substrát pre kaspázu-3), Ac-DEVD-CHO (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-CHO), merkaptoetanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$)

ThermoFisher (USA): PageRuler Prestained Protein Ladder

Študované látky

PharmaCan s.r.o. (ČR): kanabichromen (CBC), kanabidiol (CBD), kanabigerol (CBG), kanabinol (CBN)

Roztoky

Roztoky pre izoláciu, kultiváciu fibroblastov a HaCaT

10x koncentrovaný fosfátový pufo (10krát PBS) (pH = 7,4): 1,37 mol.l⁻¹ NaCl; 0,0268 mol.l⁻¹ KCl; 0,0896 mol.l⁻¹ Na₂HPO₄.12 H₂O; 0,0147 mol.l⁻¹ KH₂PO₄. Pred použitím je roztok 10krát riedený deionizovanou vodou

Roztok pre transport kože: PBS obsahujúci PNC (500 mg.ml⁻¹), STR (500 U/ml) a amfotericín B (1,25 mg.ml⁻¹)

Roztok pre kultiváciu kože: DMEM a Ham's F12 Nutrient Mixture (1:3) obsahujúci FBS (10%, v/v), PNC (100 mg.ml⁻¹), STR (100 U/ml), amfotericín B (0,125 mg.ml⁻¹), hydrokortizón (0,8 mg.ml⁻¹), adenín (24 µg.ml⁻¹), inzulín (0,12 U/ml), epidermálny rastový faktor (1 ng.ml⁻¹) a 3,3',5-trijod-L-tyronín (0,136 µg.ml⁻¹)

Kultivačné médium: DMEM s FBS (10%, v/v), PNC (100 mg.ml⁻¹), STR (100 U/ml) (pre NHDF a HaCaT)

Bezsérové médium: DMEM s PNC (100 mg.ml⁻¹), STR (100 U/ml) (pre NHDF a HaCaT)

PBS s glukózou: PBS s glukózou (1 mg.ml⁻¹)

PBS s EDTA: EDTA (0,05%, m/v) v PBS

Roztok pre počítanie buniek: 0,4% roztok trypanovej modrej

Zásobné roztoky kanabinoidov k testovaniu na bunkách: 0,156 – 20,1 mmol.l⁻¹ CBC, CBD, CBN a CBG v DMSO

Roztoky pre stanovenie životnosti buniek pomocou neutrálnej červene

0,1% roztok neutrálnej červene: 0,1 g v 100 ml vody s 2 kvapkami ľadovej CH₃COOH; pred použitím bol roztok nariadený PBS s glukózou (3 diely 0,1% roztoku neutrálnej červene a 8 dielov roztoku PBS s glukózou)

Fixačný roztok: roztok formaldehydu (0,5%, v/v) a roztok CaCl₂ (1%, m/v) (2,5 ml formaldehydu do 250 ml vody a 2,5 g CaCl₂ do 250 ml vody; pred použitím roztok zmiešať v pomere 1:1)

Extrakčný roztok: roztok CH₃COOH (1%, v/v) v metanole (5 ml CH₃COOH v 500 ml metanole)

Roztoky pre stanovenie bielkovín metódou s kyselinou bicinchoninovou

Pracovný roztok: zmiešanie reagentu A a reagentu B v pomere 50:1

Reagent A: 1 g 4,4'-dikarboxy-2,2'-bichinolin, dvojsodná soľ (Na₂BCA, konečná koncentrácia 26 mmol.l⁻¹), 2 g Na₂CO₃.H₂O (konečná koncentrácia 0,16 mol.l⁻¹), 160 mg vínan sodný (konečná koncentrácia 7 mmol.l⁻¹), 0,4 g NaOH (konečná koncentrácia 0,1 mol.l⁻¹) 0,95 g NaHCO₃ (konečná koncentrácia 0,11 mol.l⁻¹), 100 ml H₂O

Roztok B: 4 g CuSO₄.5H₂O (konečná koncentrácia 16 mmol.l⁻¹), 100 ml H₂O.

Roztoky pre stanovenie bielkovín podľa Bradforda

Pracovný roztok: 0,01% (m/v), 100 mg Coomassie Brilliantová modrá v 50 ml etanolu (96%, v/v) a 100 ml H₃PO₄ (85%, v/v) doplnené do 1000 ml deionizovanou vodou

Štandardné roztoky hovädzieho sérového albumínu (BSA): koncentračné rozmedzie roztokov pripravených v PBS pufri: 0,0078 - 1 mg.ml⁻¹

Roztoky pre stanovenie aktivity kaspázy-3

Lyzačný roztok pre stanovenie kaspázy-3: 50 mmol.l⁻¹ HEPES, pH 7,4; Triton X-100 (0,5%, v/v), 1 tableta Complete, 5 mmol.l⁻¹ DTT doplniť vodou do 50 ml

Reakčný pufor pre kaspázu-3: 20 mmol.l⁻¹ HEPES, pH 7,1; 2 mmol.l⁻¹ EDTA, 2 tablety Complete, 5 mmol.l⁻¹ DTT doplniť vodou do 100 ml

Zásobný roztok substrátu kaspázy-3: 10 mmol.l⁻¹ Ac-DEVD-AMC v DMSO

Zásobný roztok inhibítora kaspázy-3: 2 mmol.l⁻¹ Ac-DEVD-CHO v DMSO

Reakčná zmes so substrátom: 995 µl reakčného puforu a 5 µl substrátu (výsledná koncentrácia substrátu 50 µmol.l⁻¹).

Reakčná zmes so substrátom a inhibítrom: 995 µl reakčného puforu, 5 µl substrátu (výsledná koncentrácia 50 µmol.l⁻¹), 0,5 µl inhibítora (výsledná koncentrácia 1 µmol.l⁻¹).

Roztok pre stanovenie aktivity laktátdehydrogenázy: 50 mmol.l⁻¹ fosfátový pufor pH 7,5 s 1,22 mmol.l⁻¹ pyruvátom sodným (0,134 g pyruvátu sodného na 1 l puforu); 0,491 mmol.l⁻¹ NADH (0,326 mg na 1 ml puforu)

Roztoky pre SDS-PAGE a Western blot

Lyzačný roztok na bunky: 20 mmol.l⁻¹ Tris, 5 mmol.l⁻¹ EGTA, 150 mmol.l⁻¹ NaCl, 20 mmol.l⁻¹ glycerol fosfát, 1 mmol.l⁻¹ NaF, 1 mmol.l⁻¹ Na₃VO₄, Triton X-100 (1%, v/v), Tween-20 (0,1%, v/v), 1x Tableta Complete na 50 ml

Vzorkový pufor: Tris (312,5 mmol.l⁻¹), pH 6,8; SDS (10%, m/v), glycerol (50%, v/v), DTT (0,5 mol.l⁻¹), bromfenolová modrá (0,05%, m/v).

Migračný gél

12,5% SDS polyakrylamidový gél: roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (40%, v/v) deionizovaná voda, migračný pufor, dodecylsulfát sodný (10%, m/v), APS (10%, m/v), TEMED (0,15 %, v/v)

Migračný pufo: Tris/HCl (1,5 mol.l⁻¹), pH 8,8.

Tris buffered saline (TBS): Tris (0,1 mol.l⁻¹), NaCl (0,154 mol.l⁻¹), pH 7,5

TBS + Tween (TBS/T): Tween 20 (0,1%, v/v) v TBS

TBS/T/mlieko: Tween 20 (0,1%, v/v), sušené mlieko (5%, m/v) v TBS

TBS/T/BSA: Tween 20 (0,1%, v/v), BSA (5%, m/v) v TBS

Koncentračný gél

12,5% polyakrylamidový gél: roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (40 %, v/v), deionizovaná voda, zaostrovací pufo, dodecylsulfát sodný (10 %, m/v), APS (10 %, m/v), TEMED (0,15 %, v/v)

Zaostrovací pufo: Tris (0,5 mol.l⁻¹), pH 6,8

Prenosový pufo: Tris (25 mmol.l⁻¹), glycín (192 mmol.l⁻¹), metanol (20%, v/v), SDS (0,1%, m/v), pH 8,3

TBS: Tris (0,1 mol.l⁻¹), NaCl (0,154 mol.l⁻¹), pH 7,5

TBS/T: Tween 20 (0,1%, v/v) v TBS

TBS/T/mlieko: Tween 20 (0,1%, v/v), sušené mlieko (5%, m/v) v TBS

TBS/T/BSA: Tween 20 (0,1%, v/v), BSA (5%, m/v) v TBS

Vzorkový pufo: Tris (0,312 mol.l⁻¹), pH 6,8; SDS (10%, m/v), glycerol (50%, v/v), DTT (0,5 mol.l⁻¹), bromfenolová modrá (0,05%, m/v)

Farbiaci roztok: Ponceau S (0,1% m/v) v kyseline octovej (5%, v/v)

Stripovací pufo: Tris (62,5 mmol.l⁻¹), SDS (2%, m/v), 2-merkaptóetanol (0,1 mol.l⁻¹), pH 6,8

Roztoky k detekcii proteínov: reagent A (Tris báza [2-amino-2-hydroxymetyl]propán-1,3-diol; C₄H₁₁NO₃]; luminol, kyselina p-kumarová), reagent B (H₂O₂), fotografická vývojka a ustálovač

Roztoky k stanoveniu fotostability látok

Zásobný roztok fosfátového pufru: 100 mmol.l⁻¹ roztok fosfátového pufru pH 7,4 s metanolom (2:1) s celkovým objemom 250 ml

Roztoky kanabinoïdov: 1 mmol.l⁻¹ zásobný roztok CBC, CBD, CBG, CBN v DMSO; konečná koncentrácia 20 µmol.l⁻¹ v zásobnom roztoku fosfátového pufru

Roztoky pre SPF

Štandardný roztok kyseliny ferulovej: 50 µmol.l⁻¹ etanolickej roztok kyseliny ferulovej

Roztoky kanabinoïdov: 50 µmol.l⁻¹ etanolickej roztok CBC a CBN

Laboratórne prístroje

Bio-Rad Laboratories (USA): Systém pre elektroforézu *Mini-Protean® 3 Cell* so zdrojom *PowerPac 200*, *PowerPac 3000* alebo *PowerPac universal*

Dr.Hönle UV technology (Nemecko): UV lampa, UV meter

Eppendorf (Nemecko): centrifuga *MiniSpin®*

Eppendorf (Nemecko): termomixér *Comfort*

Gilson (USA): odsávačka *Gilson Safe Aspiration Station*

IKA® (Nemecko): elektromagnetická miešačka *RH Basic KT/C*

Memmert GmbH + Co. KG (Nemecko): ultrazvuková vodná kúpeľ

Mettler Toledo (Švajčiarsko): váhy *AX105 Delta Range*

Olympus (Japonsko): mikroskop *CK40*

Shimadzu (Japonsko): UV-VIS spektrofotometer *UV-2401PC*

Tecan (Švajčiarsko): fotometer *Infinite M200 pro* pre meranie absorpcie a fluorescencie na 96-jamkových doskách, hlbokomraziaci box *VX 380*, chladená centrifuga *Jouan BR4i*, laminárny box *Jouan MSC 9 Standard*

Trigon Plus (ČR): CO₂ inkubátor

WTW (Nemecko): pH-metr inoLab pH Level 1 s elektródou *SenTix41*

Ostatný materiál a vybavenie

Eppendorf (ČR): plastové mikroskúmavky, pipety a špičky

Biotech (ČR): kultivačné fľaše, kultivačné dosky a centrifugačné skúmavky

Biologix Research Company (USA): sterilné škrabky

Dispolab (ČR): 96-jamkové dosky

Eastman Kodak (USA): fotografický film *Carestream Kodak BioMax light*, fotografická vývojka a ustálovač *Kodak GBX*

BioRad Laboratories (USA): polyvinilidenfluoridová membrána (PVDF) *Immuno-Blot™ (0,2 μm)*

Whatman (USA): filtračný papier *Whatman*

B. Braun (Nemecko): plastové injekčné striekačky

Millipore (USA): sterilizačné filtre *0,22 μm Millex®-GS*

Bürkerova komôrka, krycie sklíčka, chladiace dosky, dezinfekčný roztok, gáza, buničina a papierové servítky

3.1.2 Metódy

3.1.2.1 Príprava biologického materiálu

Ľudské kožné fibroblasty

Kožné explantáty boli pripravené z kože dospelých zdravých darcov. Použitie kože k experimentálnym účelom bolo schválené Etickou komisiou Fakultnej nemocnice Olomouc a Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a je v súlade s českou legislatívou. Všetky pacientky podpísali písomný informovaný súhlas.

Bunkové línie HaCaT

Spontánne imortalizované línie ľudských keratinocytov (HaCaT) z histologicky normálnej kože boli dodané firmou The European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) Salisbury, Spojené kráľovstvo.

Kultivácia ľudských kožných explantátov

Ľudské kožné explantáty boli pripravované z kože zdravých, dospelých darcov vo veku 18–60 rokov. Táto koža bola získavaná s informovaným súhlasom pacientov podstupujúcich plastickú operáciu prsného alebo brušného tkaniva na Oddelení plastickej a estetickej chirurgie Fakultnej nemocnice Olomouc. Použitie kožného tkaniva bolo schválené Etickou komisiou Fakultnej nemocnice Olomouc a Lekárskou fakultou Univerzity Palackého v Olomouci.

Kožné tkanivo bolo 3x opláchnuté v roztoku pre transport kože a nastrihané na približne rovnako veľké úseky (1x1 cm). Kožné explantáty boli potom vložené na 10 cm Petriho misku a po niekoľkých minútach zaliate médiom pre kultiváciu kožných explantátov tak, aby povrch kože zostal v kontakte so vzduchom. Kultivácia prebiehala v inkubátore pri teplote 37 °C, v atmosfére obsahujúcej CO₂ (5% v/v). Médium bolo menené 2x týždenne.

Kultivácia fibroblastov

Ľudské dermálne fibroblasty (NHDF) boli získavané migráciou z kožných explantátov na Petriho miskách v médiu pre kultiváciu kožných explantátov. Po dosiahnutí konfluencie boli kožné štepy prenesené na novú miskú. Bunky, ktoré vyputovali z explantátu boli uvoľnené zo dna Petriho misky trypsinizáciou a premiestnené do 75 cm² kultivačnej fľaše. NHDF boli pestované v kultivačnom médiu pri teplote 37 °C v atmosfére CO₂ (5% v/v). Po dosiahnutí konfluencie boli bunky pasážované. Bunky boli opláchnuté PBS a uvoľnené pridaním 1 ml trypsínu, s ktorým boli 10 min. inkubované v inkubátore pri teplote 37 °C. Uvoľnenie buniek zo dna kultivačnej fľaše bolo kontrolované mikroskopicky. Pôsobenie trypsínu bolo zastavené prídavkom kultivačného média (10 ml). Suspenzia buniek bola následne centrifugovaná pri 946 rcf, 7 min., 20 °C. Po centrifugácii boli bunky resuspendované v kultivačnom médiu a buď boli nariadené a kultivované v nových kultivačných fľašiach, alebo spočítané a vysiate pre experimenty na Petriho misky (priemer 9 cm), 96-jamkové alebo 6-jamkové dosky. Pre experimenty boli bunky použité z 2. - 4. pasáže.

Kultivácia HaCaT

Línia keratinocytov HaCaT bola zamrazená v tekutom dusíku a po rozmrazení bola rýchlo prenesená do kultivačnej fľaše 25 cm² v kultivačnom médiu. Po dosiahnutí konfluencie boli bunky 10 min. inkubované v PBS s EDTA, roztok bol vyliaty a bolo aplikovaných 0,5 ml trypsínu. Po 10 min. inkubácii v termostate pri 37 °C bolo pôsobenie trypsínu kontrolované mikroskopicky a po uvoľnení všetkých buniek bolo pôsobenie trypsínu zastavené prídavkom kultivačného média. Obsah fľaše bol vyliaty a k zvyšným bunkám v kultivačnej fľaši bolo pridané kultivačné médium. To sa opakovalo minimálne 6krát, aby došlo k obnoveniu plnej funkcie buniek po zamrazení. Potom boli uvoľnené bunky prenesené do kultivačnej fľaše 75 cm² v kultivačnom médiu. Po dosiahnutí konfluencie boli bunky 10 min. inkubované v PBS s EDTA, roztok bol vyliaty a bol aplikovaný 1 ml trypsínu. Po 10 min. inkubácii v termostate pri 37°C bolo pôsobenie trypsínu kontrolované mikroskopicky, po uvoľnení všetkých buniek bolo pôsobenie trypsínu zastavené prídavkom kultivačného média. Bunky boli centrifugované pri 946 rcf 7 min., 20 °C. Následne boli resuspendované v 10 ml kultivačného média a spočítané k výsevu pre experimenty.

Príprava a počítanie buniek pre experimenty

Trypanová modrá je kyslé azofarbivo, ktoré sa využíva ako špecializované biologické farbivo na určenie počtu buniek a ich viability. Počítanie buniek sa vykonáva v Bürkerovej komôrke pod mikroskopom so zväčšením 1000x. Bürkerova komôrka obsahuje 9 veľkých štvorcov každý s obsahom 1 mm². Štvorce sú rozdelené dvojitémi čiarami do 16 skupinových štvorcov a dvojité čiary tvoria malé štvorce s obsahom 0,0025 mm². Hĺbka komôrky je 0,1 mm. Bunky sú počítané v každom zo 4 veľkých štvorcov v oboch častiach komôrky a na konci procedúry je spočítaný priemerný počet buniek vo štvorci a vypočítaná koncentrácia buniek nasledovným spôsobom:

$$b = \frac{n}{c * v * h} * z$$

b - počet buniek v 1 mm³

n - celkový počet napočítaných buniek

c - počet štvorcov v ktorých sa počítalo

v - plocha použitého štvorca

h - hĺbka komôrky

z - použité riedenie suspenzie (uvádza sa koľkokrát bola suspenzia riedená trypanovou modrou)

20 µl suspenzie buniek bolo zriedených s 80 µl trypanovej modrej (1:4). 20 µl tejto zmesi bolo nanosených pod krycie sklíčko v Bürkerovej komôrke a bol spočítaný počet buniek. NHDF boli vysiate s výsledným počtom 0,5 x 10⁵ buniek/cm²; v prípade HaCaT bol výsledný počet 1 x 10⁵ buniek/cm² v objemoch 0,2 ml na jamku 96-jamkovej dosky; 10 ml na Petriho misku (priemer 9 cm); 1,5 ml na 6-jamkové dosky (priemer 3,4 cm). Bunky boli po vysiatí inkubované pri 37 °C v inkubátore a nasledujúci deň využité k ďalším experimentom. K štúdiu fototoxických a fotoprotektívnych vlastností boli NHDF vysiate na kolagenované dosky.

3.1.2.2 Stanovenie cytotoxicity látok metódou neutrálnej červene

Bunky vystavené pôsobeniu cytotoxickej zlúčeniny môžu reagovať rôznymi spôsobmi. V prípade silného toxického účinku dochádza k nekróze, počas ktorej sa stráca integrita membrány alebo bunky nasledujú apoptózu, či autofágiu. Test je založený na schopnosti životaschopných buniek inkorporovať a viazať supravitálne farbivo neutrálnu červen. Toto slabo katiónové farbivo preniká cez bunkové membrány neiónovou pasívnou difúziou a koncentruje sa v lyzozómoch, kde sa viaže elektrostatickými hydrofóbnymi väzbami na aniónové alebo fosfátové skupiny lyzozomálneho matrix (Repetto *et al.*, 2008). Príjem neutrálnej červene závisí od bunkovej kapacity, ktorá sa udržiava na úrovni pH prostredníctvom produkcie ATP. Pri fyziologickom pH farbivo predstavuje celkový náboj blízky nule, čo mu umožňuje preniknúť membránami bunky. Vo vnútri lyzozómov je protónový gradient na udržanie hodnoty pH nižšej ako je hodnota cytoplazmy. Farbivo sa tak nabíja a udržiava sa vo vnútri lyzozómov. V prípade, že bunka umiera, dochádza k zníženiu pH gradientu a farbivo sa tak nemôže udržať. V dôsledku toho je množstvo zadržaného farbiva úmerné počtu životaschopných buniek (Filman *et al.*, 1975). Okrem toho môže byť príjem neutrálnej červene životaschopnými bunkami modifikovaný zmenami v bunkovom povrchu alebo lyzozomálnych membránach (Repetto *et al.*, 2008). Je teda možné rozlišovať medzi životaschopnými, poškodenými alebo odumretými bunkami podľa ich špecifickej kapacity na príjem farbiva (Borenfreund a Puerner, 1985). Integrita lyzozómov so súčasným viazaním neutrálnej červene je vysoko citlivým indikátorom životaschopných buniek.

Na NHDF a HaCaT pripravených na 96-jamkových doskách bola testovaná toxicita kanabinoidov CBC, CBD, CBG a CBN. Bunky boli preinkubované s látkami v koncentračnom rozsahu 0,78 – 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ s 0,5 % DMSO (rozpušťač, v ktorom boli pripravené zásobné roztoky testovaných látok) v bezsérovom médiu (200 μl /jamku). Súčasne boli bunky inkubované len v bezsérovom médiu s 0,5 % DMSO, tieto bunky slúžili ako kontrolné. Po 24 hod inkubácii buniek bola stanovená viabilita buniek metódou neutrálnej červene. 0,1 % roztok neutrálnej červene nanosený na bunky (50 μl /jamku) po 1 hod inkubácii v inkubátore pri 37 °C bol vyliaty a bunky boli premyté fixačným roztokom (100 μl /jamku). Následne bol roztok vyliaty, na bunky bol nanosený extrakčný roztok (100 μl /jamku), čím došlo k rozpusteniu farbiva. Intenzita sfarbenia bola stanovená spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 540 nm a bola vyhodnocovaná hodnota IC_{50} , tj. koncentrácia, kedy dochádza k poklesu životnosti buniek na 50 %. Táto hodnota

sa najčastejšie používa k porovnaniu účinku látok. Každá koncentrácia testovanej látky bola testovaná v 6-tich opakovaníach a každá látka bola testovaná najmenej 3krát, teda na 3 rôznych NHDF od 3 rôznych darcov a u HaCaT boli bunky použité v rôznych pasážach. Z každého experimentu bol spočítaný priemer a smerodajná odchýlka z minimálne 3 opakovaní a prevedený na % kontroly podľa vzorca:

$$\text{Cytotoxicita (\%)} = \frac{A_p}{A_c} \cdot 100$$

A_p - absorbanca vzoriek

A_c - absorbanca kontroly

3.1.2.3 Stanovenie fototoxicity látok metódou neutrálnej červene

Fototoxicita alebo tiež nazývaná fotoiritácia je chemicky vyvolané podráždenie kože, ktoré vyžaduje svetlo. Zahrnutá chemikália vstupuje do pokožky lokálne, perorálne alebo pomocou systémového obehu. Podmienkou chemikálie je, že musí byť fotoaktívna, čo znamená, že pri absorpcii svetla vytvára absorbovaná energia molekulárne zmeny, ktoré sú zodpovedné za toxicitu (Anderson *et al.*, 1994).

Na NHDF a HaCaT pripravených na 96-jamkových doskách boli testované potenciálne fototoxické účinky 4 kanabinoïdov – CBN, CBC, CBG a CBD. Bunky boli preinkubované s látkami v koncentračnom rozsahu 0,78 – 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ s 0,5 % DMSO (rozpúšťadlo, v ktorom boli pripravené zásobné roztoky testovaných látok) v bezsérovom médiu (200 $\mu\text{l/jamku}$). Súčasne boli bunky inkubované len v bezsérovom médiu s 0,5 % DMSO a tieto bunky slúžili ako kontrolné. Takýmto spôsobom boli pripravené dve dosky. Po 1 hod inkubácii s látkami bolo médium vyliate, bunky boli opláchnuté dvakrát PBS a následne inkubované v PBS s glukózou (200 $\mu\text{l/jamku}$). Jedna doska bola ožiarená netoxickou dávkou UV-A (NHDF boli ožiarené dávkou 5 J/cm^2 a HaCaT dávkou 7,5 J/cm^2) a druhá doska bola uložená v tme po dobu ožarovania. Doba ožarovania závisí na intenzite žiarenia (W/cm^2) a bola vypočítaná podľa vzorca:

$$\text{Doba ožiarenia (min.)} = \frac{\text{dávka} \left(\frac{J}{\text{cm}^2} \right) \cdot 1000}{\text{intenzita žiarenia} \left(\frac{W}{\text{cm}^2} \right) \cdot 60}$$

Po ožiarení bolo na bunky nanosené bezsérové médium (200 µl/jamku) a po 24 hod inkubácii buniek bol sledovaný vplyv na viabilitu, ktorá bola hodnotená akumuláciou NČ. Roztok neutrálnej červene (0,1 %) nanosený na bunky (50 µl/jamku) bol po 1 hod inkubácii v inkubátore pri 37 °C vyliaty a bunky boli premyté fixačným roztokom (100 µl/jamku). Následne bol roztok vyliaty a na bunky bol nanosený extrakčný roztok (100 µl/jamku), čím došlo k rozpusteniu farbiva. Intenzita sfarbenia bola stanovená spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 540 nm. Každá koncentrácia testovanej látky bola testovaná v 6-tich opakovaniach a každá látka bola testovaná najmenej 3krát, teda na 3 rôznych NHDF od 3 rôznych darcov. U HaCaT boli bunky použité v rôznych pasážach. Z každého experimentu bol spočítaný priemer a smerodajná odchýlka z 3 opakovaní a prevedený na % kontroly podľa vzorca:

$$\text{Fototoxicita (\%)} = \frac{A_p}{A_c} \cdot 100$$

A_p - absorbanca vzoriek

A_c - absorbanca kontroly

Životnosť buniek bola vyhodnocovaná hodnotou IC_{50} a následne bol z týchto hodnôt vypočítaný fotoiritačný faktor (PIF), ktorý je pomerom IC_{50} vzorky neožiarenej a vzorky ožiarenej dávkou UV-A žiarenia. Látka sa považuje sa fototoxickú v prípade, že jej hodnota $PIF \geq 5$. Hodnoty $PIF < 5$ nepredpovedajú fototoxický potenciál látky (OECD, 2004).

3.1.2.4 Stanovenie UV-A a UV-B fotoprotekcie látok metódou neutrálnej červene

Fotoprotekcia je biochemickým procesom, ktorý organizmom pomáha vyrovnať sa s molekulárnym poškodením spôsobeným slnečným žiarením s využitím prírodných či syntetických látok. Rastliny si vyvinuli celú radu fotoprotektívnych mechanizmov, ktoré slúžia k zabráneniu oxidačnému stresu. Ľudia, prípadne zvieratá si taktiež vyvinuli rôzne formy ochrany, ktoré tlmia negatívny dopad UV žiarenia na kožu, zabraňujú poškodeniu DNA a minimalizujú následky oxidačného stresu (Samorano a Reis, 2017).

Fotoprotektívne účinky CBN, CBC, CBG a CBD boli testované na NHDF a HaCaT. Bunky boli preinkubované 1 hod s netoxickými koncentráciami látok ($0,78 - 6,25 \mu\text{mol.l}^{-1}$) v 0,5 % DMSO (rozpušťač, v ktorom boli pripravené zásobné roztoky testovaných látok) v bezsérovom médiu (200 $\mu\text{l/jamku}$). Súčasne boli inkubované len v bezsérovom médiu s 0,5 % DMSO a tieto bunky slúžili ako kontrolné. Takto boli pripravené dve 96-jamkové dosky. Potom bolo médium vyliate, bunky boli opláchnuté dvakrát PBS a následne inkubované v PBS s glukózou (200 $\mu\text{l/jamku}$). Jedna doska bola ožiarená toxickou dávkou UV-A (NHDF boli ožiarené dávkou $7,5 \text{ J/cm}^2$ a HaCaT dávkou 10 J/cm^2) alebo dávkou UV-B žiarenia (150 mJ/cm^2 u oboch typov buniek). Druhá doska bola uložená v tme po dobu ožarovania. Doba ožarovania závisí na intenzite žiarenia (W/cm^2) a bola vypočítaná podľa vzorca:

$$\text{Doba ožarovania (min.)} = \frac{\text{dávk}a \left(\frac{\text{J}}{\text{cm}^2} \right) \cdot 1000}{\text{intenzita žiarenia} \left(\frac{\text{W}}{\text{cm}^2} \right) \cdot 60}$$

Po ožarení bolo z buniek odstránené PBS s glukózou, bolo aplikované bezsérové médium (200 $\mu\text{l/jamku}$) a dosky s bunkami boli umiestnené do inkubátora pri 37°C 24 hod. Následne bolo prevedené stanovenie viability buniek akumuláciou neutrálnej červene. 0,1 % roztok neutrálnej červene bol nanesený na bunky (50 $\mu\text{l/jamku}$) a po 1 hod inkubácii v inkubátore pri 37°C bol vyliaty a bunky boli premyté (100 $\mu\text{l/jamku}$) fixačným roztokom. Následne bol roztok vyliaty a na bunky bol naneseý (100 $\mu\text{l/jamku}$) extrakčný roztok, čím došlo k rozpusteniu farbiva. Intenzita sfarbenia bola stanovená spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 540 nm. Každá koncentrácia testovanej látky bola

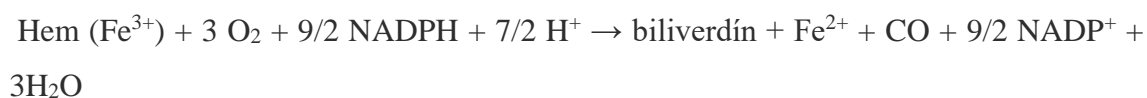
testovaná v 6-tich opakovaníach a každá látka bola testovaná najmenej 3krát, teda na 3 rôznych NHDF od 3 rôznych darcov a u HaCaT boli bunky použité v rôznych pasážach. Z každého experimentu bol spočítaný priemer a smerodajná odchýlka z 3 opakovaní a prevedený na % kontroly. % protekcie bolo vypočítané podľa vzorca:

$$\text{Protekcía (\%)} = \left(1 - \frac{A_S - A_C}{A_T - A_C}\right) \cdot 100$$

3.1.2.5 UV-A fotoprotektívne účinky kanabinoídiv na aktivitu vybraných enzýmov v NHDF

Laktátdehydrogenáza (LDH) je cytozolárny enzým, ktorého aktivita v médiu sa zvyšuje pri poškodení cytoplazmatickej membrány. Súčasne je zvýšenie LDH považované za marker nekrózy, kedy dochádza k uvoľneniu cytozolárnych enzýmov do média (Artiukhova *et al.*, 1996). Pokiaľ nie je pokles viability sprevádzaný uvoľnením LDH z bunky, môžeme hovoriť, že je aktivovaná apoptóza. Kaspázy sú rozhodujúcimi mediátormi v programovanej bunkovej smrti – apoptóze. Spomedzi nich je kaspáza-3 (casp-3) často aktivovanou proteázou, ktorá katalyzuje špecifické štiepenie mnohých kľúčových bunkových proteínov (Lakhani *et al.*, 2006).

Kataláza (Cat) a hemoxygenáza-1 (Ho-1) sú antioxidantné enzýmy, ktoré sú citlivé na oxidačný stres, napr. UV žiarenie (Dennery, 2001; Imlay, 2008). Ho-1 (34 kDa) je tzv. stresom indukovaný enzým, ktorý je známy svojimi antiapoptickými a antioxidantnými vlastnosťami (Choi *et al.*, 2004). Prvýkrát bol rozpoznávaný ako hlavný stresový proteín indukovateľný oxidantom v eukaryotických bunkách, keď sa zistilo, že UV-A silne aktivuje expresiu tohto génu v kultivovaných ľudských kožných fibroblastoch (Modak a Tyrrell, 2001). Ho-1 katalyzuje degradáciu hemu na biliverdín a CO, ktoré sú považované za molekuly s antioxidantnými vlastnosťami:



Cat (55 kDa) je tetramérnym antioxidantným enzýmom obsahujúcim hem (hemoproteín), ktorý sa v bunkách vyskytuje predovšetkým v peroxizómoch a mitochondriách (Bonekamp *et al.*, 2009). Cat katalyzuje rozklad peroxidu vodíka: $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + 1/2 \text{ O}_2$ (Kirkman a Gaetani, 2007).

Na bunky boli asepticky nanosené 4 kanabinoidy – CBC, CBD, CBG a CBN v dvoch koncentráciách 0,78 a 1,56 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ v bezsérovom médiu. Súčasne boli inkubované len v bezsérovom médiu s 0,5 % DMSO a tieto bunky slúžili ako kontrolné. Po 1 hod. pôsobenia látok bolo médium odstránené, vzorky boli 2x premyté PBS a následne bolo aplikovaných 10 ml PBS s glukózou (1 mg.ml⁻¹) na Petriho misky/ 1,5 ml v prípade 6-jamkových dosiek. Následne bola otestovaná toxická dávka UV-A žiarenia 7,5 J/cm², pričom paralelne boli spracovávané rovnakým spôsobom bunky kontrolné, ktoré neboli ožiarené. Po ožiarení bolo nanosených 10 ml bezsérového média na všetky Petriho misky alebo 1,5 ml bezsérového média v prípade 6-jamkových dosiek. Po 4 hod inkubácii boli do plastových Eppendorf skúmaviek odobraté alikvoty média s objemom 1 ml ako z ožiarených tak aj z kontrolných Petriho misiek/ 6-jamkových dosiek. Zvyšné médium bolo odsaté a vzorky boli 2x opláchnuté PBS. Pomocou plastovej škrabky určenej na bunkové kultúry boli bunky uvoľnené do PBS a bunková suspenzia bola prenesená do plastových Eppendorf skúmaviek, následne bol povrch opláchnutý PBS a zvyšné bunky boli prenesené do skúmavky. Všetko sa vykonávalo za chladenia. Bunky boli scentrifugované pri teplote 4 °C, 10 400 rcf, 5 min. Supernatant bol odstránený a k sedimentu bolo pridaných 40 μl lyzačného roztoku na bunky (vzorky pre western blot - Ho-1, Cat – P. misky 9 cm) alebo 50 μl lyzačného roztoku k stanoveniu aktivity kaspázy-3 (bunky z 6-jamkových dosiek). Vzorky boli uskladnené pri -80 °C k následnému spracovaniu.

3.1.2.6 Stanovenie aktivity laktátdehydrogenázy

Stanovenie aktivity LDH je spoľahlivým testom k stanoveniu poškodenia buniek či tkanív. Poskytuje reprodukovateľné informácie potencionalnej toxicite experimentálnych zlúčenín. Aktivita LDH sa stanovuje prostredníctvom enzymatickej reakcie, pri ktorej dochádza k redukcii pyruvátu na laktát v prítomnosti NADH. Reakcia je reverzibilná, takže je možné sledovať aj oxidáciu laktátu za tvorby NADH (Stoddart, 2011).

Aktivita LDH bola stanovovaná v médiu po experimente. K stanoveniu aktivity enzýmu bolo na 96 -jamkovú dosku nanosených 50 alebo 100 μl média v dublete. Reakcia bola odštartovaná roztokom k stanoveniu aktivity LDH (150 μl /jamku). Zmena absorbancie za minútu bola meraná pri 340 nm na spektrofotometri pre 96-jamkové dosky. Enzymatická aktivita LDH (α) [mol.s^{-1}] bola vypočítaná podľa vzorca:

$$a = \frac{(A \times \text{riedenie})}{(\varepsilon \times t \times l)}$$

A - absorbanca

ε - mólový absorpčný koeficient pri vlnovej dĺžke l [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

t - čas [s]

l - dĺžka dráhy lúča vo vzorke (hrúbka kvety) [cm]

3.1.2.7 Metódy stanovenia proteínu

3.1.2.7.1 Stanovenie proteínu bicinchoninovou kyselinou

Stanovenie bielkovín pomocou bicinchoninovej kyseliny (BCA) sa radí medzi najcitlivejšie metódy ku kvantifikácii celkového proteínu vo vzorke. Princíp spočíva v redukcii Cu^{2+} na Cu^+ v prítomnosti bielkovín v alkalickom roztoku (podobne ako u Biuretovej reakcie) a následnou chelataciou kyselinou bicinchoninovou vedie k vzniku fialového komplexu. Za redukcii medi sú zodpovedné najmä 4 aminokyselinové reziduá, a to cysteín, cystín, tyrozín a tryptofan prítomné v molekulách proteínov (Smith *et al.*, 1985). Farebný komplex je detekovaný pri 562 nm.

Bunkový lyzát bol nariadený PBS 40krát. Boli pripravené proteínové štandardy v koncentračnom rozmedzí od 0,0078 – 1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Na 96-jamkovú dosku bol nanesený nariadený lyzát alebo štandard (10 μl). Reagent B a reagent A boli zmiešané v pomere 1:50 a následne bolo napipetovaných 200 μl zmesi ku vzorkám (lyzát alebo štandard). Mikrotitračná doska bola umiestnená na termoblok na dobu 30 min. pri 37 °C. Následne bola zmeraná absorbanca pri 562 nm. Z hodnôt absorbancií štandardov bola pripravená kalibračná krivka, ktorá bola použitá k zisteniu koncentrácie proteínu v lyzátoch.

3.1.2.7.2 Stanovenie proteínu Bradfordovho metódou

Bradfordova metóda je rýchly a presný spektroskopický analytický postup, ktorý sa využíva na meranie koncentrácie proteínu v roztoku. Reakcia závisí od zloženia aminokyselín meraných proteínov. Jedná sa o kolorimetrický proteínový test využívajúci farbivo Coomassie Brilliant Blue G-250, ktoré existuje v 3 formách: aniónová (modrá),

neutrálna (zelená) a katiónová (červená). Za kyslých podmienok sa červená forma farbiva premieňa na modrú, ktorá sa viaže na testovaný proteín. V prípade, že sa na žiaden proteín neviaže zostáva roztok hnedý (Bradford, 1976).

Roztok obsahujúci proteín (bunkový lyzát) bol nariadený 10x a nanesený (10 μl /jamku) na 96-jamkovej dosky spolu s Bradfordovým činidlom (100 μl /jamku). Stanovenie prebehlo spektrofotometricky pri 595 nm. Kvantifikácia bola vykonaná pomocou kalibračnej krivky z BSA štandardu. Z kalibračnej krivky zostrojenej pre koncentrácie 0,0078 – 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bola vypočítaná koncentrácia proteínu.

3.1.2.8 Stanovenie aktivity kaspázy-3

Princíp stanovenia kaspázy-3 (casp-3) je založený na štiepení špecifického fluorogenného substrátu Ac-DEVD-AMC, ktorý je fluorescenčne aktívny a emituje modré svetlo ($\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$). Aktivita casp-3 bola stanovená v lyzátach NHDF. Lyzáty boli centrifugované (10 400 rcf, 10 min., 4 °C), supernatant bol prepipetovaný do nových plastových kepev a bol využitý k stanoveniu aktivity enzýmov a stanoveniu bielkovín Bradfordovým činidlom. Lyzát (4 μl /jamku) bol pipetovaný na 96-jamkovú dosku v dublete a následne bola pipetovaná reakčná zmes so substrátom (80 μl /jamku) alebo reakčná zmes so substrátom a inhibítorom (80 μl /jamku). Po 60 min. inkubácii pri 37 °C bola zmeraná fluorescencia pri excitácii 380 a emisii 450 nm. Pri vyhodnotení sa odčítala intenzita fluorescencie vzorky inkubovanej so substrátom a inhibítorom od vzorky inkubovanej so substrátom. Rozdiel fluorescencie bol vzťahnutý ku koncentrácii proteínu v lyzáte.

3.1.2.9 SDS-PAGE elektroforéza

Elektroforéza v polyakrylamidovom géli v prítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) je biochemickou metódou, ktorá sa využíva k separácii proteínov na základe elektroforetickej pohyblivosti. Závisí predovšetkým od molekulárnej hmotnosti a dĺžky polypeptidového reťazca, ale aj od denaturácie a posttranslačných modifikácií proteínu. Princíp spočíva v narušení sekundárnej a terciárnej štruktúry proteínu prostredníctvom SDS, ktorý sa viaže na jeho povrch a pokrýva ho negatívnym nábojom, v dôsledku čoho polypeptidové reťazce migrujú v polyakrylamidovom géli ku kladne nabitej anóde na základe rôznej veľkosti.

Príprava gélov

Čisté sklo bolo prekryté krycím sklom a upevnené do plastového držiaku. K príprave 12,5 % (v/v) separačného gélu bol do plastových skúmaviek napipetovaný akrylamid:bisakrylamid (29:1), separačný pufor, deionizovaná voda, 10% SDS (m/v), 10% APS (m/v) a TEMED (Tab. 1). Obsah skúmavky bol dôkladne premiešaný a nanesený medzi sklá. K zamedzeniu tvorby bubliniek bol separačný gél prevrstvený izopropanolom. Po stuhnutí separačného gélu bol izopropanol odstránený premytím deionizovanou vodou. Následne bol pripravený koncentračný gél napipetovaním akrylamidu:bisakrylamidu (29:1), deionizovanej vody, 10 % SDS, 10 % APS a TEMED (Tab. 1) do plastovej skúmavky. Po dôkladnom premiešaní na vortexe bol obsah nanesený medzi sklá s následným opatrným vložení plastového hrebienka s príslušným počtom jamiek.

Tab. 1 Príprava SDS polyakrylamidového gélu. Uvedenie presných objemov (μl) pre prípravu dvoch 12,5 % gélov s hrúbkou 1,5 mm.

12,5 % (v/v) separačný gél	V [μl]	12,5 % (v/v) koncentračný gél	V [μl]
akrylamid:bisakrylamid (29:1)	6250	akrylamid:bisakrylamid (29:1)	800
deionizovaná voda	8550	deionizovaná voda	5120
4 x separačný pufor	5000	4 x koncentračný pufor	2000
10 % SDS	200	10% SDS	80
10 % APS	200	10% APS	60
TEMED	20	TEMED	8

Separácia proteínov

Bunkový lyzát bol nariadený vzorkovým pufrom v pomere 4:1 (40 μ l vzorku a 10 μ l vzorkového pufru). Vzorky boli povarené v termobloku pri teplote 99 °C po dobu 5 min. a následne využité v SDS elektroforéze k stanoveniu jednotlivých proteínov.

Pripravené gély v plastovom držiaku boli umiestnené do elektroforetickej vane. Následne bola vaňa naplnená migračným pufrom, najskôr v priestore medzi géľmi v plastových držiakoch a potom vo vonkajšom priestore zhruba do polovice. Po odstránení plastového hrebienka boli do jednotlivých jamiek nanesené presné objemy vzorky tak, aby na jamku bolo nanesených 0,03 mg proteínu a súčasne bol do jednej jamky nanesený marker molekulovej hmotnosti. Po nanesení 10 vzoriek na gél bola vaňa uzavretá krycím vekom a zapojená k zdroju konštantného prúdu 0,03 A. Po migrácii vzoriek bol prúd zvýšený na 0,06 A. Po doputovaní bromfenolovej modrej k okraju gélu bola elektroforéza ukončená. Sklá s géľmi boli vytiahnuté, pomocou plastovej špachtle uvoľnené a gél bol premiestnený do 10x riedeného prenosového pufru. Blotovacia polyvinylidenfluoridová (PVDF) membrána (6,5 x 8,5), ktorá slúži ako pevná matrica k imobilizácii proteínových bandov bola aktivovaná ponorením na 1 minútu do metanolu, premytá v deionizovanej vode po dobu 3 minút a nakoniec ponechaná v prenosovom pufri po dobu 30 min.

3.1.2.9.1 Western blotting

Western blot je citlivá imunologická metóda, ktorá slúži k detekcii elektroforeticky separovaných proteínov. Princíp je založený na prenose komplexného proteínového vzoru, ktorý bol separovaný pomocou gélovej elektroforézy na základe molekulovej hmotnosti. Výsledok je potom prenesený na membránu produkujúcu pás pre každý proteín. Membrána je inkubovaná so značkovacími protilátkami, ktoré sú špecifické pre požadovaný proteín.

Western Blotting bol vykonaný s použitím Trans Blot Turbo zariadenia. Do blotovacej kazety boli sendvičovo umiestnené: blotovacia poduška, bavlnená buničina, PVDF membrána, gél, bavlnená buničina, blotovacia poduška a kazeta bola uzavretá. Po vložení do prístroja bolo napätie nastavené na 25 V s prúdom 1 A. Po skončení Western Blottingu (25 min.) bola membrána vytiahnutá z kazety, umiestnená do TBS/T a premývaná 2x po 5 min. s následným vložením do farbiaceho roztoku po dobu 2 min. Membrána bola potom nastrihaná podľa molekulových hmotností proteínov, ktoré boli

študované. Fragmenty membrány boli umiestnené do metanolu na odfarbenie a 3x po 10 min. boli premyté v TBS/T. Membrány boli následne blokované po dobu 2 hod. v roztoku TBS/T s odtučneným mliekom. Po blokovaní bola nanosená primárna polyklonálna králičia protilátka pripravená v TBS/T/BSA; v prípade detekcie hemoxygenázy-1 (Ho-1) bolo zvolené riedenie protilátky 1:400, u katalázy (Cat) 1:500 a u tubulínu 1:1000. Primárna protilátka sa nechala pôsobiť cez noc v chlade (4°C). Membrány boli opäť premyté 3x 10 min. v TBS/T s následným nanosením sekundárnej protilátky (1,5 hod) pripravenej v TBS/T/BSA s riedením 1:10 000. Pred detekciou proteínov boli membrány znovu premyté 3x po 10 min. v TBS/T.

Detekcia separovaných proteínov

Na jednotlivé membrány bolo nanosené detekčné činidlo (2 min.) pripravené riedením roztokov k detekcii proteínov - reagentu A a reagentu B v pomere (1:1) v objeme 1,5 ml na membránu. Po aplikácii sa jednotlivé membrány umiestnili do plastovej fólie, čím došlo k homogénnemu rozmiestneniu činidla po celom povrchu membrán a odstráneniu bubliniek. Fólie boli vložené do detekčnej kazety. Vo fotokomore bol na membrány vo fóliách priložený film, kazeta bola zatvorená. Po 10 s - 10 min. (podľa detekovaného proteínu) bol film pomocou pinzety opatrne prenesený do predom pripraveného roztoku s vývojkou, následne do nádoby s deionizovanou vodou, do roztoku ustálovača a nakoniec bol film premytý v deionizovanou vodou. Po vysušení boli filmy naskenované a vyhodnotené v programe ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). Jednotlivé proteínové bandy boli kvantifikované. Množstvo príslušného proteínu bolo vzťahnuté k množstvu β -tubulínu (55 kDa), proteínovému štandardu, ktorý je vhodnou kontrolou k normalizácii obsahu proteínov.

3.1.2.11 Testovanie fotostability látok

Stabilita látok môže byť negatívne ovplyvnená svetlom, ale aj prítomnosťou kyslíku. Preto je testovanie stability a fotostability látok a liečivých prípravkov nevyhnutné k zaisteniu bezpečného používania týchto látok v praxi.

Stabilita a fotostabilita bola študovaná u 4 kanabinoïdov – CBC, CBG, CBD a CBN v prítomnosti kyslíka a bez prítomnosti kyslíka v argónovej atmosfére. Zo zásobného 1 mmol.l⁻¹ roztoku kanabinoïdu v DMSO boli pripravené pracovné roztoky s koncentráciou 20 μ mol.l⁻¹ vo fosfátovom pufrí pH 7,4 s metanolom (2:1). Pracovný

roztok testovanej látky bol rozdelený na 2 časti. Jedna časť bola prebublaná argónom (30 ml po dobu 15 min.), následne bola rozdelená do dvoch fliaš po cca 11 ml, ktoré boli taktiež prebublané argónom (cca 2 min.) a nádoby boli uzavreté (bez kyslíka). Druhá časť roztoku bola rozdelená do dvoch plastových fliaš po cca 11 ml, ktoré boli uzavreté (v prítomnosti kyslíka). Jedna fľaša s roztokom prebublaným argónom a 1 fľaša s normálnou atmosférou boli ožiarené dávkou 20 J/cm² UV-A žiarenia, pričom zvyšné dve fľaše boli uložené v tme (neboli ožiarené). V momente po pripravení roztoku, potom hneď po ožiarení a v čase 2 hod, 4 hod, 6 hod a 24 hod po ožiarení bolo UV-VIS spektrometrickou analýzou merané spektrum v rozmedzí 220-400 nm. Meranie jednotlivých vzoriek prebiehalo v kremennej kyvete proti roztoku DMSO (1%) pripravenom vo fosfátovom pufri pH 7,4 s metanolom (2:1) (eliminácia vplyvu rozpúšťadla DMSO). Doba žiarenia zodpovedajúca 20 J/cm² bola vypočítaná nasledovne:

$$\text{Doba ožiarenia (min.)} = \frac{\text{dávka} \left(\frac{\text{J}}{\text{cm}^2} \right) \cdot 1000}{\text{intenzita žiarenia} \left(\frac{\text{W}}{\text{cm}^2} \right) \cdot 60}$$

3.1.2.12 Spektrofotometrické stanovenie faktoru ochrany pred slnečným žiarením

Stanovenie faktoru ochrany (SPF) je *in vitro* metódou k odhadu účinnosti opaľovacích prípravkov - sunscreenov pri pôsobení slnečného žiarenia na ľudskú kožu. SPF sa stanovuje spektrofotometricky, meraním spektier alebo ožarovaním ľudskej pokožky a meraním SPF *in vivo*. SPF je definovaný ako energia UV, ktorá je potrebná k tvorbe minimálnej erytémovej dávky (MED) na chránenej pokožke vydelená energiou UV potrebnej k tvorbe MED na nechránenej pokožke (Wood a Murphy, 2000).

$$\text{SPF} = \frac{\text{MED na pokožke chránenej sunscreenom}}{\text{MED na pokožke nechránenej sunscreenom}}$$

Pre výpočet SPF *in vitro* bolo merané spektrum v rozmedzí vlnových dĺžok 290-320 nm v roztokoch 2 kanabinoidov – CBC, CBN a štandardu kyseliny ferulovej

pripravených v etanole s výslednou koncentráciou 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. SPF bol vypočítaný z matematickej rovnice podľa Sayre *et al.* (1979):

$$SPF_{\text{spektrofotometricky}} = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times A(\lambda)$$

EE - spektrum erytémového efektu (konštanta)

I - spektrum slnečnej intenzity (konštanta)

A - absorbanca opaľovacieho prípravku

CF - korekčný faktor (=10)

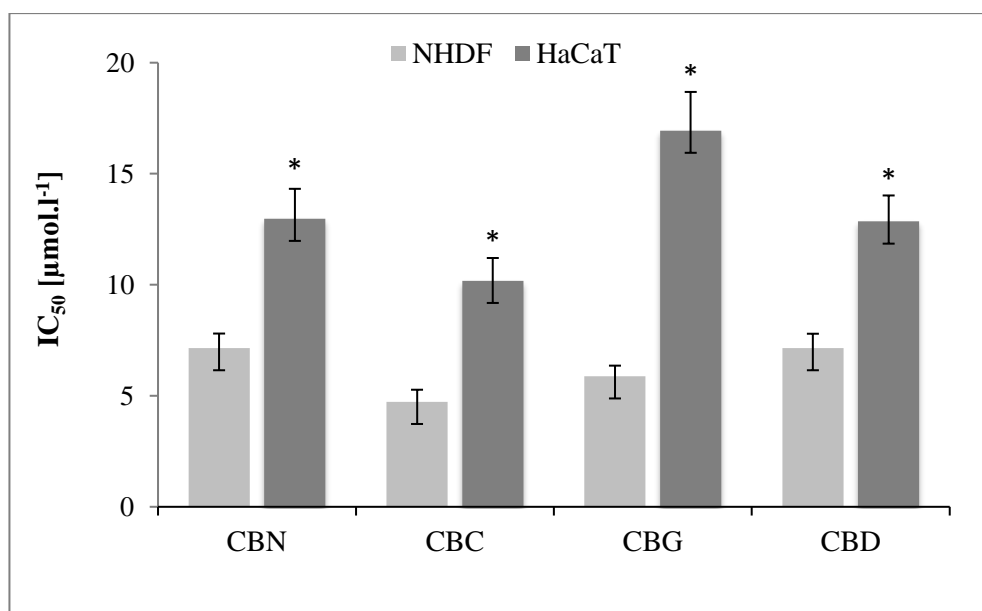
3.1.2.13 Štatistická analýza

Dáta sú vyjadrené ako priemer \pm S.D. Štatistická významnosť bola stanovená pomocou nepárového Studentovho t-testu. Rozdiely boli považované za štatisticky významné pri $p < 0,05$.

4. Výsledky

4.1 Testovanie cytotoxicity látok

Toxicita 4 vybraných kanabinoidov – CBN, CBC, CBG a CBD bola testovaná na NHDF a HaCaT. Kanabinoidy boli pripravené v koncentračnom rozmedzí od 0,78 do 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ v bezsérovom médiu s 0,5 % DMSO. Pre kontrolné bunky bolo použité rovnaké médium bez testovaných látok s 0,5 % DMSO. Viabilita buniek bola stanovená metódou neutrálnej červene po 24 hod. inkubácii. Hodnota IC_{50} bola vyhodnocovaná na základe spektrofotometrického stanovenia toxicity kanabinoidov, pričom jednotlivé hodnoty boli spočítané v programe MS Excel a spracované graficky (Obr. 11). Na NHDF vykazovala najvyššiu toxicitu látka CBC, ktorej IC_{50} bolo stanovené na $4,73 \pm 0,54 \mu\text{mol.l}^{-1}$. U látok CBD a CBN bola naopak zaznamenaná najnižšia toxicita ($7,15 \pm 0,65 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Pri testovaní toxicity na HaCaT bola najvyššia toxicita zistená taktiež u látky CBC s hodnotou $\text{IC}_{50} = 10,18 \pm 1,03 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Zatiaľ čo látka CBG vykazovala najnižšiu toxicitu, s hodnotou IC_{50} stanovenou na $16,94 \pm 1,74 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Na základe týchto údajov možno povedať, že kanabinoidy vykazovali signifikantne vyššiu toxicitu na NHDF v porovnaní s HaCaT, a teda NHDF sú viac citlivé k ich účinku než HaCaT.



Obr. 11 Toxicita kanabinoidov na NHDF a HaCaT vyjadrená ako IC_{50} . Dáta predstavujú priemer z troch nezávislých meraní. U NHDF boli použité bunky od 3 nezávislých darcov, u HaCaT boli použité bunky v rôznej pasáži. * = štatisticky signifikantne odlišné hodnoty IC_{50} u HaCaT od NHDF. Testované na hladine významnosti $\alpha \leq 0,05$.

4.2 Testovanie fototoxicity látok

Potenciálne fototoxické účinky boli testované u CBN, CBC, CBG a CBD na NHDF a HaCaT, v rovnakých koncentračných rozsahoch ako pri testovaní cytotoxicity (kapitola 4.1). Bunky boli inkubované s testovanými látkami 1 hod a potom boli vystavené pôsobeniu netoxickej dávky UV-A žiarenia (NHDF = 5 J/cm², HaCaT = 7,5 J/cm²) a viabilita bola stanovená 24 hod po ožiarení. Jednotlivé hodnoty IC₅₀ boli spočítané v programe MS Excel a získané hodnoty boli následne použité na výpočet fotoiritačného faktoru (PIF) (Tab. 2 a 3). Ožiarenie buniek netoxickou dávkou UV-A neznížilo životnosť či hodnotu IC₅₀, čo taktiež korešponduje s hodnotou PIF, ktorá je nižšia alebo rovná 1. U žiadnej z testovaných látok nebola preukázaná fototoxicita.

Tab. 2 Fototoxicita kanabinoidov na NHDF vyjadrená ako IC₅₀ ± smerodajná odchýlka (SD) bez a s aplikáciou netoxickej dávky UV-A (5 J/cm²) a hodnotou fotoiritačného faktoru (PIF). Dáta predstavujú priemer z troch experimentov na bunkách od 3 rôznych darcov.

	- UV-A IC ₅₀	+ UV-A IC ₅₀	PIF
CBN	14,64 ± 1,24	18,74 ± 1,24	0,78
CBC	20,75 ± 1,98	20,61 ± 1,55	1,01
CBG	21,23 ± 2,05	24,10 ± 2,25	0,88
CBD	12,97 ± 1,01	19,18 ± 1,47	0,68

Tab. 3 Fototoxicita kanabinoidov na HaCaT vyjadrená ako IC₅₀ ± smerodajná odchýlka (SD) bez a s aplikáciou netoxickej dávky UV-A (7,5 J/cm²) a hodnotou fotoiritačného faktoru (PIF). Dáta predstavujú priemer z troch nezávislých experimentov na bunkách z 3 rôznych pasáží.

	- UV-A IC ₅₀	+ UV-A IC ₅₀	PIF
CBN	12,07 ± 1,10	16,32 ± 1,23	0,74
CBC	20,74 ± 1,65	20,61 ± 1,45	1,01
CBG	16,21 ± 1,37	20,14 ± 1,99	0,80
CBD	10,74 ± 1,00	16,93 ± 1,36	0,63

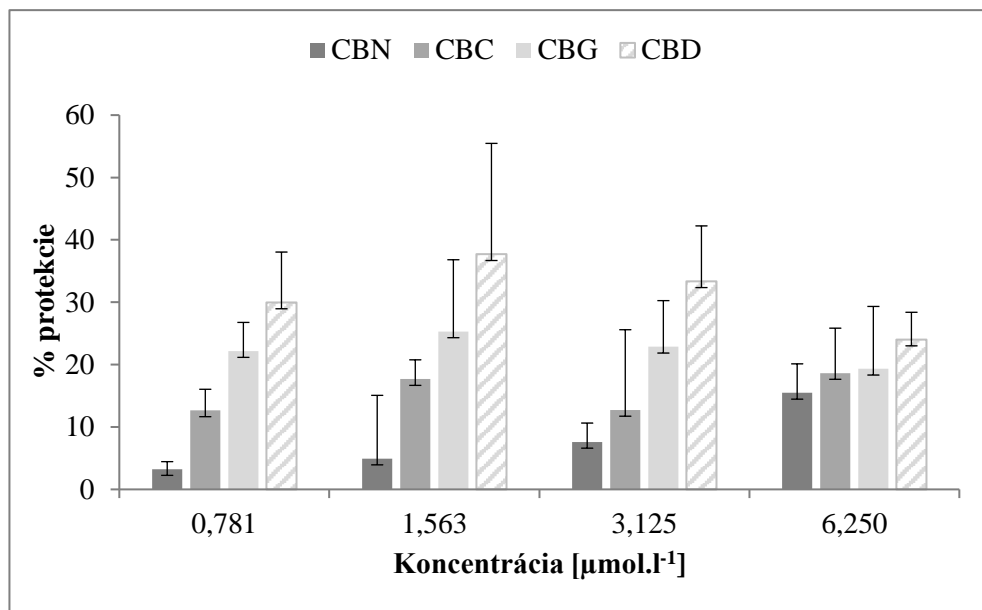
4.3 Testovanie fotoprotektívnych účinkov

Fotoprotektívne účinky boli testované u CBN, CBC, CBG a CBD na NHDF a HaCaT. K testovaniu boli zvolené netoxické koncentrácie kanabinoidov 0,78 – 6,25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ v bezsérovom médiu s 0,5 % DMSO. Pre kontrolné bunky bolo použité rovnaké médium bez testovaných látok s 0,5 % DMSO. Po 1 hod preinkubácii s látkami boli bunky ožiarené toxickou dávkou UV-A či UV-B žiarenia. Po 24 hod bolo prevedené stanovenie viability buniek metódou neutrálnej červene. Fotoprotektívny účinok bol vyjadrený ako % protekcie. Z výsledkov testovania fotoprotektívnych účinkov vyššie zmienených látok na NHDF a HaCaT bol zostrojený graf % protekcie v závislosti na koncentrácii látky ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) (Obr. 12 a 13).

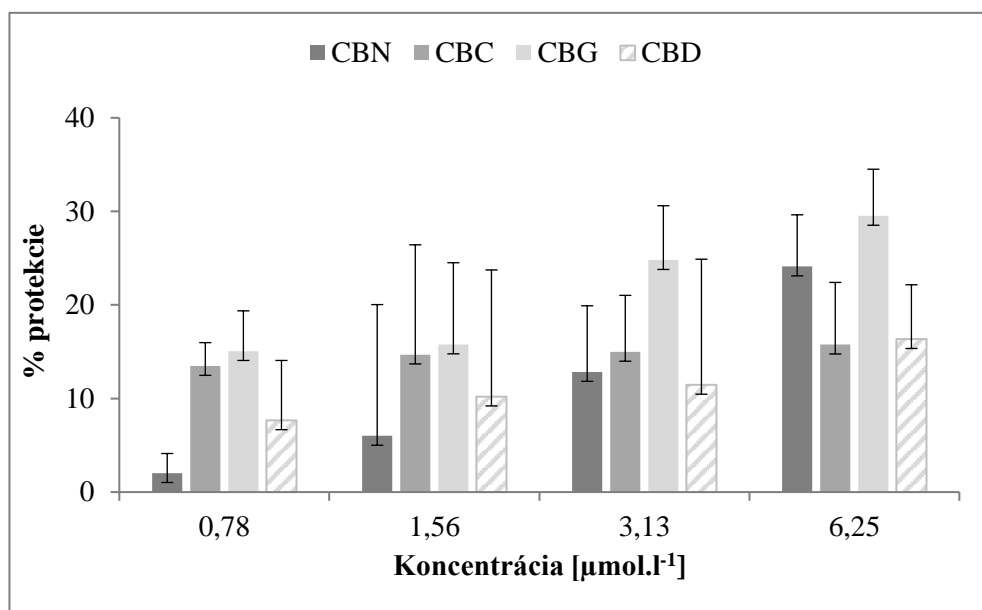
4.3.1 UV-A fotoprotektívne účinky

UV-A fotoprotektívny potenciál látok bol hodnotený u buniek ožiarených toxickou dávkou UV-A žiarenia (NHDF boli ožiarené dávkou 7,5 J/cm² a HaCaT dávkou 10 J/cm²) a následne porovnávané s kontrolnými neožiarenými bunkami.

Najvyšší protektívny účinok na NHDF mal z testovaných kanabinoidov CBD. Maximálny účinok CBD ($37,69 \pm 7,2$ %) bol pozorovaný pri koncentrácii 1,563 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ s následným miernym poklesom pri vyšších koncentráciách. Pokles protektívneho účinku pri vyšších koncentráciách je možné sledovať aj u ostatných kanabinoidov okrem CBN, kde možno pozorovať koncentračne závislý nárast protekcie. Najnižší fotoprotektívny charakter vykazoval CBN, pri koncentrácii 0,781 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ bola protekcia až 9x nižšia ($3,25 \pm 1,20$ %) než u látky CBD ($29,95 \pm 8,10$ %). Podľa protektívneho účinku možno látky zoradiť zostupne v poradí CBD > CBG > CBC > CBN (Obr. 12). UV-A fotoprotektívne účinky kanabinoidov na HaCaT sú zhrnuté na Obr. 13. Najvyššia UV-A protekcia bola zaznamenaná u látky CBG pri všetkých testovaných koncentráciách. Najvyššie % protekcie ($29,52 \pm 4,99$ %) bolo zaznamenané pri koncentrácii 6,25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Najnižšie % protekcie bolo preukázané u látky CBN podobne ako na NHDF a to pri koncentrácii 0,781 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, ktorej hodnota bola stanovená na $2,02 \pm 2,10$ %. U všetkých kanabinoidov je možné sledovať koncentračne závislú protekciu, okrem CBC, kde sa protekcia u všetkých testovaných koncentrácií pohybuje okolo 15 %.



Obr. 12 UV-A protektívne účinky kanabinoidov na NHDF. Hodnoty sú vyjadrené ako % protekcie \pm smerodajná odchýlka (SD). Dáta predstavujú priemer z troch nezávislých meraní na bunkách od troch rôznych darcov.

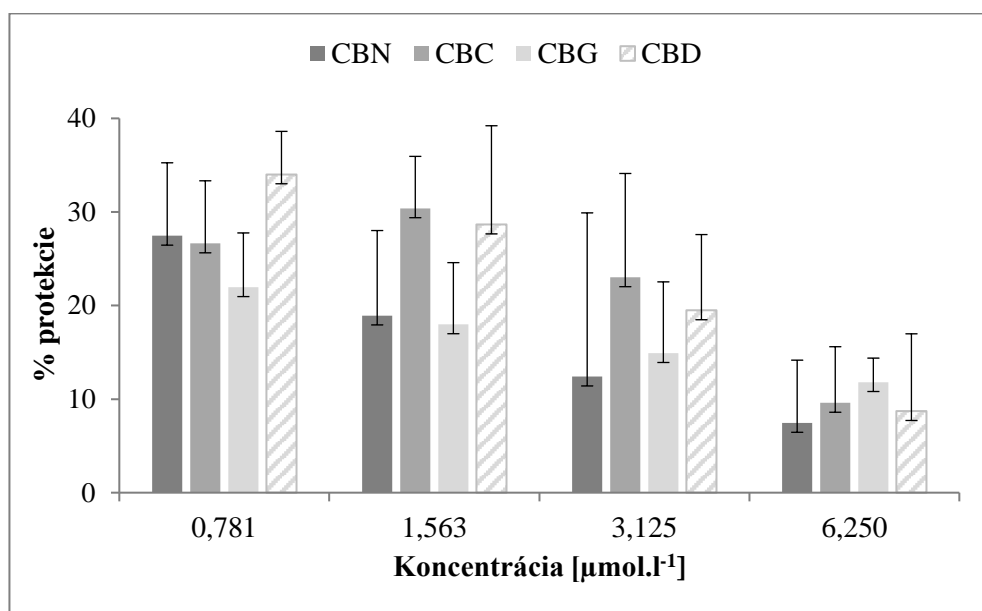


Obr. 13 UV-A protektívne účinky kanabinoidov na HaCaT. Hodnoty sú vyjadrené ako % protekcie \pm smerodajná odchýlka (SD). Dáta predstavujú priemer z troch nezávislých meraní na bunkách v troch rôznych pasážach.

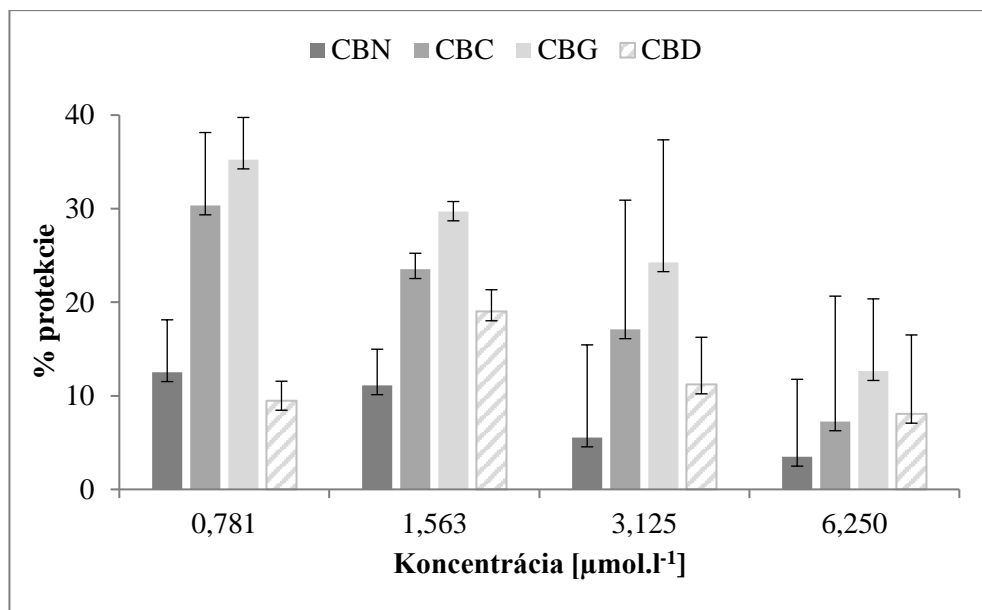
4.3.2 UV-B fotoprotektívne účinky

UV-B fotoprotektívny potenciál látok bol hodnotený na NHDF a HaCaT ožiarených toxickou dávkou UV-B žiarenia 150 mJ/cm^2 . Pri testovaní UV-B fotoprotektívnych účinkov látok na NHDF vykazovali všetky testované kanabinoidy protektívny účinok (Obr. 14). Úroveň ochrany klesala s koncentráciou, okrem CBD, kde bola maximálna protekcia pri koncentrácii $1,563 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ($30,38 \pm 11,10 \%$). Pri najnižšej koncentrácii látok $0,781 \mu\text{mol.l}^{-1}$ je poradie ochranného účinku látok zostupne $\text{CBD} > \text{CBN} > \text{CBC} > \text{CBG}$ ($34,01 \pm 4,60 \%$ $>$ $27,45 \pm 7,80 \%$ $>$ $26,63 \pm 6,70 \%$ $>$ $21,95 \pm 5,80 \%$). U látky CBD pri koncentráciách $0,781$ a $1,563 \mu\text{mol.l}^{-1}$ bola zaznamenaná najvyššia ochrana voči UV-B žiareniu.

UV-B fotoprotektívne účinky kanabinoidov na HaCaT (Obr. 15) klesali spolu so vzrastajúcou koncentráciou okrem CBD, kde bol najvyšší protektívny efekt zaznamenaný u druhej testovanej koncentrácie $1,56 \mu\text{mol.l}^{-1}$. U všetkých testovaných koncentrácií bolo najvyššie % UV-B protekcie zaznamenané u látky CBG. Najvyššia hodnota protekcie tejto látky bola stanovená na $35,25 \pm 4,50 \%$ pri najnižšej použitej koncentrácii $0,781 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Najnižší fotoprotektívny účinok mala látka CBN pri koncentráciách $1,563 - 6,25 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Pri najnižšej koncentrácii látok $0,781 \mu\text{mol.l}^{-1}$ je poradie ochranného účinku látok $\text{CBG} > \text{CBC} > \text{CBN} > \text{CBD}$ ($35,25 \pm 4,50 \%$ $>$ $30,34 \pm 7,80 \%$ $>$ $12,52 \pm 5,60 \%$ $>$ $9,46 \pm 2,10 \%$).



Obr. 14 UV-B protektívne účinky kanabinoidov na NHDF. Hodnoty sú vyjadrené ako % protekcie \pm smerodajná odchýlka (SD). Dáta predstavujú priemer z troch nezávislých meraní na bunkách od troch rôznych darcov.



Obr. 15 UV-B protektívne účinky kanabinoidov na HaCaT. Hodnoty sú vyjadrené ako % protekcie \pm smerodajná odchýlka (SD). Dáta predstavujú priemer z troch nezávislých meraní na bunkách v troch rôznych pasážach.

4.4 Vplyv kanabinoidov a UV-A žiarenia na vybrané parametre

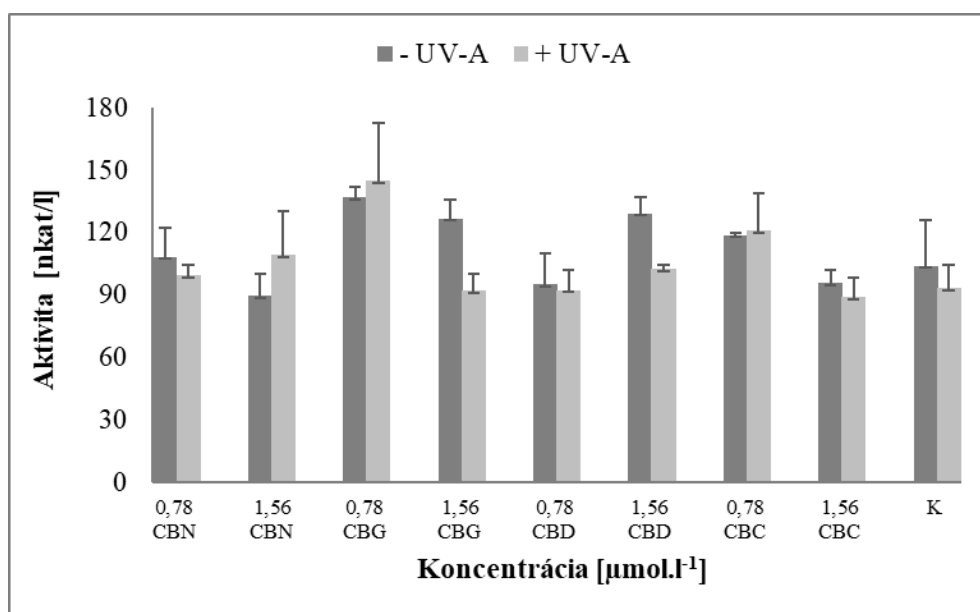
K zisteniu vplyvu kanabinoidov na vybrané parametre (laktátdehydrogenáza, kataláza, hem-oxygenáza-1, kaspáza-3) na NHDF boli použité len dve najnižšie testované koncentrácie, ktoré u všetkých 4 kanabinoidov vykazovali najvyššie protektívne vlastnosti voči UV-A. Pri vyšších koncentráciách bol pozorovaný pokles protekcie.

4.4.1 Toxicita kanabinoidov a UV-A

Laktátdehydrogenáza (LDH) je cytozolárny enzým. Považuje sa za marker nekrózy, ku ktorej dochádza pri poškodení cytoplazmatickej membrány a zvýšení aktivity LDH v médiu (Artiukhova *et al.*, 1996). V prípade, že nedochádza k uvoľneniu LDH z bunky môžeme hovoriť, že je aktivovaná apoptóza. Kaspáza-3 (casp-3) sa považuje za hlavný marker programovanej bunkovej smrti – apoptózy (Lakhani *et al.*, 2006). Pre aplikáciu na bunky boli kanabinoidy pripravené v netoxických koncentráciách od 0,78 – 1,56 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ v bezsérovom médiu s 0,5 % rozpúšťadlom DMSO. Súčasne boli bunky inkubované len v bezsérovom médiu s 0,5 % DMSO, ktoré slúžili ako kontrolné. Po 1 hod preinkubácii boli bunky ožarované UV-A o dávke 7,5 J/cm². Po 4 hodinovej inkubácii bola stanovená aktivita LDH v médiu.

Zo získaných výsledkov je zrejmé, že zvolená dávka UV-A žiarenia nespôsobila

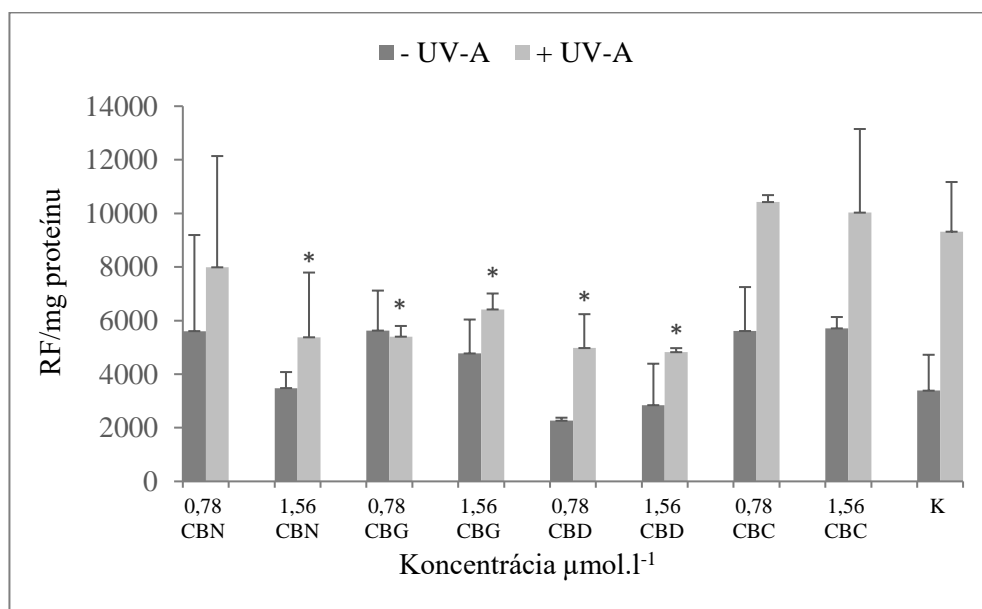
v porovnaní s kontrolnými neožiarenými bunkami výraznejšie poškodenie buniek (vyplavením LDH do média) (Obr. 16). Látka CBN nevykazovala toxický efekt pri žiadnej testovanej koncentrácii, u látky CBC bol zaznamenaný mierny nárast aktivity LDH v médiu pri nižšej testovanej koncentrácii. U CBD bol spozorovaný nárast aktivity u vyššej testovanej koncentracie a pri CBG nastal nárast u oboch testovaných koncentrácií, avšak zvýšenie aktivity LDH bolo veľmi nízke, menej než 30 % kontroly. U niektorých kanabinoidov bola naopak hladina LDH v médiu nižšia než u kontrolných buniek, čo svedčí o ochrannom účinku. Pôsobenie UV-A neovplyvnilo množstvo LDH v médiu u buniek, ktoré boli preinkubované s testovanými kanabinoidmi, okrem CBG (0,78 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) a CBN (1,56 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), kde bol zaznamenaný nesignifikantný nárast aktivity LDH v médiu. Výsledky naznačujú, že poškodenie buniek je minimálne a nie je sprevádzané nekrotickými zmenami.



Obr. 16 Vplyv kanabinoidov v koncentrácii 0,78 a 1,56 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ na extracelulárnu hladinu LDH v neožiarených a UV-A ožiarených NHDF. Bunky inkubované len v bezsérovom médiu s 0,5 % DMSO slúžili ako kontrolné (K). Poškodenie membrány bolo sledované ako aktivita LDH v médiu. Bunky boli ožiarené UV-A žiarením o dávke 7,5 J/cm². Dáta \pm smerodajná odchýlka (SD) predstavujú priemer zo štyroch nezávislých experimentov na 4 NHDF od odlišných darcov.

Bunkové lyzáty NHDF pre stanovenie casp-3 boli pripravené v rovnakých experimentoch ako médium k stanoveniu hladiny LDH.

Zo získaných výsledkov je zrejmé, že všetky testované kanabinoidy okrem CBD zvyšovali bazálnu hladinu casp-3. Toto zvýšenie sa pohybovalo do 100 % kontroly, teda dvojnásobná hodnota bazálnej hladiny (Obr. 17). UV-A žiarenie zvyšovalo hladinu casp-3. CBD, ktorý neovplyvnil bazálnu hladinu casp-3 bol schopný v oboch koncentráciách signifikantne znížiť účinok UV-A žiarenia a mal teda antiapoptický efekt. Signifikantné zníženie aktivácie casp-3 stimulovanej UV-A zaznamenali aj látky CBG (0,78 a 1,56 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) a CBN (1,56 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). U látky CBC v oboch testovaných koncentráciách nebol pozorovaný antiapoptický efekt, nedošlo teda k zníženiu aktivity casp-3 po pôsobení UV-A.



Obr. 17 Vplyv kanabinooidov v koncentrácii 0,78 a 1,56 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ na bazálnu a UV-A stimulovanú hladinu kaspázy-3 v NHDF. Bunky inkubované v bezsérovom médiu s 0,5 % DMSO slúžili ako kontrolné (K). Hladina enzýmu je vyjadrená ako relatívna fluorescencia (RF) na mg proteínu. Bunky boli ožiarené UV-A žiarením o dávke 7,5 J/cm^2 . Dáta \pm smerodajná odchýlka (SD) predstavujú priemer z dvoch nezávislých experimentov na NHDF od dvoch odlišných darcov. * = hodnoty, ktoré sú štatisticky signifikantne odlišné od kontrolných NHDF ožiarených UV-A. Testované na hladine významnosti $\alpha \leq 0,05$.

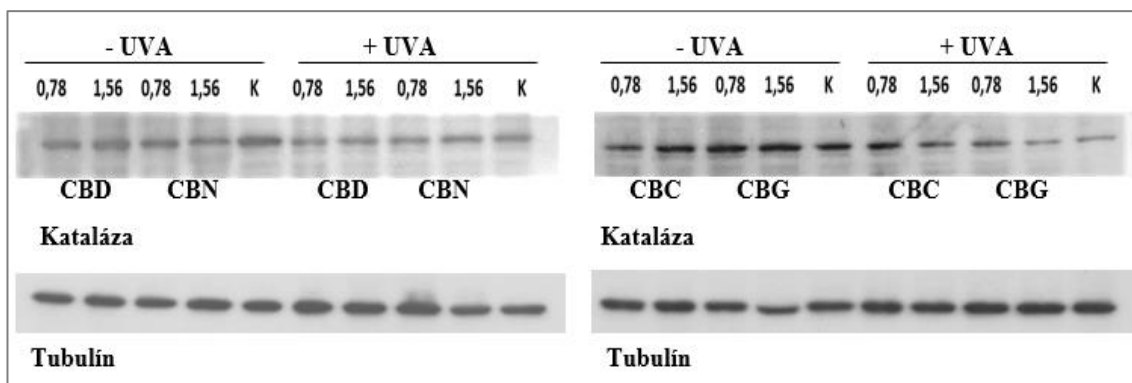
4.4.2 Vplyv kanabinoidov a UV-A žiarenia na hladinu katalázy a hemoxygenázy-1

V rámci experimentu bol stanovený vplyv kanabinoidov a UV-A žiarenia na hladinu enzýmu katalázy (Cat) a hemoxygenázy-1 (Ho-1). Oxidačný stres napr. UV žiarenie ovplyvňuje hladiny týchto enzýmov (Dennerly, 2001; Imlay, 2008).

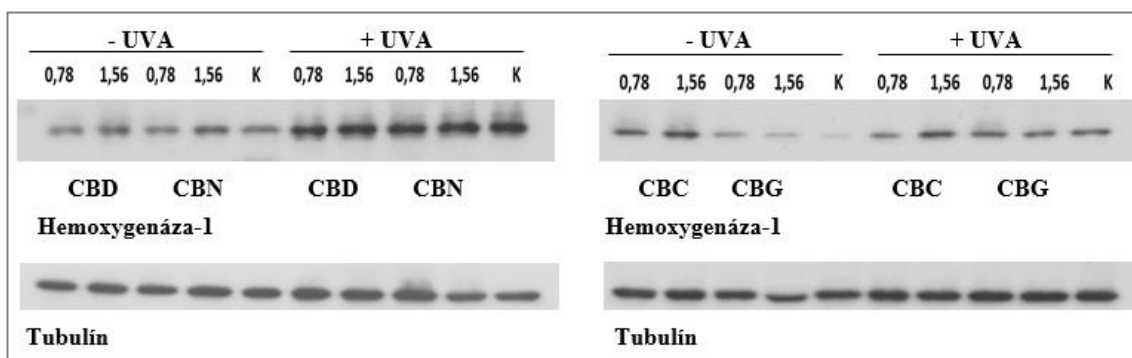
NHDF fibroblasty boli inkubované 1 hod s testovanými kanabinoidmi CBN, CBC, CBG a CBD v koncentráciách 0,78 a 1,56 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a potom ožarované UV-A žiarením dávkou 7,5 J/cm^2 . Súčasne boli NHDF inkubované s testovanými látkami a neožiarené, taktiež boli pripravené kontroly – neožiarené a UV-A ožiarené NHDF inkubované len v bezsérovom médiu s 0,5 % DMSO. Po 4 hod. inkubácii v bezsérovom médiu boli bunky zlyzované, zmerané množstvo proteínu metódou s bicinchoninovou kyselinou a prevedená elektroforéza s následným blotom a imunodetekciou. Z piatich experimentov bola zvolená 1 reprezentatívna ukážka z detekcie proteínov Cat, Ho-1 a β -tubulínu (Obr. 18 a 19) a v Tab. 4 sú uvedené hodnoty z kvantifikácie ako priemer \pm S.D. (z 5 experimentov), ktoré boli získané z programu ImageJ.

V NHDF, ktoré boli ošetrené kanabinoidmi bez UV-A bol v obsahu Cat vidieť len mierny pokles v porovnaní s kontrolou (Tab. 4). Samotné kanabinoidy mali teda minimálny vplyv na hladinu Cat. UV-A žiarenie znižovalo množstvo Cat v NHDF. Všetky kanabinoidy mierne znižovali zníženie hladiny Cat spôsobené UV-A žiarením, a teda nebránili toxickému účinku UV-A žiarenia. Okrem látky CBG (0,78 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), kde možno vidieť zníženie toxického účinku UV-A žiarenia a to miernym zvýšením obsahu Cat (tab. 4). CBG teda mierne chránilo NHDF po pôsobení UV-A žiarenia.

Dvojica samotných kanabinoidov CBN a CBD mierne zvyšovala bazálny obsah Ho-1. Pokiaľ bol porovnávaný ich efekt s príslušnou kontrolou (bez UV-A), najmä vyššia koncentrácia látok 1,56 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ zvyšovala hladinu Ho-1. Naopak kanabinoidy CBC a CBG znižovali bazálnu hladinu Ho-1 oproti príslušnej kontrole, okrem vyššej koncentrácie látky CBC, kde dochádzalo k miernemu zvýšeniu obsahu enzýmu. Žiadna z testovaných látok ale nezvýšila hladinu Ho-1 ako samotné UV-A. UV-A žiarenie zvyšovalo hladinu Ho-1 v NHDF. Všetky kanabinoidy znižovali UV-A stimulovanú hladinu Ho-1 v NHDF, čo svedčí o ich ochrannom účinku pri vplyvoch oxidačného stresu. U niektorých z nich bol pozorovaný signifikantný účinok (Tab. 4).



Obr. 18 Vplyv kanabinoidov na bazálnu a UV-A stimulovanú hladinu Cat v NHDF. Obsah proteínu bol vzťahnutý k β -tubulínu. Prezentovaný je vybraný blot.



Obr. 19 Vplyv kanabinoidov na bazálnu a UV-A stimulovanú hladinu Ho-1 v NHDF. Obsah proteínu bol vzťahnutý k β -tubulínu. Prezentovaný je vybraný blot.

Tab. 4 Vplyv kanabinoidov na bazálnu a UV-A stimulovanú hladinu katalázy a hemoxygenázy-1 v NHDF. Dáta predstavujú hodnoty spriemerované z piatich nezávislých experimentov vykonaných na NHDF od 5 rôznych darcov. Hodnoty boli kvantifikované využitím programu Image J. * = relatívne hodnoty, ktoré sú štatisticky signifikantne odlišné od kontrolných NHDF ožiarených UV-A. Testované na hladine významnosti $\alpha \leq 0,05$.

látka ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	kataláza/ tubulín	hemoxygenáza-1/ tubulín
- UV-A		
CBD (0,78)	0,6991 \pm 0,3080	1,0315 \pm 0,7866
CBD (1,56)	0,7568 \pm 0,2750	1,2318 \pm 0,5659
CBN (0,78)	0,8006 \pm 0,3256	0,9753 \pm 0,7324
CBN (1,56)	0,7971 \pm 0,3503	1,0559 \pm 0,5365
kontrola	0,8488 \pm 0,3748	0,7923 \pm 0,3498
+ UV-A		
CBD (0,78)	0,6034 \pm 0,2473	1,1002 \pm 0,5859
CBD (1,56)	0,6280 \pm 0,2579	1,0111 \pm 0,5855 *
CBN (0,78)	0,5532 \pm 0,2134	1,1856 \pm 0,5451
CBN (1,56)	0,4561 \pm 0,1330	1,1762 \pm 0,4699
kontrola	0,6974 \pm 0,2986	1,4140 \pm 1,3581
- UV-A		
CBC (0,78)	0,7261 \pm 0,5099	0,9169 \pm 0,6281
CBC (1,56)	0,9504 \pm 0,5249	1,2229 \pm 0,7228
CBG (1,56)	1,0127 \pm 0,4446	0,6899 \pm 0,3001
CBG (1,56)	0,8871 \pm 0,3350	0,7853 \pm 0,5767
kontrola	1,0813 \pm 0,4153	1,0549 \pm 1,3875
+ UV-A		
CBC (0,78)	0,5437 \pm 0,2598	1,1800 \pm 0,6753 *
CBC (1,56)	0,5627 \pm 0,2429	1,3511 \pm 0,7892 *
CBG (0,78)	0,7691 \pm 0,4210	1,3175 \pm 0,4475 *
CBG (1,56)	0,5402 \pm 0,1963	1,2118 \pm 0,3343 *
kontrola	0,6077 \pm 0,5731	1,6250 \pm 1,2694

4.5 Testovanie fotostability kanabinoidov

Pokiaľ sú látky používané v kozmetických, dermatologických či liečivých prostriedkoch, je veľmi dôležité zistiť ich stabilitu a fotostabilitu. Stabilita a fotostabilita kanabinoidov – CBG, CBN, CBC a CBD bola testovaná vo fosfátovom pufrí pri pH 7,4 s metanolom (2:1) po pôsobení UV-A žiarenia (dávka 20 J/cm²) v prostredí s a bez kyslíku. UV spektrum bolo merané v rozmedzí 220-400 nm v rôznych časových intervaloch (0, 2, 4, 6 a 24 hod).

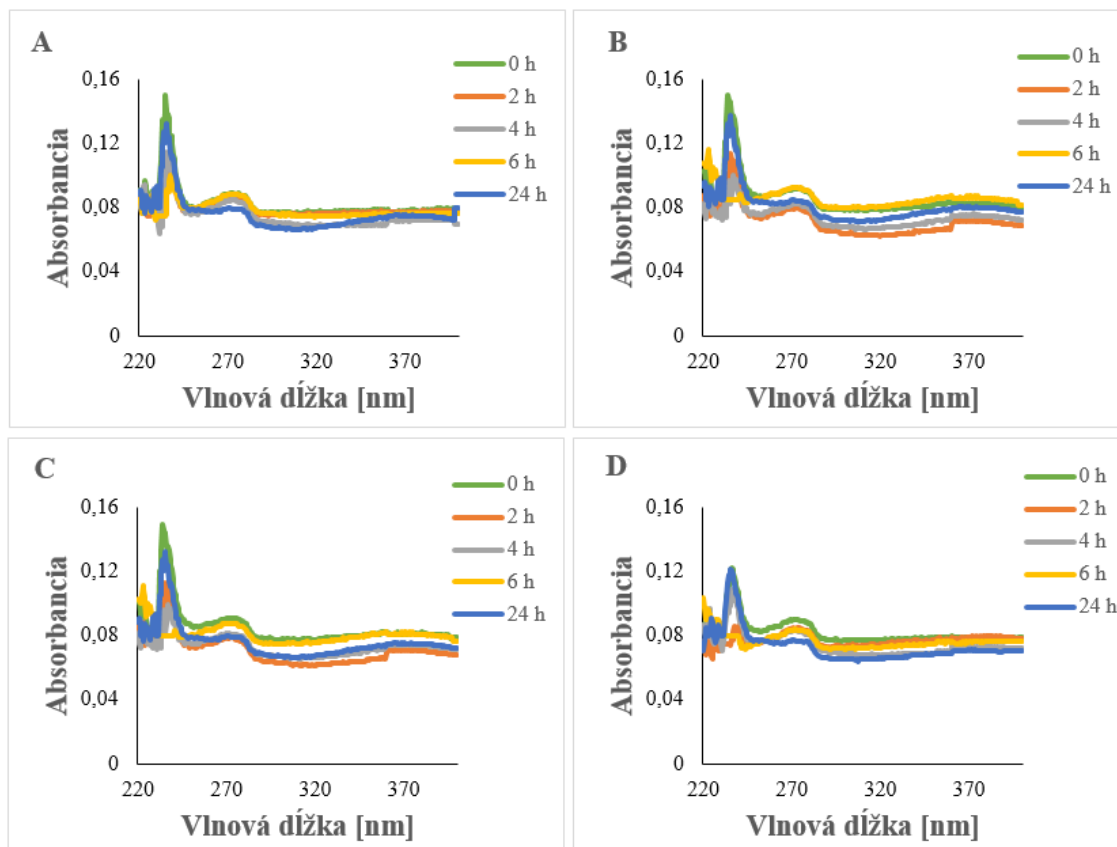
Látka CBG má výrazné spektrálne maximum, ktoré bolo namerané pri vlnovej dĺžke 235 nm a pri 273 nm sa nachádzalo menej intenzívne maximum. Vo všetkých prípadoch bol zaznamenaný pokles absorbancie pri 235 nm po 2 a 6 hod inkubácii, ale po 24 hod inkubácii bola nameraná hodnota absorbancie blízka hodnote v čase 0. Pokiaľ bol CBG ožarovaný UV-A v bezkyslíkovej atmosfére nebol pozorovaný vplyv žiarenia na CBG (Obr. 20 A,C). Pokiaľ bol ožarovaný v prítomnosti kyslíku došlo k poklesu absorbancie pri 235 nm okamžite po ožiarení a táto hodnota bola zistená aj po 24 hod (Obr. 20 B,D). CBG je v prítomnosti kyslíku fotolabilný.

CBN má výrazné spektrálne maximum pri 284 nm a 232 nm. Vo všetkých prípadoch bol zaznamenaný výraznejší pokles absorbancie po 2, 4 a 6 hod pri vlnovej dĺžke 232 nm (Obr. 21). Hodnota absorbancie sa však nemenila pri maxime 284 nm. V čase 0 a 24 hod v atmosfére s kyslíkom a bez kyslíka bez UV-A bola nameraná takmer identická hodnota absorbancie (Obr. 21 A,B). Vplyvom UV-A žiarenia dochádzalo v kyslíkovej atmosfére pri 232 nm k miernemu poklesu absorbancie hneď po ožiarení (0 hod), to však nebolo pozorované pri 284 nm (Obr. 21 C,D). V prítomnosti kyslíku došlo po ožiarení k miernemu poklesu v oboch maximách (Obr. 21 B, D).

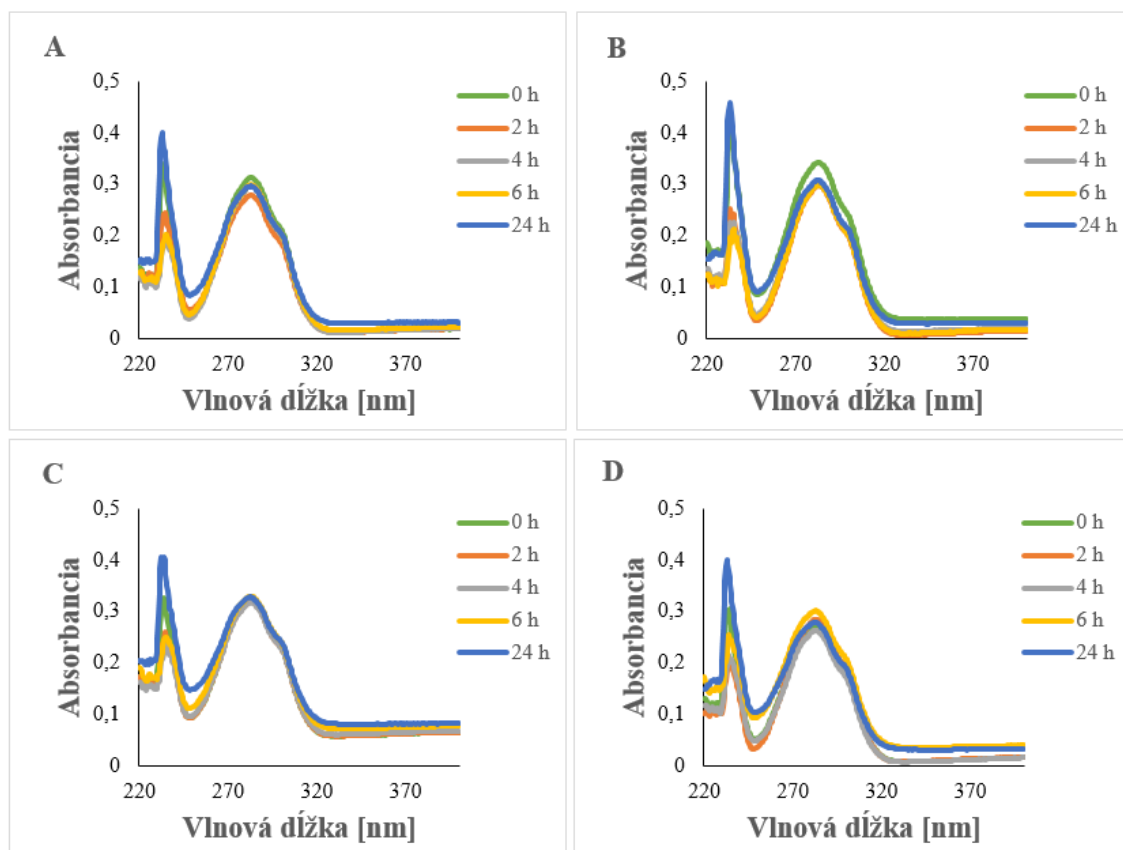
Maximum spektra látky CBC bolo namerané pri 233 a 283 nm. Vo všetkých prípadoch dochádzalo k poklesu absorbancie po 2, 4 a 6 hod pri 233 nm (Obr. 22). Pokles intenzity spektra po 24 hod nebol pozorovaný iba u ožiareného roztoku CBC v kyslíkovej atmosfére. Zmena bola viditeľná najmä pri maxime 283 nm, kedy bola látka ožiarená UV-A v prostredí s argónom, kedy dochádzalo k zníženiu absorpcie v celom meranom rozsahu v porovnaní so vzorkou neožiarenou a ožiarenou v prostredí kyslíka (Obr. 22 C).

CBD absorboval v porovnaní s ostatnými testovanými kanabinoidmi menej v použitom rozsahu vlnových dĺžok. CBD má výrazné maximum pri 233 a 276 nm. Rovnako ako pri predchádzajúcom meraní bol zistený pokles absorbancie pri vlnovej

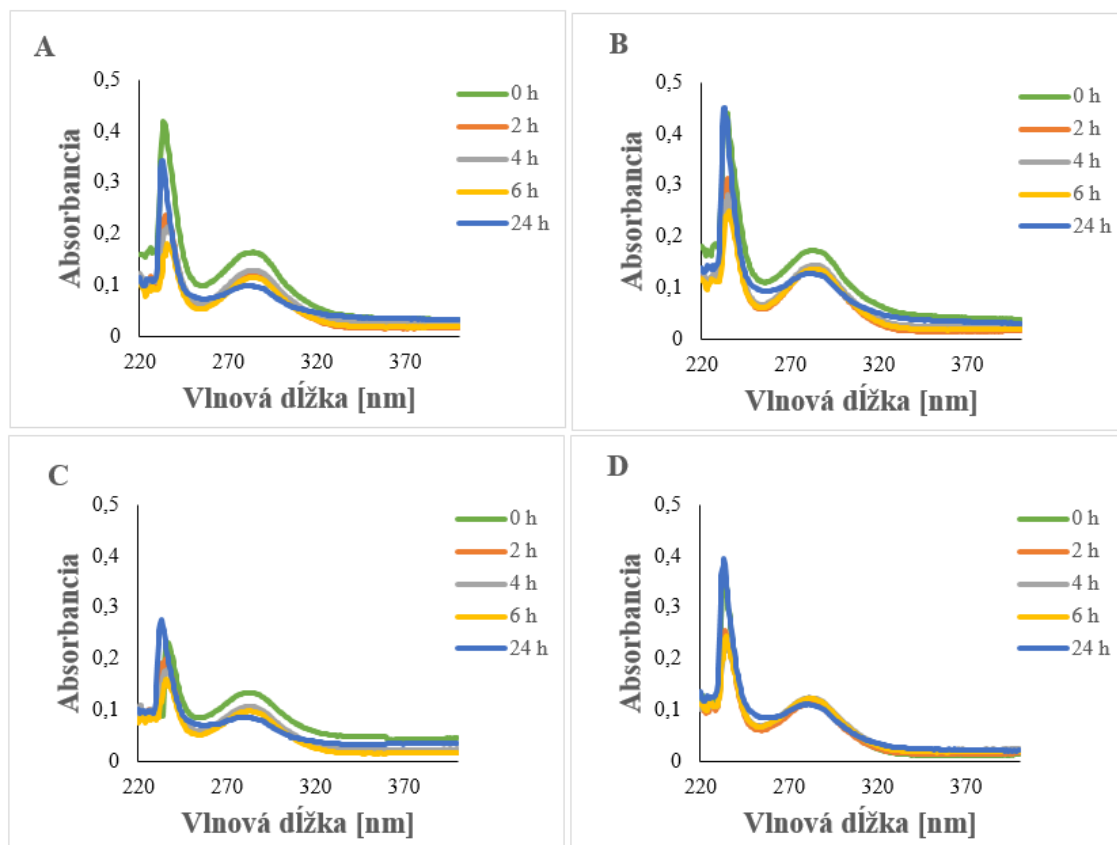
dĺžke 233 nm vo všetkých testovaných podmienkach po 2 a 6 hod inkubácii, čo nebolo sprevádzané zmenami pri 276 nm. Po 24 hod bola nameraná takmer identická hodnota ako v čase 0 a je teda možné predpokladať, že látka je stabilná. U CBD však bola zistená nestabilita po pôsobení UV-A ako v prítomnosti tak aj neprítomnosti kyslíka. Zmena v spektre bola zistená ihneď po ožiarení a v čase sa neprehlbovala (Obr. 23 C,D).



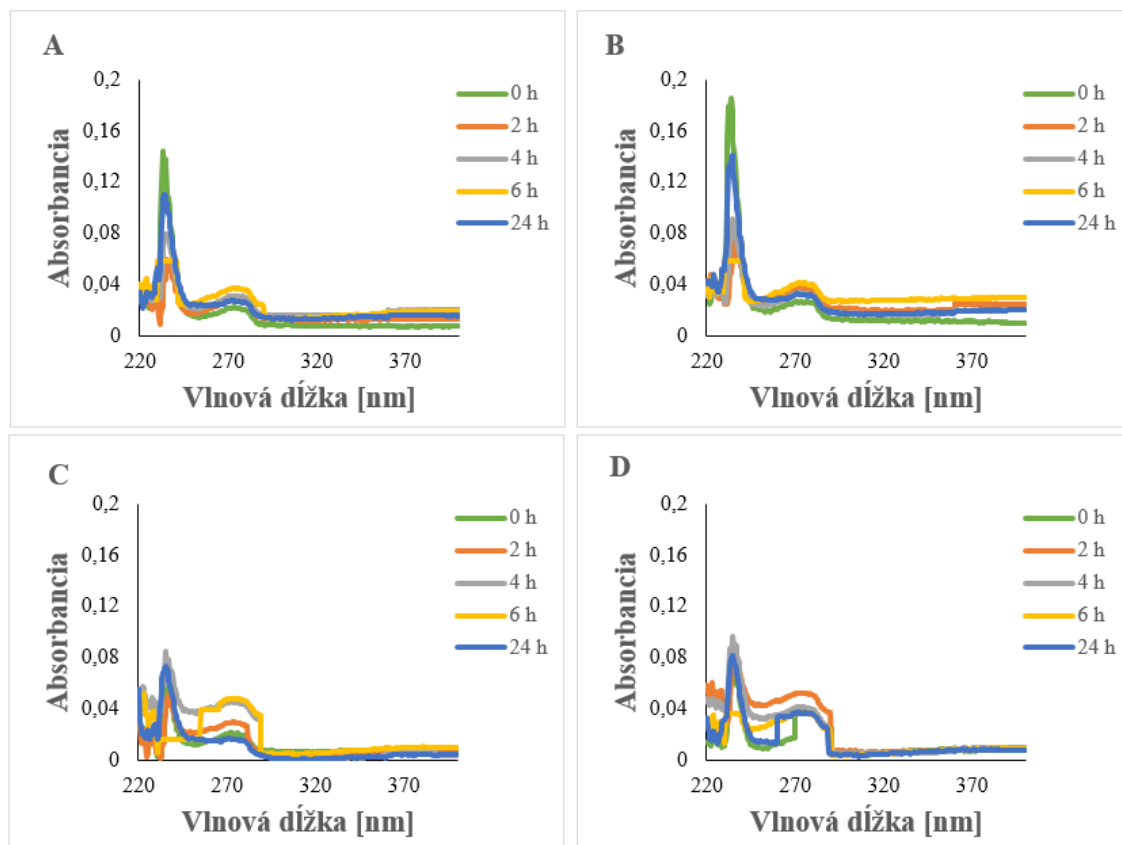
Obr. 20 Fotostabilita CBG. Roztok CBG ($20 \mu\text{mol.l}^{-1}$) vo fosfátovom pufrí pri pH 7,4 s metanolom (2:1) bol ožarovaný UV-A (20 J/cm^2). Experiment bol vykonávaný v kyslíkovej aj v argónovej atmosfére, aby sa eliminoval vplyv kyslíka. Súčasne bol vykonávaný paralelný experiment bez ožiarovania. Spektrum bolo merané v časových intervaloch 0, 2, 4, 6 a 24 hod. A) testovaná látka v prostredí s argónom bez vystavenia UV-A žiareniu. B) testovaná látka v kyslíkovej atmosfére bez vystavenia UV-A žiareniu. C) testovaná látka v prostredí s argónom a ožiarená UV-A. D) testovaná látka v kyslíkovej atmosfére a ožiarená UV-A.



Obr. 21 Fotostabilita CBN. Roztok CBN ($20 \mu\text{mol.l}^{-1}$) vo fosfátovom pufrí pri pH 7,4 s metanolom (2:1) bol ožiarený UV-A (20 J/cm^2). Experiment bol vykonávaný v kyslíkovej aj v argónovej atmosfére, aby sa eliminoval vplyv kyslíka. Súčasne bol vykonávaný paralelný experiment bez ožiarenia. Spektrum bolo merané v časových intervaloch 0, 2, 4, 6 a 24 hod. A) testovaná látka v prostredí s argónom bez vystavenia UV-A žiareníu. B) testovaná látka v kyslíkovej atmosfére bez vystavenia UV-A žiareníu. C) testovaná látka v prostredí s argónom a ožiarená UV-A. D) testovaná látka v kyslíkovej atmosfére a ožiarená UV-A.



Obr. 22 Fotostabilita CBC. Roztok CBC ($20 \mu\text{mol.l}^{-1}$) vo fosfátovom pufrí pri pH 7,4 s metanolom (2:1) bol ožiarený UV-A (20 J/cm^2). Experiment bol vykonávaný v kyslíkovej aj v argónovej atmosfére, aby sa eliminoval vplyv kyslíka. Súčasne bol vykonávaný paralelný experiment bez ožiarenia. Spektrum bolo merané v časových intervaloch 0, 2, 4, 6 a 24 hod. A) testovaná látka v prostredí s argónom bez vystavenia UV-A žiareniu. B) testovaná látka v kyslíkovej atmosfére bez vystavenia UV-A žiareniu. C) testovaná látka v prostredí s argónom a ožiarená UV-A. D) testovaná látka v kyslíkovej atmosfére a ožiarená UV-A.



Obr. 23 Fotostabilita CBD. Roztok CBD ($20 \mu\text{mol.l}^{-1}$) vo fosfátovom pufri pri pH 7,4 s metanolom (2:1) bol ožarovaný UV-A (20 J/cm^2). Experiment bol vykonávaný v kyslíkovej aj v argónovej atmosfére, aby sa eliminoval vplyv kyslíka. Súčasne bol vykonávaný paralelný experiment bez ožiarenia. Spektrum bolo merané v časových intervaloch 0, 2, 4, 6 a 24 hod. A) testovaná látka v prostredí s argónom bez vystavenia UV-A žiareniu. B) testovaná látka v kyslíkovej atmosfére bez vystavenia UV-A žiareniu. C) testovaná látka v prostredí s argónom a ožiarená UV-A. D) testovaná látka v kyslíkovej atmosfére a ožiarená UV-A.

4.6 Stanovenie faktoru ochrany pred slnečným žiarením

Pokiaľ je látka používaná dermálne je možné overiť *in vitro* či má protektívne vlastnosti. Slnečný ochranný faktor (SPF₂₉₀₋₃₂₀) bol stanovený u dvoch kanabinoïdov – CBC a CBN. Hodnota SPF bola spočítaná z hodnôt absorbcie v rozmedzí vlnových dĺžok 290 – 320 nm etanolického roztoku kanabinoïdu (50 µmol.l⁻¹) a bola porovnávaná s kyselinou ferulovou (50 µmol.l⁻¹), ktorá je považovaná za štandard. Dáta predstavujú priemer z dvoch nezávislých experimentov ± smerodajná odchýlka (S.D.). SPF pre štandard - kyselinu ferulovú mal hodnotu 7,51 ± 0,16. Hodnoty SPF stanovené pre kanabinoïdy boli signifikantne nižšie a vypočítané na hodnotu 1,07 ± 0,14 pre látku CBC a 1,74 ± 0,11 pre látku CBN. U látok CBD a CBG nebolo SPF stanovené vzhľadom k tomu, že tieto látky vo vyššie uvedenej oblasti vlnových dĺžok neabsorbujú.

5. Diskusia

Ľudská koža je dennodenne vystavovaná pôsobeniu slnečného žiarenia. V poslednej dobe bol zaznamenaný dramatický nárast expozície UV žiarenia nielen pobytom na slnku, ale aj znížením ozónovej vrstvy a teda väčšej priestupnosti tejto vrstvy pre UV žiarenie, najmä UV-B oblasť (~295 nm). Rovnako ako aj UV-B, tak aj UV-A žiarenie (315-400 nm) sú zodpovedné za negatívne účinky (Hermann, 1987). Nadmerné expozície sú sprevádzané tvorbou ROS, ktoré poškadzujú biomolekuly – proteíny, lipidy a DNA. Nadprodukcia ROS je následne spojená s rozvojom oxidačného stresu v koži, a to v epidermálnej vrstve, ktorej najhojnejšími bunkami sú keratinocyty a melanocyty a vo vrstve dermálnej, ktorá je bohatá na fibroblasty a imunitné bunky. Okrem poškodenia makromolekúl dochádza taktiež k narušeniu extracelulárnej matrix. Znižuje sa syntéza kolagénu, elastínu a aktivujú sa enzýmy, ktoré ich štiepia. Dochádza k nahromadeniu rozštiepených a poškodených zložiek extracelulárnej matrix, čo sa prejaví vo funkčných a štruktúrnych zmenách vedúcich k predčasnému starnutiu kože. Vo vážnejších prípadoch dochádza k vzniku kožných ochorení alebo kožného karcinómu (Seebode *et al.*, 2016). Vplyvom oxidačného stresu dochádza taktiež k stimulácii mnohých antioxidantných enzýmov, ktoré eliminujú kyslíkové radikály, avšak expozícia UV-A a UV-B žiarenia zvyšuje tvorbu ROS do takej miery, ktorá často prevyšuje endogénnu antioxidantnú kapacitu ľudskej kože (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1997).

Na zmiernenie týchto nežiadúcich účinkov sa využívajú preparáty, ktoré obsahujú prírodné látky. Vďaka svojim vlastnostiam (antioxidačným, imunostimulačným, antiapoptickým a protizápalovým) môžu potlačiť nežiadúce účinky slnečného žiarenia a spomaliť predčasné starnutie kože. Používajú sa nielen vyzolované čisté látky, ale taktiež ich zmesi alebo extrakty s vysokým obsahom antioxidantov a polyfenolov.

V rámci diplomovej práce boli skúmané účinky kanabinoidov – sekundárnych metabolitov rastliny konope siatej (*Cannabis sativa*). Konope obsahuje vyše 100 fyto-kanabinoidov (Aizpurua-Olaizola *et al.*, 2016), ktoré sa nachádzajú v žľazových trichómoch tejto rastliny. V tejto práci boli skúmané účinky štyroch kanabinoidov, a to CBC, CBD, CBG a CBN ich toxicita, možné fototoxické či UV-A a UV-B fotoprotektívne vlastnosti na ľudských kožných bunkách.

Cytotoxické účinky kanabinoidov boli testované v koncentračnom rozmedzí 0,78 – 100 μmol^{-1} , a teda ich vplyv na viabilitu buniek – normálnych ľudských dermálnych fibroblastov (NHDF) a línií ľudských kožných keratinocytov (HaCaT). Najvyššiu

toxicitu vykazovala látka CBC na oboch typoch buniek s hodnotou IC_{50} stanovenou na $4,73 \pm 0,54 \mu\text{mol.l}^{-1}$ u NHDF a $10,18 \pm 1,03 \mu\text{mol.l}^{-1}$ pre HaCaT. V porovnaní s látkami CBD a CBN, kde bola zaznamenaná najnižšia cytotoxicita na NHDF ($IC_{50} = 7,15 \pm 0,65 \mu\text{mol.l}^{-1}$) a CBG ($IC_{50} = 16,94 \pm 1,74 \mu\text{mol.l}^{-1}$) s najnižšou toxicitou u HaCaT. Z výsledkov je teda možné usúdiť, že látka CBC je najtoxickejšia. Cytotoxický účinok kanabinooidov bol skúmaný aj v štúdií Petrosino *et al.* (2018), kde boli HaCaT ošetrené látkami CBD, CBC, CBG, tetrahydrokanabivarín (THCV) a kanabigerivarín (CBGV) v koncentráciách 10 a 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po dobu 6 hod. Po tejto dobe nebola pozorovaná žiadna toxicita, rovnako aj po ošetrení HaCaT látkou CBD po dobu 12 a 24 hod. Tieto výsledky však neodpovedajú nášmu pozorovaniu a rozdiel je možné vysvetliť tým, že experimenty boli prevedené v sérovom médiu. Prítomnosť séra v kultivačnom médiu znižuje toxicitu študovaných látok, pretože dochádza k zníženiu voľnej koncentrácie testovaných látok. Štúdia Jasztrąb *et al.* (2019) testuje cytotoxicitu látky CBD v koncentračnom rozmedzí 0,1-100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ na ľudských immortalizovaných keratinocytoch (CDD 1102 KERTr). Výsledky naznačili koncentračne závislý pokles viability; pri koncentrácii 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ klesla viabilita na 75 %. V štúdií Wilkinson a Williamson (2007) boli stanovené hodnoty IC_{50} jednotlivých kanabinooidov v ľudských HPV-16 E6/E7 transformovaných kožných keratinocytoch. Pre CBD bola zistená $IC_{50} = 2 \mu\text{mol.l}^{-1}$, CBN 2,1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a CBG 2,3 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Nami zistené hodnoty IC_{50} boli vyššie (Obr. 11). Poradie hodnôt IC_{50} však zodpovedá hodnotám našich meraní. Sangiovanni *et al.* (2019) vo svojej štúdií skúmal cytotoxicitu CBD a etanolického extraktu konope siatej (CSE) na HaCaT a NHDF. Toxicita CBD nebola pozorovaná pri koncentráciách 0,05 - 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ u HaCaT a na NHDF v rozmedzí 1 - 2,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. U CBD bol na NHDF pozorovaný toxický účinok pri koncentrácii nad 2,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Vyššia toxicita bola pozorovaná na NHDF, čo odpovedá aj našim výsledkom.

Aby mohli byť látky použité v dermatologických preparátoch je nutné overiť či sú nefototoxické, to znamená, že pri expozícii slnečnému žiareniu, hlavne UV-A zložke, nedochádza k zvýšeniu ich toxicity. Pri testovaní fototoxických účinkov kanabinooidov nebol preukázaný fototoxický potenciál u žiadnej z testovaných látok (Tab. 2 a 3). Pôsobením UV-A žiarenia nedochádzalo k zníženiu IC_{50} študovaných kanabinooidov a z tohto pohľadu sa látky javia ako bezpečné. Tieto výsledky sú unikátne, pretože doposiaľ nebola fototoxicita študovaná.

Ďalej bola testovaná fotoprotekcia kanabinooidov na HaCaT a NHDF voči UV-A a UV-B žiareniu. K testovaniu boli zvolené netoxické koncentrácie kanabinooidov (0,78 -

6,25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). Najúčinnějšími kanabinoidmi s ochranou voči UV-A žiareniu boli CBD a CBG ako na NHDF, tak aj na HaCaT. U CBD bola pri koncentrácii 1,56 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ spozorovaná ochrana okolo $37,69 \pm 7,2 \%$ a u látky CBG pri koncentrácii 6,25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ bolo $29,52 \pm 4,99 \%$ ochrany. Naopak nízky ochranný účinok zaznamenala látka CBN na oboch typoch buniek. Pri testovaní UV-B ochranných účinkov na NHDF bol u CBD najvyšší ochranný účinok pri koncentrácii 0,78 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ($34,01 \pm 4,60 \%$) a u CBC pri koncentrácii 1,56 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ $30,38 \pm 11,10 \%$. U HaCaT CBG v koncentrácii 0,781 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ preukázala najvyšší UV-B fotoprotektívny potenciál ($35,25 \pm 4,50 \%$). Nízke ochranné vlastnosti boli zaznamenané opäť u látky CBN. Z našich zistení teda vyplýva, že najvyšší ochranný účinok má látka CBD a CBG, zatiaľ čo látka CBN javí najnižšie protektívne vlastnosti. Jasztrąb *et al.* z roku 2019 vo svojej štúdií skúmal protektívne účinky látky CBD (4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) na ľudských dermálnych fibroblastoch vystavených dávke UV-A žiarenia (20 J/cm^2) alebo UV-B žiarenia (200 mJ/cm^2). Bol zaznamenaný ochranný účinok látky špecificky znížením tvorby aldehyd-proteínových aduktov až o 80% oproti ožiarenej kontrole.

Ďalším cieľom diplomovej práce bolo stanoviť či sú kanabinoidy schopné potlačiť apoptózu vyvolanú UV-A žiarením (Putisek a Situm, 2011) a či samotné kanabinoidy aktivujú apoptózu. Ako marker apoptózy bola zvolená kaspáza-3 (casp-3). Po overení správnosti experimentálnych podmienok sme sa zamerali na meranie extracelulárnej hladiny enzýmu laktátdehydrogenázy (LDH) ako marker nekrózy. Vplyvom oxidačného stresu vyvolaného UV-A žiarením dochádza k narušeniu bunkovej membrány a zvýšením jej permeability počas procesu peroxidácie lipidov s následným zvýšením hladiny cytozolickej LDH (Ohia *et al.*, 2005). Vplyvom UV-A žiarenia nedochádzalo k výrazným zmenám hladiny LDH a je teda možné usúdiť, že zvolená dávka nepoškodzovala bunkovú membránu. Naše výsledky potvrdili, že nedošlo k poškodeniu membrány a aktivácii nekrózy. Výsledky našej práce nezaznamenali ani vplyv samotných kanabinoidov v koncentráciách 0,78 a 1,56 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ či kanabinoidov v kombinácii s UV-A na hladiny LDH. Výsledky získané meraním LDH odpovedajú meraniu toxicity a fototoxicity metódou akumulácie neutrálnej červene. Toto zistenie je v súlade so štúdiou z roku 2006, ktorá skúmala inhibičný účinok kanabinoidov THC, CBD a CBG na proliferáciu ľudských keratinocytov testom LDH (Wilkinson a Williamson, 2007).

Keďže nebol preukázaný toxický účinok kanabinoidov ani UV-A žiarenia na hladinu LDH zamerali sme sa na meranie casp-3. Považuje sa za najdôležitejší enzým zapojený v procese apoptózy a jej úloha spočíva v degradácii bunkových komponent

(McIlwain *et al.*, 2013). Vplyvom UV-A žiarenia dochádzalo k nárastu hladiny casp-3, čo koreluje s publikovanými výsledkami na NHDF (Rajnochová Svobodová *et al.*, 2018). Rovnaký efekt na NHDF zaznamenal vo svojej štúdií aj Hwang *et al.* (2019). Samotné kanabinoidy CBN, CBG a CBC v koncentráciách 0,78 a 1,56 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ zvyšovali hladinu casp-3 v NHDF oproti kontrole (do dvojnásobku hladiny kontroly). U látky CBD v oboch testovaných koncentráciách nebol zaznamenaný efekt hladiny casp-3 oproti kontrole. Získané výsledky odpovedajú pozorovaniu na inom type buniek (sebocyty). V štúdií Oláh *et al.* (2016) bol skúmaný vplyv kanabinooidov (CBC, CBG, CBDV, CBGV a THCv) na viabilitu a mechanizmus bunkovej smrti – apoptózu a nekrózu. V nízkych koncentráciách ($<10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) bol zaznamenaný len minimálny účinok avšak vo vyšších dávkach ($>50 \mu\text{mol.l}^{-1}$) kanabinoidy indukovali apoptózu buniek s následnou nekrozou. Testované kanabinoidy znižovali taktiež lipogézu a potlačili proliferáciu, čím vedci predpokladali ich protizápalové účinky u akné. Všetky kanabinoidy (okrem CBC) znižovali účinok UV-A žiarenia na hladinu casp-3, mali teda antiapoptický efekt, čo svedčí o ich ochrannom účinku. Z výsledkov vyplýva, že CBD mal najnižšie proapoptické účinky a navyš je schopný potlačiť apoptózu vyvolanú UV-A žiarením.

Pretože vybrané kanabinoidy vykazovali UV-A a UV-B protektívne vlastnosti, zamerali sme sa na ďalšie parametre, ktoré sú ovplyvňované UV-A žiarením v NHDF a to na enzýmy katalázu (Cat) a hemoxygenázu-1 (Ho-1) (Dennerly, 2001; Imlay, 2008). V štúdií Rhie *et al.* z roku 2001 bol skúmaný kombinovaný vplyv UV-A a UV-B žiarenia na hladiny Cat vo vrstvách epidermis a dermis. Po 24 a 48 hod od expozície UV žiarenia bol zaznamenaný pokles hladiny Cat. Pokles hladiny Cat v NHDF vplyvom UV-A žiarenia bol popísaný aj v štúdií Liu *et al.* (2018). Tieto účinky sme na Cat potvrdili. Samotné testované kanabinoidy v koncentráciách 0,78 a 1,56 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ neovplyvnili hladinu Cat a ich účinok na UV-A zníženú hladinu enzýmu bol minimálny. Mierny ochranný efekt bolo možné spozorovať u látky CBG v nižšej testovanej koncentrácii, kde dochádzalo k potlačeniu oxidačného stresu zvýšením hladiny Cat, čo môžeme prisúdiť potlačeniu oxidačného stresu CBG. Protichodné výsledky publikovala v roku 2020 Jarocka-Karpowicz *et al.*, ktorí sledovali nárast aktivity Cat po ožiarení normálnych ľudských keratinocytov dávkou UV-A (dávkou 30 J/cm^2) a následnou normalizáciou hladiny Cat CBD. Na základe týchto ale aj ďalších pozorovaní sú kanabinoidom pripisované antioxidantné účinky. Napríklad Hosseinzadeh *et al.* (2016) vo svojej štúdií skúmal účinok CBD (0,3 nmol.l^{-1}) na antioxidantný status v hipokampálnych bunkách počas chronickej fázy epilepsie na modeloch potkanov, ktorý je sprevádzaný poklesom

aktivity Cat. CBD bol schopný aktivitu normalizovať a výrazne dopomohol v oneskorení nástupu chronickej fázy ochorenia.

Ho-1 sa radí medzi antioxidantné enzýmy, ktoré produkujú antioxidanty. Vplyvom oxidačného stresu je expresia génov riadených týmto elementom značne zvýšená aktiváciou transkripčného faktora, napríklad *Nrf 2* (Alam *et al.*, 2004; Srisook *et al.*, 2005). Zhong *et al.* (2010) vo svojej štúdií potvrdzuje, že UV-A žiarenie (250 kJ.m^{-2}) ako induktor oxidačného stresu silne ovplyvňuje Ho-1 v NHDF, kde po 6 a 8 hod. od expozície dochádzalo k zvýšeniu hladiny tohto enzýmu. V diplomovej práci bol potvrdený stimulačný účinok UV-A žiarenia na Ho-1. Aj samotné kanabinoidy mierne zvyšovali hladinu Ho-1 okrem CBG, ktoré hladinu tohto enzýmu znižovalo. Všetky 4 testované látky znižovali hladinu enzýmu stimulovaného UV-A žiarením. Môžno teda usúdiť, že látky aktivovali signálnu dráhu riadenú komplexom transkripčného faktora *Nrf2*, došlo k aktivácii Ho-1 a zníženiu oxidačného stresu. V porovnaní so štúdiou Schwartz *et al.* z roku 2018, kde bol na myších modeloch zaznamenaný koncentračne závislý nárast v expresii Ho-1 vplyvom CBD, a to najmä v koncentráciách 6 a $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hod inkubácii. Ho-1 indukovaná expresia bola sprevádzaná inhibíciou proliferácie sprostredkovanou rastovým faktorom. Predpokladá sa, že antiproliferatívne vlastnosti tohto enzýmu zvýšené účinkom CBD môžu byť sľubné pri liečbe kardiovaskulárnych ochorení a rakoviny (Marx *et al.*, 2011).

K tomu či látky môžu byť využívané v dermatologických prípadne opaľovacích prípravkoch nestačí otestovať ich protektívne vlastnosti voči UV žiareniu, ale je rovnako potrebné zistiť či nepodliehajú degradácii vplyvom hlavne UV-A žiarenia a taktiež v prítomnosti kyslíka. V literatúre však nie sú informácie o stabilite či fotostabilite kanabinooidov. Jedným z cieľov bolo preto testovanie stability a fotostability po UV-A expozícii v čase. Súčasne sme sa zamerali aj na vplyv kyslíka na stabilitu a fotostabilitu kanabinooidov, experimenty boli vykonané v atmosfére s kyslíkom a bez kyslíka (argónová atmosféra). U všetkých látok boli v spektre namerané 2 maximá spektra a to približne pri vlnových dĺžkach 230 a 280 nm. V čase 0 a 24 hod boli takmer identické spektrá u všetkých kanabinooidov čo naznačuje, že látky nepodliehajú degradácii či fotodegradácii. U látky CBD však došlo k výrazným zmenám v spektre po ožiarení, čo naznačuje pravdepodobnú fotolabilitu. Tieto zmeny boli rovnaké ako v prítomnosti tak aj v neprítomnosti kyslíka. Toto zistenie bude naďalej potvrdené detekciou možných produktov degradácie vo vzorkách, ktoré budú analyzované HPLC-MS.

Aby sme vysvetlili ochranné účinky kanabinooidov voči UV žiareniu na kožných

bunkách, pokúsili sme sa zmerať ich faktor ochrany pred slnečným žiarením (SPF) v rozmedzí vlnových dĺžok 290-320 nm. Namerané spektrá ukázali, že látky CBN a CBC nebudú mať vysoký SPF v porovnaní so spektrom kyseliny ferulovej. Pretože CBG a CBD prakticky neabsorbujú v meranej oblasti, nebolo u nich SPF stanovené. Pre látku CBC bol SPF stanovený na hodnotu $1,07 \pm 0,14$ a pre látku CBN na hodnotu $1,74 \pm 0,11$, čo je v porovnaní s kyselinou ferulovou nižšia hodnota. Na základe tohoto zistenia môžeme povedať, že kanabinoidy chránia bunky pred pôsobením UV žiarenia hlavne iným mechanizmom než je absorpcia svetla, ale že pravdepodobne ovplyvňujú niektorú z ochranných signálnych dráh ako je Nrf2 (Alam *et al.*, 2004; Srisook *et al.*, 2005).

Získané výsledky diplomovej práce naznačujú, že dané kanabinoidy by mohli byť potenciálnou súčasťou dermatologických prípravkov, a teda oddialiť nechcené predčasné starnutie vyvolané UV-A, ale i UV-B zložkou slnečného žiarenia. Ďalší výskum sa zameria na pochopenie mechanizmu ochranného fotoprotektívneho účinku kanabinooidov.

6. Záver

V rámci tejto diplomovej práce bola skúmaná možnosť uplatnenia kanabinoidov používaných v dermatológii pre ich protizápalové vlastnosti aj vo fotoprotektívnych preparátoch. Väčšina informácií je doposiaľ o CBD, preto sa diplomová práca zamerala aj na skúmanie ďalších kanabinoidov, a to CBN, CBG a CBC.

Bola skúmaná ich toxicita, fototoxicita, UV-A a UV-B fotoprotektívne vlastnosti a taktiež ich (foto)stabilita. Kanabinoidy neboli fototoxické a v pomerne nízkych koncentráciách mali UV-A a UV-B fotoprotektívne vlastnosti na ľudských kožných bunkách NHDF a HaCaT.

U kanabinoidov bol zaznamenaný antioxidantný potenciál, a to nepriamo moduláciou hladín Cat a Ho-1. Všetky kanabinoidy znížili UV-A stimulovanú hladinu antioxidantného enzýmu Ho-1, čo pravdepodobne vysvetľuje ich ochranný účinok. Samotné kanabinoidy a kanabinoidy v kombinácii s V-A mali len minimálny vplyv na hladinu Cat.

Samotné kanabinoidy CBC, CBG a CBN mierne zvýšili hladinu casp-3, ale na druhú stranu boli okrem CBC schopné potlačiť UV-A stimulovanú aktiváciu casp-3, čo dokazuje ich ochranný účinok.

Okrem CBD, všetky kanabinoidy boli (foto)stabilné a stabilita nebola ovplyvnená kyslíkom. Vďaka nízkym hodnotám SPF možno usúdiť, že ich ochranný účinok je pravdepodobne spojený s ich biologickou aktivitou, pretože nepôsobia ako filtre.

Výsledky diplomovej práce doplnili znalosti o CBD a ukázali, že je možné ho využiť nielen v protizápalových preparátoch, ale aj v prípravkoch s fotoprotektívnym potenciálom v celej škále UV žiarenia. Perspektívny sa tiež javí CBG, ktorý má zrovnateľné vlastnosti ako CBD, naopak CBN má nízky ochranný efekt.

Výsledky získané *in vitro* potvrdili, že testované kanabinoidy majú schopnosť chrániť ľudskú kožu pred nepriaznivými účinkami UV žiarenia a oddialiť tak predčasné starnutie kože.

7. Literatúra

- Abraham, N. G., Kappas, A. (2008): Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacological Reviews* **60**, 79–127.
- Aggarwal B. B., Bhardwaj A., Aggarwal R. S., Seeram N. P., Shishodia S., Takada Y. (2004): Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research* **24**, 2783–2840.
- Aizpurua-Olaizola O., Soydaner U., Öztürk E., Schibano D., Sinsir Y., Navarro P., Etxebarria N., Usobiaga A. (2016): Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of Cannabis sativa Plants from Different Chemotypes. *Journal of Natural Products* **79**, 324–331.
- Aktaş M., Değirmenci U., Ercan S. K., Tamer L., Atik U. (2005): Redükte glutatyon ölçümünde HPLC ve spektrofotometrik yöntemlerin karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* **3**, 95–99.
- Alam J., Igarashi K., Immenschuh K. S., Shibahara S., Tyrrell R. M. (2004): Regulation of heme oxygenase-1 gene transcription: recent advances and highlights from the International Conference on Heme Oxygenase. *Antioxidants and Redox Signaling* **6**, 924–933.
- Anderson D. M., Keith J., Novac P., Elliott M. A. (1994): *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*. 28 ed., W. B. Saunders Company, Philadelphia, U.S.A., 1992 strán.
- Andre C. M., Hausman J.-F., Guerriero G. (2016): Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Frontiers in Plant Science* **7**, 19.
- Artiukhova V., Nakvasina M., Lysenko I. (1996): Active forms of oxygen and the degree of UV modification of the structural and functional properties of lactate dehydrogenase. *Radiatsionnaia biologiiia radioecologiia/Rossiiskaia akademiia nauk* **37**, 453–460.
- Basu S., Dittel B. N. (2011): Unraveling the complexities of cannabinoid receptor 2 (CB2) immune regulation in health and disease. *Immunologic Research* **51**, 26–38.
- Bíró T., Tóth B. I., Haskó G., Paus R., Pacher P. (2009): The endocannabinoid system of the skin in health and disease: Novel perspectives and therapeutic opportunities. *Trends in Pharmacological Sciences* **30**, 411–420.
- Bitencourt R. M., Pamplona F. A., Takahashi R. N. (2008): Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats. *European Neuropsychopharmacology* **18**, 849 – 859.
- Blereau R. P. (2002): Three cases of hyperpigmentation of pregnancy. *Consultantlive* **42**, 10.
- Bonekamp N. A., Volkl A., Fahimi H. D., Schrader M. (2009): Reactive oxygen species and peroxisomes: struggling for balance. *BioFactors* **35**, 346–355.
- Borenfreund E., Puerner J. A. (1985): Toxicity determined in vitro by morphological alternation and neutral absorption. *Toxicology Letters* **24**, 119–124.
- Bradford M. M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Britannica home page: <https://www.britannica.com/science/light/The-electromagnetic-spectrum> (17.11.2019).
- Burke K. E. (2017): Chapter 24: Photodamage: protection and reversal with topical antioxidants. In: *Textbook of Cosmetic Dermatology*, 5th ed., (Baran R., Maibach H.I., eds.), CRC Press, Taylor and Francis group, Boca Raton, Florida, U.S.A., 199 – 213.
- Cadet J., Sage E., Douki T. (2005): Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutation Research* **571**, 3–17.
- Campos A. C., Moreira F. A., Gomes F. V., Del Bel E. A., Guimarães F. S. (2012): Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Biological Sciences* **367**, 3364–78.
- Canada home page: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/sun-safety/what-is-ultraviolet-radiation.html> (5.5.2020).
- Casanova M. L., Blázquez C., Martínez-Palacio J., Villanueva C., Fernández-Aceñero M. J., Huffman J. W., Guzmán, M. (2003): Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *Journal of Clinical Investigation* **111**, 43–50.

- Ciechanover A. (2005): Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 79–87.
- Pustisek N., Situm M. (2011): UV-radiation, apoptosis and skin. *Collegium Antropologicum* **2**, 339–41.
- Cooper G.M. (2000): *The cell: A molecular approach*. 2nd ed., Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, U.S.A., 832 strán.
- Cory S., Adams J. M. (2002): The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* **2**, 647–56.
- de Meijer E. P. M., Bagatta M., Carboni A., Crucitti P., Moliterni V.M., Ranalli P., Mandolino G. (2003): The inheritance of chemical phenotype in cannabis sativa. *L. Genetics* **163**, 335–46.
- Demirseren D. D., Emre S., Akoglu G., Arpacı D., Arman A., Metin A., Cakır B.. (2014): Relationship between skin diseases and extracutaneous complications of diabetes mellitus: clinical analysis of 750 patients. *American Journal of Clinical Dermatology* **15**, 65–70.
- Dennery P. A. (2001): Regulation and role of heme oxygenase in oxidative injury. *Current Topics in Cellular Regulation, Elsevier* **36**, 181–199.
- Di Marzo V., Bifulco M., De Petrocellis L. (2004): The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nature Reviews Drug Discovery* **3**, 771–84.
- Di Marzo V., Stella N., Zimmer A. (2015): Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. *Nature Reviews Neuroscience* **16**, 30–42.
- El-Alfy A. T., Ivey K., Robinson K., Ahmed S., Radwan M., Slade D., Khan I., ElSohly M., Ross S. (2010): Antidepressant-like effect of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from Cannabis sativa *L. Pharmacology Biochemistry and Behavior* **95**, 434–442.
- Emedicinehealth home page:
https://www.emedicinehealth.com/image-gallery/skin_picture/images.htm
- Fellermeier M., Zenk M. H. (1998): Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetrahydrocannabinol. *FEBS Letters* **427**, 283–285.
- Filman D. J., Brawn R. J., Dankler W. B. (1975): Intracellular supravital stain delocalization as an assay for antibody-dependent complement-mediated cell damage. *The Journal of Immunological Methods* **6**, 189–207.
- Fisher G. J., Kang S., Varani J., Bata-Csorgo Z., Wan Y., Datta S., Voorhees J.J. (2002): Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Archives of Dermatology* **138**, 1462–1470.
- Fowler J. F. Jr, Woolery-Lloyd H., Waldorf H., Saini R. (2010): Innovations in natural ingredients and their use in skin care. *Journal of Drugs in Dermatology* **9**, 72–81.
- Gagne S. J., Stout J. M., Liu E, Liu E., Boubakir Z., Clark S.M., Page J.E. (2012): Identification of olivetolic acid cyclase from Cannabis sativa reveals a unique catalytic route to plant polyketides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 12811–6.
- Gawkrodger D. J. (1997): *Dermatology: An illustrated Colour text*. 2nd ed., Churchill Livingstone, Elsevier, London, United Kindgdom, 136 strán.
- Gies P. (2007): Photoprotection by clothing. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine* **23**, 264–74.
- Gil M. I., Tomás-Barberán F. A., Hess-Pierced B., Holcroft D. M., Kader A. A. (2000): Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 4581–4589.
- Gu L. H., Coulombe P. A. (2007): Keratin function in skin epithelia: A broadening palette with surprising shades. *Current Opinion in Cell Biology*. **19**, 13–23.
- Guzman M. (2003): Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nature Reviews Cancer* **3**, 745–755.
- Habib L. K., Lee M. T. C., Yang J. (2010): Inhibitors of catalase-amyloid interactions protect cells from β -amyloid induced oxidative stress and toxicity. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 38933–38943.

- Halder R. M., Chappell J. L. (2009): Vitilligo update. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* **28**, 86-92.
- Hawk J. L. M., Young A. R., Ferguson J. (2013): Cutaneous photobiology. In: *Rook's Textbook of Dermatology*. 8th ed., (Burns T., Breathnach S., Cox N., Griffith C., eds.), Blackwell Science Ltd Oxford, United Kingdom, 1-24.
- Hazekamp A., Fishedick J. T. (2012): Cannabis - from cultivar to chemovar. *Drug Testing and Analysis* **4**, 660–667.
- He F. (2011): BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay. *Journal of Biology* **44**, 101.
- Healtheuropa home page: <https://www.healtheuropa.eu/cannabinoids-cbc-and-cbg-exhibit-anti-tumour-properties-on-cancer-cells/97058/> (4.4.2020).
- Hearing V.J. (2005): Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *Journal of Dermatological Science* **37**, 3-14.
- Hermann A. (1987): Unity and metamorphosis of forces. In: *Symmetries in Physics*. (Doncel M. G., Hermann A., Michel L., Pais A., eds.), Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, 51-62.
- Hosseinzadeh M., Nikseresht S., Khodagholi F., Naderi N., Maghsoudi N. (2016): Cannabidiol Post-Treatment Alleviates Rat Epileptic-Related Behaviors and Activates Hippocampal Cell Autophagy Pathway Along with Antioxidant Defense in Chronic Phase of Pilocarpine-Induced Seizure. *Journal of Molecular Neuroscience* **58**, 432–440.
- Howlett A. C. (2002): Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacological Reviews* **54**, 161–202.
- Hussein A., Elhassaneen Y. (2014): Natural dye from red onion skins and applied in dyeing cotton fabrics for the production of women's headwear resistance to ultraviolet radiation (UVR). *The Journal of American Science* **10**, 129–139.
- Hwang J., Yadav A., Jang B., Kim Y. (2019): Antioxidant and cytoprotective effects of *Stachys riederi* var. *japonica* ethanol extract on UVA-irradiated human dermal fibroblasts. *International Journal of Molecular Medicine* **43**, 1497-1504.
- Chan W. H., Wu C. C., Yu J. S. (2003): Curcumin inhibits UV irradiation-induced oxidative stress and apoptotic biochemical changes in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **90**, 327-338.
- Chen T. C., Chimeh F., Lu Z., Mathieu J., Person K. S., Zhang A., Kohn N., Martinello S., Berkowitz R., Holick M. F. (2007): Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **460**, 213–217.
- Cho S., et al. (2009): Effects of infrared radiation and heat on human skin aging in vivo. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* **14**, 15–9.
- Choi B. M., Pae H. O., Jeong Y. R., Oh G. S., Jun C. D., Kim B. R., Kim Y. M., Chung H. T. (2004): Overexpression of heme oxygenase (HO)-1 renders Jurkat T cells resistant to fas-mediated apoptosis: involvement of iron released by HO-1. *Free Radical Biology and Medicine* **36**, 858–871.
- Choi A. M., Alam J. (1996): Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **15**, 9–19.
- Chu D. H. (2008): Overview of biology, development and structure of skin. In: *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 7th ed., (Wolff K., Goldsmith L.A., Katz S. I., Gilchrist B. A., Paller A.S., Leffell D. J., eds.), McGraw-Hill, New York, U.S.A., 57-73.
- Imlay J. A. (2008): Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual Review of Biochemistry* **77**, 1-22.
- Isdin home page: <https://www.isdin.com/en-US/blog/skincare/anti-aging/what-is-photoaging-and-why-do-we-have-to-care-about-it/> (10.4.2020).
- Itoh K., Wakabayashi N., Katoh Y., Ishii T., O'Connor T., Yamamoto M. (2003): Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes to Cells* **8**, 379–391.
- James W. D., Berger T. G., Elston D. M. (2006): Andrews' diseases of the skin. *Clinical dermatology* **10**, 473-474.

- Junqueira L. C., Carneiro J., Kelley R. O. (1999): *Basic Histology*. 8th ed., Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 339-351.
- Jarocka-Karpowicz I., Biernacki M., Wroński A., Gęgotek A., Skrzydlewska E. (2020): Cannabidiol Effects on Phospholipid Metabolism in Keratinocytes from Patients with Psoriasis Vulgaris. *Biomolecules* **10**, 367.
- Jasztrąb A., Gęgotek A., Skrzydlewska E. (2019): Cannabidiol Regulates the Expression of Keratinocyte Proteins Involved in the Inflammation Process through Transcriptional Regulation. *Cells* **8**, 827.
- Jenkins G. (2002): Molecular mechanisms of skin ageing. *Mechanisms of ageing and development* **123**, 801-810.
- Jones N. A., Hill A. J., Smith, I., Bevan, S. A., Williams C. M., Whalley B. J. Stephens G. J. (2010): Cannabidiol displays antiepileptiform and antiseizure properties in vitro and in vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **332**, 569–577.
- Kanitakis J. (2002): Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology* **12**, 390–401.
- Kansanen E., Jyrkkänen H. K., Levonen A. L. (2012): Activation of stress signalling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids. *Free Radicals Biology and Medicine* **52**, 973–982.
- Karsak M., Gaffal E., Date R., Wang-Eckhardt L., Rehnelt J., Petrosino S., Starowicz K., Steuder R., Schlicker E., Cravatt B., Mechoulam R., Buettner R., Werner S., Di Marzo V., Tüting T., Zimmer A. (2007): Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system. *Science* **316**, 1494–1497.
- Kasai H., Crain P. F., Kuchino Y., Nishimura S., Ootsuyama A., Tanooka H. (1986): Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* **7**, 1849-1851.
- Kim K., Park H., Lim K. (2015): Phototoxicity: Its mechanism and animal alternative test methods. *Toxicological Research* **31**, 97-104.
- Kirkman H. N., Gaetani G. F. (2007): Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in biochemical sciences* **32**, 44-50.
- Kolarsick P. A. J., Kolarsick M. A., Goodwin C. (2011): Anatomy and physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* **3**, 203-213.
- Kroemer G., Mariño G., Levine B. (2010): Autophagy and the integrated stress response. *Molecular Cell* **40**, 280–293.
- Kühnl J., Roggenkamp D., Gehrke S. A., Stäb F., Wenck H., Kolbe L., Neufang G. (2015): Licochalcone A activates Nrf2 in vitro and contributes to licorice extract-induced lowered cutaneous oxidative stress in vivo. *Experimental Dermatology* **24**, 42.
- Lakhani S. A., Masud A., Kuida K., Porter G. A. Jr, Booth C. J., Mehal W. Z., Inayat I., Flavell R. A. (2006): Caspases 3 and 7: Key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* **311**, 847–85.
- Lambers H., Piessens S., Bloem A., Pronk H., Finkel P. (2006): Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *International Journal of Cosmetic Science* **28**, 359-70.
- Lastres-Becker I., Molina-Holgado F., Ramos J. A., Mechoulam R., Fernandez-Ruiz J. (2005): Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* **19**, 96–107.
- Laurent-Applegate L. E., Schwarzkopf S. (2001): Photooxidative stress in skin and regulation of gene expression. In: *Environmental Stressors in Health and Disease*. 1st ed., (Fuchs J., Packer L., eds.), CRC Press, Taylor and Francis group, New York, U.S.A., 571 strán.
- Leafly home page: <https://www.leafly.com/news/cannabis-101/factors-influencing-cannabis-degradation> (4.10.2019).
- Lim H. W., Hawk J. L. M. (2012): Photodermatologic disorders. In: *Dermatology*. 3rd ed. (Bologna J. L., Jorizzo J. L., Schaffer J. V., eds.), Elsevier Saunders, Philadelphia, U.S.A., kapitola 87.
- Lim H., Honigsmann H., Hawk, J. (2007): Photodermatology. *Informa Healthcare* **13**, 149-168.

- Liu X., Zhang R., Shi H., Li X., Li Y., Taha A., Xu C. (2018): Protective effect of curcumin against ultraviolet A irradiation-induced photoaging in human dermal fibroblasts. *Molecular Medicine Reports* **17**, 7227-37.
- Locksley R. M., Killeen N., Lenardo M. J. (2001): The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487–501.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky S. L., Darnell J. (2004): "3" *Molecular cell biology*. 5th ed., W.H. Freeman CO, New York, U.S.A., 1392 strán.
- Lucas R. M., Norval M., Neale R. E., Young A. R., de Gruijl F. R., Takizawa Y., van der Leun J.C. (2015): The consequences for human health of stratospheric ozone depletion in association with other environmental factors. *Photochemistry and Photobiological Sciences* **14**, 53-87.
- Maddodi N., Jayanthi A. Setaluri V. (2012): Shining Light on Skin Pigmentation: The Darker and the Brighter Side of Effects of UV Radiation. *Photochemistry and Photobiology* **88**, 1075–1082.
- Marx S. O., Totary-Jain H., Marks A.R. (2011): Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis. *Circulation: Cardiovascular Interventions* **4**, 104–111.
- McIlwain D. R., Berger T., Mak T. W. (2013): Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**, 1-28
- McKallip R. J., Lombard C., Fisher M., Martin B. R., Ryu S., Grant S., Nagarkatti P.S., Nagarkatti M. (2002): Targeting CB2 cannabinoid receptors as a novel therapy to treat malignant lymphoblastic disease. *Blood* **100**, 627–634.
- Memorial University home page: <https://www.mun.ca/biology/scarr/Gr16-20,25.html> (1.4.2020).
- Mescher A. L. (2016): *Junqueira's Basic Histology: Text and atlas*. 13th ed., McGraw-Hill, New York, U.S.A., 480 strán.
- Modak B. S., Tyrrell M. R. (2001): Modulation of gene expression by solar ultraviolet radiation. *Comprehensive series in Photoscience* **3**, 305-320.
- Montenegro L., Santagati L.M.(2019): Use of Vegetable Oils to Improve the Sun Protection Factor of Sunscreen Formulations. *Cosmetics* **6**, 25.
- Mounessa J. S., Siegel J. A., Dunnick C. A., Dellavalle R. P. (2017): The role of cannabinoids in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology* **77**, 188-190.
- Munro S., Thomas K. L., Abu-Shaar M. (1993): Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**, 61–65.
- Niki E. (2009): Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine* **47**, 469–484.
- O'Connell R. L., Rusby J. E. (2015): Anatomy relevant to conservative mastectomy. *Gland Surgery* **4**, 476-83.
- Ohia S. E., Opere C. A, LeDay A. M. (2005): Pharmacological consequences of oxidative stress in ocular tissues. *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **579**, 22–36.
- Oláh A., Markovics A., Szabó-Papp J., Szabó P. T., Stott C., Zouboulis C. C., Bíró T. (2016): Differential effectiveness of selected non-psychotropic phytocannabinoids on human sebocyte functions implicates their introduction in dry/seborrhoeic skin and acne treatment. *Experimental Dermatology* **25**, 701–707.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD (2004): Guideline for the Testing of Chemicals 432: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test, Paříž, Francúzsko, 15 strán.
- Pacher P., Batkai S., Kunos G. (2006): The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews* **58**, 389-462.
- Pertwee R. (2015): *Handbook of Cannabis*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom:<http://www.oxfordscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780199662685.001.0001/acprof-9780199662685>.

- Petrosino S., Verde R., Vaia M., Allarà M., Iuvone T., Di Marzo V. (2018): Anti-inflammatory Properties of Cannabidiol a Nonpsychotropic Cannabinoid in Experimental Allergic Contact Dermatitis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy* **365**, 652-663.
- Poljšak B., Dahmane R. (2012): Free radicals and extrinsic skin aging. *Dermatology Research and Practice*, 1–4.
- Potter D. (2004): Growth and morphology of medicinal cannabis. In: *Medicinal Uses of Cannabis and Cannabinoids*.(Guy G. W., Whittle B. A., Robson P., eds.), Pharmaceutical Press, London, United Kingdom, 17–54.
- Priante G., Giancesello L., Ceol M., Del Prete D., Anglani F. (2019): Cell Death in the Kidney. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 3598.
- Proskuryakov S. Y., Konoplyannikov A. G., Gabai V. L. (2003): Necrosis: a specific form of programmed cell death. *Experimental Cell Research* **283**, 1–16.
- Raharjo T. J., Chang W. Te, Choi Y. H. *et al.*(2004): Olivetol as product of a polyketide synthase in *Cannabis sativa*. *Plant Science* **166**, 381–5.
- Rajnochová Svobodová A., Gabrielová E., Michaelides L., Kosina P., Ryšavá A., Ulrichová J., Zálešák B., Vostálová J. (2018): UVA-photoprotective potential of silymarin and silybin. *Archives of Dermatological Research* **310**, 413–424.
- Repetto G., Peso del A., Zurita G. (2008): Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. *Nature Protocols* **3**, 1125-1131.
- Rhie G., Seo J. Y., Chung J. H. (2001): Modulation of Catalase in Human Skin In Vivo by Acute and Chronic UV Radiation. *Molecules and Cells* **11**, 399-404.
- Robinson E. S., Alves P., Bashir M. M., Zeidi M., Feng R., Werth V.P. (2017): Cannabinoid Reduces Inflammatory Cytokines,Tumor Necrosis Factor-alpha and Type I In- terferons in Dermatomyositis In Vitro. *Journal of Investigative Dermatology* **137**, 2445- 2447.
- Samorano L. P., Reis V. M. S. (2017): Photoprotection: Concept, Classification, and Mechanism of Action. In: *Daily Routine in Cosmetic Dermatology*. (Issa M., Tamura B., eds.), Clinical Approaches and Procedures in Cosmetic Dermatology, Springer, Berlin, Germany.
- Sangiovanni E., Fumagalli M., Pacchetti B., Piazza S., Magnavacca A., Khalilpour S., Melzi G., Martinelli G., Dell'Agli M. (2019): Cannabis sativa L. extract and cannabidiol inhibit in vitro mediators of skin inflammation and wound injury. *Phytotherapy Research* **33**, 2083-2093.
- Sarfraz S., Adhami V. M., Syed D. N., Afaq F., Mukhtar H. (2008): Cannabinoids for cancer treatment: Progress and promise. *Cancer Research* **68**, 339-342.
- Sayre R. M., Agin P.P., LeVee G. J., Marlowe E. (1979): A comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens formulas. *Photochemistry and Photobiology* **29**, 559–566.
- Seebode C., Lehmann J., Emmert S. (2016): Photocarcinogenesis and skin cancer prevention strategies. *Anticancer Research* **36**, 1371–1378.
- Shacter E. (2000): Protein oxidative damage. *Methods in Enzymology* **319**, 428-436.
- Shetty S., Gokul S. (2012): Keratinization and its disorders. *Oman Medical Journal* **27**, 348–57.
- Shindo Y., Witt E., Han D., Epstein W., Packer L. (1994): Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidant and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. *Journal of Investigative Dermatology* **102**, 470–475.
- Scharffetter-Kochanek K., Wlaschek M., Brenneisen P., Schauen M., Blaudschun R., Wenk J. (1997): UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Journal of Biological Chemistry* **378**, 1247-57.
- Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**, 671-5.
- Schwartz M., Böckmann S., Hinz B. (2018): Up-regulation of heme oxygenase-1 expression and inhibition of disease-associated features by cannabidiol in vascular smooth muscle cells. *Oncotarget* **9**, 34595-34616.
- Silverberg J. I., Jagdeo J., Patel M., Siegel D., Brody N. (2011): Green tea extract protects human skin fibroblasts from reactive oxygen species induced necrosis. *Journal of Drugs in Dermatology* **10**, 1096–1101.

- Sinha R. P., Häder D. P. (2002): UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical and Photobiological Sciences* **1**, 225-36.
- Sirikantaramas S., Taura F., Morimoto S., Shoyama Y. (2007): Recent advances in Cannabis sativa research: biosynthetic studies and its potential in biotechnology. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **8**, 237–243.
- Situm M., Bulat V., Majcen K., Dzapo A., Jezovita J. (2014): Benefit of controlled ultraviolet radiation in the treatment of dermatological diseases. *Collegium Antropologicum* **38**, 1249–1253.
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**, 76–85.
- Srisook K., Kim C., Cha Y. N. (2005): Molecular mechanisms involved in enhancing HO-1 expression: de-repression by heme and activation by Nrf2, the “one-two” punch. *Antioxidants and Redox Signaling* **7**, 1674–1687.
- Stahl W., Sies H. (2002): Carotenoids and Protection against Solar UV Radiation. *Skin Pharmacology and Physiology* **15**, 291–296.
- Stoddart M. J. (2011): Cell Viability Assays: Introduction. In: *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*. (Stoddart M. J. ed.), Humana Press, New York City, U.S.A., 1-6.
- Stout J. M., Boubakir Z., Ambrose S. J., Purves R.W., Page J.E. (2012): The hexanoyl-CoA precursor for cannabinoid biosynthesis is formed by an acyl-activating enzyme in Cannabis sativa trichomes. *The Plant Journal* **71**, 353–65.
- Svobodová A., Vostálová J. (2010): Solar radiation induced skin damage: review of protective and preventive options. *International Journal of Radiation Biology* **86**, 999-1030.
- Szepietowski J. C., Szepietowski T., Reich A. (2005): Efficacy and tolerance of the cream containing structured physiological lipids with endocannabinoids in the treatment of uremic pruritus: a preliminary study. *Acta Dermatovenerologica Croatica* **13**, 97.
- Tham M., Yilmaz O., Alaverdashvili M., Kelly M. E. M., Denovan-Wright E. M., Laprairie R. B. (2018): Allosteric and orthosteric pharmacology of cannabidiol and cannabidiol-dimethylheptyl at the type 1 and type 2 cannabinoid receptors. *British Journal of Pharmacology* **176**, 1455-1469.
- Van Kuijk F. J. G. M., Sevanian A., Handelman G. J., Dratz E. A. (1987): A new role for phospholipase A2: protection of membranes from lipid peroxidation damage. *Trends in Biochemical Sciences* **12**, 31-34.
- Vendemiale G., Grattagliano I., Altomare E. (1999): An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *International Journal of Clinical and Laboratory Research* **29**, 49–55.
- Wilkinson J. D., Williamson E. M. (2007): Cannabinoids inhibit human keratinocyte proliferation through a non-CB1/CB2 mechanism and have a potential therapeutic value in the treatment of psoriasis. *Journal of Dermatological Science* **45**, 87-92.
- Wood C., Murphy E. (2000): Sunscreens efficacy. *Global Cosmetic Industry* **167**, 38-44.
- Yaar M., Eller M.S., Gilchrist B.A. (2002): Fifty years of skin aging. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* **7**, 51-8.
- Yamamoto J., Shimizu K., Kanda T., Hosokawa Y., Iwai S., Plaza P., Müller P. (2017): Loss of Fourth Electron-Transferring Tryptophan in Animal (6-4) Photolyase Impairs DNA Repair Activity in Bacterial Cells. *Biochemistry* **56**, 5356–5364.
- Yin H., Xu L., Porter N. A. (2011): Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews* **111**, 5944–5972.
- Yoshida T., Oka S.-I., Masutani H., Nakamura H., Yodoi J. (2003): The role of thioredoxin in the aging process: involvement of oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling* **5**, 563-570.
- Zhong J. L., Edwards G. P., Raval C., Li H., Tyrrell R. M. (2010): The role of Nrf2 in ultraviolet A mediated heme oxygenase 1 induction in human skin fibroblasts. *Photochemical and Photobiological Science* **9**, 18–24.
- Zurier R. B., Burstein S. H. (2016): Cannabinoids, inflammation, and fibrosis. *The FASEB Journal* **30**, 3682–3689.

8. Zoznam použitých skratiek

$^1\text{O}_2$	singletový kyslík
AA	akrylamid
AAE1	acyl-Coa-syntetáza
AC	adenylátcykláza
Ac-DEVD-AMC	N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metylkumarín
Ac-DEVD-CHO	N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-CHO
AEA	anandamid
APS	peroxodisíran amónny
ARE	element antioxidačnej odpovede
BCA	kyselina bicinchoninová
BSA	hovädzí sérový albumín
Casp-3	kaspáza-3
Cat	kataláza
CB	kanabinoidný receptor
CBC	kanabichromen
CBCA	kyselina kanabichromenová
CBD	kanabidiol
CBDA	kyselina kanabidiolová
CBG	kanabigerol
CBGA	kyselina kanabigerolová
CBGV	kanabigerivarín
CBN	kanabinol
CoQ	koenzým Q

CSE	etanolický extrakt konope siatej
DMEM	Dulbecco's modified Eagle médium
DMSO	dimetylsulfoxid
DTT	ditiotreitól
ECS	endokanabinoidný systém
EGTA	kyselina etylénglykol-di-(2-aminoethylether)- tetraoctová
FBS	fetálne hovädzie sérum
GPP	geranyldifosfát
GPx	glutatiónperoxidáza
GPx	glutatiónperoxidáza
GR	glutatiónreduktáza
GSH	glutatión
GSSG	glutatióndisulfid
GST	glutatión-S-transferáza
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-etánsulfonová
Ho-1	hemoxygenáza-1
IR	infračervené žiarenie
Keap-1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LDH	laktátdehydrogenáza
LOO [•]	lipidové peroxylové radikály
MAPK	mitogénom aktivovaná proteín kináza
MED	minimálna erytémová dávka
NFκβ	jadrový faktor κβ

NHDF	normálne ľudské dermálne fibroblasty
NQO1	NAD(P)H chinón:oxidoreduktáza-1
Nrf-2	transkripčný faktor NF-E2-related factor 2
$O_2^{\bullet -}$	superoxidový radikál
OLA	kyselina olivetolová
PIF	fotoiritačný faktor
PKS	polyketidsyntáza
PNC	penicilín
PUFA	polynenasýtené mastné kyseliny
PVDF	polyvinylidénfluorid
RF	relatívna fluorescencia
ROS	reaktívne formy kyslíka
SOD	superoxiddismutáza
SPF	faktor ochrany pred slnečným žiarením
STR	streptomycín
TBS	Tris tlmený fyziologický roztok
TBS/T	Tris tlmený fyziologický roztok s tweenom
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin
THC	tetrahydrokanabinol
THCA	kyselina Δ^9 – tetrahydrokanabinolová
THCV	tetrahydrokanabivarin
TPx	tioredoxínperoxidáza
Tris	tris(hydroxymetyl)aminometán (Tris)
TRPV1	kanál prechodného receptorového potenciálu

Trx

tioredoxín