

**Kanabidiol modifikuje tvorbu NET v neutrofiloch
psoriatických pacientov**

(Vol'ný preklad)

Autori:

Piotr Wójcik, Marzena Garley, Adam Wroński, Ewa Jabłońska, Elżbieta Skrzydlewska

Publikované:

Online 16.9.2020

Originálny článok dostupný na:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7554718/>

Kanabidiol modifikuje tvorbu NET v neutrofiloch psoriatických pacientov

Abstrakt

Psoriáza je spojená so zvýšenou produkciou reaktívnych foriem kyslíka, čo vedie k oxidačnému stresu. Keďže antioxidanty môžu poskytnúť ochranu, cieľom tejto štúdie bolo vyhodnotiť účinky kanabidiolu (CBD) na tvorbu extracelulárnej pasce neutrofilov (NET) u psoriatických a zdravých neutrofilov. Dôležité markery NETózy boli merané u zdravých a psoriatických neutrofilov po inkubácii s CBD, lipopolysacharidom (LPS) a LPS + CBD. Percento neutrofilov podstupujúcich NETózu a hladina markerov NETózy (cfDNA, MPO, elastáza) boli vyššie v neutrofiloch a krvnej plazme psoriatických pacientov v porovnaní s kontrolami. Po liečbe LPS sa vo vzorkách od zdravých jedincov a pacientov so psoriázou zvýšili všetky markery NETózy, okrem elastázy a p47 a citrulinovaných histónov. CBD znížilo koncentrácie markerov NETosis. To viedlo k zníženiu NETózy, ktorá bola výraznejšia u psoriatických neutrofilov a neutrofilov liečených LPS u psoriatických aj zdravých účastníkov. Tieto výsledky naznačujú, že neutrofilové psoriatických pacientov sú vystavené vyššiemu riziku NETózy in vitro aj in vivo. CBD znižuje NETózu, hlavne u psoriatických neutrofilov, pravdepodobne vďaka svojim antioxidantným vlastnostiam. Anti-NET vlastnosti CBD naznačujú pozitívny účinok CBD pri liečbe autoimunitných ochorení. CBD znižuje NETózu, hlavne u psoriatických neutrofilov, pravdepodobne vďaka svojim antioxidantným vlastnostiam. Anti-NET vlastnosti CBD naznačujú pozitívny účinok CBD pri liečbe autoimunitných ochorení. CBD znižuje NETózu, hlavne u psoriatických neutrofilov, pravdepodobne vďaka svojim antioxidantným vlastnostiam. Anti-NET vlastnosti CBD naznačujú pozitívny účinok CBD pri liečbe autoimunitných ochorení.

Kľúčové slová: psoriáza, liečba kanabidiolom, pasce neutrofilov, NET, imunita

1. Úvod

Psoriáza je najčastejším autoimunitným ochorením a je zvyčajne spôsobená patologickými interakciami medzi lymfocytmi a keratinocytmi v kožnom epiteli [1]. Cytokíny produkované lymfocytmi sprostredkujú tieto interakcie. Je známe, že niekoľko cytokínov je dôležitých v patogenéze psoriázy. Interferón gama (IFN γ) zvyšuje proliferáciu keratinocytov a aktivuje ďalšie imunitné bunky [2 , 3] a interleukín-22 (IL-22) je zodpovedný za zvýšenú proliferáciu keratinocytov [4]. Tumor nekrotizujúci faktor alfa (TNF α) [5] a interleukín 17 (IL-17) stimulujú produkciu chemoatraktantov v keratinocytoch. Chemoatraktanty (hBD2, S100A9, S100A7, S100A, CCL20) zvyšujú migráciu leukocytov do epitelu, čo vedie k zápalu. Inhibítory TNF α a IL-17 sa používajú ako terapeutiká na psoriázu, čo dokazuje dôležitosť týchto cytokínov v patogenéze [6 , 7].

Zvýšený zápal a nadmerná proliferácia keratinocytov vedie k charakteristickej kožnej zmene nazývanej psoriatický plak. Psoriatické plaky môžu viesť k psychologickým a sociologickým problémom, ktoré majú silne negatívny vplyv na kvalitu života pacienta. Hoci sa psoriáza často spája ako ochorenie kože, môže spôsobiť systémové problémy [1]. Zvýšená produkcia cytokínov môže tiež nadmerne aktivovať cirkulujúce lymfocyty a neutrofilové prítomné v krvi [7 , 8]. Ukázalo sa tiež, že psoriatické granulocyty sa vyznačujú vyššou produkciou cytokínov a reaktívnych foriem kyslíka (ROS) v porovnaní so zdravými

jedincami [8]. U neutrofilov môže nadmerná produkcia ROS indukovaná NADPH oxidázou viesť k procesu nazývanému NETóza [9].

Už skôr sa ukázalo, že počas NETózy sa antimikrobiálne proteíny, ako je myeloperoxidáza (MPO), neutrofilná elastáza a katepsín G, uvoľňujú do cytoplazmy z azurofilných granúl v neutrofiloch a že ich obsahujú aj NET [9]. MPO využíva superoxydy a peroxid vodíka generované počas oxidačného výbuchu na výrobu kyseliny chlórnej a iných reaktívnych oxidantov. Neutrofilná elastáza migruje do jadra, kde degraduje proteíny, ktoré sú potrebné na udržanie chromatinovej štruktúry, ako sú históny H1, čo vedie k dekondenzácii chromatínu [10]. Súčasne ostatné históny (H2A, H3, H4) podliehajú citrulinácii peptidylarginín deiminázou 4 a dochádza k narušeniu jadrovej membrány. Keď sa chromatín uvoľní do cytoplazmy, je napadnutý antimikrobiálnymi proteínmi produkovanými vyššie uvedenými neutrofilmi. Nakoniec sa naruší bunková membrána a vytvoria sa neutrofilné extracelulárne pasce (NET) [11]. Tieto pasce sú generované z extracelulárnej DNA spojenej s antimikrobiálnymi proteínmi pochádzajúcimi z neutrofilných granúl a majú formu siete. Pasce viažu a ničia patogény. Je to možné, pretože bakteriálne bunky priľnú k DNA a NET v skutočnosti obmedzujú ich šírenie. Podobný mechanizmus sa pozoruje aj v iných leukocytoch, keďže eozinofily, bazofily, žirne bunky a monocyty sú tiež schopné tvoriť NET [12, 13, 14]. Zvýšená NETóza sa často pozoruje pri iných autoimunitných ochoreniach okrem psoriázy vrátane systémového lupus erythematosus (SLE) a reumatickej artritídy [12, 15]. Keďže tvorba extracelulárnych pascí vedie k uvoľneniu všetkých molekúl a proteínov obsiahnutých v bunkách, vrátane rôznych cytokínov, NETóza môže byť silným induktorom prozápalovej odpovede pri autoimunitných ochoreniach. Napríklad pri psoriáze sa pozoruje, že neutrofilové bunky sú najviac IL-17 pozitívne infiltrujúce bunky kože, čo naznačuje, že môžu byť dôležitým zdrojom tohto a iných cytokínov [15].

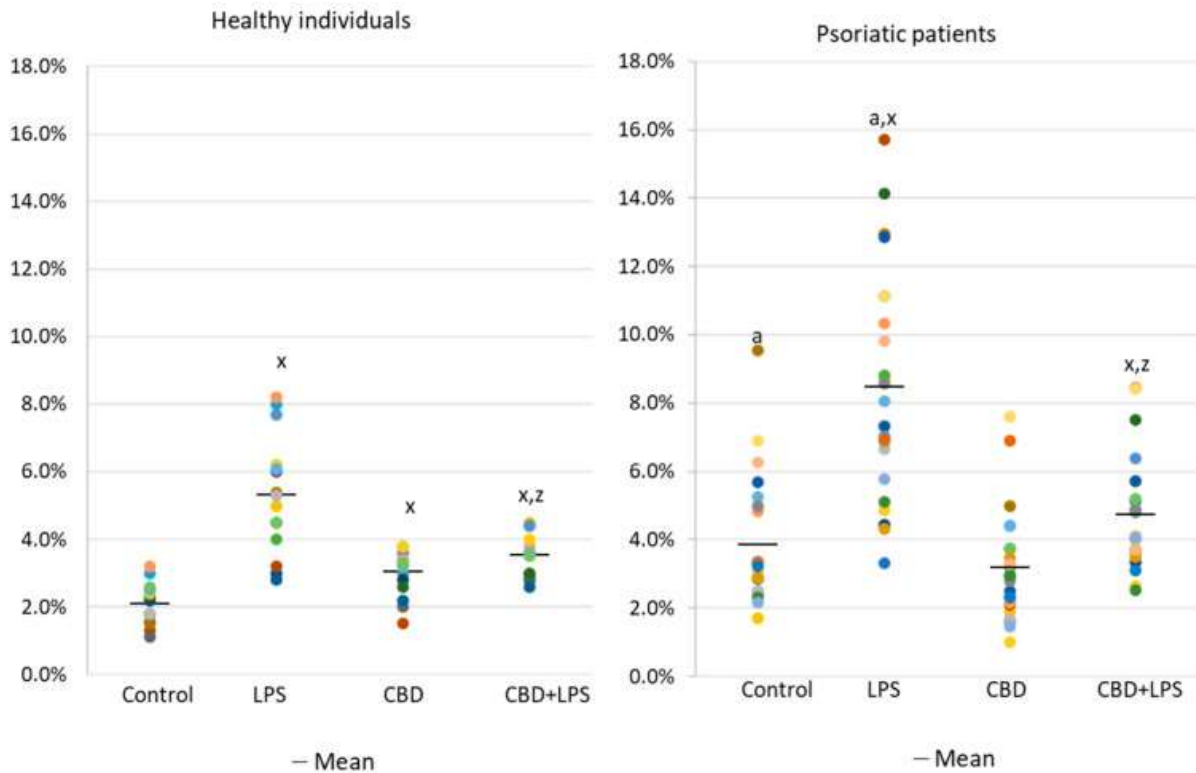
Keďže neutrofilové bunky, podobne ako iné leukocyty pri psoriáze, sú neustále nadmerne aktivované v dôsledku prozápalových stavov, môžu byť vystavené väčšiemu riziku rôznych procesov vrátane NETózy. Tieto bunky môžu byť obzvlášť citlivé na NETózu, pretože psoriáza zvyšuje expresiu IL-17, ktorý je silným aktivátorom NETózy [15]. Preto modulácia funkcie neutrofilov môže byť sľubnou liečbou psoriázy, pretože súčasné terapie sú zvyčajne neúčinné alebo vyvolávajú vážne vedľajšie účinky. Protilátkové terapie psoriázy sú veľmi drahé, preto sa používajú len v najvážnejších prípadoch. Preto sa hľadajú nové zlúčeniny, najmä prírodného pôvodu, ako potenciálne liečivá pri liečbe psoriázy.

Zdá sa, že jedným z potenciálnych kandidátov na terapeutické pôsobenie je kanabidiol (CBD) – fytokanabinoid nachádzajúci sa v Cannabis Sativa L., ktorý nemá psychoaktívny účinok, ale je protizápalovou a antioxidantnou zlúčeninou a jeho použitie preukázalo pozitívny účinok na psoriatickú pokožku. bunky [16, 17]. Keďže je známe, že CBD môže znižovať aktivitu neutrofilov a produkciu ROS v ňom [18, 19], jeho priaznivý účinok môže byť, aspoň čiastočne, spôsobený oslabením neutrofilov infiltrujúcich kožu. Zabránením produkcie ROS môže CBD pôsobiť ako inhibítor NETózy.

Cieľom tejto štúdie bolo preto vyhodnotiť rozdiely v tvorbe NETózy medzi neutrofilmi získanými od pacientov so psoriázou a zdravých kontrolných jedincov s kanabidiolom. Okrem toho sa účinnosť kanabidiolu hodnotila v reakcii na pôsobenie silného aktivátora NETózy – lipopolysacharidu (LPS).

Výsledky

Výsledky ukazujú, že percento nestimulovaných neutrofilov podstupujúcich NETózu bolo vyššie v kohorte psoriasis vulgaris ako u zdravých kontrolných jedincov (postava 1). Inkubácia s LPS, známym aktivátorom NETózy, zvýšila počet neutrofilov podstupujúcich NETózu v oboch skupinách, hoci koncentrácia NETózy bola vyššia v kohorte s psoriázou. Liečba CBD nespôsobila významný pokles počtu NETotic buniek v porovnaní s neliečenými. Na rozdiel od toho aktivácia neutrofilov pomocou LPS v spojení s CBD významne znížila percento neutrofilov podstupujúcich NETózu v porovnaní s liečbou samotným LPS.



Neutrofilý podstupujúce NETózu vykazujú metabolické zmeny v týchto bunkách, hodnotené úrovňou rôznych parametrov. Produkcia p47 podjednotky prooxidačnej NADPH oxidázy, zodpovednej za tvorbu superoxidových radikálov, je po podaní LPS výrazne zvýšená, najmä v neutrofiloch psoriatických pacientov (Obrázok 2). V tomto prípade sa zdá, že CBD zvyšuje produkciu p47 v neutrofiloch liečených LPS zdravých jedincov, ale neovplyvňuje produkciu neutrofilov psoriázy. U neutrofilov liečených iba CBD sa u psoriatických pacientov pozoroval pokles produkcie p47. Stručne povedané, výsledky naznačujú, že CBD môže pôsobiť ako aktivátor prooxidačného NADH neutrofilov u zdravých ľudí, ale nezosilňuje už existujúce prooxidačné stavy v neutrofiloch od pacientov so psoriázou.

Na rozdiel od p47 sa MPO uvoľňuje z bunky počas NETózy, a preto sa hodnotí skôr v supernatantoch než intracelulárne (Obrázok 3). Keďže MPO je jedným z dôležitých markerov NETózy, vyššia koncentrácia neutrofilov v supernatantoch získaných od pacientov so psoriázou a v bunkách liečených LPS naznačuje zvýšenú NETózu v týchto skupinách. Na druhej strane, v prípade buniek ošetrených CBD je hladina MPO nižšia, čo môže inhibovať tvorbu kyseliny chlórnej a naznačovať pokles NETózy. Okrem toho má CBD anti-NETotický účinok v bunkách ošetrených LPS.

Zmeny v tvorbe alebo aktivite prooxidačných proteínov pri NETóze sú tiež sprevádzané histónovou citrulináciou (Obrázok 4). V tomto prípade LPS viedol k aktivácii NETózy, čo malo za následok zvýšenú expresiu citrulinovaných H3-histónov. Na druhej strane CBD vykazovalo anti-NETotické vlastnosti, najmä vo vzťahu k psoriatickým a LPS-aktivovaným neutrofilom.

Zvýšená produkcia neutrofilnej elastázy je nevyhnutná pre NETózu a produkcia elastázy bola oveľa väčšia u neutrofilov pacientov so psoriázou ako u zdravých jedincov, čo naznačuje zvýšenú aktiváciu NETózy. Zdá sa, že CBD má protizápalový účinok, pretože vedie k zníženiu produkcie elastázy v neutrofiloch pacientov so psoriázou. Preto možno predpokladať, že CBD znižuje účinok LPS na neutrofilov v plakoch (Obrázok 5).

Keďže pôsobenie opísaných enzýmov vedie v konečnom dôsledku k uvoľneniu DNA, cfDNA je jedným z najspoľahlivejších markerov NETózy. V tejto štúdii bolo pozorované zvýšenie koncentrácie cfDNA v supernatantoch získaných po inkubácii neutrofilov od pacientov so psoriázou, ako aj po inkubácii neutrofilov s LPS. Na druhej strane, CBD vedie k zníženiu hladín cfDNA, čo naznačuje, že účinok CBD na neutrofilov v konečnom dôsledku znižuje NETózu (Obrázok 6).

Keďže intenzita NETózy závisí od aktivity neutrofilov, môže závisieť aj od závažnosti psoriázy. Korelácie medzi indexom závažnosti psoriázy (PASI) – najdôležitejším markerom používaným v klinickej praxi na hodnotenie psoriázy – a in vitro markermi NETózy ukazujú, že vo väčšine prípadov závažnosť psoriázy koreluje so závažnosťou ochorenia (Obrázok 7). Okrem toho sa pozorovalo, že korelácie sú stále jasné aj po podaní LPS alebo CBD v prípade percenta neutrofilov podstupujúcich NETózu a hladiny MPO. Naopak hladina cfDNA koreluje s neutrofilmi stimulovanými LPS a LPS + CBD.

Ako bolo spomenuté, MPO aj cfDNA sú externalizované mimo bunky, preto ich možno merať aj priamo v krvnej plazme a hladina týchto parametrov môže naznačovať zosilnenie NETózy. Testy ELISA ukázali, že koncentrácie cfDNA a MPO sú významne vyššie u psoriatických pacientov ako u zdravých jedincov, čo naznačuje zvýšenie NETózy u týchto pacientov (Obrázok 8).

Diskusia

V súčasnosti sa verí, že psoriáza je ochorenie modulované hlavne lymfocytmi, najmä T lymfocytmi. Neutrofilov však tvoria najväčšiu skupinu leukocytov a zmeny v ich metabolizme a funkcii, ako je vyššia generácia ROS počas aktivácie, zvýšená produkcia cytokínov a tendencia podstupovať NETózu, silne ovplyvňujú systémové funkcie, čo z nich robí dôležité faktory patofyziológie rôznych autoimunitných ochorení [20 , 21]. Preto si granulocyty získavajú väčšiu pozornosť ako dôležití hráči v rozvoji psoriázy. Už skôr sa zistilo, že aktivované granulocyty v podmienkach oxidačného stresu produkujú vyššie množstvá cytokínov nielen v koži, ale aj v krvi pacientov so psoriázou.1]. Navyše sa ukázalo, že neutrofilov sa podieľajú na tvorbe kožných lézií počas rozvoja psoriázy [8 , 9].

Doterajšia literatúra uvádza, že zvýšená aktivita NADPH oxidázy a xantínoxidázy bola pozorovaná v celej populácii granulocytov u pacientov so psoriázou, čo môže naznačovať oveľa väčší oxidačný efekt v týchto bunkách [8]. V neutrofiloch aktivácia zvyšuje produkciu NADPH oxidázy, ktorá vytvára superoxidové radikály, prvé reaktívne formy kyslíka, ktoré sa ďalej metabolizujú na peroxid vodíka a môžu sa premeniť na kyselinu chlórnu pomocou MPO alebo na hydroxylový radikál vo Fentonovej reakcii, čím sa podporuje tvorba oxidačného vzplanutia [22 , 23 , 24]. Koncentrácia týchto enzýmov koreluje s intenzitou NETózy [25]. Náš výskum potvrdzuje toto predchádzajúce pozorovanie, pretože v neutrofiloch pacientov so psoriázou sú pozorované zvýšené hladiny NADPH oxidázy a MPO, najmä ak sú aktivované LPS. Zvýšenie expresie vyššie uvedených prooxidačných enzýmov je sprevádzané vyšším

percentom neutrofilov podstupujúcich NETózu, ktoré sme pozorovali u psoriatických a LPS-aktivovaných neutrofilov. To je v súlade s výsledkami z predchádzajúcich štúdií, ktoré ukázali vyššie percento NETotických buniek pri psoriáze [26]. To tiež podporuje všeobecné pozorovanie, že pri autoimunitných ochoreniach vedie zvýšená aktivácia neutrofilov k zvýšenej NETóze [27 , 28]. Okrem toho sme pozorovali, že percento buniek podstupujúcich NETózu a hladiny MPO koreluje so závažnosťou psoriázy, odhadnutou indexom PASI a tieto korelácie sa pozorujú v prípade stimulovaných a nestimulovaných buniek. To ukazuje, že psoriatické bunky sú náchylnejšie na NETózu a tento trend sa zvyšuje so závažnosťou psoriázy. Vzhľadom na menšie korelácie v bunkách aktivovaných LPS to môže naznačovať, že neutrofilové v najťažších prípadoch psoriázy sú tak stimulované, že dodatočné použitie aktivačných činidiel má o niečo menší vplyv na ich tendenciu podstupovať NETózu.

Za normálnych fyziologických podmienok sa zvyčajne používa zvýšená hladina ROS na elimináciu patogénov, ale pri autoimunitných ochoreniach vedie chronická aktivácia neutrofilov k kontinuálnej nadprodukcii ROS. Táto nadprodukcia prispieva k oxidatívnej modifikácii bunkových zložiek vrátane antioxidantov (vitamíny A, C, E, tioredoxín, glutatión, tioredoxínreduktáza a glutatiónperoxidáza) a k zníženiu ich biologickej účinnosti. V dôsledku toho je oxidačný stres dôležitým faktorom v patofyziológii tohto ochorenia [29]. Oxidačný stres podporuje aj ďalšie metabolické zmeny, vrátane zvýšenia produkcie prozápalových cytokínov, ktoré sme my a iní autori predtým pozorovali v granulocytoch pacientov so psoriázou [8 , 29 , 30]. Okrem toho môže ROS reagovať s lipidmi, proteínmi a nukleovými kyselinami za účelom modifikácie ich štruktúry a funkcií a bol pozorovaný s proteínmi a lipidmi v psoriatických krvinkách [7 , 8 , 29 , 31]. Predpokladá sa, že tento typ účinku vedie k exacerbácii symptómov ochorenia [8].

Rozsiahle oxidačné modifikácie môžu dokonca viesť k apoptóze alebo nekróze. Okrem toho sú produkty aktivácie MPO dôležitými regulátormi uvoľňovania neutrofilnej elastázy z granúl, ako ukazuje nedostatok MPO spôsobuje, že neutrofilová elastáza sa neuvolňuje [23]. V našej štúdii boli pozorované vyššie koncentrácie neutrofilnej elastázy v nestimulovaných neutrofiloch od pacientov so psoriázou, čo potvrdzuje vyššie hladiny aktivácie v týchto bunkách počas vývoja ochorenia. Naopak, neutrofilové liečené LPS vykazovali zvýšené hladiny neutrofilnej elastázy u zdravých pacientov, ale nie u pacientov s psoriázou. Ako ukazujú ďalšie markery NETózy, ako aj percento buniek podstupujúcich NETózu, psoriatické neutrofilové tiež podliehajú NETóze po podaní LPS a strata tohto enzýmu je pravdepodobne spôsobená skutočnosťou, že je externalizovaný z bunky.

Neutrofilná elastáza je nevyhnutná pre NETózu, pretože jej pôsobenie vedie k degradácii proteínov jadra zodpovedných za udržiavanie chromatinu v kondenzovanej forme. Históny sa zároveň podieľajú na udržiavaní nukleových kyselín v jadrách, ktoré podliehajú citrulinácii. Tieto aktivity vedú k extracelulárnemu uvoľňovaniu MPO [32] a naša štúdia potvrdzuje uvoľňovanie MPO z neutrofilov. Vyššie hladiny MPO v plazme a bunkových supernatantoch po inkubácii naznačujú, že psoriáza vedie k nadmernej aktivácii neutrofilov a oxidačnému stresu, ako sa uvádza v našej predchádzajúcej práci [8], čo vedie k zosilneniu NETózy. Naopak, v našom výskume sa zistilo, že citrulinácia histónu H3 je vyššia v skupine zdravých ľudí. Môže to byť spôsobené tým, že históny pri psoriáze vykazujú odlišný profil posttranslačnej modifikácie ako u zdravých jedincov [33], ktorí môžu menej podliehať citrulinácii. Okrem toho sa pri tomto ochorení pozoruje nižšia aktivita peptidylarginín deiminázy 1 [34]. Hoci tento izoenzym peptidyl-arginín deiminázy nie je najdôležitejším faktorom pri NETóze, jeho nižšia aktivita môže čiastočne znižovať expresiu citrulinovaných histónov. Preto je konečná expresia citrulinovaných

H3 histónov nižšia v psoriatickej skupine. Ďalším potvrdením zvýšenej NETózy je zvýšená hladina cfDNA v supernatantoch získaných po inkubácii neutrofilov od psoriatických pacientov, ako aj v krvnej plazme. Okrem toho sa zistilo, že LPS účinnejšie zvyšuje hladinu cfDNA vo vzťahu k bunkám získaným od pacienta so psoriázou a uvoľňovanie cfDNA koreluje so závažnosťou psoriázy, podobne ako v prípade percenta neutrofilov podstupujúcich NETózu. Keďže NETotické neutrofilové súbory sú zdrojom cytokínov, sú schopné ovplyvniť diferenciačný profil Th lymfocytov do dominancie Th1 alebo Th17 [17, 35], ktoré sú spojené so psoriázou [6]. Okrem toho, keďže Th17 sú zdrojom IL-17, silného aktivátora NETózy [36], môže to viesť k pozitívnej slučke, v ktorej NET zvyšujú dominanciu Th17 a Th17 zvyšuje NETózu pri psoriáze.

Keďže cytokíny produkované neutrofilmi a lymfocytmi môžu reagovať s rôznymi bunkami, môže to vysvetliť, prečo NET zvyšujú produkciu antibakteriálnych proteínov pri psoriáze [26]. Preto možno naznačiť, že NET môžu byť dôležitými faktormi vo vývoji psoriázy, najmä preto, že LPS, ktorý je podobne ako imiquimod agonistom TLR4 [37], ktorý spôsobuje silnú aktiváciu NETózy [38, 39]. Napriek tomu, keďže sa predpokladá, že pri psoriáze nie sú patologické autoprotilátky rozhodujúce a dôležitejší je vplyv NET na Th lymfocyty, najmä na diferenciáciu. Je známe, že mutácie v DNAáze 1, jednej z najdôležitejších nukleáz zodpovedných za degradáciu chromatinu, vedú k zhoršenej degradácii NET a sú spojené s autoimunitnými ochoreniami [40].

Okrem toho sa zistilo, že NET zhoršujú priebeh ochorenia v myšom modeli tohto ochorenia indukovaného imiquimodom, pretože purifikované NET aktivujú cytokínovú kaskádu, čo vedie k zvýšenej infiltrácii imunitných buniek do kože, čo vedie k exacerbácii zápalu podľa meraní hladinami prozápalových molekúl [41]. Keďže tento model je bežný a často používaný vo výskume psoriázy, tieto výsledky silne naznačujú, že NETóza tiež koreluje so závažnosťou zápalu u psoriatických pacientov. Navyše inhibícia peptidylarginín deiminázy 4, kľúčového enzýmu v procese histónovej citrulinácie, a teda NETózy, vedie k zlepšeniu stavu kože na myšom modeli [35]. Keďže tento enzým je kľúčový pri NETóze, ale zdá sa, že má veľmi malý vplyv na iné funkcie neutrofilov, zlepšenie stavu kože v tomto prípade tiež naznačuje, že zvýšená NETóza je dôležitým faktorom, ktorý vedie k exacerbácii symptómov psoriázy. Okrem toho počas NETózy zostáva DNA v kontakte s prooxidačnými enzýmami a výsledné ROS spôsobujú oxidačné modifikácie DNA, čo vedie k tomu, že nukleové kyseliny sú odolné voči nukleázam [42] a NET sa ťažko odstraňujú. To umožňuje NET ovplyvňovať ostatné bunky na dlhú dobu. V dôsledku toho môžu byť terapie založené na inhibícii NETózy tiež účinné pri liečbe psoriázy.

Keďže tvorba NET súvisí s produkciou a biologickou funkciou ROS a psoriáza je sprevádzaná oxidačným stresom, antioxidantné zlúčeniny môžu byť negatívnymi regulátormi NETózy pri tomto ochorení. Preto sme po prvýkrát skúmali CBD ako potenciálny anti-NETotický faktor pri psoriáze. CBD sa vyznačuje širokým spektrom biologickej aktivity, vrátane antioxidantných a protizápalových vlastností, preto sa často študuje na použitie pri prevencii a liečbe chorôb, ktorých rozvoj je spojený s redoxnou nerovnováhou a zápalom [43]. CBD môže regulovať redoxný stav priamo ovplyvňovaním prvkov redoxného systému a/alebo nepriamo interakciou s inými molekulárnymi cieľmi spojenými s redoxným systémom, napr. receptormi viazanými na G proteín [44]. CBD znižuje oxidačné podmienky tým, že bráni tvorbe superoxidových radikálov, generovaných xantínoxidázou a NADPH oxidázou, a chelátovaním iónov prechodných kovov zapojených do Fentonovej reakcie za vzniku extrémne reaktívnych hydroxylových radikálov [45]. CBD tiež zvyšuje hladinu endokanabinooidov, ktoré aktivujú receptory viazané na G proteín (kanabinoidy a TRPV) [46]. V tejto štúdii inkubácia CBD znížila hladiny

NADPH oxidázy a MPO a následne znížila NETózu najmä u psoriatických neutrofilov. CBD však tiež znižuje koncentrácie MPO a NETózu v neutrofiloch získaných od zdravých jedincov. To naznačuje inhibíciu prooxidačných enzýmov (NADPH oxidáza a MPO) prostredníctvom CBD a následne zníženú NETózu.

Okrem toho CBD inhibuje, aspoň čiastočne, zmeny v produkcii prooxidačných enzýmov závislé od LPS a následne NETózu, o čom svedčia nižšie hladiny cfDNA a percento NETotických buniek. Toto priame pôsobenie CBD je podporované známou moduláciou bunkovej antioxidačnej aktivity [44]. Antioxidačný účinok CBD je spojený aj s aktiváciou redox-senzitívneho transkripčného faktora Nrf2, ktorý je zodpovedný za biosyntézu cytoprotektívnych proteínov vrátane antioxidantov, ako aj ochranu neenzymatických aj enzymatických bunkových antioxidantov [47]. V dôsledku toho CBD zabraňuje oxidačným modifikáciám bunkových komponentov, pričom hrá dôležitú úlohu vo fungovaní NFκB, ďalšieho redox-senzitívneho transkripčného faktora. V dôsledku toho sa CBD môže podieľať na regulácii patologických stavov charakterizovaných ako redoxnými nerovnováhami, tak zápalmi, ako je psoriáza [8 , 31 , 48]. Napriek tomu väčšina markerov NETózy (úroveň MPO a NETotických buniek) napriek pridaniu CBD (v podmienkach in vitro) stále koreluje so závažnosťou ochorenia. To naznačuje, že hoci pôsobenie kanabidiolu vedie k silnému zníženiu hladiny týchto markerov pri psoriáze, stále nie je schopné úplne eliminovať prozápalový fenotyp neutrofilov pri psoriáze, najmä v najzávažnejších prípadoch.

Pretože regulácia bunkovej redoxnej rovnováhy je závislá aj od endokanabinoidného systému, pôsobenie tohto fyto-kanabinoidu podporuje biologickú aktivitu tohto systému. CBD sa ukázalo ako aktivátor endokanabinoidnej signalizácie [49], ktorá zahŕňa interakciu s membránovými receptormi, ako sú kanabinoidné (CB1 a CB2), G proteín-coupled receptor 55 (GPR55), ionotropné (TRP) a jadrové (PPAR) receptory, ktoré podieľajú sa na modulácii redoxnej rovnováhy a zápalových stavov [50 , 51]. Keďže receptory CB2, prevládajúce v imunitných bunkách, zabraňujú tvorbe ROS a prozápalových cytokínov, kanabinoidy sa považujú za antioxidačné a protizápalové látky [52 , 53].

V skutočnosti lokálna terapia psoriázy s CBD vykazuje pozitívny účinok a vedie k zmierneniu kožných symptómov ochorenia [17]. Podľa súčasných poznatkov o pôsobení CBD môže byť tento účinok sprostredkovaný schopnosťou posunúť Th diferenciáciu na Th2 lymfocyty [54]. V iných modeloch chorôb CBD tiež vykazuje pozitívny vplyv a inhibuje nábor neutrofilov [55 , 56], ale nie je známe, či CBD reaguje s neutrofilmi priamo, alebo či sú tieto zmeny spôsobené protizápalovými vlastnosťami CBD pôsobiacimi na iné bunky. Účinky CBD na neutrofilov neboli doteraz dostatočne študované. Nedávno sa zistilo, že CBD inhibuje migráciu neutrofilov a ich produkciu ROS, pretože predinkubácia neutrofilov s CBD vedie k výrazne nižším hladinám ROS [18]. Ako už bolo spomenuté vyššie, kanabidiol funguje tak, že aktivuje špecifické receptory, v prípade imunitných buniek hlavne prostredníctvom CB2. Štúdie s agonistami CB2 ukazujú, že táto aktivácia receptora vedie aj k zníženiu migrácie neutrofilov, ale vplyv tohto receptora na produkciu ROS v neutrofiloch ešte nebol študovaný [57]. Podobne aktivácia receptora GPR55 prítomného na neutrofiloch vedie k zníženiu produkcie ROS, ako aj k degranulácii [58]. Na druhej strane, v predchádzajúcich štúdiách CBD nepreukázalo vplyv na životaschopnosť neutrofilov [18] a jeho účinok na NETózu nebol analyzovaný. V tu prezentovanej štúdii naše výsledky ukazujú, že CBD znižuje rýchlosť NETózy v neutrofiloch a tiež produkciu väčšiny markerov NETózy. Navyše v prípade psoriázy môže mať CBD pozitívny vplyv nielen na samotnú NETózu, ale keďže CBD pôsobí ako protizápalový faktor, môže inhibovať aktiváciu dendritických buniek,

lymfocytov a môže spôsobiť posun Th lymfocytov na Th2, čím pôsobí opačným spôsobom ako NET, ktoré tieto bunky aktivujú a vedú k polarizácii na Th1 a Th17 [17, 35, 54, 59]. U neutrofilov od zdravých jedincov CBD vykazuje nižší účinok ako u psoriatických neutrofilov. Môže to byť spôsobené tým, že v psoriatických neutrofiloch je zvýšená produkcia CB2 receptora, ktorý je zodpovedný za protizápalové účinky CBD [8], čo potenciálne vysvetľuje, prečo sa kanabidiol môže výraznejšie podieľať na ochrane týchto buniek. .

Naše výsledky potvrdili, že psoriatické neutrofily sú náchylnejšie na NETózu ako neutrofily od zdravých jedincov, čo môže byť spôsobené prooxidačnými stavmi a rôznymi profilmi receptorov, ktoré sú spojené so psoriázou. Preto má použitie CBD pozitívny účinok a znižuje NETózu u psoriatických neutrofilov. Tento mechanizmus môže aspoň čiastočne zodpovedať za pozitívny účinok CBD na pacientov s psoriázou, ktorý bol predtým pozorovaný in vivo.

Materiály a metódy

Do štúdie bolo vybraných 28 pacientov (15 žien a 13 mužov, priemerný vek 40 rokov) s diagnózou psoriasis vulgaris počas najmenej 6 mesiacov a s najmenej 10 % postihnutého celkového povrchu tela. Závažnosť psoriázy sa hodnotila pomocou indexu závažnosti psoriázy (PASI), ktorý sa vypočítal podľa závažnosti začervenania, hrúbky a šupinatosti epidermy, váženej podľa oblasti postihnutia a priemerná hodnota tohto indexu bola 16,3 [60]. Kontrolnú skupinu tvorilo 14 zdravých jedincov (8 žien a 6 mužov) s priemerným vekom 42,5 roka. Žiadny z pacientov alebo zdravých jedincov nedostával lokálne alebo perorálne lieky počas 4 týždňov pred štúdiou. Do štúdie boli zahrnutí iba jedinci bez akejkoľvek významnej komorbidity (ochorenia pečene, obličiek alebo kardiovaskulárneho systému; rakovina; respiračné poruchy; a cukrovka) a ktorí neboli zneužívateľmi alkoholu alebo fajčiarmi. Štúdia bola schválená Miestnym bioetickým výborom Lekárskej univerzity v Białystoku (Białystok, Poľsko), č. RI-002/289/2017. Od všetkých účastníkov bol získaný písomný informovaný súhlas.

Venózna krv sa odoberala do skúmaviek obsahujúcich kyselinu etyléndiamíntetraoctovú (K3-EDTA) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). (Plazma sa oddelila odstredením (300 x g , 25 minút), pred analýzou sa zhromaždila a uskladnila zmrazená. Na odber neutrofilov sa vzorky krvi centrifugovali cez Polymorphprep™ (300 x g ; 40 minút, 4 °C) (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Nórsko) a frakcie granulocytov a leukocytov sa zhromaždili. Neutrofily sa izolovali z frakcie granulocytov pomocou techniky magneticky aktivovaného triedenia buniek a separátora MidiMACS™ vybaveného LS kolónami a mikrogulôčkami CD16 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Nemecko), podľa pokynov výrobcu. Bunky sa použili ihneď po odbere.

4.1. Liečba a inkubácia buniek

Zobierané neutrofily, ako od zdravých jedincov, tak od psoriatických pacientov, boli suspendované v Hanksovom médiu doplnenom fetálnym bovinným sérom (FBS) (Biomed, Krakov, Poľsko) a boli inkubované pri 37 °C s prietokom 5 % CO₂ počas jednej hodiny. Inkubácie sa uskutočňovali v 96-jamkových platniach a štandardizovali sa tak, aby obsahovali 100 000 buniek v každej jamke na mikroskopickú vizualizáciu a 1 000 000 buniek v každej jamke pre Western bloty a testy ELISA. Boli aplikované nasledujúce liečby:

Kontrola – žiadne ďalšie zlúčeniny

10 ug/ml LPS

10 µg/ml kanabidiolu

10 µg/ml LPS + 10 µg/ml kanabidiolu

Zásobné roztoky LPS a kanabidiolu sa rozpustili v PBS a etanole.

Po inkubácii boli 96-jamkové platne pre Western bloty a ELISA testy centrifugované a supernatant bol odstránený. Bunky a supernatanty sa skladovali pri -80 °C, kým sa nepoužili na Western bloty a test ELISA.

4.2. Vizualizácia a enumerácia

Pred inkubáciou sa pridali FITC konjugované anti-MPO protilátky (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) a Hoechstov roztok na zafarbenie extracelulárneho MPO a jadra, v danom poradí. Zafarbené bunky boli vizualizované pri 100-násobnom zväčšení pomocou fluorescenčného mikroskopu Nikon Eclipse Ti (Nikon, Tokio, Japonsko) vybaveného štandardnými filtrami FITC/TRITC a bunky s charakteristickými zmenami boli označené ako NETotic. Vypočítalo sa percento NETotic buniek v porovnaní s celkovými bunkami.

4.3. Western Blots

Western blot analýza expresie neutrofilného proteínu sa uskutočnila podľa protokolu opísaného v Eissa a Seada [61]. Neutrofilny boli podrobené sonikácii a centrifugácii (15 000 x g, 30 min, 4 °C) na získanie proteínovej frakcie, ktorá sa použila na detekciu špecifických proteínov pomocou western blotu. Proteíny boli elektroforeticky separované na 10% polyakrylamidových géloch, prenesené na nitrocelulózoové membrány (veľkosť pórov 0,2 µm), blokované 5% mliekom počas 1 hodiny (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) a potom štyrikrát premyté TBS. -T buffer. Premyté membrány sa inkubovali cez noc s nasledujúcimi primárnymi protilátkami: monoklonálne proti p47 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), β-aktín (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA), elastáza neutrofilov (Thermo Fisher Scientific, Inc.; Waltham, MA, USA) a králičie polyklonálne proti citrulinovaným histónom H3 (Abcam; Cambridge, MA, USA). Po inkubácii, membrány sa potom štyrikrát premyli TBS-T a inkubovali sa 2 hodiny s kozou polyklonálnou alkalickou fosfatázovou sekundárnou protilátkou (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA). Proteínové pásy sa vizualizovali pomocou systému kvapalného substrátu BCIP/NBT (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA). Na porovnanie koncentrácie proteínov medzi vzorkami bola odhadnutá intenzita každého pásu pomocou systému VersaDoc a softvéru Quantity One (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Výsledky boli vyjadrené ako percento expresie stanovenej v kontrolných bunkách. intenzita každého pásu bola odhadnutá pomocou VersaDoc System

a softvéru Quantity One (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Výsledky boli vyjadrené ako percento expresie stanovenej v kontrolných bunkách. intenzita každého pásu bola odhadnutá pomocou VersaDoc System a softvéru Quantity One (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Výsledky boli vyjadrené ako percento expresie stanovenej v kontrolných bunkách.

4.4. Vyšetrenie koncentrácie MPO

Koncentrácia MPO v bunkových supernatantoch a vzorkách plazmy bola stanovená pomocou komerčnej súpravy ELISA (Quantikine ELISA Human Myeloperoxidase Immunoassay, R&D System, Minneapolis, MN, USA) podľa pokynov výrobcu. Tento test využíva techniku kvantitatívneho sendvičového enzýmového imunotestu s mikroplatňou vopred pokrytou monoklonálnou protilátkou. Koncentrácia MPO bola stanovená spektrofotometricky podľa intenzity zmeny farby vo vzorke [62].

4.5. Vyšetrenie cfDNA

Koncentrácia cfDNA v bunkových supernatantoch a vzorkách plazmy bola tiež stanovená pomocou komerčnej súpravy (Circulating DNA Quantification Kit, Abcam, Cambridge, MA, USA). Táto analýza využíva fluorescenčnú metódu a izoláciu DNA na rotačných kolónach, ktorá využíva metódu extrakcie na pevnej fáze na rýchle čistenie nukleových kyselín. Čistá DNA sa potom inkubuje s testovacím roztokom a meria sa fluorescencia s vlnovou dĺžkou excitácie 480 nm a vlnovou dĺžkou emisie 540 nm [63].

4.6. Štatistiky

Štatistická analýza sa uskutočnila pomocou STATISTICA 13.1 (StatSoft Polska, Krakov, Poľsko). Výsledky boli vyjadrené ako priemer \pm SD. Rozdiely medzi skupinami boli hodnotené pomocou Studentovho testu a hladina štatistickej významnosti bola $p < 0,05$. Korelácie boli hodnotené pomocou Spearmanovho korelačného indexu.

Referencie

1. RENDN A., SCHÄKEL K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:1475. doi: 10.3390/ijms20061475. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
2. Kryczek I., Bruce A.T., Gudjonsson J.E., Johnston A., Aphale A., Vatan L., Szeliga W., Wang Y., Liu Y., Welling T.H., et al. Induction of IL-17+ T cell trafficking and development by IFN- γ : Mechanism and pathological relevance in psoriasis. *J. Immunol.* 2008;181:4733–4741. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
3. Cai Y., Fleming C., Yan J. New insights of T cells in the pathogenesis of psoriasis. *Cell Mol. Immunol.* 2012;9:302–309. doi: 10.1038/cmi.2012.15. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
4. Fujita H. Role of IL-22 in the pathogenesis of skin diseases. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* 2012;35:168–175. doi: 10.2177/jsci.35.168. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

5. Fantuzzi F., Giglio M.D., Gisondi P., Girolomoni G. Targeting tumor necrosis factor α in psoriasis and psoriatic arthritis. *Expert Opin. Ther. Targets*. 2008;12:1085–1096. doi: 10.1517/14728222.12.9.1085. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
6. Chaudhari U., Romano P., Mulcahy L.D., Dooley L.T., Baker D.G., Gottlieb A.B. Efficacy and safety of infliximab monotherapy for plaque-type psoriasis: A randomised trial. *Lancet*. 2001;357:1842–1847. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04954-0. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
7. Wójcik P., Biernacki M., Wroński A., Łuczaj W., Waeg G., Žarković N., Skrzydlewska E. Altered Lipid Metabolism in Blood Mononuclear Cells of Psoriatic Patients Indicates Differential Changes in Psoriasis Vulgaris and Psoriatic Arthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:4249. doi: 10.3390/ijms20174249. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
8. Ambrożewicz E., Wójcik P., Wroński A., Łuczaj W., Jastrząb A., Žarković N., Skrzydlewska E. Pathophysiological Alterations of Redox Signaling and Endocannabinoid System in Granulocytes and Plasma of Psoriatic Patients. *Cells*. 2018;7:159. doi: 10.3390/cells7100159. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
9. Rada B. Neutrophil Extracellular Traps. *Methods Mol. Biol.* 2019;1982:517–528. doi: 10.1007/978-1-4939-9424-3_31. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
10. Papayannopoulos V., Metzler K.D., Hakkim A., Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2010;191:677–691. doi: 10.1083/jcb.201006052. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
11. Remijsen Q., Vanden Berghe T., Wirawan E., Asselbergh B., Parthoens E., De Rycke R., Noppen S., Delforge M., Willems J., Vandenabeele P. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* 2011;21:290–304. doi: 10.1038/cr.2010.150. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
12. Lee K.H., Kronbichler A., Park D.D.-Y., Park Y., Moon H., Kim H., Choi J.H., Choi Y., Shim S., Lyu I.S., et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review. *Autoimmun. Rev.* 2017;16:1160–1173. doi: 10.1016/j.autrev.2017.09.012. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
13. Möllerherm H., von Köckritz-Blickwede M., Branitzki-Heinemann K. Antimicrobial Activity of Mast Cells: Role and Relevance of Extracellular DNA Traps. *Front. Immunol.* 2016;7 doi: 10.3389/fimmu.2016.00265. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
14. Schorn C., Janko C., Latzko M., Chaurio R., Schett G., Herrmann M. Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Front. Immunol.* 2012;3 doi: 10.3389/fimmu.2012.00277. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
15. Lin A.M., Rubin C.J., Khandpur R., Wang J.Y., Riblett M., Yalavarthi S., Villanueva E.C., Shah P., Kaplan M.J., Bruce A.T. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J. Immunol.* 2011;187:490–500. doi: 10.4049/jimmunol.1100123. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
16. Wilkinson J.D., Williamson E.M. Cannabinoids inhibit human keratinocyte proliferation through a non-CB1/CB2 mechanism and have a potential therapeutic value in the treatment of psoriasis. *J. Dermatol. Sci.* 2007;45:87–92. doi: 10.1016/j.jdermsci.2006.10.009. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

17. Palmieri B., Laurino C., Vadalà M. A therapeutic effect of cbd-enriched ointment in inflammatory skin diseases and cutaneous scars. *Clin. Ter.* 2019;170:e93–e99. doi: 10.7417/CT.2019.2116. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
18. Mabou Tagne A., Marino F., Legnaro M., Luini A., Pacchetti B., Cosentino M. A Novel Standardized Cannabis sativa L. Extract and Its Constituent Cannabidiol Inhibit Human Polymorphonuclear Leukocyte Functions. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:1833. doi: 10.3390/ijms20081833. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
19. Mukhopadhyay P., Rajesh M., Horváth B., Bátkai S., Park O., Tanashian G., Gao R.Y., Patel V., Wink D.A., Liaudet L., et al. Cannabidiol protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating inflammatory signaling and response, oxidative/nitrative stress, and cell death. *Free Radic. Biol. Med.* 2011;50:1368–1381. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.021. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
20. Tamassia N., Bianchetto-Aguilera F., Arruda-Silva F., Gardiman E., Gasperini S., Calzetti F., Cassatella M.A. Cytokine production by human neutrophils: Revisiting the “dark side of the moon.” *Eur. J. Clin. Investig.* 2018;48(Suppl. 2):e12952. doi: 10.1111/eci.12952. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
21. Winterbourn C.C., Kettle A.J., Hampton M.B. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu. Rev. Biochem.* 2016;85:765–792. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014442. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
22. Brinkmann V., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J. Cell Biol.* 2012;198:773–783. doi: 10.1083/jcb.201203170. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
23. Metzler K.D., Goosmann C., Lubojemska A., Zychlinsky A., Papayannopoulos V. A Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. *Cell Rep.* 2014;8:883–896. doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.044. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
24. Nakanishi T., Hasuike Y., Otaki Y., Nanami M., Kuragano T. Dysregulated iron metabolism in patients on hemodialysis. *Contrib. Nephrol.* 2015;185:22–31. doi: 10.1159/000380967. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
25. Sur Chowdhury C., Giaglis S., Walker U.A., Buser A., Hahn S., Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: Analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res. Ther.* 2014;16:R122. doi: 10.1186/ar4579. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
26. Hu S.C.-S., Yu H.-S., Yen F.-L., Lin C.-L., Chen G.-S., Lan C.-C.E. Neutrophil extracellular trap formation is increased in psoriasis and induces human β -defensin-2 production in epidermal keratinocytes. *Sci. Rep.* 2016;6 doi: 10.1038/srep31119. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
27. Frangou E., Vassilopoulos D., Boletis J., Boumpas D.T. An emerging role of neutrophils and NETosis in chronic inflammation and fibrosis in systemic lupus erythematosus (SLE) and ANCA-associated vasculitides (AAV): Implications for the pathogenesis and treatment. *Autoimmun. Rev.* 2019;18:751–760. doi: 10.1016/j.autrev.2019.06.011. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
28. Berthelot J.-M., Le Goff B., Neel A., Maugars Y., Hamidou M. NETosis: At the crossroads of rheumatoid arthritis, lupus, and vasculitis. *Joint Bone Spine.* 2017;84:255–262. doi: 10.1016/j.jbspin.2016.05.013. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

29. Cannavò S.P., Riso G., Casciaro M., Di Salvo E., Gangemi S. Oxidative stress involvement in psoriasis: A systematic review. *Free Radic. Res.* 2019;53:829–840. doi: 10.1080/10715762.2019.1648800. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
30. Elmarakby A.A., Sullivan J.C. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Cardiovasc. Ther.* 2012;30:49–59. doi: 10.1111/j.1755-5922.2010.00218.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
31. Wójcik P., Žarković N., Gęgotek A., Skrzydlewska E. Involvement of Metabolic Lipid Mediators in the Regulation of Apoptosis. *Biomolecules.* 2020;10:402. doi: 10.3390/biom10030402. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
32. Bacellar I.O.L., Baptista M.S. Mechanisms of Photosensitized Lipid Oxidation and Membrane Permeabilization. *ACS Omega.* 2019;4:21636–21646. doi: 10.1021/acsomega.9b03244. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
33. Ovejero-Benito M.C., Reolid A., Sánchez-Jiménez P., Saiz-Rodríguez M., Muñoz-Aceituno E., Llamas-Velasco M., Martín-Vilchez S., Cabaleiro T., Román M., Ochoa D., et al. Histone modifications associated with biological drug response in moderate-to-severe psoriasis. *Exp. Dermatol.* 2018;27:1361–1371. doi: 10.1111/exd.13790. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
34. Witalison E.E., Thompson P.R., Hofseth L.J. Protein Arginine Deiminases and Associated Citrullination: Physiological Functions and Diseases Associated with Dysregulation. *Curr. Drug Targets.* 2015;16:700–710. doi: 10.2174/1389450116666150202160954. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
35. Lambert S., Hambro C.A., Johnston A., Stuart P.E., Tsoi L.C., Nair R.P., Elder J.T. Neutrophil Extracellular Traps Induce Human Th17 Cells: Effect of Psoriasis-Associated TRAF3IP2 Genotype. *J. Investig. Dermatol.* 2019;139:1245–1253. doi: 10.1016/j.jid.2018.11.021. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
36. Garley M., Jabłońska E., Surażyński A., Grubczak K., Ratajczak-Wrona W., Iwaniuk A., Dabrowska D., Palka J.A., Moniuszko M. Cytokine Network & NETs. *Folia Biol. (Praha)* 2017;63:182–189. [PubMed] [Google Scholar]
37. Lu Y.-C., Yeh W.-C., Ohashi P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008;42:145–151. doi: 10.1016/j.cyto.2008.01.006. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
38. Kutukculer N., Yuksel S.E., Aksu G., Alper S. Autoantibodies Other than Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies Are Not Positive in Patients with Psoriasis Vulgaris. *J. Dermatol.* 2005;32:179–185. doi: 10.1111/j.1346-8138.2005.tb00741.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
39. Cambridge G., Williams M., Leaker B., Corbett M., Smith C.R. Anti-myeloperoxidase antibodies in patients with rheumatoid arthritis: Prevalence, clinical correlates, and IgG subclass. *Ann. Rheum. Dis.* 1994;53:24–29. doi: 10.1136/ard.53.1.24. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
40. Hakkim A., Fürnrohr B.G., Amann K., Laube B., Abed U.A., Brinkmann V., Herrmann M., Voll R.E., Zychlinsky A. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107:9813–9818. doi: 10.1073/pnas.0909927107. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
41. Shao S., Fang H., Dang E., Xue K., Zhang J., Li B., Qiao H., Cao T., Zhuang Y., Shen S., et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote Inflammatory Responses in Psoriasis via Activating Epidermal TLR4/IL-36R

Crosstalk. *Front. Immunol.* 2019;10 doi: 10.3389/fimmu.2019.00746. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

42. Gehrke N., Mertens C., Zillinger T., Wenzel J., Bald T., Zahn S., Tüting T., Hartmann G., Barchet W. Oxidative damage of DNA confers resistance to cytosolic nuclease TREX1 degradation and potentiates STING-dependent immune sensing. *Immunity.* 2013;39:482–495. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.004. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

43. Millar S.A., Stone N.L., Bellman Z.D., Yates A.S., England T.J., O’Sullivan S.E. A systematic review of cannabidiol dosing in clinical populations. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2019;85:1888–1900. doi: 10.1111/bcp.14038. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

44. Booz G.W. Cannabidiol as an Emergent Therapeutic Strategy for Lessening the Impact of Inflammation on Oxidative Stress. *Free Radic. Biol. Med.* 2011;51:1054–1061. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.007. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

45. Atalay S., Jarocka-Karpowicz I., Skrzydlewska E. Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. *Antioxidants (Basel)* 2019;9:21. doi: 10.3390/antiox9010021. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

46. Petrocellis L.D., Orlando P., Moriello A.S., Aviello G., Stott C., Izzo A.A., Marzo V.D. Cannabinoid actions at TRPV channels: Effects on TRPV3 and TRPV4 and their potential relevance to gastrointestinal inflammation. *Acta Physiol.* 2012;204:255–266. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02338.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

47. Jastrzab A., Gęgotek A., Skrzydlewska E. Cannabidiol Regulates the Expression of Keratinocyte Proteins Involved in the Inflammation Process through Transcriptional Regulation. *Cells.* 2019;8:827. doi: 10.3390/cells8080827. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

48. Peluso I., Cavaliere A., Palmery M. Plasma total antioxidant capacity and peroxidation biomarkers in psoriasis. *J. Biomed. Sci.* 2016;23:52. doi: 10.1186/s12929-016-0268-x. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

49. Leweke F.M., Piomelli D., Pahlisch F., Muhl D., Gerth C.W., Hoyer C., Klosterkötter J., Hellmich M., Koethe D. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl. Psychiatry.* 2012;2:e94. doi: 10.1038/tp.2012.15. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

50. Di Marzo V., Piscitelli F. The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics.* 2015;12:692–698. doi: 10.1007/s13311-015-0374-6. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

51. Zou S., Kumar U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19:833. doi: 10.3390/ijms19030833. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

52. Patel K.D., Davison J.S., Pittman Q.J., Sharkey K.A. Cannabinoid CB(2) receptors in health and disease. *Curr. Med. Chem.* 2010;17:1393–1410. doi: 10.2174/092986710790980041. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

53. Biernacki M., Skrzydlewska E. Metabolism of endocannabinoids. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej.* 2016;70:830–843. doi: 10.5604/17322693.1213898. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

54. Smith S.R., Terminelli C., Denhardt G. Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000;293:136–150. [PubMed] [Google Scholar]
55. Krohn R.M., Parsons S.A., Fichna J., Patel K.D., Yates R.M., Sharkey K.A., Storr M.A. Abnormal cannabidiol attenuates experimental colitis in mice, promotes wound healing and inhibits neutrophil recruitment. *J. Inflamm. (Lond.)* 2016;13:21. doi: 10.1186/s12950-016-0129-0. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
56. Ribeiro A., Ferraz-de-Paula V., Pinheiro M.L., Vitoretti L.B., Mariano-Souza D.P., Quinteiro-Filho W.M., Akamine A.T., Almeida V.I., Quevedo J., Dal-Pizzol F., et al. Cannabidiol, a non-psychotropic plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: Role for the adenosine A(2A) receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 2012;678:78–85. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.12.043. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
57. Kurihara R., Tohyama Y., Matsusaka S., Naruse H., Kinoshita E., Tsujioka T., Katsumata Y., Yamamura H. Effects of peripheral cannabinoid receptor ligands on motility and polarization in neutrophil-like HL60 cells and human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 2006;281:12908–12918. doi: 10.1074/jbc.M510871200. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
58. Balenga N.A.B., Aflaki E., Kargl J., Platzer W., Schröder R., Blättermann S., Kostenis E., Brown A.J., Heinemann A., Waldhoer M. GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell Res.* 2011;21:1452–1469. doi: 10.1038/cr.2011.60. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
59. Chiurchiù V., Battistini L., Maccarrone M. Endocannabinoid signalling in innate and adaptive immunity. *Immunology.* 2015;144:352–364. doi: 10.1111/imm.12441. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
60. Feldman S., Krueger G. Psoriasis assessment tools in clinical trials. *Ann. Rheum. Dis.* 2005;64:ii65–ii68. doi: 10.1136/ard.2004.031237. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
61. Eissa S., Seada L.S. Quantitation of bcl-2 protein in bladder cancer tissue by enzyme immunoassay: Comparison with Western blot and immunohistochemistry. *Clin. Chem.* 1998;44:1423–1429. [PubMed] [Google Scholar]
62. Grunwell J.R., Giacalone V.D., Stephenson S., Margaroli C., Dobosh B.S., Brown M.R., Fitzpatrick A.M., Tirouvanziam R. Neutrophil Dysfunction in the Airways of Children with Acute Respiratory Failure Due to Lower Respiratory Tract Viral and Bacterial Coinfections. *Sci. Rep.* 2019;9:2874. doi: 10.1038/s41598-019-39726-w. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
63. Garley M., Dziemiańczyk-Pakieła D., Grubczak K., Surażyński A., Dąbrowska D., Ratajczak-Wrona W., Sawicka-Powierza J., Borys J., Moniuszko M., Pałka J.A., et al. Differences and similarities in the phenomenon of NETs formation in oral inflammation and in oral squamous cell carcinoma. *J. Cancer.* 2018;9:1958–1965. doi: 10.7150/jca.24238.