

# **Stanovení fototoxicity aktivních látek pro kosmetický průmysl**

Gabriela Švecová

---

Bakalářská práce

2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Gabriela Švecová**  
Osobní číslo: **T17159**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Stanovení fototoxicity aktivních látek pro kosmetický průmysl**

### Zásady pro vypracování

Kosmeticky a farmaceuticky aktivní látky (AKF) mohou být schopny absorbovat sluneční záření a následně vyvolávat fototoxický efekt, tedy patologicky zvýšenou citlivost kůže. V rámci teoretické části se student/ka seznámí s principy účinku světelného záření na lidský organismus a dosud známe reakce AKF se slunečním zářením. V praktické části se pak student/ka zaměří na stanovení fototoxicity pomocí *in vitro* buněčných modelů v rámci Laboratoře buněčných kultur na Centru polymerních systémů UTB. Student/ka se seznámí s prací v této laboratoři, postupy kultivace buněčných kultur, mikroskopii a základními metodami stanovení buněčné životnosti.

Forma zpracování bakalářské práce: **Tištěná/elektronická**

**Seznam doporučené literatury:**

SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J., RELICHOVÁ, J. et al. Genetika. Brno: Masarykova univerzita, 2009.

ALBERTS B. et al. Molecular Biology of the Cell 5th ed. Garland Science.

DAVID A.P. BIZIOS R. Biological Interactions on Material Surfaces. ISBN 978-0-387-98160-4

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Zdenka Capáková, PhD.**  
Centrum polymerních systémů

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **22. května 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2020

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Fototoxická může způsobit dočasné i trvalé změny na pokožce a je způsobena reakcí fototaktivních látek s UV zářením. Některé fotoaktivní látky se používají jako kosmetické ingredience, a proto je nutné tyto látky testovat a legislativně řídit. Teoretická část této práce je zaměřená na fototoxicitu a její dopady na lidskou pokožku. Také se zabývá možnou ochranou před fototoxickou reakcí a popsány jsou i samotné fototoxické látky. V rámci praktické části byla stanovena fototoxická vybraných esenciálních olejů a UV filtrů. Testování fototoxicity bylo provedeno s použitím myších fibroblastů a vyhodnoceno pomocí testu MTT.

Klíčová slova: fototoxická, esenciální oleje, UV filtry, pokožka

## **ABSTRACT**

Phototoxicity can cause temporary and permanent skin changes and is caused by interaction of phototoxic substance and UV light. Some of the phototoxic substances can be used as cosmetics ingredients and therefore it is necessary to test photoactive materials and legislatively manage them. The theoretical part of this thesis is dealing with phototoxicity and its effect on the human skin. Moreover, the possible protection against the phototoxicity and some phototoxic substances is also described. Regarding the experimental part, the phototoxicity of chosen essential oils and UV filters was tested. Testing of the phototoxicity was done by using mice fibroblasts and the evaluation was done by MTT test.

Keywords: phototoxicity, essential oils, UV filters, skin

Děkuji Ing. Simoně Kačerová a Ing. Martině Kašparové za práci v laboratoři. Dále také děkuji Ing. Zdence Capákové, Ph.D. za trpělivost, vstřícný přístup a pomoc při zpracování této práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 STAVBA KŮŽE</b> .....	<b>11</b>
1.1 POKOŽKA.....	11
1.2 ŠKÁRA .....	14
1.3 SUBKUTÁNNÍ TKÁŇ .....	16
<b>2 BUNĚČNÉ LINIE V KŮŽI</b> .....	<b>17</b>
2.1 KERATINOCYTY .....	17
2.2 MELANOCYTY.....	17
2.3 LANGERHANSOVY BUŇKY .....	17
2.4 MERKELOVY BUŇKY.....	18
2.5 MASTOCYTY .....	18
<b>3 MECHANISMUS FOTOTOXICITY</b> .....	<b>20</b>
<b>4 PROJEVY FOTOTOXICITY</b> .....	<b>22</b>
4.1 AKUTNÍ PROJEVY .....	22
4.2 SUBAKUTNÍ PROJEVY .....	23
4.3 POZDNÍ A OPOŽDĚNÉ PROJEVY.....	24
<b>5 LÉČBA FOTOTOXICITY</b> .....	<b>25</b>
<b>6 FOTOALERGIE</b> .....	<b>26</b>
<b>7 TESTOVÁNÍ FOTOTOXICITY</b> .....	<b>27</b>
7.1 <i>IN VIVO</i> .....	27
7.2 <i>IN VITRO</i> .....	27
7.3 <i>IN CHEMICO</i> .....	29
<b>8 FOTOTOXICITA A KOSMETIKA</b> .....	<b>30</b>
8.1 LEGISLATIVA .....	30
8.2 UV FILTRY .....	31
8.3 ANTIOXIDANTY .....	33
8.3 ESENCIÁLNÍ OLEJE .....	33
8.3.1 Kumariny .....	34
8.3.2 Bergamotový olej.....	35
8.3.3 Další esenciální oleje .....	35

8.5	DALŠÍ KOSMETICKÉ INGREDIENCE .....	37
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>38</b>
<b>9</b>	<b>METODIKA.....</b>	<b>39</b>
9.1	TESTOVANÉ LÁTKY .....	39
9.2	POUŽITÉ BUNĚČNÉ LINIE.....	39
9.3	POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	39
9.4	PŘÍPRAVA TESTOVANÝCH LÁTEK .....	39
9.5	PODMÍNKY OZÁŘENÍ.....	40
9.6	PŘÍPRAVA BUNĚK A IRADIACE .....	40
9.7	MTT TEST.....	41
9.8	VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ.....	41
9.9	DISKUZE.....	49
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>51</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>52</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>58</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>61</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>63</b>



## ÚVOD

Fototoxicita je definovaná jako toxická odpověď látky aplikované na kůži, která je vyvolaná vystavením daného místa UV záření, nebo která vzniká po ozáření kůže po systémovém podání této látky. Jiná definice říká, že je to neimunologická odpověď kůže po ozáření UV zářením (vznik dermatitidy) k fotoreaktivní látce [1].

Projevy fototoxicity jsou podobné jako při poškození kůže slunečním zářením: erytém, edém, vezikulace, pruritis apod., tyto příznaky se objevují pouze na místě vystaveném UV záření, a to po několika minutách až hodinách po expozici [2]. Z těchto důvodů je v zájmu nejen farmaceutických a kosmetologických firem, ale i samotných spotřebitelů se tímto problémem zabývat. Rozsah, vlastnosti a způsob vzniku fototoxicity jsou ovlivněny chemickou strukturou látek, dobou expozice UV zářením a fyziologickým stavem kůže a buněk, které jsou radiaci vystavovány apod. [2, 3].

Pro zjištění fototoxického potenciálu látek se používají testy *in silico*, *in vitro*, *in chemico* a *test in vivo*, který je ale používán v menší míře kvůli etickým náležitostem. Mezi doporučené testy patří spektrální analýza UV záření (UV-visible spectral analysis), zjištění životaschopnosti buněk s využitím barviva neutrální červeň (3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity test/3T3 NRU PT) a detekce reaktivních oxygeních molekul (ROS assay). V současnosti je fototoxicita prokázána u množství ingrediencí používaných v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu [1].

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

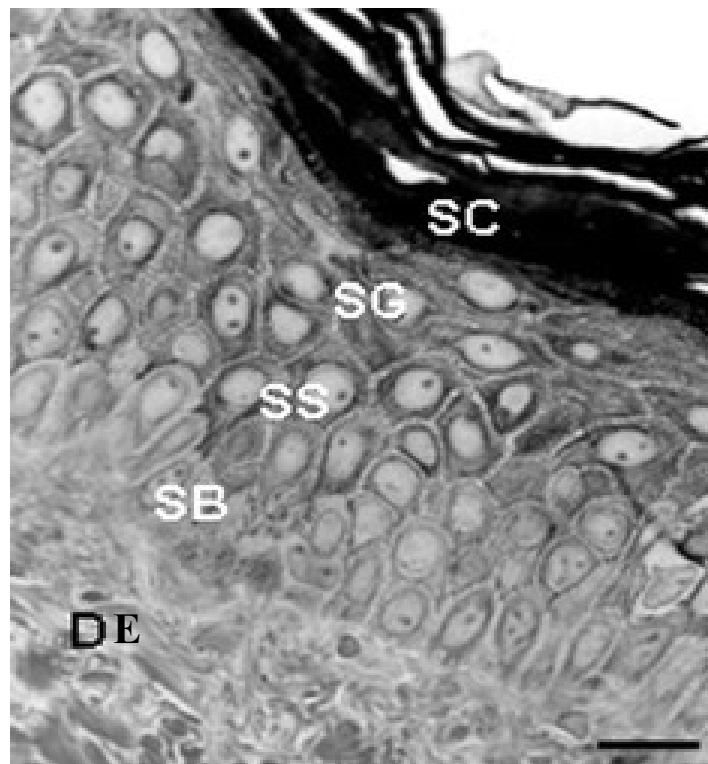
## 1 STAVBA KŮŽE

Lidská kůže se skládá ze tří hlavních vrstev: *epidermis* (pokožka), *dermis* (škára) a *panniculus* (subkutánní tkáň). Nejsvrchnější vrstva *epidermis* je složena ze specifického uspořádání buněk – keratinocytů, které syntetizují keratin, což je dlouhý vláknitý protein s ochrannou funkcí. Střední vrstva *dermis* je složena hlavně z fibrilárního strukturálního proteinu kolagenu a leží na subkutánní vrstvě obsahující tukové buňky, které se nazývají lipocyty. Tloušťka těchto vrstev se liší podle jejich umístění na lidském těle, přičemž nejtenčí je kůže na očních víčkách (méně jak 0,1 mm) a nejtlustší bývá na dlaních a chodidlech (asi 1,5 mm) [4].

### 1.1 Pokožka

Epidermis je nejsvrchnější a neustále se obnovující vrstva kůže, která se skládá převážně z keratinocytů a dendritických buněk. Keratinocyty se liší od dendritických buněk tím, že obsahují intracelulárních spojení a velké množství barvitelné cytoplazmy. V epidermis se také nachází další buněčné populace jako jsou melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky, nicméně keratinocyty tvoří většinu buněk. Podle morfologie a umístění keratinocytů v kůži během jejich diferenciaci na korneocyty se epidermis dělí na čtyři vrstvy: horní zrohovatělá vrstva (*stratum corneum*), vrstva zrnitých buněk (*stratum granulosum*), vrstva ostnitých buněk (*stratum spinosum*) nebo také squamozní vrstva (*stratum squamosum*) a nejspodnější bazální vrstva (*stratum basale/stratum germinativum*). Tyto vrstvy jsou pod mikroskopem zobrazeny na obrázku 1[4].

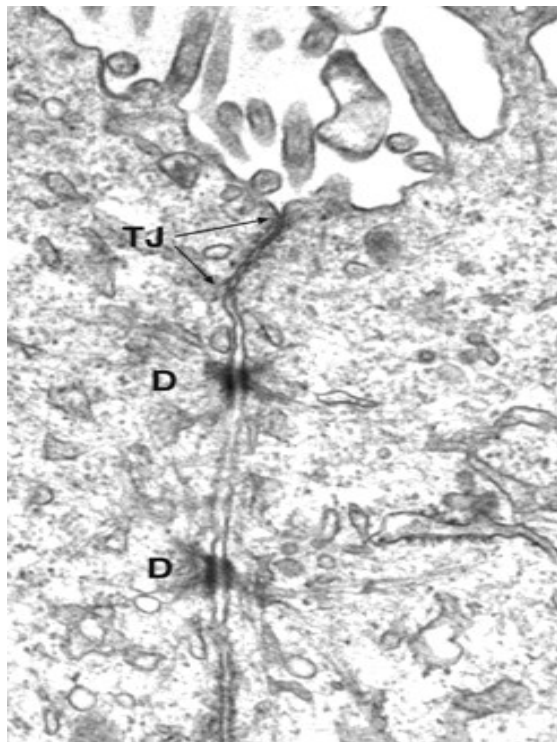
V bazální vrstvě se nachází keratinocyty tvořící jedinou vrstvu a přiléhající jak k sobě, tak k výše přilehlým squamozním buňkám skrze desmozomální spojení. Další charakteristikou těchto buněk je s podlouhlé jádro a přítomnost melaninu, který se do nich dostal ze sousedících melanocytů. Bazální vrstva je hlavní místo mitoticky aktivních buněk, které dávají vzniknout buňkám vnějších epidermálních vrstev. V bazální vrstvě jsou přítomny také kmenové buňky pokožky, které jsou klonogenní a za normálních podmínek je jejich buněčný cyklus velmi pomalý. Při nepříznivých podmínkách jako je například poranění kůže, se může zvýšit počet neustále se obměňujících buněk kůže, právě díky vyšší stimulaci dělení kmenových buněk. Četnost dělení buněk může také ovlivnit poškození DNA, které může změnit mechanismus jejich proliferace [4].



Obrázek 1: Vrstvy *epidermis*, *dermis* (DE), *stratum basale* (SB), *stratum spinosum* (SS), *stratum granulosum* (SG), *stratum corneum* (SC), měřítko 30 $\mu$ m, [5]

*Stratum spinosum* je vrstva tlustá 5–10 buněk, přičemž jejich tvar, struktura a vnitřní obsah záleží na jejich umístění. V nejspodnějších vrstvách jsou tzv. suprabazální spinózní buňky polyhedrálního tvaru obsahující kulaté jádro, zatímco buňky ve vyšších vrstvách jsou větší,

ploché a obsahují lamelární granula. Tyto granula jsou organely přiléhající k membráně a je v nich možné najít glykoproteiny, glykolipidy a fosfolipidy, volné steroly, dále také kyselé hydrolázy jako proteázy, lipázy, fosfatázy a glykosidázy. Velké množství hydrolytických enzymů nacházejících se v granulích ukazuje na to, že lamelární granula mohou být typem lyzozomů. Mezibuněčné prostory mezi spinózními buňkami jsou vyplněny značným množstvím desmozomů, které zajišťují spojení mezi buňkami epidermis a odolávání fyzickému stresu. Kolem jádra jsou v cytoplazmě buněk koncentricky organizovány keratinová vlákna, které jsou jedním koncem připojeny k útvarům, kterými se desmozom připojuje k buňkám (k tzv. „plakům“) a druhý konec blíže k jádru zůstává volný. Desmozomální „plaky“ jsou složeny z šesti polypeptidů, které se nachází i na cytoplazmatické membráně buněk a hrají důležitou roli při regulaci vápníku, který je potřebný pro vznik a udržování desmozomů. Dalším typem spojení buněk jsou tzv. těsné spoje (tight junctions) umožňující fyziologickou buněčnou komunikaci, která je nezbytná pro správný buněčný metabolismus, růst a diferenciaci. Těsné spoje a desmozomy pod mikroskopem je možné vidět na obrázku 2 [4].



Obrázek 2: Řez kůží zobrazující těsné spoje (TJ) a desmozomy (D), [6]

Granulární vrstva je poslední vrstva obsahující živé buňky. Tloušťka vrstvy je závislá na tloušťce zrohovatělé vrstvy – v místech na těle, kde je zrohovatělá vrstva tenká může být granulární vrstva složená z 1 až 3 vrstev buněk, zatímco na například na dlaních může být tato vrstva až desetkrát tlustší. Granulární vrstva obsahuje zploštělé buňky zodpovídají za syntézu a modifikaci proteinů účastnící se keratinizace a v jejich cytoplazmě je množství keratohyalinních granulí. Jsou to bazofilní granula, která jsou nezbytná při vzniku interfibrilárního matrixu držící vlákna keratinu u sebe a při vzniku vláken v korneocytech. V buňkách jsou přítomny ve velkém množství i lyzozomální enzymy, protože je zde připravováno rozpouštění organel granulárních buněk, které zde podstupují konečný proces diferenciaci na korneocyty [4].

Ve zrohovatělé vrstvě se nachází korneocyty, které poskytují kůži mechanickou ochranu, tvoří bariéru před vstupem cizích látek do těla a zabraňují ztrátě vody. Tyto buňky obsahují vysoké množství proteinů, málo lipidů a během terminální diferenciaci ztratili jádro, takže jsou technicky považovány za mrtvé. Jejich fyziologické a biologické vlastnosti závisí na jejich umístění ve zrohovatělé vrstvě. Buňky ve střední vrstvě mají vysokou schopnost vázat vodu díky přítomnosti aminokyselin v jejich cytoplazmě a buňky v hlubších vrstvách jsou více připojeny k sobě a oproti povrchové vrstvě vykazují přítomnost mnohých intracelulárních spojů [4].

## 1.2 Škára

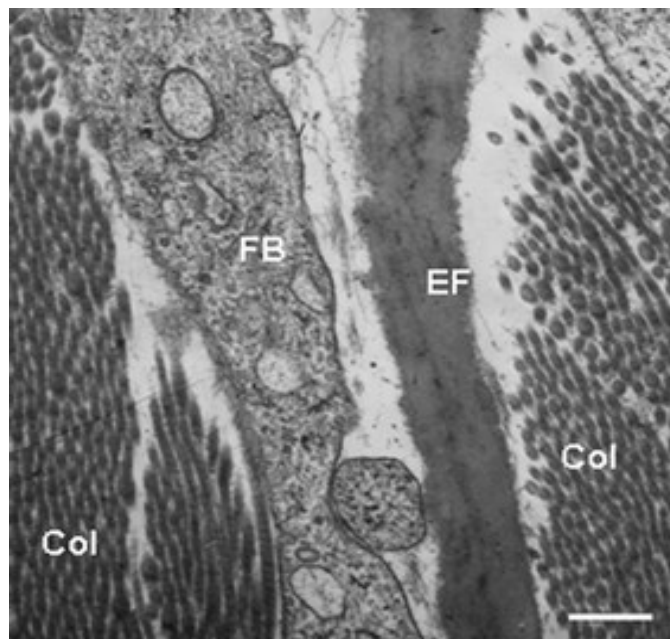
Rozhraní mezi *epidermis* a *dermis* je složeno z pórovité bazální membrány (*basal lamina*), která umožňuje výměnu buněk, tekutin a udržuje obě vrstvy spojené. Tato membrána obsahuje v největším množství bazální keratinocyty a v menší míře také dermální fibroblasty. Bazální buňky jsou připojeny k bazální membráně tzv. hemidesmozomy. Spojení mezi *epidermis* a *dermis* funguje jako opora pro *epidermis*, určuje polaritu buněk a směr jejich růstu, řídí organizaci cytoskeletu bazálních buněk, vydává růstové signály a funguje jako semipermeabilní membrána mezi oběma vrstvami [4].

*Dermis* je integrovaný systém fibrilární, filamentární a amorfní mezibuněčné hmoty, ve které se nachází síť nervů, cév, výběžků *epidermis*, fibroblasty, makrofágy a mastocyty. Kvůli různým podnětům mohou do *dermis* vstupovat také krevní buňky jako jsou leukocyty, lymfocyty a plazmatické buňky. *Dermis* také obsahuje v normálním stavu malé množství mukopolysacharidu kyseliny hyaluronové, která se ale v *dermis* při patologických stavech

kumuluje. Škára vytváří objem kůže a její funkcí je zajišťovat ohebnost, pevnost v tahu a elasticitu. Dále je díky ní tělo chráněné proti mechanickému poškození, je schopna vázat vodu a pomáhá při termoregulaci. Dermis je v kontaktu s epidermis a společně interagují při remodelaci a spravování kůže během procesu hojení ran [4].

Hlavním komponentem dermis je kolagen, což je látka patřící do skupiny proteinů s nejméně patnácti typy v lidské kůži. Kolagen se mimo jiné také nachází ve vazech a šlachách. V dermis se vyskytuje hlavně kolagen I. Kolagenní vlákna odolávají tahu a tlaku a neustále dochází k jejich obměně díky degradaci proteolytickými enzymy kolagenázami. [4].

Elastická vlákna jsou strukturně i chemicky odlišná od kolagenu a jsou složena z proteinových filament a elastinu. Tato vlákna zajišťují elasticitu kůže, ale na rezistenci proti stresu a tahu se téměř nepodílí. Kolagenní vlákna, fibroblasty a elastická vlákna jsou zobrazeny na obrázku 3 [4].



Obrázek 3: Řez kůží zobrazující kolagenní vlákna (Col), fibroblasty (FB), elastická vlákna (EF), měřítko 0,25  $\mu\text{m}$ , [5]

### 1.3 Subkutánní tkáň

V této vrstvě se vyskytují tukové buňky lipocyty, které jsou odděleny vláknitými septy, tvořenými velkými krevními cévami a kolagenem. Tuto vrstvu je možné považovat za endokrinní orgán a probíhá zde hormonální přeměna a produkce hormonu leptin, který se podílí na regulaci tělesné váhy. Subkutánní tkáň také funguje jako zásobárna energie a v ní nacházející se tukové buňky se podílí na termoregulaci [4].



## 2 BUNĚČNÉ LINIE V KŮŽI

Mezi nejdůležitější buněčné linie v kůži se řadí keratinocyty, melanocyty, Langerhansovy buňky, Merkelovy buňky a mastocyty [4].

### 2.1 Keratinocyty

Jak již bylo zmíněno výše, epidermis je složena převážně z keratinocytů a dendritických buněk. Keratinocyty migrují z bazální vrstvy na povrch kůže a tento proces se nazývá keratinizace. Keratinizace probíhá ve dvou fázích, a to v syntetické a degradační fázi. V první fázi si buňka vytvoří cytoplazmatickou zásobu keratinu – fibrilární intermediální filamentum, které je součástí cytoskeletu. Svazky těchto keratinových filament se sbíhají a končí na cytoplazmatické membráně, kde formují intracelulární spoje – desmozomy. V degradační fázi dochází ke ztrátě buněčných organel, obsah buněk je sjednocen do vláken a amorfních buněčných obalů a z buňky se stává korneocyt. Proces zrání buněk, který končí její smrtí, se nazývá terminální diferenciací. Jak buňky postupují k povrchu, desmozomy v této vrstvě podstupují proteolytickou degradaci a pomáhají k vylučování korneocytů během deskvamace. Migrace buněk do zrohovatělé vrstvy trvá nejméně 14 dní a dalších 14 dní poté trvá, než se buňky dostanou do nejzevnější části epidermis [4].

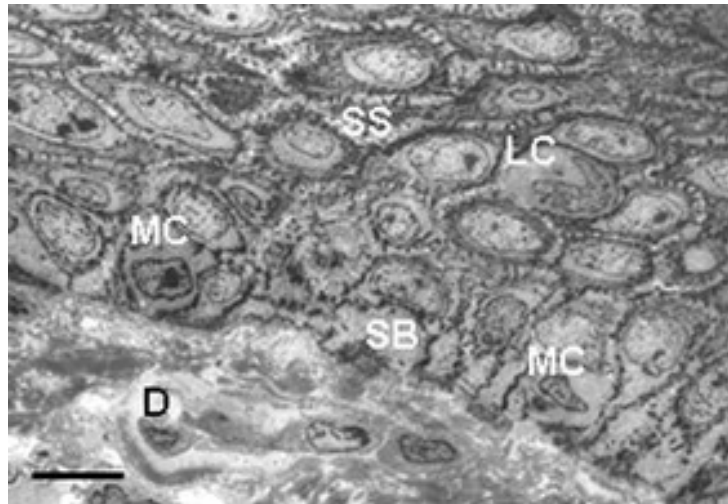
### 2.2 Melanocyty

Melanocyty jsou buňky obsahující melanozomy, což jsou organely syntetizující pigment melanin z esenciální aminokyseliny fenylalaninu. Melanocyty se nacházejí pod bazální vrstvou a jejich výběžky prostupují bazální buňky. Každý výběžek je ukotven v cytoplazmě bazální buňky a přenáší do ní melanozomy. Počet a velikost melanozomů v keratinocytech určuje charakteristickou pigmentaci kůže. Působením UV zářením dochází ke zvýšení produkce melanocytů a přenos melanozomů. Pigmentaci také ovlivňuje genetická výbava, pohlavní hormony a melanocyty-stimulující hormon z podvěsku mozkového [7].

### 2.3 Langerhansovy buňky

Langerhansovy buňky jsou dendritické buňky podílející se na imunitních odpovědích organismu a tvořící 2–8 % celkové buněčné populace v epidermis. Vyskytují se převážně ve squamózní a granulózní vrstvě, v menším množství také v bazální vrstvě. Langerhansovy buňky mají schopnost rozpoznat antigen v epidermální tkáni, přijmout ho endocytózou

a vytvořit buněčné granula. Obsah těchto granulí putuje do lyzozomů obsahující podobné hydrolytické enzymy, jaké obsahují makrofágy. V první fázi jejich života pouze slabě stimulují T-buňky a spíše rozpoznávají a přijímají antigeny, zatímco v druhé fázi se stávají efektivními aktivátory T-buněk. Langerhansovy buňky jsou spolu s melanocyty zobrazeny na obrázku 4 [4].



Obrázek 4: Řez epidermis s Langerhansovými buňkami (LC) ve *Stratum spinosum* (SS) a s melanocyty (MC) ve *Stratum basale* (SB), měřítko – 20 $\mu$ m, [5]

## 2.4 Merkelovy buňky

Mezi další buňky nacházející se v kůži, konkrétně v epidermis patří Merkelovy buňky. Tyto buňky jsou mechanoreceptory připojené k bazálním keratinocytům a nachází se v prstech (hlavně v konečcích prstů), ústech a ve vnějším obalu kořene vlasového folikulu. Pouze malou deformací přiléhajících keratinocytů dochází ke stimulaci Merkelových buněk, které vyloučí chemický signál generující akční potenciál v přiléhajícím aferentním neuronu, který přenáší signál do mozku [4].

## 2.5 Mastocyty

Mastocyty jsou specializované sekreční buňky vzniklé z kostní dřeně a distribuované v pojivové tkáni po celém těle. Nacházejí se ve velkém množství nejen v *dermis*, ale také v subkutánní tkáni, a to hlavně kolem krevních cév. V normální *dermis* jsou mastocyty oválného až vřetenovitého tvaru s kulatým až oválným jádrem a nacházející se ve středu buňky. Obsahují množství buněčných granulí obsahující histamin, heparin, serin-proteinázy

a určité cytokininy a na povrchu buněk jsou umístěné glykoproteinové receptory pro imunoglobulin E. Mastocyty se dělí na typ I (mastocyty pojivové tkáně), který se vykytuje ve škáře a submukóze a na typ II (mukózní mastocyty), který se nachází ve střevech a sliznici dýchacího ústrojí. Mastocyty se v kůži kumulují, pokud dojde k abnormální proliferaci, migraci nebo při selhání apoptózy, kdy vzniká mastocytóza. Mastocyty mohou být aktivovány díky alergenům nebo antigenům působících prostřednictvím vysoko afinitního imunoglobulinu E, superoxydy, komplementárními proteiny, neuropeptidy a lipoproteiny. Po aktivaci buňky produkují histamin, leukotrieny, prostanoidy, proteázy a další cytokininy a chemokininy. Tyto mediátory mohou být poté stěžejní při zahájení zánětlivé reakce [4].

### 3 MECHANISMUS FOTOTOXICITY

Fototoxicita vzniká působením slunečního záření na fotoreaktivní látku. Energie záření a míra jeho prostupu do kůže závisí na jeho vlnové délce. Čím je vlnová délka záření kratší, tím je jeho energie silnější. Naopak, čím je vlnová délka záření delší, tím je záření schopno hlouběji prostupovat do kůže, protože záření s delší vlnovou délkou snadno předává na jeho trajektorii energii sousedním tkáním [8].

Hlavním předpokladem pro fototoxicitu látek je jejich schopnost absorbovat sluneční záření ve vlnové délce 290–700 nm. K fototoxicitě dochází jak při absorpci UVA záření (320–400) nm, tak i UVB záření (290–320) nm. UVB je světlo s nejkratší vlnovou délkou, které dopadá na Zemi a je schopno asi 1000krát silněji poškozovat DNA a způsobovat spálení kůže než UVA. UVB záření ale prochází pouze do *epidermis*, zatímco UVA může procházet až do subkutánní tkáně [8].

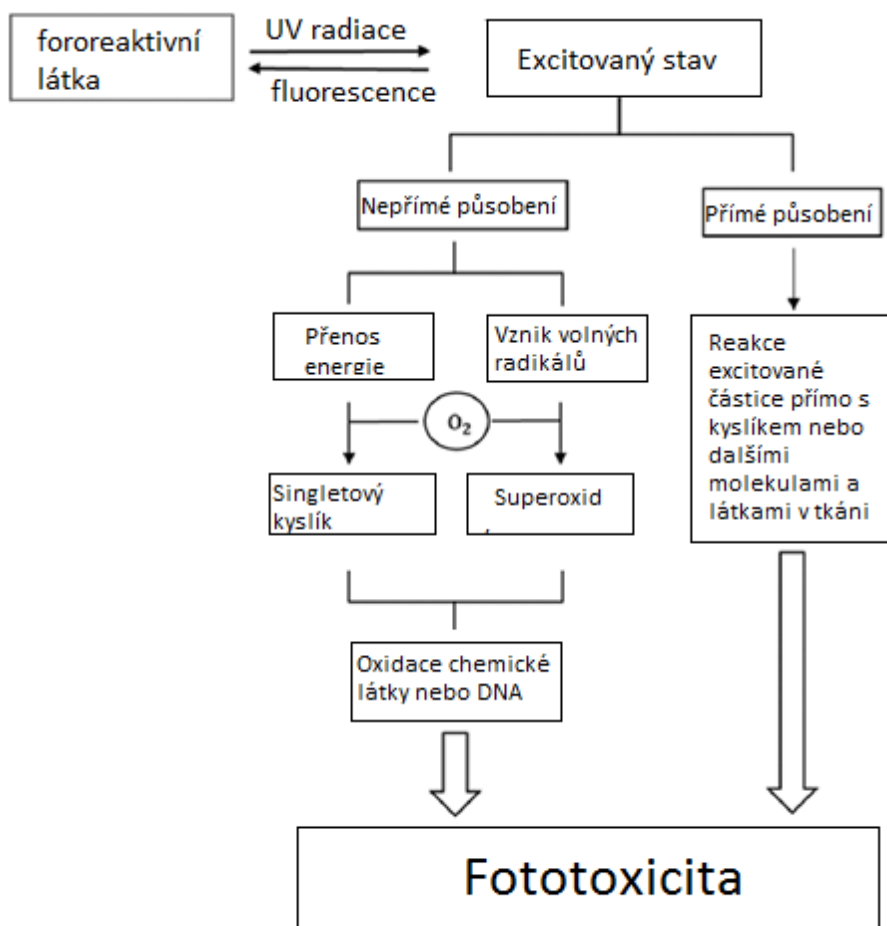
Podle prvního fotochemického zákona (Grotthausův-Draperův zákon) k fotochemické reakci dochází až při dostatečné absorpci světelného kvanta. Dalším předpokladem pro fototoxicitu látek je vykazovat absorpční molární koeficient<sup>1</sup> větší než 10 mol/l [9]. Každá fotoaktivní látka absorbuje pouze určitou vlnovou délku světla, která se nazývá absorpční spektrum. Specifické vlnové délky, které způsobují fotoaktivní reakci se nazývají aktivní spektrum, tím pádem je aktivní spektrum obsaženo v absorpčním spektru dané chemikálie [10].

Po absorpci světelné energie dochází k excitaci molekuly. Při tomto procesu může dojít ke ztrátě energie dané molekuly, a to fluorescencí nebo fosforescencí [10]. Při fluorescenci i fosforescenci dochází k vyzáření světla z excitované molekuly po absorpci elektromagnetického záření. U fluorescence nedochází při tomto procesu ke změně elektronového spinu, zatímco u fosforescence ke změně elektronového spinu dochází. V jiném případě může dojít ke změně struktury molekuly, reakci molekuly s okolím nebo ke vzniku reaktivních kyslíkových molekul. Tyto neradiační procesy jsou hlavním důvodem pro vznik fototoxicity, ke které dochází mechanismem přímým nebo nepřímým. Mechanismus fototoxicity je graficky znázorněn na obrázku 5 [11].

---

<sup>1</sup> Absorpční molární koeficient je konstanta vyjadřující schopnosti látky absorbovat elektromagnetické záření, která je vztažena na určitou látku o dané koncentraci.

- Přímý mechanismus – excitovaná molekula reaguje přímo s ostatními látkami, které jsou obsažené v dané topicky aplikované nebo požitě látce, s kyslíkem nebo jinými molekulami vyskytujícími se v tkáních, což může způsobovat poškození DNA, ztrátu funkce proteinů nebo smrt buněk [8].
- Nepřímý mechanismus – dochází k produkci dalších reaktivních molekul, které vznikají, když se excitovaná látka vrací do základního stavu. Mezi tyto molekuly se řadí hlavně tzv. ROS (reaktivní oxygenní molekuly, reactive oxygen species) mezi něž patří:  $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $O_2^{-1}$ ,  $OH$ , které mohou také způsobovat již zmíněné poškození DNA, ztrátu funkce proteinů nebo smrt buněk. Po systémovém podání chemické látky může docházet díky ROS i k oxidaci dané chemikálie, nejčastěji léčiva [8].



Obrázek 5: Schéma mechanismu fototoxicity, [8]

## 4 PROJEVY FOTOTOXICITY

Lokace fototoxických reakcí záleží na fyzi chemických vlastnostech daného fototoxického činidla. Lokálně aplikované látky díky jejich největší koncentraci v epidermis poškozují nejčastěji keratinocyty, zatímco systémově podávané látky způsobují největší škodu v dermis, a to konkrétně u mastocytů a endotelových buněk. Hydrofilní látka ničí hlavně buněčné membrány, zatímco lipofilní látka se dostává dovnitř buňky a může poškodit buněčné orgány jako jsou např. lysosomy, mitochondrie nebo jádro. Poškození buněk způsobuje uvolnění mediátorů, které vyvolávají zánětlivou reakci. Mezi tyto mediátory patří eikosanoidy, histamin a komplement. V erytému vzniklém po expozici UVB zářením byly detekovány cytokiny jako je interleukin-1, interleukin-6 a nádorový nekrotický faktor  $\alpha$ , které se mohou účastnit fototoxické reakce způsobené chemikáliemi nebo léčivy, nicméně pro většinu látek chybí experimentální potvrzení této myšlenky [13].

Projevy fototoxicity lze rozdělit na akutní, subakutní a pozdní nebo opožděné [14].

### 4.1 Akutní projevy

Mezi akutní projevy fototoxicity, což jsou projevy, které vznikají krátce po ozáření, patří přesně vymezený akutní erytém nebo edém doprovázený pálením, který je zobrazen na obrázku 6. Po delší době, konkrétně 12–24 hodin po expozici může dojít ke vzniku puchýřů a dále dokonce k hyperpigmentaci. Projevy fototoxicity jsou podobné jako po spálení slunečním zářením a bývají doprovázeny i systematickými symptomy jako je např. horečka [14].



Obrázek 6: Projev akutní fototoxicity, [14]

## 4.2 Subakutní projevy

Mezi subakutní příznaky, které se projevují dny nebo týdny po expozici nebo akutně pouze zřídka se řadí: pseudoporfyrie, fotoonycholýza a dyschromie [14].

Pseudoporfyrie je reakce vyznačující se chronickou křehkostí kůže, vznikem puchýřů a výjimečně i vznikem milií v pozdějším stadiu [14].

Fotoonycholýza se projevuje půlměsíčitou onocholýzou<sup>2</sup> jednoho nebo více nehtů 2–3 týdny po expozici a její vizuální projev je zobrazen na obrázku 7. Onocholýza je způsobena více faktory: nehtové lůžko není ničím chráněno před slunečním zářením, obsahuje méně melaninu než kůže, samotný nehet může sluneční záření odrážet a zánětlivá reakce způsobí odloučení nehtu z nehtového lůžka [14].



Obrázek 7: Fotoonycholýza, [14]

Dyschromie je hyperpigmentace, která často vzniká díky reziduální hyperpigmentaci způsobené zvýšenou aktivitou nebo počtem melanocytů. Hlavním důvodem dyschromie je nahromadění chemikálií nebo jejich metabolitů v dermis. Projevuje se zlatohnědým, šedým nebo namodralým zbarvením kůže, která byla vystavena slunečnímu záření u malého procenta lidí s nízkým fototypem. Na rozdíl od hyperpigmentace způsobené zvýšenou aktivitou nebo počtem melanocytů se dyschromie projevuje později a pigmentace kůže přetrvává déle [14].

---

<sup>2</sup> Onocholýza je bezbolestné odloučení nehtové ploténky od lůžka.

### 4.3 Pozdní a opožděné projevy

Mezi pozdní a opožděné příznaky fototoxicity se řadí lupus erythematosus. Při tomto autoimunitním onemocnění dochází ke vzniku prstencových lézí v oblastech obličeje, krku, horního hrudníku několik týdnů až měsíců po vystavení slunečnímu záření, a to u subakutního lupusu. V krajních případech můžou vzniknout chronické léze na obličeji nebo krku [14].

Mezi další pozdní projevy patří chronická aktinická dermatitida, kterou nejčastěji trpí starší muži. Projevuje se jako ekzém nebo častěji jako dlouhotrvající chronický ekzém doprovázený hnědošedou hyperpigmentací, edémem a lichenifikací<sup>3</sup>, které jsou zobrazeny na obrázku 8. Léze se objevují na místech vystavených slunečnímu záření a dalším vystavením UV zářením dochází k jejich zhoršení. Tímto onemocněním trpí lidé s extrémní fotocitlivostí, často způsobenou předchozí dermatitidou [14].

Je prokázána souvislost mezi vnitřně podanými fotoaktivními látkami a zvýšeným výskytem aktinické keratózy, nemelanomové rakoviny kůže či maligního melanomu. Fototoxické látky mohou také podporovat stárnutí kůže způsobené slunečním zářením, tzv. photoaging [14].



Obrázek 8: Lichenifikace a hyperpigmentace člověka s chronickou aktinickou dermatitidou, [14]

---

<sup>3</sup> Lichenifikace – zhrubění kůže



## 5 LÉČBA FOTOTOXICITY

Léčba projevů fototoxicity vzniklých po topicky aplikovaných látkách závisí na rozsahu a druhu poškození kůže [15].

Při vzniku akutních fototoxických reakcí je nutné ihned přestat používat fototoxická léčiva a kosmetiku [16]. Ke zmírnění příznaků, které se jeví jako spálení od slunce stačí pouze přikládání vlhkých obvazů. V závažnějších případech, kdy je zasaženo více jak 30 % povrchu těla, je doporučeno přijmout pacienta na popáleninové oddělení nemocnice, kde poté dochází k chlazení akutního poškození kůže a pomocí topické aplikace kortikosteroidů je možné zmírnit projevy. Pokud vzniknou závažné zánětlivé léze je nutná léčba založená na vnitřním užíváním kortikosteroidů. V případě riziku bakteriální infekce se podávají antibiotika [15].

Konkrétní přetrvávající pozdní a opožděné projevy se poté řeší individuálně a podle typu problému buď kosmetickým nebo lékařským způsobem [17].

Během celé léčby je nutné používat fotoprotekci jako je fotoprotektivní oblečení (textil má pouze omezenou ochranu proti UVA záření a je nutné brát na ohled jeho typ, tloušťku, poréznost a barvu), sluneční brýle, používání krému s vysokým SPF faktorem a ochranou proti UVA záření a také je nutné se vyhýbat přímému slunci [15].

## 6 FOTOALERGIE

Podobné projevy jako fototoxicita má i fotoalergie. Fotoalergie je definovaná jako hypersenzitivní reakce zprostředkovaná pomocí T-buněk k alergenu, který se zformoval při expozici UV zářením [14].

Na rozdíl od fototoxicity, fotoalergie se vyskytuje pouze u omezeného počtu lidí, k jejímu projevení stačí malá dávka UV záření a příznaky se objevují až po dlouhé době, ale i na místech, které nebyly záření vystaveny. Typickými příznaky fotoalergie je ekzém a erytém, ty ale neovlivňuje množství fotoaktivní látky. Fotoalergie se neobjevuje po prvním kontaktu s fotoaktivní látkou jako fototoxicita, ale pro reakci je potřeba přechodí senzibilizace danou substancí. Rozdíly mezi fototoxicitou a fotoalergií jsou zobrazeny v tabulce 1 [14].

I přes značné rozdíly obou reakcí existují látky, které je mohou vyvolávat obě. Fotoalergeny mohou být fotoaktivní molekuly s vlastní fototoxicitou, která může iniciovat samotnou senzibilizaci [14].

Tabulka 1: Rozdíly mezi fototoxicitou a fotoalergií, [14]

	<b>FOTOTOXICITA</b>	<b>FOTOALERGIE</b>
<b>ČETNOST VÝSKYTU</b>	Vysoká	Nízká
<b>PŘÍTOMNOST LATENTNÍ PERIODY</b>	Ne	Ano
<b>DÁVKA UV ZÁŘENÍ/FOTOSENZITIVNÍ LÁTKY</b>	Vysoká	Nízká
<b>POSTIŽENÍ ZAKRYTÝCH OBLASTÍ</b>	Ne	Ano
<b>REZIDUÁLNÍ HYPERPIGMENTACE</b>	Ano	Ne
<b>LÉČBA</b>	Rychlá	Možné opakování, perzistentní projevy

## 7 TESTOVÁNÍ FOTOTOXICITY

Veřejnost se o fotoreaktivní látky začala zajímat, když se u zákazníků a pacientů začaly vyskytovat projevy fototoxicity v důsledku vyšší intenzity UV záření, které dopadalo na zem kvůli poškození ozonové vrstvy. Produkty zanechávaly u zákazníků negativní dojem a farmaceutické a kosmetické firmy měli problém předpovědět nebo se vyhnout fototoxickým látkám, protože neexistovali normy a ustálené testy. Kolem roku 2000 byly ustanoveny regulačními společnostmi: FDA – Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv), European Medicines Agency (Evropská léková agentura) a OECD – Organization for Economic Cooperation and Development (Organizace pro hospodářskou organizaci a rozvoj) normy a návody pro testování fototoxicity [3]. Od roku 2000 je také zakázáno *in vivo* pro akutní fototoxicitu u zvířat. V dalších letech byly postupně vyvinuty další testy a postupy [1].

### 7.1 *In vivo*

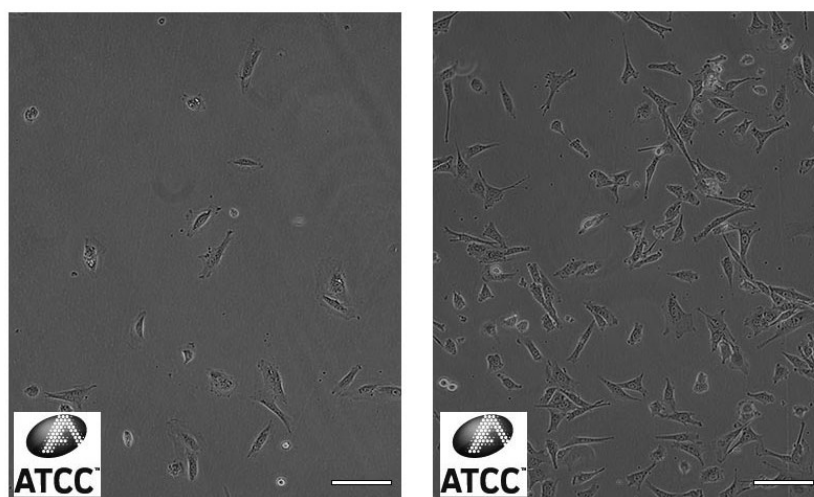
Pro testování *in vivo* se používají laboratorní zvířata jako je myš nebo morče. Zvířatům je topicky nebo systémově aplikovaná testovaná látka a jsou vystaveny určité dávce UV záření ( $10 \text{ J/m}^2$  pro morče a  $20 \text{ J/cm}^2$  pro myš). Vniklý edém a erytém se během 72 hodin pozorování hodnotí číslem 0–4, hodnocení se pro každé zvíře zprůměruje a tento průměr se nazývá iritační index. Index fototoxicity se poté spočítá jako odečet iritačního indexu před ozáření od iritačního indexu po ozáření zvířete. Pokud index fototoxicity překročí hodnotu 0,6, tak se testovaná látka považuje za potenciálně fototoxickou. Tyto testy dobře zobrazují patofyziologické procesy fototoxicity, které jsou podobné u lidí, ale faktory jako vysoká cena testů, dlouhá doba trvání testu a stále větší zájem veřejnosti o etiku a wellfare zvířat způsobují ústup od těchto testů [8].

Jako *in vivo* se také používá lidský photopatch test a při tomto testu se stanovuje tzv. minimální dávka způsobující erytém (MED – minimal erythema dose) na lidských dobrovolnících. Tento test může být použit pouze po zhodnocení rizika po provedení *in vitro* testů a s dodržováním všech etických zásad [1].

### 7.2 *In vitro*

Pro svou vysokou specificitu a selektivitu je považován a doporučen podle normy OECD č. 432 jako hlavní *in vitro* test a jako alternativa pro *in vivo* testy test 3T3 Neutral Red Uptake

Phototoxicity test (3T3 NRU PT) a pokud látka není považována za fototoxickou, tak je to většinou jediný požadovaný test [1]. Tento test byl vyvinut jako alternativní metoda pro *in vivo* testy fototoxicity a předložen organizací ECVAM – European Centre for the Validation of Alternative Methods (Evropské centrum pro validizaci alternativních metod) a organizací COLIPA – European Cosmetics, Toiletry and Perfumery Association (Evropská kosmetická a parfumérská asociace) organizaci OECD [15]. Principem je srovnání cytotoxicity vybrané chemikálie, která je testována v přítomnosti a absenci necytotoxické dávky simulovaného UV záření. Cytotoxicita je poté vyjádřena jako redukce vychytaného barviva Neutral red buňkami. Tato redukce se měří 24 hodin po přidání chemikálie a ozáření. Neutral red je slabé kationické barvivo, které snadno prostupuje buněčné membrány a intracelulárně se akumuluje v lyzozomech. Změny na buněčném povrchu a na citlivé lizozomální membráně vedou ke křehkosti lyzozomů a dalším změnám, které se postupně stanou nevratnými. Takové změny způsobují snížení vázání barviva na buňku, a tudíž je možné od sebe rozlišit živé, poškozené nebo mrtvé buňky [9]. Pro tento test se používá buněčná linie BALB/3T3 zobrazená na obrázku 9, což jsou fibroblasty získané z embrya myši domácí starého 14 až 17 dní. BALB/3T3 byly vyvinuty jako jedna z mnoha linií v roce 1968, linie je hypotetraploidní a většina buněk této linie obsahuje telocentrické nebo akrocentrické chromozomy [9].



Obrázek 9: Vlevo: nízká hustota buněk BALB/3T3, vpravo: vysoká hustota buněk BALB/3T3, měřítko 100 $\mu$ m, [19]

Test 3T3 NRU PT bohužel často poskytuje falešně pozitivní výsledky a závěry z těchto zkoušek ne vždy odrážejí další typy *in vitro* riziku fototoxicity jako je fotogenotoxicita, fotoalergie nebo *in vivo* fototoxicity. Z toho důvodu jsou vyvinuty další testy a metody, které mohou jiným způsobem zhodnotit fototoxicitu. Mezi ně patří i ROS assay – test detekce reaktivních oxygenních molekul. Detekce vzniklých molekul singletového kyslíku probíhá spektrofotometrickým měřením běleného p-nitrosomethylanilinu a následným snížením jeho absorbance. Detekce vzniklých molekul superperoxidového aniontu je určena pozorováním redukce látky nitroblue tetrazolia. Test ROS je určen pro látky splňující určitá kritéria jako je specifická rozpustnost a další [18].

Mezi další *in vitro* používané testy se řadí test hemolýzy erytrocytů. Buněčné membrány jsou velmi citlivé na fotochemicky vzniklé ROS, tím pádem dochází k poškození buněk a k hemolýze, jejíž množstvím (konkrétně měřením optické hustoty látky) lze poté určit fotochemický potenciál testované látky [8].

Pro testování se také používají rekonstruované 3D modely lidské kůže, které se díky své bariérové funkci podobají lidské *epidermis*, nicméně jsou využívány spíše jako dodatečné testy pro ověřování výsledků z testu 3T3 NRU PT nebo pokud z nějakých důvodů není možné pro danou látku test 3T3 NRU PT využít [1]. Princip testu je podobný jako 3T3 NRU PT test, kdy se testuje životnost tkáně při přítomnosti a nepřítomnosti UV záření po přidání konkrétní látky [8].

### 7.3 *In chemico*

Za test *in chemico* lze považovat již výše zmíněný test ROS. Dále je mezi testy *in chemico* pro fototoxicitu možné řadit test, kdy je pozorováno poškození DNA. V tomto testu je použit plazmid, který je rozpuštěn v pufru s testovanou látkou. Směs je poté ozářena UV zářením a vzorky jsou podrobeny elektroforéze. Díky technologii založené na fluorescenci je určeno množství poškozených DNA řetězců, které závisí na testované látce a dávce ozáření. Tento test nevyžaduje živé buňky či tkáň a při testování fototoxicity může zvýšit variabilitu výsledků. Tyto metody jsou ale limitované pro nedostatek aktivního metabolismu, nemožnost použít ve vodě nerozpustné látky a neschopnost testu předpovědět fotogenotoxicitu, fotoalergii nebo fotokarcinogenocitu. Tento test je tedy limitovaný pouze pro posouzení nebezpečí a riziku, ne pro přesné určení fototoxického potenciálu [8].

## 8 FOTOTOXICITA A KOSMETIKA

### 8.1 Legislativa

V Evropské unii jsou kosmetické přípravky a ingredience v nich obsažené kontrolovány dle Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu o kosmetických přípravcích. V tomto nařízení je mimo jiné seznam látek povolených k použití do kosmetických přípravků včetně jejich názvu podle společné nomenklatury, maximální povolené koncentrace v přípravku připraveném k použití, podmínky použití a upozornění [20].

Pokyny o bezpečnosti kosmetických přípravků a ingrediencí jsou zakotveny v Pokynech k příloze I Nařízení (ES) č. 1223/2009 o zprávě o bezpečnosti kosmetického přípravku. Konkrétně fototoxicita je zařazena mezi cílové parametry, které mohou být relevantní pro toxikologický profil. Toxikologický profil se určuje pomocí stanovení nebezpečí a charakterizace odezvy na určitou dávku látky [21].

Po dodání veškerých informací potřebných k provedení posouzení bezpečnosti jednotlivých látek, směsí a konečného přípravku jako je např. kvalitativní a kvantitativní složení kosmetického přípravku, fyzikální a chemické vlastnosti, stabilita, mikrobiologická kvalita, toxikologický profil látek atd. může posuzovatel bezpečnosti složení přípravku přijmout, odmítnout nebo přijmout za určitých podmínek. Posuzovatel bezpečnosti musí být odborník s potřebnými znalostmi a odbornými vědomostmi k tomu, aby vypracoval přesné posouzení bezpečnosti, a to v souladu s kvalifikačními požadavky uvedenými v čl. 10 odst. 2 nařízení (ES) č. 1223/2009. Přípravek, který není v souladu s nařízením (ES) č. 1223/2009 musí být odmítnut a nesmí být uveden na trh [21].

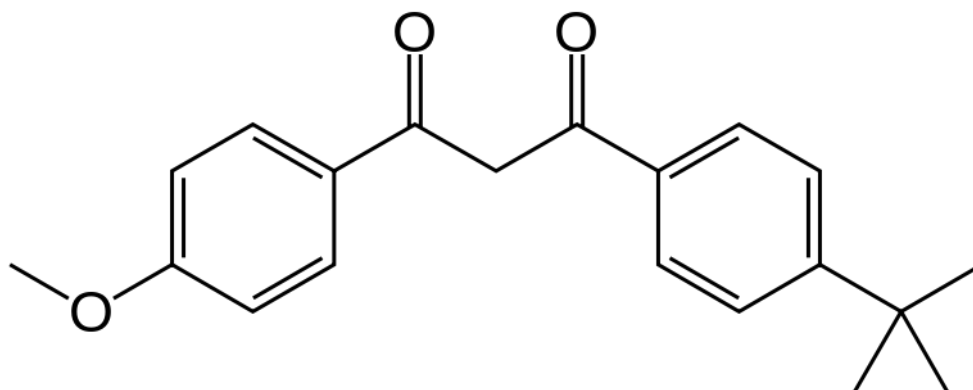
Organizace odpovědná za kontrolu kosmetických přípravků v USA je Úřad pro kontrolu potravin a léčiv FDA, ale Federální zákon o potravinách, léčivech a kosmetiky nepožaduje schválení produktů FDA předtím, než jsou vpuštěny na trh s výjimkou přídavných barviv, které nejsou určeny jako vlasová barviva z uhelného dehtu. Výrobky a ingredience musí být nicméně pro zákazníky bezpečné a sami výrobci nesou za bezpečnost produktů právní zodpovědnost [22].

## 8.2 UV filtry

UV filtry jsou chemické látky využívané jako ochrana kůže proti slunečnímu záření v přípravcích nejen na opalování. V kosmetice zabraňují degradaci produktů slunečním zářením a tím pádem zvyšují jejich dobu trvanlivosti, dále se přidávají jako aditiva do plastů, oblečení či pracích prášků. UV filtry se podle způsobu ochrany dělí na anorganické a organické [1].

Organické UV filtry, jsou lipofilní látky, které při expozici UV zářením změni svoji chemickou strukturu, absorbují UV záření a přeměňují ho na teplo. Z chemického hlediska jsou to nejčastěji aromatické látky schopné odštěpit nebo přijmout elektron, což je znázorněno na obrázku 10 a 11, kde je zobrazen strukturní vzorec avobenzonu a kyseliny p-aminobenzoové. Podle druhu absorbovaného UV záření se dělí na:

- UVA filtry – avobenzon, methyl anthranilát, tris-bifenyl triazin
- UVB filtry – 3-benzylidyn kamphor, 4-methylbenzylidyn kamphor, kyselina benzylidyn-kamphor sulfonová, PABA – kyselina 4-aminobenzoová, salicyláty (homosalát), cinnamáty (izoamyl p-methoxycinnamát, ethylhexyl methoxycinnamát), polysilikon-15, oktokrylen
- UVA i UVB filtry – benzofenon 3,4,5 [12]

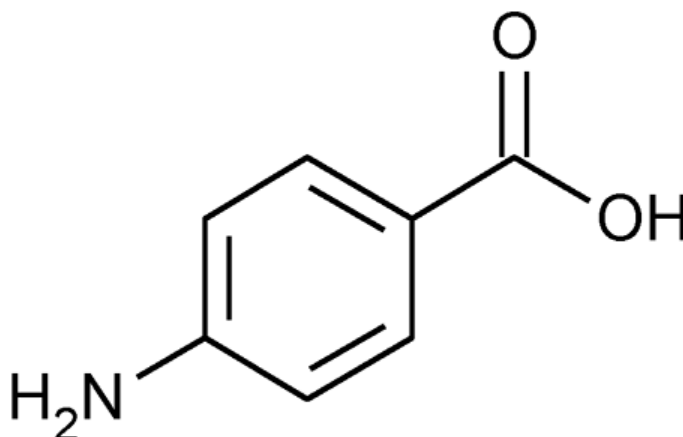


Obrázek 10: Strukturní vzorec avobenzonu

Výše zmíněné látky jsou příklady UV filtrů povolených v Evropské unii k použití do kosmetických přípravků v různé koncentraci k datu 11.4.2020. Dnešní kosmetické přípravky obsahují alespoň dva UV filtry, a to vždy jeden UVA a UVB filtr, zkombinované tak, aby jejich synergický efekt způsoboval maximální ochranu proti UV záření a aby byly přípravky fotostabilní. Reaktivní meziproducty fotonestabilního UV filtru, které jsou

v přímém kontaktu s kůží, se mohou chovat jako foto-oxidanty nebo způsobovat fototoxickou a fotoalergickou reakci [1].

Fototoxicita byla prokázána při *in vitro* testu 3T3 NRU PT a u 3D modelu lidské kůže u avobenzonu [1]. Nejvyšší povolená koncentrace avobenzonu v přípravku připraveného k použití v EU je 5 % [20].



Obrázek 11: Strukturní vzorec kyseliny p-aminobenzoové

Anorganické UV filtry rozptylují nebo odrážejí zároveň UVA i UVB záření a k absorpci dochází pouze v malém množství [12]. Mezi povolené anorganické UV filtry v Evropské unii se řadí oxid titaničitý a oxid zinečnatý včetně jejich nano forem [20].

Fototoxicita byla prokázána u oxidu titaničitého při testu na lidských keratinocytech po osvětlení UV zářením, během něhož došlo ke generaci ROS, které způsobili poškození buněk. Největší poškození vyvolaly částice menší než 25 nm. Čím větší částice byly, tím menší poškození vyvolaly. Testovány byly také dvě formy oxidu titaničitého: rutil a anatas. Testy na modifikaci rutil, která se často využívá jako tzv. titanová běloba, prokázaly menší fototoxicitu než minerální forma oxidu titaničitého anatas [23]. Nejvyšší povolená koncentrace oxidu titaničitého obou forem v přípravku připraveného k použití v EU je 25 %. Při použití nano formy jsou povoleny částice pouze splňující tyto podmínky: střední velikost částí musí být  $\geq 30$  nm, čistota nanočástic musí být  $\geq 99$  %, modifikace musí být rutil nebo rutil s obsahem nejvýše 5 % anatasu a další [20].



### 8.3 Antioxidanty

Mezi látky, které chrání pokožku pře UV zářením lze řadit také antioxidanty. Antioxidanty jsou látky, které již v nízkých koncentracích zabraňují nebo zpomalují oxidaci biologicky relevantních molekul buď specifickým potlačováním volných radikálů nebo chelatací redoxních kovů [24].

Do antioxidantů, které se používají hlavně v přípravcích proti stárnutí, patří deriváty vitamínů A, C a E. Mezi deriváty vitamínu A patří vitamin A palmitát neboli retinyl palmitát, který se přidává do kosmetiky pro jeho zvláčňující účinky na pokožku a působení proti abnormální keratinizaci pokožky. Jeho další vlastností je schopnost absorpce UV záření vlnové délky 300–350 nm s maximální absorpcí vlnové délky 325 nm, takže může být používán jako slabý UV filtr. Přes všechny jeho využití a výhody bylo prokázána jeho schopnost generovat ROS po expozici UV zářením a v kombinaci s výše zmíněným avobenzonem fototoxicitu avobenzonu zvyšoval. Z těchto důvodů je zařazen FDA a Národním toxikologickým programem (NTP – National toxicology program) jako hlavní látka pro studium fototoxicity a fotokarcinogenity [1]. V Evropské unii není použití vitamínu A ani jeho derivátů v kosmetických přípravcích legislativně omezeno [20].

### 8.4 Esenciální oleje

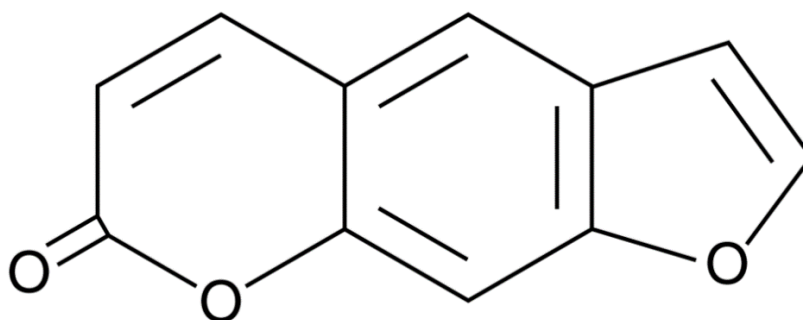
Esenciální oleje nemají přesnou kosmetickou definici, nicméně European Pharmacopoeia (Organizace pro kontrolu kvality léčiv) si osvojila definici podobnou, která vydala Mezinárodní organizace pro standardizaci pro aromatické přírodní ingredience. Jsou to vonné produkty většinou s komplexním složením, získané z botanicky definovaného čerstvého rostlinného materiálu destilací parou, suchou destilací nebo vhodným mechanickým procesem bez zahřívání. Esenciální oleje jsou většinou odděleny z vodné fáze fyzikálním procesem, který výrazně neovlivňuje jejich složení [26].

Esenciální oleje jsou chemikálie často využívané nejenom v kosmetice, přičemž látky, které mohou způsobovat fototoxicitu obsahují čeledě: Routovité (*Rutaceae*), Miříkovité (*Apiaceae*), Hvězdnicovité (*Asteraceae*) a Morušovníkovité (*Moraceae*). Esenciální oleje rostlin z těchto čeledí obsahují bohaté spektrum látek včetně tzv. kumarinů a do této skupiny patřících furokumarinů, které jsou intenzivně studovány jako fotoreaktivní látky [15].

### 8.4.1 Kumariny

Kumariny jsou fenolické látky nacházející se v rostlinách, které vznikly spojením benzenových a  $\alpha$ -pyronových jader. Rostliny kumariny nejspíše syntetizují jako jejich chemickou obranu proti predátorům a bakteriím. Některé studie navrhují, že slouží jako růstové regulátory nebo jsou pouze odpadními produkty, nicméně jejich funkce ještě nebyla zcela pochopena [15]. Vyskytující se v celé části rostliny, ale jejich nejvyšší koncentrace je v ovocných plodech a jejich přítomnost může být ovlivněna podmínkami prostředí a změnami ročního období. Množství kumarinů v esenciálních olejích záleží také na způsobu výroby oleje (v menší míře se nacházejí u destilovaných olejů než například u olejů lisovaných za studena) nebo na způsobu skladování [15].

Furokumariny jsou typem kumarinů charakterizované plochými polycyklickými molekulami, což je znázorněno na obrázku 12, kde je zobrazen strukturní vzorec psoralenu. Při ozáření UV zářením dojde k jejich fotoaktivaci a stávají se vysoce reaktivní vůči určitým částem buňky jako jsou proteiny a nukleové kyseliny, kde formují komplexy mezi páry bází. Mezi fotoaktivní furokumariny patří psoralen, 8-methoxypsoralen (8-MOP, xantotoxin) a 5-methoxypsoralen (5-MOP, bergapten). angelicin (isoproralen), citropten, bergamottin, herniarin a další [15].



Obrázek 12: Strukturní vzorec psoralenu

Psoraleny jsou schopny způsobovat fotomodifikace různých molekul. Na rozdíl od jiných fotoaktivních látek, psoraleny primárně působí na DNA a způsob interakce lze rozdělit na dvě fáze. Nejprve neozářený psoralen v základním stavu přejde do duplexu nukleové kyseliny, po ozáření UVA zářením dojde k excitaci psoralenových molekul a vytvoří se psoralen-DNA adukty s pyrimidinovými bázemi, a to hlavně s thyminem, ale i s cytosinem a uracilem. Toto poškození DNA způsobuje další problémy jako je mutagenita a rakovina kůže [15].

V evropské unii je použití furokumarinů s výjimkou jejich přirozeného obsahu v použitých přírodních esencích zakázáno. V přípravcích na ochranu proti slunečnímu záření a v přípravcích pro zhnědnutí kůže musí být obsah furokumarinů menší než 1 mg/kg [20].

Furokumariny nejsou jediné látky v rostlinách zodpovědné za fototoxicitu. Mezi možné fotoaktivní látky patří například i sekundární metabolit rostlin  $\alpha$ -terthienyl [15].

#### 8.4.2 Bergamotový olej

Esenciální olej z bergamotu (*Citrus bergamia*) je v kosmetice často používaná ingredience jako vonná látka. Tento olej přirozeně obsahuje fotoaktivní furokumariny jako je bergapten a 5 a 8-methoxypsoralen [15].

Bylo provedeno několik studií, jejichž výsledky prokazovali fototoxicitu u bergamotového oleje. Fototoxicita byla prokázána například při *in vitro* testu fotohemolýzy, kdy byla použita suspenze lidských erytrocytů. Suspenze obsahující testovanou látku byla ozářena zdrojem obsahující UVA i UVB záření. Výsledky studie ukazovali, že bergamotový olej indukoval po ozáření UVA záření fotohemolýzu. Kromě tohoto oleje fotohemolýzu ve studii způsobovali také olej limetový, pomerančový a citronový [28].

Prokázaná fototoxicita toho oleje vedla k zákazu jeho používání do kosmetických přípravků nebo léčiv pro topické použití. Aby byla zajištěna bezpečnost, bylo navrženo odstranění bergamotu a dalších fototoxických látek z tohoto oleje destilací. Výsledkem je používání tzv. furocoumarin-free (bez furokumarinů) nebo bergapten-free (bez bergaptenu) olejů. Dále IFRA – International Fragrance Association (Mezinárodní organizace pro parfémy) navrhla maximální koncentraci 0,4 % oleje pro leave-on kosmetické přípravky pro použití na kůži. I přes bezpečnostní opatření zůstává bergamotový olej potenciálním nebezpečím při použití v aromaterapii, kde může dojít k expozici aerosolizovaného oleje [15].

#### 8.4.3 Další esenicální oleje

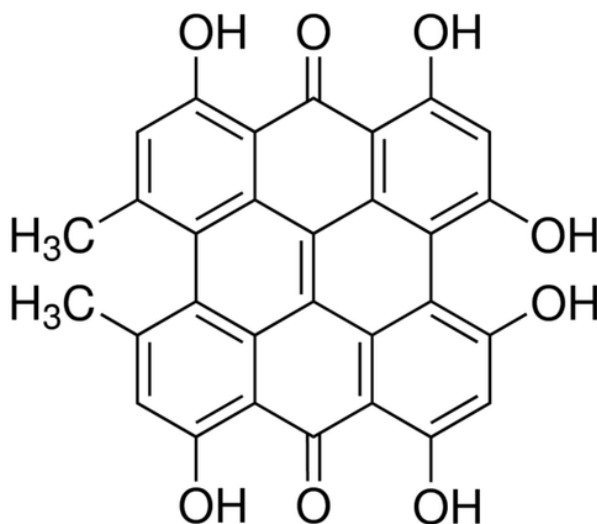
Jak už bylo výše zmíněno mezi fototoxické oleje se řadí i olej citronový, limetový a pomerančový. V citronovém oleji, který se získává z plodů citrusu limonového (*Citrus limon*) byla ve studii prokázána přítomnost fototoxického bergaptenu a oxypeucedaninu. Nicméně oxypeucedanin vykazoval pouze čtvrtinovou fototoxicitu oproti bergaptenu. Koncentrace těchto furokumarinů v oleji se také lišila v závislosti na geografické poloze, kde byly plody sklizeny [15].

Olej z limety (*Citrus aurantifolia*) obsahuje ve slupce a v dužině ovoce kumariny schopné vyvolávat fototoxicitu jako je limettin, bergapten, isopimpinellin, xanthotoxin a psoralen, přičemž limettinu obsahuje nejvíce a psoralenu nejméně a jejich množství se liší podle toho, jestli jde o limetu perskou nebo mexickou [30].

Pomerančový olej se získává ze slupky pomerančovníku čínského (*Citrus sinensis*). Z více jak 90 % je složen z d-limonenu. Při testech na myších fibroblastech bylo použita malá koncentrace oleje – nižší než 0,0464 % obj. %, a i při této nízké koncentraci byl olej považován za fototoxický [31].

V esenciální oleji anděliky lékařské (*Angelica Archangelica*) se nacházejí fototoxické furokumariny jako je 5- a 8-methoxypsoralen. Nicméně do tohoto data nebyla provedena studie přesně dokazující fototoxicitu tohoto oleje [15].

Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*) se využívá pro produkci třezalkového oleje, ze kterého je možné dále destilovat esenciální olej. Esenciální olej se může topicky aplikovat čisté formě nebo rozptýlený v jiném oleji. Pro přítomnost látky hypericinu, jehož struktura je zobrazena na obrázku 13, a který patří mezi prokázané fotoaktivní látky, mohou být produkty z třezalky potenciálně fototoxické [15].



Obrázek 13: Strukturní vzorec hypericinu

## 8.5 Další kosmetické ingredience

Mezi ingredience způsobující fototoxicitu patří také vonné látky, jiné než esenciální oleje. Při již výše zmíněné studii, kdy byl proveden *in vitro* test pro fotohemolýzu, vykazoval fototoxický efekt při ozáření UVA i UVB zářením oakmoss. Oakmoss je extrahován z lišejníku *Evernia prunastri*, který roste na kmenech a větvích dubu a používá se do formulací parfémů jako vonná látka [28].

Další mírný fototoxický efekt byl prokázán v té samé studii po ozáření UVA zářením u vonných látek benzyl alkoholu,  $\alpha$ -amyl cinnamaldehydu, oleje z listu vavřínu vznešeného (*Laurus nobilis*) a po ozáření UVB zářením u látek  $\alpha$ -amyl cinnamaldehydu, hydroxycitronellalu, cinnamil alkoholu, cinnamic aldehydu a opět u oleje z vavřínu vznešeného [28].

Mezi další látky, které mají fototoxický potenciál patří silymarin. Silymarin je standardizovaný extrakt ze semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*) a jeho hlavní složka silybin je využíván jako aktivní látka v oblasti doplňků stravy, kosmetiky a dermatologie. Silybin a další komponenty jako je isosilybin, silychristin, silydianin a 2,3-dehydrosilybin patří do skupiny tzv. flavonolignanů. Byl proveden 3T3/NRU test a výsledkem byla identifikace 2,3-dehydrosilybinu jako látky s fototoxickým potenciálem [32].

Mezi barviva používané v kosmetice vykazující fototoxicitu se řadí tzv. disperse blue 7 [33]. Barvivo disperse blue 7 je v Evropské unii zakázáno, pokud se používá jako látka v přípravcích k barvení vlasů [20].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 9 METODIKA

V rámci bakalářské práce byla testována fototoxicita vybraných látek podle normy OECD 432 na buněčné linii BALB/3T3, klon 31 s určitými modifikacemi, kdy místo testu příjmu barviva neutrální červen byl použit test MTT.

### 9.1 Testované látky

Pro testování fototoxicity byly vybrány látky běžně používané v kosmetickém průmyslu, které byly popsány v teoretické části. Testované byly přírodní esenciální oleje a UV filtry. Konkrétně se jednalo o následující esenciální oleje: Grep (INCI: Citrus paradisi; Salus, Česká republika), Citron (INCI: Citrus limon; Salus, Česká republika), Kafrovník (INCI: Cinnamomum camphora; Salus, Česká republika), Máta peprná (INCI: Mentha piperita; Salus, Česká republika), Bergamot (INCI: Citrus aurantium; Slow-natur, Slovenská republika), Mandarinka (INCI: Citrus reticulata; Slow-natur, Slovenská republika). Z UV filtrů byly vybrány filtry avobenzon (Sigma Aldrich, USA) a oktinoxát (Sigma Aldrich, USA).

### 9.2 Použité buněčné linie

Pro testování byla použita fibroblastová buněčná linie BALB/3T3, klon 31 (ECACC 86110401). Jako kultivační medium bylo použito DMEM (Biosera, Francie) doplněno o 10% novorozenecí telecí sérum (Biosera, Francie), 2mM glutamin (Biosera, Francie), 100 U mL<sup>-1</sup> penicilin a streptomycin (Biosera, Francie). Inkubace buněk probíhala v inkubátoru HeraCell 150i (Trigon, Česká republika) při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub> za stálé vlhkosti.

### 9.3 Použité přístroje

Flow box HeraSafe KS (Thermo Fisher, USA), inkubátor HeraCell 150i (Trigon, Česká republika), solární simulátor SOL 500 (Honle, Německo), centrifuga 5702 R (Eppendorf, Německo), vodní lázeň (Memmert, Německo), ultrazvuková lázeň, spektrofotometr Infinite M200 PRO (Tecan, Švýcarsko).

### 9.4 Příprava testovaných látek

Testov esenciální oleje ébyly rozpuštěny ve fosfátovém pufru (PBS, Biosera, Francie). Oleje nejsou mísitelné s vodou a pufr PBS je na bázi vody, tudíž byly vzorky homogenizovány 15

minut v ultrazvukové lázni, aby došlo ke vzniku emulze. Vzorky byly připraveny v koncentracích: 1; 0,5; 0,1; 0,05 a 0,01 obj. %.

UV filtry byly rozpuštěné v oleji také za pomoci ultrazvukové lázně. Nejvyšší použitá koncentrace byla stanovena podle Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009, kde v příloze VI je uvedena nejvyšší povolena koncentrace UV filtru v kosmetickém přípravku. Avobenzon byl testován v koncentracích 5, 1 a 0,5 hm. %. Oktinoxát v koncentracích 10, 5 a 1 obj. %.

## 9.5 Podmínky ozáření

Podle OECD normy je dávka záření 5 J/cm<sup>2</sup> necytotoxická pro použitou buněčnou linii a dostatečně silná pro excitaci chemikálií k vyvolání fototoxické reakce. Pro docílení této dávky se čas ozáření spočítá jako [9]:

$$t = \frac{\text{iradiační dávka (J}\cdot\text{cm}^{-2}) \cdot 1000}{\text{iradiace (mW}\cdot\text{cm}^{-2}) \cdot 60} \text{ [min]} \quad (1), [9]$$

Reálná doba ozáření byla: 45 minut.

## 9.6 Příprava buněk a iradiace

První den byla do 96- jamkových mikrotitračních destiček (TPP plastic, Švýcarsko) pro tkáňové kultury napipetovaná buněčná suspenze 1x10<sup>5</sup> buněk/ml kultivačního média. Do každé jamky bylo nanášeno 100 µl suspenze, přičemž se obvodové jamky destičky ponechali volné. Pro každou testovanou koncentraci látky byly připraveny dvě destičky, přičemž na každé destičce byla každá koncentrace ve 4 opakováních. Buňky byly poté 24 hodin ponechány v inkubátoru. Tato doba inkubace umožnila buňkám adhezi a exponenciální růst.

Druhý den se po inkubaci dekantovalo kultivační medium a buňky byly jemně opláchnuty 150 µl fosfátovým pufrům použitého pro inkubaci. Do vypláchnutých jamek bylo přidáno 100 µl pufru obsahující požadovanou koncentraci testované chemikálie a s testovanou látkou byly inkubovány ve tmě 60 minut. Z každé ze dvou destiček byla náhodně jedna vybrána pro určení cytotoxicity (-Irr) jako kontrolní destička a jedna pro určení fotocytotoxicity (+Irr). Pro provedení expozice +Irr byly při pokojové teplotě skrz víčko ozářeny buňky 45 minut. Neozářené destičky s buňkami (-Irr) byly ponechány při pokojové teplotě na tmavém místě stejně dlouhou dobu jako trvalo ozařování buněk. Ihned po ozáření byl



testovaný roztok dekantován a buňky byly dvakrát promyty 150  $\mu$ l pufovaného roztoku použitého pro inkubaci ale neobsahující testované látky. Pufr byl nakonec nahrazen kultivačním médiem a buňky byly ponechány přes noc v inkubátoru. Následně byla stanovena buněčná životaschopnost pomocí MTT testu.

## 9.7 MTT test

MTT test je test viability buněk založený na schopnosti buněk přeměňovat na mitochondriální membráně žlutý rozpustný MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) na nerozpustný fialový formazan. Test je poté spektrofotometricky vyhodnocen a čím vyšší je naměřená absorbance roztoku, tím vyšší je množství živých buněk.

Buňky byly opláchnuty pomocí 150  $\mu$ l ohřátého pufru. Pufr byl poté odstraněn jemným vyklepáním z destiček. Do jamek bylo přidáno 100  $\mu$ l MTT o koncentraci 0,5 mg/ml v médiu a buňky byly 4 hodiny inkubovány. Po inkubaci bylo médium odstraněno a vzniklý formazan byl rozpuštěný v DMSO (dimethylsulfoxid). Po patnácti minutách byla změřena absorbance na přístroji Infinite M200 při vlnové délce 540 nm. Jako reference byly použity buňky kultivované pouze v médiu a u nich byla měřena absorbance při 690 nm.

## 9.8 Výsledky testování

Byla zjištěna životaschopnost buněk pomocí testu MTT. Statistické rozdíly relativní buněčné viability mezi ozářenými a neozářenými buňkami byly vyhodnoceny pomocí Tukeyho testu.

Pro určení fototoxicity látek je podle OECD normy nutné spočítat PIF – Photo-Irradiation-Factor (Foto-iradiační faktor) [9].

$$\text{PIF} = \frac{\text{IC}_{50}(-\text{Irr})}{\text{IC}_{50}(+\text{Irr})} \quad (2), [9]$$

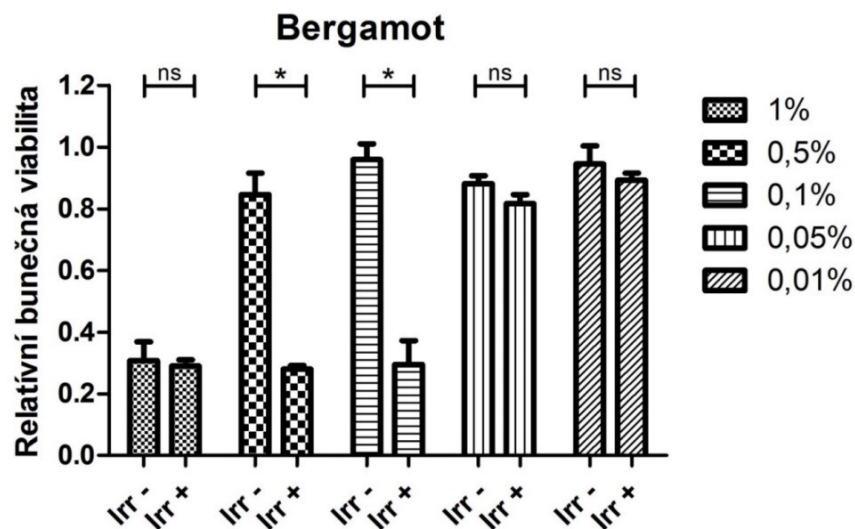
$\text{IC}_{50}(-\text{Irr})$  poloviční maximální inhibiční koncentrace bez ozáření

$\text{IC}_{50}(+\text{Irr})$  poloviční maximální inhibiční koncentrace s ozářením

Poloviční maximální inhibiční koncentrace určuje množství látky, které je nutné ke zpomalení biologického procesu o polovinu. Pro přesné stanovení  $\text{IC}_{50}$  je nutné naměření většího rozsahu koncentrací testovaných látek, což z důvodu pandemie onemocnění

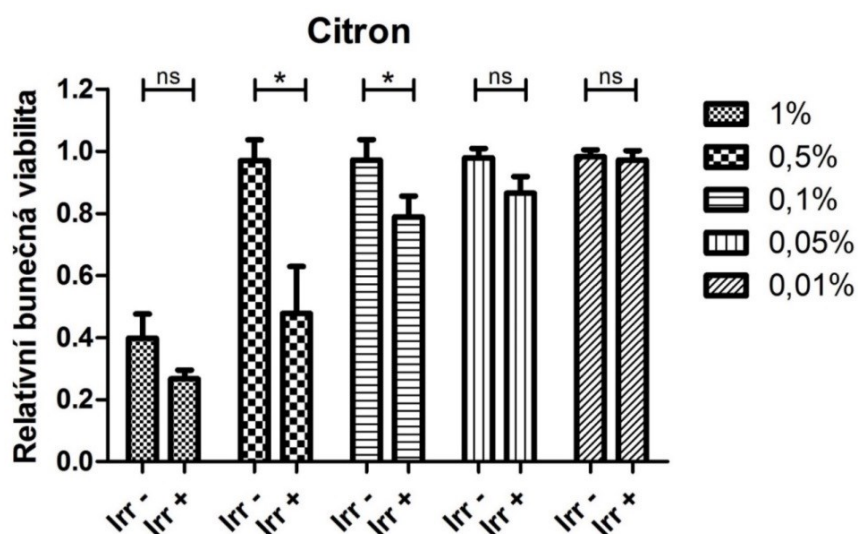
COVID-19 nebylo možné provést, tudíž také nebylo možné přesně určit fototoxický potenciál látek.

Při testování fototoxicity bergamotového esenciálního oleje došlo po ozáření ke statisticky významnému rozdílu ve snížení relativní viability buněk u koncentrací 0,5 a 0,1 obj. % oproti neozářené kontrole, tyto rozdíly jsou graficky znázorněné na obrázku 14. Při koncentracích 1; 0,05 a 0,01 obj. % nedošlo po ozáření ke staticky významné změně relativní viability buněk oproti neozářené kontrole. Při koncentraci 1 obj. % byla ale buněčná viabilita neosvícených buněk tak nízká, že k vysoké redukci viability buněk po osvětlení dojít nemohlo.



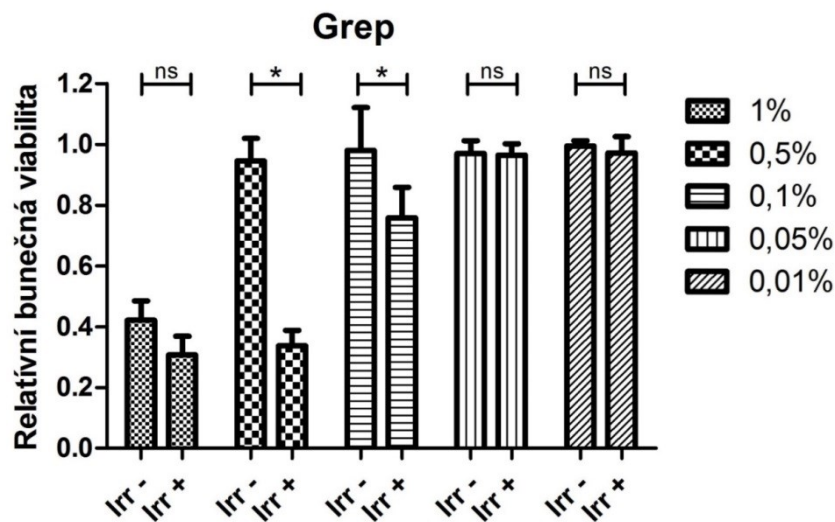
Obrázek 14: Graf závislosti relativní buněčné viability na koncentraci bergamotového esenciálního oleje při Irr+ (ozáření) a Irr- (neozáření), ns – mezi vzorky není statisticky významný rozdíl, \* – mezi vzorky je statisticky významný rozdíl při hladině významnosti  $p < 0,05$

Z obrázku 15 lze vidět, že při testování fototoxicity citronového esenciálního oleje po iradiaci UV lampou se u koncentrací 0,5 a 0,1 obj. % významně snížila relativní buněčná viabilita oproti neozářené kontrole, naopak při koncentracích 1; 0,05 a 0,01 obj. % nedošlo po ozáření ke staticky významné změně relativní viability buněk oproti kontrole bez ozáření. Při koncentraci 1% se ale opakoval stejný efekt jako při oleji z bergamotu, tedy že buněčná viabilita osvětlených i neosvětlených buněk byla velmi nízká.



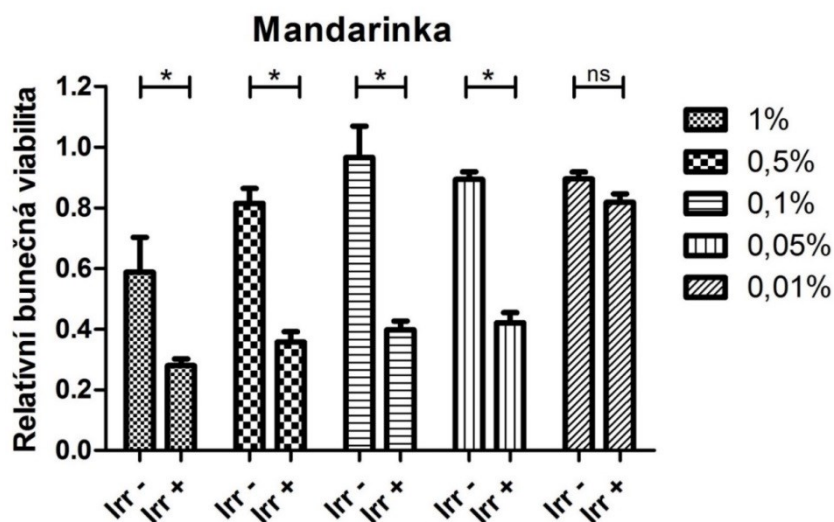
Obrázek 15: Graf závislosti relativní buněčné viability na koncentraci citronového esenciálního oleje při Irr+ (ozáření) a Irr- (neozáření), ns – mezi vzorky není statisticky významný rozdíl, \* – mezi vzorky je statisticky významný rozdíl při hladině významnosti  $p < 0,05$

Na obrázku 16 je zobrazená buněčná viabilita osvícených a neosvícených buněk s různou koncentrací grepového esenciálního oleje. Z grafu je patrné, že při koncentraci 0,05 obj. % a méně nedochází ke statisticky významnému rozdílu mezi buňkami vystavenými a nevystavenými UV záření. Významný statistický rozdíl nebyl zaznamenán ani při nejvyšší testované koncentraci (1 obj. %), ale stejně jako při předchozích dvou testovaných olejích (bergamot a citron) zde byly velmi nízké hodnoty viability buněk. Naopak, ke statisticky významnému rozdílu mezi vystavením a nevystavením UV záření došlo při koncentraci 0,5 a 0,1 obj. %.



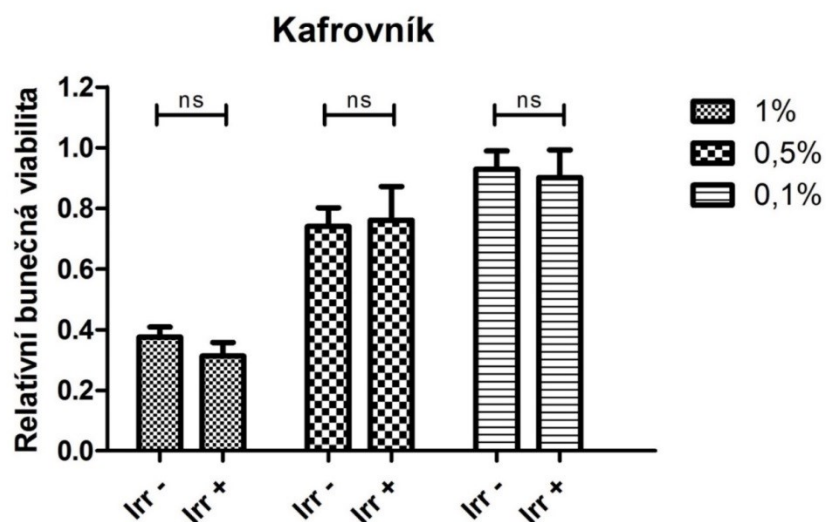
Obrázek 16: Graf závislosti relativní buněčné viability na koncentraci grepového esenciálního oleje při Irr+ (ozáření) a Irr- (neozáření), ns – mezi vzorky není statisticky významný rozdíl, \* – mezi vzorky je statisticky významný rozdíl při hladině významnosti  $p < 0,05$

Dalším testovaným esenciálním olejem, byl olej mandarinkový. Výsledky tohoto testování jsou znázorňeny na obrázku 17. Na rozdíl od přechodných esenciálních olejů z citrusových plodů, které patří stejně jako mandarinka do čeledi routovité se statisticky významně snížila buněčná viabilita na rozdíl od buněk, které nebyly vystaveny UV záření u většího množství koncentrací, a to u koncentrací 1; 0,5; 0,1 a 0,05 obj. %. Jediná koncentrace, kdy ke statisticky významnému rozdílu nedošlo byla nejnižší použitá koncentrace 0,01 obj. %.



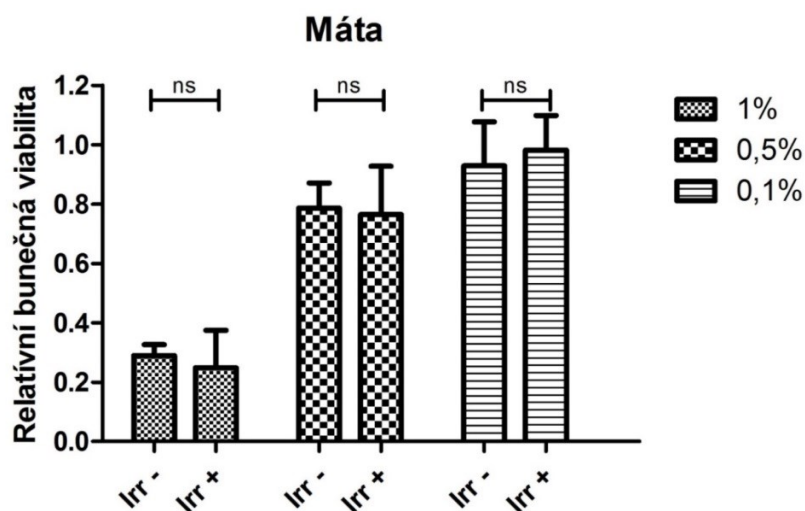
Obrázek 17: Graf závislosti relativní buněčné viability na koncentraci mandarinkového esenciálního oleje při Irr+ (ozáření) a Irr- (neozáření), ns – mezi vzorky není statisticky významný rozdíl, \* – mezi vzorky je statisticky významný rozdíl při hladině významnosti  $p < 0,05$

Při testování fototoxicity kafrovníkového esenciálního oleje nedošlo při žádné koncentraci po ozáření ke staticky významnému změně relativní viability buněk oproti neozářené kontrole, a to ani při použití nejvyšší koncentrace 1 obj. %. Graficky jsou tyto výsledky zobrazeny na obrázku 18.



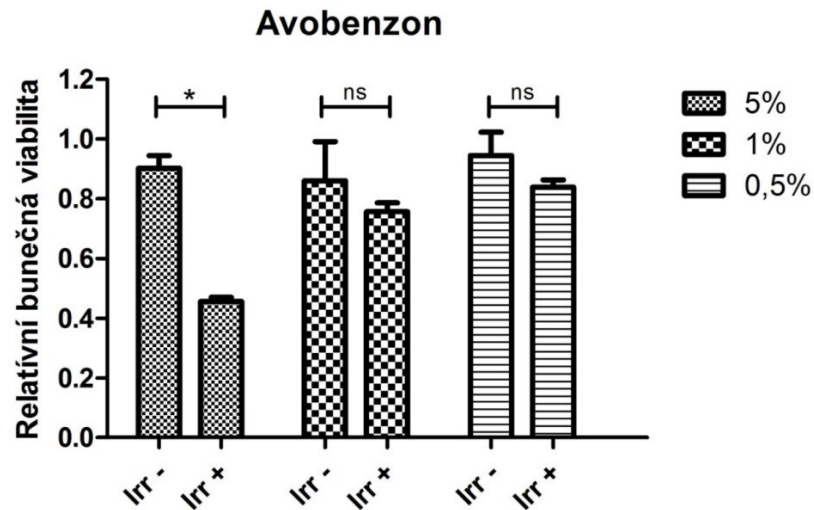
Obrázek 18: Graf závislosti relativní buněčné viability na koncentraci kafrovníkového esenciálního oleje při Irr+ (ozáření) a Irr- (neozáření), ns – mezi vzorky není statisticky významný rozdíl, \* – mezi vzorky je statisticky významný rozdíl při hladině významnosti  $p < 0,05$

Na obrázku 19 lze vidět, že stejně jako u kafrovníkového oleje se při ani jedné z použitých koncentrací mátového olej po iradiaci buněk nesnížila viabilita natolik, aby její redukce byla statisticky významná. Při použití nejvyšší koncentrace 1 obj. % byla buněčná živostnost velmi malá stejně jako u předchozího oleje bergamotového, citronového a grepfruitového.



Obrázek 19: Graf závislosti relativní buněčné viability na koncentraci mátového esenciálního oleje při Irr+ (ozáření) a Irr- (neozáření), ns – mezi vzorky není statisticky významný rozdíl, \* – mezi vzorky je statisticky významný rozdíl při hladině významnosti  $p < 0,05$

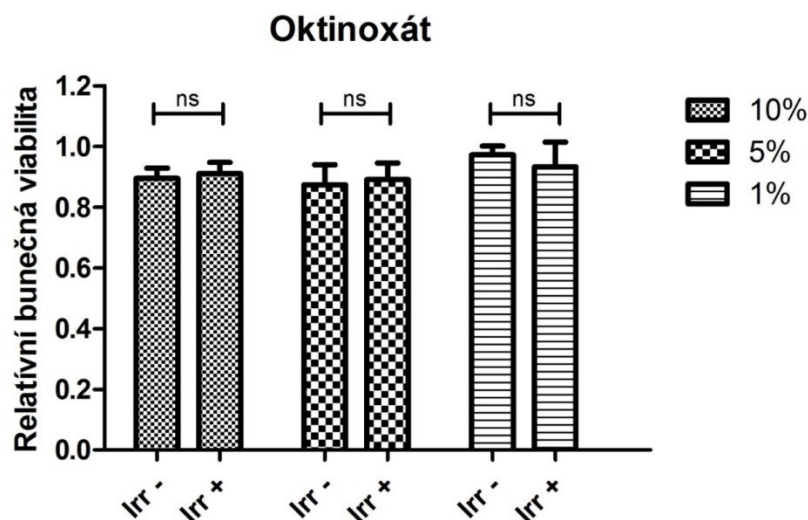
Jako první z UV filtrů byla testován na fototoxicitu avobenzon. Jako jediná z koncentrací, u které se statisticky snížila viabilita ozářených buněk oproti buňkám, které ozářené nebyly, byla nejvyšší koncentrace, a to 5 hm. %, což lze vidět v grafu na obrázku 20.



Obrázek 20: Graf závislosti relativní buněčné viability na koncentraci avobenzonu při Irr+ (ozáření) a Irr- (neozáření), ns – mezi vzorky není statisticky významný rozdíl, \* – mezi vzorky je statisticky významný rozdíl při hladině významnosti  $p < 0,05$



Jako druhý UV filtr byl testován oktinoxát. Z obrázku 21 lze vidět, že žádná z použitých koncentrací nezpůsobila statisticky významné snížení buněčné životnosti po ozáření UV lampou.



Obrázek 21: Graf závislosti relativní buněčné viability na koncentraci avobenzonu při Irr+ (ozáření) a Irr- (neozáření), ns – mezi vzorky není statisticky významný rozdíl, \* – mezi vzorky je statisticky významný rozdíl při hladině významnosti  $p < 0,05$

## 9.9 Diskuse

V rámci bakalářské práce byly testované látky běžně používané jako ingredience do kosmetických přípravků. Vzhledem k tomu, že se v rámci UTB jednalo o zavedení a optimalizaci nové metodiky, byly vybrány takové látky, jejichž fototoxicita byla předmětem jiných studií a zároveň takové látky, které prokázaně vykazují a nevykazují fototoxicitu. Využití těchto látek je popsáno v teoretické části této bakalářské práce v kapitolách 8.2 a 8.4. Pro svůj fototoxický účinek jsou známé citrusové esenciální oleje [15, 27, 31]. Z citrusových olejů, které byly v rámci testování použité, byl vybrán olej bergamotový, citronový, grepový a mandarinkový. Jako oleje, které by fototoxicitu neměli vykazovat byl vybrán olej mátový a kafrovníkový.

Výsledky testování všech esenciálních citrusových olejů dopadly podobně. Pro testování byly použity koncentrace 0,01–1 obj. %. V případě bergamotového, citronového i grapefruitového oleje nebyl při koncentraci 1 % zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi ozářenými a neozářenými vzorky, ale buněčná životnost byla velmi nízká, (přibližně 40 % a méně), tudíž nemůže docházet před a po ozáření k velkým rozdílům viability. Naopak při koncentraci citrusových olejů 0,5 a 0,1 obj. % došlo ke statisticky významnému rozdílu viability mezi ozářenými a neozářenými buňkami, z čehož vyplývá, že při těchto koncentracích docházelo k fototoxickému efektu. U bergamotového, citronového a grapefruitového oleje se tento rozdíl ztrácel při koncentraci 0,05 obj. %. Olej kafrovníkový a mátový nevykazovaly statisticky významný rozdíl ani u jedné použité koncentraci a zároveň viabilita buněk byla v celé škále cytotoxicity (od silně cytotoxického efektu – menší jak 40 % viability buněk, až po necytotoxický efekt – více jak 80 % viability buněk), nebylo nutné tedy testovat další koncentrace. Jak už bylo zmíněno výše, tyto oleje nejsou prokázaně fototoxické, což se v rámci bakalářské práce potvrdilo.

Fototoxicita vzniká působením UV záření na fotoaktivní látku, což u kosmetických přípravků v praxi znamená vystavení kůže slunečnímu záření, na kterou byl aplikován přípravek obsahující fotoaktivní látku. Nejčastěji se bezprostředně po aplikaci vystavují slunečnímu záření přípravky na opalování obsahující UV filtry. UV filtry byly také proto vybrány jako další chemikálie pro testování, a to konkrétně avobenzon a oktinoxát. Nejvyšší použité koncentrace u obou UV filtrů odpovídaly nejvyšší legislativně povolené koncentraci této látky do kosmetických přípravků, a to konkrétně u oktinoxátu 1; 5 a obj. 10 obj. % a u avobenzonu 0,5; 1 a 5 hm. %. Při testování oktinoxátu nedošlo k žádnému statisticky významnému rozdílu mezi ozářenými a neozářenými buňkami, což znamená, že tento UV filtr nevykazoval známky fototoxicity. U testování avobenzonu docházelo naopak při nejvyšší použité koncentraci 5 hm. % k velkému rozdílu mezi buňkami, které byly vystavené a těmi, které nebyly vystavené UV záření. Tyto výsledky jsou shodné s výsledky vědeckých studií, které ukazují, že oktinoxát nevykazuje fototoxicitu, zatímco u avobenzonu byla fototoxicita prokázána [1, 34].

## ZÁVĚR

V teoretické části práce byla popsána fototoxicita a její projevy. Vzhledem k tomu, že se fototoxicita nejčastěji projevuje změnami na kůži, tak je na začátku práce popsána stavba kůže, na kterou navazuje popis buněčných linií, které se v kůži nachází. Dále je práce zaměřena na samotnou fototoxicitu, kdy je popsán nejen mechanismus a projevy, ale také léčba a testování fototoxicity. Konec teoretické části je věnovaný fototoxickým látkám používaných jako ingredience do kosmetických přípravků a s tím související legislativě.

Cílem praktické části bakalářské práce bylo stanovit fototoxicitu aktivních látek, které se používají v kosmetickém průmyslu. Nejednalo se pouze o samotné stanovení, ale také o zavedení metodiky pro stanovení fototoxicity za použití buněčné linie a také o optimalizaci této metody. Z tohoto důvodu byly pro testování vybrané látky, které by měli a které by neměli vykazovat fototoxický efekt. Konkrétní vybrané chemikálie byly esenciální oleje bergamotový, citronový, grepový, mandarinkový, kafrovníkovaný a mátový, a také UV filtry avobenzon a oktinoxát. Pro testování byla použita buněčná linie BALB/3T3 klon 31, na kterou byla daná látka aplikovaná. Buněčná linie byla dále vystavena UV záření a test byl vyhodnocen jako určení rozdílu životaschopnosti buněk mezi ozářenými a neozářenými buňkami s aplikovanou testovanou látkou.

Kvůli pandemii COVID-19 nebylo možné změřit větší rozsah koncentrací testovaných látek, tudíž nebylo možné spočítat PIF faktor a určit fototoxicitu látek přesně. Díky rozdílu viability mezi buňkami, které byly a nebyly vystavené UV záření lze ale určit, které látky fototoxicitu vykazovali.

Všechny testované citrusové oleje měli fototoxický účinek. Výsledky všech 4 olejů byly podobné, ale mandarinkový olej přestal vykazovat fototoxicitu až při koncentraci 0,01 obj. %, zatímco ostatní citrusové oleje přestali vykazovat fototoxický efekt už při koncentraci 0,05 obj. %. Kafrový a mátový esenciální olej oproti výše zmíněným citrusovým olejům fototoxický účinek neměli, což odpovídá výsledkům z vědeckých studií.

Při testování UV filtrů vykazoval fototoxicitu avobenzon, a to pouze při použití nejvyšší koncentrace 5 hm. %. Naopak oktinoxát fototoxicitu nevykazoval při žádné použité koncentraci. Tyto výsledky jsou opět v souladu s předešlými vědeckými studiemi.

Z uvedených výsledků je možné konstatovat, že se metodiku podařilo optimalizovat, tudíž byl cíl bakalářské práce splněný, tato metodika může být tedy na UTB využívána.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] GASPAR, Lorena R., Julian THARMANN, Patricia M.G.B Maia CAMPOS a Manfred LIEBSCH. Skin phototoxicity of cosmetic formulations containing photounstable and photostable UV-filters and vitamin A palmitate. *Toxicology in vitro* [online]. 2013, **27**(1), 418-425 [cit. 2019-10-19]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.08.006>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088723331200210X>
- [2] GONÇALO, Margarida. Phototoxic and Photoallergic Reactions. *Contact Dermatitis* [online]. 2012, 1-14 [cit. 2019-10-22]. DOI: 10.1007/978-3-642-03827-3\_18. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/7485/fbd2f2aaf203567f9eab40b131dc9558bb52.pdf>
- [3] SETO, Yoshiki, Hiroko OHTAKE, Masashi KATO a Satomi ONOUE. Phototoxic Risk Assessments on Benzophenone Derivatives: Photobiochemical Assessments and Dermal Cassette-Dosing Pharmacokinetic Study. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [online]. 2015, **354**(2), 195-202 [cit. 2019-10-19]. DOI: <https://doi.org/10.1124/jpet.115.223644>. Dostupné z: <http://jpet.aspetjournals.org/content/jpet/354/2/195.full.pdf>
- [4] KOLARSICK BS, Paul A. J., Maria Ann KOLARSICK, MSN, ARNP-C a Carolyn GOODWIN, APRN-BC, FNP. Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* [online]. 2011, **3**(4), 203-213 [cit. 2020-04-03]. DOI: 10.1097/JDN.0b013e3182274a98. Dostupné z: [https://pdfs.semanticscholar.org/e438/ad9b53321bc162acd89e0d057a8db0f4d67d.pdf?\\_ga=2.10930742.364052562.1585906849-817534807.1585906849](https://pdfs.semanticscholar.org/e438/ad9b53321bc162acd89e0d057a8db0f4d67d.pdf?_ga=2.10930742.364052562.1585906849-817534807.1585906849)
- [5] TOBIN, Desmond J. Biochemistry of human skin—our brain on the outside. *Chemical Society Reviews* [online]. 2006, **1**(35), 52-67 [cit. 2019-10-27]. DOI: 10.1039/B505793K. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2006/cs/b505793k>
- [6] MATTER, Karl a Maria Susana BALDA. Epithelial tight junctions, gene expression and nucleo-junctional interplay. *Journal of cell science* [online]. 2007, **120**(9), 1505-1511 [cit. 2019-10-25]. DOI: 10.1242/jcs.005975. Dostupné z: <https://jcs.biologists.org/content/120/9/1505>

- [7] POWELL, Jennifer. Skin physiology. *Women's Health Medicine* [online]. 2004, **3**(3), 130-133 [cit. 2019-10-27]. DOI: <https://doi.org/10.1383/wohm.2006.3.3.130>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect-com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S1744187006701834>
- [8] KYURI, Kim, Park HYEONJI a Lim KYUNG-MIN. Phototoxicity: Its Mechanism and Animal Alternative Test Methods. *Toxicological Research* [online]. 2015, **31**(2), 97-104 [cit. 2019-10-27]. DOI: 10.5487/TR.2015.31.2.097. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4505355/>
- [9] *OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS* [online]. 2-3 [cit. 2019-07-09]. Dostupné z: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071162-en.pdf?expires=1586593958&id=id&accname=guest&checksum=B1276D763A116D31AA45EADB4E2FDE79>
- [10] D. JAMES, William, Dirk M. ELSTON a Timothy G. BELGER. *Andrews' Diseases of the Skin: Clinical Dermatology* [online]. Třinácté vydání. Elsevier, 2019, 28 [cit. 2020-04-10]. ISBN 9780323551892. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?id=Ef\\_HllqkdqEC&pg=PA28&lpg=PA28&dq=phototoxicity,+fluorescence+phosphorescence&source=bl&ots=BsbU14Z5GT&sig=ACfU3U2uAeUOeJF6ngUm3b8i5Pn2v5uImA&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwjx06Xd893oAhXEi1wKHWqMAzEQ6AEwEHoECA0QPQ#v=onepage&q=phototoxicity%2C%20fluorescence%20phosphorescence&f=false](https://books.google.cz/books?id=Ef_HllqkdqEC&pg=PA28&lpg=PA28&dq=phototoxicity,+fluorescence+phosphorescence&source=bl&ots=BsbU14Z5GT&sig=ACfU3U2uAeUOeJF6ngUm3b8i5Pn2v5uImA&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwjx06Xd893oAhXEi1wKHWqMAzEQ6AEwEHoECA0QPQ#v=onepage&q=phototoxicity%2C%20fluorescence%20phosphorescence&f=false)
- [11] VALEUR, Bernard a Mário Nuno Berberan SANTOS. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications* [online]. Druhé vydání. 69469 Weinheim, Germany: WILEY-VCH, 2012, 1-25, [cit. 2020-04-06]. ISBN 9783527650002. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9783527650002.ch1>
- [12] HAYES, Laura M. *Cosmetics: types, allergies and applications*. New York: Nova Science Publishers, c2011, xiii, 197 s. Chemical engineering methods and technology. ISBN 978-1-61761-761-4.
- [13] RYCROFT, Richard J. G., Torkil MENNÉ, Peter J. FROSCHE a Jean-Pierre LEPOITTEVIN. *Textbook of Contact Dermatitis* [online]. Třetí vydání. Berlin: Springer, 2001 137, [cit. 2020-04-10]. ISBN 978-3-662-10302-9. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?id=c\\_XxCAAQAQBAJ&pg=PA137&lpg=PA137&dq=lo-cation+of+phototoxic+reactions+depends+on+physicochemical+properties&source=bl](https://books.google.cz/books?id=c_XxCAAQAQBAJ&pg=PA137&lpg=PA137&dq=lo-cation+of+phototoxic+reactions+depends+on+physicochemical+properties&source=bl)

- &ots=Gwz2P1YYkP&sig=ACfU3U2ho6pegVU85RCNfc9B44LHufZGhw&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKewj01JqQgN7oAhXEgVwKHYowDz8Q6AEwCnoECA0QLw#v=onepage&q=location%20of%20phototoxic%20reactions%20depends%20on%20physicochemical%20properties&f=false
- [14] GONÇALO, Margarida. *Phototoxic and Photoallergic Reactions* [online]. Páté vydání. Berlin Heidelberg: Springer, 2011, 361-376 [cit. 2020-04-06]. ISBN 978-3-642-03827-3. Dostupné z: <http://rihuc.huc.min-saude.pt/bitstream/10400.4/1340/1/Phototoxic.pdf>
- [15] NAVARRA, Michele, Marco MIRODDI a Gioacchiono CALAPAI. *Aromatherapy: Basic Mechanisms and Evidence-Based Clinical Use* [online]. 1. 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742: Taylor and Francis Group, 2016, 191-198 [cit. 2020-03-08]. ISBN 978-1-4822-4664-3. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?hl=sk&lr=&id=Xo\\_wCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA191&dq=navarra+Phototoxicity+of+Essential+Oils&ots=GajXns2Nbn&sig=hziQNSLtgWk3vMi1QmcsuJEEEy8&redir\\_esc=y#v=onepage&q=navarra%20Phototoxicity%20of%20Essential%20Oils&f=false](https://books.google.cz/books?hl=sk&lr=&id=Xo_wCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA191&dq=navarra+Phototoxicity+of+Essential+Oils&ots=GajXns2Nbn&sig=hziQNSLtgWk3vMi1QmcsuJEEEy8&redir_esc=y#v=onepage&q=navarra%20Phototoxicity%20of%20Essential%20Oils&f=false)
- [16] LEHMANN, Percy a Thomas SCHWARZ. Photodermatoses: Diagnosis and Treatment. *Deutsches Ärzteblatt International* [online]. 2011, **108**(9), 135-141 [cit. 2019-10-28]. DOI: 10.3238/arztebl.2011.0135. Dostupné z: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3063367/pdf/Dtsch\\_Arztebl\\_Int-108-0135.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3063367/pdf/Dtsch_Arztebl_Int-108-0135.pdf)
- [17] DOSAI, Seemil R. Hyperpigmentation Therapy: A Review. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology* [online]. 2018, **11**(8), 13-17 [cit. 2019-10-28]. Dostupné z: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4142815/pdf/jcad\\_7\\_8\\_13.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4142815/pdf/jcad_7_8_13.pdf)
- [18] *OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS DRAFT PROPOSAL FOR A NEW TEST GUIDELINE: ROS (Reactive Oxygen Species) assay for photosafety* [online]. 1-4 [cit. 2020-04-11]. Dostupné z: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/Draft%20TG%20ROS%20161012.pdf>
- [19] BALB/3T3 clone A31 (ATCC® CCL-163™). *ATCC* [online]. US, 2016 [cit. 2020-04-11]. Dostupné z: [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-163.aspx?geo\\_country=cz](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-163.aspx?geo_country=cz)

- [20] Evropská unie. NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:02009R1223-20160812&from=EN>
- [21] PROVÁDĚCÍ ROZHODNUTÍ KOMISE ze dne 25. listopadu 2013 o pokynech k příloze I nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013D0674&from=EN>
- [22] Cosmetic Ingredients. *U.S. Food and Drug Administration* [online]. 10903 New Hampshire Ave Silver Spring, MD 20993-0002: United States Government [cit. 2019-10-28]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetic-products-ingredients/cosmetic-ingredients>
- [23] YIN, Jun Jie-. Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes—Generation of reactive oxygen species and cell damage. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2012, **263**(1), 81-88 [cit. 2019-10-29]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.06.001>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0041008X12002608>
- [24] FLORA, Govinder. Medical Countermeasures—Chelation Therapy. FLORA, S.J.S. *Handbook of Arsenic Toxicology* [online]. United States of America: Academic Press, 2015, s. 589-626 [cit. 2020-04-06]. ISBN 978-0-12-418688-0. Dostupné z: [sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124186880000265](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124186880000265)
- [25] P.P. FU et al., Photoreaction, Phototoxicity, and Photocarcinogenicity of Retinoids. *Journal of Environmental Science and Health Part C* [online]. 2003, **21**(2), 165-197 [cit. 2019-10-29]. DOI: 10.1081/GNC-120026235. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/7892806\\_Photoreaction\\_Phototoxicity\\_and\\_Photocarcinogenicity\\_of\\_Retinoids](https://www.researchgate.net/publication/7892806_Photoreaction_Phototoxicity_and_Photocarcinogenicity_of_Retinoids)
- [26] *Guidance on essential oils in cosmetic products: Consumer Health Protection Committee (CD-P-SC)* [online]. 2016, s. 5 [cit. 2020-04-12]. Dostupné z: [https://zdravlje.gov.hr/UserDocsImages/2017%20dokumenti%20razni/Guidance%20on%20essential%20oils%20in%20cosmetic%20products\\_EDQM%202016.PDF](https://zdravlje.gov.hr/UserDocsImages/2017%20dokumenti%20razni/Guidance%20on%20essential%20oils%20in%20cosmetic%20products_EDQM%202016.PDF)

- [27] KELJOVÁ, Kristina, Dagmar JÍLOVÁ, Hana BENDOVIČ, Petr GAJDOŠ a Hana KOLÁŘOVÁ. Phototoxicity of essential oils intended for cosmetic use. *Toxicology in Vitro* [online]. 2010, **24**(8) [cit. 2019-11-01]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.07.025>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0887233310001864>
- [28] PLACZEK, Marianne, Wolfgang FRÖMEL, Bernadette EBERLEIN, Klaus-Peter GILBERTZ a Bernhard PRZYBILLA. Evaluation of Phototoxic Properties of Fragrances. *Acta Derm Venereol* [online]. 2007, **87**(4), 312-316 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.2340/00015555-0251. Dostupné z: <https://www.medicaljournals.se/acta/download/10.2340/00015555-0251/>
- [29] NAGANUMA, M., Hirose S, Nakayama Y, Nakajima K a Someya T. A study of the phototoxicity of lemon oil. *Arch Dermatol Res.* [online]. 1985, **278**(1), 31-36 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1007/bf00412492. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00412492>
- [30] NIGG, H.N., H.E. NORDBY, R.C. BEIER, A. DILLMAN, C. MACIAS a R.C. HANSEN. Phototoxic coumarins in limes. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 1993, **31**(5), 331-335 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/0278-6915(93)90187-4. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0278691593901874?via%3Dihub>
- [31] BINDER ET AL., Svatopluk. ADVERSE PHOTOTOXIC EFFECT OF ESSENTIAL PLANT OILS ON NIH 3T3 CELL LINE AFTER UV LIGHT EXPOSURE. *Cent Eur J Public Health* [online]. 2016, **24**(3), 234-240 [cit. 2020-04-12]. DOI: <http://dx.doi.org/10.21101/cejph.a4354>. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27755863>
- [32] RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ, Alena, Bohumil ZÁLEŠÁK, David BIERDERMANN, Jitka ULRICOVÁ a Jitka VOSTÁLOVÁ. Phototoxic potential of silymarin and its bioactive components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2016, **156**, 61-68 [cit. 2020-04-03]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.01.011>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134415301494>
- [33] SCHLOSSMAN, Mitchell L. *The chemistry and manufacture of cosmetics*. Volume III, Ingredients. 3rd ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, c2002, 2 sv. (xxi, 1123, xli s.). ISBN 0-931710-77-4.



- [34] KAWAKAMI, Camila Martins; GASPAR, Lorena Rigo. Mangiferin and naringenin affect the photostability and phototoxicity of sunscreens containing avobenzone. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2015, 151: 239-247 [cit. 2020-04-03]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.08.014>  
Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1011134415002638?via%3Dihub>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

UV	Ultrafialové (Ultraviolet)
3T3/NRU PT	test příjmu barviva neutral red (3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity test)
ROS	Reaktivní oxygenní molekuly
mm	Milimetr
DNA	Deoxyrybonukleová kyselina
DE	<i>Dermis</i>
SB	<i>Stratum basale</i>
SS	<i>Stratum spinosum</i>
SG	<i>Stratum granulosum</i>
SC	<i>Stratum corneum</i>
TJ	Těsné spoje (Tight junctions)
Col	Kolagenní vlákna
FB	Fibroblasty
EF	Elastická vlákna
MC	Melanocyty
nm	Nanometr
UVA	Ultrafialové A (Ultraviolet A)
UVB	Ultrafialové B (Ultraviolet B)
O <sub>2</sub>	Kyslík
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxid vodíku
O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	Superoxidový anion
OH	Hydroxid
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)

---

OECD	Organizace pro hospodářskou organizaci a rozvoj (Organization for Economic Cooperation and Development)
J	Joule
MED	Minimální erytémová dávka (Minimal erythema dose)
ECVAM	Evropské centrum pro validizaci alternativních metod (European Centre for the Validation of Alternative Methods)
COLIPA	Evropská kosmetická a parfuméska asociace (European Cosmetics, Toiletry and Perfumery Association)
BALB/3T3	Myší fibroblasty
3D	Troj-rozměrný (Three-dimensional)
NTP	Národním toxikologický program (National Toxicology Program)
8-MOP	8-methoxypsoralen
5-MOP	5-methoxypsoralen
IFRA	Mezinárodní organizace pro parfémy (International Fragrance Association)
v/v	Objemová procenta
MTT	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid)
INCI	Mezinárodní nomenklatura kosmetických přísad (International Nomenclature of Cosmetics Ingredients)
USA	Spojené státy americké (United States of America)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
mM	Milimol
U mL <sup>-1</sup>	Jednotky na mililitr (Unit per millilitre)
CO <sub>2</sub>	Oxid uhličitý
°C	Stupeň Celsia
PBS	Fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
min	Minuta

Irr-	Bez přítomnosti UV záření
Irr+	Za přítomnosti UV záření
DMSO	Dimethylsulfoxid
PIF	Foto-iradiační faktor (Photo-Irradioation-Factor)
IC <sub>50</sub>	Poloviční maximální inhibiční koncentrace

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: Vrstvy epidermis, dermis .....	12
Obrázek 2: Řez kůží zobrazující tight junctions, desmozomy.....	13
Obrázek 3: Řez kůží zobrazující kolagenní vlákna, fibroblasty, elastická vlákna .....	15
Obrázek 4: Řez epidermis s Langerhasovými buňkami ve <i>Stratum spinosum</i> a s melanocyty ve <i>Stratum basale</i> .....	18
Obrázek 5: Schéma mechanismu fototoxicity .....	21
Obrázek 6: Projev akutní fototoxicity.....	22
Obrázek 7: Fotoonocholýza.....	23
Obrázek 8: Lichenifikace a hyperpigmentace člověka s chronickou aktinickou dermatitidou .....	24
Obrázek 9: Vlevo: nízká hustota buněk BALB/3T3, vpravo: vysoká hustota buněk BALB/3T3 .....	28
Obrázek 10: Strukturní vzorec avobenzonu.....	31
Obrázek 11: Strukturní vzorec kyseliny p-aminobenzoové .....	32
Obrázek 12: Strukturní vzorec psoralenu .....	34
Obrázek 13: Strukturní vzorec hypericinu.....	36
Obrázek 14: Graf závislosti relativní buněčné viability na koncentraci bergamotového esenciálního oleje při Irr+ (ozáření) a Irr- (neozáření) .....	42
Obrázek 15: Graf závislosti relativní buněčné viability na koncentraci citronového esenciálního oleje při Irr+ (ozáření) a Irr- (neozáření), .....	43
Obrázek 16: Graf závislosti relativní buněčné viability na koncentraci grepového esenciálního oleje při Irr+ (ozáření) a Irr- (neozáření), .....	44
Obrázek 17: Graf závislosti relativní buněčné viability na koncentraci mandarinkového esenciálního oleje při Irr+ (ozáření) a Irr- (neozáření) .....	45
Obrázek 18: Graf závislosti relativní buněčné viability na koncentraci kafrovníkového esenciálního oleje při Irr+ (ozáření) a Irr- (neozáření) .....	46

---

Obrázek 19: Graf závislosti relativní buněčné viability na koncentraci mátového esenciálního oleje při Irr+ (ozáření) a Irr- (neozáření) .....	47
Obrázek 20: Graf závislosti relativní buněčné viability na koncentraci avobenzonu při Irr+ (ozáření) a Irr- (neozáření).....	48
Obrázek 21: Graf závislosti relativní buněčné viability na koncentraci oktinoxátu při Irr+ (ozáření) a Irr- (neozáření).....	49

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Rozdíly mezi fototoxicitou a fotoalergií.....	26
--	----