

# Nanočástice a jejich interakce s kožní bariérou

Bc. Alžběta Kastelíková

---

Diplomová práce  
2022

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

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

Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Alžběta Kastelíková**  
Osobní číslo: **T20133**  
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Nanočástice a jejich interakce s kožní bariérou**

## Zásady pro vypracování

1. Studentka vypracuje literární rešerši ohledně bariérové funkce kůže s zvláštním zřetelem na průchod nanočástic různé velikosti a složení.
2. Kriticky zhodnotí dopad využívání nanočástic na lidské zdraví.
3. V praktické části provede experimenty za účelem stanovení míry průniku nanočástic skrze kožní modely.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] Schneider, M., Stracke, F., Hansen, S., & Schaefer, U. F. (2009). Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. *Dermato-endocrinology*, 1(4), 197-206.
- [2] Gautam, A., Singh, D., & Vijayaraghavan, R. (2011). Dermal exposure of nanoparticles: an understanding. *Journal of Cell and Tissue Research*, 11(1), 2703-2708.
- [3] Allofkhazrael, M. (Ed.). (2016). *Handbook of nanoparticles*. Switzerland: Springer International Publishing.
- [4] Xu, C., Wang, X., & Pramanik, M. (Eds.). (2019). *Imaging Technologies and Transdermal Delivery in Skin Disorders*. John Wiley & Sons.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Zdenka Capáková, Ph.D.**  
Centrum polymerních systémů

Datum zadání diplomové práce: **25. února 2022**

Termín odevzdání diplomové práce: **13. května 2022**

L.S.

---

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

---

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

## PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou 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 – diplomovou 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 diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji 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 diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## ABSTRAKT

Využívání nanočástic oxidu titaničitého v různých spotřebních produktech je stále rozšířenější. Tím, že se stále častěji vystavujeme expozici těmito částicemi, je nutné porozumět vlivu těchto částic na lidský organismus. Teoretická část této práce se proto věnuje popisu oxidu titaničitého se zaměřením na jeho využití a způsoby syntézy. S ohledem na fakt, že nejčastěji je titanovým nanočásticím vystavena naše kůže, pojednává další část právě o dermální expozici těmito částicím. V závěru teoretické části jsou popsány zdravotní rizika spojená s oxidem titaničitým a také jeho dopad na životní prostředí. Praktická část se zaměřuje na jeho pronikání skrze nejvíce zasažený orgán kůže. Nejdříve byly připraveny disperze oxidu titaničitého, a to dvou krystalických forem – anatasu a rutilu. Tyto disperze byly podrobeny transdermální absorpci, která byla vyhodnocena histologicky a stripováním jednotlivých vrstev *stratum corneum*. Cílem této diplomové práce bylo prohloubit současné znalosti o vlivu nanočástic oxidu titaničitého na kůži.

Klíčová slova: nanočástice, oxid titaničitý, transdermální absorpce, stripování, histologické řezy

## **ABSTRACT**

The application of titanium dioxide nanoparticles in various consumer products is becoming more widespread. Humanity is increasingly exposed to these particles, thus it is necessary to understand the effects of these particles on the human body. The theoretical part of this work is therefore devoted to the description of titanium dioxide with a focus on its use and methods of its synthesis. Given the fact that our skin is the most often exposed organ to titanium nanoparticles, the next part deals with dermal exposure to these particles. The last part of the theoretical summary describes the health risks associated with titanium dioxide and its impact on the environment. The practical part focuses on its penetration through, the most affected organ, the skin. First, dispersions of titanium dioxide were prepared in two crystalline forms - anatase and rutile. These dispersions were subjected to transdermal absorption, which was evaluated histologically and by stripping the individual stratum corneum layers. This Master's thesis aimed to deepen the current knowledge about the effect of titanium dioxide nanoparticles on the skin.

Keywords: nanoparticles, titanium dioxide, transdermal absorption, stripping, histological sections

Ráda bych tímto srdečně poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. Ing. Zdence Capákové, Ph.D. za veškerou pomoc, trpělivost, ochotu a čas, který mé práci věnovala. Mé poděkování patří také Ing. Evě Korábkové za pomoc s experimentální částí práce a v neposlední řadě mé rodině a partnerovi za velkou podporu během celého studia.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>12</b>
<b>1 OXID TITANIČITÝ .....</b>	<b>13</b>
1.1 VYUŽITÍ OXIDU TITANIČITÉHO JAKO NANOMATERIÁLU .....	14
1.1.1 Definice nanomateriálu .....	14
1.1.2 E 171 .....	15
1.2 OXID TITANIČITÝ JAKO UV FILTR.....	16
1.2.1 Ochranný sluneční faktor .....	18
<b>2 SYNTÉZA NANOČÁSTIC OXIDU TITANIČITÉHO.....</b>	<b>20</b>
2.1 FYZIKÁLNÍ SYNTÉZA .....	20
2.2 CHEMICKÁ SYNTÉZA .....	21
2.3 BIOGENNÍ SYNTÉZA.....	21
2.3.1 Využití rostlin.....	22
2.3.2 Využití mikroorganismů .....	23
<b>3 DERMÁLNÍ EXPOZICE NANOČÁSTICÍM OXIDU TITANIČITÉHO .....</b>	<b>24</b>
3.1 KŮŽE.....	25
3.1.1 <i>Stratum corneum</i> .....	26
3.2 CESTY DERMÁLNÍ ABSORPCE.....	27
3.3 VLASTNOSTI PENETRUJÍCÍCH ČÁSTIC.....	28
3.4 PERKUTÁNNÍ PRONIKÁNÍ KRÉMU NA OCHRANU PROTI SLUNEČNÍMU ZÁŘENÍ S NANOČÁSTICEMI TiO <sub>2</sub> A ZNO .....	29
<b>4 ZDRAVOTNÍ RIZIKA NANOČÁSTIC OXIDU TITANIČITÉHO .....</b>	<b>31</b>
4.1 KARCINOGENITA .....	31
4.2 CYTOTOXICITA A GENOTOTOXICITA .....	32
4.3 VLIV NANOČÁSTIC OXIDU TITANIČITÉHO NA ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ.....	32
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>33</b>
<b>5 MATERIÁLY A METODY .....</b>	<b>34</b>
5.1 POUŽITÉ VZORKY A CHEMIKÁLIE.....	34
5.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	34
5.3 PŘÍPRAVA VZORKŮ KŮŽE.....	35
5.4 PŘÍPRAVA DISPERZÍ OXIDU TITANIČITÉHO .....	36
5.5 TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE .....	37
5.6 HISTOLOGICKÉ ŘEZY KŮŽE.....	39
5.6.1 Fixace vzorků kůže.....	39
5.6.2 Zalévání vzorků kůže do parafínu.....	39



5.6.3	Krájení řezů .....	40
5.7	STRIPOVÁNÍ KŮŽE .....	43
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>45</b>
6.1	INTEGRITA KŮŽE.....	45
6.2	HISTOLOGICKÉ ŘEZY KŮŽE.....	47
6.3	STRIPOVÁNÍ KŮŽE .....	49
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>52</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>54</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>59</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>61</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>62</b>

## ÚVOD

Nanočástice získaly velkou pozornost v celosvětovém měřítku díky široké možnosti uplatnění v mnoha oborech a patří k nejrychleji se rozvíjející oblasti vědeckého výzkumu. V současnosti jsou využívány například pro cílené dodávání léčiv v organismu, v textiliích pro zvýšení kvality a odolnosti oblečení, pro čištění životního prostředí anebo pro zpevnění současných materiálů. Nejčastějším zástupcem nanočástic v produktech běžné spotřeby je oxid titaničitý. Tato chemická sloučenina se dostala do vědeckého podvědomí díky své fotokatalytické aktivitě a od té doby se s ní můžeme setkat v každodenním životě, ať už ve velikosti nano či větší.

Nanočástice oxidu titaničitého jsou vysoce stabilní, kromě fotokatalytických vlastností vykazují i vysoký index lomu, antikorozní a antibakteriální vlastnosti. Najdeme je v systému čištění odpadních vod, fotovoltaiických zařízeních, náhradách tvrdých tkáních, potravinářských výrobcích, barvách a lacích i v kosmetice. Spolu s oxidem zinečnatým jsou hojně využívány jako anorganické filtry proti slunečnímu záření v opalovacích přípravcích, neboť společně poskytují širokopásmovou UV ochranu. Vzhledem k topické aplikaci těchto přípravků je důležité pochopení jejich interakce s kůží a hodnocení zdravotních rizik, jež mohou po aplikaci nastat.

Kůže představuje první ochrannou bariéru těla před vlivem vnějšího prostředí a zároveň zabraňuje ztrátě tekutin a solí. Nejdůležitější je v tomto obranném mechanismu především vrstva *stratum corneum*, která díky své jedinečné mezibuněčné organizaci reguluje dermální penetraci všech látek do těla. Stav ochranné bariéry, a tedy možnost transdermálního vstřebávání, však může být ovlivněn různými dermálními a patologickými stavy. Například přípravky na ochranu proti slunečnímu záření s nanočásticemi oxidu titaničitého jsou často spotřebiteli aplikovány na pokožku spálenou sluncem. Proto je nutné důkladně zkoumat, do jaké míry je dermální absorpce ovlivněna stavem pokožky, jakou roli přitom mají fyzikálně-chemické vlastnosti penetrujících částic a jaké mohou v případě penetrace do hlubších vrstev kůže hrozit zdravotní problémy. Všemi těmito otázkami se zabývají regulační orgány po celém světě a společně s vědeckými pracovníky hledají jejich nejlepší řešení.

Kvůli vysoké spotřebě nanočástic oxidu titaničitého je snaha zajistit co nejekologičtější přístup jejich syntézy. V dnešní době je upřednostňována tzv. zelená syntéza, při níž jsou k výrobě nanočástic oxidu titaničitého využívány přírodní zdroje, jako jsou rostliny, řasy, houby a bakterie. Široká aplikace oxidu titaničitého v nano velikosti tedy představuje značný

potenciál pro expozici člověka, s čímž nevyhnutelně souvisí i riziko pro životní prostředí. Vědci v poslední letech věnují velké úsilí na pochopení vlivu nanočástic na lidské zdraví i ekosystém. Přesto stále nejsou objasněna všechna rizika, jež mohou nanočástice představovat, a to i z důvodu různého chování těchto částic v závislosti na materiálových vlastnostech, jako je především jejich velikost.

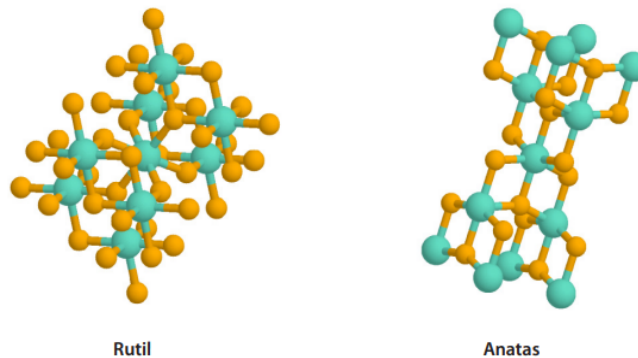
Předložená diplomová práce se zabývá právě touto problematikou a soustřeďuje se na popis nanočástic oxidu titaničitého, jeho aplikace a dopad na environment. Praktická část je pak zaměřena na přípravu disperzí oxidu titaničitého v jeho krystalických formách anatas a rutil a stanovení jeho transdermální absorpce metodou *in vitro*. Vyhodnocení proběhlo skrze histologické řezy a stripováním kůže.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 OXID TITANIČITÝ

Titan, chemická značka Ti (lat. *Titanium*), je devátým nejrozšířenějším prvkem v zemské kůře. Kvůli své vysoké afinitě ke kyslíku a dalším prvkům se titan v přírodě nevyskytuje v kovovém stavu. Nejvíce průmyslově využíván je kovový titan, oxid titaničitý ( $\text{TiO}_2$ ) a chlorid titaničitý ( $\text{TiCl}_4$ ). [1]

Přirozeně se vyskytující oxid titaničitý existuje ve třech krystalických formách – anatas a rutil s tetragonální strukturou (zobrazeny na obrázku 1) a brookit se strukturou orthorhomboickou. [2] Obecně vykazují všechny tři krystalické formy podobné vlastnosti, avšak brookit se vyskytuje zřídka, protože je nestabilní a při vysoké teplotě přechází na rutilovou formu. [3] Mezi hlavní parametry částic ovlivňující jejich fyzikálně-chemické vlastnosti patří tvar, velikost, povrchové charakteristiky a vnitřní struktura, přičemž chemicky nejreaktivnější je krystalová modifikace anatas. Mezi obecné vlastnosti  $\text{TiO}_2$  lze zmínit molekulovou hmotnost  $79,9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , relativní hustotu  $4,26 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , bod varu  $2\ 972 \text{ }^\circ\text{C}$  a bod tání  $1\ 843 \text{ }^\circ\text{C}$ . [1]



Obrázek 1 Krystalové formy  $\text{TiO}_2$  rutil a anatas, upraveno podle [4]

Oxid titaničitý je tepelně stabilní, nehořlavá a špatně rozpustná bílá pevná anorganická látka, kterou lze díky širokému spektru použití považovat za globální produkt. Poprvé byl představen v roce 1923 a po mnoho let se používá v široké škále spotřebitelského a průmyslového zboží. [5] Svou vědeckou pozornost si získal v roce 1972, kdy Fujishima a Honda objevili, že může působit jako katalyzátor pro fotoštěpení vody za vzniku vodíku a kyslíku. Tento objev podnítil zájem o využití  $\text{TiO}_2$  v rozsáhlé škále aplikací, jako je fotokatalýza, systémy čištění vody či solární články. [6]

## 1.1 Využití oxidu titaničitého jako nanomateriálu

Oxid titaničitý se široce používá v mnoha komerčních produktech, včetně barev a laků, kosmetiky, plastů, papírů a v potravinách jako prostředek proti spékání nebo pro bělení. [4] Jako bílý pigment je  $\text{TiO}_2$  pro svou jasnost a velmi vysoký index lomu nejrozšířenějším pigmentem, ročně se jej celosvětově spotřebují přibližně čtyři miliony tun. [1] Další využití zahrnují také aplikace antimikrobiální a lékařské, přičemž je stále větší pozornost věnována použití oxidu titaničitého jako nanomateriálu. [7]

Nanočástice (nanoparticles, NPs) mají obecně výrazně odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti ve srovnání s jemnými částicemi (fine particles, FPs) stejného složení. [1] Za jemné částice jsou považovány částice o velikosti 0,1 až přibližně 3  $\mu\text{m}$ . [8]

Nanočástice se obecně používají pro nespočetné množství účelů, mezi kterými můžeme jmenovat cílené podávání léků proti rakovině či brýle odolné proti poškrábání. Konkrétně uhlíkové nanotrubičky lze nalézt v tenisových raketách, nanočástice stříbra se přidávají do ponožek či sportovního oblečení pro snížení zápachu a také do ob vazů pro zabránění bakteriálních infekcí. Nanočástice se také používají ke zpevnění stávajících materiálů, například lopatky větrných turbín mohou být potaženy uhlíkovými nanotrubicemi obsahujícími epoxid pro snížení hmotnosti lopatek a zároveň zvýšení jejich životnosti. [9]

$\text{TiO}_2$  ve formě nanočástic má široké uplatnění v kosmetickém průmyslu. Společně s oxidem zinečnatým ( $\text{ZnO}$ ) jsou klíčovou složkou opalovacích krémů, kde slouží jako UV filtry. [10] Dále jsou díky regeneračním a protizánětlivým účinkům využívány například v krémech proti stárnutí, hydratačních krémech, deodorantech či parfémtech. [11] Za zmínku stojí fakt, že patenty na NPs oxidu titaničitého a zinečnatého pocházejí již z 80. let 20. století, a že nano  $\text{TiO}_2$  byl v široké komerční distribuci na začátku 90. let. [12]

### 1.1.1 Definice nanomateriálu

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 definuje nanomateriál jako „nerozpustný nebo bioperzistentní a záměrně vyrobený materiál o jednom nebo více vnějších rozměrech nebo s vnitřní strukturou v řádu od 1 do 100 nm“. Nařízení zároveň udává výrobcům kosmetických přípravků s nanomateriálem oznamovací povinnost, kdy musí odpovědná osoba oznámit tento přípravek Komisi elektronickou cestou šest měsíců před uvedením tohoto výrobku na trh. Navíc v seznamu ingrediencí musí být za názvy všech přísad ve formě nanomateriálu uvedeno slovo „nano“ v závorkách. [13]

Některé materiály mohou existovat jako částice, jež mají vnější rozměry větší než 100 nm, ale které sestávají z agregátů či aglomerátů menších částic, přičemž tyto menší částice jsou v rozsahu nano. Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO) ve spolupráci s Německým institutem pro normalizaci (DIN) popisují tyto materiály jako „nanostrukturované agregáty“ nebo „nanostrukturované aglomeráty“. Je důležité termíny agregát a aglomerát nezaměňovat, přičemž jejich definice zní:

- agregát – částice obsahující silně vázané nebo tavené částice, kde výsledný vnější povrch může být výrazně menší než součet vypočtených povrchů jednotlivých složek;
- aglomerát – soubor volně vázaných částic nebo agregátů nebo jejich směsí, kde je výsledný vnější povrch podobný součtu povrchů jednotlivých složek. [12]

### 1.1.2 E 171

E 171 je označení pro oxid titaničitý dle Přílohy II Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách. Široce se používá jako barvivo v řadě potravin, včetně žvýkaček, čokoládových bonbonů a dresinků. Evropskou Unií jsou pro potraviny povoleny krystalické formy anatas a rutil, převážně je používán anatas. [14]

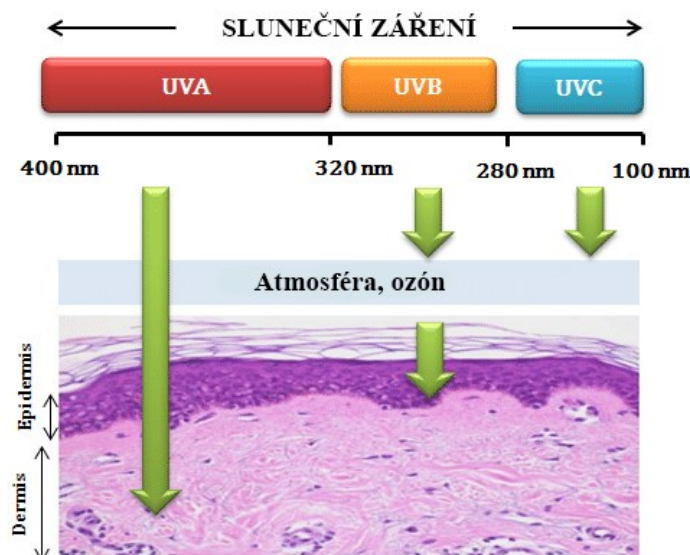
Weir a kol. stanovovali obsah  $\text{TiO}_2$  v 89 různých, ve Spojených státech amerických komerčně dostupných potravinách, ve kterých byl  $\text{TiO}_2$  deklarován na obale nebo se dal předpokládat jeho výskyt. Nejvíce oxidu titaničitého bylo stanoveno ve žvýkačkách, sladkostech s tvrdým vnějším obalem a práškových produktech přimíchávaných do potravin (např. nápojové směsi), obsah byl stanoven od 0,0013 do 340 mg oxidu titaničitého na porci (240 mL). Dále charakterizovali vzorek E 171 od velkého komerčního dodavatele (Fioro Colori Spa, Itálie). Pomocí rastrovací (scanning electron microscope, SEM) a transmisní elektronové mikroskopie (TEM) stanovili střední velikost částic 110 nm, avšak s velmi širokou distribucí (30–400 nm), přičemž nejméně 36 % částic bylo menších než 100 nm alespoň v jednom rozměru. [7]

Dne 14. ledna 2022 bylo vydáno Nařízení Komise (EU) 2022/63, kterým se mění přílohy II a III nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, pokud jde o potravinářskou přídatnou látku oxid titaničitý (E 171). Komise přijala zákaz používání  $\text{TiO}_2$  v potravinách poté, co Evropský úřad pro bezpečnost potravin uvedl, že dále není možné považovat tuto látku v potravinách za bezpečnou. Poprvé byly k hodnocení bezpečnosti potravinářských přídatných látek uplatněny Pokyny vědeckého výboru EFSA o nanotechnologiích z roku

2018. [15] Francouzská vláda na základě stanoviska Francouzské agentury pro bezpečnost potravin (ANSES) zakázala používání oxidu titaničitého v potravinářských výrobcích již roku 2020. [16]

## 1.2 Oxid titaničitý jako UV filtr

Doporučení Komise (EU) ze dne 22. září 2006 o účinnosti prostředků na ochranu proti slunečnímu záření a o uváděných tvrzeních, která s nimi souvisí definuje prostředek na ochranu proti slunečnímu záření jako „*jakýkoliv přípravek (např. krém, olej, gel nebo sprej) určený k aplikaci na lidskou pokožku, jehož výhradním či převážným účelem je chránit ji před ultrafialovým zářením pohlcením, rozptylem či odrazem záření*“. [17] Tyto přípravky se používají k ochraně před nepříznivými účinky UVB (280–320 nm) a UVA (320–400 nm) záření. Většina UVC záření (100–280 nm) neproniká k zemskému povrchu, protože záření o vlnových délkách kratších než 242 nm je absorbováno stratosférickým molekulárním kyslíkem za vzniku ozonu. Různé vlnové délky slunečního spektra interagují odlišně s různými částmi kůže. UVA může proniknout hluboko do dermis, zatímco UVB záření proniká pouze do epidermis a svrchní části dermis (obrázek 2). [18]



Obrázek 2 Elektromagnetická spektra UV záření a jejich proniká do kůže v závislosti na vlnové délce, upraveno podle [19]

Expozice ultrafialovému (UV) záření je považována za nejvíce prokázanou etiologickou příčinu karcinogeneze kůže. UV záření poškozují kožní buňky různými způsoby, například způsobuje předčasné stárnutí pleti, imunosupresi, zánět či poškození DNA. [20] Krátkodobé kožní reakce na sluneční záření zahrnují syntézu vitamínu D (cholecalciferol), při vyšších

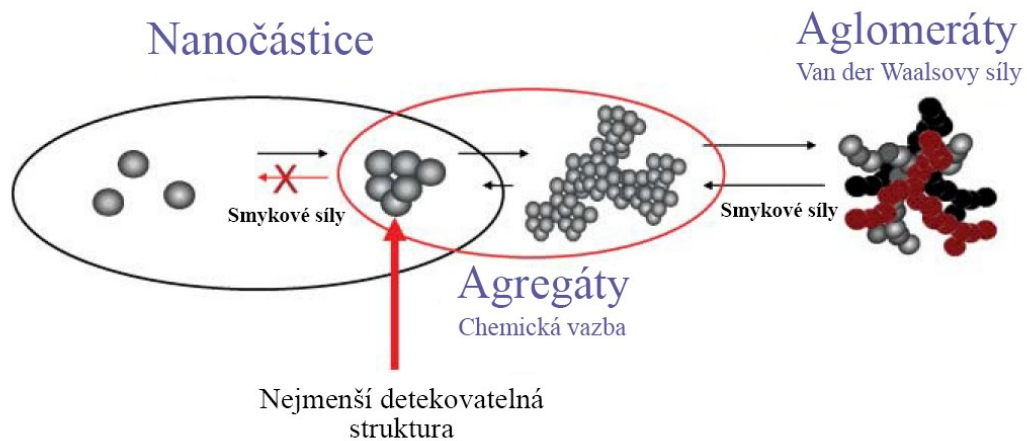


expozicích může vzniknout zarudnutí kůže – erytém. Tyto reakce lze z velké části připsat záření UVB. [18] Celková rizika spojená s používáním výrobků obsahující oxid titaničitý a zinečnatý v nanoformě jsou pro lidské zdraví nízká vzhledem k nedostatečné perkutánní absorpci, existuje však riziko při expozici inhalací, proto se doporučuje opalovací krémy obsahující nanočástice  $\text{TiO}_2$  a  $\text{ZnO}$  nestříkat. [10]

Dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 je filtrem ultrafialového záření „látka, která je výhradně nebo převážně určena k ochraně kůže před určitým ultrafialovým zářením prostřednictvím absorpce, odrazu nebo rozptýlení tohoto záření“. [13] Nanočástice oxidu titaničitého i zinečnatého si v poslední době získaly oblibu jako anorganické UV filtry v opalovacích přípravcích, jelikož dokáží odrazet a rozptylovat UVA i UVB záření zatímco organické filtry ultrafialového záření jej pouze absorbují. [21] Mezi další výhody, které nabízejí, patří absence podráždění a senzibilizace pokožky, inertnost složek a omezená penetrace kůží. [18]

$\text{ZnO}$  a  $\text{TiO}_2$  se v prostředcích na ochranu proti slunečnímu záření používají od 80. let 20. století, kdy velikost jejich částic byla v rozmezí 200–400 nm ( $\text{ZnO}$ ) a 150–300 nm ( $\text{TiO}_2$ ). Větší velikost částic odpovídala za bílou křídovou texturu na povrchu pokožky, protože tyto částice odrážejí dopadající viditelné světlo, jež je sítnicí lidského oka vnímáno jako bílé. Využití nanočástic umožňuje transparentní a snadnější aplikaci, jelikož odrážejí pouze malou část dopadajícího viditelného světla.

Oxid zinečnatý má širokou křivku absorpce UVA–UVB, zatímco oxid titaničitý poskytuje lepší ochranu proti záření UVB. Při společném použití tedy poskytují širokopásmovou UV ochranu. [10] Nejčastěji používanými výrobními procesy NPs oxidu titaničitého a oxidu zinečnatého vznikají částice o velikosti 10–20 nm. Silné přitažlivé síly mezi krystaly však způsobují, že vytvářejí pevně spojené agregáty, které mají větší velikost než primárně vyrobené částice. Tyto agregáty s typickou velikostí 30–150 nm představují nejmenší částice, které se skutečně vyskytují ve formulacích pro ochranu proti slunečnímu záření, protože síly potřebné k jejich rozdělení na jednotlivé nanočástice jsou mnohem větší než síly, které jsou vynaloženy při výrobě opalovacích přípravků nebo při aplikaci těchto přípravků na kůži. Při elektronové mikroskopii se mohou tyto agregáty jevit jako primárně vyrobené částice, ačkoliv se skládají z více nanočástic. Agregáty se dále shlukují do volně vázaných aglomerátů o velikosti větší než 1  $\mu\text{m}$ . Tak velké částice by však nebyly dostatečně účinné při ochraně proti UV záření, což značí nutnost jejich rozložení v konečných přípravcích, neboť na trhu jsou dostupné opalovací přípravky na bázi anorganických filtrů s vysokým ochranným slunečním faktorem (viz obrázek 3). [12]



Obrázek 3 Schéma nejmenší velikosti částic v produktech na ochranu proti slunečnímu záření, upraveno podle [12]

### 1.2.1 Ochranný sluneční faktor

Úroveň ochrany opalovacích přípravků proti UVB záření je vyjádřena ochranným slunečním faktorem (Sun Protection Factor, SPF). [20] V Doporučení Komise (EU) ze dne 22. září 2006 o účinnosti prostředků na ochranu proti slunečnímu záření a o uváděných tvrzeních, která s nimi souvisí, je SPF definováno – „se ochranným slunečním faktorem rozumí poměr minimální erytémové dávky pro kůži chráněnou prostředkem na ochranu proti slunečnímu záření k minimální erytémové dávce pro nechráněnou kůži“. Hodnota SPF tedy udává, jaká část slunečního záření se dostane na pokožku. Jak lze vidět na obrázku 4, při použití opalovacího přípravku s SPF 50 se na pokožku dostane 5krát méně fotonů než při aplikaci přípravku s SPF 10.



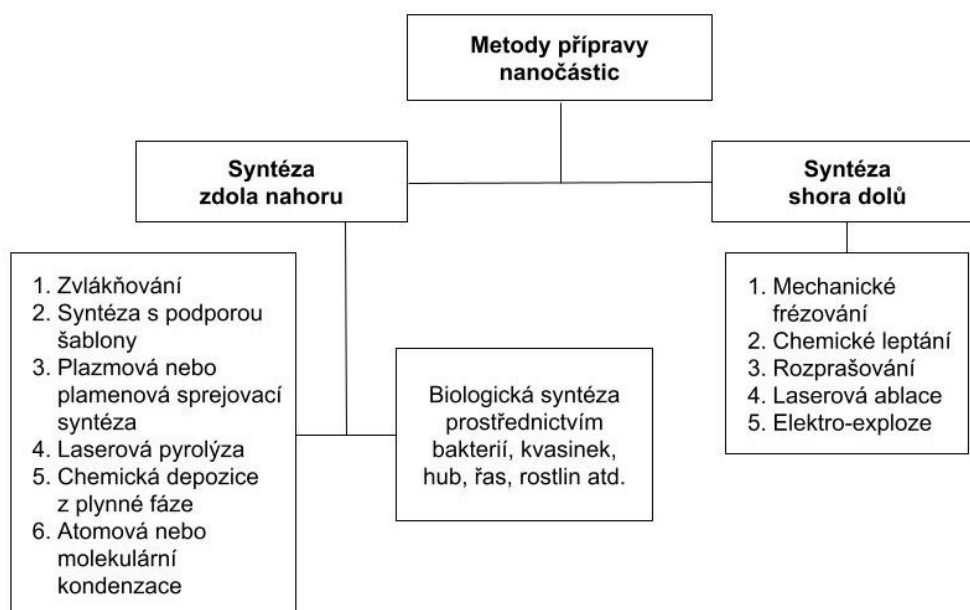
Obrázek 4 Ilustrace definice ochranného slunečního faktoru, upraveno podle [19]

Ochranným faktorem proti UVA se rozumí „*poměr minimální dávky UVA potřebné k navození přetrvávající pigmentace u kůže chráněné prostředkem na ochranu proti slunečnímu záření k minimální dávce UVA potřebné k navození minimálního tmavnutí u nechráněné kůže*“. [17] K minimálnímu, tedy okamžitému ztmavnutí pigmentu (immediate pigment darkening, IPD) dochází během několika minut po vystavení UVA záření a může trvat až 2 hodiny. Po IPD následuje přetrvávající ztmavnutí pigmentu (persistent pigment darkening, PPD), které může trvat až 24 hodin. [22] Podle amerického Úřadu pro kontrolu léčiv (U.S. Food and Drug Administration, USFDA) by měl ochranný faktor proti UVA činit alespoň jednu třetinu celkového ochranného slunečního faktoru. [18]

## 2 SYNTÉZA NANOČÁSTIC OXIDU TITANIČITÉHO

Pro syntézu nanočástic bylo vyvinuto několik metod, jež jsou kategorizovány do dvou hlavních tříd – shora-dolů a zdola-nahoru (viz obrázek 5). [23] Metoda shora-dolů využívá destruktivní přístup, tedy rozložení větších částic na menší, které jsou poté přeměněny na vhodné NPs. Naopak metodou zdola-nahoru jsou nanočástice vytvářeny z jednotlivých atomů a molekul, proto je tento přístup také nazýván jako budování. [24] Oba přístupy mají své výhody i omezení pro požadovanou aplikaci. Například metody shora-dolů jsou obecně jednoduché, spolehlivé i biokompatibilní. Nevýhoda však spočívá ve vysoké spotřebě energie, polydisperzitě, časové náročnosti a vysokých nákladech. [23]

V závislosti na povaze, kterou jsou nanočástice oxidu titaničitého syntetizovány, je lze rozdělit na fyzikální, chemické a biologické. [5]



Obrázek 5 Schéma syntetických metod nanočástic, upraveno podle [24]

### 2.1 Fyzikální syntéza

Fyzikální syntetické metody, na rozdíl od syntéz chemických, nezahrnují použití toxických chemikálií a díky použití specializovaných zařízení jsou obvykle rychlejší. Nevýhodou je však jednak nižší kvalita produktů a jednak použití nákladných vakuových systémů nebo zařízení. Mezi fyzikální metody používané pro syntézu TiO<sub>2</sub> NPs patří depozice z plynné fáze (Vapor Deposition, VD) a metoda obloukového výboje (plazmová syntéza).

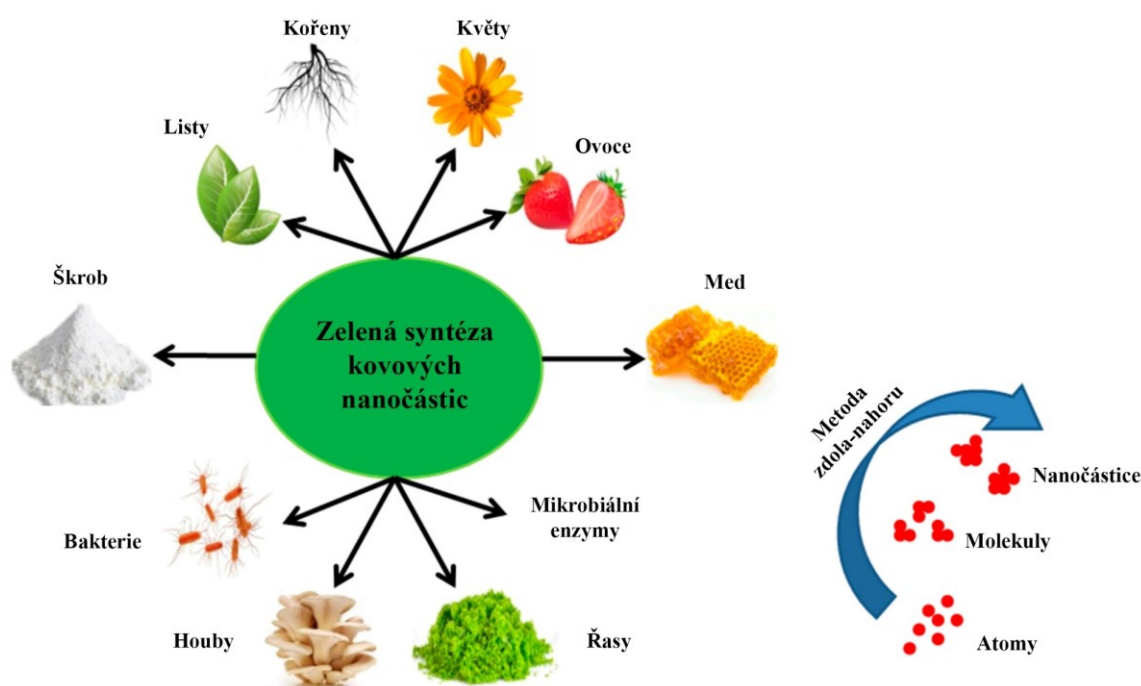
Depozici z plynné fáze lze dále rozdělit na fyzikální depozici z plynné fáze (PVD), během které nedochází k žádné chemické reakce, a chemickou depozici z plynné fáze (CVD), při jejímž procesu k chemickým reakcím dochází. [5]

## 2.2 Chemická syntéza

Pro syntézu nanočástic  $\text{TiO}_2$  jsou ve velké míře používány různé chemické syntézy, jako je například metoda sol-gel a solvotermální či hydrotermální metoda. Ačkoliv nabízí mnoho výhod v podobě jednoduchosti, možné kontroly velikosti a tvaru nanočástic, existuje pro ně mnoho omezení. Tato syntéza je finančně nákladná, vyžaduje vysoké teploty a tlak a má nepříznivou energetickou udržitelnost i vliv na životní prostředí. [3]

## 2.3 Biogenní syntéza

Pro biogenní neboli zelenou syntézu (z angl. Green Synthesis, GS) nanočástic  $\text{TiO}_2$  jsou využívány přírodní zdroje, jako jsou rostliny, řasy, houby a bakterie (viz obrázek 6). [25] Oproti syntéze chemické a fyzikální je zelená syntéza nanočástic v dnešní době upřednostňovaným přístupem, neboť je bezpečná pro životní prostředí a finančně i časově méně náročná. [23]



Obrázek 6 Různé typy zelené syntézy používané pro přípravu kovových nanočástic, upraveno podle [26]

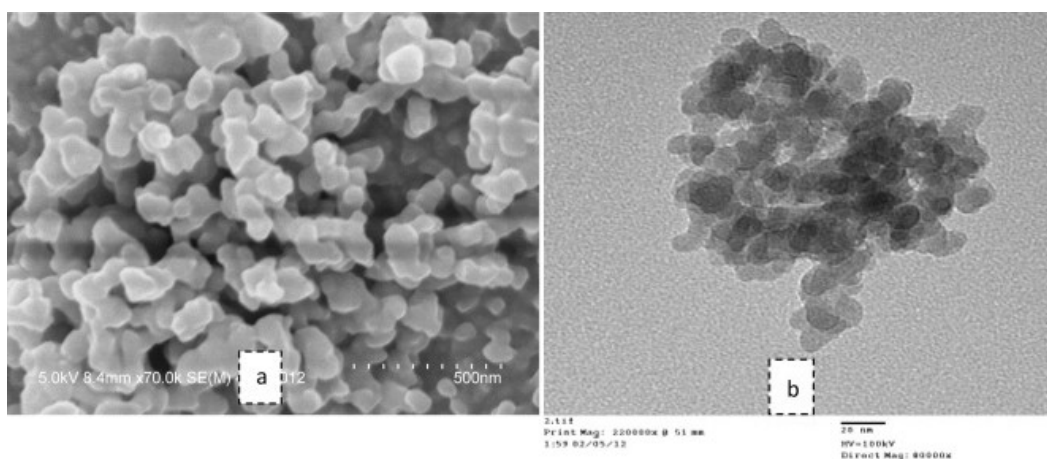
Biosyntézu nanočástic lze shrnout do tří hlavních fází:

- I. aktivační fáze – dochází k přeměně kovového iontu z mono– nebo divalentního oxidačního stavu na nulamocný a zároveň k nukleaci redukováného kovového iontu;
- II. fáze růstu – nanočástice tvoří agregáty o různých tvarech (pětiúhelníkové, šestiúhelníkové, sférické, krychlové atd.), biogenní extrakt působí jako stabilizační činidlo pro získání ustálené morfologie;
- III. ukončovací fáze – agregáty nanočástic se shlukují za vzniku nanotrubic, nanohranolů a dalších nepravidelně tvarovaných aglomerátů. [25]

### 2.3.1 Využití rostlin

Rostliny a jejich různé části jsou používány k syntéze NPs různých tvarů a velikostí. Upřednostňovány jsou listy, semena a květy, jelikož bioaktivní sloučeniny z nich získané (např. alkaloidy, glykosidy, terpenoidy, vitaminy či enzymy) působí jako redukční a stabilizační látky pro kovové ionty. Mezi hlavní výhody využití rostlin patří snadná dostupnost a bezpečná manipulace. [25]

Doposud bylo vyvinuto mnoho postupů věnující se biosyntéze nanočástic oxidu titaničitého. Například Ganapathi Rao a kol. využili extrakt z květů ibišku čínského (lat. *Hibiscus rosa-sinensis*) k syntéze NPs oxidu titaničitého s průměrnou velikostí 43,5 nm. [27] Roopan a kol. syntetizovali z extraktu kůry stromu anona šupinatá (lat. *Annona squamosa*) nanočástice rutilu o velikosti  $23 \pm 2$  nm. Rastrovací a elektronovou mikroskopií byla pozorována morfologie nanočástic přibližně kulovitěho tvaru tvořící agregáty i aglomeráty. (viz obrázek 7). [28]



Obrázek 7 TiO<sub>2</sub> nanočástice a) SEM (měřítko 500 nm), b) TEM (měřítko 20 nm), upraveno podle [28]

### 2.3.2 Využití mikroorganismů

Podobně jako rostliny obsahují i bakterie a mikroskopické houby různé složky, jež hrají zásadní roli při stabilizaci a redukci nanočástic oxidu titaničitého. [23] Byla popsána bakteriální výroba NPs  $\text{TiO}_2$  s využitím *Aeromonas hydrophila*. Syntetizované nanočástice o velikosti 28–54 nm navíc vykazovaly inhibiční aktivitu proti *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus pyogenes*. [29] V jiné studii byl pro výrobu nanočástic použit *Bacillus subtilis*, vyrobené nanočástice  $\text{TiO}_2$  měly kulovitý tvar a velikost 66–77 nm. [30]

Mikroskopickými houbami zprostředkovaná syntéza nanočástic má navíc další výhody. Houby obsahují velké množství biomasy, a proto poskytují vysoký výtěžek nanočástic. Často využívaným druhem pro tuto ekologickou syntézu je *Aspergillus flavus*. [23]

### 3 DERMÁLNÍ EXPOZICE NANOČÁSTICÍM OXIDU TITANIČITÉHO

Jakýkoliv druh organismu vždy čelil vystavení nanočásticím z prostředí, jež interagují s jejich vnější bariérou. Významný zájem o tyto interakce se však objevil až s širokým vzestupem nanočástic umělých. Je nezbytné prozkoumat různé biologické aspekty expozice nanočástic pro lidský organismus. Na straně jedné je potřeba identifikovat a hodnotit zdravotní rizika, na straně druhé zase objevit a využít medicínský a farmaceutický potenciál. [31] Příkladem interakce nanočástice-kůže je lokální použití nanočástic stříbra jako volně prodejných antimikrobiálních látek, kde nanočástice zajišťují pomalé uvolňování iontů stříbra, které mohou inhibovat mikrobiální proliferaci, ale také urychlit hojení ran. Toto řízené uvolňování stříbra, zatímco nanočástice zůstávají na povrchu kůže, zdůrazňuje jednu z nejúspěšnějších strategií lokálního dodávání léčiv nanočásticemi. [32]

Hladina nebo koncentrace nanočástic v tělesném systému závisí na rychlosti absorpce, distribuci, metabolismu a vylučování. Tyto procesy mohou nastat po expozici prostřednictvím inhalace, požití, dermálního kontaktu a intraperitoneální nebo intravenózní injekce. [1] Topická aplikace je široce používána v klinické praxi jako způsob podávání léků při léčbě dermatologických onemocnění, svalových poranění i transdermálního dodání léků do krevního oběhového systému. [33] Lokální podávání léčiva přes kůži umožňuje obejít metabolismus prvního průchodu po perorálním podání a poskytuje výhodu při léčbě klinických a subklinických lézí na velkém povrchu těla. [34]

Pravděpodobnost pronikání nanočástic přes kůži byla v roce 2009 přezkoumána Vědeckým výborem pro bezpečnost spotřebitele (Scientific Committee on Consumer Safety, SCCP), jež vyjádřil skutečnou situaci pro dermální expozici následovně:

- I. Existují důkazy o určitém pronikání do životaschopných tkání kůže (hlavně do *stratum spinosum* v epidermální vrstvě, ale případně také do dermis) pro velmi malé částice (méně než 10 nm), jako jsou funkcionalizované fullereny a kvantové tečky.
- II. Při použití akceptovaných protokolů pronikání kůží (neporušená kůže) neexistuje žádný nezvratný důkaz o pronikání do životaschopné tkáně kůže pro primární částice o velikosti asi 20 nm a větší, jaké se používají v opalovacích krémech s fyzikálními UV filtry.

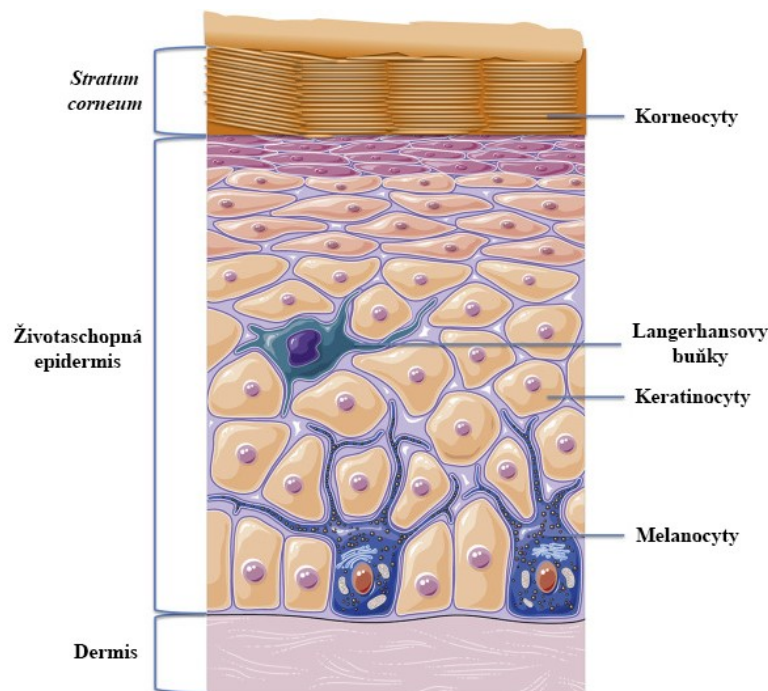


- III. Výše uvedená tvrzení o kožním pronikání platí pro zdravou kůži (lidskou a prasečí). Pro kůži s narušenou bariérovou funkcí chybí vhodné informace, např. atopická kůže nebo kůže spálená sluncem. K dispozici je několik údajů o psoriatické kůži.
- IV. Existují důkazy, že některé mechanické účinky (např. ohýbání) na kůži mohou mít vliv na pronikání nanočástic.
- V. Nejsou žádné informace o transadnexální penetraci pro částice pod 20 nm. Nanočástice o velikosti 20 nm a více pronikají hluboko do vlasových folikulů, ale nebyla pozorována žádná penetrace do životaschopné tkáně. [35]

### 3.1 Kůže

Kůže je největším orgánem lidského těla, slouží jako první obranná linie proti mikroorganismům, UV záření i chemikáliím. Díky svým odolným bariérovým vlastnostem taktéž zabraňuje ztrátě solí a tekutin a zároveň reguluje tělesnou teplotu. [34] Přestože je obvykle tenčí než 2 mm, přispívá k tělesné hmotnosti přibližně 4 % a je 102–104krát méně propustná než stěna krevních kapilár. [36]

Kůže sestává ze tří vrstev – epidermis, dermis a subcutis (podkoží), přičemž epidermis a dermis tvoří její hlavní strukturu (obrázek 8). [37]



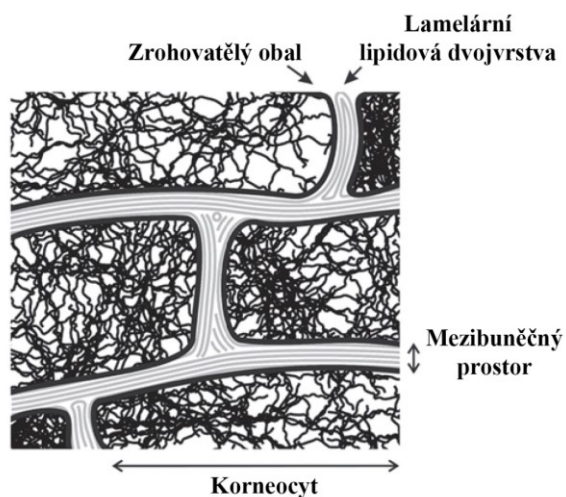
Obrázek 8 Struktura kůže, upraveno podle [34]

Epidermis je tvořena několika vrstvami buněk počínaje nejvnitřnější *stratum germinativum* (*basale*), následuje *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum*, které je přítomno pouze na dlaních a chodidlech, a *stratum corneum* (SC). Z praktických důvodů může být epidermis obecně rozdělena na životaschopnou epidermis a *stratum corneum*. [38] Epidermis nemá vaskularizaci a živiny do ní difundují pomocí dermoepidermálního spojení z dermis. [37] Keratinocyty (buňky epidermis) procházejí procesem keratinizace, při kterém buňky migrují směrem ke SC a diferencují se v korneocyty (viz kapitola 3.1.1). Kromě keratinocytů jsou v epidermis přítomny melanocyty produkující melanin, Langerhansovy buňky zodpovědné za imunitní funkci kůže a mechanoreceptory Merkelovy buňky. [32]

Dermis obsahuje různé typy buněk, nervy, krevní a lymfatické cévy zasazené do husté sítě pojivové tkáně. [32] Dermis plynule přechází v subcutis, která pomáhá absorbovat mechanické otřesy, jež by jinak mohly ohrozit kožní cévy a nervy [36], a působí jako tepelný izolátor. [38] Kromě strukturovaných buněčných složek jsou v kůži i kožní přívesky – vlasové folikuly s přidruženými mazovými žlázami a žlázy potní. [32]

### 3.1.1 *Stratum corneum*

*Stratum corneum* má tloušťku obvykle 10–25  $\mu\text{m}$  a je tvořeno 15–20 vrstvami korneocytů – anecluované, zploštělé, neživotaschopné buňky naplněné keratinem. [37] Jediná mezibuněčná organizace SC má zásadní roli ve funkci kožní bariéry. [18] Tato strukturální organizace je popisována modelem „cihel a malty“, ve kterém cihlami jsou myšleny korneocyty a maltou mezibuněčné lipidy, jež tvoří zrohovatělý obal obklopující korneocyty (obrázek 9). [37]

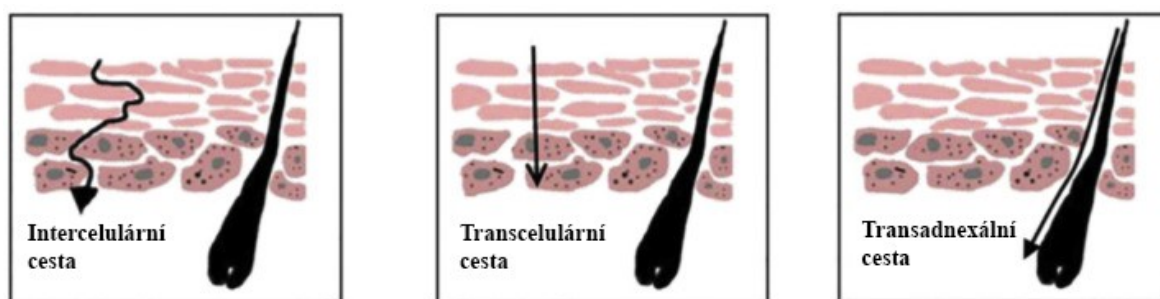


Obrázek 9 Schéma morfologie *stratum corneum*, upraveno podle [31]

Mezibuněčné lipidy (ceramidy, volné mastné kyseliny s dlouhým a krátkým řetězcem a cholesterol) tvoří dvoulamelární fáze, v jejichž rámci jsou lipidy strukturovány v semikrystalických mřížkách. Kromě důležitosti SC jsou pro funkci kožní bariéry důležité těsná spojení mezi keratinocyty ve *stratum granulosum* (desmozomy), těsná spojení mezi korneocyty (korneodesmozomy), kožní imunitní faktory a sekrece mazových žláz. [18] Výjimečnost této kožní bariéry ilustruje také související strmý pokles koncentrace vody z přibližně 75 % v životaschopné epidermis na pouhých 10–30 % ve SC. [36] Lze jej považovat za lipidní kompartment, zatímco životaschopná epidermis je prostředí hydrofilnější. Snadnější distribuce ve SC je tedy pro lipofilní molekuly. [31] Vlastnosti propustnosti *stratum corneum* se po odstranění z těla nemění, a proto jsou vhodné pro experimenty *in vitro*. [39]

### 3.2 Cesty dermální absorpce

Pokud jde o absorpci jakéhokoliv druhu materiálu, lze uvažovat dvě obecné cesty (viz obrázek 10) – přes *stratum corneum* a spodní vrstvy kůže (intercelulární a transcelulární cesta) anebo pomocí kožních přívěsků (transadnexální cesta). [31] Vzhledem k vysoce nepropustnému charakteru zrohovatělého obalu korneocytů má transcelulární cesta ve srovnání s intercelulární menší význam. V intercelulárním vstřebávání může být transport látek usnadněn kapalnými doménami vytvořenými nenasycenými skupinami ceramidů v 13 nm široké lamelární fázi. [18] Zvolená cesta tedy závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech částice, vlastnostech konečné formulace a stavu samotné pokožky. [34]



Obrázek 10 Cesty dermální absorpce, upraveno podle [34]

Přestože kožní přívěsky představují pouze malou část povrchu kůže (0,1 %), přispívají k absorpci a mohou být dokonce určeny pro řízenou dávku kvůli hloubce, do které zasahují. Invaze látky do kožního adnexa ještě není samotným absorpčním procesem, neboť látky uvnitř jsou stále na vnější straně těla. Nicméně akumulace v takových strukturách může vést

k rychlejšímu a účinnějšímu příjmu v důsledku změněné morfologie v nich [31] a díky absenci SC v dolní třetině folikulů. [34]

Při absorpci kůží představuje důležitou roli také místo aplikace, což zahrnuje umístění na těle a integritu kůže, rozměry pórů potních žláz a folikulů a jejich hustota. Integrita kůže nebo *stratum corneum* může být narušena dermatologickými (např. psoriáza, atopická dermatitida) a jinými patologickými (např. popáleniny, infekce) stavy i nadměrným používáním detergentů či dlouhodobým vystavením klimatizovanému, nezvlhčovanému prostředí. [40]

### 3.3 Vlastnosti penetrujících částic

Mezi faktory ovlivňující transdermální absorpci nepatří jen integrita a stav kůže, ale také vlastnosti penetrujících částic. Jednou z důležitých vlastností samotných nanočástic, která ovlivňuje jejich penetraci dermální bariérou, je jejich velikost. U zdravých jedinců nanočástice o velikosti  $<40$  nm v průměru mohou penetrovat transcelulární cestou, zatímco větší než 40 nm do *stratum corneum* nepronikají. Intercelulární penetrace jsou schopné látky menší než 7 nm. Folikulární cestu mohou využívat ty látky, jejichž rozměry jsou menší než rozměr folikulárních otvorů a jsou schopny rozptýlit se do potu nebo kožního mazu. Nicméně je důležité odečíst od průměru folikulárních otvorů tloušťku chlupů pro vyhodnocení skutečné plochy a objemu infundibula, jež by mohl být použit k penetraci. Dalším předpokladem pro folikulární penetraci je také homogenita, tedy nepřítomnost agregátů. Důležitým faktorem je také tvar, kdy sférické částice jsou schopny proniknout hluboko do epidermis i dermis, zatímco elipsoidní zůstávají především ve SC a vyšších epidermálních vrstvách. [40]

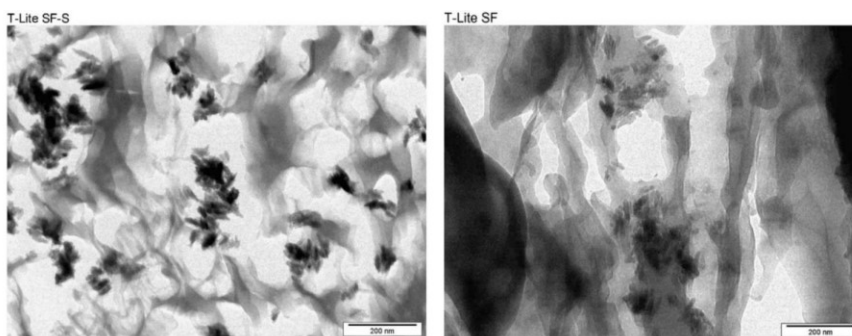
Zásadní roli mají i další faktory jako lipofilně-hydrofilní gradient, pH gradient či izoelektrický bod. [40] Ideální fyzikálně-chemické vlastnosti látky vybrané pro kožní podání jsou nízká molekulová hmotnost ( $<600$  Da), rozpustnost ve vodě a olejích pro dosažení vysokého koncentračního gradientu a zvýšení difúzní síly na kůži, zvýšený ale vyvážený rozdělovací koeficient a nízká teplota tání ( $<200$  °C), která souvisí s vhodnou rozpustností. [37] Pro absorpci kůží jsou vhodné pouze látky s rozdělovacím koeficientem ( $\log P$ ) mezi 1 a 3. [31]

### 3.4 Perkutánní pronikání krému na ochranu proti slunečnímu záření s nanočásticemi TiO<sub>2</sub> a ZnO

Nanočástice oxidu titaničitého a oxidu zinečnatého, formulované v topicky aplikovaných přípravcích na ochranu proti slunečnímu záření, existují jako agregáty o velikosti 30–150 nm. Tyto agregáty jsou spojeny natolik, že síla nanášení přípravku na kůži nemá žádný dopad na jejich strukturu ani nevede k uvolňování primárních částic (viz kapitola 1.2). Několik studií ukázalo, že ani za přehnaných testovacích podmínek NPs oxidu titaničitého ani zinečnatého nepronikají do kůže hlouběji než do *stratum corneum*. [12]

Při diskuzi o bezpečnosti nanočástic v opalovacích krémech je však potřeba brát v úvahu možnost jejich aplikace na kůži spálenou sluncem, neboť lidé často znovu nanášejí opalovací krém poté, co byli slunci vystaveni a mohli se spálit. [41] Narušení kožní bariéry způsobené UVB zářením může vést ke zvýšené epidermální permeabilitě, která je pravděpodobně spojena s defektními lipidovými lamelárními vrstvami ve SC. [18]

Gamer a kol. testovali *in vitro* absorpci nanočástic oxidu zinečnatého a titaničitého v emulzích olej/voda na prasečí kůži (laterální břišní oblast) pomocí Francových statických penetračních cel a stripování. Emulze oxidu zinečnatého obsahovala nepotažené nanočástice Z-Cote o střední velikosti primárních částic 80 nm. Dvě formulace oxidu titaničitého T-Lite SF-S (potaženy oxidem křemičitým a methikonem) a T-Lite SF (potaženy pouze methikonem) byly jehlovitého tvaru s rozměry 30–60 na 10 nm (obrázek 11). Ve všech formulacích byly primární částice, agregáty a v případě TiO<sub>2</sub> i aglomeráty přítomny pouze ve vodné fázi. Bylo zjištěno, že zinek, titan ani NPs ZnO a TiO<sub>2</sub> nebyly schopny proniknout *stratum corneum* prasečí kůže. Většina aplikovaného materiálu byla obnovena v prvních pěti stripech, což naznačuje, že nepronikl do hlubších vrstev kůže. Navíc k odstranění NPs oxidu titaničitého z kůže postačovala jednoduchá mycí procedura. [39]



Obrázek 11 Elektronové mikrofotografie oxidu titaničitého T-Lite SF-S (vlevo) a T-Lite SF (vpravo) v kosmetických formulacích [39]

Mavon a kol. uvádějí studie *in vitro* a *in vivo* pronikání nanočástic TiO<sub>2</sub> (velikost částic 20 nm) na lidské kůži. Testovaným materiálem byla emulze voda/olej. Studie *in vivo* byly provedeny na laterální části paže tří dobrovolníků stripovací metodou, pro *in vitro* testování byly využity části kůže z břicha a obličeje z plastické chirurgie. V obou studiích bylo více než 97 % aplikovaného titanu získáno ve SC, žádný titan nebyl detekován ve folikulech, životaschopné epidermis nebo dermis. [42]

Běžné přípravky na ochranu proti slunečnímu záření jsou většinou založeny na emulzích olej/voda (o/v) a voda/olej (v/o) s dispergovanými částicemi TiO<sub>2</sub> a ZnO. Emulze jsou obecně nestabilní, může dojít ke změně emulze v/o na o/v nebo jejich rozpadu na kůži, čímž se může zvýšit permeabilita kůže. [18] Bylo prokázáno, že nanočástice oxidu titaničitého pronikají hlouběji do lidské kůže z disperze olejové než z vodné. [43] Proto by měly formulace opalovacích přípravků obsahovat minerální UV filtry dobře rozptýlené ve fázi vodné. [18]

## 4 ZDRAVOTNÍ RIZIKA NANOČÁSTIC OXIDU TITANIČITÉHO

Nanočástice lze klasifikovat jako:

- I. rozpustné a/nebo biologicky odbouratelné, které se po aplikaci na kůži rozpadají na molekulární druhy (např. liposomy, mikroemulze a nanoemulze), nebo
- II. nerozpustné a/nebo bioperzistentní (např.  $\text{TiO}_2$ , fullereny, kvantové tečky).

Obecně lze pro první skupinu použít metodiky hodnocení rizik, zatímco pro druhou skupinu je vyžadováno hodnocení podrobnější. Zejména nerozpustné částice mohou vést ke zdravotním problémům, pokud jsou zachyceny kůží v důsledku jejich translokace/transportu a případné akumulace v sekundárních cílových orgánech, především při jejich opakované aplikaci. Navíc je zde otázka zátěže ekologické. [32]

Široká aplikace nanočástic oxidu titaničitého poskytuje značný potenciál pro expozici člověka a uvolňování do životního prostředí, což nevyhnutelně umožňuje potencionální zdravotní riziko pro lidi, zvířata i ekosystém. Rychlý nárůst počtu publikovaných studií potvrzuje, že je o bezpečnost nanočástic  $\text{TiO}_2$  velký zájem. [1] Bylo provedeno mnoho studií *in vitro* i *in vivo* na lidech i zvířatech zabývající se orální a kožní expozicí nanočásticemi oxidu titaničitého i zinečnatého, zahrnující například kožní podráždění, fototoxicitu či fotosenzibilizaci. Riziko toxicity lidí není žádné nebo je minimální. [10]

### 4.1 Karcinogenita

Experimentální studie na zvířatech ukazují, že vysoké koncentrace nanočástic oxidu titaničitého mohou způsobit rakovinu dýchacího traktu u exponovaných potkanů. [1] Heinrich a kol. zkoumali karcinogenitu NPs  $\text{TiO}_2$  (velikost 15–40 nm). Po dvouleté expozici zjistili, že byly tyto nanočástice tumorigenní [44], nicméně tento účinek nanočástic oxidu titaničitého byl zpochybňován a připisován spíše přetížení plic než specifické karcinogenitě. [1] Přesto v roce 2006 klasifikovala Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer, IARC) oxid titaničitý karcinogenem 2B, tedy jako možný karcinogen pro člověka. V monografii týkající se  $\text{TiO}_2$  uvádějí, že neexistují dostatečné důkazy o karcinogenitě oxidu titaničitého u lidí, ale u pokusných zvířat existuje dostatek důkazů o jeho karcinogenitě. [45] Předpokládá se, že nejvíce ohrožení vdechování nanočástic oxidu titaničitého jsou pracovníci zapojení přímo do jejich výroby. [10]

## 4.2 Cytotoxicita a genotoxická

Cytotoxicita a genotoxicita nanočástic  $\text{TiO}_2$  je často spojena s jejich fotokatalytickou aktivitou, neboť dochází ke světlem indukované produkci hydroxylových ( $\bullet\text{OH}$ ) a superoxidových aniontových radikálů ( $\bullet\text{O}_2^-$ ). Vznik volných radikálů lze měřit přímo pomocí elektronové spinové rezonance nebo nepřímo detekcí fotoindukovaného buněčného poškození v testech buněčné toxicity. [18] Uchino a kol. studovali tvorbu hydroxylových radikálů působením UVA v různých formách NPs  $\text{TiO}_2$ . Zjistili, že ozářením krystalické formy anatas bylo generováno množství  $\bullet\text{OH}$  v závislosti na dávce, zatímco rutil vykazoval mnohem menší tvorbu hydroxylových radikálů. Cytotoxicita těchto radikálů byla poté testována vůči ovariálním buňkám čínského křečka. [46]

Oxidační stres a buněčná toxicita by mohly být problémem, pokud by nanočástice  $\text{TiO}_2$  pronikaly do životaschopné epidermis, dermis a krevního oběhu. Studie *in vivo* i *in vitro* však zjistily, že se tomu tak neděje. [10]

## 4.3 Vliv nanočástic oxidu titaničitého na životní prostředí

Vliv nanočástic  $\text{TiO}_2$  i  $\text{ZnO}$  je komplikovaný, neboť jsou to minerály nacházející se v životním prostředí a je obtížné odlišit účinek těch přirozeně se vyskytujících od těch uměle vytvořených. [10] NPs oxidu titaničitého z potravin, spotřebního zboží a výrobků pro domácnost jsou vypouštěny do odpadních vod. Přestože jsou čistírny odpadních vod schopny odstranit většinu  $\text{TiO}_2$  v nano velikosti, stále byly v čištěných vodách nalezeny nanočástice o velikosti 4–30 nm, jež se uvolňují do povrchových vod, kde mohou interagovat s živými organismy. [7]

Gondikas a kol. hodnotili po dobu jednoho roku koncentraci nanočástic oxidu titaničitého na Starém Dunajském jezeře (Alte Donau, Rakousko) shromažďováním suspendovaných částic s následnou analýzou kombinací komplementárních technik. Zjistili, že nedokáží odlišit nanočástice z přípravků na ochranu proti slunečnímu záření od přírodních nanočástic obsahujících titan, ale na druhou stranu pozorovali mírný celkový nárůst částic titanu v létě. Pomocí elektronové mikroskopie také zjistili, že NPs nezůstávají ve vodě volně suspendované, ale agregují se a sedimentují. [47]

V současné době je známé riziko pro životní prostředí nízké, i když s rostoucím používáním anorganických filtrů ( $\text{TiO}_2$  a  $\text{ZnO}$ ), a tedy s jejich zvyšující se koncentrací, se může významně zvyšovat. [10]



## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 MATERIÁLY A METODY

Cílem práce bylo stanovení transdermální absorpce *in vitro* oxidu titaničitého (krystalické formy anatas a rutil) na prasečí kůži. Kůže byla nejdříve vystavena nanočásticím TiO<sub>2</sub> v systému difúzních permeačních cel. Permeace nanočástic byla vyhodnocena na základě mikroskopie histologických řezů a stripů kůže.

### 5.1 Použité vzorky a chemikálie

- Oxid titaničitý
  - Rutil 5 (Precheza a. s., Česká republika)
  - Anatas (Sigma Aldrich, Německo)
- Triglycerid kyseliny kaprylové/kaprinové (Acettrade, Česká republika)
- Fosfátový pufr (Biosera, Francie)
- Gentamicin sulfát (Sigma Aldrich, Německo)
- Brij O20 (Sigma Aldrich, USA)
- Roti Histofix ECO plus (Carl Roth, Německo)
- Ethanol (Penta, Česká republika)
- Xylen (Sigma Aldrich, Německo)
- Surgipath Paraplast parafinový vosk (Leica Mikrosysteme, Německo)
- Demineralizovaná voda

### 5.2 Použité přístroje a pomůcky

- Váha analytická AS 220.R2 (RADWAG, Polsko)
- Ultrazvukový sonikátor UP400S (Heielscher, Německo)
- Míchačka magnetická Arex Digital Pro (Velp, Itálie)
- Mikroskop IX81 (Olympus, Japonsko) s digitální kamerou DFC480 (Leica Mikrosysteme, Německo)
- Rotační mikrotom Pathome LS 2065A
- Mikrotomová čepel BS1 (Dakewe, Japonsko)

- Mikrometr (Kinex, Česká republika)
- Stanice MPA5 se sondou Tewametr TM 300 (Courage+Khazaka electronic GmbH., Německo)
- Permeagear Fraction Collector FC33 (SES GmbH. Analysesysteme, Německo)
- Sušárna UN30 (Memmert GmbH., Německo)
- Nástroje pro přípravu vzorků kůže – jednorázová žiletka, skalpel, pinzety, chirurgické nůžky
- Stripovací páska
- Běžné laboratorní pomůcky

### 5.3 Příprava vzorků kůže

Pro hodnocení transdermální absorpce *in vitro* byla použita kůže z ušního boltce prasete. Z důvodu dále provedených histologických řezů nesměly být použity ušní boltce, jež byly skladovány při teplotách pod bodem mrazu, a z důvodu možného porušení kožní bariéry ani tepelně opražené. Boltce byly očištěny pod tekoucí vodou a pomocí jednorázové žiletky byly depilovány ušní štětiny. Kůže v rozsahu epidermis a dermis byla pomocí skalpelu a pinzety odstraněna od podkladové chrupavky (obrázek 12).



Obrázek 12 Ušní boltce (vlevo) a z něj odstraněná kůže (vpravo)

Z kůže bylo chirurgickými nůžkami vystřiženo několik vzorků čtvercového tvaru o velikosti 2,5×2,5 cm. U všech vzorků byla změřena tloušťka pomocí mikrometru (Kinex, Česká republika) a hodnota transepidermální ztráty vody (Transepidermal Water Lose, TEWL) sondou Tewametr TM 300 (Courage+Khazaka electronic GmbH., Německo).

#### 5.4 Příprava disperzí oxidu titaničitého

Pro tuto práci byly vybrány dvě krystalické formy oxidu titaničitého – anatas (Sigma Aldrich, Německo) a rutil 5 (Precheza a. s., Česká republika), charakterizace částic v tabulce 1.

Tabulka 1 Charakterizace použitých částic TiO<sub>2</sub> podle dodavatelů

Vzorek	Specifická plocha [m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup> ]	Krystalová forma	Velikost krystalu [nm]
Anatas	45–55	anatas	<25
Rutil 5	7,11	rutil	150

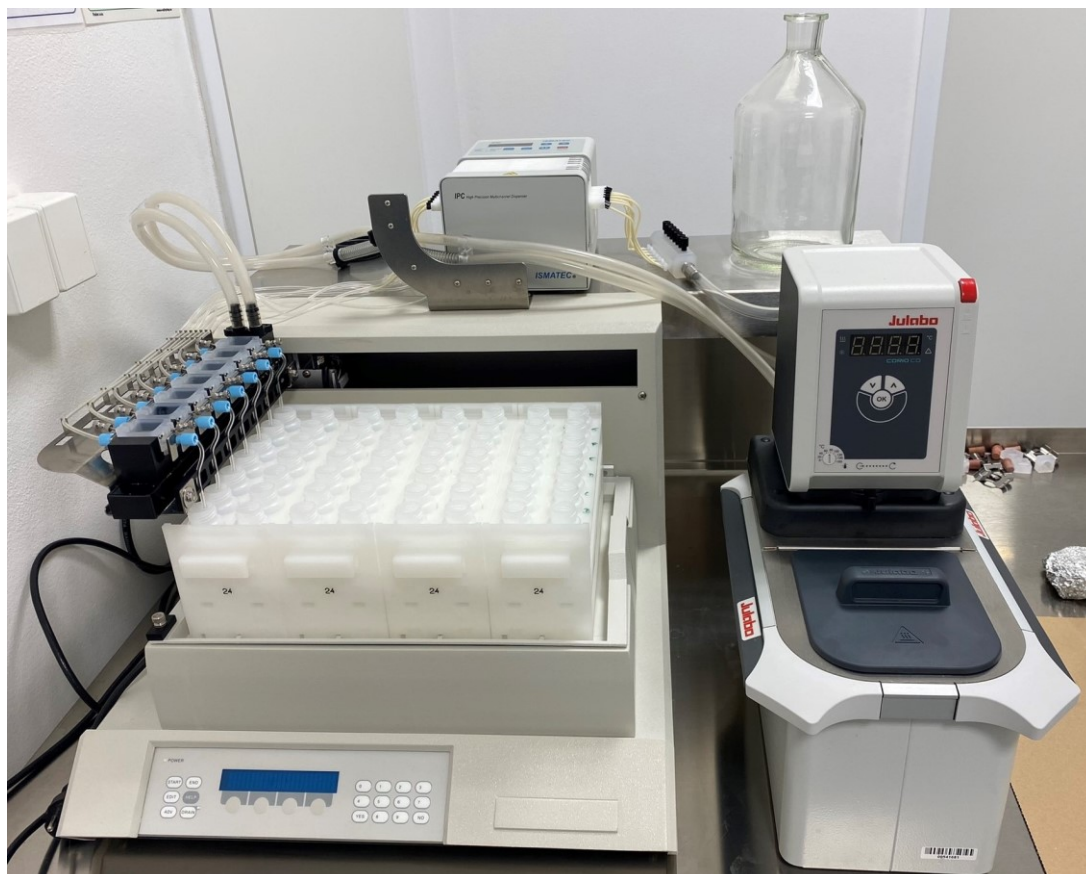
Disperze byly připraveny homogenizováním 0,5 g částic TiO<sub>2</sub> v 10 mL triglyceridu kyseliny kaprylové/kaprinové (Acettrade, Česká republika) pomocí ultrazvukového sonikátoru UP400S (Heielscher, Německo) po dobu 20 minut. Průběh sonikace a vzniknuté disperze jsou vyobrazeny na obrázku 13.



Obrázek 13 Sonikace (vlevo) disperzí oxidu titaničitého (vpravo)

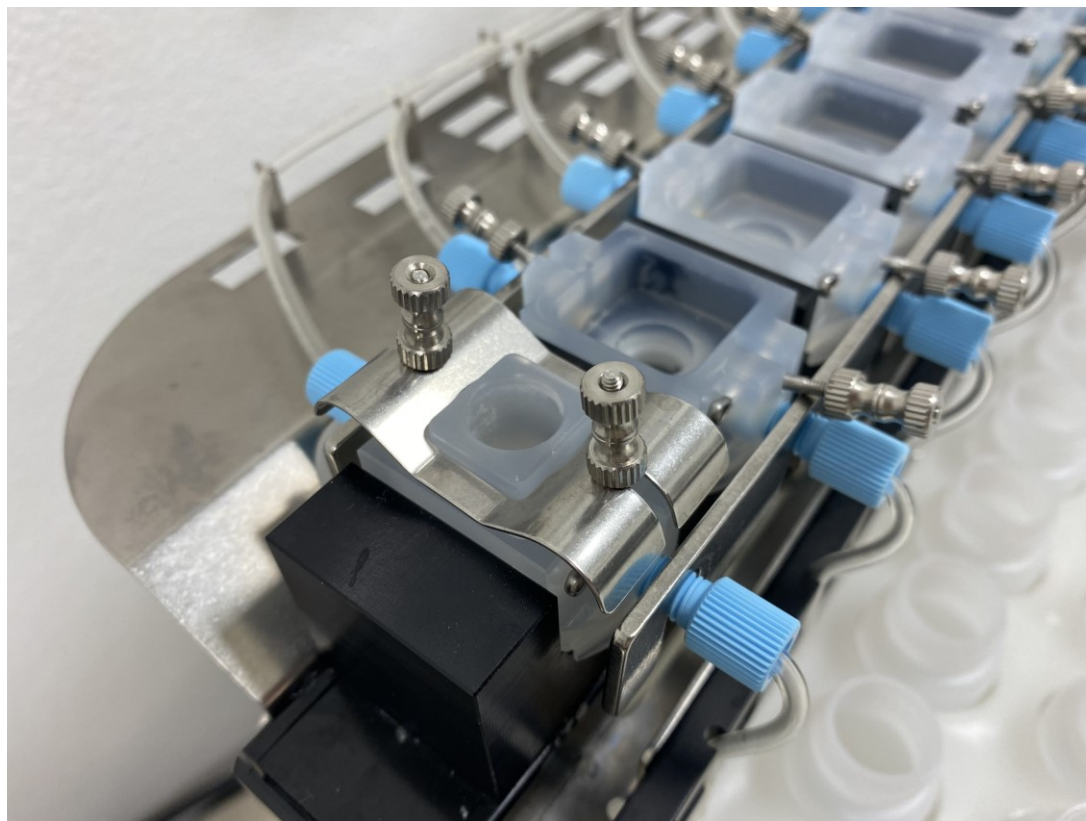
## 5.5 Transdermální absorpce

Pro posouzení penetrace částic oxidu titaničitého po dermální expozici *in vitro* byl použit transdermální difúzní detekční systém Permeagear Fraction Collector FC33 (SES GmbH, Analysesysteme, Německo), jež je zobrazen na obrázku 14.



Obrázek 14 Příklad přístroje Permeagear Fraction Collector FC33

Tento přístroj se skládá z permeačních cel (obrázek 15), recirkulační vodní lázně, peristaltického čerpadla s hadičkovým kazetovým systémem, jehož součástí je zásobní láhev pro receptorovou kapalinu, a z police se zásobníky na sbírání receptorové kapaliny (obrázek 15).



Obrázek 15 Detail na permeační cely přístroje PermeaGear Fraction Collector FC33

Vzorky kůže byly vloženy do permeačních cel a po dobu 30 minut byly ponechány v kontaktu s receptorovou kapalinou. Receptorová kapalina byla složena z fosfátového pufru (Biosera, Francie), 0,05% gentamicin sulfátu (Sigma Aldrich, Německo) a 1,5% Brij O20 (Sigma Aldrich, USA). Průtok receptorové kapaliny byl peristaltickým čerpadlem nastaven na  $33,3 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ , což odpovídá průtoku 2 mL za jednu hodinu. Poté byly na vzorky kůží nanесeny konečné dávky ( $10 \mu\text{L} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) testovaných disperzí, na dva vzorky anatas a na další dva rutil 5. Recirkulační vodní lázeň byla nastavena na teplotu  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ , jež byla konstantní po celou dobu experimentu. Celková doba dermální expozice činila 24 hodin.

## 5.6 Histologické řezy kůže

### 5.6.1 Fixace vzorků kůže

Po 24hodinové dermální expozici disperzemi  $\text{TiO}_2$  byly dva vzorky kůže – jeden po expozici anatasem a jeden rutilem 5, umístěny do plastových komůrek a vloženy do fixační kapaliny Roti Histofix ECO plus (Carl Roth, Německo) na dobu 48 hodin (obrázek 16). Roti Histofix ECO plus je fixační činidlo na bázi hexamethylentetraminu. Na rozdíl od běžně využívaného formaldehydu se jedná o netoxický roztok. Při využití tohoto fixačního činidla je nativní morfologie tkáně zachována a nedochází k tvorbě artefaktů, takže je zabráněno smršťování vzorku kůže.



Obrázek 16 Fixace vzorků kůže

### 5.6.2 Zalévání vzorků kůže do parafínu

Po fixaci byly vzorky nachystány na zalévání do parafinových bloků odvodněním (vzestupná alkoholová řada), projasněním a prosycením. V tabulce 2 jsou znázorněny jednotlivé použité chemikálie a doba, po kterou byly vzorky v této chemikálii umístěny.

Tabulka 2 Chemikálie a jejich doby expozice pro přípravu vzorků kůže na zalévání parafínem

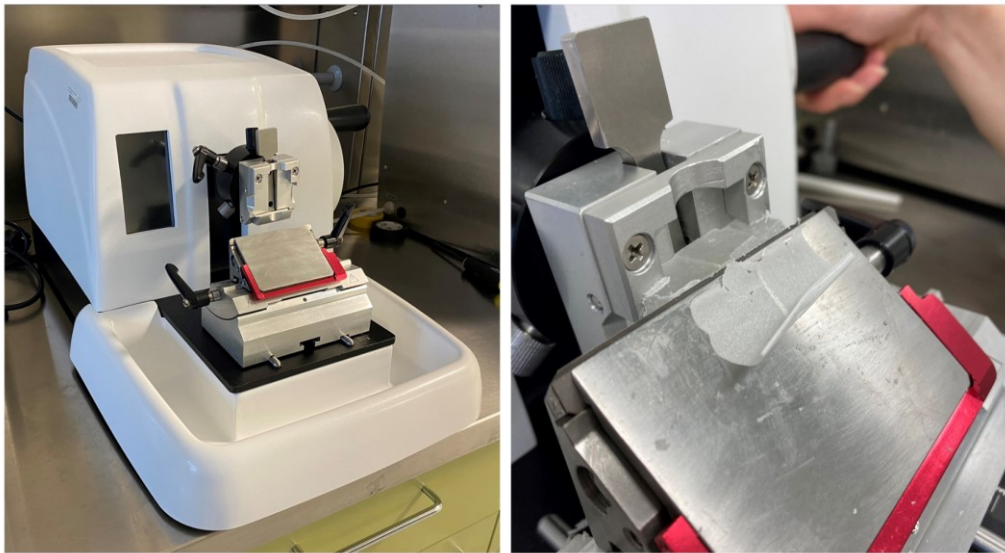
Chemikálie	Doba expozice [h]
70% Ethanol	1
80% Ethanol	1
95% Ethanol	1
100% Ethanol	1
Xylen	1, 1
Parafín (58–60 °C)	2, 48

Z důvodu použití parafínu, tedy ve vodě nerozpustného zalévacího média, bylo nutné odvodnit vzorky s využitím vzestupné řady ethanolu (Penta, Česká republika). Při odvodnění tkáně často dochází k jejímu smrštění. Při zvoleném postupu využívající vzestupnou alkoholovou řadu dochází k co nejmenšímu smrštění kůže. Dále byly vzorky projasněny xylenem (Sigma Aldrich, Německo) a prosyceny rozpuštěným parafínovým voskem (Leica Mikrosysteme, Německo). Při projasnění se vzorek kůže prosytí rozpouštědlem a tím se tkáň zprůsvitní. Z důvodu teploty tání parafínu 56 °C byly tyto vzorky umístěny po celou dobu expozice v sušárně UN30 (Mettmert GmbH., Německo) při teplotě 60°C. Po prosycení byly vzorky vyjmuty z plastových komůrek, vloženy do forem, jež byly nachystány na požadovaný tvar parafínového bloku, a zality rozpuštěným parafínovým voskem. Po zalití voskem byly ponechány ztuhnout při laboratorní teplotě.

### 5.6.3 Krájení řezů

Ztuhnuté parafínové bloky se vzorky kůže byly krájeny na rotačním mikrotomu Pathome LS 2065A. Mikrotom společně s detailem krájení parafínového bloku je zobrazen na obrázku 17. Pomocí mikrotomu byly postupně vytvořeny řezy o tloušťce 30–200  $\mu\text{m}$  a to po 10  $\mu\text{m}$  krocích.



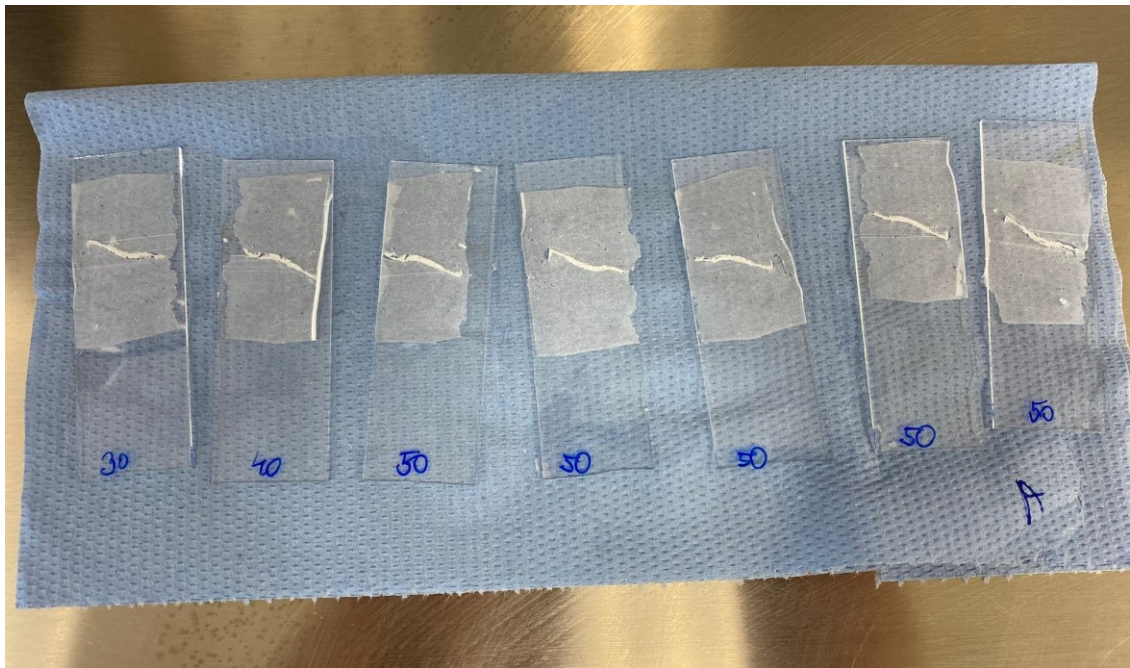


Obrázek 17 Rotační mikrotom (vlevo) a detail na krájení parafinového bloku (vpravo)

Řezy byly přímo z mikrotomu vloženy do vodní lázně o teplotě 40 °C z důvodu narovnání a vypnutí řezů. Z této vodní lázně byly poté opatrně po jednom nabírány na podložní sklo (obrázek 18) a ponechány při laboratorní teplotě vyschnout (obrázek 19).



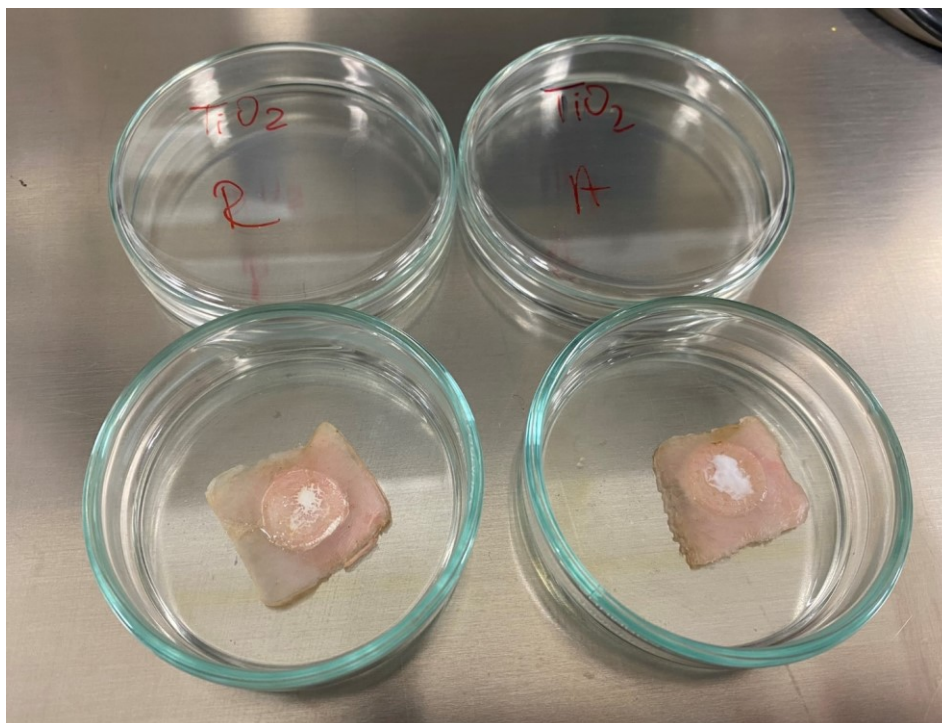
Obrázek 18 Nabírání řezu z hladiny teplé vody na podložní sklo



Obrázek 19 Řezy parafinového bloku o různých tloušťkách

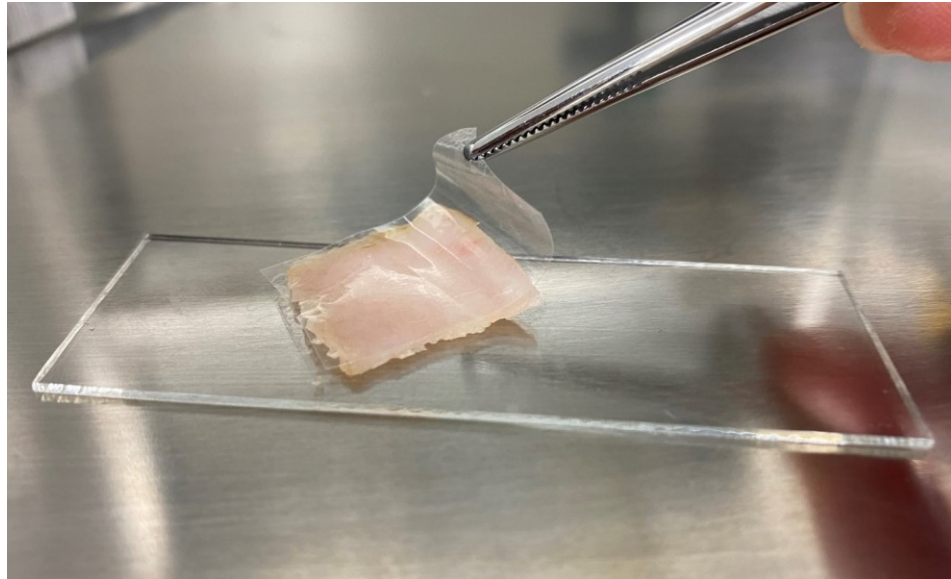
## 5.7 Stripování kůže

Stripy vzorků kůže po dermální expozici oxidu titaničitého byly vytvořeny ze zbývajících dvou vzorků (jeden anatas, jeden rutil), tedy z těch, které nebyly použity na přípravu histologických řezů. Kůže byla nejdříve omyta jemným proudem demineralizované vody, aby byly odstraněny disperze, jež zůstaly na kůži, jak je vidno na obrázku 20.



Obrázek 20 Vzorky kůže po dermální expozici disperzí  $\text{TiO}_2$  – rutil (vlevo), anatas (vpravo)

Technika stripování zahrnuje postupné odstraňování buněčných vrstev *stratum corneum* aplikací kousků adhezivní pásky (obrázek 21). Páska je aplikována tlakem, aby se zajistilo její přilnutí ke kůži. Tlak a rychlost aplikace by měly být během celého procesu stejné, aby byla zajištěna homogenita relativního množství odstraněného SC. [37] Celkem bylo vytvořeno 20 stripů ze vzorku po expozici anatasem a 20 stripů ze vzorku po expozici rutilem 5. První strip není pro hodnocení použit, neboť může obsahovat velké množství testovaných disperzí, jež se nepodařilo omýt vodou, a které by mohly ovlivnit vyhodnocení experimentu.



Obrázek 21 Stripování vzorků kůže

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Oxid titaničitý patří mezi top 5 nejčastěji využívaných nanočástic ve spotřebních produktech, mezi které patří kosmetika, potraviny, či pigmenty. [48] Rostoucí využívání materiálů s obsahem  $\text{TiO}_2$  vede též k jeho zvýšené expozici na lidský organismus. S tím jsou spojená různá zdravotní rizika dopadající na člověka.  $\text{TiO}_2$  je nejčastěji využíván v dermálních produktech, a to hlavně v opalovacích přípravcích a různých krémech určených na kožní ošetření, například akné, atopickou dermatitidu, hyperpigmentované kožní léze a další. [49]. Z těchto aplikací je zřejmé, že k orgánům nejčastěji vystavovaným částicím  $\text{TiO}_2$  patří lidská kůže. Z tohoto důvodu je tato práce zaměřena právě na transdermální absorpci po expozici titanovým částicím. Kůže byla vystavena dvěma, nejčastěji se vyskytujícím, krystalovým formám tohoto oxidu.

V rámci praktické části této diplomové práce byly připraveny histologické řezy a stripy kůže ušního boltce prasete, která byla po dobu 24 hodin exponována disperzím oxidu titaničitého v transdermálním difúzním systému. Byly použity dvě syntetické krystalové formy oxidu titaničitého anatas a rutil, přičemž obě formy byly podrobeny histologickým řezům i stripování. Obě techniky byly vyhodnoceny mikroskopicky pomocí mikroskopu IX81 (Olympus, Japonsko) s digitální kamerou DFC480 (Leica Mikrosysteme, Německo).

### 6.1 Integrita kůže

Integrita kůže je velmi důležitý parametr ovlivňující pronikání částic skrze tento orgán. Pro testování transdermální absorpce je nezbytné, aby si kožní vzorky zachovali svou celistvost. Nevhodné zacházení s biologickými vzorky může vést k poškození *stratum corneum*, tedy k poškození kožní bariéry. Proto je nutné před samotným testováním připravené vzorky kůže zkontrolovat. Existuje několik parametrů, které je možné stanovit pro určení neporušenosti vzorku tkáně. Jedná se například o metody sledování transepidermální ztráty vody (TEWL), transepiteliální elektrické resistance (TEER) nebo toku tritiové vody (TWF). Měření TEWL je široce využívanou metodou ke sledování celistvosti kožní bariérové funkce. Jedná se o neinvazivní metodu, při které se měří množství odpařené vody (páry) z kůže do okolní atmosféry. Pro toto sledování se využívá tewametr, který je přiložen na vzorek kůže a data sbírá v různých časových intervalech. Měření tewametrem je znázorněno na obrázku 22 TEWL se vyjadřuje jako množství odpařené vody za jednotku času. Hodnota TEWL nesmí přesahovat hodnotu  $15 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ .



Obrázek 22 Měření TEWL vzorku kůže

Zároveň je důležité použít vzorky kůže s přibližně stejnou tloušťkou, protože právě tloušťka může ovlivnit absorpci a tím pádem by nebylo možné výsledky mezi sebou porovnávat. Pro experiment byly vybrány čtyři vzorky s tloušťkou  $1,63 \pm 0,14$  mm a hodnotou TEWL 11–12,4  $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ . V tabulce 3 jsou naměřené hodnoty tloušťky a TEWL pro všechny vzorky získané z kůže, čtyři vzorky vybrané pro experiment jsou červeně označeny.

Tabulka 3 Hodnoty tloušťky a TEWL všech vzorků kůže

Vzorek	Tloušťka [mm]	TEWL [ $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ]
1	1,206	10,4
2	1,637	12,0
3	1,444	12,4
4	1,209	12,9
5	1,184	12,1
6	1,780	11
7	1,270	13
8	0,822	12,1
9	1,057	12,7
10	1,650	12,4

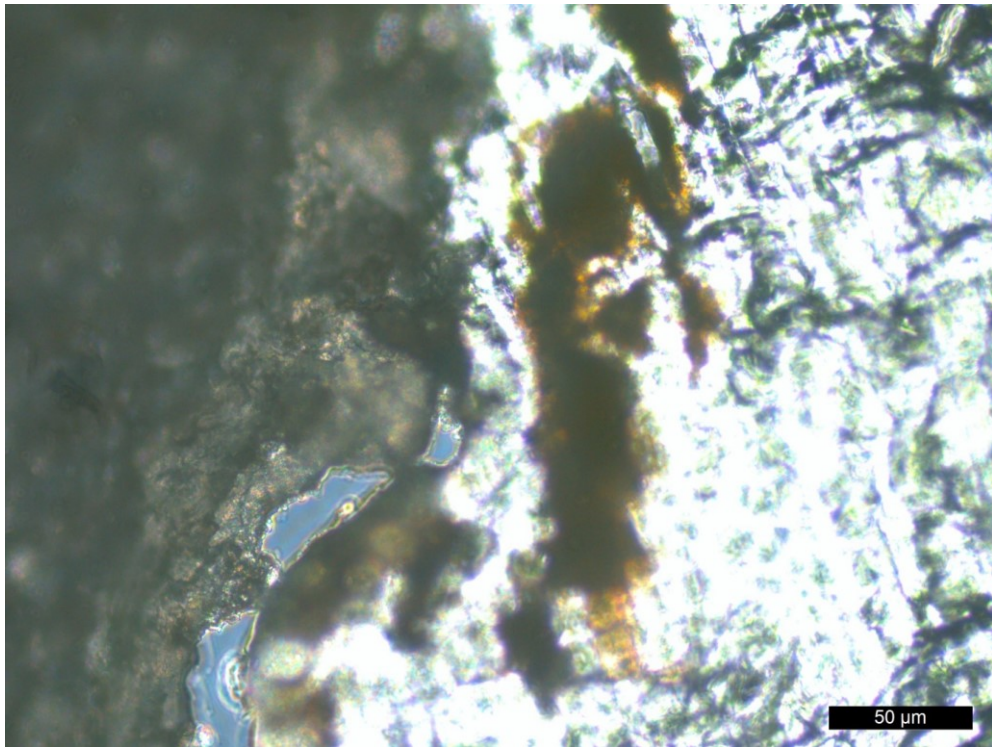
## 6.2 Histologické řezy kůže

Histologické řezy kůže nám umožňují pohled na její mikroskopické struktury. Na histologickém průřezu je možné sledovat jednotlivé vrstvy kůže, a tak je možné sledovat, do které vrstvy částice penetrují. Nutno ale podotknout, že v některých případech je nutné k zobrazení částic v jednotlivých vrstvách využít mikroskop s velmi vysokým rozlišením anebo použít specifické histologické barvení. Zároveň je díky histologickému barvení možné sledovat i změny ve struktuře tkáně nebo i případné různé patologické změny způsobené po expozici částicemi. Na histologické pozorování se využívá celistvá část tkáně. Tuto tkáň je však nutné před mikroskopickým sledováním vhodně upravit a to tak, že se z kůže musí připravit co nejtenčí řezy. Před samotným krájením řezů je nutné provést fixaci tkáně a její zalévání. Při fixaci dochází k tzv. zakonzervování, a to šetrnou denaturací enzymových proteinů. Díky tomuto procesu se předchází znehodnocení vzorku. Bez fixace by vzorek kůže mohl začít podléhat procesu rozkladu, čímž by ztratil přirozený tvar a strukturu. Posledním krokem před řezáním plátů je již vzpomínané zalévání vzorku kůže. Zalévání je proces, bez kterého by nebylo možné kůži nařezat na mikrotomu. Během zalévání je vzorek kůže zakomponován do zalévacího média, v tomto případě do parafinového vosku.

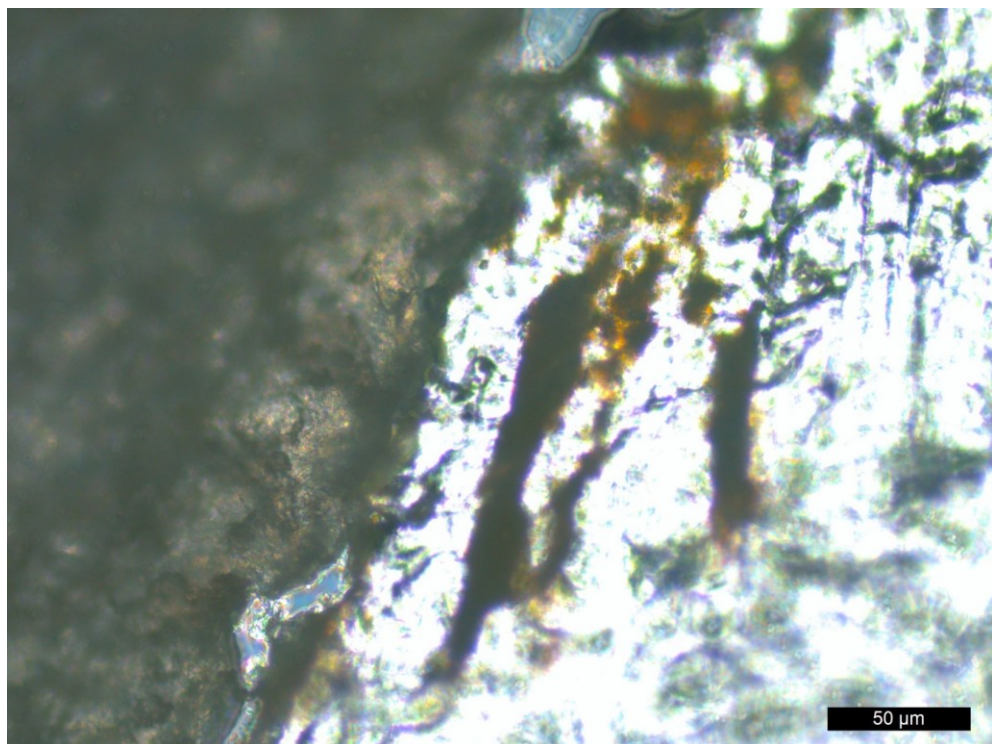
Připravené parafinové preparáty kůže byly nařezány pomocí rotačního mikrotomu na řezy o různých tloušťkách. Nejtenčí řezy měly tloušťku 30  $\mu\text{m}$ , nejsilnější 200  $\mu\text{m}$ . Pro mikroskopické vyhodnocení byly použitelné pouze řezy o tloušťce 40 a 50  $\mu\text{m}$ , přičemž ani u těchto řezů nebylo možné rozeznat částice  $\text{TiO}_2$  ani jedné krystalové formy ve strukturách kůže. Řezy tloušťky 30  $\mu\text{m}$  nebyly použitelné z důvodu drobení kůže, proto také nebylo možné vytvořit řezy o menší tloušťce. Drobení kůže mohlo být způsobeno nevhodně zvoleným způsobem fixace či odvodnění kůže anebo typem formy, ve které tuhly parafinové bloky se vzorky, jež byla papírová a při tuhnutí došlo k mírnému propadnutí bloku uprostřed.

Na obrázcích 23 a 24 vidíme řezy kůže po expozici anatasem o tloušťkách 40 a 50  $\mu\text{m}$ . Je patrné, že většina částic zůstala na povrchu kůže ve formě agregátů různých velikostí. Jejich penetrace do kůže však není jasně prokazatelná, neboť kůže o této tloušťce není optickým mikroskopem možno zaostřit. Průnik oxidu titaničitého do horních vrstev *stratum corneum* je však pravděpodobný. Lademann a kol. zkoumali průnik  $\text{TiO}_2$  (komerční opalovací emulzní přípravek typu o/v) na histologických, 10  $\mu\text{m}$  širokých, řezech lidské kůže odebrané biopsií.  $\text{TiO}_2$  byl detekován v horních vrstvách *stratum corneum* a ve vlasových folikulech,

včetně jejich hlubších částech, avšak tuto přítomnost nelze interpretovat jako průnik do živých vrstev kůže, neboť i tato část folikulu je pokryta SC. [50]



Obrázek 23 Histologický řez kůže o tloušťce 40 μm po expozici TiO<sub>2</sub> (anatase)



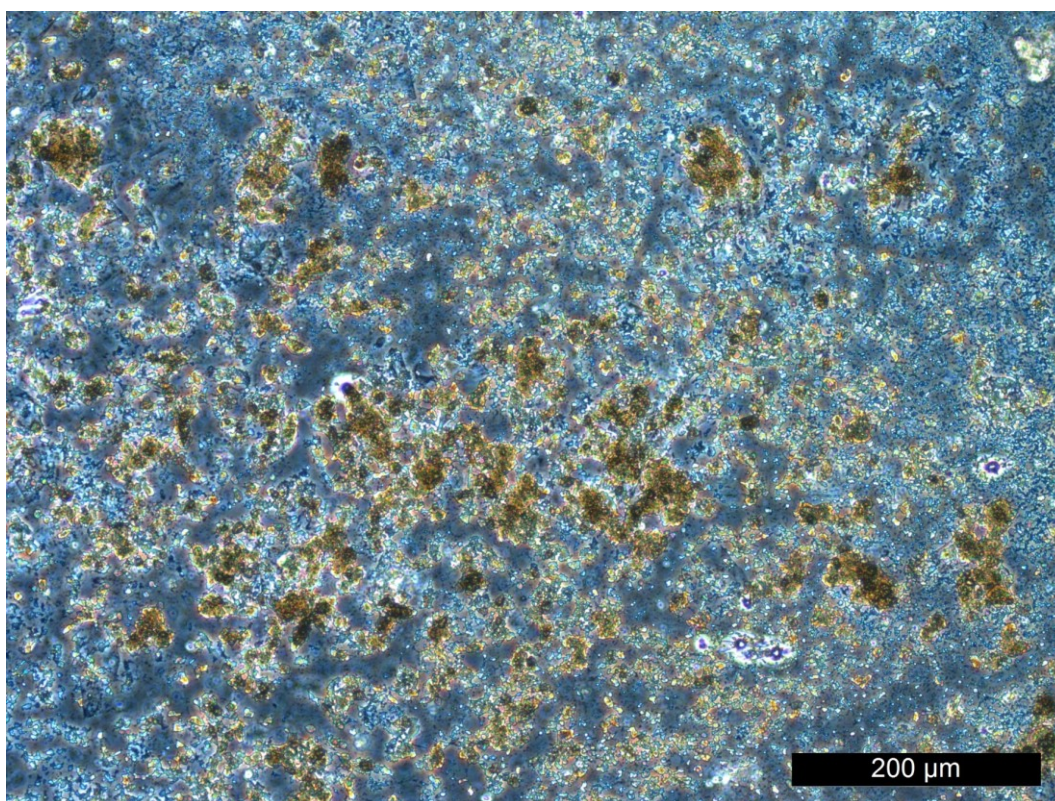
Obrázek 24 Histologický řez kůže o tloušťce 50 μm po expozici TiO<sub>2</sub> (anatase)



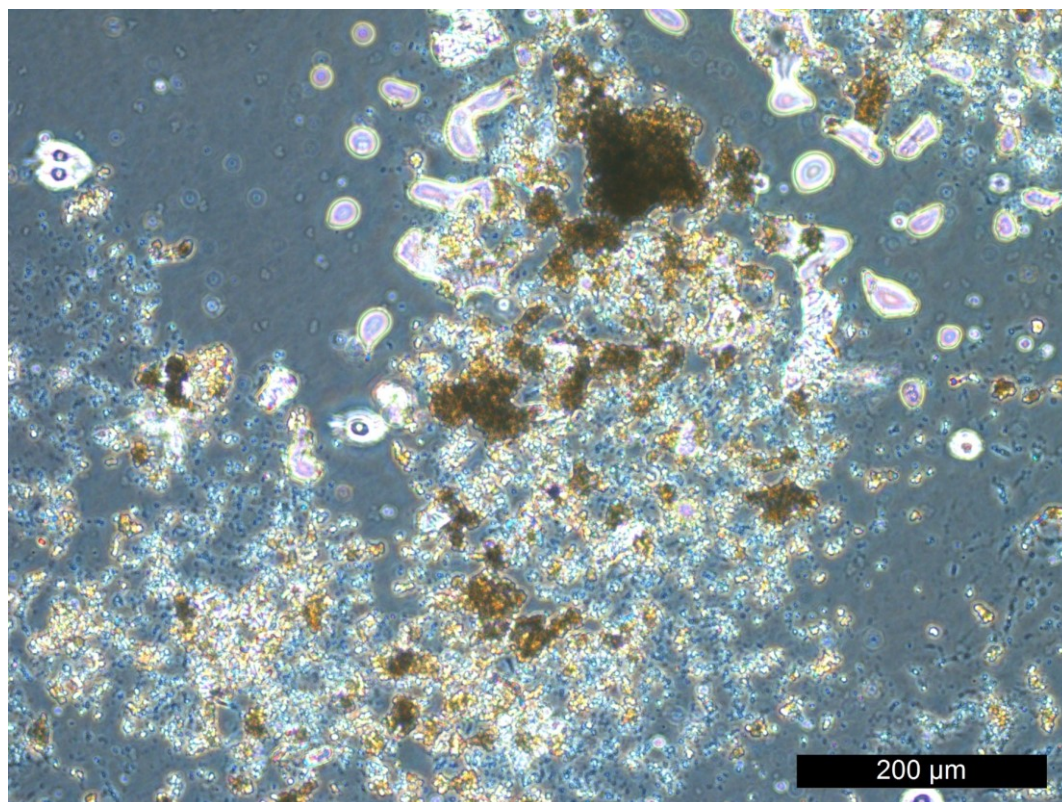
### 6.3 Stripování kůže

Vzhledem k faktu, že z histologických řezů nebylo možné jasně určit, zda a do jaké vrstvy kůže částice absorbují, bylo dalším krokem pro stanovení, kam až jsou částice skrze kůži schopné migrovat. K tomu bylo využito tzv. stripování kůže. Jedná se o minimálně invazivní techniku, při které dochází ke strhávání jednotlivých vrstev korneocytů. Díky této metodě je pak možné určit absorbované množství částic v jednotlivých vrstvách *stratum corneum*. Z každého vzorku kůže bylo vytvořeno 20 stripů, přičemž 1. strip představuje nejsvrchnější odtrženou část *stratum corneum* a 20. naopak tu nejhlubší (tedy nejbližší životaschopné epidermis). Nelze však přímo říct, že každý strip představuje přesně jednu buněčnou vrstvu SC.

Detekce oxidu titaničitého byla pro všechny stripy, kromě prvních u obou vzorků kůže, vyhodnocena vizuálně pomocí mikroskopu. Většina  $\text{TiO}_2$  bylo shodně u obou krystalových forem detekována ve druhém a třetím stripu, přičemž množství se s každým dalším stripem rapidně snižovalo. Na obrázcích 25 a 26 můžeme sledovat přítomné velké množství částic  $\text{TiO}_2$ , a to jak ve formě anatasu (obrázek 25), tak ve formě rutilu (obrázek 26).



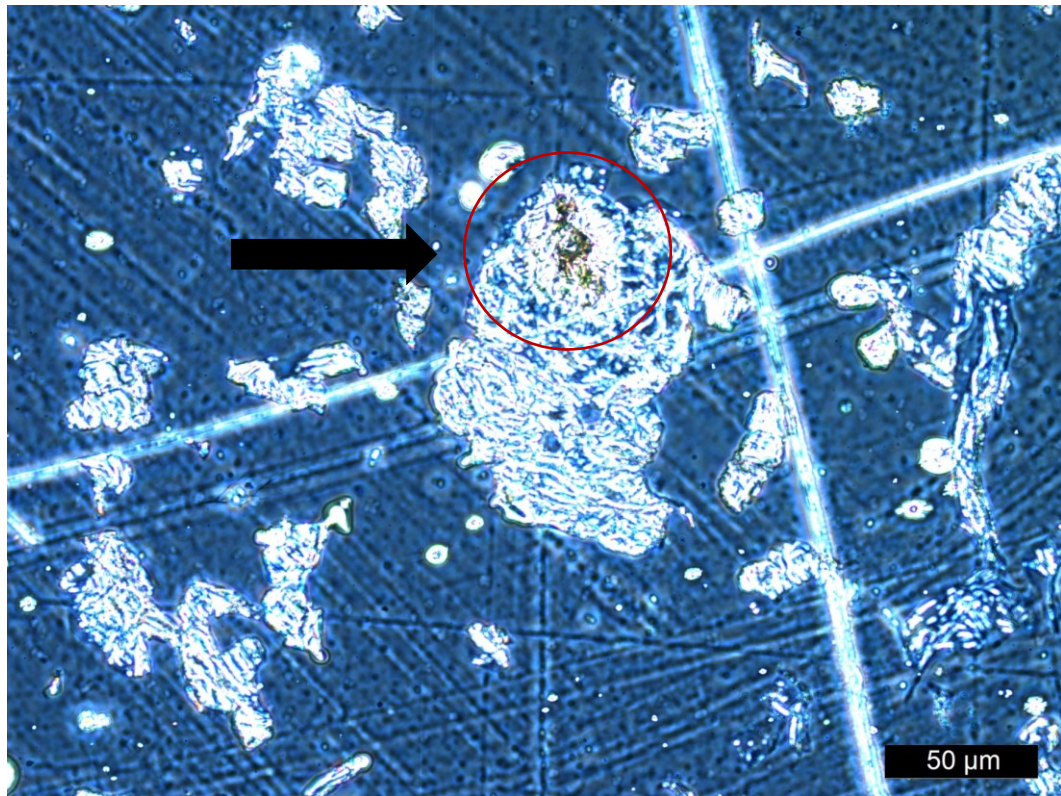
Obrázek 25 2. strip kůže po expozici  $\text{TiO}_2$  (anatas)



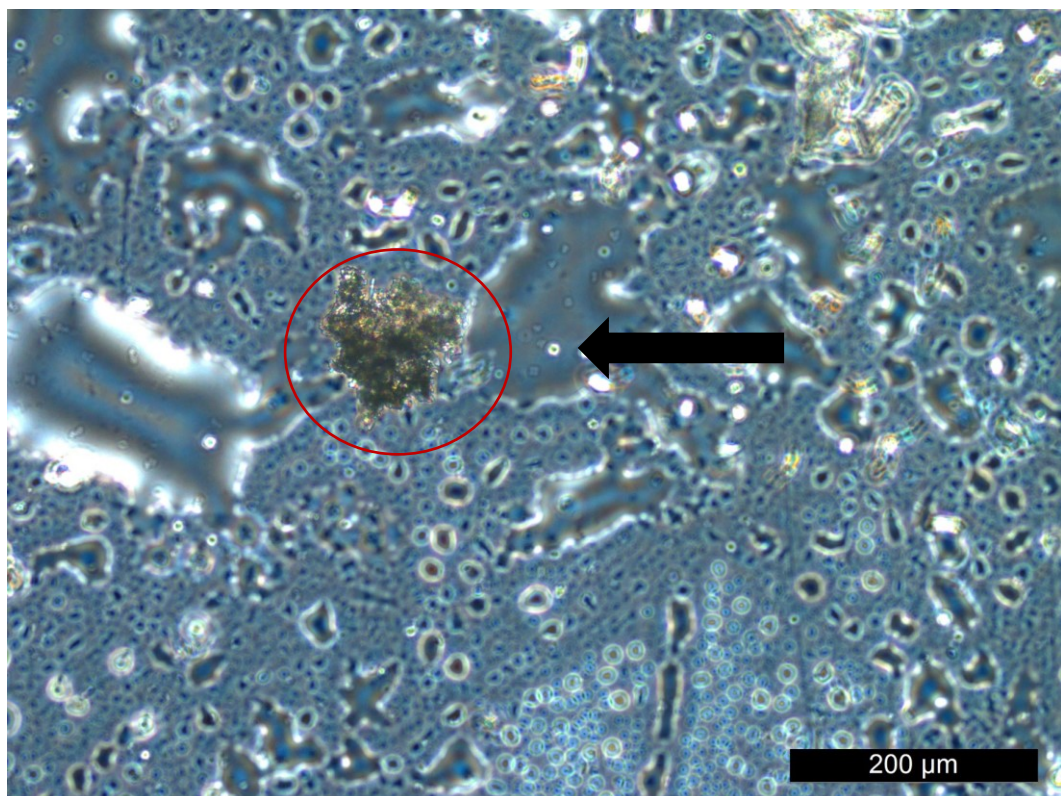
Obrázek 26 2. strip kůže po expozici  $\text{TiO}_2$  (rutil)

Na přiložených obrázcích (25–26) je také patrný rozdíl ve velikosti částic jednotlivých krystalických forem, kdy rutil s větší velikostí krystalu tvoří oproti anatasu také patrně větší agregáty.

Částice anatasu byly detekovány do 19. stripu (obrázek 27), zatímco částice rutilu byly detekovány i v posledním 20. stripu (obrázek 28). Pro lepší znázornění jsou přítomné částice zaznačeny v červeném kruhu. Rozdíl ve velikosti agregátu jednotlivých forem je patrná i na těchto obrázcích. Rutil, přestože se jedná o 20. strip a teda hlubokou vrstvu, se stále vyskytuje ve formě velkého agregátu o rozměru až  $100\ \mu\text{m}$ . U obou krystalických forem bylo množství  $\text{TiO}_2$  v těchto posledních stripech velmi malé. Navzdory tomu je možné konstatovat, že částice  $\text{TiO}_2$  jsou schopné penetrovat hluboko do *stratum corneum*.



Obrázek 27 19. strip kůže po expozici TiO<sub>2</sub> (anatas)



Obrázek 28 20. strip kůže po expozici TiO<sub>2</sub> (rutil)

## ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byly popsány vlastnosti a využití oxidu titaničitého, především jeho nanočástic, charakteristika a aplikace nanočástic obecně a současně byla hodnocena také jejich dermální expozice.

V teoretické části byly shrnuty vlastnosti a nejčastější aplikace oxidu titaničitého včetně jeho použití jako potravinové přídatné látky E 171. Také byl definován nanomateriál a možnosti využití oxidu titaničitého v nano formě s důrazem na jeho společné využití s oxidem zinečnatým jako filtrů ultrafialového záření. Byly popsány možnosti výroby nanočástic oxidu titaničitého, včetně jejich výhod a limitací. Nejvíce prostoru bylo věnováno biologickému přístupu, tzv. zelené syntéze, jež je z hlediska velké spotřeby těchto nanočástic nejlepší variantou, ať už z hlediska ekologického, finančního nebo časového.

Vzhledem k častému použití nanočástic  $\text{TiO}_2$  v kosmetických přípravcích aplikovaných na kůži byla v další kapitole popsána kůže, její ochranná funkce a způsoby, kterými mohou nanočástice penetrovat přes kožní bariéru do hlubších vrstev kůže. Bylo zhodnoceno perkutánní pronikání přípravku na ochranu proti slunečnému záření s nanočásticemi oxidu titaničitého a zinečnatého. Nakonec byla shrnuta možná zdravotní rizika spojená s nanočásticemi  $\text{TiO}_2$  a jejich vliv na životní prostředí.

V praktické části byla hodnocena transdermální absorpce disperzí oxidu titaničitého *in vitro* na kůži z ušního boltce prasete. Byly použity dvě krystalové formy oxidu titaničitého, které jsou běžně používány v komerčních přípravcích, anatas a rutil. Dermální expozice  $\text{TiO}_2$  byla simulována v systému difúzních permeačních cel a exponovaná kůže byla hodnocena technikou stripování a pomocí histologických řezů kůže. Obě vyhodnocení byla provedena vždy pro jeden vzorek po expozici anatasem a jeden po expozici rutilem.

Příprava histologických řezů kůže zahrnuje časově náročnou přípravu vzorků, zahrnující fixaci, odvodnění, projasnění, prosycení a až poté následné zalití do parafinových bloků, jež jsou krájeny na řezy. Byly vytvořeny řezy o tloušťce 30–200  $\mu\text{m}$ , pro mikroskopické vyhodnocení byly použitelné pouze 40 a 50  $\mu\text{m}$ . U obou vzorků bylo optickým mikroskopem pozorováno velké množství agregátů  $\text{TiO}_2$  na povrchu kůže, jejich penetraci do kůže nebylo schopné prokázat, avšak na kůži nebyly pozorovány žádné patologické změny ani změny struktury.

Technikou stripování bylo vytvořeno z každého vzorku kůže 20 stripů. Většina oxidu titaničitého byla u obou krystalových forem detekována ve druhém a třetím stripu, přičemž první strip není pro vyhodnocení použit z důvodu možného obsahu velkého množství

testované disperze, která nebyla odstraněna omytím. Částice anatasu byly pozorovány do 19. stripu, částice rutilu i v posledním 20. Přestože bylo množství obou krystalických forem oxidu titaničitého v posledních stripech velmi malé, je nutné konstatovat, že jsou částice  $\text{TiO}_2$  schopny penetrace hluboko do *stratum corneum*.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SHI, Hongbo, Ruth MAGAYE, Vincent CASTRANOVA a Jinshun ZHAO. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology* [online]. 2013, **10**(1) [cit. 2022-05-03]. ISSN 1743-8977. Dostupné z: doi:10.1186/1743-8977-10-15
- [2] GHOSH, S. a A.P. DAS. *Modified titanium oxide (TiO<sub>2</sub>) nanocomposites and its array of applications: a review* [online]. 2015, **97**(5), 491-514 [cit. 2022-05-03]. ISSN 0277-2248. Dostupné z: doi:10.1080/02772248.2015.1052204
- [3] IRSHAD, Muhammad Atif, Rab NAWAZ, Muhammad Zia ur REHMAN, Muhammad ADREES, Muhammad RIZWAN, Shafaqat ALI, Sajjad AHMAD a Sehar TASLEEM. Synthesis, characterization and advanced sustainable applications of titanium dioxide nanoparticles: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2021, **212** [cit. 2022-05-05]. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2021.111978
- [4] DANKOVIC, David A. *Occupational Exposure to Titanium Dioxide: Current Intelligence Bulletin 63* [online]. 2011-160. DHHS (NIOSH), 2011 [cit. 2022-05-03]. ISBN 9781493529780. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2011-160/default.html>
- [5] AKINNAWO, Solomon. Synthesis, modification, applications and challenges of titanium dioxide nanoparticles. *Research Journal of Nanoscience and Engineering*. 2019, **3**(4), 10-22. ISSN 2637-5591.
- [6] ABBAS, Zareen, Jenny Perez HOLMBERG, Anna Karin HELLSTRÖM, Magnus HAGSTRÖM, Johan BERGENHOLTZ, Martin HASSELLÖV a Elisabet AHLBERG. Synthesis, characterization and particle size distribution of TiO<sub>2</sub> colloidal nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2011, **384**(1-3), 254-261 [cit. 2022-05-03]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2011.03.064
- [7] WEIR, Alex, Paul WESTERHOFF, Lars FABRICIUS, Kiril HRISTOVSKI a Natalie VON GOETZ. *Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products* [online]. 2012, **46**(4), 2242-2250 [cit. 2022-05-03]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es204168d
- [8] ŚWIDWIŃSKA-GAJEWSKA, Anna Maria a Sławomir CZERCZAK. Titanium dioxide nanoparticles – biological effects. *Medycyna Pracy* [online]. 2015 [cit. 2022-05-03]. ISSN 04655893. Dostupné z: doi:10.13075/mp.5893.00096
- [9] WILSON, Niki. Nanoparticles: Environmental Problems or Problem Solvers?. *BioScience* [online]. 2018, **68**(4), 241-246 [cit. 2022-05-03]. ISSN 0006-3568. Dostupné z: doi:10.1093/biosci/biy015
- [10] SCHNEIDER, Samantha L. a Henry W. LIM. *A review of inorganic UV filters zinc oxide and titanium dioxide* [online]. 2019, **35**(6), 442-446 [cit. 2022-05-03]. ISSN 0905-4383. Dostupné z: doi:10.1111/phpp.12439
- [11] Outlook on the titanium dioxide nanomaterials global market to 2026 – By type, application and region. *Focus on Catalysts* [online]. 2021, **2021**(12) [cit. 2022-05-03]. ISSN 13514180. Dostupné z: doi:10.1016/j.focat.2021.11.005
- [12] SCHILLING, Karsten, Bobbie BRADFORD, Dominique CASTELLI et al. *Human safety review of “nano” titanium dioxide and zinc oxide* [online]. 2010, **9**(4) [cit. 2022-05-03]. ISSN 1474-905X. Dostupné z: doi:10.1039/b9pp00180h

- [13] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu o kosmetických přípravcích. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 2009. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1223&from=CS>  
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1223&from=CS>
- [14] LUO, Ke, Ye-lin YOON, Hyein PARK, Soo-Jin CHOI a Young-Rok KIM. Effect of organic acids on the morphology and particle size of titanium dioxide (E171) in processed food. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2022, **432** [cit. 2022-05-03]. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2022.128666
- [15] Titanium dioxide: E171 no longer considered safe when used as a food additive. In: *EFSA European Food Safety Authority* [online]. 2021 [cit. 2022-05-03]. Dostupné z: <https://www.efsa.europa.eu/en/news/titanium-dioxide-e171-no-longer-considered-safe-when-used-food-additive>
- [16] CAO, Xiaoqiong, Yanhui HAN, Min GU et al. Foodborne Titanium Dioxide Nanoparticles Induce Stronger Adverse Effects in Obese Mice than Non-Obese Mice: Gut Microbiota Dysbiosis, Colonic Inflammation, and Proteome Alterations. *Small* [online]. 2020, **16**(36) [cit. 2022-05-03]. ISSN 1613-6810. Dostupné z: doi:10.1002/sml.202001858
- [17] Doporučení Komise (EU) ze dne 22. září 2006 o účinnosti prostředků na ochranu proti slunečnímu záření a o uváděných tvrzeních, která s nimi souvisí. In: *Úřední věstník*. L 265/39, s. 39-43. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32006H0647>
- [18] SMIJS, Threes a PAVEL. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnology, Science and Applications* [online]. 2011 [cit. 2022-05-04]. ISSN 1177-8903. Dostupné z: doi:10.2147/NSA.S19419
- [19] NGOC, Le Thi Nhu, Vinh Van TRAN, Ju-Young MOON, Minhe CHAE, Duckshin PARK a Young-Chul LEE. Recent Trends of Sunscreen Cosmetic: An Update Review. *Cosmetics* [online]. 2019, **6**(4) [cit. 2022-05-11]. ISSN 2079-9284. Dostupné z: doi:10.3390/cosmetics6040064
- [20] TYAGI, Nikhil, Sanjeev K. SRIVASTAVA, Sumit ARORA et al. Comparative analysis of the relative potential of silver, Zinc-oxide and titanium-dioxide nanoparticles against UVB-induced DNA damage for the prevention of skin carcinogenesis. *Cancer Letters* [online]. 2016, **383**(1), 53-61 [cit. 2022-05-04]. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2016.09.026
- [21] LU, Pei-Jia, Shou-Chieh HUANG, Yu-Pen CHEN, Lih-Ching CHIUEH a Daniel Yang-Chih SHIH. Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. 2015, **23**(3), 587-594 [cit. 2022-05-04]. ISSN 10219498. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfda.2015.02.009
- [22] SKLAR, Lindsay R., Fahad ALMUTAWA, Henry W. LIM a Iltefat HAMZAVI. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review. *Photochem. Photobiol. Sci* [online]. 2013, **12**(1), 54-64 [cit. 2022-05-05]. ISSN 1474-905X. Dostupné z: doi:10.1039/C2PP25152C
- [23] ILYAS, Muhammad, Abdul WARIS, Atta Ullah KHAN et al. Biological synthesis of titanium dioxide nanoparticles from plants and microorganisms and their potential biomedical applications. *Inorganic Chemistry Communications* [online]. 2021, **133** [cit. 2022-05-05]. ISSN 13877003. Dostupné z: doi:10.1016/j.inoche.2021.108968

- [24] KHAN, Ibrahim, Khalid SAEED a Idrees KHAN. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2019, **12**(7), 908-931 [cit. 2022-05-05]. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011
- [25] SUNNY, Nisha Elizabeth, Sneha Susan MATHEW, Nandita CHANDEL et al. Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using plant biomass and their applications- A review. *Chemosphere* [online]. 2022, **300** [cit. 2022-05-05]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2022.134612
- [26] KUMAR, Harsh, Kanchan BHARDWAJ, Kamil KUČA, Anu KALIA, Eugenie NEPOVIMOVA, Rachna VERMA a Dinesh KUMAR. Flower-Based Green Synthesis of Metallic Nanoparticles: Applications beyond Fragrance. *Nanomaterials* [online]. 2020, **10**(4) [cit. 2022-05-11]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano10040766
- [27] GANAPATHI RAO, K., K. VENKATESWARA RAO a V. RAJENDAR. *Green Synthesis of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles Using Hibiscus Flower Extract* [online]. Proceedings of the International Conference on Emerging Technologies in Mechanical Sciences, 2014, s. 79-82 [cit. 2022-05-06]. ISBN 978-93-83038-28-2.
- [28] ROOPAN, Selvaraj Mohana, A. BHARATHI, A. PRABHAKARN et al. Efficient phyto-synthesis and structural characterization of rutile TiO<sub>2</sub> nanoparticles using *Annona squamosa* peel extract. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2012, **98**, 86-90 [cit. 2022-05-06]. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2012.08.055
- [29] JAYASEELAN, Chidambaram, Abdul Abdul RAHUMAN, Selvaraj Mohana ROOPAN, Arivarasan Vishnu KIRTHI, Jayachandran VENKATESAN, Se-Kwon KIM, Moorthy IYAPPAN a Chinnadurai SIVA. Biological approach to synthesize TiO<sub>2</sub> nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and its antibacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2013, **107**, 82-89 [cit. 2022-05-06]. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2012.12.083
- [30] KIRTHI, A. Vishnu, A. Abdul RAHUMAN, G. RAJAKUMAR et al. Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles using bacterium *Bacillus subtilis*. *Materials Letters* [online]. 2011, **65**(17-18), 2745-2747 [cit. 2022-05-06]. ISSN 0167577X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matlet.2011.05.077
- [31] SCHNEIDER, Marc, Frank STRACKE, Steffi HANSEN a Ulrich F. SCHAEFER. Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. *Dermato-Endocrinology* [online]. 2014, **1**(4), 197-206 [cit. 2022-05-04]. ISSN 1938-1980. Dostupné z: doi:10.4161/derm.1.4.9501
- [32] PROW, Tarl W., Jeffrey E. GRICE, Lynlee L. LIN et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2011, **63**(6), 470-491 [cit. 2022-05-09]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2011.01.012
- [33] MCLEAN, Kevin a Wenbo ZHAN. Mathematical modelling of nanoparticle-mediated topical drug delivery to skin tissue. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2022, **611** [cit. 2022-05-04]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2021.121322
- [34] KRISHNAN, Vinu a Samir MITRAGOTRI. Nanoparticles for topical drug delivery: Potential for skin cancer treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2020, **153**, 87-108 [cit. 2022-05-04]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2020.05.011



- [35] Opinion on Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products. In: *Scientific Committee on Consumer Products*. 2007, SCCP/1147/07. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A52008DC0366&qid=1652117697089>
- [36] CEVC, Gregor a Ulrich VIERL. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. *Journal of Controlled Release* [online]. 2010, **141**(3), 277-299 [cit. 2022-05-09]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2009.10.016
- [37] RUELA, André Luís Morais, Aline Gravinez PERISSINATO, Mônica Esselin de Sousa LINO, Paula Silva MUDRIK a Gislaïne Ribeiro PEREIRA. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2016, **52**(3), 527-544 [cit. 2022-05-10]. ISSN 1984-8250. Dostupné z: doi:10.1590/s1984-82502016000300018
- [38] EHRHARDT, Carsten a Kim KWANG-JIN. *Drug Absorption Studies In Situ, In Vitro and In Silico Models: Biotechnology: Pharmaceutical Aspects (VII)* [online]. 1. New York: American Association of Pharmaceutical Scientists, 2008 [cit. 2020-05-19]. ISBN 978-0-387-74901-3.
- [39] GAMER, A.O., E. LEIBOLD a B. VAN RAVENZWAAY. The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin. *Toxicology in Vitro* [online]. 2006, **20**(3), 301-307 [cit. 2022-05-09]. ISSN 08872333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2005.08.008
- [40] GUATAM, A., D. SINGH a R. VIJAYARAGHAVAN. Dermal Exposure of Nanoparticles: An Understanding. *Journal of Cell and Tissue Research* [online]. Rajkot, 2020, **11**(1), 2703-2078 [cit. 2022-05-03]. ISSN 0974-0910.
- [41] NEWMAN, Marissa D., Mira STOTLAND a Jeffrey I. ELLIS. The safety of nanosized particles in titanium dioxide- and zinc oxide-based sunscreens. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. 2009, **61**(4), 685-692 [cit. 2022-05-10]. ISSN 01909622. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaad.2009.02.051
- [42] MAVON, A., C. MIQUEL, O. LEJEUNE, B. PAYRE a P. MORETTO. In vitro Percutaneous Absorption and in vivo Stratum Corneum Distribution of an Organic and a Mineral Sunscreen. *Skin Pharmacology and Physiology* [online]. 2006, **20**(1), 10-20 [cit. 2022-05-11]. ISSN 1660-5527. Dostupné z: doi:10.1159/000096167
- [43] BENNAT a MÜLLER-GOYMANN. Skin penetration and stabilization of formulations containing microfine titanium dioxide as physical UV filter. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2000, **22**(4), 271-283 [cit. 2022-05-11]. ISSN 01425463. Dostupné z: doi:10.1046/j.1467-2494.2000.00009.x
- [44] HEINRICH, U., R. FUHST, S. RITTINGHAUSEN, O. CREUTZENBERG, B. BELLMANN, W. KOCH a K. LEVSEN. Chronic Inhalation Exposure of Wistar Rats and two Different Strains of Mice to Diesel Engine Exhaust, Carbon Black, and Titanium Dioxide. *Inhalation Toxicology* [online]. 2008, **7**(4), 533-556 [cit. 2022-05-11]. ISSN 0895-8378. Dostupné z: doi:10.3109/08958379509015211
- [45] *Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 93* [online]. Lyon, Francie: IARC Library Cataloguing in Publication Data, 2010, [cit. 2022-05-03]. ISSN 1017-1606. Dostupné z: <https://publications.iarc.fr/111>
- [46] UCHINO, T, H TOKUNAGA, M ANDO a H UTSUMI. Quantitative determination of OH radical generation and its cytotoxicity induced by TiO<sub>2</sub>-UVA treatment.

- Toxicology in Vitro* [online]. 2002, **16**(5), 629-635 [cit. 2022-05-11]. ISSN 08872333. Dostupné z: doi:10.1016/S0887-2333(02)00041-3
- [47] GONDIKAS, Andreas P., Frank von der KAMMER, Robert B. REED, Stephan WAGNER, James F. RANVILLE a Thilo HOFMANN. *Release of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles from Sunscreens into Surface Waters: A One-Year Survey at the Old Danube Recreational Lake* [online]. 2014, **48**(10), 5415-5422 [cit. 2022-05-11]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es405596y
- [48] SHUKLA, Ritesh K., Vyom SHARMA, Alok K. PANDEY, Shashi SINGH, Sarwat SULTANA a Alok DHAWAN. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology in Vitro* [online]. 2011, **25**(1), 231-241 [cit. 2022-05-13]. ISSN 08872333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2010.11.008
- [49] ROBERTSON, Thomas A., Washington Y. SANCHEZ a Michael S. ROBERTS. Are Commercially Available Nanoparticles Safe When Applied to the Skin?. *Journal of Biomedical Nanotechnology* [online]. 2010, **6**(5), 452-468 [cit. 2022-05-13]. ISSN 15507033. Dostupné z: doi:10.1166/jbn.2010.1145
- [50] LADEMANN, Juergen, Hans-Juergen WEIGMANN, Christiane RICKMEYER, Hans BARTHELMES, Hans SCHAEFER, Gerhard MUELLER a Wolfram STERRY. Penetration of Titanium Dioxide Microparticles in a Sunscreen Formulation into the Horny Layer and the Follicular Orifice. *Skin Pharmacology and Physiology* [online]. 1999, **12**(5), 247-256 [cit. 2022-05-04]. ISSN 1660-5527. Dostupné z: doi:10.1159/000066249

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

•O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidový aniontový radikál
•OH	Hydroxylový radikál
ANSES	Francouzská agentura pro bezpečnost potravin
CVD	Chemická depozice z plynné fáze
DIN	Německý institut pro normalizaci
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
EU	Evropská unie
FPs	Jemné částice
GS	Zelená syntéza
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
IPD	Okamžité ztmavnutí pigmentu
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
log	Logaritmus
NPs	Nanočástice
o/v	Emulze olej ve vodě
pH	Vodíkový exponent
PPD	Přetrvávající ztmavnutí pigmentu
PVD	Fyzikální depozice z plynné fáze
SC	<i>Stratum corneum</i>
SCCP	Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitele
SEM	Rastrovací elektronová mikroskopie
SPF	Ochranný sluneční faktor
TEER	Transepiteliální elektrická resistance
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie

---

TEWL	Transepidermální ztráta vody
Ti	Titan
TiCl <sub>4</sub>	Chlorid titaničitý
TiO <sub>2</sub>	Oxid titaničitý
TWF	Tok tritiové vody
USFDA	Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv
UV	Ultrafialový
UV filtr	Filtr ultrafialového záření
VD	Depozice z plynné fáze
v/o	Emulze voda v oleji
ZnO	Oxid zinečnatý

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Krystalové formy TiO <sub>2</sub> rutil a anatas, upraveno podle [4].....	13
Obrázek 2 Elektromagnetická spektra UV záření a jejich proniká do kůže v závislosti na vlnové délce, upraveno podle [19].....	16
Obrázek 3 Schéma nejmenší velikosti částic v produktech na ochranu proti slunečnímu záření, upraveno podle [12] .....	18
Obrázek 4 Ilustrace definice ochranného slunečního faktoru, upraveno podle [19] .....	18
Obrázek 5 Schéma syntetických metod nanočástic, upraveno podle [24].....	20
Obrázek 6 Různé typy zelené syntézy používané pro přípravu kovových nanočástic, upraveno podle [26].....	21
Obrázek 7 TiO <sub>2</sub> nanočástice a) SEM (měřítko 500 nm), b) TEM (měřítko 20 nm), upraveno podle [28].....	22
Obrázek 8 Struktura kůže, upraveno podle [34] .....	25
Obrázek 9 Schéma morfologie <i>stratum corneum</i> , upraveno podle [31].....	26
Obrázek 10 Cesty dermální absorpce, upraveno podle [34].....	27
Obrázek 11 Elektronové mikrofotografie oxidu titaničitého T-Lite SF-S (vlevo) a T-Lite SF (vpravo) v kosmetických formulacích [39] .....	29
Obrázek 12 Ušní boltec (vlevo) a z něj odstraněná kůže (vpravo).....	35
Obrázek 13 Sonikace (vlevo) disperzí oxidu titaničitého (vpravo) .....	36
Obrázek 14 Přístroj PermeGear Fraction Collector FC33 .....	37
Obrázek 15 Detail na permeační cely přístroje PermeGear Fraction Collector FC33.....	38
Obrázek 16 Fixace vzorků kůže.....	39
Obrázek 17 Rotační mikrotom (vlevo) a detail na krájení parafinového bloku (vpravo)....	41
Obrázek 18 Nabírání řezu z hladiny teplé vody na podložní sklo .....	41
Obrázek 19 Řezy parafinového bloku o různých tloušťkách.....	42
Obrázek 20 Vzorky kůže po dermální expozici disperzí TiO <sub>2</sub> – rutil (vlevo), anatas (vpravo) .....	43
Obrázek 21 Stripování vzorků kůže.....	44
Obrázek 22 Měření TEWL vzorku kůže.....	46
Obrázek 23 Histologický řez kůže o tloušťce 40 μm po expozici TiO <sub>2</sub> (anatas).....	48
Obrázek 24 Histologický řez kůže o tloušťce 50 μm po expozici TiO <sub>2</sub> (anatas).....	48
Obrázek 25 2. strip kůže po expozici TiO <sub>2</sub> (anatas) .....	49
Obrázek 26 2. strip kůže po expozici TiO <sub>2</sub> (rutil).....	50
Obrázek 27 19. strip kůže po expozici TiO <sub>2</sub> (anatas) .....	51
Obrázek 28 20. strip kůže po expozici TiO <sub>2</sub> (rutil).....	51

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Charakterizace použitých částic TiO <sub>2</sub> podle dodavatelů.....	36
Tabulka 2 Chemikálie a jejich doby expozice pro přípravu vzorků kůže na zalévání parafínem .....	40
Tabulka 3 Hodnoty tloušťky a TEWL všech vzorků kůže .....	46