

Fototoxicita

Bc. Gabriela Švecová

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. Gabriela Švecová**
Osobní číslo: **T20141**
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Fototoxicita**

Zásady pro vypracování

1. Student(ka) zpracuje literární rešerši na metody stanovení fototoxického efektu, vlastnosti ovlivňující fototoxicitu látek a popis látek využívaných v kosmetice s fototoxickým efektem.
2. V praktické části provede experimenty vlivu koncentrace vybraných látek na jejich fototoxicitu pomocí in vitro metod.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] KIM K., PARK, H., LIM, KM. Phototoxicity: its mechanism and animal alternative test methods. *Toxicological research*, 2015, 31.2: 97-104.
- [2] SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J., RELICHOVÁ, J. et al. *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita, 2009.
- [3] ALBERTS B. et al. *Molecular Biology of the Cell* 5th ed. Garland Science.
- [4] DAVID A.P. BIZIOS R. *Biological Interactions on Material Surfaces*. ISBN 978-0-387-98160-4.

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, 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 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

Fototoxicita je běžná kožní reakce vznikající po aplikaci fotosenzitivních látek a následné expozici pokožky slunečnímu záření. Na ochranu před škodlivými účinky slunečního světla způsobených ultrafialovým zářením se v běžné praxi využívají produkty obsahující UV filtry. V dnešní době se však v souvislosti s využíváním běžně dostupných UV filtrů často mluví s negativními dopady, jak na organismus, tak na životní prostředí. Teoretická část diplomové práce pojednává právě o fototoxicitě, jejím mechanismu a klinických projevech. Dále je popsáno testování fototoxicity, fototoxické látky využívané v kosmetickém průmyslu a využití fototoxického účinku v medicíně. Další část teorie se zabývá oxidativním stresem, který může být způsoben právě fototoxickým účinkem na organismus. Konkrétně se zaměřuje na reaktivní formy kyslíku a důsledky oxidativního stresu. V rámci praktické části byly připravené koloidní suspenze vykazující antioxidační vlastnosti, a to polyanilinová a polypyrrlová koloidní suspenze za využití polyvinylpyrrolidonu jako stabilizátoru. Následovalo určení jejich vlastností, jako je průměrná velikost částic, index polydisperzity a cytotoxicita. Nakonec proběhlo testování fototoxicity vybraných fototoxických esenciálních olejů a vlivu připravených koloidů na jejich fototoxický účinek.

Klíčová slova: fototoxicita, oxidační stres, reaktivní formy kyslíku, koloidní polypyrrrol, koloidní polyanilin

ABSTRACT

Phototoxicity is a common skin reaction that occurs after the application of photosensitizers and subsequent exposure of the skin to sunlight. Products containing UV filters are commonly used to protect against the harmful effects of sunlight caused by ultraviolet radiation. Today, however, in connection with the use of commonly available UV filters, there are often discussions about the negative effect on the organism and the environment. The theoretical part of the diploma thesis is about phototoxicity, its mechanism and clinical manifestations. Next, phototoxicity testing, phototoxic substances in the cosmetic industry and the use of the phototoxic effect in medicine are also described. The next part of the theory is about oxidative stress, which can be caused by a phototoxic effect on the organism. Specifically, it focuses on reactive oxygen species and the consequences of oxidative stress. In the practical part, a colloidal suspension showing antioxidant properties was prepared, namely polyaniline and polypyrrole were prepared in the presence of polyvinylpyrrolidone as a stabilizer. This was followed by the determination of their characteristics such as average particle size, polydispersity index and cytotoxicity. Finally, the phototoxicity of selected essential oils and the effect of prepared colloids on their phototoxic impact were tested.

Keywords: phototoxicity, oxidative stress, reactive oxygen species, colloidal polypyrrole, colloidal polyaniline

Děkuji Ing. Evě Korábkové a Ing. Martině Martínkové za pomoc při práci v laboratoři. Dále děkuji paní doc. Zdence Capákové Ph.D za trpělivost a přístup při psaní diplomové práce.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 FOTOTOXICITA	13
1.1 MECHANISMUS FOTOTOXICITY	13
1.1.1 UV záření, viditelné světlo.....	13
1.1.2 Mechanismus fotosenzibilizace	14
1.2 PROJEVY FOTOTOXICITY	15
1.3 TESTOVÁNÍ FOTOTOXICITY KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ	16
1.3.1 Strategie pro testování fototoxicity	17
1.4 FOTOTOXICKÉ LÁTKY V KOSMETICE.....	19
1.4.1 Esenciální oleje	19
1.4.2 Další fototoxické látky	20
1.4.3 UV filtry	21
1.5 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE.....	22
1.5.1 Fotosenzitizátory	23
2 OXIDATIVNÍ STRES	25
2.1 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU	26
2.1.1 Neradikálové ROS	26
2.1.2 Radikálové ROS.....	27
2.1.3 Endogenní zdroje ROS.....	27
2.1.4 Exogenní zdroje ROS.....	28
2.2 DŮSLEDKY OXIDATIVNÍHO STRESU	28
2.2.1 Poškození buněk a biomolekul.....	28
2.2.2 Oxidativní stres a onemocnění	30
II PRAKTICKÁ ČÁST	33
3 METODIKA	34
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	34
3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	34
3.3 POUŽITÁ BUNĚČNÉ LINIE	34
3.4 PŘÍPRAVA TESTOVANÝCH LÁTEK	35
3.4.1 Příprava koloidů	35
3.4.2 Příprava emulzí esenciálních olejů.....	36
3.5 PODMÍNKY KULTIVACE	36
3.5.1 Pasážování buněk	36
3.6 CHARAKTERIZACE KOLOIDŮ	36
3.6.1 Velikost částic a index polydisperzity.....	37

3.6.2	Cytotoxicita koloidů.....	37
3.7	TEST FOTOTOXICITY A VLIVU KOLOIDŮ NA FOTOTOXICITU.....	39
3.7.1	Čas iradiace	39
3.7.2	Příprava buněk a ozáření	39
3.7.3	Fotoiritační faktor.....	40
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	42
4.1	MATERIÁLOVÁ CHARAKTERIZACE KOLOIDŮ	42
4.2	TEST CYTOTOXICITY	44
4.3	TEST FOTOTOXICITY A ÚČINKU KOLOIDŮ NA FOTOTOXICITU	46
	ZÁVĚR	52
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	54
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	66
	SEZNAM OBRÁZKŮ	69
	SEZNAM TABULEK	70

ÚVOD

Kůže je nejsvrchnější tkáň lidského organismu s množstvím funkcí, ze kterých je hlavní ochrana organismu. Z tohoto důvodu je nesmírně důležitá její ochrana před poškozením vnějšími vlivy. Kůže je neustále vystavovaná okolnímu prostředí a často je vystavena přímo slunečnímu záření. Současně je to orgán, který je nejčastěji vystaven chemickým látkám objevujícím se hlavně v kosmetických přípravcích, léčivech nebo potravinách. Některé chemikálie, které se dostávají do kontaktu s kůží díky topické aplikaci, neúmyslné adhezi nebo přes cévní systém mohou představovat riziko a chovat se po ozáření sluncem jako fotosenzitizátory [1].

Fotosenzitivní látky mohou způsobovat fototoxické nebo fotoalergické reakce. Fototoxicita je neimunologická světlem indukovaná odpověď kůže (dermatitida) fotoaktivní látky. Reakce je charakterizovaná erytémem, někdy edémem, vesikulací a pigmentací. Fotoalergická reakce naopak vzniká, když UV záření interaguje s chemikálií za vzniku haptenu nebo antigenu, který spouští hypersenzitivní reakci typu IV [2].

Součástí mechanismu fototoxických reakcí je vznik reaktivních forem kyslíku (ROS) [3]. ROS mohou přímo nebo nepřímo poškozovat buňky a jejich části nebo způsobovat oxidaci lipidů [4]. ROS se také vytvářejí během běžného buněčného metabolismu a v organismu zastupují množství funkcí. Zatímco nadměrná produkce reaktivních forem kyslíku může přispívat k rozvoji některých onemocnění a stárnutí, mírné oxidační zatížení způsobuje pozitivní dopady pro biologické organismy a je důležité pro jejich adaptaci a přežití [5].

Před nežádoucími účinky slunečního záření a vzniku fototoxické reakce se v kosmetických přípravcích využívají různé UV filtry. V poslední době se ale stále více diskutuje jejich toxicita k organismům, dopad na životní prostředí a další negativní vlivy. Z tohoto důvodu existuje snaha vyvinout nové bezpečnější látky, které by měly ochrannou funkci před vznikem fotosenzitivních reakcí.

Z výše uvedených důvodů byla práce zaměřená na popis fototoxicity, jejího mechanismu, možnosti ochrany a na oxidativní stres. Praktická část byla poté zaměřená na přípravu a charakterizaci vybraných koloidních látek, a to konkrétně polypyrrolu a polyanilinu. V předchozích studiích bylo zjištěno, že dané koloidy mají schopnost vylučovat ROS, které se podílí na vzniku fototoxicity. Z tohoto důvodu je předpoklad, že by tyto látky mohly napomáhat ke snížení projevu fototoxického účinku. V další části byla tedy fototoxicita

testovaná u látek využívaných v kosmetickém průmyslu a byl také stanoven vliv připravených koloidů na jejich fototoxický účinek.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 FOTOTOXICITA

Fototoxicita je akutní, světlem-indukovaná reakce, která se projevuje po aktivaci fotoreaktivní látky slunečním zářením [3]. Tento jev může být také popsán jako excitace chromoforu s následnou tvorbou volných radikálů, které mohou přímo nebo nepřímo způsobit poškození buněčných membrán a DNA, oxidaci lipidů apod. [4].

Podmínkou fototoxické reakce je schopnost chemické látky absorbovat v oblasti viditelného světla a UV záření. Na začátku reakce absorbuje fotoreaktivní látka záření a její molekuly přechází do excitovaného stavu. Dalším krokem procesu může být reakce excitované molekuly s endogenní molekulou nebo vznik sekundárních produktů fototoxické látky. V obou případech dochází k poškození buněčných částí a vzniku biologické odpovědi [3].

Fototoxicita patří spolu s fotoalergií mezi fotosenzibilizační reakce. Na rozdíl od fotoalergie se ale jedná o neimunologickou reakci organismu s vyšší incidencí, bez nutné předchozí senzibilace. Klinické projevy se objevují pouze na exponované části kůže slunečnímu záření, a napodobují reakce vzniklé slunečním spálením jako je erytém, edém, vezikulace a pigmentace [2, 6].

Množství chemických látek používaných hlavně ve farmakologii, ale také v kosmetice, potravinách nebo pesticidech vykazují fototoxický účinek [3, 1], proto je nutné využívat pro testování fototoxicity různé metody jako *in silico*, *in chemico* (např. měření generace reaktivních forem kyslíku), *in vitro* (např. test příjmu barviva neutrální červeně, 3D model epidermis, test fotohemolýzy erytrocytů) nebo *in vivo* (např. testy s použitím morčat nebo myší) [3].

1.1 Mechanismus fototoxicity

1.1.1 UV záření, viditelné světlo

Fototoxickou reakci má schopnost indukovat jak UV záření, tak viditelné světlo [1]. Viditelné světlo spadá pod vlnovou délku 400–700 nm [3]. UV záření zaujímá oblast vlnových délek 100–400 nm a podle nich se také dělí na tři kategorie: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) a UVC (100–280 nm) [7].

UVA záření není zachytáváno ozonovou vrstvou a tvoří až 90 % celkového UV záření dopadající na zemský povrch. Díky svým vlnovým délkám penetruje až do *dermis* a způsobuje vznik reaktivních forem kyslíku. Tyto reaktivní formy kyslíku jsou schopné prostřednictvím nepřímých fotosenzitizujících reakcí poškodit DNA [8]. UVA záření také

způsobuje ztmavnutí kůže, ale přílišné vystavení má za následek ztvrdnutí epidermis, oslabení imunitního systému nebo vznik šedého zákalu. Obecně je UVA považované za bezpečné záření [9].

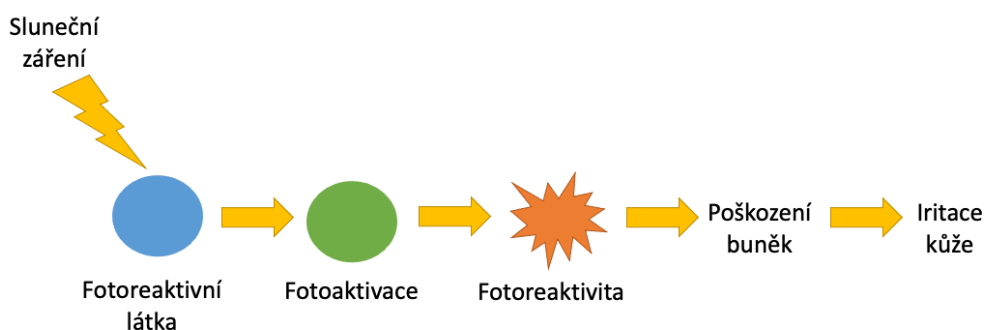
UVB záření tvoří na zemském povrchu 1–10 % z celkového UV záření, protože je z větší části zachytávané ozonovou vrstvou. UVB dosahuje pouze do *epidermis*, spadá pod oblast kratších vlnových délek než UVA, ale má větší energii. Také je přímo absorbováno DNA, což vede k jeho modifikaci a mutacím [8]. UVB je nezbytné pro syntézu vitamínu D, ale přílišnou expozicí vzniká spálení, šedý zákal nebo karcinogenní procesy v kůži [3, 9].

UVC záření je ionizující záření, takže pro živé organismy působí jako silný mutagen a ze všech UV záření je nejnebezpečnější. Pro lidský organismus to znamená možnost rozvoje rakoviny nebo imunitně zprostředkovaných onemocnění. Díky atmosférickému ozonu, je ale UVC záření téměř zcela absorbováno, tudíž na lidský organismus žádný efekt nemá [10].

Kvůli rozdílným vlastnostem jednotlivých UV záření je fototoxicita indukovaná hlavně UVA zářením a viditelným světlem. Pro většinu fototoxických látek je navíc akční spektrum v oblasti vlnových délek UVA záření [1].

1.1.2 Mechanismus fotosenzibilizace

Fototoxicita dané chemikálie záleží na vlastnostech prostředí (teplota, vlhkost, povětrnostní podmínky apod.) a na stavu exponované osoby (absorpce gastrointestinálního traktu, metabolismu fototoxické látky, obsahu melaninu v kůži nebo tloušťce *stratum corneum*) [11]. Fotosenzitivní vlastnosti vykazují nejčastěji látky s rezonanční strukturou, nízkou molekulovou hmotností (200–500 Da) a planární, tricyklickou nebo polycyklickou konfigurací. Žádný prvek či molekula nemá automatickou schopnost vykazovat fototoxicitu, nicméně některé strukturní elementy, jako jsou např. aromatické substituenty chloru, jsou často součástí mnohých senzibilizátorů [12].



Obrázek 1: Schéma fototoxické reakce [3]

Pro vznik fototoxické reakce, jejíž schéma se nachází na obrázku 1, je nutná akumulace fotosenzitivní látky v buňkách kůže, expozice kůže světlu o vhodných vlnových délkách a absorpce světla fototoxickou látkou. Fototoxická reakce může vznikat různými mechanismy, které probíhají buď samostatně nebo v kombinaci. Obecně záleží na přítomnosti (fotodynamický mechanismus) nebo nepřítomnosti (nefotodynamický mechanismus) kyslíku [11].

Během fotodynamických reakcí je fotosenzibilizátor excitován energií záření a většinou vytváří tripletový stav. Tato excitovaná molekula poté reaguje s kyslíkem a tvoří buď volné radikály (typ I fotodynamické reakce) anebo tvoří singletový kyslík (typ II fotodynamické reakce). Tyto vysoce reaktivní formy kyslíku [12] mohou způsobit oxidaci aminokyselin, nenasycených mastných kyselin a lipidů vedoucí k poškození buněk a tkání [11, 12].

Nefotodynamické reakce mohou probíhat několika cestami. Může například dojít ke kovalentnímu vázání excitované chemikálie a buněčných makromolekul. Fototoxická látka může také interagovat s částmi buňky přenosem elektronů nebo atomů vodíku. V dalším případě se excitovaná fototoxická chemikálie rozkládá na fotoprodukty, které můžou reagovat s částmi buňky nebo se chovat jako nový fotosenzibilizátor [13].

1.2 Projevy fototoxicity

Všechny projevy fototoxicity jsou dependentní na dávkě jak fototoxické látky, tak záření, kterému je člověk vystaven [14]. Poškození tkání je dále ovlivněno biodistribucí fotosenzitivní látky, kdy se topicky aplikované přípravky akumulují hlavně ve svrchních vrstvách *epidermis* a poškozují keratinocyty. Orálně nebo parentálně aplikované látky se dostávají ke kůži přes krevní oběh, tím pádem se shromažďují v *dermis* [11]. Subcelulární cíle fototoxických látek ovlivňuje jejich rozpustnost v tucích. Hydrofilní látky způsobují poškození buněčných membrán, zatímco hydrofobní difundují do buněk a působí na intracelulární části jako jsou mitochondrie, lysozomy a jádro, což poté vede k uvolnění erytrogenních mediátorů. Biologicky aktivní látky účastníci se procesu fototoxicity jsou eikosanoidy, histamin, proteázy a látky komplementu [13].

Fototoxické reakce je možné rozdělit na akutní, které se projevují minuty až hodiny po expozici slunečnímu záření a na chronické, projevující se po dlouhodobém působení fototoxické látky a dlouhodobé expozici záření [11].

Akutní reakce se podobají spálení sluncem a projeví se během minut až hodin po sluneční expozici jako ostře ohraničený erytém doprovázený pálením a bolestí přítomným hlavně

na místech vystavených slunci [14]. Dále může docházet k přímému poškození keratinocytů, doprovázené edémem, vazodilatací a zánětem [14, 15]. Během dalších dnů se svrchní nekrotická vrstva *epidermis* oddělí a může dojít k hyperpigmentaci. Při systematickém podávání fototoxické látky se projevy objevují za několik dnů či týdnů. Na obrázku 2 je zobrazena pseudoporfyrie, což je fotosenzitivní onemocnění vyvolané po podávání fototoxických léčiv. Mezi další fotosenzitivní onemocnění patří fotoonycholýza, hyperpigmentace nebo hypopigmentace, teleangiektázie nebo purpura [15].



Obrázek 2: Pseudoporfyrie [17]

Chronické fototoxické reakce jsou spojeny s dlouhodobým užíváním léčiv často doprovázené fototerapií (např. užíváním psoralenů a UVA terapií). Důsledkem chronických reakcí mohou být změny a poškození DNA vedoucí k předčasnému stárnutí pleti, lentigu nebo spinocelulárnímu karcinomu a melanomu [14].

Hlavní způsob předcházení fototoxickým reakcím je vyhýbání se slunečnímu záření a fototoxické látce po její identifikaci, dále používání fotoprotektivního oblečení a přípravků na opalování s UVA filtry. Při setrvávajících problémech je vhodné vyhledat lékařskou pomoc, kdy se pro zmírnění zánětlivých reakcí používají topické steroidní přípravky nebo antihistaminika. V těžších případech jsou steroidní přípravky podávány systémově [11].

1.3 Testování fototoxicity kosmetických přípravků

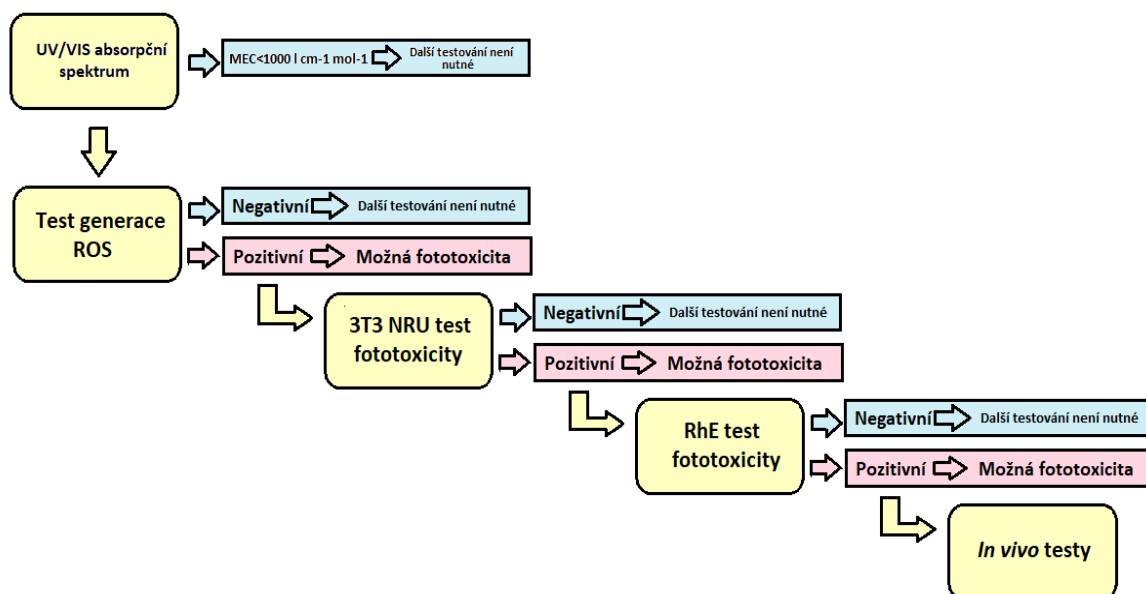
Testování bezpečnosti kosmetických přípravků v Evropě je povinné podle legislativy Evropské unie [18]. Konkrétně je tato povinnost zakotvena v nařízení Evropského

parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30.11. 2009 o kosmetických přípravcích [19]. Testování kosmetických přípravků na zvířatech je v EU zakázáno od roku 2009, navíc celosvětově roste počet zemí zakazující a omezující testování na zvířatech pro kosmetiku. Z těchto důvodů bylo nutné vyvinout alternativní relevantní testy *in vitro* [20].

1.3.1 Strategie pro testování fototoxicity

Pro hodnocení fototoxicity je doporučena několikastupňová strategie s cílem maximalizovat potenciál každého testu a snížit jejich množství. Tato strategie je schematicky znázorněna na obrázku 3. Součástí strategie jsou biologické i nebiologické testy. Prvním krokem určení fototoxického potenciálu látky je testování UV/VIS absorpčního spektra. U látek s molárním absorpčním koeficientem nižším než $1000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ je pravděpodobné, že nejsou fotoreaktivní, a proto další testování není nutné. Pokud je ale molární absorpční koeficient vyšší, než je $1000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, pravděpodobnost fotoreaktivity se zvyšuje. U takových látek je dalším doporučeným krokem test generace ROS. Pokud je výsledek testu negativní, daná látka je pravděpodobně nefototoxická a není tedy vyžadované další testování. Při pozitivitě testu generace ROS následují *in vitro* testy, pokud je během nich fototoxický potenciál látky potvrzen, je možné přejít na testy *in vivo* [21].

Prvním stupněm biologického testování je test 3T3 NRU (test příjmu barviva neutrální červeně) [21]. V roce 1997 byl tento test validovaný ECVAM (Evropské centrum pro validaci alternativních metod) a po dalších validacích v roce 2004 přijat jako norma OECD (Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj) č. 432 [22]. Cílem testu je určení fototoxického potenciálu testované látky aktivovaného po expozici světlu. Při vyhodnocení testu dochází ke srovnání životaschopnosti ozářených a neozářených buněk, které byly vystavené testované látce. Cytotoxicita je v rámci testu vyjádřena jako koncentračně závislá redukce příjmu barviva neutrální červeně buňkami [23]. Pro testování jsou použité myší embryonální fibroblasty linie BALB/c 3T3 [23, 24]. Test 3T3 NRU predikuje akutní fototoxicitu na zvířatech a lidech *in vivo*, nicméně neadresuje další nepříznivé účinky vzniklé z kombinace působení světla a testované látky. Nevýhodou tohoto testu je také, že není vhodný pro testování nepřímého mechanismu fototoxicity nebo účinku metabolitů testované látky [23].



Obrázek 3: Schéma strategie testování fototoxicity [21]

Pokud je výsledek testu 3T3 NRU pozitivní a látka vychází jako potenciálně fototoxická, pro další stupeň testování je vhodné použít 3D rekonstruovaný model lidské kůže [21]. Konkrétně je doporučovaná norma OECD č. 498: Testová metoda pro *in vitro* fototoxicitu na rekonstruované lidské *epidermis* (RhE). Fototoxický potenciál testované látky je identifikován po její aplikaci na *epidermis* jako úbytek viability buněk exponovaných testované látce v přítomnosti a nepřítomnosti simulovaného slunečního záření [25]. Rekonstruovaná tkáň je založena na trojrozměrném systému tvořeném vysoko diferenciovanými lidskými keratinocyty. Tyto modely lidské kůže obsahují mnohvrstevnou strukturu zahrnující bazální, spinální, granulární a rohovou vrstvu – *stratum corneum* s mitoticky a metabolicky aktivními buňkami kůže. Z tohoto důvodu lépe simulují strukturu lidské *epidermis* než test 3T3 NRU. Oproti lidské kůži jsou ale 3D modely více permeabilní a nejsou schopny dokonale napodobit podmínky *in vivo* [21].

Posledním krokem ve stanovení fototoxického účinku látky může být potvrzující fotokutánní test na skupině dobrovolníků. Testovaná látka se v tomto případě aplikuje na kůži zad dobrovolníka. Výběr použitých koncentrací se odvíjí od první nefototoxické koncentrace zjištěné RhE testem. Po 24 hodinách je látka odstraněna a místo je ozářené UVA zářením. Reakce kůže se pozorují ihned po iradiaci a také po 24, 48 a 72 hodinách, pokud je pozorovaná reakce oproti kontrole. V případě systematicky podávaných testovaných léčiv je možné použít testování na zvířatech, kdy je možné pozorovat akumulaci látky v kůži nebo její zadržování ve tkáních [21].

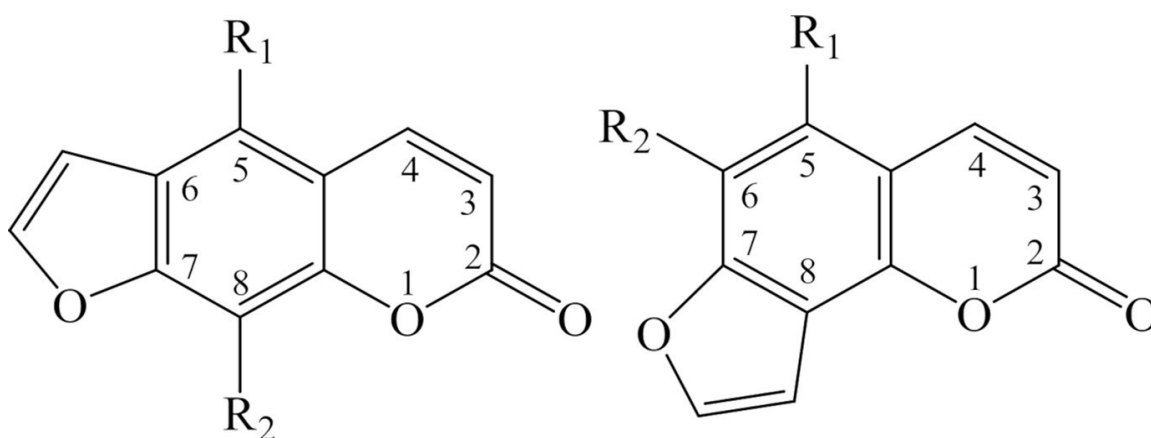
1.4 Fototoxické látky v kosmetice

Mnoho látek využívaných v kosmetice může způsobovat fototoxicitu finálního produktu po expozici slunečnímu záření. Zároveň může docházet i k interakci mezi těmito složkami a biomolekulami obsaženými v kůži. Mezi celosvětově rozšířené fototoxické látky patří hlavně esenciální oleje a jejich spotřeba neustále roste díky zvyšující se poptávce po přírodních ingrediencích. Z chemického hlediska způsobují fototoxicitu těchto látek nejčastěji cyklické aromatické sloučeniny [26].

1.4.1 Esenciální oleje

Esenciální oleje mohou být definované jako těkavé nepolární organické rostlinné extrakty, které jsou zodpovědné za charakteristický odér rostliny [27]. Esenciální oleje jsou využívány jak pro svoje vonné vlastnosti, tak pro svou biologickou aktivitu. Využívají se v parfumérském, potravinářském nebo i farmaceutickém průmyslu. Hlavní složky obsažené v esenciálních olejích zodpovědné za jejich fototoxický účinek jsou tzv. furokumariny [28].

Furokumariny jsou přírodní látky syntetizované přirozeně rostlinami a vznikají splynutím kumarinu a furanového kruhu. Podle pozice furanového kruhu tvoří deriváty tzv. lineárních (např. psoralen) nebo angulárních (např. angelicin) izomerů. Strukturní vzorce těchto izomerů jsou zobrazeny na obrázku 4 [29]. Furanový kruh je u lineárních typů připojený na pozici C6/C7 kumarinové báze, angulární izomery obsahují furanový kruh na C7/C8 pozici kumarinu. Nejčastěji jsou syntetizovány rostlinami z čeledi miříkovitých (*Apiaceae*), rourovitých (*Rutaceae*), morušovníkovitých (*Moraceae*) nebo bobovitých (*Fabaceae*) [30].



Obrázek 4: Strukturní vzorec lineárního (vlevo) a angulárního (vpravo) typu izomeru furokumarinů [30]

Fototoxické reakce furokumarinů vznikají působením UVA záření a jejich výsledkem jsou DNA adukty a zesíťování DNA [31]. Furokumariny lineárního typu vykazují silnou fototoxicitu. Angulární izomery díky své chemické struktuře nejsou zesíťování DNA schopny, proto je jejich fototoxický potenciál slabší [30]. Mezi nejvíce účinné fototoxické furokumariny se řadí bergapten, jako další fototoxické furokumariny se považují bergamottin, citropten, herniarin nebo oxypeucedanin [32].

Nejvíce fototoxický furokumarin – bergapten je ve velkém množství obsažen v bergamotovém (*Citrus bergamia*) esenciálním oleji, a proto se tento olej řadí k nejvíce fototoxickým olejům. Kromě bergaptenu tento olej obsahuje furokumariny jako je citropten, bergamoten a další. Organizace IFRA (Mezinárodní asociace parfémů) doporučuje maximální koncentraci 0,4 % bergamotového oleje ve finálních leave-on produktech pro aplikaci na části kůže vystavené slunečnímu záření [33]. V současnosti se pro topické aplikace používá bergamotový olej bez furokumarinů [34].

Jako další fototoxické esenciální oleje se považují podle Svatopluka Bindera a kol. [35] pomerančový olej (*Citrus aurantium dulcis*), jehož fototoxicita byla zjištěna při testování na myších fibroblastech. Při testu 3T3 NRU, a za použití fosfátové pufru pro zředění silic vykazoval fototoxicitu také olej z vavřínu kubébového (*Litsea cubeba*) nebo citronu (*Citrus limonium*) [32]. Výsledkem testování na buňkách z králičí rohovky a na myších fibroblastech vykazoval fototoxicitu i olej z citronové trávy (*Lemongrass cymbopogon citratus*) [36].

1.4.2 Další fototoxické látky

Mezi další fotosenzitizující látky je možné řadit např. silymarin. Silymarin je extrakt ze semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*). Tato látka je tvořena nejméně sedmi flavonolignany, jejichž přesné zastoupení se liší v závislosti na podmínkách růstu rostliny. Hlavní složkou je silybin, dále obsahuje také isosilybin nebo 2,3-dehydrosilybin. Právě minoritní 2,3-dehydrosilybin byl identifikován jako látka s fototoxickým potenciálem [37]. V některých studiích byl ale naopak prokázán ochranný efekt sylimarinu proti poškození buněk po UVA záření. Nicméně bylo zjištěno, že se fototoxický a antioxidační efekt sylimarinu může projevit současně, a to díky různorodým bioaktivním flavonoidům, ze kterých je silymarin složen [38].

Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*) obsahuje biologicky aktivní látky jako je hlavně hypericin, ale také flavonoidy (např. quercetin) nebo acylfloroglucinoly (např.

hyperforin). Hypericin je fotosenzitivizátor schopný vyvolat fototoxické reakce. Kromě hypericinu fotosenzitivní vlastnosti vykazují také jeho prekurzor pseudohypericin nebo hyperforin [39].

1.4.3 UV filtry

UV filtry jsou častá složka kosmetických přípravků využívaná jako ingredience chránící uživatele před slunečním zářením, ale i jako fotostabilizátor daného přípravku [40]. Kvůli ochraně proti fotodegradaci se přidávají i do průmyslových výrobků, jako jsou například plasty nebo textilie [41]. Obecně se UV filtry rozdělují na dvě kategorie:

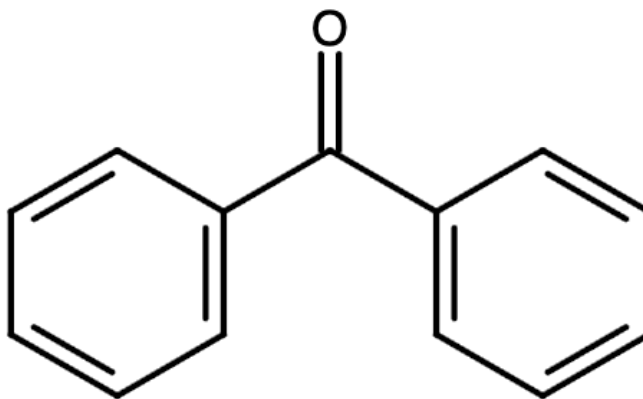
- Organické, které se podle spektra účinku dělí na:
 - UVA filtry – např. benzofenony, avobenzon
 - UVB filtry – např. deriváty kyseliny p-amino benzoové, oktokrylen
 - Širokospektré filtry – např. ekamsul, bemotrizinol
- Anorganické – ZnO (oxid zinečnatý, mikro a nano forma), TiO₂ (oxid titaničitý, mikro a nano forma). Anorganické UV filtry slouží jako širokospektré filtry chránící před UVA i UVB zářením [42].

Chemické filtry absorbují UV záření, dochází k jejich konformačním změnám a energii záření uvolňují ve formě tepla. Fyzikální filtry UV záření odrážejí, rozptylují nebo absorbují [42].

V posledních dekádách dochází ke zpochybňování bezpečnosti UV filtrů jak k lidskému organismu, tak k životnímu prostředí [43]. Extenzivní používání UV filtrů vede k jejich přítomnosti ve vodních matricích, sedimentech a dalších místech environmentu [44]. Rezidua UV filtrů byla nalezena ve vodních organismech, ale i v lidském mateřském mléce, lidské placentě nebo ve vzorcích moči [43, 44]. Jejich schopnost bioakumulace je dána především lipofilitou, stabilitou a perzistencí [44].

Přítomnost chemických skupin může způsobit akutní, vývojovou nebo reprodukční toxicitu různých organismů [43, 44]. Byla například popsána toxicita nano formy TiO₂ a ZnO vůči rybám, řasám a mořským bezobratlovcům [45]. Dalším závažným účinkem je efekt endokrinní disrupce. Například u benzofenonů, jejichž strukturní vzorec je možné vidět na obrázku 5, byl tento účinek pozorován při testech *in vitro* a *in vivo*, a to pro receptory estrogenů, androgenů, progesteronů a dalších jaderných receptorů. Jako další bezpečnostní

problém je fotostabilita UV filtrů. V tomto případě dochází k fotoizomeraci nebo ke vzniku toxických produktů při fotodegradaci a ztrátě ochranných vlastností. Toxické produkty mohou poškozovat části buněk, navíc ovlivňují stabilitu dalších ingrediencí přítomných ve formulaci přípravku [43].



Obrázek 5: Strukturní vzorec UV filtrů typu benzofenon

1.5 Fotodynamická terapie

Fotoreaktivní schopnosti některých látek jsou využívány pro tzv. fotodynamickou terapii (PDT). PDT je neinvazivní způsob léčby využíváný v mnoha oblastech medicíny hlavně v onkologii, ale také v oblasti dermatologie, gynekologie nebo urologie. PDT je založena na topickém nebo systematickém podání fotosenzitivní látky, tzv. fotosenzitizátoru (PS). Tato látka se akumuluje v patologických tkáních a absorbuje světlo o vhodných vlnových délkách [46]. Výsledkem je aktivace procesů vedoucí ke generaci ROS, buněčné smrti, cévnímu poškození nebo imunitní odpovědi [47]. Molekulární mechanismus PDT je stejný jako vznik fototoxicity a důležitější podmínkou pro efektivitu PDT je převažující průběh fotodynamické reakce typu II. Množství podílu obou reakcí ale záleží na koncentraci kyslíku, dielektrické konstantě a pH tkáně a chemické struktuře fotosenzitivní látky [46].

Oproti chemoterapii je PDT vysoce lokalizovaná technika, která nepoškozují zdravé buňky [48]. PS se akumuluje ve větších koncentracích v rakovinných buňkách než v běžných buňkách. Důvodem může být jejich tendence se vázat na lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL). Funkcí LDL je zásobovat tkáň cholesterolem, který buňka využívá pro vytváření membrán během buněčného dělení. Intenzivně se dělící buňky, jako jsou buňky nádorové, vykazují zvýšený příjem LDL lipoproteinů, které transportují fotosenzitizátor do rakovinné tkáně. Jako další důvod pro lokalizované působení léčiva je vyšší přítomnost LDL

lipoproteinových receptorů na povrchu buněk se zvýšenou mitotickou aktivitou. Afinita PS k sérovým lipoproteinům, obzvláště k LDL hraje poté důležitou roli pro dodání léčiva do rakovinných tkání [46].

Jako světelné zdroje se používají širokopásmová světla ze žárovek nebo obloukových lamp, dále monochromatické světlo z diodových a barvivových laserů. Většina fotosenzitizátorů má sekundární absorpční píky a použití širokopásmových světel zvyšuje jejich fotodynamický účinek [49]. Použité světlo je neionizující, tudíž nedochází k poškození a mutacím DNA a ke karcinogenezi [48]. Optimální vlnové délky jsou mezi 600–850 nm a nazývají se terapeutické okno. Nižší vlnové délky hůře prostupují tkání, naopak vyšší nevykazují dostatečnou energii pro excitaci molekulárního kyslíku do singletového stavu [49].

1.5.1 Fotosenzitizátory

Vhodný fotosenzitizátor využívaný v PDT by měl být netoxický a zároveň by měl mít známou a stabilní strukturu. Existují fotosenzitizátory tří generací. Přírodně se vyskytující porfyriny a jejich deriváty se řadí do první generace fotosenzitizátorů [50]. Jako první látka byla pro PDT použita směs porfyrinů tzv. hematoporfyrin (Hp), dále také jeho více selektivní derivát (HpD). Později byla směs dimerů a oligomerů izolovaných z HpD představena jako fotofrin [51]. I přes široké rozšíření první generace fotosenzitizátorů, je jejich průchod přes tkáň nedostatečný díky maximální absorpci 630 nm a akumulace v kůži naopak příliš vysoká. Za jejich další nevýhodu se považuje hypersenzitivita kůže několik týdnů po aplikaci léčiva a nízká chemická čistota [46].

Fotosenzitizátory druhé generace byly vyvinuty, aby překonaly problémy spojené s první generací. Mezi druhou generaci se řadí látky, které zahrnují nebo mají původ v porfyrinech, bakteriochlorinech, ftalocyaninech, chlorinech, benzoporfyrinech, dále deriváty kurkuminu, methylenové modře a další [52]. PS druhé generace jsou charakterizovány vyšší chemickou čistotou a vyšším množstvím vzniku singletového kyslíku. Díky jejich maximální absorpci vlnových délek 650–800 nm lépe penetrují do hlubších tkání, navíc se vyznačují menším množstvím nepříznivých účinků. PS druhé generace jsou více selektivní pro rakovinné tkáň a dochází k jejich rychlejší eliminaci. Hlavní nevýhodou je špatná rozpustnost ve vodě, což je významně limitující faktor při intravenózní aplikaci [46].

Třetí generace fotosenzitizátorů zahrnuje většinou chemické látky druhé generace, které byly modifikované nebo enkapsulované [51]. Modifikace zahrnuje spojení s cílovými skupinami

např. s protilátkami, sacharidy, aminokyselinami nebo peptidy. Mezi formy vzniklé enkapsulací se řadí lipozomy, micely nebo nanočástice [52]. Zmíněná úprava fotosenzitizátorů zlepšuje jejich selektivitu a akumulaci v cílených tkáních vedoucí k možnosti snížení dávky léčiva při zachování jeho terapeutických vlastností [46].

2 OXIDATIVNÍ STRES

Oxidativní stres je fenomén způsobený nerovnováhou mezi produkcí reaktivních forem kyslíku a antioxidačním mechanismem organismu. Antioxidační mechanismy jsou typem ochranných mechanismů, které slouží k eliminaci ROS se schopností detoxikovat reaktivní molekuly nebo opravit vzniklé poškození způsobené peroxidy a volnými radikály [53].

ROS jsou chemicky aktivní molekuly produkované živými organismy, které jsou výsledkem běžného buněčného metabolismu a v nízkých koncentracích se účastní fyziologických procesů buňky. Naopak, zvýšené množství ROS má schopnost poškozovat buněčné komponenty jako je DNA, RNA, lipidy a proteiny, což může vést k apoptóze a nekróze buněk, nebo také způsobovat změny v buněčných drahách a signalizacích [53, 54].

Tzv. endogenní ROS, které organismus vytváří při normálním stavu, jsou generovány plazmatickými membránovými proteiny, jako je např. skupina NADPH oxidáz, metabolismem lipidů uvnitř peroxizomů a aktivitou různých cytosolických enzymů např. cyklooxygenáz. Tyto zdroje sice přispívají do celkového množství generovaných ROS, ale největší množství buněčných ROS (kolem 90 %) pochází díky oxidativní fosforylaci z mitochondrií [54]. ROS plní mnohé biologické funkce, např. mohou sloužit jako signální molekuly a jejich přítomnost je tedy nutná pro fungování organismu [55, 56].

Při nadměrném oxidačním stresu v patologických a stresových situacích dochází k otvírání iontových kanálků, oxidaci lipidů, modifikaci proteinů a oxidaci DNA. Prozánětlivé molekuly generované prostřednictvím ROS způsobují zánětlivé reakce, které poté hrají roli při vývoji některých onemocnění, jako je arterioskleróza, diabetes mellitus, neurodegenerativní onemocnění jako je Alzheimerova a Parkinsonova choroba. ROS se také podílí při procesu stárnutí nebo komplikacích při těhotenství [53, 54, 57]. Stresové faktory prostředí (např. UV záření, ionizující záření, těžké kovy, kouření, expozice k polutantům, psychologický stres) a některá léčiva mohou produkci ROS zvyšovat a tím pádem zvyšovat i oxidativní stres [55]. Lidský organismus má sice integrované antioxidační systémy zahrnující enzymatické i neenzymatické antioxidanty, které jsou obvykle efektivní při blokování škodlivých účinků ROS, nicméně při patologických podmínkách mohou být antioxidační systémy překonány [53].

2.1 Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku jsou skupina molekul, odvozená od molekulárního kyslíku a formovaná redukčně-oxidačními reakcemi nebo excitací elektronů [58]. ROS se mohou dělit na neradikálové ROS (obsahující dva elektrony) a na volné radikály (molekuly obsahující alespoň jeden volný elektron) [54, 58]. Termín „reaktivní formy kyslíku“ není chemicky přesný a spíše než skupinu molekul, popisuje příbuzné látky s různou mírou reaktivity. Kvůli obtížnému rozeznávání jednotlivých molekul se ale v minulosti začal používat. Dnes je již možné díky současným technologiím určit přesné složení látek a je doporučováno danou molekulu přesně specifikovat [58].

2.1.1 Neradikálové ROS

Mezi neradikálové ROS se řadí peroxid vodíku (H_2O_2), organické hydroperoxydy (ROOH), singletový molekulární kyslík ($^1\text{O}_2$), elektronově excitovaný karbonyl ($\text{R}-\text{C}=\text{O}$), ozon (O_3) a kyselina chlorná a bromná (HClO , HBrO) [58].

Peroxid vodíku vzniká z molekulárního kyslíku redukcí dvou elektronů převážně NADPH oxidázami ve spojení se superoxidovými dismutázami mitochondriálním elektronovým transportním řetězcem a dalšími enzymy. Peroxid vodíku je relativně stabilní a je schopný oxidovat proteiny obsahující atomy síry – glutathion, cystein a methionin. Další jeho vlastností je rozpustnost v tucích a schopnost snadno difundovat přes buněčné membrány [59, 60].

Organické hydroperoxydy zahrnují hydroperoxydy vytvořené enzymaticky a neenzymaticky (vznikající např. při oxidaci lipidů) z polynenasycených mastných kyselin (PUFA) a sterolů (např. z cholesterolu). Jejich hlavní funkcí je buněčná signalizace, převážně v imunitním systému a podílejí se na např. ferroptóze¹[58].

Singletový molekulární kyslík je excitovaná forma O_2 . Proces generování $^1\text{O}_2$ může probíhat fotoexcitací (v částech těla, které jsou vystavené světlu) a chemickou excitací enzymaticky, která může fungovat bez přístupu světla [58]. Singletový kyslík může přímo oxidovat proteiny, DNA a lipidy a účastní se také oxidace cholesterolu, která se může být součástí Diels-Alderových reakcí [61].

¹ Ferroptóza je typ buněčné smrti, který je většinou doprovázen velkým množstvím nahromaděného železa a oxidací lipidů [62].

Ozon je velmi reaktivní oxidační činidlo, jenž v oblastech se znečištěným ovzduším zvyšuje oxidativní stres v plicích a dalších exponovaných tkáních, jako jsou pokožka, či oko [58].

Kyselina chlorná a bromná jsou látky produkované z peroxidu vodíku myeloperoxidázou ve fagocytických vakuolách v neutrofilech při obraně proti patogenům [58]. Kyselina chlorná má schopnost snadno oxidovat proteinové konstituenty, např. thiolové skupiny, aminoskupiny nebo methionin [60].

2.1.2 Radikálové ROS

Mezi volné radikály se řadí superoxidový radikál (anion O_2^-), hydroxylový radikál ($\bullet OH$), peroxylový radikál ($ROO\bullet$) a alkoxylový radikál ($RO\bullet$) [58].

Superoxidový radikál vzniká redukcí jednoho elektronu kyslíku O_2 nebo je katalyzován superoxidovými dismutázemi na H_2O_2 a O_2 a slouží jako hlavní zdroj peroxidu vodíku [56], [58]. Protonovaná forma O_2^- , je perhydroxylový radikál $HO_2\bullet$, který není nabitý a může se rozpouštět v lipidech. Superoxidový radikál efektivně reaguje s dalšími radikály např. s oxidem dusnatým (NO) a tímto vytváří peroxonitrit ($ONOO^-$), který slouží jako nitrační činidlo tyrosinu [58].

Hydroxylový radikál je nejreaktivnější forma ROS a je nespecifickým oxidačním činidlem. Je tvořen z peroxidu vodíku redukcí Fentonovou reakcí za účasti Fe^{2+} a reaguje přímo s nejbližší molekulou v místě jeho vzniku [58]. Hydroxylový radikál je schopen poškozovat proteiny, dále také může způsobit rozštěpení řetězce DNA a oxidaci lipidů [63].

Peroxylový radikál vzniká po iniciaci řetězové reakce volných radikálů polynenasycených mastných kyselin při oxidaci lipidů. Peroxylové radikály propagují řetězové reakce volných radikálů odebráním protonu jiné PUFA a tím pádem vytváří lipidový hydroperoxid a další uhlíkový radikál. Alkoxylový radikál vzniká jako meziprodukt oxidace lipidů rozkladem hydroperoxidů a může zesilovat řetězové reakce oxidace tuků [58].

2.1.3 Endogenní zdroje ROS

ROS vznikají díky všudypřítomnému kyslíku v buňkách a snadno akceptující volné elektrony, které jsou generovány normálním oxidativním metabolismem uvnitř buňky. Hlavním zdrojem ROS jsou mitochondrie, které je produkují při oxidativní fosforylaci [64]. Další buněčné součásti, jako jsou na endoplazmatické retikulum se vážící enzymy a cytoplazmatické enzymatické systémy se mohou produkce účastnit také [56]. Na zvýšení množství ROS se také podílí mnohé enzymatické systémy, např. jsou syntézy oxidu

dusnatého, xantinoxidáza, enzymy fagocytózy, enzymy syntézy prostaglandinů a další enzymy účastníci se zánětlivých procesů (cyklooxygenáza a lipoxygenáza). Množství ROS zvyšují dále kovy jako je železo, měď a mangan, které mohou být uvolněny z metaloproteinových komplexů [56, 60].

2.1.4 Exogenní zdroje ROS

Jak už bylo zmíněno výše, ROS nebývají produkovány pouze přirozenými procesy v těle, ale mohou být generovány i díky vnějším vlivům. Mezi exogenní zdroje se řadí chemické látky, jenž reagují za vzniku peroxidů nebo ozonu, chemické látky, které podporují tvorbu superoxidů (např. quinony, aromatické sloučeniny s dusíkem), sloučeniny, které jsou metabolizovány na radikály (např. polyhalogenované alkany, fenoly, aminofenoly) a chemikálie uvolňující železo a měď a podporující vznik hydroxylových radikálů. ROS mohou být také generovány ozářením vody ionizujícím zářením (RTG záření a γ záření) nebo UV ozářením peroxidu vodíku [65], dále také expozicí k ozonu, těžkým kovů nebo kouřením (cigaretový kouř obsahuje oxidační činidla, jako jsou superoxidy a oxid dusný) [64].

2.2 Důsledky oxidativního stresu

Oxidativní stres způsobuje poškození proteinů, lipidů, DNA a dalších buněčných komponentů. Dále hraje úlohu v rozvoji řady onemocnění, jako je rakovina, kardiovaskulární onemocnění, zdravotní problémy související s věkem, neurologické onemocnění jako je Alzheimerova a Parkinsonova choroba a v neposlední řadě se podílí na mnohých zánětlivých onemocněních [65].

2.2.1 Poškození buněk a biomolekul

Proteiny

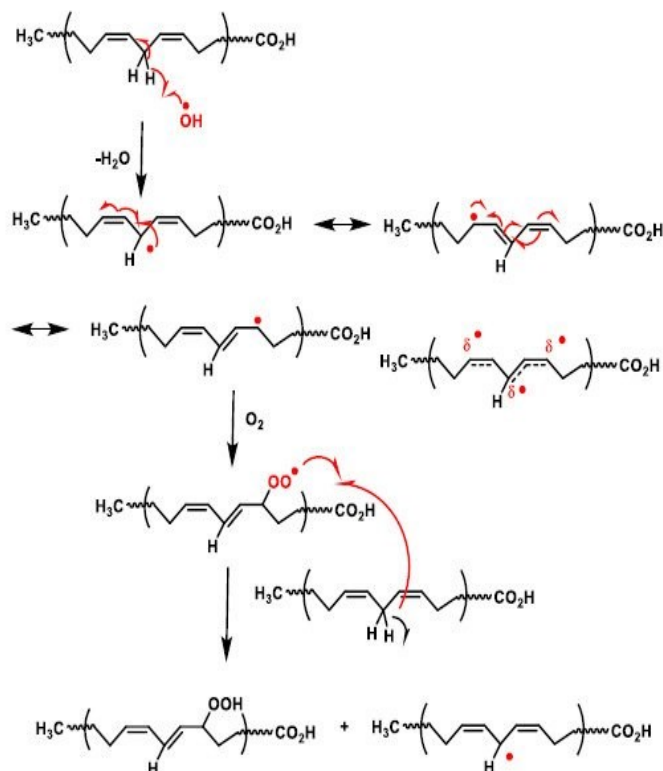
ROS mohou způsobit oxidaci nebo modifikaci proteinů. Nejvíce náchylné bílkoviny k oxidaci jsou složeny z aminokyselin jako je methioninu, cysteinu, argininu, a histidinu [60]. Oxidace bílkovin může být rozdělena na ireverzibilní a reverzibilní. Ireverzibilní oxidace většinou vede k agregaci a degradaci bílkovin. Tento typ oxidace zahrnuje vznik karbonylů bílkovin, nitrotyrosinu a sulfonových kyselin, což má za následek ztrátu funkce proteinů a jejich degradaci nebo akumulaci. Reverzibilní oxidace se většinou účastní redoxních signálních cest a regulace struktury a funkce bílkovin, často k ní dochází na cysteinovém zbytku a vede ke vzniku disulfidů, S-sulfonace, S-nitrosylace,

a S-glutathionylace, dále také ke vzniku methioninu sulfoxidu, což je reverzibilní proces účastnící se ochrany proti ischemii [66].

Lipidy

Produkce ROS v biomembránách je velmi vysoká díky vysoké rozpustnosti molekulárního kyslíku. Tím pádem jsou k napadení reaktivními formami kyslíku náchylné fosfolipidy obsahující vysoké množství polynenasycených mastných kyselin. Ty jsou dále schopné se po reakci s ROS přeměnit na reaktivní volné radikály, které iniciující řetězové reakce oxidace lipidů [67]. Dalším cílem ROS mohou být také glykolipidy nebo cholesterol. Lipidy mohou být také oxidovány enzymaticky pomocí např. lipoxygenáz, cyklooxygenáz [68].

Působením volných radikálů může dojít k oxidativnímu poškození lipidů k tzv. peroxidaci lipidů, jejíž mechanismus je zobrazen na obrázku 6. Peroxidace lipidů je reakce, během níž dochází k odebrání elektronů molekulám tukových látek. Odebráním elektronů dojde ke vzniku reaktivní sloučeniny účastnící se dalších reakcí. Peroxidace lipidů přímo poškozují fosfolipidy a hraje roli při apoptóze a zánětlivých onemocněních [68]. Tato radikálová reakce probíhá ve třech následujících krocích: iniciaci, propagaci a terminaci. Během iniciace prooxidanty, jako je např. hydroxylový radikál, dochází k odštěpení allylového vodíku za vzniku lipidového radikálu ($L\bullet$), který bývá stabilizován molekulárním přeskupením za vzniku konjugovaného dienu. V propagační fázi lipidový radikál reaguje s kyslíkem za vzniku peroxylového radikálu ($LOO\bullet$), ten odejme vodík z další molekuly mastné kyseliny za vzniku nového radikálu a hydroperoxidu ($LOOH$) [66]. V poslední fázi spolu reagují dva radikály za vzniku stabilních molekul a zároveň antioxidanty účinně rozkládají radikály, čímž inhibují řetězovou reakci [68]. Primárním produktem oxidace lipidů jsou hydroperoxydy. Sekundárními produkty jsou aldehydy, jako je malondialdehyd, který může mít mutagenní účinky nebo dále také propanal, hexanal nebo 4-hydroxynonenal, který se řadí mezi cytotoxické látky [66].



Obrázek 6: Mechanismus peroxidace lipidů [69]

DNA

Poškozením DNA se rozumí fyzikálně-chemické změny jak v jaderné DNA, tak hlavně v mitochondriální DNA, která je více náchylná k oxidativnímu poškození díky přítomnosti dýchacího řetězce, v němž probíhá generace ROS v největší míře. ROS reagují v DNA s dusíkatými bázemi a deoxyribózou a způsobují oxidativní reakce, mající za důsledek vznik mutací, apoptózu a nekrózu buněk nebo dědičná onemocnění. Oxidace DNA má také za důsledek roztržení dvoušroubovice nebo změnu v DNA bázích. ROS působí oxidačně různým způsobem, např. hydroxylový radikál způsobuje oxidativní poškození pyrimidinových a purinových bází excizí vlákna nebo reaguje s deoxyribózou, kdy dochází k odstranění vodíku molekuly, což vede ke tvorbě oxidačních produktů [69].

2.2.2 Oxidativní stres a onemocnění

Při nízkých koncentracích jsou ROS zapojeny do různých buněčných procesů (proliferace, diferenciace, apoptóza) nebo fungují jako signální molekuly. Vyšší koncentrace ROS a jejich produkce v nechtěných buněčných částech nebo jejich uvolňování při přirozených procesech v nevhodných formách může být spouštěčem vývoje některých chronických onemocnění [64].

Kardiovaskulární onemocnění (KVO)

Hlavním rizikovým faktorem ve vývoji KVO je hypertenze. Ačkoliv je vysoký krevní tlak způsobený mnoha příčinami (životní styl, genetické predispozice, komorbidity), společným znakem na molekulární úrovni je oxidativní stres [70]. A. C. Montezano a R. M. Touyz [71] ve své studii zmiňují, že při zvýšeném krevním tlaku pocházejí oxidanty hlavně z NADPH oxidáz (NOX), dále může být spojitost oxidativního stresu a KVO podpořena tím, že u pacientů s vysokým krevním tlakem bylo pozorováno zvýšené množství superoxidových aniontů a peroxidu vodíku [72]. Kauzální role oxidativního stresu nicméně u hypertenze nebyla ještě ustanovena [70].

Reaktivní formy kyslíku v malém množství v kardiovaskulárním systému poskytují benefity jako je ochrana proti ateroskleróze a podpora angiogeneze. Vyšší množství ROS ale způsobuje snížení buněčné viability a oxidační stres se podílí na vývoji a postupu KVO jako je endoteliální dysfunkce, ateroskleróza, selhání srdce, arytmie nebo ischemická choroba srdeční [64].

Nádorová onemocnění

Rozvoj rakoviny v lidském organismu je komplexní proces, který zahrnuje změny na buněčné a molekulární úrovni, které jsou způsobeny endogenními i exogenními vlivy [64]. Bylo zjištěno, že stálá expozice k vysokým množstvím ROS může poškodit DNA a ROS jsou přítomny při růstu nádorů, proliferaci, angiogenezi a jejich metastázi [70, 73]. Tato tvrzení byla mnohokrát prokázána, například H.P.Chang a kol. [74] měřili množství H_2O_2 v kondenzovaném vydechnutém vzduchu u pacientů s nově diagnostikovaným nemalobuněčným karcinomem plic a změřili zvýšené množství H_2O_2 a sníženou antioxidační kapacitu oproti normálu.

Neurodegenerativní onemocnění

Alzheimerova choroba je onemocnění charakterizované postupnou akumulací extracelulárních β -amyloidních plaků a neurofibrilárních pletenin uvnitř neuronů, dále také neurodegenerací, která vede ke ztrátě paměti a k demenci [70, 75]. Hlavní příčina onemocnění není jasná, ale rizikové faktory jako je věk, genetika, pohlaví a znečištění ovzduší přispívají k rozvoji nemoci. Mnohé studie ukazují, že v mozcích pacientů s Alzheimerovou chorobou byl zvýšený oxidační stres. Například v čelním, temenním a spánkovém laloku bylo zjištěno zvýšené množství oxidovaného jaderného

a mitochondriálního DNA oproti kontrole stejného věku nebo byl zjištěn nárůst oxidace proteinů v hypokampu a proteinových karbonylů v kůře mozkové [70].

Parkinsonova choroba je chronické neurodegenerativní onemocnění diagnostikované především svými klinickými projevy a vyznačuje se poškozením dopaminergní neuronů v černé substantii a přítomností Lewyho tělísek v cytoplazmě těchto neuronů. Dopaminergní neurony jsou díky extrémní metabolické aktivitě a přítomnosti snadno oxidovatelných látek např. PUFA a železo, náchylné k oxidativnímu poškození [76]. Pacienti s Parkinsonovou chorobou měli zvýšené množství poškození DNA a oxidaci lipidů v nervových buňkách, dále také snížené množství cytoplazmatického glutathionu, který má v mozku antioxidační funkci [77].

Diabetes mellitu II. typu

Diabetes mellitus druhého typu je typ diabetu, který může být způsoben genetickými faktory, ale také vnějšími vlivy, např. obezitou. Tento typ onemocnění se vyznačuje nefunkčními mechanismy, regulujícími tkáňovou citlivost na inzulin, což vede ke zhoršené sekreci inzulinu pankreatickými beta buňkami a sníženému účinku inzulinu díky inzulinové rezistenci [78]. Oxidativní stres stimuluje produkci zánětlivých mediátorů a zánětlivé procesy naopak podporují produkci ROS, chronický zánět je tedy spojován s vývinem diabetu [79].

Stárnutí kůže

Reaktivní oxygenní molekuly indukují a zrychlují procesy stárnutí, včetně stárnutí kůže. V kůži je 1,5–5 % přijímaného kyslíku přeměněno na ROS, které poté aktivují signální cesty, jejichž výsledkem je snížení produkce kolagenu, syntéza a aktivace metaloproteináz, které jsou zodpovědné za degradaci pojivové tkáně a sekreci sekrečního fenotypu spojeného se stárnutím, který podporuje stárnutí kůže [80].

ROS se také účastní procesu stárnutí kůže přes photoaging. Photoaging je proces stárnutí kůže způsobené vystavením kůže UV záření a je zodpovědný za více než 80 % stárnutí pleti [80]. Ozářením kůže UV zářením dochází ke zvýšení produkce ROS, které způsobují oxidativní stres, aktivují dráhy kyseliny arachidonové a zprostředkovávají zánětlivé odpovědi [80, 81].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 METODIKA

V rámci diplomové práce proběhla příprava koloidního polyanilinu (PANI) a koloidního polypyrrolu (PPy) v přítomnosti polyvinylpyrrolidonu (PVP) jako stabilizátoru. Dále proběhlo testování fototoxicity vybraných fototoxických látek podle normy OECD č. 432 s určitými modifikacemi na buněčné linii BALB/c 3T3. Již dříve bylo prokázáno, že koloidní polyanilin je schopen vychytávat reaktivní formy kyslíku [82]. Antioxidační schopnosti byly prokázány také u dalšího vodivého polymeru a to polypyrrolu [83]. Právě vznik ROS je jedním z mechanismů vzniku fototoxicity. Proto byly polyanilin a polypyrrol použity ke zmírnění fototoxického účinku.

3.1 Použité chemikálie

Anilin hydrochlorid (AH, Lach-Ner, Česká republika), amonumpersulfát (APS, Sigma-Aldrich, Rakousko), polyvinylpyrrolidon (PVP, Sigma-Aldrich, USA), pyrrol (Sigma-Aldrich, Čína), chlorid železitý (FeCl_3 , IPL Česká republika), kyselina chlorovodíková (HCl, Lach-Ner, Česká republika), kultivační médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Biosera, Francie), novorozenecké telecí sérum (Biosera, Francie), penicilin a streptomycin (Biosera, Francie), glutamin (Biosera, Francie), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid (MTT, Duchefa Biochemie, Nizozemsko), dimethyl sulfoxid (DMSO, Penta, Česká republika), esenciální bergamotový olej (M&H, Česká republika), esenciální citronový olej (Salus, Slovenská republika).

3.2 Použité přístroje

Inkubátor HeraCell 150 i (Trigon, Česká republika), flow box HeraSafe KS (Thermo Fisher, USA), centrifuga 5702 R (Eppendorf, Německo), vodní lázeň (Mettler, Německo), ultrazvuková lázeň (Mettler, Německo), solární simulátor SOL 500 (Honle, Německo), spektrofotometr Infinite M200 PRO (Tecan, Švýcarsko), homogenizátor Sonoplus HD 2070 (Bandelin Sonopuls, Německo), zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Velká Británie).

3.3 Použitá buněčná linie

Jako buňky pro testování byla použita buněčná linie myších fibroblastů BALB/c 3T3 klonu A31. Tato linie byla použita na základě doporučení normy OECD č. 432. Linie byla vyvinuta

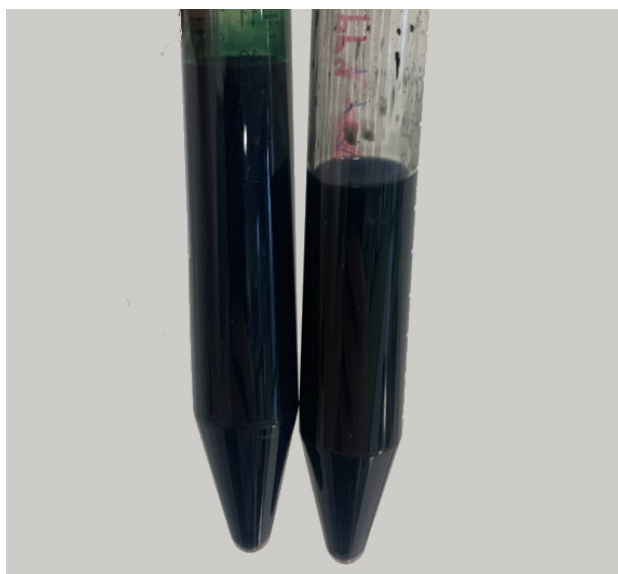
z disagregovaných myších embryí starých 14–17 dní a většina buněk obsahuje pouze telocentrické nebo akrocentrické chromozomy [24].

3.4 Příprava testovaných látek

3.4.1 Příprava koloidů

Koloidní PANI byl připraven podle standardu IUPAC (Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii) [84]. Nejprve bylo 0,26 g AH rozpuštěno v 5 ml vodného roztoku PVP o koncentraci 2 hm. %. Poté bylo 0,57 g APS rozpuštěno v 5 ml destilované vody. Roztok APS byl přidán k roztoku AH s PVP a směs byla ponechána 10 minut polymerizovat při laboratorní teplotě. Koloid byl poté dialyzován v celulosové membráně Spectra/Por 1 (Spectrum Medical Instruments, USA, Mw 7 000D) proti roztoku 0,1 M HCl po dobu 10 dní za stálého míchání. HCl byla každý den vyměněná za čistou. Dialýza byla provedena kvůli odstranění nečistot a nezreagovaných zbytků monomeru a oxidačního činidla.

Příprava koloidního PPy začala rozpuštěním 0,1675 g pyrrolu ve 25 ml vodného roztoku PVP o koncentraci 2 hm. %. Výsledný roztok byl ponechán 30 minut na sonikátoru pro jeho homogenizaci. Dalším krokem bylo rozpuštění 0,676 g FeCl₃ ve 25 ml destilované vody a přidání rozpuštěného FeCl₃ k roztoku PVP a PPy. Připravená směs byla poté ponechána 24 hodin polymerizovat. Koloid byl opět dialyzován přes celulosovou membránu Spectra/Por 1 (Spectrum Medical Instruments, USA, Mw 7 000D) v roztoku 0,1 M HCl po dobu 10 dnů, za stálého míchání. HCl byla každý den vyměněna za čistou, stejně jako v případě přípravy PANI. Výsledné připravené koloidy je možné vidět na obrázku 7.



Obrázek 7: Koloidní PANI (vlevo) a Ppy (vpravo)

3.4.2 Příprava emulzí esenciálních olejů

Jako fototoxické látky byly vybrány esenciální oleje, a to konkrétně olej citronový a bergamotový, jejichž fototoxický účinek je prokazatelně znám [85, 86]. Vybrané silice byly přidány do fosfátového pufru, který je založen na vodní bázi. Pro nemísitelnost silic s vodou byla směs ponechána 10 minut v ultrazvukové lázni kvůli lepší homogenizaci. Esenciální oleje byly připraveny v koncentracích v rozmezí 0,01 až 1,0 obj. %.

3.5 Podmínky kultivace

Buňky byly kultivovány v kultivačním médiu DMEM s přidavkem 10% novorozeneckého telecího séra, 100 U m/L penicilinu a streptomycinu a 2mM glutaminu. Kultivace probíhala na tkáňovém plastiku TPP (Techno Plastic Products AG, Švýcarsko) v inkubátoru HeraCell při teplotě 37 °C, 5 % CO₂ za stálé vlhkosti. Před samotným testováním museli být vždy buňky rozmrazeny a rozkultivovány, takže buňky byly pravidelně pasážovány.

3.5.1 Pasážování buněk

Na začátku pasážování byly buňky promyty 8 ml fosfátového pufru. Po promytí byly na do kultivační lahve přidány 4 ml trypsinu a lahev byla ponechána kolem 5 minut v inkubátoru pro rozvolnění buněk a jejich uvolnění ze dna kultivační lahve. Po rozvolnění buněk bylo do kultivační lahve přidáno stejné množství média jako trypsinu a buněčná suspenze odpipetována do zkumavky. Suspenze byla poté odstředěna v centrifuzě po dobu 3 minut při 37 °C a rychlosti otáček 1100 rpm. Po centrifugaci byl supernatan odsán a buňky rozsuspendovány v kultivačním médiu. V posledním kroku proběhlo ředění buněčné suspenze na požadovanou koncentraci. Všechny testy byly zahájeny při dosáhnuté konfluenci přibližně 80 %.

3.6 Charakterizace koloidů

Po přípravě koloidů byly charakterizovány jejich vybrané materiálové a biologické vlastnosti. Z materiálových vlastností byla stanovena jak velikost koloidních částic, tak index polydisperzity. Oba tyto parametry byly stanovené na čerstvě připravených koloidech ve fyziologickém prostředí a po půl roce jejich skladování. Z biologických vlastností byl stanovený základní parametr biokompatibility. Konkrétně byla vyhodnocená cytotoxicita koloidních disperzí.

3.6.1 Velikost částic a index polydisperzity

Velikost částic a index polydisperzity (PDI) byly měřeny na přístroji Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Velká Británie). Standardní měření proběhlo v 1M 2x filtrované HCl, pro zjištění pH stability ve fyziologickém prostředí měření proběhlo v PBS. Na začátku byl koloid smíchán s měřicím médiem (20 μ l koloidu a 3 ml HCl nebo PBS). Dalším krokem bylo přidání 1 ml připravené směsi do skleněné čisté kyvety, která bylo poté vložena do přístroje pro měření. Testování v HCl proběhlo na čerstvě připravených koloidech a taktéž byla stanovena časová stabilita, a to po půl roce od jejich přípravy. Testování v PBS bylo z důvodu zjištění pH stability ve fyziologickém prostředí, které PBS s pH 7,4 představuje. Vyhodnocení poté proběhlo pomocí softwaru Zetasizer.

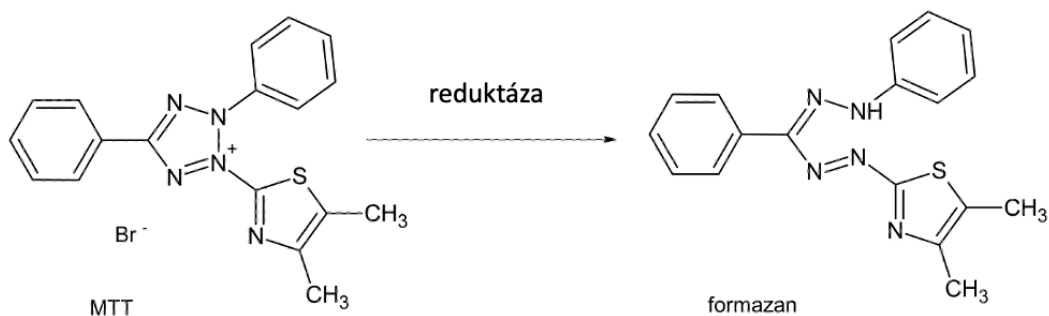
3.6.2 Cytotoxicita koloidů

Cytotoxicita koloidních disperzí byla stanovena podle české technické normy ČSN ISO 10993-5: Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*. První den byla do 96- jamkové mikrotitrační destičky nasazena buněčná suspenze v koncentraci 2×10^5 /ml média. Do každé jamky bylo napipetováno 100 μ l suspenze, přičemž krajní jamky destičky byly ponechány volné. Buňky byly poté ponechány adherovat na povrch plastiku po dobu 24 hodin v inkubátoru.

Druhý den byl koloidní PANI a PPy rozpuštěn v médiu v koncentracích: 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 a 10 obj. %. Kultivační médium bylo dekantováno, nahrazeno médiem s jednotlivými koncentracemi koloidů a jeden sloupec jamek byl ponechán pouze s čistým kultivačním médiem jako reference. Destička byla poté opět nechána 24 hodin v inkubátoru.

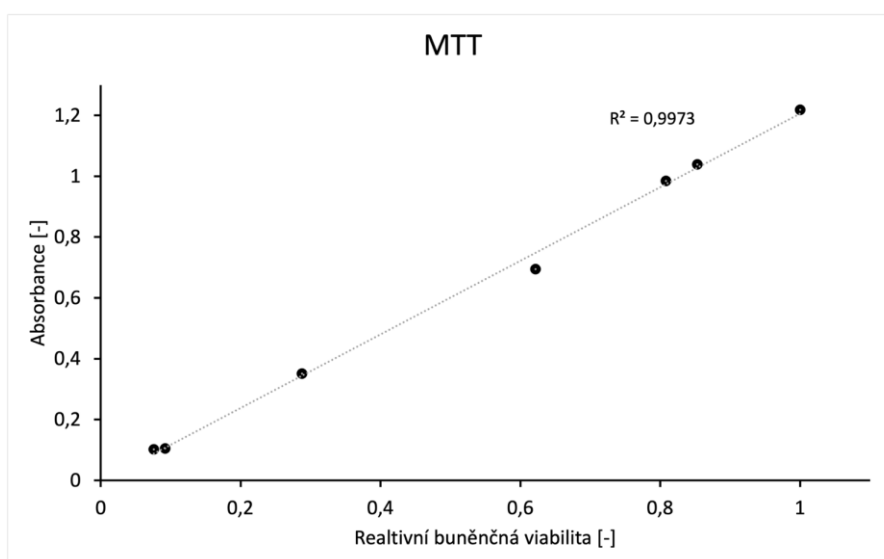
Třetí den byla cytotoxicita koloidů vyhodnocena pomocí testu MTT. Test MTT je kolorimetrický test životaschopnosti buněk založen na redukci ve vodě rozpustného žlutého barviva MTT na ve vodě nerozpustný fialový formazan. Tuto reakci je možné vidět na obrázku 8. MTT je schopné procházet skrz buněčnou a mitochondriální membránu pravděpodobně díky svému pozitivnímu náboji a lipofilním vlastnostem. Redukce potom probíhá metabolicky aktivními buňkami, kde je barvivo MTT přeměňováno enzymy na mitochondriální membráně. Takže čím více je metabolicky aktivních buněk, tím více barviva je přeměněno a tím vyšší je hodnota absorbance. Z čehož vyplývá, že čím vyšší je absorbance, tím je viabilita buněk vyšší. Tato závislost je graficky znázorněna na obrázku 9. Intracelulární redukce MTT může být zprostředkována enzymy oxidoreduktázy a dehydrogenázy a donory elektronů (hlavně NADPH) různých fází

glykolytických drah k mitochondriálnímu transportnímu řetězci elektorů. I přesto, že se MTT test považuje jako ukazatel mitochondriální aktivity, biochemické a mikroskopické testy lokalizovaly formazanová granula i v endoplazmatickém retikulu nebo plazmatické membráně buněk [87].



Obrázek 8: Přeměna ve vodě rozpustného MTT na ve vodě nerozpustný formazan [88]

Na začátku provedení testu MTT byly testované látky dekantovány, buňky byly 2x propláchnuty fosfátovým pufrém a bylo k nim přidáno 90 μ l čerstvého média. Do každé jamky bylo poté přidáno 10 μ l roztoku MTT v koncentraci 5 mg/ml. Destička byla poté ponechána v inkubátoru. Po 4 hodinách bylo médium s MTT dekantováno a do jamek bylo přidáno na 15 minut 80 μ l DMSO pro rozpuštění vzniklého formazanu. Test byl nakonec spektrofotometricky vyhodnocen měřením absorbance pomocí multifunkčního readeru Infinite M 200 PRO. Měření proběhlo při vlnové délce 570 nm a referenční vlnová délka byla nastavena na 690 nm.



Obrázek 9: Graf závislosti absorbance na relativní buněčné viabilitě při testu MTT, při vlnové délce 570 nm

Výsledná absorbance byla přepočtena na relativní hodnoty, kde reference znamenala 100 % životaschopnost buněk a odpovídala hodnotě 1. Životaschopnost buněk po expozici koloidem byla vypočítána dle rovnice 1, která je podle české technické normy ČSN ISO 10993-5: Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro* [89]. Všechny testy byly provedeny ve čtyřech opakování.

$$\text{relativní buněčná viabilita} = \frac{OD_{570e}}{OD_{570b}} \quad (1)$$

OD_{570e} střední hodnota změřené absorbance vzorku

OD_{570b} střední hodnota změřené absorbance reference

Čím nižší byla hodnota relativní buněčné viability, tím vyšší byla cytotoxicita testované látky.

3.7 Test fototoxicity a vlivu koloidů na fototoxicitu

3.7.1 Čas iradiace

Doba ozáření buněk byla spočítána podle OECD normy 432 [25]. Pro buněčnou linii BALB/c 3T3 je podle normy dávka iradiace určena jako 5 J/cm². Dávka je necytotoxická, ale zároveň dostačující pro vznik fototoxické reakce. Čas iradiace byl poté spočítán podle rovnice 2:

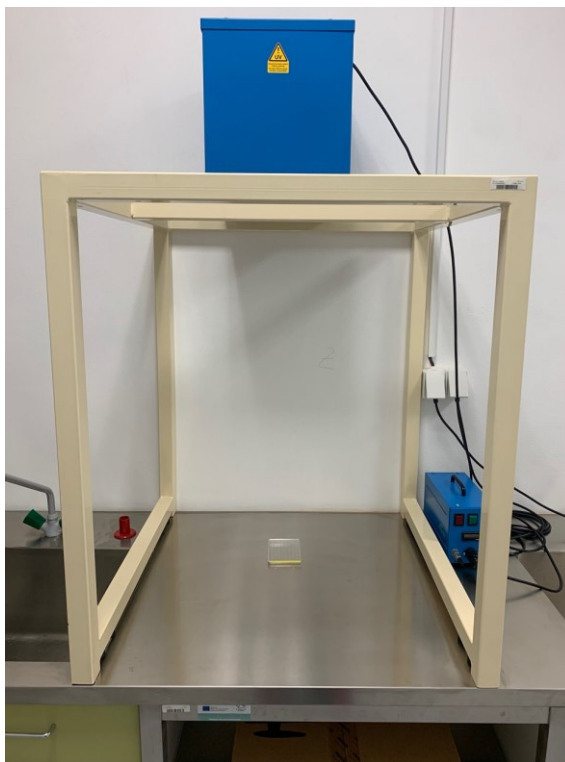
$$t [\text{min}] = \frac{\text{dávka iradiace [J/cm}^2\text{]}}{\text{výkon iradiace [mW/cm}^2\text{]}} \quad (2)$$

Reálná doba ozáření byla 35 minut.

3.7.2 Příprava buněk a ozáření

První den byla nasazena buněčná suspenze na 96- jamkovou multititrační destičku o koncentraci buněk 5x10⁵/ml, přičemž krajní jamky byly ponechány volné. Pro všechny kombinace byly připraveny dvě destičky a z nich jedna byla použita pro zjištění fotocytotoxicity (Irr+) a druhá pro zjištění cytotoxicity (Irr-). Destičky byly poté ponechány 24 hodin v inkubátoru. Druhý den bylo médium dekantováno a do jamek byl přidán fosfátový pufr s oleji o koncentracích 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 a 1 obj. %. Silice byly testovány jednak samotné a také byly k silicím přidány koloidy v koncentraci 1 obj. %. Destičky byly poté s testovanými látkami ponechány 30 minut inkubátoru. Po 30 minutách byla jedna destička ozářena pod UV lampou a druhá byla po stejnou dobu ponechána na tmavém místě. Na obrázku 10 lze právě vidět ozařování destičky UV lampou. Po 35 minutách byly buňky

promyty fosfátovým puftrem, do jamek přidáno médium a destičky byly opět ponechány 24 hodin v inkubátoru.



Obrázek 10: Ozařování destičky UV lampou

Třetí den proběhlo určení viability buněk pomocí testu MTT způsobem popsaným v kapitole 3.6.2. Pomocí softwaru GraphPad Prism byla stanovena hodnota IC_{50} pro buňky ozářené i neozářené. Tato hodnota byla následně použita pro výpočet tzv. fotoiritačního faktoru.

3.7.3 Fotoiritační faktor

Výsledky získané díky testu MTT, byly poté zhodnoceny pomocí fotoiritačního faktoru (PIF). PIF je hodnota předpovídající fototoxicitu testované látky. Podle normy OECD č. 432 je možné hodnotu PIF spočítat podle rovnice 3.

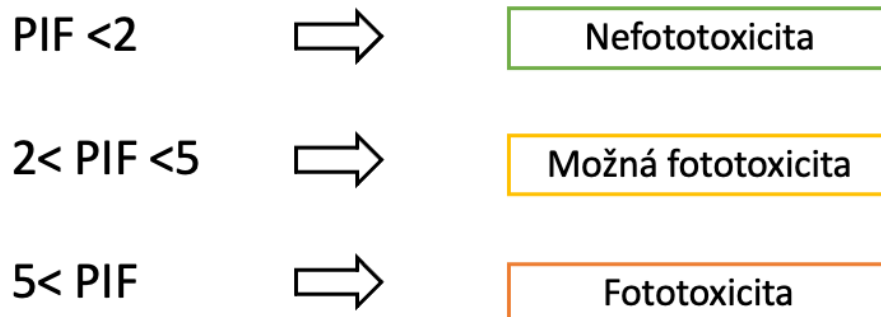
$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)} \quad (3)$$

$IC_{50}(-Irr)$ maximální poloviční inhibiční koncentrace bez ozáření

$IC_{50}(+Irr)$ maximální poloviční inhibiční koncentrace s ozářením

Norma OECD také říká, že podle hodnoty PIF faktoru je možné předpovědět fototoxicitu testované látky. Jak lze vidět na obrázku 11, PIF faktor <2 předpovídá, že látka není

fototoxická, PIF faktor větší než 2, ale menší než 5 předpovídá „možnou fototoxicitu“ chemikálie, PIF faktor větší než 5 potom predikuje, že testovaná látka je fototoxická.



Obrázek 11: Predikční model fototoxicity podle fotoiritačního faktoru

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Materiálová charakterizace koloidů

Byly připravené dva typy koloidních systémů, a to poyanilinový a polypyrrolový koloid. Jako bylo zmíněné už dříve, oba tyto polymery vykazují antioxidační vlastnosti. Tyto polymery mohou být připravené v různých formách jako je prášek, tenký film, či koloidní suspenze. Z hlediska zpracování a využití při testování fototoxicity byla forma koloidu zvolena jako nejideálnější. Na rozdíl od prášku, který je nerozpustný ve vodním prostředí, a dokonce i v běžných organických rozpouštědlech, koloidní forma je lehce mísitelná ve vodním prostředí. Koloidní disperze vznikají, když polymerizace probíhá za přítomnosti vhodného stabilizátoru. Stabilizátor vytváří na povrchu vznikajících částic obal, který částice chrání před agregací. Jako stabilizátory se používají jak různé syntetické polymery, tak biopolymery. Pro využití v biologických aplikacích by se měl jednoznačně volit biokompatibilní stabilizátor. Proto byl zvolen pro stabilizaci připravovaných koloidů polyvinylpyrrolidon, který vykazuje mnoho vhodných vlastností, ze kterých nejdůležitější je biokompatibilita, rozpustnost ve vodě a výborná stabilita [90].

Koloidní částice jsou definované na základě jejich struktury a podle definice se za koloidní částice považují částice mající jakýkoliv rozměr menší jako 1 μm , ale zároveň větší jako 10 nm [91]. Důležitým charakterizačním ukazatelem koloidních disperzí je jejich velikost částic a index polydisperzity (PDI).

Index polydisperzity reprezentuje distribuci velikosti částic daného vzorku. Jeho číselné hodnoty se pohybují od 0,0, kdy se jedná o perfektní monodisperzní vzorek, až do 1,0, kdy hovoříme o vysoko polydisperzním systému s širokou velikostní distribucí [92].

Dalším důležitým ukazatelem je stabilita koloidních částic. Koloidní stabilita se týká právě velikosti částic, a to konkrétně změn v jejich velikosti, které mohou naznačovat např. agregaci nebo aglomeraci. Pokud velikost částic nepodléhá změnám, disperze se považuje za koloidně stabilní. Stabilita může být různého charakteru. V rámci diplomové práce byla stanovena časová stabilita a vzhledem k plánovanému použití koloidu i pH stabilita. Časová stabilita byla stanovena po 6 měsících od přípravy koloidních disperzí. S ohledem na využití koloidu v biologických systémech, byla pH stabilita měřena ve fyziologickém prostředí.

Jako první byly změřeny vlastnosti koloidního PANI. V tabulce 1 lze vidět, že průměrná velikost částic byla naměřena jako $277,0 \pm 5,0$ nm, měřením v PBS byla velikost částic zjištěna jako $277,0 \pm 0,3$ nm. Z těchto hodnot lze usuzovat, že velikost částic koloidního PANI zůstala ve fyziologickém prostředí stabilní a částice neměli tendenci agregovat. Tabulka 2 zobrazuje naměřenou velikost částic PANI po 6 měsících jako $292,0 \pm 12,0$ nm. Srovnáním s výsledky naměřenými ihned po přípravě koloidů došlo pouze k mírnému zvýšení velikosti částic, a proto lze konstatovat, že průměrná velikost částic koloidního PANI se v čase nemění a koloid byl stabilní i po 6 měsících. Naměřený index polydisperzity koloidního PANI dosahoval po 6 měsících hodnoty $0,240 \pm 0,020$. Ve srovnání s PDI naměřeného ihned po přípravě vzorku, jehož velikost byla $0,160 \pm 0,070$ a v PBS $0,112 \pm 0,017$, se PDI po půl roce zvýšil. V čase zůstávala tedy velikost částic PANI koloidu stabilní, ale i přes neměnnou velikost částic došlo v čase ke zhoršení jeho homogenity.

Tabulka 1: Měřené vlastnosti koloidů ihned po přípravě

Koloid	Prostředí při měření	Průměrná velikost částic [nm]	σ [nm]	Index polydisperzity	σ [nm]
PANI	HCl	277,0	5,0	0,160	0,070
PANI	PBS	277,0	0,3	0,112	0,017
PPy	HCl	152,9	1,3	0,236	0,021
PPy	PBS	116,0	4,0	0,207	0,017

Druhým testovaným koloidem byl PPy koloid. Hodnota velikosti částic byla naměřena jako $152,9 \pm 1,3$ nm. Ve fyziologickém prostředí došlo poté ke zmenšení velikosti částic, a to na $116,0 \pm 4,0$ nm. Podobným způsobem došlo ke zmenšení velikosti částic i po 6 měsících, kdy velikost částic po půl roce byla naměřena jako $115,0 \pm 5,0$ nm. Homogenita koloidu se ve fyziologickém prostředí zvýšila, což lze vidět na změně PDI z hodnoty $0,236 \pm 0,021$ nm na $0,207 \pm 0,017$ nm. V případě měření PDI došlo po půl roce také ke snížení hodnoty, a to z $0,236 \pm 0,021$ na $0,180 \pm 0,040$. Zmenšení částic a zvýšení homogenity bylo nejspíše zapříčiněné zráním koloidních částic.

Tabulka 2: Měřené vlastnosti koloidů po 6 měsících

Koloid	Prostředí při měření	Průměrná velikost částic [nm]	σ [nm]	Index polydisperzity	σ [nm]
PANI	HCl	292,0	12,0	0,240	0,020
PPy	HCl	115,0	5,0	0,180	0,040

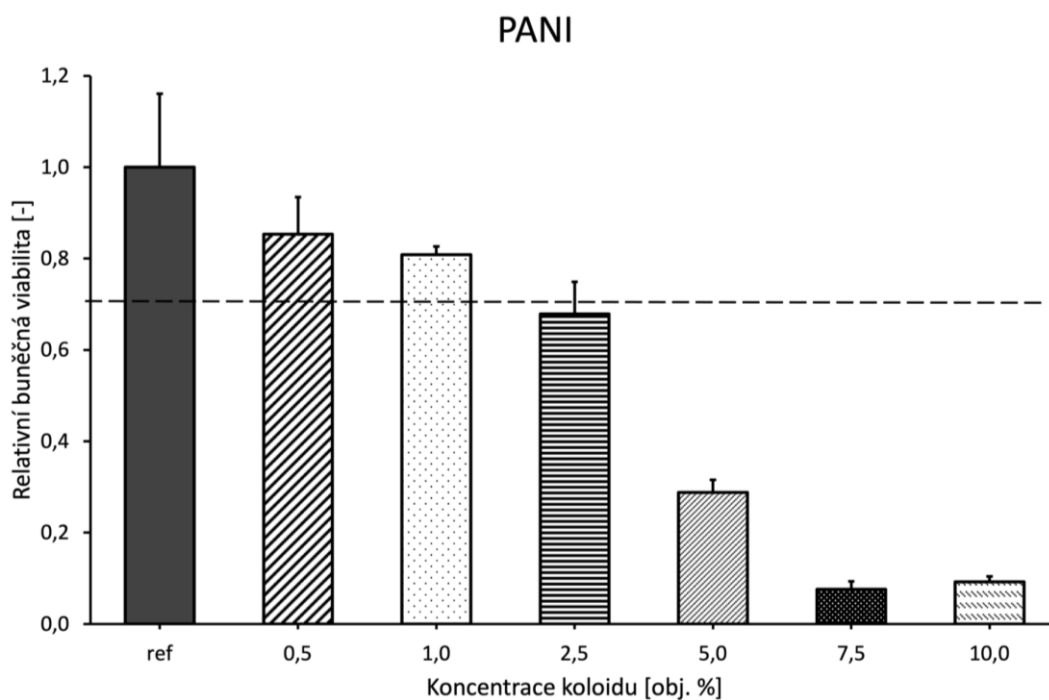
Navzdory drobným změnám ve velikosti částic nebo indexu polydisperzity pro oba vzorky lze vzhledem k hodnotám konstatovat, že oba koloidy byly jak ve fyziologickém prostředí, tak v čase stabilní.

4.2 Test cytotoxicity

Pro všechny materiály, které mají přijít do kontaktu s biologickým prostředím je důležitá jejich biokompatibilita. Základním ukazatelem biokompatibility je cytotoxicita materiálu. Vzhledem k zamýšlenému využití koloidů je tedy nutné ověřit jejich cytotoxicitu a stanovit prahovou koncentraci, ve které budou koloidní disperze využívány pro další testování.

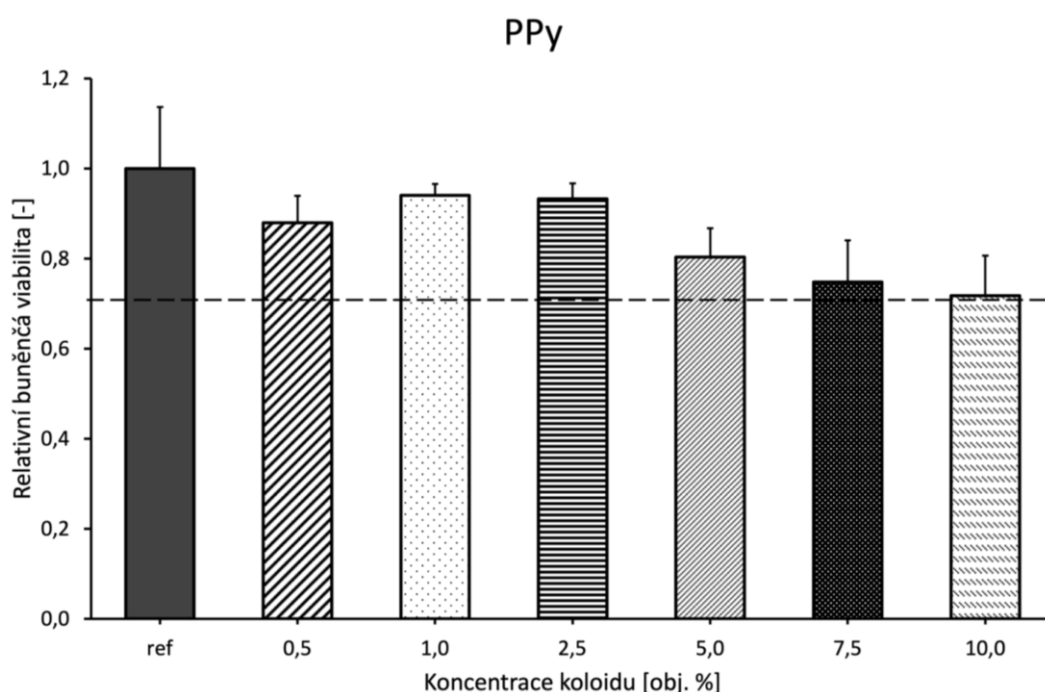
Koloidy byly testovány v rozmezí koncentrací 0,5–10 obj. %. Buněčná linie vybraná pro testování byla BALB/c 3T3, tedy linie doporučená normou OECD č. 432 pro testování fototoxicity. Důvodem zjištění cytotoxicity koloidů bylo tedy určení necytotoxické koncentrace vhodné pro použití v následujícím testování fototoxicity esenciálních olejů. Podle české technické normy ČSN ISO 10993-5: Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro* jako necytotoxickou koncentrací látky lze považovat takovou, která nesníží relativní buněčnou viabilitu pod hodnotu 0,7 [89].

Nejprve proběhlo testování cytotoxicity koloidního PANI. Na obrázku 12 lze vidět, že koncentrace koloidu 0,5 a 1 obj. % nesnížily relativní buněčnou životaschopnost pod hodnotu 0,7, tudíž nejsou považovány za cytotoxické. Koncentrace 2,5 obj. % leží na hranici cytotoxicity, tudíž je možné ji považovat za potenciálně cytotoxickou, a proto nebezpečnou pro zamýšlené aplikace. Naopak, použité koncentrace 5–10 obj. % způsobily výrazné snížení relativní buněčné viability, a to až pod hodnoty 0,4, tím pádem jsou považovány pro danou buněčnou linii za cytotoxické.



Obrázek 12: Graf závislosti relativní buněčné viability na koncentraci koloidního PANI

Jako druhý byl testován koloidní PPy. Graficky jsou výsledky testování zobrazeny na obrázku 13. Z výsledků lze vidět, že ani jedna z testovaných koncentrací nevykazuje cytotoxicitu. Koncentrace koloidu 0,5–2,5 obj. % dokonce dosahují relativní buněčné životaschopnosti vyšší než 90 %. I přes to, že ani jedna z testovaných koncentrací nedosahuje cytotoxického efektu, u koncentrace 5 obj. % a více buněčná životaschopnost hodně poklesla a výsledky jsou na hranici cytotoxického efektu. Z tohoto důvodu je bez další úpravy tento koloid možné používat až od koncentrace 2,5 obj. % a méně.



Obrázek 13: Graf závislosti relativní buněčné viability na koncentraci koloidního PPy

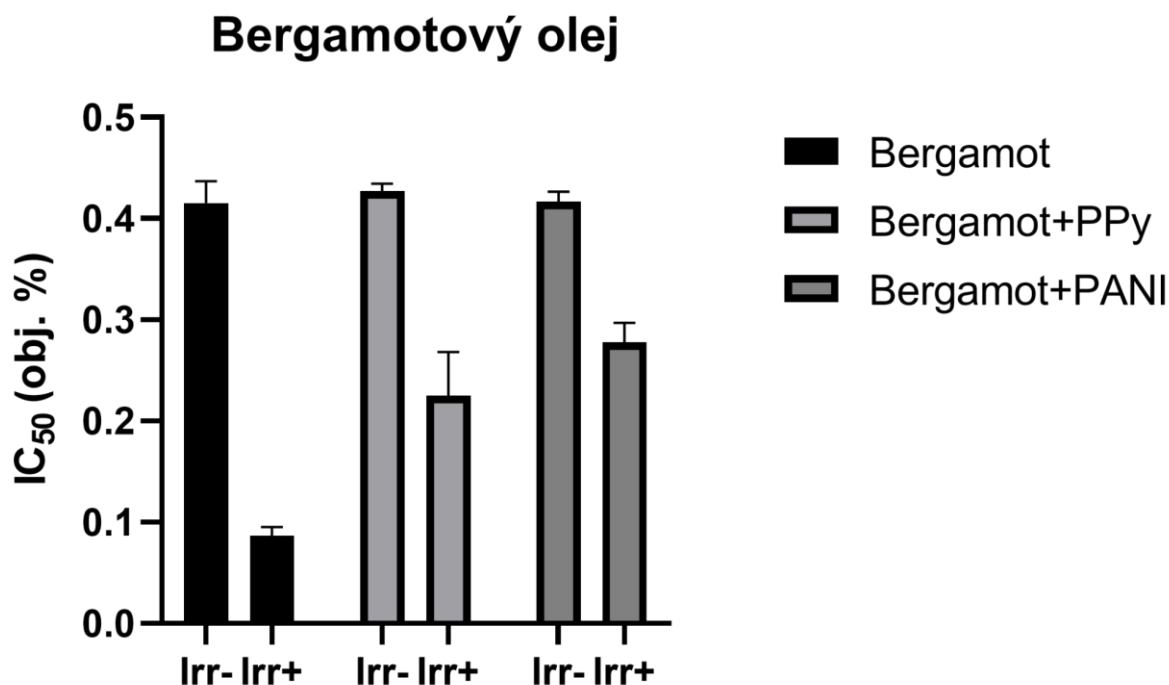
Po testování cytotoxicity koloidů byla určena nejvyšší společná necytotoxická koncentrace koloidního PANI a PPy jako 1 obj. %.

4.3 Test fototoxicity a účinku koloidů na fototoxicitu

Některé chemické látky mohou po ozáření slunečním zářením vykazovat fototoxicitu. Jako ochrana před fototoxicitou se často používají UV filtry, nicméně díky studiím často zpochybňující jejich bezpečnost je vhodné hledat alternativy ochrany. Fototoxické reakce mohou probíhat mnoha mechanismy a jedním z nich je vznik reaktivních forem kyslíku a jejich působení na části buněk, biomolekul apod. U koloidního PPy a PANI byla prokázána schopnost působit antioxidantně a ROS vylučovat. Z tohoto důvodu byla testována fototoxicita esenciálních olejů a vliv koloidů na jejich fototoxický účinek. Esenciální oleje byly testovány v koncentraci 0,01–1 obj. %. Koloidy byly do silic v PBS přidány

v necytotoxické koncentraci 1 obj. %, jak bylo zjištěno z předchozího testování jejich cytotoxicity.

Pro výpočet PIF faktoru bylo nejprve nutné určit IC_{50} ozářených a neozářených buněk. Jako první proběhlo testování bergamotového oleje, jehož $IC_{50}(-Irr)$ a $IC_{50}(+Irr)$ bez přídavku a s přídavkem koloidů lze vidět na obrázku 14. Už na první pohled je znatelné, že přidání koloidu nemělo vliv na hodnoty IC_{50} při neozářených buňkách a je tedy možné konstatovat, že vybraná necytotoxická koncentrace neměla vliv na buněčnou viabilitu. Při testování samotného bergamotového oleje docházelo při ozáření k poklesu IC_{50} až na hodnotu 0,09 obj. % oproti hodnotě 0,42 obj. % bez ozáření. Přidáním koloidního PPy rozdíl mezi $IC_{50}(Irr)$ a $IC_{50}(+Irr)$ byly pouze poloviční a to 0,43 obj. % oproti 0,23 obj. %. Koloidní PANI byl schopen zmenšit rozdíl mezi IC_{50} ozářených a neozářených buněk ještě více, a to 0,42 obj. % pro $IC_{50}(Irr-)$ a 0,28 obj.% pro $IC_{50}(Irr+)$. V obou případech byly koloidy schopné snížit rozdíl IC_{50} ozářených a neozářených buněk oproti samotnému bergamotovému oleji a už u těchto výsledků je patrný pozitivní vliv obou koloidů na fototoxický účinek olejů.

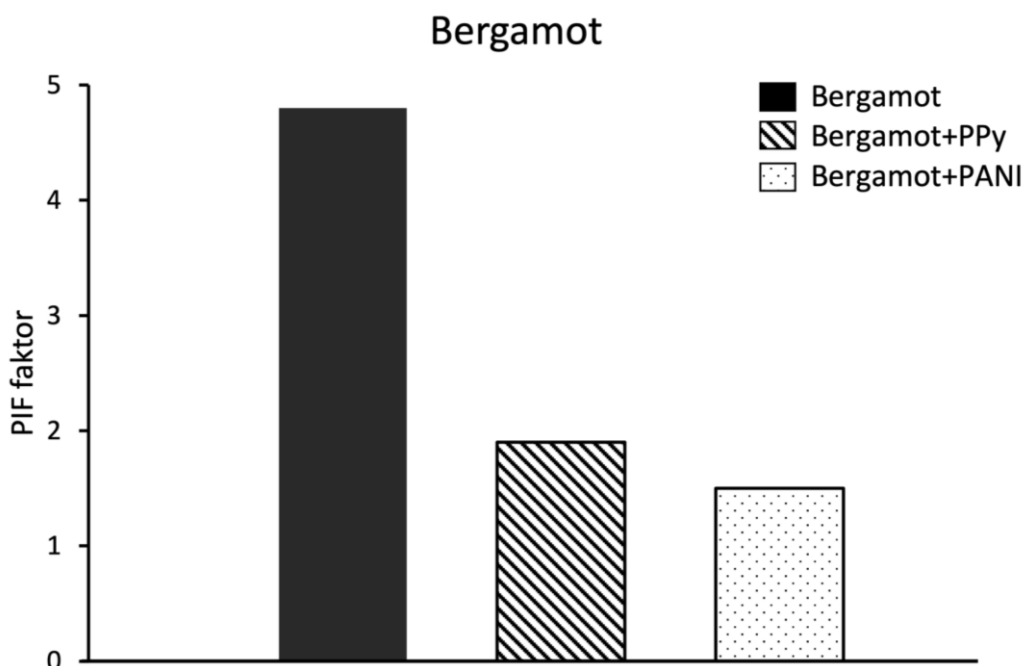


Obrázek 14: Poloviční maximální inhibiční koncentrace neozářených (Irr-) a ozářených (Irr+) buněk pro samotný bergamotový olej a bergamotový olej s koloidy

Jako ukazatel fototoxicity látky se využívá PIF faktor. Tento faktor vyjadřuje poměr IC_{50} buněk neozářených k IC_{50} buněk ozářených. V tabulce 3 je uveden PIF faktor získaný testováním fototoxicity bergamotového oleje a PIF faktor bergamotového oleje s přidáním koloidního PPy a koloidního PANI. Grafické znázornění je možné vidět na obrázku 15. Při testování samotného oleje dosahoval PIF faktor hodnoty 4,8, ve srovnání s PIF faktorem silice s přidáním PPy koloidem, u kterého došlo snížení až na hodnotu 1,9. Na snížení fototoxického účinku působil také koloidní PANI, a to snížením PIF faktoru na 1,5 oproti hodnotě 4,8 naměřené bez přídavku koloidu.

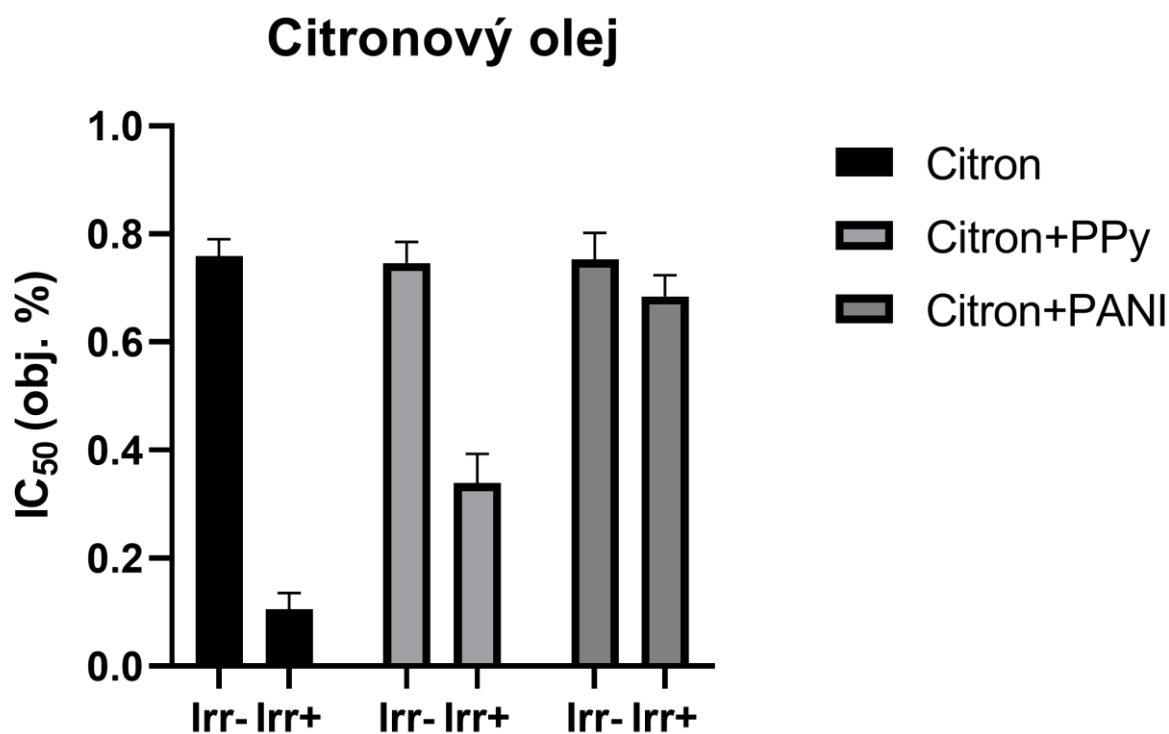
Tabulka 3: PIF faktory při testování fototoxicity bergamotového oleje

Vzorek	Bergamot	Bergamot + PPy	Bergamot + PANI
PIF faktor	4,8	1,9	1,5



Obrázek 15: Grafické znázornění PIF faktoru samotného bergamotového oleje a bergamotového oleje s přidáními koloidy

Jako druhý byl testovaný citronový olej. Na obrázku 16 lze vidět IC_{50} ozářených a neozářených buněk citronového oleje pro citronovou silici a silici s přidávanými koloidy. Stejně jako při testování oleje bergamotového, ani zde nedošlo k ovlivnění buněčné životaschopnosti přidávkem koloidů. V případě samotného oleje, ozáření UV lampou výrazně snížilo IC_{50} z hodnoty 0,76 obj. % až na hodnotu 0,12 obj. %. Při přidávku koloidního PPy byly hodnoty pro $IC_{50}(Irr-)$ naměřeny jako 0,75 obj. % a pro $IC_{50}(Irr+)$ jako 0,34 obj. %. Koloidní PANI snížil rozdíly mezi poloviční maximální inhibiční koncentrací ještě ve větší míře než PPy, a to jako 0,76 obj. % pro $IC_{50}(Irr-)$ a 0,69 obj. % pro $IC_{50}(Irr+)$. Oba koloidy byly opět schopné výrazným způsobem snížit rozdíly mezi $IC_{50}(Irr-)$ a $IC_{50}(Irr+)$ oproti citronovému oleji bez koloidů, a tudíž měly opět pozitivní vliv na snížení fototoxického efektu silice.

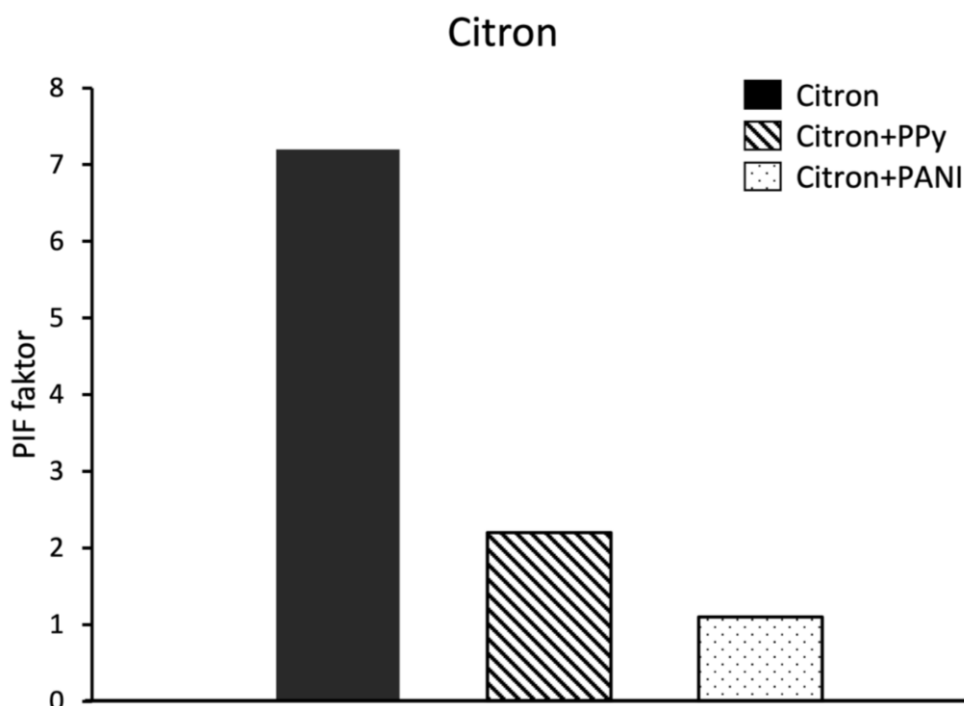


Obrázek 16: Poloviční maximální inhibiční koncentrace neozářených (Irr-) a ozářených (Irr+) buněk pro samotný citronový olej a citronový olej s koloidy

Znovu byl i v případě citronového oleje pro stanovení fototoxicity látky vypočítán PIF faktor, který je pro testované kombinace uveden v tabulce 4. Pro lepší znázornění jsou graficky výsledky zobrazeny na obrázku 17. Schopnost snižovat fototoxický účinek se projevila jak koloidního PPy, tak u koloidního PANI jak ukazuje tabulka 4. Hodnota PIF faktoru se při použití koloidního PPy snížila ze 7,2 na 2,2. Koloidní PANI byl schopen snížit PIF faktor až téměř sedmkrát a to ze 7,2 na 1,1.

Tabulka 4: PIF faktory při testování fototoxicity citronového oleje

Vzorek	Citron	Citron + PPy	Citron + PANI
PIF faktor	7,2	2,2	1,1



Obrázek 17: Grafické znázornění PIF faktoru samotného citronového oleje a citronového oleje s přidanými koloidy

Byl testován vliv koloidů na fototoxický účinek látek běžně využívaných v kosmetickém průmyslu. Konkrétně byly vybrány fototoxické citrusové esenciální oleje, a to bergamotový a citronový olej. Fototoxicita těchto látek je popsána již v dříve provedených studiích. Vystavení fototoxické látky slunečnímu záření, která aplikovaná topicky nebo systémově může způsobovat akutní nebo chronické negativní fototoxické projevy. Tyto projevy jsou popsány v kapitole 1.2. Jedním ze způsobů předcházení vzniku fototoxických reakcí

je využití UV filtrů. V současné době nicméně dochází k jejich omezování kvůli novým studiím o jejich biokompatibilitě, dopadu na životní prostředí apod. Z těchto důvodů je vhodné vyhledávat alternativní látky jako ochranu před fototoxickými reakcemi. Jedním z mechanismů vzniku fototoxicity je produkce reaktivních forem kyslíku. Bylo zjištěno že koloidy PANI a PPy mají schopnost ROS vychytávat, proto proběhlo testování vlivu těchto koloidů na fototoxický účinek.

Prvním testovaným olejem byl olej bergamotový. U tohoto oleje došlo ke snížení PIF faktoru z hodnoty 4,8 na hodnotu 1,9 díky přidání koloidního PPy. Podle normy OECD č. 432 došlo tedy ke snížení fototoxického účinku látky z „potencionálně fototoxické“ na „nefototoxickou“. V případě sledování fototoxického účinku v přítomnosti koloidního PANI došlo ke snížení PIF faktoru na hodnotu 1,5, což podle OECD normy také odpovídá nefototoxické látce.

Nutno podotknout, že hodnota PIF samotného oleje, stanová jako 4,8 je už na hranici s hodnotou, která je hodnocená jako fototoxická ($PIF > 5$), ale přesto se jedná o významný pokles ve fototoxickém účinku s použitím koloidních disperzí.

Schopnost připravených koloidů snížit fototoxický účinek se projevila i v případě druhé testované látky-citronového oleje. Koloidní PPy snížil hodnotu PIF faktoru ze 7,2 na 2,2. Při testování vlivu koloidního PANI na zmírnění fototoxického účinku byla stanovena hodnota PIF 1,1 a to z původních 7,2. Podle OECD normy se jedná o změnu fototoxické látky na látku nefototoxickou.

Výsledky testování ukazují na účinek koloidního PPy i PANI snižovat fototoxicitu bergamotového a citronového esenciálního oleje, a to pravděpodobně díky jejich schopnosti vychytávat ROS. Tyto výsledky souhlasí s poznatky předchozích provedených studií [82, 83].

ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce se zabývala fototoxicitou, jejím mechanismem a projevy. Protože fototoxické účinky může mít množství látek z farmaceutického, kosmetického nebo potravinářského průmyslu, bylo nutné vyvinout množství testů pro sledování fototoxické reakce. Další část se tedy věnuje testování fototoxicity a konkrétními látkami, které fototoxicitu vykazují a využívají se v kosmetice. Jako ochrana před fototoxickými reakcemi slouží především UV filtry. Další kapitola tedy pojednává o UV filtrech a jejich možných negativních dopadech na organismus a životní prostředí. Během fototoxických reakcí může docházet k množství procesů od poškození buněk a jejich částí až po buněčnou smrt. Tohoto účinku využívá tzv. fotodynamická terapie, na kterou je zaměřena další část teorie. Součástí vzniku fototoxických reakcí je produkce reaktivních forem kyslíku, tudíž poslední kapitola teoretické části se zabývá oxidativním stresem. Konkrétně jsou popsány reaktivní formy kyslíku a jejich zdroje a důsledky na lidský organismus jak na molekulární úrovni, tak na úrovni celého organismu.

Kvůli současným rizikům spojeným s využíváním UV filtrů je na místě hledat vhodné alternativy ochrany před fototoxickými reakcemi. V předchozích studiích byla zjištěna schopnost polyanilinu a polypyrrolu vychytávat ROS a vykazovat antioxidační vlastnosti. Například monitorování generace reaktivních forem kyslíku při tzv. respiračním výbuchu neutrofilů ukázalo schopnost koloidního PANI vychytávat ROS, přičemž tento efekt byl koncentračně dependentní [82]. Kumar A. a Somik Banerjee zase ukázaly antioxidační schopnost polypyrrolových nanovláken při DPPH testu [83] (DPPH je detekční metoda antioxidantů založená na vychytávání radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu) [93]. Jelikož je produkce ROS součástí vzniku fototoxické reakce, v rámci praktické části proběhla příprava koloidů z těchto polymerů a testování jejich vlivu na fototoxický účinek vybraných látek.

Nejprve byl připraven koloidní PANI a PPy v přítomnosti PVP jako stabilizátoru. Dalším krokem bylo určení jejich materiálových charakteristik, jako je velikost částic a index polydisperzity. Měření proběhlo pomocí metody dynamického rozptylu světla, jednak standardně, po přípravě koloidních suspenzí, ale i 6 měsíců po přípravě koloidů z důvodu ověření časové stability připravených roztoků. Vzhledem k dalšímu zamýšlenému využití v biologických systémech, měření proběhlo i ve fyziologickém prostředí, a to kvůli ověření pH stability připravených vzorků. Při testování koloidního PANI byla velikost částic v čase a ve fyziologickém prostředí stabilní, ale homogenita se v čase mírně zhoršila. V případě

polypyrrolového koloidu došlo k mírnému zmenšení velikosti částic v čase i ve fyziologickém prostředí, a ke snížení indexu polydisperzity v čase, což bylo nejspíše zapříčiněné zráním koloidních částic. U obou koloidů bylo ale možné vzhledem k hodnotám říci, že i přes menší změny v jejich homogenitě a velikosti částic, koloidy zůstaly stabilní jak v čase, tak ve fyziologickém prostředí.

Jako další krok bylo nutné provést test cytotoxicity a zjištění necytotoxické koncentrace vhodné pro následující test fototoxicity. Jako společná necytotoxická koncentrace byla určena koncentrace 1 obj.% pro oba koloidy, tedy koncentrace, která nezpůsobovala snížení relativní viability buněk pod 0,7 podle normy ČSN ISO 10993-5.

Následně proběhlo testování fototoxicity a vlivu připravených koloidů na fototoxický účinek. Fototoxicita byla testovaná podle normy OECD č. 432 testu 3T3 NRU s určitými modifikacemi na buněčné linii BALB/c 3T3 klonu A31. Pro test byly vybrány fototoxické látky využívané v kosmetice, a to esenciální citrusové oleje, konkrétně olej bergamotový a citronový. Oleje byly testované ve fosfátovém pufru v koncentraci 0,01–1 obj. % bez a s přidanými koloidy. Pro každou testovanou kombinaci látek byla z výsledků měření stanovena hodnota IC_{50} , která určuje polovinu maximální inhibiční koncentrace. Podle normy OECD č. 432 byl následně z hodnoty IC_{50} spočítán tzv. fotoiritační faktor, který predikuje fototoxicitu testované látky. Čím vyšší je hodnota PIF faktoru, tím větší je fototoxický účinek chemikálie. Nejprve byl testovaný bergamotový olej. PIF faktor samotného bergamotového oleje dosahoval hodnoty 4,8. Po přidání PPy došlo ke snížení PIF faktoru na 1,9; v případě koloidního PANI PIF faktor klesl na hodnotu 1,5. Koloidy vykazovaly schopnost snížení fototoxicity i při testování citronového oleje. Koloidní PPy v tomto případě snižoval PIF faktor ze 7,2 na hodnotu 2,2. Účinek koloidního PANI se projevil snížením PIF faktoru ze 7,2 až na 1,1. Koloidní PANI a PPy tedy snižovaly fototoxický účinek jak bergamotového, tak citronového oleje, pravděpodobně díky vychytávání ROS, což odpovídá poznatkům z dříve provedených studií.

Je možné tedy konstatovat, že předpoklad využití polyanilinového a polypyrrolového koloidu jako preventivního prostředku před negativními dopady UV záření byl potvrzený. Samozřejmě pro další využití těchto látek v praxi je nutné provést důkladnější testování těchto látek metodami zmíněnými v teoretické části této práce. Také je nutné provést důslednější testování připravených materiálů z hlediska jejich bezpečnosti na organismus. Závěrem je ale možné říci, že připravené koloidní materiály by mohly být potenciálně využívány jako účinný prostředek v boji před fototoxickými reakcemi.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] IBUKI, Yuko a Tatsushi TOYOOKA, 2015. Evaluation of chemical phototoxicity, focusing on phosphorylated histone H2AX. *Journal of Radiation Research* [online]. **56**(2), 220-228 [cit. 2021-11-18]. Dostupné z: doi:10.1093/jrr/rru105
- [2] HINTON, Andrea N a Ari M GOLDMINZ, 2017. Feeling the Burn: Phototoxicity and Photoallergy. *Dermatologic clinics* [online]. **38**(1), 165-175 [cit. 2021-11-15]. ISSN 0733-8635. Dostupné z: doi: 10.1016/j.det.2019.08.010.
- [3] KIM, Kyuri, Hyeonji PARK a Kyung-Min LIM, 2015. Phototoxicity: Its Mechanism and Animal Alternative Test Methods. *Toxicological Research* [online]. **31**(2), 97-104 [cit. 2021-11-17]. ISSN 2234-2753. Dostupné z: doi: 10.5487/TR.2015.31.2.097
- [4] HOSSY, Bryan Husdon et al., 2017. Phototoxic assessment of a sunscreen formulation and its excipients: An in vivo and in vitro study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. **173**, 545-550 [cit. 2021-11-23]. ISSN 1011-1344. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.06.043
- [5] TAUFFENBERGER, Arnaud a Pierre J. MAGISTRETTI, 2021. Reactive Oxygen Species: Beyond Their Reactive Behavior. *Neurochemical Research* [online]. **46**(1), 77-87 [cit. 2022-04-23]. Dostupné z: doi:10.1007/s11064-020-03208-7
- [6] GASPAR, Lorena S et al., 2013. Skin phototoxicity of cosmetic formulations containing photounstable and photostable UV-filters and vitamin A palmitate. *Toxicology in Vitro* [online]. **27**(1), 418-425 [cit. 2021-11-17]. ISSN 0887-2333. Dostupné z: doi: 10.1016/j.tiv.2012.08.006
- [7] Ultraviolet radiation. *World Health Organization* [online]. WHO [cit. 2022-02-15]. Dostupné z: https://www.who.int/health-topics/ultraviolet-radiation#tab=tab_1
- [8] D'ORAZIO, John et al., 2013. UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **14**(6), 12222-12248 [cit. 2022-02-15]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms140612222

- [9] JAGER, T.L., A.E. COCKRELL a S.S. Du PLESSIS, 2017. Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species. AHMAD, Shamim I. *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment* [online]. 1. Springer, Cham, s. 15-23 [cit. 2021-12-19]. ISBN 978-3-319-56017-5. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_2
- [10] D., Mohania et al., 2017. Ultraviolet Radiations: Skin Defense-Damage Mechanism. SHAMIM, Ahmad I. *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment*. [online]. Springer, Cham, s. 71-87 [cit. 2022-02-15]. ISBN 978-3-319-56017-5. Dostupné z: https://link-springer-com.proxy.k.utb.cz/chapter/10.1007/978-3-319-56017-5_7#citeas
- [11] GLATZ, Martin a Günther F.L HOFBAUER, 2012. Phototoxic and Photoallergic Cutaneous Drug Reactions. *Adverse Cutaneous Drug Eruptions* [online]. Karger, s. 169-179 [cit. 2021-12-19]. ISBN 978-3-8055-9971-9. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=LkWiQYoZ00kC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_atb#v=onepage&q&f=false
- [12] HOFMANN, Georg Amun a Benedikt WEBER, 2021. Drug-induced photosensitivity: culprit drugs, potential mechanisms and clinical consequences. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* [online]. **19**(1), 19-29 [cit. 2021-11-23]. Dostupné z: [doi:10.1111/ddg.14314](https://doi.org/10.1111/ddg.14314)
- [13] KOWALSKA, Justyna et al., 2021. Drug-Induced Photosensitivity—From Light and Chemistry to Biological Reactions and Clinical Symptoms. *Pharmaceuticals* [online]. **14**(8) [cit. 2021-12-18]. ISSN 1424-8247. Dostupné z: [doi:10.3390/ph14080723](https://doi.org/10.3390/ph14080723)
- [14] KUTLUBAY, Zekayi et al., 2014. Photodermatoses, including phototoxic and photoallergic reactions (internal and external). *Clinics in Dermatology* [online]. **32**(1), 73-79 [cit. 2021-12-18]. ISSN 0738-081X. Dostupné z: [doi:10.1016/j.clindermatol.2013.05.027](https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.05.027)
- [15] GONÇALO, Margarida. Phototoxic and Photoallergic Reactions. JOHANSEN, Jean Duus. *Contact Dermatitis* [online]. Springer, s. 1-25 [cit. 2022-03-15]. ISBN 978-3642038266. Dostupné z: <http://rihuc.huc.min-saude.pt/bitstream/10400.4/1340/1/Phototoxic.pdf>

- [16] LOZZI, Flavia et al., 2020. Latest Evidence Regarding the Effects of Photosensitive Drugs on the Skin: Pathogenetic Mechanisms and Clinical Manifestations. *Pharmaceutics* [online]. **12**(11) [cit. 2022-01-17]. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics12111104
- [17] VIERA, Fátima Mendonça Jorge a José Eduardo Costa MARTINS, 2006. Porphyria cutanea tarda. *Anais Brasileiros de Dermatologia* [online]. **81**(6), 569-580 [cit. 2022-02-21]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/286333801_Porphyrina_cutanea_tarda
- [18] AGUIAR, Brandon et al., 2022. In Vitro Evaluation of the Photoreactivity and Phototoxicity of Natural Polyphenol Antioxidants. *Molecules* [online]. **27**(1) [cit. 2022-03-20]. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27010189
- [19] *Narižení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích*, 2009. In: Úřední věstník EU. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj>
- [20] UTKU TÜRK, Elif Gözde, Ayşe Tarbin JANNUZZI a Buket ALPERTUNGA, 2022. Determination of the Phototoxicity Potential of Commercially Available Tattoo Inks Using the 3T3-neutral Red Uptake Phototoxicity Test. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. **19**(1), 70-75 [cit. 2022-03-20]. Dostupné z: doi:10.4274/tjps.galenos.2021.86344
- [21] GASPAR, Lorena Rigo, Camila Martins KAWAKAMI a Carolina Gomes BENEVENUTO, 2017. Overview on the Current Status of Available Test Methods and Additional Promising Methods for Assessing UV-Induced Effects. *Alternatives for Dermal Toxicity Testing* [online]. Springer, s. 463-476 [cit. 2022-03-21]. ISBN 978-3-319-50353-0. Dostupné z: <https://doi-org.proxy.k.utb.cz/10.1007/978-3-319-50353-0>
- [22] CERIDONO, Mara et al., 2012. The 3T3 neutral red uptake phototoxicity test: Practical experience and implications for phototoxicity testing – The report of an ECVAM–EFPIA workshop. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. **63**(3), 480-488 [cit. 2022-03-21]. ISSN 0273-2300. Dostupné z: doi:10.1016/j.yrtph.2012.06.001

- [23] OECD. Test No 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. In: *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, [online]. [Paris]: OECD Publishing, 2019, [cit. 2022-03-20]. Dostupné z: doi:10.1787/9789264071162-en
- [24] BALB/3T3 clone A31, 2021. *ATCC* [online]. [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: <https://www.atcc.org/products/ccl-163>
- [25] OECD. Test No 498: In vitro Phototoxicity – Reconstructed Human Epidermis Phototoxicity test method. In: *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, [online]. [Paris]: OECD Publishing, 2021, [cit. 2022-03-22]. Dostupné z: doi:10.1787/7b2f9ea0-en
- [26] SHARMEEN, Jugreet B., 2021. Essential Oils as Natural Sources of Fragrance Compounds for Cosmetics and Cosmeceuticals. *Molecules* [online]. **26**(3) [cit. 2022-04-30]. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26030666
- [27] DILWORTH, L.L., C.K. RILEY a D.K.Stennet, 2017. Plant Constituents Carbohydrates, Oils, Resins, Balsams, and Plant Hormones. *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies* [online]. Academic Press, s. 61-68 [cit. 2022-03-15]. ISBN 978-0-12-802104-0. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802104-0.00005-6>
- [28] DUARTE, M.C.T., 2017. 1 Essential Oils and Their Characteristics 1. *Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications* [online]. Wiley-Blackwell, s. 1-15 [cit. 2022-03-15]. ISBN 978-1-119-14937-8. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781119149392>
- [29] MELOUGH, Melissa M., Eunyoung CHO a Ock K. CHUN, 2018. Furocoumarins: A review of biochemical activities, dietary sources and intake, and potential health risks. *Food and Chemical Toxicology* [online]. **113**, 99-107 [cit. 2022-02-19]. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2018.01.030
- [30] KREIDL, Macro et al., 2020. Determination of phototoxic furanocoumarins in natural cosmetics using SPE with LC-MS. *Analitica Chimica Acta* [online]. **1101**, 2011-221 [cit. 2022-02-20]. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2019.12.015

- [31] BRUNI, Renato et al., 2019. Botanical Sources, Chemistry, Analysis, and Biological Activity of Furanocoumarins of Pharmaceutical Interest. *Molecules* [online]. **24**(11) [cit. 2022-02-20]. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24112163
- [32] KEJLOVÁ, Kristina et al., 2010. Phototoxicity of essential oils intended for cosmetic use. *Toxicology in Vitro* [online]. **24**(8), 2084-2089 [cit. 2022-02-20]. ISSN 0887-2333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2010.07.025
- [33] KEJLOVÁ, Kristina et al., 2007. Phototoxicity of bergamot oil assessed by in vitro techniques in combination with human patch tests. *Toxicology in Vitro* [online]. **21**(7), 1289-1303 [cit. 2022-02-21]. ISSN 0887-2333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2007.05.016
- [34] NAVARRA, Meichele et al., 2015. Citrus bergamia essential oil: from basic research to clinical application. *Frontiers in Pharmacology* [online]. **6**(36) [cit. 2022-02-21]. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2015.00036
- [35] BINDER, Svatopluk et al., 2016. Adverse phototoxic effect of essential plant oils on NIH 3T3 cell line after UV light exposure. *Central European Journal of Public Health* [online]. **24**(3), 234-240 [cit. 2022-02-22]. Dostupné z: doi:10.21101/cejph.a4354
- [36] NATHALIE, Dijoux et al., 2006. Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay. *Toxicology in Vitro* [online]. **20**(4), 480-489 [cit. 2022-02-22]. ISSN 0887-2333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2005.08.018
- [37] RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ Alena et al., 2016. Phototoxic potential of silymarin and its bioactive components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*[online]. **156**, 61-68 [cit. 2022-02-24]. ISSN 1011-1344. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.01.011
- [38] FIDRUS, Eszter et al., 2019. Silymarin: Friend or Foe of UV Exposed Keratinocytes? *Molecules* [online]. **24**(9) [cit. 2022-02-24]. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24091652

- [39] NAPOLI, Edoardo et al., 2018. Phytochemical profiles, phototoxic and antioxidant properties of eleven *Hypericum* species – A comparative study. *Phytochemistry*[online]. **152**, 162-173 [cit. 2022-02-26]. ISSN 0031-9422. Dostupné z: doi:10.1016/j.phytochem.2018.05.003
- [40] DE MIRANDA, L.L.R.. et al., 2021. UV-filter pollution: current concerns and future prospects. *Environmental Monitoring Assessment* [online]. **193**(12) [cit. 2022-02-23]. Dostupné z: doi:10.1007/s10661-021-09626-6
- [41] HUANG, Yanran et al., 2021. Risks of organic UV filters: a review of environmental and human health concern studies. *Science of The Total Environment* [online]. **775** [cit. 2022-05-08]. ISSN 0147-6513. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142486
- [42] EGAMBARAM, Orielia P., Sreejarani K. PILLAI a Suprakas S. RAY, 2019. Materials Science Challenges in Skin UV Protection: A Review. *Photochemistry and Photobiology* [online]. **96**(4), 779-797 [cit. 2022-02-23]. Dostupné z: doi:10.1111/php.13208
- [43] JESUS, Ana et al., 2022. UV Filters: Challenges and Prospects: Review. *Pharmaceuticals*[online]. **15** [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: doi:10.3390/ph15030263
- [44] WANG, Jiaying et al., 2016. Recent Advances on Endocrine Disrupting Effects of UV Filters. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. **13**(8) [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph13080782
- [45] BILAL, Muhammad, Shahid MEHMOOD a Hafiz M.N. IQBAL, 2020. The Beast of Beauty: Environmental and Health Concerns of Toxic Components in Cosmetics. *Cosmetics*[online]. **7**(1) [cit. 2022-05-08]. Dostupné z: doi:10.3390/cosmetics7010013
- [46] KWIATKOWSKI, Stanisław et al., 2018. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. **106**, 1098-1107 [cit. 2022-03-16]. ISSN 0753-3322. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2018.07.049

- [47] ALGORRI, José Francisco et al., 2021. Photodynamic Therapy: A Compendium of Latest Reviews. *Cancers* [online]. **13**(17) [cit. 2022-03-16]. Dostupné z: doi:10.3390/cancers13174447
- [48] KIM, Michele M. a Arash DARAFSHEH, 2020. Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology* [online]. **96**(2), 280-294 [cit. 2022-03-17]. Dostupné z: doi:10.1111/php.13219
- [49] CHILAKAMARTHI, Ushasri a Lingamallu GIRIBABU, 2017. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *The Chemical Record* [online]. **17**(8), 775-802 [cit. 2022-03-17]. Dostupné z: doi:10.1002/tcr.201600121
- [50] GUNAYDIN, Gurcan, M.Emre GEDIK a Seylan AYAN, 2021. Photodynamic Therapy for the Treatment and Diagnosis of Cancer. *Frontiers in Chemistry* [online]. **9** [cit. 2022-03-16]. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2021.686303
- [51] ZHANG, Juan, 2018. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B* [online]. **8**(2), 137-146 [cit. 2022-03-16]. ISSN 2211-3835. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsb.2017.09.003
- [52] MFOUO-TYNGA, Ivan S.et al., 2021. Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*[online]. **34** [cit. 2022-03-16]. ISSN 1572-1000. Dostupné z: doi:10.1016/j.pdpdt.2020.102091
- [53] AL-DALAEN, Said M. a Aiman I AL-QTAITAT. Review article: Oxidative stress versus antioxidants. *American Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. **2**(5), 60-71 [cit. 2021-8-16]. ISSN 2328-5893. Dostupné z: doi:10.11648/j.bio.20140205.11
- [54] CHECA, Javier a Josep M. ARAN, 2020. Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *Journal of Inflammation Research* [online]. **13**, 1057-1073 [cit. 2022-03-14]. Dostupné z: doi:10.2147/JIR.S275595

- [55] PIZZINO, Gabriele et al., 2017. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. **2017** [cit. 2021-9-9]. Dostupné z: doi:10.1155/2017/8416763
- [56] MALTEPE, Emin a Ola Didrik SAUGSTAT, 2009. Oxygen in Health and Disease: Regulation of Oxygen Homeostasis—Clinical Implications. *Pediatric Research* [online]. **65**, 121-127 [cit. 2021-09-09]. Dostupné z: doi:10.1203/PDR.0b013e31818fc83f
- [57] BURTON, Graham J. a Eric JAUNIAUX, 2011. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*[online]. **25**(3), 287-299 [cit. 2021-9-9]. ISSN 1521-6934. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016
- [58] SIES, Helmut a Dean P JONES, 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **21**(7), 363-383 [cit. 2021-9-9]. Dostupné z: doi:10.1038/s41580-020-0230-3
- [59] FABRICE, Collin, 2019. Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **20**(10) [cit. 2021-09-09]. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20102407
- [60] LOBO, Vijaya et al., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* [online]. **4**(8), 118-126 [cit. 2021-09-09]. Dostupné z: doi:10.4103/0973-7847.70902.
- [61] OZCAN, Ayla a Metin OGUN, 2015. Biochemistry of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress* [online]. InTech, s. 37-64 [cit. 2021-10-22]. ISBN 978-953-51-2200-5. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/chapters/48975>
- [62] LI, Jie et al., 2020. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death & Disease volume* [online]. **11**(2) [cit. 2021-09-09]. ISSN 2041-4889. Dostupné z: doi:10.1038/s41419-020-2298-2

- [63] AMSTRONG, Donald, 2016. Introduction to free radicals, inflammation, and recycling. *Oxidative Stress and Antioxidant Protection: The Science of Free Radical Biology and Disease* [online]. Wiley, s. 1-10 [cit. 2021-11-17]. ISBN 9781118832431. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118832431.ch1>
- [64] SHARIFI-RAD, Mehdi et al., 2020. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology* [online]. **11** [cit. 2021-09-09]. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2020.00694
- [65] KRUMOVA, Katerina a Gonzalo COSA, 2016. Overview of Reactive Oxygen Species. *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences* [online]. Royal Society of Chemistry, s. 1-21 [cit. 2021-09-19]. ISBN 978-1-78262-220-8. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/9781782622208-00001>
- [66] YAN, Liang-Jun et al., 2014. Protein Redox Modification as a Cellular Defense Mechanism against Tissue Ischemic Injury. *Oxidative Medicine Medicine and Cellular Longevity* [online]. [cit. 2021-12-15]. Dostupné z: doi:10.1155/2014/343154
- [67] AYALA, Antonio, Mario F. MUÑOZ a Sandro ARGÜELLES, 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. [cit. 2021-12-15]. Dostupné z: doi:10.1155/2014/360438
- [68] SU, Lian-Ju et al., 2019. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. [cit. 2021-10-22]. Dostupné z: doi:10.1155/2019/5080843
- [69] JUAN, Celia Andrés, 2021. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(9) [cit. 2021-10-22]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22094642

- [70] FORMAN, Henry J. a Hongquiao ZHANG, 2021. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. **20**(9), 689-709 [cit. 2021-9-21]. ISSN 1474-1784. Dostupné z: doi:10.1038/s41573-021-00233-1
- [71] MONTEZANO, Augusto C. a Rhian M. TOUYZ, 2014. Reactive Oxygen Species, Vascular Noxs, and Hypertension: Focus on Translational and Clinical Research. *Antioxidants and Redox Signaling* [online]. **20**(1), 164-182 [cit. 2021-9-21]. Dostupné z: doi:0.1089/ars.2013.5302
- [72] RODRIGO, Ramón, Jaime GONZÁLEZ a Fabio PAOLETTO. The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. *Hypertension Research* [online]. **34**(4), 431-440 [cit. 2021-09-21]. ISSN 1348-4214. Dostupné z: doi:10.1038/hr.2010.264
- [73] HAYES, John D., Albena T. DINKOVA-KOSTOVA a Kenneth D. TEN, 2021. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell* [online]. **38**(2), 167-197 [cit. 2021-09-22]. ISSN 1535-6108. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccell.2020.06.001.
- [74] CHAN, Hiang Ping et.al., 2009. Elevated Levels of Oxidative Stress Markers in Exhaled Breath Condensate. *Journal of Thoracic Oncology* [online]. **4**(2), 172-178 [cit. 2021-9-22]. Dostupné z: doi:10.1097/JTO.0b013e3181949eb9
- [75] MISRANI, Afzal, Sidra TABASSUM a Li YANG, 2021. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* [online]. **13** [cit. 2021-09-06]. Dostupné z: doi:10.3389/fnagi.2021.617588
- [76] DINARVAND, Mohsen Hemmati et al., 2019. Oxidative stress and Parkinson's disease: conflict of oxidant-antioxidant systems. *Neuroscience Letters* [online]. **709**(18) [cit. 2021-09-24]. ISSN 0304-3940. Dostupné z: doi:10.1016/j.neulet.2019.134296.
- [77] LATIF, Reem Abdul et. al., 2021. Natural antioxidants in the management of Parkinson's disease: Review of evidence from cell line and animal models. *Journal of Integrative Medicine* [online]. **19**(4), 300-310 [cit. 2021-9-24]. ISSN 2095-4964. Dostupné z: doi:10.1016/j.joim.2021.03.007

- [78] ASMAT, Ullah, Khan ABAD a Khan ISMAIL, 2016. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal* [online]. **24**(5), 547-553 [cit. 2021-09-24]. ISSN 1319-0164. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsps.2015.03.013.
- [79] OGUNTIBEJU, Omoniyi Oluwafemi, 2019. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *International Journal of Pathophysiology and Pharmacology* [online]. **11**(3), 46-63 [cit. 2022-03-14]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31333808/>
- [80] GU, Yanpei et al., 2020. Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. *Ageing Research Reviews* [online]. **59** [cit. 2022-03-14]. ISSN 1568-1637. Dostupné z: doi:10.1016/j.arr.2020.101036
- [81] TSUCHIDA, K a M KOBAYASHI, 2020. Oxidative stress in human facial skin observed by ultraweak photon emission imaging and its correlation with biophysical properties of skin. *Scientific Reports* [online]. **10**, [cit. 2021-9-6]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-66723-1
- [82] KUČEKOVÁ, Zdenka et al., 2014. Colloidal polyaniline dispersions: Antibacterial activity, cytotoxicity and neutrophil oxidative burst. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. **116**, 411-417 [cit. 2022-05-11]. ISSN 0927-7765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2014.01.027
- [83] KUMAR, A. a Somik BANERJEE, 2011. Size Dependent Antioxidant Activity of Polypyrrole Nanofibers. *AIP Conference Proceedings* [online]. **1349**, 399-400 [cit. 2022-05-03]. Dostupné z: doi:10.1063/1.3605903
- [84] STEJSKAL, Jaroslav a Irina SAPURINA, 2005. POLYANILINE: THIN FILMS AND COLLOIDAL DISPERSIONS: IUPAC Technical Report. *Pure and Applied Chemistry* [online]. **77**(5), 815-826 [cit. 2022-05-04]. Dostupné z: doi:10.1351/pac200577050815
- [85] BURNETT, Christina L., 2019. Safety Assessment of Citrus-Derived Peel Oils as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology* [online]. **38**(2), 33-59 [cit. 2022-05-10]. Dostupné z: doi:10.1177/1091581819862504

- [86] KADDU, Steven, Helmut KERL a Peter WOLF, 2001. Accidental bullous phototoxic reactions to bergamot aromatherapy oil. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. **45**(3), 458-461 [cit. 2022-05-10]. ISSN 0190-9622. Dostupné z: doi:10.1067/mjd.2001.116226
- [87] GHASEMI, Mahshid et al., 2021. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Science* [online]. **22**(23) [cit. 2022-05-10]. Dostupné z: doi:10.3390/ijms222312827
- [88] TWARUŽEK, Magdalena et al., 2018. The use of in vitro assays for the assessment of cytotoxicity on the example of MTT test. *Folia Biologica et Oecologica* [online]. **14**, 23-32 [cit. 2022-05-10]. Dostupné z: doi:10.1515/fobio-2017-0006
- [89] ČSN EN ISO 10993-5: *Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu in vitro*, 2010. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 40 s., Třídící znak 855220.
- [90] TEODORESCU, Mirela a Maria BERCEA, 2015. Poly(vinylpyrrolidone) – A Versatile Polymer for Biomedical and Beyond Medical Applications. *Polymer-Plastics Technology and Engineering* [online]. **54**(9), 923-943 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: doi:10.1080/03602559.2014.979506
- [91] PATEL, Samir G., 2018. Solid Lipid Nanoparticles for Targeted Brain Drug Delivery. *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Brain Tumors* [online]. Academic Press, s. 191-244 [cit. 2022-05-09]. ISBN 9780128122181. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812218-1.00008-7>
- [92] DANAEI, M., 2018. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* [online]. **10**(2) [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics10020057
- [93] YANG, Bin, R.P. SINGH a Sagar B. KEDARE, 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Molecules* [online]. **48**(4), 412-422 [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-011-0251-1

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

UV	Ultrafialové (Ultraviolet)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (Reactive oxygen species)
DNA	Deoxyrybonukleová kyselina
UVA	Ultrafialové A (Ultraviolet A)
UVB	Ultrafialové B (Ultraviolet B)
UVC	Ultrafialové C (Ultraviolet C)
Da	Dalton
ES	Evropská společenství
EU	Evropská Unie
UV/VIS	Ultrafialové-viditelné (Ultraviolet-visible)
3T3 NRU	Test fototoxicity příjmu barviva neutrální červeně (3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Test)
ECVAM	Evropské centrum pro validaci alternativních metod (European Centre for the Validation of Alternative Methods)
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (Organisation for Economic Co-operation and Development)
RhE	Testová metoda pro <i>in vitro</i> fototoxicitu na rekonstruované lidské <i>epidermis</i>
IFRA	Mezinárodní asociace parfémů (International Fragrance Association)
ZnO	Oxid zinečnatý
TiO ₂	Oxid titaničitý
PTD	Fotodynamická terapie (Photodynamic therapy)
PS	Fotosenzitizátor
LDL	Lipoproteiny s nízkou hustotou (Low density lipoproteins)
Hp	Hematoporfyrin
HpD	Derivát hematoporfyrinu

RNA	Ribonukleová kyselina
NADPH	Redukovaná forma nikotinaminadenin dinukleotidu
H ₂ O ₂	Peroxid vodíku
ROOH	Hydroperoxid
¹ O ₂	Singletový molekulární kyslík
R—C=O	Elektronově excitovaný karbonyl
O ₃	Ozon
HClO	Kyselina chlorná
HBrO	Kyselina bromná
PUFA	Polynenasycená mastná kyselina (Polyunsaturated fatty acid)
O ₂ ⁻	Superoxidový radikál
•OH	Hydroxylový radikál
ROO•	Peroxylový radikál
RO•	Alkoxylový radikál
HO ₂ •	Perhydroxylový radikál
NO	Oxid dusnatý
Fe ²⁺	Železnatý kationt
RTG	Rentgenové
L•	Lipidový radikál
LOO•	Peroxylový radikál
LOOH	Hydroperoxid
KVO	Kardiovaskulární onemocnění
NOX	NADPH oxidáza
PANI	Polyanilin
PPy	Polypyrrol
PVP	Polyvinylpyrrolidon

AH	Anilin hydrochlorid
APS	Amoniumpersulfát
FeCl ₃	Chlorid železitý
HCl	Kyselina chlorovodíková
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difeynyltetrazolium bromid
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitnou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
Obj. %	Objemové procento
U m/L	Jednotky na mililitr (Unit per mililitre)
mM	Milimolární
CO ₂	Oxid uhličitý
Rpm	Otáček za minutu (Revolution per minute)
PBS	Fosfátotový pufr (Phosphate Buffered Saline)
OD _{570e}	Střední hodnota změřené absorbance vzorku
OD _{570b}	Střední hodnota změřené absorbance reference
Irr-	Bez přítomnosti UV záření
Irr+	V přítomnosti UV záření
IC ₅₀ (-Irr)	Maximální poloviční inhibiční koncentrace bez ozáření
IC ₅₀ (+Irr)	Maximální poloviční inhibiční koncentrace s ozářením
PDI	Index polydisperzity
σ	Směrodatná odchylka
DPPH?	2,2-difeny-1-pikrylhydrazyl

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma fototoxické reakce	15
Obrázek 2: Pseudoporfirie	17
Obrázek 3: Schéma strategie testování fototoxicity	19
Obrázek 4: Strukturální vzorec lineárního (vlevo) a angulárního (vpravo) typu izomeru furokumarinů	20
Obrázek 5: Strukturální vzorec UV filtrů typu benzofenon	23
Obrázek 6: Mechanismus peroxidace lipidů.....	31
Obrázek 7: Koloidní PANI (vlevo) a PPy (vpravo).....	36
Obrázek 8: Přeměna ve vodě rozpustného MTT na ve vodě nerozpustný formazan	39
Obrázek 9: Graf závislosti absorpance na relativní buněčné viabilitě při testu MTT, při vlnové délce 570 nm	39
Obrázek 10: Ozařování destičky UV lampou	41
Obrázek 11: Predikční model fototoxicity podle fotoiritačního faktoru.....	42
Obrázek 12: Graf závislosti relativní buněčné viability na koncentraci koloidního PANI .	46
Obrázek 13: Graf závislosti relativní buněčné viability na koncentraci koloidního PPy	47
Obrázek 14: Poloviční maximální inhibiční koncentrace neozářených (Irr-) a ozářených (Irr+) buněk pro samotný bergamotový olej a bergamotový olej s koloidy	48
Obrázek 15: Grafické znázornění PIF faktoru samotného bergamotového oleje a bergamotového oleje s přidanými koloidy	49
Obrázek 16: Poloviční maximální inhibiční koncentrace neozářených (Irr-) a ozářených (Irr+) buněk pro samotný citronový olej a citronový olej s koloidy.....	50
Obrázek 15: Grafické znázornění PIF faktoru samotného citronového oleje a citronového oleje s přidanými koloidy	51

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Měřené vlastnosti koloidů ihned po přípravě	44
Tabulka 2: Měřené vlastnosti koloidů po 6 měsících	44
Tabulka 3: PIF při testování fototoxicity bergamotového oleje	49
Tabulka 4: PIF při testování fototoxicity citronového oleje	51