

Fototoxicita esenciálních olejů

Klaudie Mátéová

Bakalářská práce
2019

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kludie Mátéová**
Osobní číslo: **T16355**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Fototoxicita esenciálních olejů**

Zásady pro vypracování:

Studentka vypracuje teoretickou práci se zaměřením na současný stav znalostí v oblasti fototoxicity kosmeticky aktivních látek s důrazem na esenciální oleje. Zaměří se především na chemickou strukturu esenciálních olejů a vztah chemické struktury k jejich biologické aktivitě. Popíše možnosti využití v kosmetických přípravcích. V druhé části práce se zaměří na pochopení podstaty fototoxického jevu a fotosensibilizace kůže. Popíše metody využívané k stanovení fototoxicity a porovná je mezi sebou. Popíše stav znalosti o fototoxicitě vybraných látek.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

DRAELOS, Zoe Kececioglu. Cosmetic dermatology: products and procedures. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell, 2010, xvi, 532 s. DOI: 978-1-4443-1765-7.
BASER, K. H. C. a Gerhard BUCHBAUER. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. Boca Raton: CRC Press, c2010, 1 online zdroj (xii, 975 s.). ISBN 978-1-4200-6316-5. OECD (2004), Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.**
Centrum polymerních materiálů

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **20. května 2019**

Ve Zlíně dne 12. března 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

Příjmení a jméno: Mátéová Klaudiva.....

Obor: TVT KD.....

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlázení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ 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, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užíje-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ 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, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce se v první části zaměřuje na esenciální oleje. Zabývá se zejména jejich chemickým složením, získáváním, izolací a v neposlední řadě jejich biologickou aktivitou. Dále je zde uvedeno možné využití esenciálních olejů v potravinářském a kosmetickém průmyslu. Druhá část práce se věnuje podstatě fototoxicity se zaměřením na průběh a mechanismus reakce. Blíže jsou popsány i metody využívané ke stanovení fototoxicity. Pozornost je také věnována anatomii kůže a problematice slunečního záření. Poslední kapitola pojednává o fototoxicitě esenciálních olejů v závislosti na obsahu furokumarinů.

Klíčová slova: esenciální oleje, sluneční záření, fotosenzibilizace, fototoxicita

ABSTRACT

The first part of the bachelor thesis focuses on essential oils. In particular, it describes their chemical composition, acquisition, isolation and finally their biological activity. This part is followed by description of the possible use of essential oils in the food and cosmetic industry. The second part of the thesis is devoted to phenomena of phototoxicity with special attention paid to the related physiological processes and reaction mechanism. The methods used for determination of phototoxicity are described in more detail. Attention is also paid to the anatomy of the skin and the issue of solar radiation. The last chapter describes the phototoxicity of essential oils depending on the amount of furocoumarins.

Keywords: essential oils, solar radiation, photosensibilisation, phototoxicity

Mé poděkování patří především doc. Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, čas, trpělivost a shovívavost při dokončení této bakalářské práce. Touto cestou bych ráda poděkovala také RNDr. Ivě Čermákové, Ph.D. za prvotní vedení práce. Dále patří můj velký dík rodině, příteli Filipovi a kamarádce Alžbětě za nesmírnou podporu, kterou mi poskytovali v průběhu psaní této bakalářské práce.

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

OBSAH

1	ÚVOD	9
1	TEORETICKÁ ČÁST	10
1	CHARAKTERISTIKA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	11
2	CHEMICKÉ SLOŽENÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	12
2.1	TERPENY	12
2.1.1	Hemiterpeny	13
2.1.2	Monoterpeny	13
2.1.3	Seskviterpeny	14
2.2	ŠIKIMÁTY	15
2.3	DOPROVODNÉ SLOŽKY ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	15
3	ZPŮSOBY ZÍSKÁVÁNÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	16
3.1	LISOVÁNÍ	16
3.2	DESTILACE	17
3.2.1.1	Destilace vodní parou	17
3.2.1.2	Hydrodestilace	17
3.3	EXTRAKCE	18
3.3.1.1	Superkritická fluidní extrakce (SFE)	18
3.3.1.2	Enfleuráž	19
4	BIOLOGICKÉ ÚČINKY ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	20
4.1	ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINKY	20
4.2	ANTIVIROVÉ ÚČINKY	21
4.3	ANTIOXIDAČNÍ ÚČINKY	22
5	VYUŽITÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	24
5.1	POTRAVINÁŘSKÝ PRŮMYSL	24
5.2	KOSMETICKÝ PRŮMYSL	25
6	ANATOMIE KŮŽE	26
6.1	POKOŽKA	26
6.2	ŠKÁRA	28
6.3	PODKOŽNÍ VAZIVO	28
7	SLUNEČNÍ ZÁŘENÍ	29
7.1	ULTRAFIALOVÉ ZÁŘENÍ	29
7.1.1	UVA	30
7.1.2	UVB	30
7.1.3	UVC	31
7.2	VIDITELNÉ ZÁŘENÍ	32
7.3	INFRAČERVENÉ ZÁŘENÍ	32
8	ÚČINKY UV ZÁŘENÍ NA ORGANISMUS	33
8.1	FOTOTOXICKÁ REAKCE	33
8.1.1	Mechanismus fototoxické reakce	34
8.1.1.1	Nepřímý mechanismus typu I	35

8.1.1.2	Nepřímý mechanismus typu II	35
8.2	FOTOALERGICKÁ REAKCE	36
8.3	FOTOGENOTOXICKÁ REAKCE	36
8.4	SOLÁRNÍ ERYTÉM	36
8.5	DALŠÍ ÚČINKY UV ZÁŘENÍ NA KŮŽI	37
9	METODY STANOVENÍ FOTOTOXICITY	38
9.1	ZKOUŠKA FOTOTOXICITY 3T3 NRU <i>IN VITRO</i>	39
9.1.1	Podstata zkušební metody	40
9.1.2	Popis metody	40
9.1.3	Interpretace výsledků	41
9.2	ZKOUŠKA FOTOTOXICITY VYUŽÍVAJÍCÍ 3D MODEL LIDSKÉ KŮŽE	42
9.2.1	Podstata zkoušky	42
9.3	ZKOUŠKA FOTOTOXICITY VYUŽÍVAJÍCÍ ČERVENÉ KRVINKY – FOTOHEMOLÝZA	43
9.4	ZKOUŠKA FOTOTOXICITY <i>IN VIVO</i>	44
9.4.1	Interpretace výsledků	45
10	FOTOTOXICITA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	46
10.1	MECHANISMUS PŮSOBNÍ FUROKUMARINŮ	47
10.2	ÚČINKY FUROKUMARINŮ NA ORGANISMUS	48
10.3	FOTOTOXICITA JEDNOTLIVÝCH FUROKUMARINŮ	49
10.3.1	Bergapten (5-methoxypsoralen)	49
	ZÁVĚR	50
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	52
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	62
	SEZNAM OBRÁZKŮ	63

ÚVOD

Esenciální oleje lze charakterizovat jako komplexní směsi molekul syntetizované v různých částech rostlin. Po chemické stránce nelze esenciální oleje jednoznačně definovat. Nicméně hlavní komponenty podléhají dělení do tří základních skupin, a to na terpeny, šikimáty a doprovodné složky esenciálních olejů. Chemická struktura esenciálních olejů úzce souvisí s jejich biologickou aktivitou. Velký potenciál mají zejména díky antimikrobiální aktivitě a slibné je také využití esenciálních olejů jako konzervačních látek v potravinářském a kosmetickém průmyslu. Z rostlinných materiálů se esenciální oleje izolují zejména lisováním, destilací a extrakcí, mezi kterou lze zařadit také enfleuráž.

Fotosenzibilizace je projevem negativního účinku ultrafialového záření na organismus. Světelná aktivace chromoforu indukuje chemické změny v jiné molekule, což vede po vystavení slunečnímu záření k vyvolání nežádoucí toxické kožní reakce. Na základě mechanismu poškození organismu se dělí na reakce fototoxické, fotoalergické a fotogenotoxické. V předložené bakalářské práci je kladen důraz zejména na fototoxicitu se zaměřením na průběh a mechanismus reakce. V závislosti na účincích ultrafialového záření na organismus je rozebrána anatomie kůže i problematika slunečního záření.

V této bakalářské práci je dále věnována pozornost fototoxicitě esenciálních olejů, zejména metodám, kterými lze fototoxický účinek stanovit. Jedná se o zkoušku fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*, zkoušku fototoxicity využívající 3D model lidské kůže, zkoušku fototoxicity využívající červené krvinky – fotohemolýzu a poslední zmíněnou zkoušku fototoxicity pomocí epikutánních testů, která se jako jediná v mé práci řadí mezi *in vivo* testovací metodu.

Potenciál vyvolat fototoxické účinky esenciálních olejů je připisován furokumarinům, jejichž mechanismus působení je podrobněji rozebrán v poslední kapitole této práce.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ

Francouzská agentura pro normalizaci: Agence Française de Normalization (AFNOR) uvádí následující definici (NF T 75–006): esenciální olej je produkt získaný z rostlinné suroviny procesem suché či parní destilace, anebo mechanickými postupy z epikarpu citrusových plodů, kdy je výsledný esenciální olej oddělen od vodné fáze fyzikálními metodami [1].

Esenciální oleje, známé také jako éterické oleje či silice, lze chápat jako těkavé sloučeniny, syntetizované přirozeně v různých částech živých organismů. Tyto organismy tvoří esenciální oleje pro vlastní obranu, signalizaci nebo jako součást svého sekundárního metabolismu. V rostlinách se esenciální oleje tvoří převážně v olejových buňkách, žláznatých trichomech či sekrečních kanálcích [2], [3]. Mezi klíčové charakteristiky esenciálních olejů patří jejich aromaticnost, lipofilita, kapalnost a především těkavost. Jsou to látky s hustotou obvykle nižší než voda, bezbarvé s možným nádechem do žluta, snadno oxidovatelné vystavením vzduchu, světlu či teplu a často obsahující biologicky aktivní složky [4], [5]. Podle toho, z jakých částí rostlinného materiálu, esenciální olej pochází, se mění jeho složení. Výchozí materiál pro izolaci tvoří celá rostlina, anebo pouze její jednotlivé části. Nejčastěji jsou oleje získávány z květů (růže, jasmín, pomerančové květy, šeřík), stonků (máta, levandule), semen (kardamom, koriandr, anýz, ibišek), listů (kafr), plodů (citrusy, jalovec) nebo dřeva (cedr, santal, skořice) [6], [7].

Kvalitu esenciálních olejů významně ovlivňuje způsob jejich získávání. Rozlišujeme tři hlavní procesy, mezi něž řadíme lisování, destilaci (vodní parou, hydrodestilaci) a extrakci (organickými rozpouštědly, superkritickým oxidem uhličitým, enflouráž) [6].

Po chemické stránce představují esenciální oleje různorodou skupinu látek, kdy zpravidla základ oleje tvoří dvě až tři majoritní složky, které jsou zastoupeny ve vysokých koncentracích. Ve stopovém množství lze pak nalézt různý počet neméně důležitých minoritních složek. Podle různých kritérií je možno tyto složky klasifikovat do několika tříd [8]. Tato bakalářská práce se zabývá rozdělením na terpeny, šikimáty a další doprovodné složky.

Esenciální oleje mají osvědčené průmyslové využití při výrobě parfémů a kosmetiky, především mýdel, krémů, šampónů a čistících prostředků. Zajímavým aspektem těchto olejů je také jejich potenciál jako terapeutická činidla v aromaterapii, či objevení alternativy nových léčiv na základě jejich biologických vlastností. Další významná aplikace je v potravinářském průmyslu, a to jak pro dochucení potravin, tak pro jejich konzervaci [9].

2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ

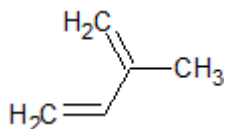
Esenciální oleje jsou komplexní směsi molekul obsahující více než 20 různých složek s nízkou molekulovou hmotností a ve velmi odlišných koncentracích. Mnohé z těchto molekul se nachází v nízkých koncentracích, zatímco jiné jsou hlavními složkami a mohou tak představovat až 70 % oleje [10].

Složky esenciálních olejů lze rozdělit do dvou, respektive tří, hlavních skupin. První, velmi významnou skupinou, jsou terpeny. Díky značné variabilitě v počtu izoprenových jednotek podléhají dalšímu dělení, převážně na hemiterpeny, nejvíce zastoupené monoterpeny a seskviterpeny. Druhou skupinu tvoří šikimáty. Poslední, neméně důležitou skupinou, jsou doprovodné složky esenciálních olejů. Mezi tyto komponenty lze zařadit neterpenoidní uhlovodíky, laktony, estery anebo sloučeniny obsahující dusík či síru [2], [6].

Chemické složení esenciálních olejů nelze v obecné rovině jednoznačně definovat, neboť je závislé na mnoha faktorech, které mohou ovlivňovat tuto různorodost. Jedná se především o klimatické podmínky, s tím související prostředí výskytu rostlin a v neposlední řadě způsob sklizně. Rozdílné chemické složení se dále odráží ve vlastnostech příslušných olejů [3].

2.1 Terpeny

Terpeny jsou jednou z nejrozmanitějších skupin základních složek esenciálních olejů. Nesou také název izoprenoidy, neboť jsou tvořeny přesmykem jedné či více izoprenových jednotek. Po chemické stránce lze tuto jednotku označit jako 2-methylbuta-1,3-dien (viz Obr. 1) [2]. Všechny chemické struktury v předložené bakalářské práci jsou vytvořeny v programu ChemSketch.



Obr. 1 Chemická struktura izoprenové jednotky

Terpeny je možno dále dělit na základě počtu uhlíků v molekule, tedy počtu izoprenových jednotek tvořících strukturu dané látky. Nejnižší počet izoprenových jednotek, a tedy nejmenší počet uhlíků mají hemiterpeny (C_5H_8). Ty jako menšinové složky obsahují pouze jednu

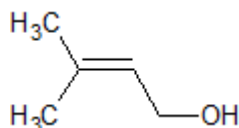
izoprenovou jednotku. Molekuly tvořené ze dvou izoprenových jednotek se nazývají monoterpeny a lze je charakterizovat přítomností deseti atomů uhlíku ($C_{10}H_{16}$). Seskviterpeny obsahující tři izoprenové jednotky se vyznačují přítomností patnácti atomů uhlíků ($C_{15}H_{24}$).

Do skupiny terpenů lze dále zařadit i těžší sloučeniny tvořené ze čtyř či šesti izoprenových jednotek, tedy diterpeny ($C_{20}H_{32}$) a triterpeny ($C_{30}H_{48}$). Obecně lze konstatovat, že pouze hemiterpeny, monoterpeny a seskviterpeny jsou natolik těkavé, aby byly hlavními složkami esenciálních olejů [2], [6].

Terpeny jsou odvozeny z alifatických prekurzorů, jako je geraniol pro tvorbu monoterpenů, farnesol pro seskviterpeny, dále pak geranylgeraniol pro diterpeny a skvalen pro triterpeny [2].

2.1.1 Hemiterpeny

Hemiterpeny tvoří minoritní složky esenciálních olejů. Patří mezi ně velké množství alkoholů, aldehydů, ketonů a zejména esterů, které mají ve své struktuře obsaženu jednu izoprenovou jednotku, tedy jednu molekulu 2-methylbutanu. Vznik hemiterpenů je zapříčiněn oxidací prenolu. Z chemického hlediska lze tuto sloučeninu pojmenovat také jako 3-methylbut-2-en-1-ol (viz Obr. 2). Součástí esenciálních olejů bývají do značné míry také deriváty tohoto alkoholu. Například prenyl acetát lze nalézt v esenciálním oleji zvaném ylang ylang [6].



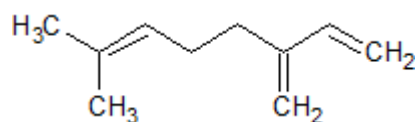
Obr. 2 Chemická struktura prenolu

2.1.2 Monoterpeny

Monoterpeny jsou acyklické, monocyklické či bicyklické C-10-izoprenoidy, tedy látky odvozené od izoprenu. Jsou považovány za sekundární metabolity, které rostlině slouží například jako detoxikační faktory, morforegulátory, atraktanty nebo obranné látky a rostlina je tedy neprodukuje za účelem využití jako zdroje energie nebo zásobní látky. Monoterpeny jsou v rostlinách nejčastěji syntetizovány v parenchymatických buňkách za následného uložení ve vakuolách, v buněčné stěně nebo ve speciálních exkretčních pletivech jako tzv. pryskyřičné buňky [11].

Význam monoterpenů spočívá především v zajištění komunikace mezi rostlinami, v ochraně rostliny před vysycháním či napadením škůdci, lákají opylující hmyz a v neposlední řadě monoterpeny zprostředkovávají interakce mezi rostlinou a prostředím. Důležitou roli hrají monoterpeny i pro vyšší organismy, přičemž jsou lidmi využívány v potravinářství, kosmetice a farmacii pro své aroma nebo jako insekticidy a herbicidy pro svou toxicitu [11].

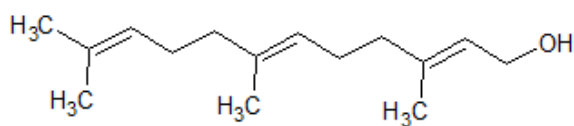
Mezi nejrozšířenější monoterpeny patří α -pinen a β -pinen, které jsou zároveň součástí pryskyřice jehličnanů. Jako příklad acyklických monoterpenů lze uvést myrcen (viz Obr. 3) a geraniol. Menthol, který nalezneme v silici máty peprné a limonen, obsažený v silici citrusových plodů, můžeme zařadit mezi tzv. cyklické monoterpeny [6], [11].



Obr. 3 Chemická struktura myrcenu

2.1.3 Seskviterpeny

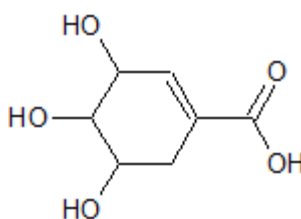
Seskviterpeny jsou tvořeny přidáním jedné izoprenové jednotky k monoterpenové molekule. Jejich prekurzorem je farnesol (viz Obr. 4), který je široce distribuován v květinových silicích, zejména z růží či akátů. S vyšším počtem uhlíků v řetězci stoupá bod varu. Z toho vyplývá, že seskviterpeny mají zřetelně vyšší bod varu než monoterpeny. Jelikož jsou seskviterpeny i daleko těžší než monoterpeny, potřebují více energie na přechod do plynné fáze, jsou tedy méně těkavé. Existují v lineární, rozvětvené nebo cyklické formě. Cyklické seskviterpeny podléhají dalšímu dělení, neboť mohou být monocyklické, bicyklické či tricyklické. Seskviterpenové deriváty mívají typickou vůni silic z listů pačuli a santalového či cedrového dřeva. Za nositele takových vůní lze označit cedren a cedrol [2], [6], [7].



Obr. 4 Chemická struktura farnesolu

2.2 Šikimáty

Kyselina šikimová (viz Obr. 5) je pro rostliny zásadním syntetickým meziproduktem. Slouží jako prekurzor zejména pro flavonoidy a lignin. Flavonoidy jsou nedílnou součástí rostlin, jako antioxidanty, barviva a v neposlední řadě jako ochranné prostředky proti ultrafialovému záření. Lignin oproti tomu hraje klíčovou roli jako strukturní materiál rostlin v dřevnatých tkáních. Kyselinu šikimovou lze syntetizovat z fosfoenolpyruvátu a erytróza-4-fosfátu. Její deriváty mohou být obvykle rozpoznávány charakteristickým šikimátovým vzorem šestičlenného kruhu s jedním či třemi uhlíkatými substituenty v poloze 1 a kyslíkem v poloze 3, 4 nebo 5 [2], [6].



Obr. 5 Chemická struktura kyseliny šikimové

Jednou ze složek esenciálních olejů mohou být i fenylypropanoidy syntetizované šikimátovou cestou prostřednictvím aminokyseliny fenylalaninu a kyseliny skořicové za působení mnohých enzymů včetně transferáz, oxidoreduktáz, lyáz a ligáz. Charakteristickým znakem pro fenylypropanoidy je přítomnost benzenového kruhu na uhlíku C6. Mezi významné fenylypropanoidy řadíme zejména eugenol, vanilín a deriváty kyseliny skořicové [2], [6].

2.3 Doprovodné složky esenciálních olejů

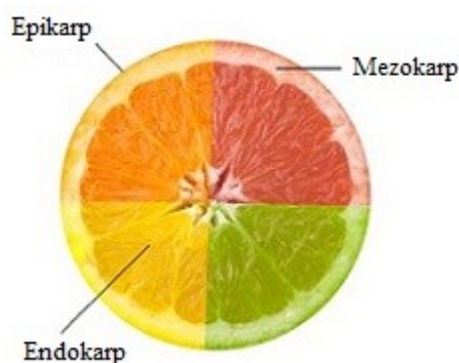
Esenciální oleje se skládají z mnoha doprovodných komponent, které se však vyskytují pouze ve stopovém množství. Mohou to být například neterpenoidní uhlovodíky, mezi něž patří aldehydy a alkoholy s krátkým řetězcem. Vznik těchto komponent je zapříčiněn metabolickou přeměnou, zejména degradací fosfolipidů a mastných kyselin. Další hojně rozšířenou složkou esenciálních olejů jsou cyklické estery kyseliny mléčné, známé jako laktony. Po chemické stránce obsahují laktony pěti či vícečetný kruh, na který je heterocyklicky vázán kyslík. Podle četnosti kruhů je lze rozdělit na dvě skupiny. Laktony s pětičetným kruhem označujeme jako γ -laktony, s šestičetným kruhem jako δ -laktony. Mezi složky esenciálních olejů lze zařadit také estery, isothiokyanáty a sloučeniny obsahující ve své molekule síru či dusík [2].

3 ZPŮSOBY ZÍSKÁVÁNÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ

Esenciální oleje se z rostlinných materiálů nejčastěji získávají třemi způsoby a to: 1) lisováním, 2) destilací, 3) extrakcí. Zmiňované způsoby jsou podrobněji popsány dále.

3.1 Lisování

Lisování a enfleuráž, rozebrána podrobněji v kapitole 3.3.1.2, patří mezi způsoby získávání silic za studena, tedy při pokojové teplotě, kdy nedochází k přímému zahřívání. S technologickým postupem lisování se můžeme setkat výhradně u citrusových plodů s vysokým obsahem silic, jako jsou např. pomeranč, citrón, bergamot nebo grapefruit. Olejové buňky citrusových plodů se nachází těsně pod povrchem, přesněji v epikarpu (viz Obr. 6) a lze je snadno izolovat. Působením vysokého tlaku a mechanickým narušením kůry dojde k samovolnému vytékání oleje, který je následně odplaven vodou. Emulze olej-voda se poté rozdělí centrifugací. Zbývající slupka a ovocnou vlákninu je možno využít jako krmivo pro dobytek [2], [6], [12].



Obr. 6 Části citrusových plodů – upraveno podle [13]

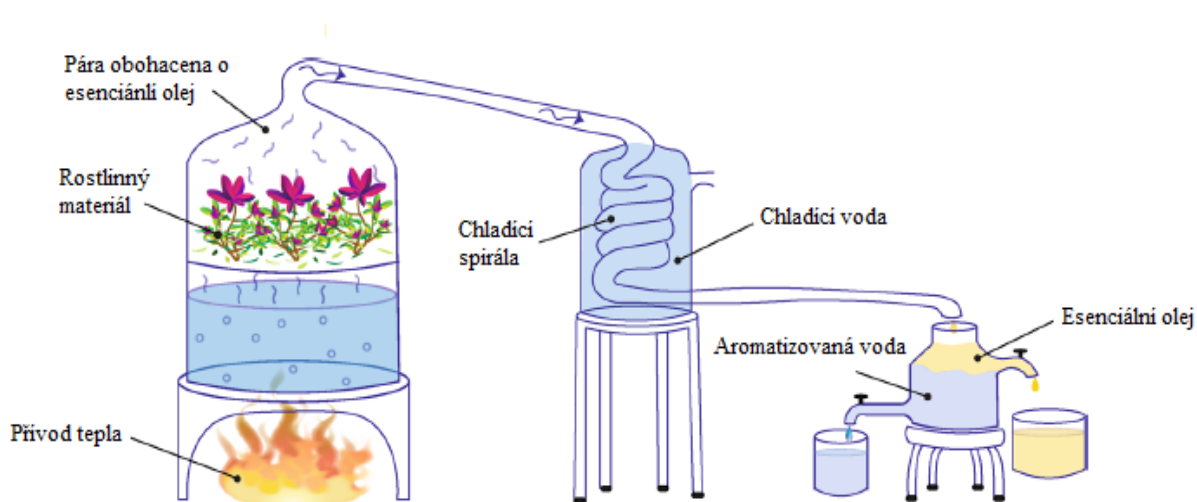
Lisovat lze celé plody citrusů, nevýhodou je však kyselost šťávy, která má tendenci zhoršovat kvalitu esenciálního oleje. Klíčovým parametrem se stává i velikost ovoce [6], [12]. Díky vysokému obsahu terpenů jsou citrusové oleje mnohem náchylnější k oxidaci. Jednou z možností, jak lze tomuto jevu předejít je hermetické uzavření ve skleněné nádobě, která je ještě před plněním vmyta proudem dusíku. Nádoby je doporučováno skladovat ve tmě na suchém a dobře větraném místě. V případech, kdy nároky na kvalitu oleje nejsou vysoké, lze získat esenciální olej z citrusových plodů i destilací [12].

3.2 Destilace

Drtivá většina esenciálních olejů se v dnešní době získává destilací, navzdory tomu, že se jedná o nejméně šetrnou metodu. Na druhou stranu lze získat oleje velmi vysoké kvality. Výchozí rostlinný materiál se často před samotnou destilací rozmělnuje, aby se dosáhlo vyšší účinnosti. Touto metodou se dá zpracovávat velké množství materiálu najednou, což patří po ekonomické stránce mezi jednu z největších výhod. Nelze opomenout také nízkou pracnost a jednoduchost nutného vybavení [6], [12], [14].

3.2.1.1 Destilace vodní parou

Princip je založen na prostupu horké páry přes dno kotle, respektive mřížku z nerezové oceli, na které je uložen rostlinný materiál. Vodní pára obohacená o uvolněné silice prochází přes spirálový chladič, kde dochází k ochlazení a vzniklý kondenzát se po ustálení v koncovém zásobníku rozdělí na silici a vodnou fázi. Silici lze snadno separovat, neboť se drží na hladině. Jednou z alternativ může být také vysokotlaký způsob destilace. Právě touto metodou lze výrazně snížit celkový čas procesu. [6], [12], [14].



Obr. 7 Destilace vodní parou – upraveno podle [15]

3.2.1.2 Hydrodestilace

Další poměrně jednoduchý způsob získávání silice z rostlinného materiálu je hydrodestilace. Oproti jiným metodám má jednu velkou výhodu. Hydrodestilací lze minimalizovat tepelnou degradaci, neboť teplota oleje by nikdy neměla přesáhnout 100 °C. Princip spočívá v pova-

ření rostlinného materiálu ve vodě. Esenciální olej, obsažený v olejových buňkách, difunduje přes buněčné stěny do vody. Poté, co je olej z olejových buněk rozptýlen, odpařuje se a odvádí proudem páry. Jakmile dojde ke kondenzaci destilátu zpět do kapaliny, esenciální olej se na základě rozdílné hustoty snadno oddělí od vody [6], [16].

3.3 Extrakce

Esenciální oleje se z rostlinného materiálu mohou získávat krom výše uvedených metod také extrakcí. V tomto případě se může jednat o extrakci pomocí organických rozpouštědel, jako jsou především hexan, benzín či petroléter, nebo extrakci pomocí superkritického oxidu uhličitého. Zvláštním případem je enflouráž, kdy dochází k extrakci květů do tuku.

3.3.1.1 Superkritická fluidní extrakce (SFE)

Superkritická fluidní extrakce se stala jednou z alternativ běžných extrakčních postupů hlavně proto, že rozpouštěcí sílu extrakčního média lze upravit regulací tlakových a teplotních podmínek [17]. Dalším aspektem pro výběr této metody je snížení doby extrakce v závislosti na snížení spotřeby organických rozpouštědel. Metoda je také vhodná pro látky citlivé na teplo [18]. Extrakty získané těkavými rozpouštědly obsahují zbytky, které kontaminují konečný produkt. Tato omezení lze překonat extrakcí pomocí oxidu uhličitého, který se na konci extrakčního procesu úplně vyloučí z produktu [19].

Použití CO₂ jako superkritického rozpouštědla k extrakci aromatických látek je způsobeno jeho chemickými a fyzikálními vlastnostmi. Představuje nízké kritické parametry (31,06 °C a 73,82 bar) a je netoxický, nehořlavý a chemicky stabilní [17], [19].

Jedná se o fyzikální proces, při němž nedochází k žádné chemické reakci, včetně uvolňování tepla. Kapalný CO₂ je v úzkém kontaktu s rostlinou, z níž dochází k uvolňování požadované silice. Tento uzavřený systém je uchováván pod vysokým tlakem, jelikož za normálních podmínek je CO₂ plyn. Snížením tohoto tlaku se změní kapalný CO₂ na páru, po extrakci se odpaří a zbytek tvoří výsledná čistá silice [16], [20]. Extrakcí oxidem uhličitým v superkritickém stavu lze získat vysoce kvalitní silice. Díky nutnosti speciálního vybavení je tento proces ekonomicky nákladný. Takto získané silice jsou proto omezeně dostupné a drahé [16].

3.3.1.2 *Enfleuráž*

Enfleuráž je jednou z nejstarších metod využívaných k izolaci vonných látek. Získat silici touto cestou je jednak časově i fyzicky náročné, navíc i velmi drahé. Jedná se především o luxusní silice např. z květů jasmínu, růží, a zejména pomerančových květů.

Proces spočívá v maceraci výchozího materiálu za studena v tuku či oleji (viz Obr. 8). Na natažené plátno, popřípadě skleněnou desku, v dřevěném rámu je částečně nanesen tuk bez pachu. Na tuto vrstvu se rovnoměrně kladou čerstvé květy. Rámy se následně naskládají na sebe, čímž dojde k vytvoření hermeticky uzavřeného systému, a po uplynutí 24 hodin se květy odstraní a nahradí čerstvými. Parfémovaný tuk se extrahuje alkoholem, kdy za následného vymražení a filtrace získáme tzv. laváž. Z této laváže se poté oddestiluje ethanol za vzniku výsledného produktu tzv. absolutní silice [6], [12], [21], [22].



Obr. 8 *Enfleuráž* [23]

4 BIOLOGICKÉ ÚČINKY ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ

Některé esenciální oleje mají velký potenciál, neboť působí jako antimikrobika, která účinně ničí některé bakteriální, plísňové či virové patogeny. Antimikrobiální aktivita esenciálního oleje závisí především na povaze, složení a orientaci jeho funkčních skupin. Díky přítomnosti různých druhů fenolů, aldehydů, terpenů a dalších antimikrobiálních sloučenin mohou být esenciální oleje účinné proti širokému spektru mikroorganismů. Perspektivní je také možnost využití coby konzervačních látek v potravinářském nebo kosmetickém průmyslu [3]. Je však třeba brát v úvahu i nepříznivé vlastnosti esenciálních olejů, zejména fototoxicitu, která tvoří hlavní naplň této bakalářské práce, a bude tedy podrobněji rozebrána v kapitolách 8 až 10.

Antimikrobiální účinnost se odvíjí od jedné či dvou hlavních složek, které tvoří esenciální olej. Mezi těmito složkami může docházet k tzv. synergismu. Nejvyššího synergetického efektu lze dosáhnout kombinací monoterpenoidního fenolu s monoterpenoidním alkoholem. Mluvíme zde o kombinacích, jako jsou například eugenol, linalool a menthol nebo eugenol, karvakrol a thymol [24].

Antimikrobiální účinky esenciálních olejů se projevují především změnou integrity a funkce buněčné membrány organismů. Expanze a změna fluidity membrány, zejména zvýšená teplotnost, mohou vést k narušení membránové integrity, která dovoluje malým intracelulárním složkám jako jsou vodík, draslík a sodík procházet buněčnou membránou. Ztráta těchto iontů vede ke snížení membránového potenciálu, a tedy narušení iontového gradientu mezi vnitřním a vnějším prostředím buňky [25]. Tato změna v buněčné organizaci může způsobit kaskádový efekt ovlivňující další organely [3]. Zatímco ztráta nízkých hladin malých iontů nemusí být pro buňku nutně smrtelná, ztráta makromolekul, jako jsou proteiny či DNA, téměř jistě naznačuje smrt buněk [25]. Některé terpenoidy s funkčními skupinami mohou také interferovat s membránově integrovanými enzymy, jako jsou enzymy dýchacích cest, které inaktivují a přerušují tak životně důležité funkce buněk [26].

4.1 Antibakteriální účinky

Grampozitivní bakterie jsou, prakticky až na výjimky, citlivější na esenciální oleje než gramnegativní bakterie. Vnější membrána gramnegativních bakterií je složitější, poskytuje tedy zvýšenou toleranci k hydrofobním antimikrobiálním sloučeninám, nacházejících se v esen-

ciálních olejích. To je zapříčiněno obsahem hydrofilních lipopolysacharidů v membráně, vytvářejících bariéru pro makromolekuly a hydrofobní sloučeniny. Grampozitivní bakterie jsou na místo toho obklopeny silnou buněčnou stěnou, tvořenou převážně z peptidoglykanu, která ale zdaleka není tak hustá, aby dokázala odolávat malým antimikrobiálním molekulám [7], [24].

Antibakteriální aktivita silic může mít za následek celkové zničení bakteriální buňky (tedy baktericidní působení), nebo může růst bakterií inhibovat pouze částečně (tedy bakteriostatické působení). Počáteční interakce mezi složkou esenciálního oleje a mikrobiální buňkou je pasivní difúze látek přes buněčnou stěnu grampozitivních bakterií nebo přes membránu gramnegativních bakterií [25]. Antimikrobiální aktivita esenciálních olejů je do značné míry spojená s jejich hydrofobností, která je zodpovědná za zvýšení permeability buněčné stěny, která nakonec vede ke smrti bakteriálních buněk v důsledku ztráty životně důležitých intracelulárních obsahů a úniku iontů ven z buňky [3], [5] a [24]. Za tyto účinky jsou zodpovědné jednotlivé složky esenciálních olejů. Kupříkladu thymol a menthol způsobující narušení lipidových frakcí bakteriálních plazmatických membrán, což vede k ovlivnění propustnosti membrány a úniku intracelulárních materiálů. Dalším příkladem je hydrofobní sloučenina karvakrol, která je významná svou schopností ovlivnit složení mastných kyselin v buněčných membránách, což pak ovlivňuje jejich propustnost a fluiditu [3]. Je taky zodpovědná za snížení bodu tání lipidů přítomných v lipidové dvojvrstvě vedoucí ke změně fluidity membrány [25].

Díky stále se zvyšující rezistenci mikroorganismů vůči antibiotikům by esenciální oleje v dnešní době mohly být potenciálním zdrojem alternativních antimikrobiálních látek a mohly by tak v blízké budoucnosti hrát významnou roli [3].

4.2 Antivirové účinky

Virová onemocnění jsou z hlediska lidského zdraví stále celosvětovým problémem, neboť máme k dispozici pouze omezený počet léků (antivirotik). Výrobky na bázi rostlin a bioaktivní láky mohou být novým zdrojem protivirových léků. Jednou z předností esenciálních olejů je inhibice virové aktivity během raných stádií infekce, neboť potlačují syntézu virových proteinů a inhibují časný proces genové exprese viru. Nesou tedy obrovský potenciál jako jedna z alternativ k syntetickým antivirovým lékům [3].

Viry jsou submikroskopické organismy (v rozmezí 20–300 nm), které mohou infikovat buňky. Jelikož postrádají vlastní proteosyntetický aparát, jsou samy o sobě inaktivní a k rozmnožování potřebují hostitelskou buňku [6]. Esenciální oleje vykazují schopnost snížit virulenci inhibicí replikace viru během fáze před adsorpcí viru na hostitelskou buňku, případně narušením virových obalových struktur, které jsou pro adsorpci na hostitelskou buňku důležité [27]. Dále zabraňují šíření virové infekce z buňky do buňky ihned po přidání do buněčných kultur již infikovaných hostitelských buněk [6], [25]. Antivirová aktivita esenciálních olejů byla zaznamenána zejména u DNA a RNA virů s virovým obalem, z nichž lze uvést nejznámější herpes virus. Viry bez virového obalu nejsou aktivitou esenciálních olejů ovlivněny [28].

Mechanismus působení esenciálního oleje na submikroskopické organismy je dán především přímými virucidními účinky (denaturace virových strukturních proteinů nebo glykoproteinů). Esenciální oleje interferují s virovým obalem za současné inhibice specifických procesů v replikačním cyklu viru nebo inaktivací virových částí, které jsou nezbytné pro adsorpci nebo vstup do hostitelských buněk, čímž zabraňují difúzi viru na buňku [29]. Mezi nejúčinnější antivirové esenciální oleje lze zařadit eukalyptový a tymiánový olej, známé svým pozitivním inhibičním účinkem proti herpes viru [6]. Za jednotlivé složky výše zmíněných esenciálních olejů vykazující antivirové účinky lze zmínit flavonoidy a fenolické látky. Fenolické látky interagují s proteinovým obalem virů, což vede k inhibici vazby viru na povrch hostitelské buňky [30]. Ačkoli existuje dostatečné množství informací o jednotlivých virech, přesný mechanismus virucidních účinků esenciálních olejů není zatím přesně znám [27].

4.3 Antioxidační účinky

O antioxidantech lze obecně říci, že jde především o organické látky, jejichž molekuly jednak omezují aktivitu volných kyslíkových radikálů (ROS), tak snižují pravděpodobnost jejich vzniku a dokáží je převést na méně reaktivní či zcela nereaktivní formy [2], [6]. Volný radikál je molekula, atom nebo iont, který má jeden nebo více nepárových elektronů. Během patogeneze chronických onemocnění způsobuje nadprodukce volných radikálů v tkáních oxidační poškození lipidů, proteinů a DNA z důvodu vysoké reaktivity vůči jiným molekulám. Snížení oxidačního stresu prostřednictvím vychytávání volných radikálů je slibnou alternativou pro zabránění či oddálení výskytu chronických onemocnění [31].

Peroxid vodíku má za následek oxidativní poškození DNA v buňkách a způsobuje peroxidaci lipidů. Právě díky těmto vlastnostem se stal jednou z nejvíce studovaných reaktivních forem kyslíku. Za silné antioxidanty považujeme esenciální oleje s vysokým obsahem fenolických látek [2], [6], [32].

Vysoký potenciál fenolických látek k zachycení volných radikálů je způsoben jejich schopností darovat atom vodíku ze svých hydroxylových skupin [2]. Mohou také reagovat nepřímo, což spočívá ve schopnosti vázat přechodné kovy (železo, měď) a měnit jejich redukční vlastnosti tak, že nemohou katalyzovat nebezpečné radikálové reakce. Esenciální oleje disponují schopností zachytit tyto volné radikály, hrají tedy důležitou roli v prevenci některých onemocnění, jako je dysfunkce mozku, srdeční onemocnění či pokles aktivity imunitního systému [33].

5 VYUŽITÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ

Esenciální oleje jsou dnes hojně využívány díky všestrannosti jejich použití v různých průmyslových oblastech. Díky svým antiseptickým účinkům se esenciální oleje využívají k výrobě zdravotnických prostředků a mýdel pro prevenci přenosu patogenů v chirurgickém prostředí. Jakmile esenciální oleje obsahují ve své molekule například limonen, thymol, geraniol, citronellol či vanilin, lze je využít jako repelenty. Nicméně tyto látky na hmyz nepůsobí jako kontaktní jed, neboť vynikají výbornou odpuzující aktivitou, a tím brání hmyzu v bodnutí a sání krve. Potravinářský a kosmetický průmysl je blíže popsán dále [4], [5], [12]. Většina esenciálních olejů se však používá přímo jako výchozí materiál při výrobě aromatických a vonných směsí [22]. Esenciální oleje se díky schopnosti inhibovat klíčivost semene také hojně využívají jako tzv. přírodní herbicidy. Na druhou stranu mohou usnadňovat opylování jako specificky žádoucí hmyzí atraktant, zatímco odpuzují ostatní organismy [34].

5.1 Potravinářský průmysl

Zájem o využití esenciálních olejů v potravinářském průmyslu vzrůstá, především díky obavám spotřebitelů vůči chemickým konzervačním látkám. Esenciální oleje jsou vhodným zdrojem několika bioaktivních sloučenin, které mají antioxidační a antimikrobiální vlastnosti, což umožňuje jejich použití pro prodloužení doby trvanlivosti některých potravinových výrobků [4], [35].

Ačkoli se ukázalo, že esenciální oleje jsou slibnou alternativou k chemickým konzervačním látkám, jejich použití má některá omezení, která musí být řešena ještě před samotnou aplikací ve výrobcích potravinářského průmyslu. Jedná se především o nízkou rozpustnost olejů ve vodě, vysokou těkavost a v neposlední řadě i o jejich silnou aromaticnost či barvu [4], [35]. Tyto vlastnosti mohou potraviny znehodnocovat. V dnešní době se zkoumají nové formy aplikace, které by těmto problémům předešly. Mezi jedny z nových aplikací patří například zapouzdření olejů přímo do potravinové matrice ve formě emulze, popřípadě nanoemulze, anebo jejich použití v obalových materiálech [4].

5.2 Kosmetický průmysl

Esenciální oleje jsou v kosmetických přípravcích hojně zastoupeny, neboť nabízejí řadu výhod. Hlavním důvodem využití v kosmetickém průmyslu je jejich příjemná vůně. Mastné kyseliny, lipidy a povrchově aktivní látky používané ve výrobním procesu kosmetických přípravků disponují nepříjemnou vůní, kterou lze esenciálními oleji dobře maskovat.

Vzhledem k antimikrobiálnímu působení silic, kosmetické přípravky jako jsou krémy, gely a lotiony, nevyžadují nutně další chemické konzervanty, pokud obsahují jako účinnou látku esenciální olej. Samozřejmě nelze opomenout fakt, že mohou být použity jen v minimálním množství a koncentraci, z důvodu možných alergických reakcí [36]. Mezi složky esenciálních olejů vyvolávající alergické reakce lze zařadit např. linalool, limonen, bergapten, citral či eugenol. Oxidace jednotlivých složek zvyšuje jejich senzibilizační potenciál, díky čemuž je důležité volit vhodné podmínky skladování, které by mohly ovlivnit bezpečnost kosmetického přípravku [26].

Tea tree esenciální olej nachází v kosmetickém průmyslu hned několik možných využití. Aplikuje se v přírodních alternativách ústních vod, neboť pomáhá zmírnit vznik zubního plaku a nepříjemnému zápachu z úst. Dle zdroje [36] se uvádí několik studií, které naznačují, že by tea tree olej mohl být účinný proti choroboplodným zárodkům, které způsobují zubní kaz. Využívá se také při léčbě houbových infekcí nehtů [36].

6 ANATOMIE KŮŽE

Lidská kůže je jedním z plošně největších a nejvšestrannějších orgánů našeho těla. Jeho specifická stavba umožňuje kůži přizpůsobovat se pohybům a potřebám těla [37].

Stavbu kůže definují tři základní vrstvy tvořeny specifickými buňkami s určitou funkcí. Jedná se tedy o pokožku (řec. *epidermis*, lat. *epikutis*), škáru (řec. *dermis*, lat. *corium*) a podkožní vazivo (řec. *hypodermis*, lat. *subcutis*). Ke kůži patří také vlasy, nehty, mazové, potní a apokrinální žlázy považovány za přídatné kožní orgány [37], [38] a [39].

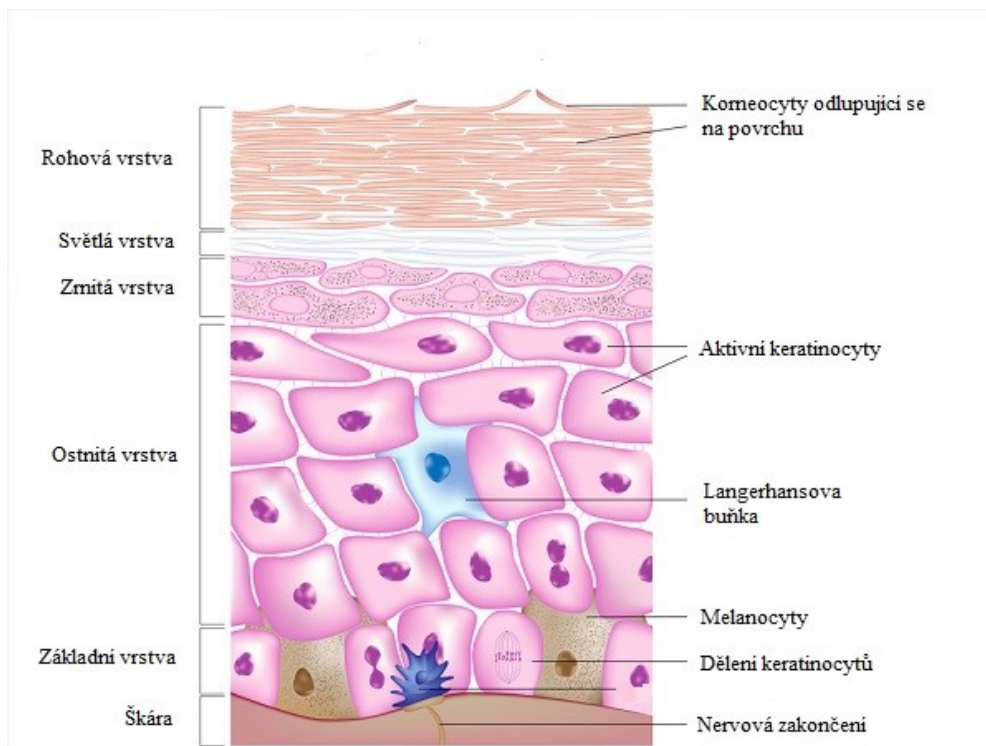
6.1 Pokožka

Jedná se o bezcévnatou vnější vrstvu kůže, která je vyživována prostřednictvím difúze ze škáry. Pokožka je tvořena čtyřmi základními typy buněk, přičemž nejhojněji zastoupeny jsou především keratinocyty, buňky rohovějícího dlaždicového epitelu. Další nedílnou součástí pokožky jsou pigmentové buňky neuroektodermálního původu, melanocyty, potřebné k syntéze melaninu. Langerhansovy buňky jsou dendritické buňky zodpovědné např. za kožní alergické reakce, nicméně za jejich hlavní funkci považujeme prezentaci antigenu lymfocytům. Posledním typem jsou Merkelovy buňky, sloužící jako mechanoreceptory [37] a [39].

Pokožku lze rozdělit na pět vrstev:

- základní vrstva (lat. *stratum basale*),
- ostnitá vrstva (lat. *stratum spinosum*),
- zrnitá vrstva (lat. *stratum granulosum*),
- světlá vrstva (lat. *stratum lucidum*),
- rohová vrstva (lat. *stratum corneum*).

Hlavní náplní pokožky je tvorba keratinu procesem diferenciací a keratinizací. Keratinocyty se v základní vrstvě neustále intenzivně mitoticky dělí, směrem k povrchu se oplošťují a postupem zrání ztrácí své jádro a mění se na rohovinu – keratin. Po dovršení keratinizace se buňky rohové vrstvy neustále v tenké vrstvičce odlučují v podobě šupinek. Tento proces zahrnující přeměnu buněk od vrstvy základní až po vrstvu rohovou trvá v průměru 28 dní. Výjimku tvoří oblast obličeje, kde se celý proces zkracuje asi na 14 dní [37], [38] a [39].



Obr. 9 Struktura pokožky – upraveno podle [40]

Melanin

Z důvodu zaměření této práce si dovoluji rozebrat podrobněji problematiku kožního pigmentu – melaninu. Melanin je pigment s vysokým obsahem tyrosinu spadající pod polychinony a ačkoli není považován za funkční složku epidermální bariéry, jeho funkcí je převážně fotoprotekce [39]. Melanin redukuje množství záření pronikajícího do pokožky svou schopností rozptýlit UV paprsky a absorbovat UVB, UVA, VIS a IR fotony, za současné přeměny energie fotonů na teplo. Existují dva hlavní typy melaninu lišící se v závislosti na složení a barvě. Jedná se o tmavý hnědo-černý eumelanin, vyskytující se silně pigmentovaných jedinců s tmavými vlasy a o světlý žluto-červený feomelanin, který je rozpustný v alkalickém prostředí a převládá u lidí se zrzavými vlasy [37]. Feomelanin lze také charakterizovat jako sulfátový pigment, který je výsledkem inkorporace cysteinů do prekurzorů melaninu [41]. Tmavší kůže s vyšším obsahem eumelaninu je výrazně odolnější vůči účinkům UV záření na DNA než světlejší kůže tvořená převážně vyšším obsahem feomelaninu. Příčinou toho je aminokyselina cystein ve struktuře feomelaninu. Díky této aminokyselině má feomelanin vyšší obsah síry než eumelanin. Konstruktivní hladiny eumelaninu a feomelaninu v kůži jsou dány geneticky [42].

6.2 Škára

Bazální membrána, oddělující pokožku od škáry, umožňuje svou propustností prostup látek mezi oběma vrstvami, a zajišťuje tak dokonalé vyživení bezcévnaté pokožky. Škára je střední a zároveň nejsilnější vrstva složená převážně z vazivových vláken, které jsou podstatou pružnosti, odolnosti a zároveň pevnosti kůže. Nejhojněji jsou zde zastoupeny kolagenní, elastinová a retikulární vlákna [37] a [38]. Tloušťka škáry závisí na lokalizaci a věku jedince, neboť s přibývajícím věkem dochází ke snižování vlhkosti kůže, a také k poklesu množství elastinu a kolagenu, což má za následek snížení tloušťky škáry [43].

Mezi hlavní buňky střední vrstvy kůže lze zařadit fibroblasty, což jsou nejdůležitější buňky pro syntézu všech proteinových vláken přítomných ve škáře [37]. Dále histiocyty, jejichž aktivní formy označujeme jako makrofágy, které fagocytují antigeny spolu s odpadními produkty metabolismu. Posledním typem jsou tzv. žírné buňky, nazývané jako mastocyty [39].

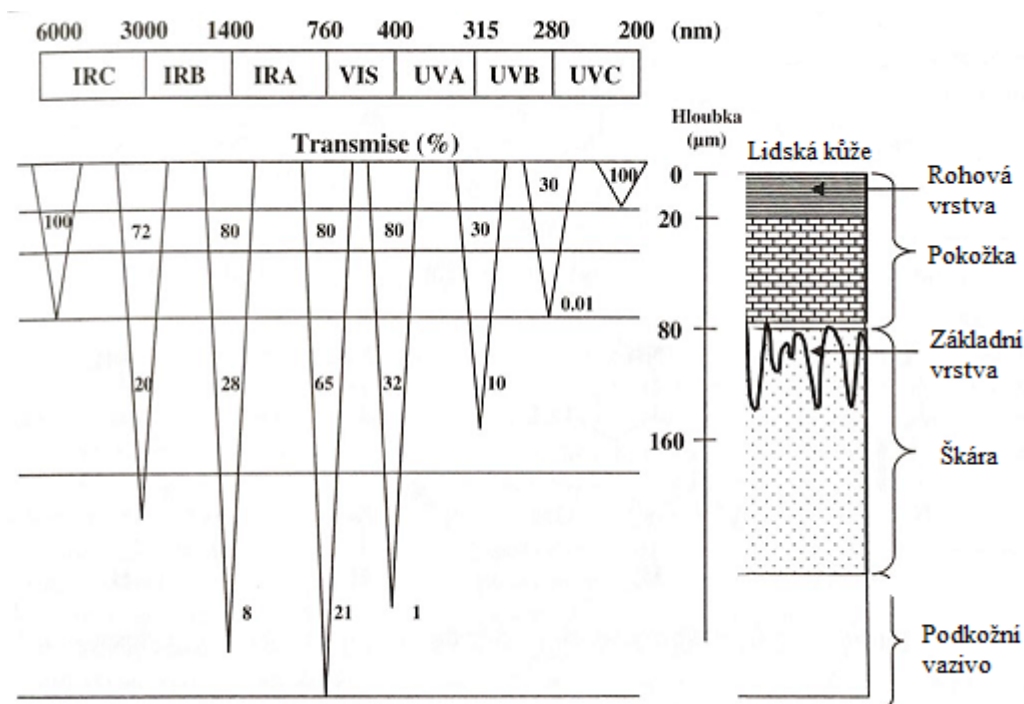
Součástí škáry jsou již zmiňované kožní adnexa a koncová nervová zakončení, která nám umožňují vnímat podněty. Jedná se o Meissnerova tělíska, receptory hmatu, která lze nalézt v horních vrstvách škáry. Vater-Pacciniho tělíska zprostředkovávají pocit vibrace, tahu a především tlaku. Krauseho tělíska přenášející pocit chladu a Ruffiniho tělíska, které je možno označit za receptory tepla [37] a [39].

6.3 Podkožní vazivo

Podkožní vazivo je jakožto nejspodnější vrstva kůže složeno z řídkého vaziva a tukové tkáně, tvořené tukovými buňkami – adipocyty, sloužící jako zásobárna energie či vitamínů rozpustných v tucích (zejména A, D, E, K) [37] a [39]. Jedna z hlavních funkcí podkožního vaziva je ochrana hlouběji uložených orgánů proti mechanickému poškození, podílí se však také na regulaci teploty celého těla včetně kůže [37] a [38]. Tuková vrstva se v závislosti na lokalitě těla mění od minimální, vyskytující se například na víčkách, až po značně silnou, kterou lze nalézt v oblasti břicha, hýždí či stehen, kde vytváří tukový polštář [39].

7 SLUNEČNÍ ZÁŘENÍ

Sluneční záření hraje svými pozitivními i negativními účinky klíčovou roli v rozvoji života na Zemi [44]. Sluneční záření je definováno jako spektrum elektromagnetického vlnění, které je tvořeno několika oblastmi: gama, rentgenovou, ultrafialovou (UV), viditelnou (VIS) a infračervenou (IR). Záření dopadající na zemský povrch je filtrováno průchodem atmosférou a neobsahuje vlnové délky kratší než 294 nm [37].



Obr. 10 Průnik jednotlivých složek záření do lidské kůže – upraveno podle [37]

7.1 Ultrafialové záření

Ultrafialové záření tvoří nejmenší část slunečního světla dopadajícího na zemský povrch, přibližně 5 %. Zahrnuje vlnové délky v rozmezí 100–400 nm, přičemž neškodlivější část UV záření (100–294 nm) je absorbována ozónovou vrstvou ve stratosféře. Podle Mezinárodní komise pro radiaci (International Commission on Illumination) podléhá UV oblast dělení na tři části:

- 1) UVA (315–400 nm),
- 2) UVB (280–315 nm),
- 3) UVC (100–280 nm).

7.1.1 UVA

Dlouhovlnné UVA záření je tvořeno vlnovými délkami v rozmezí 315–400 nm [37]. Jakmile UV záření zasáhne kůži, část záření se odrazí a část je absorbována různými vrstvami kůže [45]. UVA fotony pronikají hluboko do kůže, přičemž 10 % prostupuje až k podkožní vazivové vrstvě, což je důvodem možného poškození kožních buněk. Nejsilněji proniká UVA k rozhraní pokožky a škály (viz Obr. 10). Ve srovnání s UVB není UVA absorbováno standartním okenním sklem ani ozónovou vrstvou a jeho intenzita se v průběhu dne příliš nemění [37]. Kromě toho, že je UVA záření silným imunopresivem, tzn. že tlumí činnost imunitního systému, je také zodpovědné za masivní produkci reaktivních forem kyslíku – ROS (superoxid, peroxid, hydroxylový radikál) a dusíku – RNS v důsledku interakce UVA fotonů s endogenními či exogenními chromofory [37], [45].

Chromofory jsou nazývány molekuly absorbující fotony. Chemická struktura chromoforu určuje vlnové délky záření, které absorbuje – jeho tzv. absorpční spektrum [46]. Mezi nejdůležitější endogenní chromofory patří DNA, která absorbuje především UVB, ale i část UVA záření. Dále zde můžeme zařadit melanin, kyselinu urokánovou, aromatické aminokyseliny, porfyriny a flaviny. Do skupiny exogenních chromoforů lze zahrnout fotosenzitivní léčiva jako fluorochinolony, ketoprofen a 8-methoxypsoralen [47].

7.1.2 UVB

UVB oblast definují vlnové délky v rozmezí 280–315 nm. Nicméně nebezpečná část UV záření 280–294 nm je eliminována v ozónové vrstvě ve stratosféře. UVB záření je několika násobně nebezpečnější než UVA, v důsledku čehož je považováno za silný karcinogen. Na rozdíl od UVA proniká UVB záření do menší hloubky kůže, kdy do škály prostupuje jen minimální množství, přičemž většina UVB zůstává absorbována v pokožce (viz Obr. 10) [37]. Nadmořská výška, zeměpisná šířka, roční a denní doba jsou faktory ovlivňující intenzitu tohoto záření, která dosahuje maxima v době kolem poledne [37], [45], [47]. Schopností odrazet UV záření disponuje mnoho povrchů, zejména písek či sníh, který dokáže odrazit až 85 % záření. Z tohoto důvodu je důležité klást důraz na ochranu i v zimním období [45].

UVB je příčinou řady fototoxických reakcí, neboť způsobuje změny ve struktuře a funkci kůže. Expozice tohoto záření způsobuje většinu kožních lézí, což může vést až ke spálení kůže či vzniku erytému s typickými projevy zánětu jako jsou bolest kůže, zarudnutí, přehřátí a napětí [37] a [45].

Intenzivní expozicí UVB záření dochází k poškození DNA přímo indukcí tvorby dimerů bází DNA, anebo nepřímo prostřednictvím volných radikálů (ROS, RNS), které následně atakují DNA, lipidy a proteiny. V obou případech toto poškození může vést ke vzniku mutací, které mohou být detekovány a napraveny obranným systémem [45], [47].

Nejuniverzálnějším mechanismem opravy DNA je vystřížení nukleotidu, kdy po rozpoznání abnormálního nukleotidu dochází působením helikas a endonukleas k rozpojení vlákna DNA na obou stranách léze a následného vystřížení poškozeného fragmentu DNA. Poté nastává syntéza odstraněného úseku DNA, přičemž nepoškozené vlákno slouží jako vzor. Oprava chybného párování bází je dalším mechanismem, který zahrnuje řadu proteinů s širokým spektrem enzymových funkcí. Právě tyto proteiny na základě porovnání s matricovým řetězcem rozpoznají chybně vloženou bázi během replikace DNA a nahradí ji. Může také docházet k opravě vystřížením báze. Tento mechanismus slouží k odstraňování oxidálně modifikovaných bází, anebo k opravě jednovláknových zlomů DNA, které se vytváří poškozením sacharidové složky ve struktuře DNA. V případě, kdy mutace rapidně narůstají a obranné systémy nestačí poškození DNA eliminovat, dochází k apoptóze (buněčná smrt), což je forma systémové obrany pro prevenci množení postižených buněk, které by mohly vést ke vzniku nádoru [37].

7.1.3 UVC

Nejvyšší energii má oproti výše zmíněným pásmům krátkovlnné UVC záření, které se nachází v rozmezí vlnových délek 100–280 nm. V celém svém rozsahu je UVC záření pohlcováno ozonovou vrstvou, a tudíž se nepodílí na patologických procesech v kůži [37] a [45]. Nicméně díky jeho germicidním účinkům se hojně využívá jako účinný prostředek k prostorové desinfekci (laboratoře, operační sály) [37], [48]. Absorpční maximum DNA spadá do oblasti UVC záření a lze jej nalézt v rozmezí vlnových délek 260–265 nm. V důsledku toho působí UVC záření, byť jen ve velmi krátkých expozicích, mutageně a genotoxicky na všechny formy života [37].

7.2 Viditelné záření

Viditelné záření tvoří až 50 % dopadajícího slunečního světla na zemský povrch. Vlnové délky viditelného záření se pohybují v rozmezí 400–760 nm. VIS záření proniká hluboko do kůže, přesněji až k podkožní vazivové vrstvě, kde dochází k jeho absorpci řadou chromoforů [37]. Ve viditelném spektru absorbuje světlo jen několik chromoforů, mezi něž lze zařadit melanin, hemoglobin a eosin [46]. Podle zdroje [48] zatím nejsou viditelnému záření připisovány škodlivé účinky na kůži, vyjma některých fotodermatóz.

7.3 Infračervené záření

Infračervené záření zahrnuje vlnové délky 760 nm až 1 mm a lze je dělit na tři oblasti:

- 1) IRA (760–1 440 nm),
- 2) IRB (1 440–3 000 nm),
- 3) IRC (3 000 nm až 1 mm).

Na zemský povrch dopadá asi 45 % slunečního světla tvořeno IR zářením, oproti viditelnému záření má tedy menší energii. IRA proniká až do škáry, zatímco IRB je společně s IRC pohlcováno především v oblasti pokožky (viz Obr. 10) [37]. Infračervené záření má schopnost převádět energii na teplo, v důsledku čehož se může teplota lidské kůže, vystavené přímo IR záření, zvýšit až o 40 °C. Chronické vystavení teplu může způsobit např. erytém či hyperpigmentaci [45].

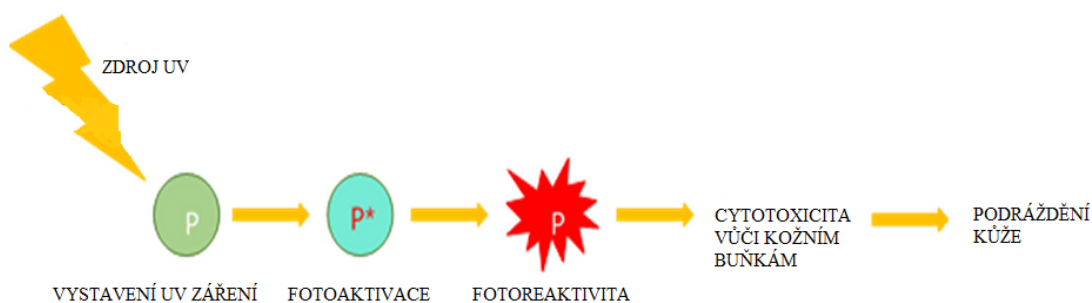
8 ÚČINKY UV ZÁŘENÍ NA ORGANISMUS

Chemické a fyzikální faktory působící na kůži jsou jedny z projevů, které se nejzásadněji podepisují na vzhledu naší kůže, proto je třeba se před nimi patřičně chránit. Lidská kůže poskytuje komplexní ochranný systém, který snižuje pronikání fotonů slunečního záření do kožní tkáně zahrnující např. syntézu kožního pigmentu či zesílení rohové vrstvy kůže. Nicméně, i když se tyto obranné mechanismy snaží poškození eliminovat, nedisponují neomezenou kapacitou a je třeba zmínit fakt, že veškerá poškození spojená se sluneční expozicí jsou kumulativního charakteru [37].

Fotosenzibilizace spadá pod nežádoucí účinky slunečního záření a podle mechanismu poškození organismu se dělí na reakce fototoxické, fotoalergické a fotogenotoxické. Fotosenzibilizace je definována jako proces, ve kterém světelná aktivace chromoforu indukuje chemické změny v jiné molekule. Následně dochází k vyvolání nežádoucí toxické kožní reakce na sluneční záření [49].

8.1 Fototoxická reakce

Vystavení pokožky slunečnímu záření a fotoreaktivním xenobikům může způsobit abnormální kožní reakci, fototoxicitu. Fototoxicita je akutní, světlem indukovaná odezva látky, která nastává v době, kdy jsou fotoreaktivní látky aktivovány slunečním zářením a transformovány na látky cytotoxické vůči kožním buňkám (viz Obr. 11). Fototoxicita se také může projevit systémově absorbovanými látkami, které jsou indukovány ozářením po podání. Příkladem takového typu látek mohou být fluorochinolová antibiotika [50]. Dle mezinárodně uznávané směrnice Organization for Economical Cooperation and Development (OECD TG 432) pro testování chemikálií je fototoxicita definována jako: toxická odezva látky aplikované na kůži, která je buď vyvolána nebo zvýšena (při nižších dávkách) po následném vystavení světlu, nebo která je indukována ozářením kůže po systémovém podání látky [51].



Obr. 11 Průběh fototoxické reakce – upraveno podle [50]

K vyvolání biologického účinku slunečního záření je potřeba absorpce fotonů (energie) [37]. Pro každý foton světla absorbovaného chemickým systémem může být aktivní pro fotochemickou reakci pouze jedna molekula. UV nebo VIS zářením mohou být aktivovány molekuly, které mají vhodné chromofory (skupiny schopné absorbovat UV nebo VIS záření v rozmezí vlnových délek 290–700 nm) [52]. Při dopadu slunečního záření na kůži se část záření ihned odrazí z jejího povrchu, část se při prostupu vrstvami kůže rozptýlí a konečná část je absorbována chromofory. Důležitou charakteristikou je absorpční spektrum, které udává schopnost chromoforů pohlcovat záření příslušné vlnové délky [37], [48]. V kapitole 7.1.1 byly podrobněji rozebrány příklady jednotlivých chromoforů.

Po vystavení kůže slunečnímu záření dochází k rapidnímu zvýšení produkce ROS a RNS spolu s jejich současnou neutralizací působením antioxidantů. Nicméně při intenzivní expozici slunečnímu záření jsou ROS/RNS produkovány v takovém množství, kdy je antioxidační systémy nestačí eliminovat. V důsledku toho dochází ke vzniku oxidačního stresu vedoucího k narušení homeostázy (udržení stálosti vnitřního prostředí organismu) v exponované tkáni. Následkem interakce DNA, lipidů a proteinů s nevychytanými reaktivními sloučeninami dochází k jejich oxidačnímu poškození [37].

8.1.1 Mechanismus fototoxické reakce

Mechanismus fototoxické reakce lze klasifikovat podle působení na přímý a nepřímý (viz Obr. 12). V prvním případě se jedná o přímou absorpci fotonů endogenní molekulou – chromoforem. Nepřímý mechanismus vyvolá absorpcí energie změnu distribuce elektronů v molekule chromoforu, což má za následek přechod ze základního do excitovaného stavu [37]. Aktivované elektrony se vracejí do základního stavu – stabilnější konfigurace a přenášejí svou energii na kyslík, přičemž dochází k tvorbě reaktivních meziproductů kyslíku (singletový kyslík, superoxidové anionty, peroxid vodíku) vedoucí k poškození buněčných membrán a DNA. To zahrnuje signální transdukční cesty, které vedou k produkci protizánětlivých cytokinů a metabolitů kyseliny arachidonové, představující hlavní složky zánětlivé reakce [53].

V závislosti na chemickém složení a vlastnostech chromoforu může nepřímý mechanismus probíhat dvěma způsoby:

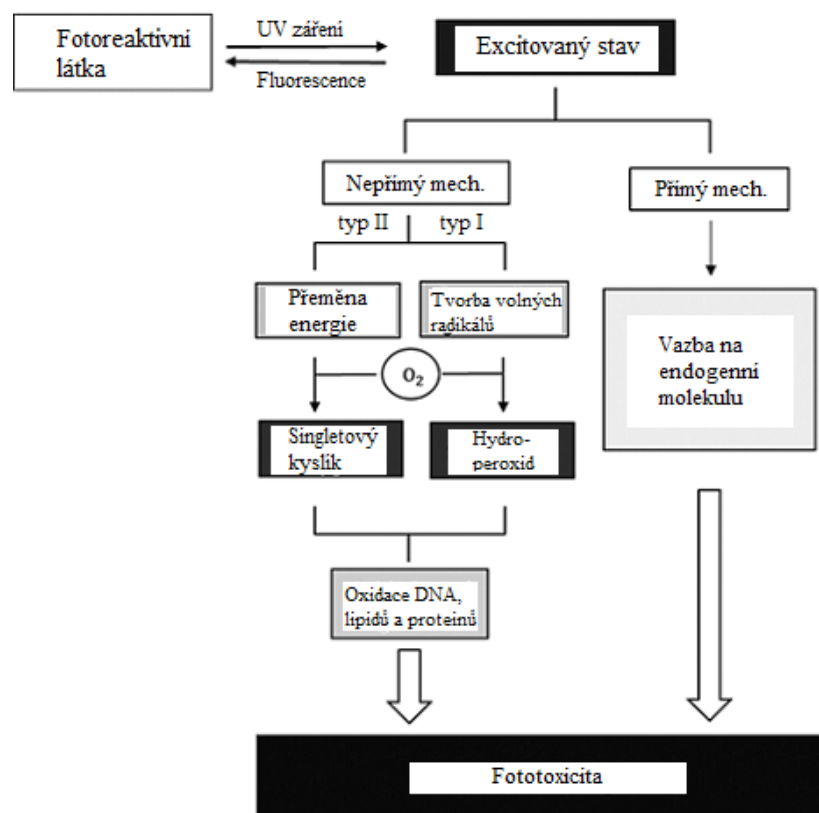
- 1) typ I,
- 2) typ II.

8.1.1.1 Nepřímý mechanismus typu I

Jedná se o jednoelektronový přenos z excitovaného chromoforu na jinou molekulu, přičemž dochází k tvorbě volných radikálů. Vzniklé volné radikály se podílí na oxidačně-redukčních reakcích, neboť tento mechanismus závisí především na oxidačním potenciálu DNA bází a redukčním potenciálu excitovaného chromoforu. V přítomnosti kyslíku tvoří vzniklé radikály hydroperoxydy, které mají za následek oxidační poškození [37], [54].

8.1.1.2 Nepřímý mechanismus typu II

Na rozdíl od mechanismu typu I je vznik volných radikálů podmíněn přenosem energie z excitovaného chromoforu na molekulární kyslík [37], [54]. Majoritně může docházet během přenosu energie k tvorbě singletového kyslíku, který je jakožto silné oxidační činidlo schopný reagovat s řadou molekul včetně DNA. Minoritně dochází ke vzniku superoxidového aniontu vlivem přenosu elektronu na molekulární kyslík. Peroxid vodíku, vzniklý dismutací superoxidového aniontu, vyvolává v přítomnosti železnatých a měďných iontů poškození molekul, neboť touto reakcí vzniká hydroxylový radikál – nejreaktivnější zástupce ROS [37].



Obr. 12 Mechanismus fototoxické reakce – upraveno podle [50]

8.2 Fotoalergická reakce

Fotoalergické reakce jsou méně časté, tedy vzácnější, postihující jen menšinu jedinců po předchozí expozici. Jedná se o imunologickou akutní nebo chronickou opožděnou reakci z přecitlivělosti zprostředkovanou T-lymfocyty [48]. Na rozdíl od fototoxických reakcí zde nedochází k hyperpigmentaci a účinky nejsou závislé na koncentraci látky. Fotoalergické reakce se podobají alergické kontaktní dermatitidě s distribucí omezenou na oblasti vystavené slunečnímu záření, s možným rozšířením do pokrytých oblastí kůže [53]. Je charakterizována především zarudnutím, pupínky a puchýřky v místech expozice fotoalergenu a ultrafialového záření. Za fotoalergeny lze označit mnohé látky z vnějšího prostředí, mezi které řadíme antibakteriální látky (např. triclosan, hexachlorofen, sulfoamidy), složky parfémů (např. syntetické pižmo), látky s ochranným účinkem proti UV záření (např. cinnamáty, salicyláty, benzofenony) a v neposlední řadě léčiva. Principem reakce je aktivace chemické látky fotony slunečního záření (především oblasti UVA vlnových délek) a její následná vazba na bílkovinu, čímž dochází ke vzniku antigenu [37], [48]. Langerhansovy buňky migrují do lymfatických uzlin a prezentují tyto antigeny T-lymfocytům [46].

8.3 Fotogenotoxická reakce

Fotogenotoxicita na rozdíl od fototoxicity popisuje genotoxické účinky slunečního záření na životaschopnou buňku zprostředkovanou chromofory. Mezi fotogenotoxické chromofory lze zařadit např. 8-methoxypsoralen, o kterém je známo, že se interkaluje do spirály DNA a po ozáření podstoupí mezisvazkové zesítnění. Chromofor chlorpromazin po ozáření UV světlem indukuje tvorbu dechlorovaných volných radikálů, které jsou schopny kovalentní vazby na DNA a jsou zodpovědné za fotogenotoxicitu. Při narušení DNA dochází ke vzniku mutace a chromozomální aberace, což může vést ke vzniku nádorů [55].

8.4 Solární erytém

Nejnápadnější akutní kožní odpovědí na UV záření je solární erytém doprovázen příznaky zánětu – zvýšená teplota, bolest hlavy, otok a v případě těžkého spálení sluncem je možný výskyt puchýřů [37]. Erytém je ostře ohraničené červené zbarvení kůže, které se objeví při zvýšení objemu krve v povrchových a hlubokých pleteních škáry v průměru o 38 % nad normální úroveň [48]. Zánětlivý proces je zahájen nerovnováhou mezi produkcí volných radikálů a jejich eliminací antioxidantními systémy, za současného vzniku oxidačního stresu

ovlivňujícího genovou expresi. Působením ROS dochází k peroxidaci membránových lipidů, což má za následek narušení biomembrán, které propouštějí zánětlivé mediátory. Příkladem mediátoru erytémové reakce je histamin, který je zodpovědný za zvýšení permeability a vazodilataci cév [37].

Minimální erytémová dávka – MED, je definovaná jako minimální jednorázová dávka UV záření, která vyvolá jasně ohraničený erytém na ozářené části kůže. MED je vyjádřena jako energie na jednotku plochy. Mezi faktory ovlivňující vznik erytému působením UV záření patří doba ozáření, dávka energie pohlcená kůží a charakteristika jedince zahrnující fototyp, tloušťku kůže a věk. V neposlední řadě závisí také na vlnových délkách použitého zdroje [37], [48].

8.5 Další účinky UV záření na kůži

Další odezvou působení UV záření na kůži může být její zvýšená pigmentace. Časná pigmentace kůže se projevuje již během expozice a dosahuje maxima bezprostředně po ní. Je výsledkem oxidace melaninu již přítomného v kůži a jeho distribuce z melanocytů do keratinocytů. Pozdní pigmentace je výsledkem zvýšené novotvorby epidermálního melaninu, která je patrná asi za 3 dny po ozáření [37], [48].

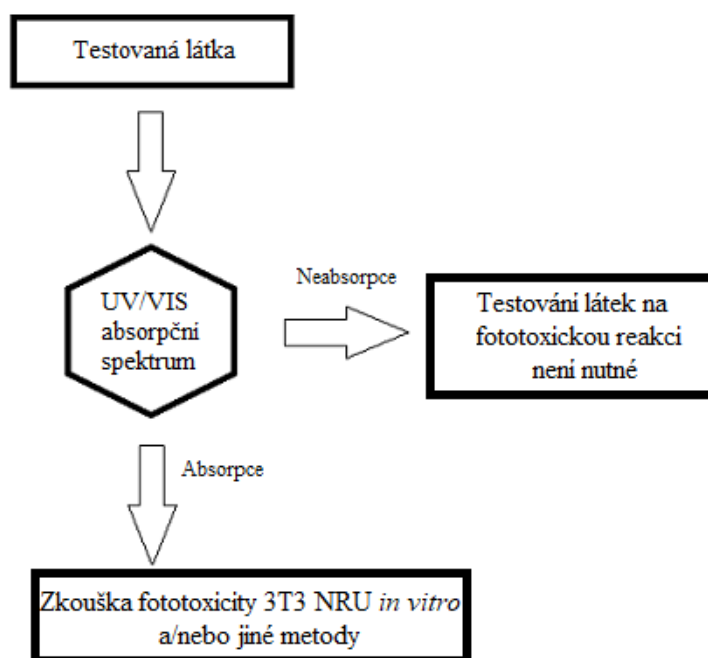
Chronické UV záření má za následek předčasné stárnutí kůže nazývané také jako fotoaging. Fotoaging se na pleti vyznačuje zejména drsností a suchostí kůže s viditelnými jemnými i hrubými vrásky doprovázené nerovnoměrnou pigmentací [42].

Fotokarcinogeneze zahrnuje veškerá poškození způsobená slunečním zářením se schopností vyústit až ke vzniku kožních nádorů. Mechanismus vniku nádoru zahrnuje poškození genetické informace, které není reparačními mechanismy opraveno. Následně dochází k přenosu poškozené DNA z mateřské buňky do buněk dceřiných. Poslední fáze zahrnuje přechod buňky v potenciálně metastazující tumor. Aktinická keratóza, bazaliom a spinaliom patří mezi nejfrekventovanější typy kožních nádorů a jsou označovány jako nemelanomové kožní nádory. Nejnebezpečnější typ kožního nádoru je maligní melanom, který se vyskytuje pouze vzácně a vzniká akutním popálením až do vzniku puchýřků [37].

Krom negativních účinků UV záření na kůži nelze opomenout také jeden pozitivní – syntéza aktivní formy vitamínu D. V první řadě 7-dehydrocholesterol absorbuje záření o vlnových délkách kratších než 320 nm za současné přeměny na provitamin D₃. Následně dochází k jeho izomeraci na formu vitamínu D₃ [48].

9 METODY STANOVENÍ FOTOTOXICITY

Společným charakteristickým rysem fototoxických látek je schopnost absorbovat světelnou energii v oblasti slunečního světla. Před zvážením biologického zkoušení musí být stanoveno UV/VIS absorpční spektrum zkoušené chemické látky podle Metodiky OECD TG 101, která vychází z předpokladu, že pokud je molární absorpční koeficient látky nižší než 10 l/mol/cm, není dotyčná chemická látka s největší pravděpodobností fotoreaktivní. Takto identifikované látky nemusí být zkoušeny zkouškou fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* ani jinými biologickými zkouškami na nepříznivé fotochemické účinky (viz Obr. 13) [37], [50], [51].



Obr. 13 Přístup ke zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* – upraveno podle [51]

Pro vyhodnocení potenciálu fototoxicity chemických látek byly zavedeny různé testovací *in vitro* a *in vivo* metody [50], [56]. V souvislosti se snížením počtu zvířat potřebných k *in vivo* metodám jsou široce využívány testy fototoxicity *in vitro*, které jsou založeny na možných toxických reakcích zprostředkovaných buňkami či modely kůže po přímém kontaktu s chemickými látkami, následované expozicí UV záření. Tyto testy zároveň umožňují určit úroveň fototoxicity na základě faktorů jako je množství a koncentrace aplikované látky, doba kontaktu látky s modelovým systémem a doba vystavení UV záření [57].

Jsou-li látky vyvíjeny tak, aby byly součástí výrobků pro osobní péči určených k aplikaci na kůži, je nutné provést posouzení potenciálního fototoxického účinku [56]. Mezinárodně uznávaným postupem zkoušky fototoxicity je *in vitro* test označovaný jako 3T3 Neutral Red Uptake (3T3 NRU). Postup zkoušky definuje směrnice OECD TG 432 z roku 2004 [51]. Tato zkouška je také definována v Nařízení Komise (ES) č. 440/2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek. Postup byl vyvinut s cílem vytvořit platnou alternativu *in vitro* k používaným zkouškám *in vivo*. Výsledky porovnání ukázaly, že zkouška fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* umožňuje předpovídat akutní fototoxické účinky u zvířat a u člověka *in vivo*. [37], [51]. Zkouška fototoxicity využívající trojrozměrný (3D) model lidské kůže je další vhodnou *in vitro* alternativou k *in vivo* testování na zvířatech [57]. Jednou z výhod této metody je možnost aplikace neředěných a nerozpustných látek na 3D modely lidské kůže [37]. Dalším možným postupem zjištění fototoxického potenciálu chemických látek je zkouška využívající červené krvinky, nazývána také jako fotohemolýza. Nicméně výsledky z této zkoušky nejsou natolik průkazné, aby byla metoda zařazena mezi hlavní postupy testování fototoxicity látek [50]. Posledním zmíněným postupem zkoušky fototoxického účinku chemických látek je tzv. epikutánní test fototoxicity prováděný na dobrovolnících [37]. Jedná se o jedinou *in vivo* testovací metodu použitou v této bakalářské práci.

9.1 Zkouška fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*

Zkouška fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* přináší informace, které slouží k identifikaci fototoxického potenciálu zkoušené látky. Lépe řečeno existenci či neexistenci možného nebezpečí, které může plynout ze zkoušené látky ve spojení s expozicí UV záření nebo viditelnému světlu [37]. Mezi látky, které lze identifikovat touto zkouškou patří jednak sloučeniny, které jsou fototoxické *in vivo* po systémovém podání a po nanesení na kůži, tak i sloučeniny, které působí po nanesení na pokožku jako fotoiritanty. Co však zkouška fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* neumožňuje je hodnotit stupeň fototoxicity. Zkouška také není určena pro předpověď jiných nepříznivých účinků, které mohou plynout z kombinovaného působení chemické látky a světla, jako je fotoalergie, fotokarcinogenita či fotogenotoxicita. Byť by mnoho chemických látek, které vykazují tyto specifické vlastnosti, mohlo na tuto zkoušku pozitivně reagovat [37], [50], [51]. Mezi přednosti této zkoušky lze zahrnout především vysokou citlivost, specifitu a reprodukovatelnost [56].

9.1.1 Podstata zkušební metody

Při absorpci světla chromoforem může dojít k fototoxické odezvě, které vede k poškození buňky. Zkouška fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* je založena na srovnání cytotoxicity chemické látky při expozici necytotoxické dávce simulovaného slunečního světla a bez této expozice. Cytotoxicitu lze v této zkoušce vyjádřit jako koncentračně závislé snížení příjmu vitálního barviva neutrální červeně (NR) 24 hodin po působení zkoušené chemické látky a ozáření [37], [51]. Neutrální červeně lze charakterizovat jako slabé kationické barvivo, které nedifuzně snadno proniká buněčnými membránami a akumuluje se intracelulárně v lysozomech životaschopných buněk. Změny povrchu citlivých lysozomálních membrán působením toxických látek způsobují ztrátu pevnosti lysozomů a další změny, které se postupem času stávají nevratnými. Tyto změny vedou ke snížení schopnosti příjmu a vázání neutrální červeně. Nicméně právě na základě těchto změn lze identifikovat počet životaschopných, poškozených a mrtvých buněk, což je principem zkoušky fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* [37], [50], [51].

9.1.2 Popis metody

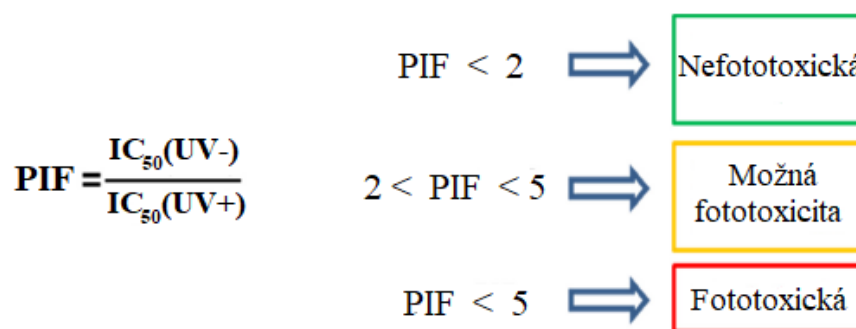
Pro testování se používá základní buněčná linie – buňka Balb/c 3T3, klon 31. Jedná se o myší fibroblast vyvinutý z myších embryí [50]. Jedním z doporučených zdrojů buněk je banka ATCC (American Type Culture Collection) v Manassasu (Virginie, USA). Jako další zdroj lze uvést banku ECACC (European Collection of Cell Cultures) v Salisbury (Wiltshire, Velká Británie). Jiné buňky či buněčné linie mohou být při stejném zkušebním postupu použity za předpokladu, že je prokázána jejich rovnocennost s ohledem na kultivační podmínky přizpůsobeny specifickým potřebám buněk [37], [51].

Buňky Balb/c 3T3 se 24 hodin kultivují, což umožňuje jejich regeneraci, přichycení a exponenciální růst k vytvoření monovrstvy. Pro každou chemickou látku se buňky vysejí stejným způsobem do dvou 96 jamkových destiček. Obě destičky se poté preinkubují osmi různými koncentracemi zkoušených chemických látek po dobu jedné hodiny. Zkoušené chemické látky musí být vhodně rozpouštěny, např. v Earlově fyziologickém roztoku (EBSS), nebo v jiných fyziologicky vyvážených pufovaných roztocích, které nesmí obsahovat proteinové složky a složky absorbující světlo (pH indikátory, vitamíny), aby nerušily při ozařování. Mezi doporučená rozpouštědla lze zařadit i dimethylsulfoxid a ethanol. Destičky jsou podrobeny celému postupu zkoušky za stejných podmínek až po následující krok, kdy je jedna

z destiček ozářena nejvyšší dávkou záření, která není cytotoxická (UV+) a druhá je udržována v temnu (UV-). U obou destiček se poté expoziční médium nahradí kultivačním médiem a po dalších 24 hodinách inkubace je životaschopnost buněk stanovena pomocí příjmu neutrální červeně (NRU) [37], [51]. Životaschopnost buněk je vyjádřena v procentech vzhledem k neexponované kontrole s rozpouštědlem a pro každou zkušební koncentraci chemické látky je vypočtena zvlášť. Pro předpověď fototoxického potenciálu se porovnají koncentračně závislé odezvy získané po expozici záření a bez expozice v hodnotě IC_{50} , tj. koncentrace zkoušené chemické látky odpovídající 50% úbytku životaschopných buněk ve srovnání s neexponovanými kontrolami [51].

9.1.3 Interpretace výsledků

Výsledkem zkoušky je fotoiritační faktor (PIF), což je faktor získaný srovnáním dvou stejně účinných cytotoxických koncentrací (IC_{50}) zkoušené chemické látky, a to při necytotoxickém ozáření UVA/VIS světlem (UV+) a bez něho (UV-). Hodnota $PIF < 2$ nepředpovídá existenci fototoxického potenciálu, zatímco hodnota > 5 tuto existenci předpovídá. Hodnoty PIF v rozmezí 2–5 předpovídají zkoušeným chemickým látkám možnou pravděpodobnost výskytu fototoxického potenciálu (viz Obr. 14) [37], [51], [56].



Obr. 14 Predikční model fotocytotoxicity pomocí PIF – upraveno podle [50]

Pozitivní výsledek zkoušky fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* ($PIF > 5$) znamená, že zkoušená látka má fototoxický potenciál. Pokud bylo dosaženo výsledku při nízkých koncentracích je také pravděpodobné, že látka bude působit za různých expozičních podmínek jako fototoxická *in vivo*. Jsou-li pozitivní fototoxické účinky pozorovány jen při nejvyšších zkoušených koncentracích, mohou být pro posouzení nebezpečnosti či intenzity fototoxicity nezbytné další úvahy, které se mohou týkat jednak údajů o penetraci, absorpci a možné akumulaci

chemické látky v kůži a jednak údajů z jiných alternativních zkoušek (např. použití modelu lidské kůže *in vitro*) [37], [51].

Negativní výsledek zkoušky fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* ($PIF < 2$) znamená, že zkoušená látka nebyla za použitých podmínek fototoxická. Jestliže bylo negativního výsledku dosaženo při vysokých koncentracích fototoxicita *in vivo* není pravděpodobná. V případě, že jsou koncentrace zkoušených chemických látek omezeny její malou rozpustností ve vodě a fototoxicita není prokázána, není patrně zkouška fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* pro takovou látku vhodná a mělo by být zváženo provedení jiné potvrzující zkoušky (zkouška *in vivo* nebo zkouška *in vitro* využívající 3D model lidské kůže) [37], [51].

9.2 Zkouška fototoxicity využívající 3D model lidské kůže

Trojrozměrný model rekonstruované lidské kůže dokáže věrně imitovat reálnou situaci v kůži a jeho citlivost k fototoxickým látkám je srovnatelná s testem fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*. Nicméně oproti buněčné kultuře použité v testu 3T3 NRU *in vitro* umožňují 3D modely lidské kůže aplikaci jednak neředěných a nerozpustných látek, tak i látek s nefyziologickým pH [37]. Mezi nevýhody této zkoušky lze zařadit poměrně krátkou životnost normálních geneticky neupravených kožních buněk, proto je nutná jejich opakovaná izolace. Kultivační média pro primární kultury (kožní buňky) jsou finančně velmi nákladné ve srovnání s liniemi, které se využívají ve zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*. V neposlední řadě je třeba zmínit jistou variabilitu dárců v genetickém pozadí, čímž jsou ovlivněny vlastnosti primárních kultur, a tedy výsledky experimentů [37].

9.2.1 Podstata zkoušky

Princip testu je v podstatě podobný testu 3T3 NRU *in vitro*, a to stanovení rozdílu životaschopných kožních buněk MTT testem po aplikaci různých koncentrací testované chemické látky a následném ozáření či neozáření nejvyšší necytotoxickou dávkou UV záření [37], [50]. Podstata metody je založena na předpokladu, že dráždivé látky vykazují schopnost proniknout difúzí přes rohovou vrstvu 3D modelu a působit cytotoxicky pro buňky v podkladových vrstvách [37]. Na 3D model rekonstruované lidské kůže se topicky nanese testovaná chemická látka, přičemž se jedna sada tkání nechá ozářit dávkou UV záření, která není cytotoxická. Životaschopnost buněk se stanovuje přeměnou vitálního žlutého barviva MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) na sůl modrého formazanu,

který se kvantitativně měří po extrakci z tkání. Reakce probíhá na mitochondriální membráně účinkem buněčných dehydrogenas a dochází k ní pouze v žijících, metabolicky aktivních buňkách. Vytvořený modrý formazan se extrahuje z tkáně pomocí vhodného rozpouštědla (např. izopropylalkohol). Optická hustota formazanového extraktu se stanovuje spektrofotometricky. Výsledky průměrných hodnot tkáně v přítomnosti a nepřítomnosti UV záření byly porovnány a látka byla označena za fototoxickou v případě, kdy jedna nebo více testovaných koncentrací dané chemické látky vykazovaly po ozáření snížení životaschopnosti kožních buněk o více než 30 % ve srovnání s identickou koncentrací neozářené dané látky [37], [58].

9.3 Zkouška fototoxicity využívající červené krvinky – fotohemolýza

Fotohemolýza je považována za jednu z nejstarších *in vitro* technik k testování možných fototoxických schopností chemických látek [37]. Pro posouzení fototoxického potenciálu se využívá UVA indukované poškození erytrocytů a jejich následná fotohemolýza. Ke stanovení se využívají ovčí červené krvinky, které jsou inkubovány společně s testovanou chemickou látkou. Po následném ozáření UV světlem dochází k další inkubaci a stanovení fotohemolýzy pomocí Drabkinova činidla spektrofotometricky měřením absorbance UV záření při vlnové délce 540 nm. Rozsah fototoxicity je úměrný množství hemoglobinu uvolněného z ovčích erytrocytů a lze jej vyjádřit rovnicí fotohemolytické aktivity (viz Obr. 15). Nicméně v dnešní době se od metody stanovení fototoxicity využívající červené krvinky upouští z důvodu nízké citlivosti, specifické a přesnosti, v závislosti na výše zmíněném testu fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*, který poskytuje relevantnější výsledky, a je tedy pro stanovení fototoxicity hojně využíván [50].

$$\text{Fotohemolytická aktivita (\%)} = \frac{\text{ADE} - \text{AD}}{\text{C}} \times 100$$

ADE: optická hustota exponovaného roztoku chemické látky s erytrocyty

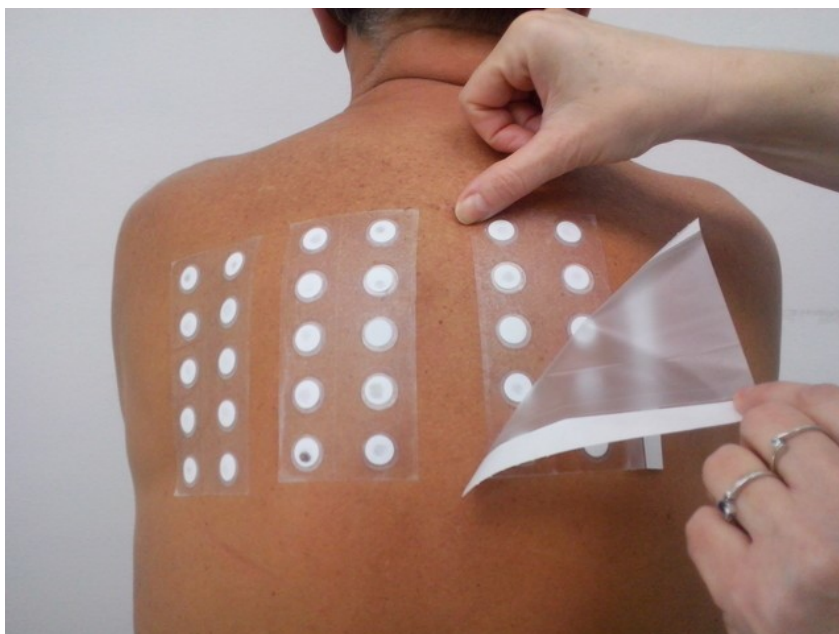
AD: optická hustota exponovaného roztoku chemické látky bez erytrocytů

C: optická hustota 100% hemolytického kontrolního roztoku

Obr. 15 Rovnice fotohemolytické aktivity – upraveno podle [50]

9.4 Zkouška fototoxicity *in vivo*

Fototoxické účinky chemických látek *in vivo* se provádí na dobrovolnících pomocí tzv. epikutánního testu fototoxicity. Studie musí být schválena Etickou komisí a dobrovolníci účastníci se tohoto testu musí být předem seznámeni s jejím průběhem, což potvrdí v informovaném souhlasu [37]. Epikutánní test fototoxicity spočívá v aplikaci dvou sad potenciálně fototoxických látek na kůži zad. Před samotným použitím se vzorky testovaných látek naředí na požadovanou koncentraci. K tomuto účelu slouží např. vazelína, sterilní voda či olej používaný do dermatologických přípravků, kde jako příklad lze uvést sezamový olej. K aplikaci vzorků se využívá techniky, kdy je látka pomocí saturovaných terčků papíru nanášena do příslušných náplastí zvaných Finn Chamber. Následně je jedna sada zakryta obvazem nepropouštějící záření a slouží jako kontrola, zatímco druhá část zad je ozářena UVA zářením, poté nastává odečítání reakce. Odečet se provádí před expozicí, ihned po ozáření a v intervalech 24, 48 a 72 hodin po expozici. Vzhledem k omezené testovací ploše zad je touto technikou možno aplikovat maximálně 30 látek [37], [58].



Obr. 16 Příklad epikutánního testu [59]

9.4.1 Interpretace výsledků

Negativní (žádná) reakce u kontrolního i ozářeného panelu předpovídá, že zkoušená látka nevykazuje fototoxické účinky. Slabá pozitivní reakce se vyznačuje vznikem slabého erytému až edému v kombinaci se suchostí či šupinatěním na většině míst aplikace testované látky. U silné pozitivní reakce lze pozorovat zřetelný erytém přesahující místo aplikace doprovázený edémem, puchýřky, šupinatěním, případně strupy. Velmi silná reakce se projevuje vznikem silného erytému zřetelně přesahující místo aplikace doprovázený edémem, velkými puchýři, hemoragií či tvorbou krusty [37].

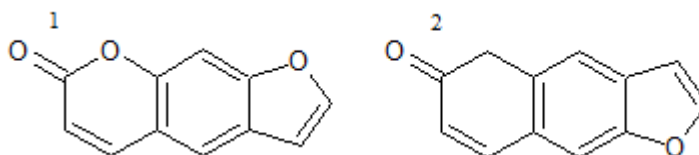
Je třeba poznamenat, že výsledky epikutánního testu fototoxicity jsou pouhými indikátory možných reakčních mechanismů, zejména fototoxicity a fotoalergie. Základní mechanismus musí být potvrzen případným provedením další zkoušky či experimentálních laboratorních studií. Mnoho chemických látek vykazuje schopnost vyvolat jak fototoxickou, tak alergickou reakci, přičemž výsledek epikutánního testu dává fotoreaktivní obraz vyplývající z okamžité (fototoxické) a zpožděné (fotoalergické) reakce [60].

10 FOTOTOXICITA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ

Esenciální oleje se považují za bezpečné především z důvodu svého přírodního původu. Nicméně označení přírodní původ nevyklučuje toxické či alergické vlastnosti produktu. Esenciální oleje mají potenciál pro vyvolání několika nežádoucích vlastností, projevujících se na kůži, mezi něž lze zařadit podráždění, senzibilizaci, a především fototoxickou či alergickou reakci [26].

Fototoxicita je zapříčiněna interakcí mezi složkou esenciálního oleje, kůží a slunečním zářením [14]. Mezi hlavní složku esenciálních olejů zodpovědnou za fototoxické účinky patří furokumariny, nacházející se převážně v zastudena lisovaných olejích z citrusových plodů [61], [62]. Jedná se o skupinu přírodních složek rostlin se základní strukturou kumarinu připojenou k furanovému kruhu. Na základě vazby kumarinu k furanovému kruhu rozlišujeme dva typy: 1) lineární furokumariny, kdy dochází k vazbě na uhlíku 6. a 7. (např. psoralen) a 2) angulární furokumariny, kdy dochází k vazbě na uhlíku 7. a 8. (např. angelicin) (viz Obr.17) [31].

Lineární furokumariny vykazují vyšší potenciál k fototoxické aktivitě než angulární furokumariny. Substituce, které zvyšují polaritu molekuly obvykle snižují její aktivitu. Zavedení skupiny poskytující elektrony (např. methylové skupiny) zvyšuje fotosenzibilizační aktivitu furokumarinů, zatímco zavedení skupin odebírající elektrony (např. nitro a hydroxylové skupiny) tuto aktivitu snižují [63].



Obr. 17 Chemická struktura psoralenu (1) a angelicinu (2)

Systémová a dermální expozice furokumarinům má za následek fototoxicitu. Po ozáření UVA zářením mohou furokumariny procházet fotoaktivací, která je činí vysoce reaktivními vůči cílovým biomakromolekulám, jako jsou proteiny nebo nukleové kyseliny [64], [65].

Jako nejúčinnější fotoaktivní furokumarin lze uvést bergapten (5-methoxypsoralen) a další deriváty jako jsou bergamottin, herniarin, citropten a oxypeucedanin [62]. Furokumariny vykazují svůj fototoxický potenciál již při nízkých koncentracích, přesněji 0,001 %. U bergaptenu a citroptenu lze pozorovat i potenciální fotokarcinogenní účinek [61], [66].

Mezinárodní asociace pro vonné látky (International Fragrance Association, IFRA) stanovuje omezení pro použití bergamotového oleje v kosmetických přípravcích, aplikovaných v oblastech kůže exponované slunečnímu záření. S výjimkou přípravků do koupele, mýdel a přípravků určených k oplachu z pokožky by maximální obsah bergamotového oleje v kosmetických přípravcích neměl přesáhnout hladiny 0,4 %. Důvodem je omezit nebezpečí fototoxicity a fotokarcinogeneze [58], [67]. Omezení se vztahuje také na složku bergamotového oleje – bergapten. Celkový obsah bergaptenu v kosmetických přípravcích, aplikovaných v oblastech kůže exponované slunečnímu záření, nesmí překročit hladinu 0,0015 % [68]. V dnešní době lze vyrobit bergamotový olej bez nebezpečných furokumarinů. Bergapten se odstraní společně s dalšími deriváty furokumarinu v oleji frakční destilací ve vakuu. Takto získaný olej se nazývá bergamot FCF (furocoumarin-free) [58], [69].

10.1 Mechanismus působení furokumarinů

Fototoxický potenciál spočívá ve vazbě furokumarinů na pyrimidinové báze DNA. Optimální vlnová délka pro aktivaci furokumarinů se nachází v UVA spektru (320–400 nm). Furokumariny tvoří s DNA komplex zprostředkovaný slabými interakcemi, jako jsou Van der Waalsovy síly a vodíkové můstky. Po vystavení UVA záření je aktivní molekula furokumarinu vázána cykloadicí na pyrimidinové báze (zejména na thymin) za vzniku silné kovalentní vazby. Vzniklý monofunkční adukt může absorbovat další foton, což indukuje reakci s jinou skupinou pyrimidinové báze na opačném konci řetězce DNA, což vede k zesílení mezi protilehlými řetězci DNA [46], [73].

10.2 Účinky furokumarinů na organismus

Esenciální oleje obsahující furanokumariny mohou po počátečním fotosenzibilizačním účinku vyvolat fototoxické reakce, které lze pozorovat jako erytém a edém doprovázený vznikem puchýřů. Po počáteční tvorbě erytému dochází k výrazné pigmentaci [70]. Takto zprostředkovaná kožní reakce nese označení fytofotodermatitida. Za aktivní chemické sloučeniny identifikované při fytofotodermatidě lze označit psoraleny. Psoraleny způsobují zesílení DNA, čímž inhibují buněčný růst a dělení. Psoraleny jsou také zodpovědné za aktivaci fotoprotekce stimulací zvýšené tvorby melaninu, zvýšené syntézy keratinu a stimulováním zesílení rohové vrstvy. Následkem toho dochází k hyperpigmentaci. Tato reakce probíhá nezávisle na imunitním systému hostitele, což dokazuje, že se nejedná o fotoalergickou reakci [71].



Obr. 18 Projev fytofotodermatitidy [72]

V terapeutických dávkách a omezené aplikaci se furanokumariny využívají při léčbě psoriázy (lupénka) a vitiliga, což je kožní onemocnění zprostředkované ztrátou pigmentu. Fototoxické účinky vykazují esenciální oleje z citrusových plodů, jedná se zejména o bergamotový olej, kde hlavní složkou zodpovědnou za fototoxické účinky je bergapten [70].

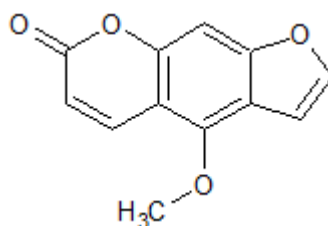
10.3 Fototoxicita jednotlivých furokumarinů

Hlavní nevýhodou při hodnocení rizika fototoxicity furokumarinů je skutečnost, že se v rostlinách vyskytuje vždy směs několika jednotlivých furokumarinů a u většiny těchto sloučenin nejsou k dispozici žádné údaje o jejich fototoxickém účinku [65].

Obecný mechanismus účinků furokumarinů je popsán v předchozí kapitole 10.1, přičemž všechny furanokumariny působí stejným mechanismem, i když se liší v chemické struktuře. Z důvodu nedostatku odborné literatury na příčinu a mechanismus fototoxické reakce jednotlivých furanokumarinů bude tato kapitola věnována odborné studii. Předložená studie se zabývá zejména stanovením minimální koncentrace bergaptenu vyvolávající fototoxickou reakci na kůži.

10.3.1 Bergapten (5-methoxypsoralen)

Bergapten se řadí mezi hlavní složku bergamotového oleje zodpovědnou za vyvolání fototoxické reakce. Pomocí epikutánního testu fototoxicity (viz kapitola 9.4) lze stanovit koncentraci bergaptenu potřebnou k tvorbě erytému na kůži. Studie prokázala negativní výsledky, tedy žádnou viditelnou reakci na kůži po ozáření UVA zářením, při aplikaci bergaptenu o koncentraci 0,0001 %. S postupným zvyšováním koncentrace docházelo k rapidnímu růstu kožní toxické reakce. Erytém byl pozorován u aplikace bergaptenu o koncentraci 0,001 %. Vznik erytému doprovázený edémem se projevil po aplikaci bergaptenu o koncentraci 0,01 %. Velmi silnou kožní reakci způsobila aplikace bergaptenu s koncentrací 0,1 %. Reakce se projevovala zejména vznikem erytému a edému doprovázených tvorbou puchýřů [66].



Obr. 19 Chemická struktura bergaptenu

ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce je zaměřena na současný stav znalostí v oblasti esenciálních olejů. Kvalitu esenciálních olejů významně ovlivňuje způsob jejich získávání. Rozlišujeme tři hlavní procesy, mezi něž řadíme lisování, destilaci a extrakci. Lisováním se získávají esenciální oleje výhradně z citrusových plodů. Esenciální olej velmi vysoké kvality lze získat destilací, která se navzdory nejméně šetrnému způsobu využívá nejčastěji. Nevšedním příkladem extrakce je enfleuráž, kdy dochází k extrakci do tuku. Esenciální oleje nesou z hlediska jejich biologické aktivity velký potenciál. Perspektivní je zejména jejich antimikrobiální aktivita. Díky stále se zvyšující rezistenci mikroorganismů vůči antibiotikům a antivirotikům by esenciální oleje v dnešní době mohly být potencionálním zdrojem alternativních antimikrobiálních látek a antivirových léků.

Vystavení pokožky slunečnímu záření a fotoreaktivním xenobikům může způsobit abnormální kožní reakci – fototoxicitu. Fototoxicita je akutní, světlem indukovaná odezva látky, které nastává v době, kdy jsou fotoreaktivní látky aktivovány slunečním zářením a transformovány na látky cytotoxické vůči kožním buňkám. Nejnápadnější akutní kožní odpovědí na UV záření je solární erytém doprovázen příznaky zánětu.

Pro vyhodnocení potenciálu fototoxicity chemických látek byly studovány různé testovací *in vitro* a *in vivo* metody. Mezinárodně uznávaným postupem zkoušky fototoxicity je *in vitro* test označovaný jako 3T3 Neutral Red Uptake. Zkouška je založena na srovnání cytotoxicity chemické látky při expozici necytotoxické dávce simulovaného slunečního světla a bez této expozice. Cytotoxicita je vyjádřena jako koncentračně závislé snížení příjmu vitálního barviva neutrální červeně 24 hodin po působení zkoušené chemické látky a následným ozářením. Díky své vysoké citlivosti, specificitě a reprodukovatelnosti se řadí mezi nejhojněji využívanou metodu. Doplňkovou metodou k testu fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* je zkouška fototoxicity využívající 3D model lidské kůže, který dokáže věrně imitovat reálnou situaci v kůži. Principem zkoušky je stanovení rozdílu životaschopných kožních buněk MTT testem po aplikaci různých koncentrací testované chemické látky a následném ozářením či neozářením nejvyšší necytotoxickou dávkou UV záření. Životaschopnost buněk se stanovuje přeměnou vitálního žlutého barviva MTT na sůl modrého formazanu. Poslední zmíněnou *in vitro* metodou je zkouška fototoxicity využívající červené krvinky. Pro posouzení fototoxického potenciálu se využívá UVA indukované poškození erytrocytů a jejich následná fotohemolýza. Nicméně výsledky z této zkoušky nejsou natolik průkazné, aby byla metoda zařazena mezi

hlavní postupy testování fototoxicity chemických látek. Jedinou zmíněnou *in vivo* alternativní metodou pro stanovení fototoxického účinku chemických látek v předložené bakalářské práci je epikutánní test fototoxicity. Podstata této zkoušky spočívá v aplikaci dvou sad potencionálně fototoxických látek na kůži zad dobrovolníků. Následně je jedna sada zakryta obvazem nepropouštějící záření a slouží jako kontrola, zatímco druhá část zad je ozářena UVA zářením. Odečty reakce se provádí před expozicí, ihned po ozáření a v intervalech 24, 48 a 72 hodin po expozici. Pozitivní reakce se projevuje vznikem erytému, edému, puchýřů či hemoragií.

Fototoxicita je zapříčiněna interakcí mezi složkou esenciálního oleje, kůží a slunečním zářením. Fototoxický potenciál spočívá ve vazbě furokumarinů na pyrimidinové báze DNA. Následkem toho dochází k zesílení DNA, čímž je inhibován buněčný růst a dělení. Výsledkem této reakce je vznik erytému a edému s následnou tvorbou puchýřů. Poté dochází k výrazné pigmentaci. Za fototoxické účinky esenciálních olejů jsou zodpovědné lineární furokumariny, které lze nalézt v zastudena lisovaných olejích z citrusových plodů. Jedná se zejména o bergapten, nazývaný také jako 5-methoxypsoralen.

Záměrem bakalářské práce bylo popsat mechanismus a příčinu fototoxického účinku jednotlivých furokumarinů v esenciálních olejích. Avšak ani české, ani zahraniční literární zdroje momentálně tyto informace neposkytují. Na základě dostupné odborné literatury bylo zjištěno, že všechny furokumariny, byť se liší chemickou strukturou, působí stejným mechanismem. V kosmetických přípravcích určených k aplikaci na kůži záleží pouze na míře použité koncentrace furokumarinů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DHIFI, Wissal, Sana BELLILI, Sabrine JAZI, Nada BAHLOUL a Wissem MNIF. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines* [online]. 2016, **3**(4) [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.3390/medicines3040025. ISSN 2305-6320. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2305-6320/3/4/25>
- [2] BERGER, Ralf G. *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. New York: Springer, 2007. ISBN 978-3-540-49338-9.
- [3] SWAMY, Mallappa Kumara, Mohd Sayeed AKHTAR a Uma Rani SINNIAH. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2016, **2016**, 1-21 [cit. 2018-12-02]. DOI: 10.1155/2016/3012462. ISSN 1741-427X. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2016/3012462/>
- [4] FERNANDEZ-LOPEZ, Juana a Manuel VIUDA-MARTOS. *Application of Essential Oils in Food Systems* [online]. Basel, Switzerland: MDPI, 2018 [cit. 2018-12-06]. ISBN 978-3-03897-048-4. ISSN 2304-8158. Dostupné z: [http://www.mdpi.com/journal/foods/special issues/Application Essential Oils](http://www.mdpi.com/journal/foods/special%20issues/Application%20Essential%20Oils)
- [5] HASHEMI, Seyed Mohammad Bagher, Amin Mousavi KHANEGHAH a Anderson de Souza SANT'ANA. *Essential oils in food processing: chemistry, safety and applications*. Hoboken, New Jersey: John Wiley, 2018. IFT Press series. ISBN 978-111-9149-354.
- [6] BAŞER, K. H. C a Gerhard BUCHBAUER. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. Boca Raton, 2010. ISBN 978-1-4200-6315-8.
- [7] PANDEY, Abhay K., Pradeep KUMAR, Pooja SINGH, Nijendra N. TRIPATHI a Vivek K. BAJPAI. Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, **7** [cit. 2018-12-02]. DOI:

- 10.3389/fmicb.2016.02161. ISSN 1664-302X. Dostupné z:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.02161/full>
- [8] BAKKALI, F., S. AVERBECK, D. AVERBECK a M. IDAOMAR. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, **46**(2), 446-475. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.106. ISSN 02786915. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691507004541>
- [9] *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. Amsterdam: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2016. ISBN 978-0-12-416641-7.
- [10] SHARIFI-RAD, Javad, Antoni SUREDA, Gian TENORE et al. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. *Molecules* [online]. 2017, **22**(1) [cit. 2018-12-04]. DOI: 10.3390/molecules22010070. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/1/70>
- [11] DVOŘÁKOVÁ, Marcela, Irena VALTEROVÁ a Tomáš VANĚK. *MONOTERPENY V ROSTLINÁCH* [online]. Chem. listy, 2011, (105), 839-845 s. [cit. 2018-12-03].
- [12] LANGMAIER, Ferdinand. *Základy kosmetických výrob*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2001. Učební texty vysokých škol. ISBN 80-731-8016-2.
- [13] Citrus Oil Guide. In: *AromaWeb* [online]. b.r. [cit. 2019-04-02]. Dostupné z:
<https://www.aromaweb.com/essentialoils/citrusessentialoils.asp>
- [14] BUCKLE, Jane. *Clinical aromatherapy: Essential Oils in Practise*. 2e. USA: Elsevier Science, 2003. ISBN 0-443-07236-1.
- [15] VAUGHN, Alexandra R., Ashley K. CLARK, Raja K. SIVAMANI a Vivian Y. SHI. Natural Oils for Skin-Barrier Repair: Ancient Compounds Now Backed by Modern Science. *American Journal of Clinical Dermatology* [online]. 2018, **19**(1), 103-117 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1007/s40257-017-0301-1. ISSN 1175-0561. Dostupné z:
<http://link.springer.com/10.1007/s40257-017-0301-1>
- [16] SALVADOR, Amparo a Alberto CHISVERT. *Analysis of cosmetic products*. London: Elsevier, 2007. ISBN 978-0-444-52260-3.
- [17] ZERMANE, A., A.-H. MENIAI a D. BARTH. *Supercritical CO₂ Extraction of Essential Oil from Algerian Rosemary (Rosmarinus officinalis L.)*. 2010, **33**(3), 489-

498. DOI: 10.1002/ceat.200900381. ISSN 09307516. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ceat.200900381>
- [18] HUANG, Zhen, Xiao-han SHI a Wei-juan JIANG. Theoretical models for supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, **1250**, 2-26 [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.04.032. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967312005894>
- [19] MARONGIU, Bruno, Silvia PORCEDDA, Giovanna Della PORTA a Ernesto REVERCHON. Extraction and isolation of *Salvia desoleana* and *Mentha spicata* subsp. *insularis* essential oils by supercritical CO₂. *Flavour and Fragrance Journal* [online]. 2001, **16**(5), 384-388 [cit. 2018-11-25]. DOI: 10.1002/ffj.1021. ISSN 0882-5734. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.1021>
- [20] HEMZAL, Boleslav. *Léčivé oleje*. Brno: Neptun, 2016. ISBN 978-80-86850-12-2.
- [21] SELL, Charles. *The Chemistry of Fragrances: From Perfumer to Consumer*. 2nd edition. Cambridge UK: The Royal Society of Chemistry, 2006. ISBN 0-85404-824-3.
- [22] SURBURG, Horst, Johannes PANTEN a Kurt BAUER. *Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses*. 5th completely rev. and enl. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2006. Učební texty vysokých škol. ISBN 3-527-31315-X.
- [23] Extração da cafeína utilizando CO₂ supercrítico. In: *Momento Químico* [online]. b.r. [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: <https://jornalmomentoquimico.wordpress.com/2017/02/17/extracao-da-cafeina-utilizando-co2-supercritico/>
- [24] Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines* [online]. 2017, **4**(3) [cit. 2018-12-03]. DOI: 10.3390/medicines4030058. ISSN 2305-6320. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2305-6320/4/3/58>
- [25] THORMAR, Halldor. *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. Chichester, West Sussex: J. Wiley, 2011. ISBN 978-047-0741-788.

- [26] DREGER, Mariola a Karolina WIELGUS. Application of essential oils as natural cosmetic preservatives. *Herba Polonica* [online]. 2013, **59**(4), 142-156 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.2478/hepo-2013-0030. ISSN 0018-0599. Dostupné z: <http://content.sciendo.com/view/journals/hepo/59/4/article-p142.xml>
- [27] WEI, Alfreda a Takayuki SHIBAMOTO. Medicinal Activities of Essential Oils. *Bioactive Foods in Promoting Health* [online]. Elsevier, 2010, , 59-70 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/B978-0-12-374628-3.00004-9. ISBN 9780123746283. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123746283000049>
- [28] REICHLING, Jürgen, Paul SCHNITZLER, Ulrike SUSCHKE a Reinhard SALLER. Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties – an Overview. *Complementary Medicine Research* [online]. 2009, **16**(2), 79-90 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1159/000207196. ISSN 2504-2092. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/207196>
- [29] DJILANI, Abdelouaheb a Amadou DICKO. The Therapeutic Benefits of Essential Oils. *Nutrition, Well-Being and Health* [online]. InTech, 2012 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.5772/25344. ISBN 978-953-51-0125-3. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/nutrition-well-being-and-health/the-therapeutic-benefits-of-essential-oils>
- [30] BEKHIT, A.E.D. a A.A. BEKHIT. *Natural Antiviral Compounds* [online]. Elsevier, 2014, , 195-228 [cit. 2019-04-29]. Studies in Natural Products Chemistry. DOI: 10.1016/B978-0-444-63281-4.00007-0. ISBN 9780444632814. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444632814000070>
- [31] HUNG, Wei-Lun, Joon Hyuk SUH a Yu WANG. Chemistry and health effects of furanocoumarins in grapefruit. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. 2017, **25**(1), 71-83 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.11.008. ISSN 10219498. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949816301843>
- [32] ELANSARY, Hosam O., Samir A. M. ABDELGALEIL, Eman A. MAHMOUD, Kowiyou YESSOUFOU, Khalid ELHINDI a Salah EL-HENDAWY. Effective antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of essential oils of horticultural aromatic crops in northern Egypt. *BMC Complementary and Alternative Medicine*

- [online]. 2018, 18(1) [cit. 2018-12-03]. DOI: 10.1186/s12906-018-2262-1. ISSN 1472-6882. Dostupné z: <https://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-018-2262-1>
- [33] MOHAMED, Amal A., Sami I. ALI, Farouk K. EL-BAZ a Dee A. CARTEL. Antioxidant and Antibacterial Activities of Crude Extracts and Essential Oils of *Syzygium cumini* Leaves. PLoS ONE [online]. 2013, 8(4) [cit. 2019-04-05]. DOI: 10.1371/journal.pone.0060269. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0060269>
- [34] SADGROVE, Nicholas a Graham JONES. A Contemporary Introduction to Essential Oils: Chemistry, Bioactivity and Prospects for Australian Agriculture. Agriculture [online]. 2015, 5(1), 48-102 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.3390/agriculture5010048. ISSN 2077-0472. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2077-0472/5/1/48>
- [35] SENDRA, Esther. Essential Oils in Foods: From Ancient Times to the 21st Century. Foods [online]. 2016, 5(4) [cit. 2019-03-30]. DOI: 10.3390/foods5020043. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2304-8158/5/2/43>
- [36] Essential Oils and Their Single Compounds in Cosmetics—A Critical Review. Cosmetics. 2018, 5(1), 11. DOI: 10.3390/cosmetics5010011. ISSN 2079-9284. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2079-9284/5/1/11>
- [37] RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ, Alena. Poškození kůže působením slunečního záření a možnosti ochrany a prevence. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2012. ISBN 978-80-244-3183-3.
- [38] ROZSÍVALOVÁ, Věra. Kosmetika I pro studijní obor Kosmetička. 2., aktualiz. vyd. Praha: Informatorium, 2010. ISBN 978-80-7333-080-4.
- [39] ŠTORK, Jiří. Dermatovenerologie. 2. vyd. Praha: Galén, 2013. ISBN 978-80-7262-898-8.
- [40] If all cells have the same genes, explain why skin cells are so different compared to heart cells?. In: SOCRATIC [online]. b.r. [cit. 2019-03-31]. Dostupné z: <https://www.socratic.net/>

<https://socratic.org/questions/if-all-cells-have-the-same-genes-explain-why-skin-cells-are-so-different-compare>

- [41] D'ORAZIO, John, Stuart JARRETT, Alexandra AMARO-ORTIZ a Timothy SCOT' UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2014(6), 12222-12248 [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.3390/ijms140612222. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/14/6/12222>
- [42] DRAELOS, Zoe Kececioglu. *Cosmetic dermatology: products and procedure*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell Pub., 2010. ISBN 978-140-5186-353.
- [43] BAUMANN, Leslie. *Cosmetic dermatology and medicine: principles and practice*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 2009. ISBN 978-0-07-164128-9.
- [44] SINGER, Sebastian, Sigrid KARRER a Mark BERNEBURG. Modern sun protection. *Current Opinion in Pharmacology* [online]. 2019, 46, 24-28 [cit. 2019-03-22]. DC 10.1016/j.coph.2018.12.006. ISSN 14714892. Dostupné <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471489218301243>
- [45] ROMANHOLE, R. C., J. A. ATAIDE, P. MORIEL a P. G. MAZZOLA. Update on ultraviolet A and B radiation generated by the sun and artificial lamps and their effect on skin. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2015, 37(4), 366-370 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1111/ics.12219. ISSN 01425463. Dostupné <http://doi.wiley.com/10.1111/ics.12219>
- [46] PALMER, Roy A. a Ian R. WHITE. Phototoxic and Photoallergic Reactions. *Contact Dermatitis* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2006, , 309-317 [cit. 2019-07-07]. DOI: 10.1007/3-540-31301-X_17. ISBN 3-540-24471-9. Dostupné http://link.springer.com/10.1007/3-540-31301-X_17
- [47] YOUNG, Antony R., Joël CLAVEAU a Ana Beatris ROSSI. Ultraviolet radiation at the skin: Photobiology and sunscreen photoprotection. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. 2017, 76(3), 100-109 [cit. 2019-03-31]. DC 10.1016/j.jaad.2016.09.038. ISSN 01909622. Dostupné <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962216308805>

- [48] ETTLER, Karel. Fotoprotekce kůže: ochrana kůže před účinky ultrafialového zářer Praha: Triton, 2004. ISBN 80-725-4463-2.
- [49] AVELINE, Béatrice M. Chapter 2 Primary processes in photosensitization mechanism Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology [online]. Elsevier 2001, , 17-37 [cit. 2019-05-05]. Comprehensive Series in Photosciences. DC 10.1016/S1568-461X(01)80106-X. ISBN 9780444508287. Dostupné <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568461X0180106X>
- [50] KIM, Kyuri, Hyeonji PARK a Kyung-Min LIM. Phototoxicity: Its Mechanism ar Animal Alternative Test Methods. Toxicological Research [online]. 2015, 31(2), 97-10 [cit. 2019-03-29]. DOI: 10.5487/TR.2015.31.2.097. ISSN 1976-8257.
- [51] Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test: OECD Guidelines for the Testir of Chemicals [online]. Paris: OECD Publishing, b.r. [cit. 2019-03-31]. DC 10.1787/9789264071162-en.
- [52] KLEINMAN, Mark H., Mark D. SMITH, Edit KURALI et al. An evaluation of chemic photoreactivity and the relationship to phototoxicity. Regulatory Toxicology ar Pharmacology [online]. 2010, 58(2), 224-232 [cit. 2019-03-29]. DC 10.1016/j.yrtph.2010.06.013. ISSN 02732300. Dostupné <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230010001054>
- [53] LUGOVIĆ, Liborija, Mirna ŠITUM, Suzana OŽANIĆ-BULIĆ a Ines SJEROBABSK MASNEC. Phototoxic and Photoallergic Skin Reactions. Collegium Antropologicu [online]. Department of Dermatology and Venereology, Zagreb (Croatia), 2007, 31(1 63-67 [cit. 2019-04-30]. Dostupné https://www.researchgate.net/publication/6359826_Phototoxic_and_Photoallergic_Ski_Reactions/citations
- [54] KUTLUBAY, Zekayi, Ayşegül SEVİM, Burhan ENGIN a Yalçın TÜZÜT Photodermatoses, including phototoxic and photoallergic reactions (internal ar external). Clinics in Dermatology [online]. 2014, 32(1), 73-79 [cit. 2019-04-04]. DC 10.1016/j.clindermatol.2013.05.027. ISSN 0738081X. Dostupné <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0738081X13000941>

- [55] STRUWE, Melanie, Karl-Otto GREULICH, Willi SUTER a Ulla PLAPPERT-HELBIG. The photo comet assay—A fast screening assay for the determination of photogenotoxicity in vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* [online]. 2007, 632(1-2), 44-57 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2007.04.014. ISSN 13835718. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383571807001313>
- [56] NATHALIE, Dijoux, Guingand YANNICK, Bourgeois CAROLINE, Durar SANDRINE, Fromageot CLAUDE, Combe CORINNE a Ferret PIERRE-JACQUE. Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay. *Toxicology in Vitro* [online]. 2006, 20(4), 480-489 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1016/j.tiv.2005.08.018. ISSN 08872333. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233305001748>
- [57] UCO, Dayane P., Vânia R. LEITE-SILVA, Heron D.T. SILVA, Marcelo D. DUQUE, Jeffrey GRICE, Monica B. MATHOR, Newton ANDRÉO-FILHO a Patricia S. LOPEZ. UVA and UVB formulation phototoxicity in a three-dimensional human skin model: Photodegradation effect. *Toxicology in Vitro* [online]. 2018, 53, 37-44 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1016/j.tiv.2018.07.009. ISSN 08872333. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233318303618>
- [58] KEJLOVÁ, K., D. JÍROVÁ, H. BENDO VÁ, H. KANDÁROVÁ, Z. WEIDENHOFER, H. KOLÁŘOVÁ a M. LIEBSCH. Phototoxicity of bergamot oil assessed by in vitro techniques in combination with human patch tests. *Toxicology in Vitro* [online]. 2007, 21(7), 1298-1303 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1016/j.tiv.2007.05.016. ISSN 08872333. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233307001671>
- [59] Testy kontaktní alergie. In: KOŽNÍ AMBULANCE KUTNÁ HORA [online]. b.r. [cit. 2019-05-05]. Dostupné z: <https://www.kozni-kutna-hora.cz/epikutanni-testy>
- [60] SPIELMANN, Horst, Lutz MÜLLER, Dietrich AVERBECK et al. The Second ECVAI Workshop on Phototoxicity Testing. *Alternatives to Laboratory Animals* [online]. Elsevier, 2000, 28(6), 777-814 [cit. 2019-05-05]. Comprehensive Series Photosciences. DOI: 10.1177/026119290002800603. ISBN 9780444508287. ISSN 0261-1929. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/026119290002800603>

- [61] TISSERAND, Robert a Rodney YOUNG. Essential oil safety: a guide for health care professionals. Second edition. Edinburgh: Elsevier, 2014. ISBN 978-0-4430-6241-4.
- [62] KEJLOVÁ, Kristina, Dagmar JÍROVÁ, Hana BENDOVIČ, Petr GAJDOŠ a Hana KOLÁŘOVÁ. Phototoxicity of essential oils intended for cosmetic use. *Toxicology in Vitro* [online]. 2010, 24(8), 2084-2089 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1016/j.tiv.2010.07.025. ISSN 08872333. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233310001864>
- [63] IVIE, G. Wayne. TOXICOLOGICAL SIGNIFICANCE OF PLANT FUROCOUMARINS. *Effects of Poisonous Plants on Livestock* [online]. Elsevier, 1977, 475-485 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1016/B978-0-12-403250-7.50052-2. ISBN 9780124032507. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124032507500522>
- [64] RAQUET, Nicole a Dieter SCHRENK. Application of the equivalency factor concept to the phototoxicity and –genotoxicity of furocoumarin mixtures. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2014, 68, 257-266 [cit. 2019-05-15]. DOI: 10.1016/j.fct.2014.03.014. ISSN 02786915. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691514001434>
- [65] LOHR, Christiane, Nicole RAQUET a Dieter SCHRENK. Application of the concept of relative photomutagenic potencies to selected furocoumarins in V79 cells. *Toxicology in Vitro* [online]. 2010, 24(2), 558-566 [cit. 2019-05-15]. DOI: 10.1016/j.tiv.2009.10.011. ISSN 08872333. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233309003269>
- [66] KAVLI, G., J. RAA, B. E. JOHNSON, G. VOLDEN a S. HAUGSBØ. Furocoumarins in *Heracleum Laciniatum*: isolation, phototoxicity, absorption and action spectra studies. *Contact Dermatitis* [online]. 1983, 9(4), 257-262 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1111/j.1600-0536.1983.tb04386.x. ISSN 01051873. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0536.1983.tb04386.x>
- [67] INTERNATIONAL FRAGRANCE ASSOCIATION. IFRA Standard: Bergamot citrus oil expressed. 48. Geneva, 1992. Dostupné také z: <http://www.ifraorg.org/>

- [68] INTERNATIONAL FRAGRANCE ASSOCIATION. IFRA standard: Citrus oils and other furocoumarins containing essential oils. 48. Geneva, 1996. Dostupné také <http://www.ifraorg.org/>
- [69] BELSITO, Emilia L., Concetta CARBONE, Maria L. DI GIOIA, Antonella LEGGI, Angelo LIGUORI, Francesca PERRI, Carlo SICILIANO a Maria C. VISCOMI. Comparison of the Volatile Constituents in Cold-Pressed Bergamot Oil and a Volatile Oil Isolated by Vacuum Distillation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2007, 55(19), 7847-7851 [cit. 2019-05-15]. DOI: 10.1021/jf070997q. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf070997q>
- [70] SVENDSEN, A. Baerheim, ed. a J. J. C. SCHEFFER, ed. *Essential Oils and Aromatic Plants* [online]. 1985, , 217–231 [cit. 2019-05-08]. DOI: 10.1007/978-94-009-5137-2.
- [71] WEBER, Ian C, Charles P DAVIS a David M GREESON. Phytophotodermatitis: the other “lime” disease. *The Journal of Emergency Medicine* [online]. 1999, 17(2), 235-240 [cit. 2019-05-15]. DOI: 10.1016/S0736-4679(98)00159-0. ISSN 07364679. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0736467998001590>
- [72] HAEBICH, Geraldine a Ru KATUGAMPOLA. Phytophotodermatitis triggered by parsnips. *BMJ* [online]. b.r. [cit. 2019-05-15]. DOI: 10.1136/bmj.j2383. ISSN 0959-8138. Dostupné z: <http://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.j2383>
- [73] MELOUGH, Melissa M., Eunyoung CHO a Ock K. CHUN. Furocoumarins: A review of biochemical activities, dietary sources and intake, and potential health risks. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2018, 113, 99-107 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1016/j.fct.2018.01.030. ISSN 02786915. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691518300309>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

3D	Trojrozměrný model.
AFNOR	Agence Française de Normalization.
ATCC	American Type Culture Collection.
CO ₂	Oxid uhličitý.
DNA	Deoxyribonukleová kyselina.
EBSS	Earlův fyziologický roztok.
ECACC	European Collection of Cell Cultures.
FCF	Furocoumarin-free.
IC ₅₀	Koncentrace látky odpovídající 50% úbytku životaschopných buněk ve srovnání s kontrolou
IFRA	International Fragrance Association.
IR	Infračervené záření.
MED	Minimální erytémová dávka.
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
NR	Neutral Red
NRU	Neutral Red Uptake
OECD	Organization for Economical Cooperation and Development.
PIF	Fotoiritační faktor.
RNA	Ribonukleová kyselina.
RNS	Reaktivní forma dusíku.
ROS	Reaktivní forma kyslíku.
SFE	Superkritická fluidní extrakce.
UV	Ultrafialové záření.
VIS	Viditelné záření.

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 Chemická struktura izoprenové jednotky</i>	12
<i>Obr. 2 Chemická struktura prenolu</i>	13
<i>Obr. 3 Chemická struktura myrcenu</i>	14
<i>Obr. 4 Chemická struktura farnesolu.....</i>	14
<i>Obr. 5 Chemická struktura kyseliny šikimové</i>	15
<i>Obr. 6 Části citrusových plodů – upraveno podle [13].....</i>	16
<i>Obr. 7 Destilace vodní parou – upraveno podle [15]</i>	17
<i>Obr. 8 Enfleuráž [23]</i>	19
<i>Obr. 9 Struktura pokožky – upraveno podle [40].....</i>	27
<i>Obr. 10 Průnik jednotlivých složek záření do lidské kůže – upraveno podle [37].....</i>	29
<i>Obr. 11 Průběh fototoxické reakce – upraveno podle [50]</i>	33
<i>Obr. 12 Mechanismus fototoxické reakce – upraveno podle [50]</i>	35
<i>Obr. 13 Přístup ke zkoušce fototoxicity 3T3 NRU in vitro – upraveno podle [51]....</i>	38
<i>Obr. 14 Predikční model fotocytotoxicity pomocí PIF – upraveno podle [50]</i>	41
<i>Obr. 15 Rovnice fotohemolytické aktivity – upraveno podle [50].....</i>	43
<i>Obr. 16 Příklad epikutanního testu [59].....</i>	44
<i>Obr. 17 Chemická struktura psoralenu (1) a angelicinu (2)</i>	46
<i>Obr. 18 Projev fytodermatitidy [72].....</i>	48
<i>Obr. 19 Chemická struktura bergaptenu</i>	49