

Toto PDF obsahuje kapitolu z knihy:  
Zdeněk Fiala, Drahomíra Holmannová (ed.):  
*Uhlíkové nanomateriály. Biomedicínské aplikace a toxicita*,  
Praha: Karolinum 2025,  
<https://doi.org/10.14712/9788024659848>.

## **6. Kožní a oční toxicita**

(Zdeněk Fiala, Drahomíra Holmannová)

© Univerzita Karlova, 2025

© Zdeněk Fiala, Drahomíra Holmannová, 2025

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

<https://doi.org/10.14712/9788024659848.6>

# 6 KOŽNÍ A OČNÍ TOXICITA

Kůže je největším a nejkompexnějším orgánem lidského těla s mnoha funkcemi. Tvoří fyzikální bariéru mezi vnějším a vnitřním prostředím a chrání organismus před chemickými, fyzikálními a mikrobiálními vlivy. Je zapojená do řady fyziologických procesů, které zahrnují termoregulaci, čítí, imunologickou surveillance, kontrolu ztráty tekutin a depozici tuků a vody. Skládá se z několika vrstev, mezi něž patří epidermis (vrchní část kůže, již kryje stratum corneum), dermis, kožní adnexa (mazové a potní žlázy a vlasové folikuly) a podkoží, ve kterém se nacházejí keratinocyty, fibroblasty, Langerhansovy buňky, buňky imunitního systému, melanocyty a Merkelovy buňky.<sup>1</sup>

Nanočástice reagují s vrchní vrstvou pokožky (epidermis), primárně se stratem corneum. To je složeno z mrtvých, plochých, terminálně diferencovaných keratinocytů (korneocytů) a extracelulární matrix, která obsahuje lipidy. Povrch strata corneum je osídlen kožním mikrobiomem, který spolu s epidermis vytváří její „kyselý plášť“ jako ochranu před útoky patogenů a pomáhá zachovávat její přirozené prostředí. Mikrobiom také interaguje s imunitním systémem, podporuje jeho funkce a brání přemnožení oportunních patogenů na povrchu kůže.<sup>2,3</sup> Hlubší vrstvy epidermis jsou tvořeny korneocyty a keratinocyty, které jsou propojené těsnými mezibuněčnými spoji. Pevnost spojů (a tedy i epitelu) se dynamicky mění v závislosti na působení externích faktorů, stimulů a fyziologických potřeb organismu. Díky tomu se mění permeabilita kůže, přestup iontů, proteinů, ale také penetrace xenobiotik či migrace imunitních buněk.<sup>4</sup>

Transdermální přestup nanočástic do organismu je modifikován jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Cesty vstupu lze v prvním přiblížení rozdělit na cesty paracelulární, intercelulární a transcelulární. Dalšími cestami pak může být průnik přes vlasové folikuly a potní a mazové žlázy.<sup>5-7</sup> Nanočástice penetrují do nižších vrstev pokožky, kde vyvolávají různé typy reakcí, mezi něž řadíme iritaci, kontaktní kopřivku, kontaktní dermatitidu a fotosensitivizaci. Současně nanočástice pronikají do systémové cirkulace a následně do orgánů a tkání.<sup>8</sup>

Při hodnocení vlivu vnější expozice je nutno zmínit také oko, které je velmi citlivé k vnějším faktorům. Nanočástice mohou dráždit jak povrch oka, tak i retinální buňky, ke kterým se dostávají jinou než topickou cestou (například inhalací nebo ze systémové cirkulace po perorální expozici). Oční toxicita tedy bude následně zmíněna společně s toxicitou kožní.<sup>9</sup>

## 6.1 IN VITRO STUDIE

*In vitro* studie dermální toxicity jsou zaměřeny na interakce uhlíkových nanočástic s jednotlivými vrstvami pokožky a s očními kompartmenty. Výsledky naznačují, že uhlíkové nanočástice mohou zvyšovat oxidační stres, vyvolávat zánětlivou odpověď, poškozovat buňky a způsobovat jejich smrt.<sup>10</sup> V následujícím textu se zaměříme na vliv CNM na různé typy buněk, které se nacházejí v pokožce. Jako poslední zmíníme toxicitu CNM vůči oku.

Vnější vlivům jsou nejvíce vystaveny keratinocyty, které představují hlavní buněčnou linii pro *in vitro* testování dermatotoxicity. Ku příkladu Frontiñán-Rubio et al. provedli dvě studie zaměřené na hodnocení dermatotoxicity vybraných uhlíkových nanomateriálů (CNM). V první studii ověřovali vliv oxidu grafenu (GO) a vícevrstvého grafenu (FLG) na metabolismus a funkce lidských immortalizovaných keratinocytů (HaCaT). Nízké koncentrace GO i FLG (5 µg/ml / 7 dní) měnily metabolický profil buněk. GO zvyšovala produkci alaninu, pyruvátu, glycerofosfocholinu a uridinofosfátu, zatímco přítomnost FLG vedla ke zvýšení hladin fumarátu, glycerofosfocholinu a ke snížení hladin pyruvátu, fosfokreatinu a fosfocholinu. Oba typy nanočástic redukovaly hladinu glukózy. Při podrobnější analýze autoři zjistili, že nanočástice zasahují do metabolických cest, které jsou kritické pro buněčnou viabilitu a mobilitu. Mezi alterovanými cestami byla syntéza proteinů, Krebsův cyklus, cyklus močovin, recyklování amonia a metabolismus methioninu. Snížení hladiny glukózy bylo spojené s nadprodukcí volných kyslíkových radikálů (ROS), zvýšením hladiny volného cytosolového Ca<sup>2+</sup>, apoptózou a nekrotizací buněk.<sup>11</sup>

V druhé studii tiž autoři testovali na keratinocytech HaCaT tři typy grafenových nanomateriálů, FLG a dva typy GO (GO1, GO2). Buňky byly kultivovány se všemi CNM (5 µg/ml) po dobu sedmi nebo třiceti dnů. Experimenty potvrdily, že přítomnost CNM mění metabolom a bioenergetiku buněk, a to zvláště v případech, kdy se buňky nacházely ve stresovém stavu. Byla rovněž zjištěna zvýšená úroveň proliferace a klonogenity buněk (zejména při kultivaci s GO2). Nadměrná míra proliferace může být spojována s vyšším rizikem vzniku a rozvoje karcinogeneze, což potvrdily některé dále uvedené indikátory. Buňky vystavené GO2 se po třiceti dnech kultivace významně zvětšily (stejně jako jejich jádra), rychleji se pohybovaly po dvojrozměrných površích v testu hojení a byla u nich zjištěna kumulace onkometabolitů. Autoři se proto domnívají, že některé typy grafenových nanočástic mohou mít (i při subchronické úrovni expozice) karcinogenní účinky.<sup>12</sup>

Toxicitu grafenu hodnotili také Salesa et al. V experimentu byl použit FLG (2–10 vrstev), který byl aplikován do kultivačních médií HaCaT v dávkách 0–10 µg/ml po dobu 12 a 24 hodin. Proliferační aktivita buněk byla posuzována za 72 a 96 hodin od aplikace. Autoři potvrdili vztah mezi dávkou a mírou toxických účinků (snížováním viability) s prahovou koncentrací 0,5 µg/ml FLG. Zajímavé bylo zjištění, že i podprahové (netoxické) koncentrace FLG 0,005 a 0,01 µg/ml dokázaly po 72 a 96 hodinách významně zvyšovat proliferační aktivitu buněk. Analýza změn v expresi třinácti vybraných genů prokázala zvýšenou expresi u šesti z nich. Jednalo se o SOD1 (superoxiddismutáza), CAT (kataláza), TGFB1 (*transforming growth factor β*), FN1 (fibronectin), CDH1 (kaderin 1) a FBN (fibrilin 1).<sup>13</sup>

Autoři Pelin et al. exponovali buňky HaCaT různým typům GO a FLG po dobu 24 a 72 hodin. Testované nanočástice redukovaly buněčnou viabilitu, alterovaly mitochondriální funkce a poškozovaly plazmatickou membránu. Nejvyšší toxicitu vykazovaly nejvíce oxidované GO s největším průměrem. Tyto částice poškozovaly mitochondrie a plazmatickou membránu již při EC<sub>50</sub> 5,4 a 2,9 µg/ml (zatímco v případě FLG byly hodnoty EC<sub>50</sub> 62,8 a 45,5 µg/ml).<sup>14</sup> Násled-

ná studie stejných autorů potvrdila již získané výsledky, a navíc zjistila, že FLG a GO v dávce 100  $\mu\text{g/ml}$  / 72 h zvyšují depolarizaci mitochondriální membrány a produkci ROS (minimálně o 44 %; významný nárůst produkce ROS byl detekován již při dávce 0,4  $\mu\text{g/ml}$  / 24 h).<sup>15</sup>

Buněčné linie HaCaT mohou být ovlivňovány také MWCNT, SWCNT a fullereny. Danielle McShan a Hongtao Yu vystavili buňky HaCaT nepurifikovaným, purifikovaným a karboxylovaným MWCNT (20  $\mu\text{g/ml}$ ) po dobu 0,5 a 24 hodin. Bylo nalezeno nevýznamné snížení viability buněk a nevýznamné poškození DNA, které zřejmě souviselo s významným nárůstem úrovně oxidačního stresu.<sup>16</sup> Brian Palmer, Sarah Phelan-Dickenson a Lisa DeLouise testovali nekarboxylované a karboxylované MWCNT (HaCaT; expozice 0–5  $\mu\text{g/ml}$  po dobu 3 a 24 hodin). MWCNT s vysokou mírou karboxylace významně snižovaly viabilitu buněk a navozovaly buněčnou smrt, zatímco nekarboxylované MWCNT významně zvyšovaly oxidační stres. Výsledky tak naznačují, že MWCNT indukují buněčnou smrt nezávisle na míře oxidačního stresu.<sup>17</sup>

Obdobně na strukturu HaCaT působí i SWCNT. Autoři Manna et al. uvádějí, že SWCNT jsou schopny redukovat viabilitu buněk i na velmi nízké expoziční hladině (0,1  $\mu\text{g/ml}$  / 72 h) a dále ji snižovat se zvyšující se dávkou. Přítomnost SWCNT vede k aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, který kontroluje expresi mnoha prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL-8, IL-1, IL-6 a TNF $\alpha$  (přímá indukce zánětu).<sup>18</sup> Ve studii autorů Onga et al. snižovaly SWCNT (12,5, 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) buněčnou viabilitu, omezovaly růst a proliferaci buněk a inhibovaly signalizaci Hsp90. Analýza genové exprese prokázala sníženou expresi Hsp90 vlivem SWCNT a narušení proteinové homeostázy v buňce. Porucha vede k progresi buněčného stárnutí (Hsp90 funguje jako chaperon podílející se na „refoldingu“ proteinů).<sup>19</sup>

K dalším uhlíkovým nanočásticím, které byly testovány na buněčných liniích HaCaT, patří fullereny a jejich deriváty. Saathoff et al. vystavili buňky HaCaT třem typům fullerenu,  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{20}$ ,  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$  a  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{32}$ , v dávkách 0,0005–42,5  $\mu\text{g/ml}$  / 24 a 48 h. Snížení viability autoři pozorovali pouze u buněk vystavených nejvyšší dávce  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{32}$ . Fullerenoly  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$  a  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{32}$  snižovaly (v nejvyšších dávkách) expresi IL-8, avšak  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{32}$  v dávce 0,34  $\mu\text{g/ml}$  / 24 h produkci IL-8 naopak zvyšoval. Autoři uvádějí, že v průběhu experimentu docházelo k paracelulární i intracelulární agregaci/aglomeraci. Fullerenol  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{20}$  aglomeroval v cytoplazmatických vakuolách, zatímco aglomeráty fullerenu  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$  byly detekovány uvnitř buněk fokálně přichycené k buněčné membráně. Fullerenol  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{32}$  vytvářel menší agregáty uvnitř buněk a vykazoval menší interakce s membránami. Výsledky naznačují dávkovou závislost toxicity fullerenu a její úzkou vazbu na míru hydroxylace molekulárních struktur.<sup>20</sup>

Fibroblasty jsou základní buňky vazivové tkáně, rozptýlené v různých částech těla. Hrají důležitou roli v epidermální proliferaci, regeneraci a tvorbě extracelulární matrix. Liao et al. exponovali lidské dermální fibroblasty (NHDF) grafenu a GO (50  $\mu\text{g/ml}$  / 24 h). Výsledkem bylo významné snížení buněčné viability, zvýšení hladiny oxidačního stresu a narušení mitochondriální aktivity.<sup>21</sup> K podobným výsledkům došli i autoři de Godoy et al., kteří kultivovali myši kožní fibroblasty s MWCNT funkcionalizovanými tetraetylenpentaminem (MWCNT-TEPA; 1, 50, 250, 500 a 1000  $\text{mg/ml}$  / 24 h). MWCNT-TEPA významně snižovaly viabilitu buněk, na druhou stranu exprese volných radikálů a prozánětlivého cytokinu TNF- $\alpha$  významně vzrostly. Vyšší dávky MWCNT-TEPA způsobovaly závažnější buněčná poškození.<sup>22</sup> K podobným závěrům došli i Anita Patlolla, Brionna Knighten a Paul Tchounwou, kteří sledovali vliv MWCNT na NHDF. Toxický účinek byl závislý na dávce, přičemž vyšší koncentrace poškozovaly DNA a aktivovaly intracelulární cesty vedoucí k apoptóze. Oba uvedené

jevy vedly k významnému poklesu buněčné viability.<sup>23</sup> Autoři Tian et al. porovnávali vliv různých typů CNM na NHDF. V rozsáhlé studii exponovali tyto buňky SWCNT, MWCNT, sazim (*carbon black*), grafitu a aktivnímu uhlíku v široké škále koncentrací po dobu 1 až 5 dní. Nejvyšší pokles viability buněk byl zjištěn v případě expozice SWCNT. Vedle snížení viability nanočástice alterovaly rovněž buněčnou morfologii se změnou tvaru a narušením adhezivity. Míra toxického účinku byla závislá na dávce a na čase.<sup>24</sup>

Vedle toxických účinků CNM je nutné zmínit i jejich pozitivní vlivy. Ve studii Jennifer Mytych, Macieje Wnuka a Sureshe Rattana bylo prokázáno, že fibroblasty z kůže lidského obličejce (FSF1) po expozici ND (dávky do 0,5 µg/ml) snáze proliferovaly a měly vyšší hojivou kapacitu a metabolickou aktivitu. ND rovněž vyvolávaly buněčný stres se zvýšenou expresí hemoxygenázy, sirtuinu 1 a DNA metyltransferázy. Ve výsledku tedy došlo k prodloužení doby přežití fibroblastů a ke zlepšení jejich funkcí.<sup>25</sup> Odborná literatura uvádí, že i aplikace dvojrozměrných grafenových struktur mohou vést ke zvýšení proliferace a zlepšení funkcí lidských fibroblastů (k vyšší efektivitě hojení). Safina et al. připravili filmy z grafenu a GO, které osadili NHDF. Komplex potencoval růst a bioaktivitu buněk a významně posiloval jejich regenerační schopnost.<sup>26</sup>

Vedle keratinocytů a kožních fibroblastů byly v některých *in vitro* studiích použity i modely lidské epidermis nebo přímo vzorky lidské kůže. Například autoři Silva et al. hodnotili vliv GO na kožní permeabilitu. V jejich experimentu byly použity vzorky lidské kůže o tloušťce 0,8 mm. Nejvyšší míra penetrace byla zjištěna při koncentraci 1000 µg GO / ml disperze. Nižší koncentrace sice penetrovaly rychleji, nicméně konečný celkový objem GO v pokožce byl nižší. Dermální penetrace CNM je využívána u fototerapie. Uhlíkové nanočástice v kůži absorbují záření blízké infračervenému pásmu, což má za následek nárůst lokální teploty a zvýšení účinnosti terapie.<sup>27</sup>

Autoři Fusco et al. studovali intenzitu dráždivých účinků CNM na kůži. V experimentu použili SkinEthic™ model rekonstruované lidské epidermis (RhE), na jehož povrch aplikovali FLG, FLG funkcionalizované dodecylsíránem sodným a dodecylbenzensulfonátem sodným, GO, rGO a grafen po dobu 42 minut. Znamky iritace byly zjištěny pouze u funkcionalizovaných FLG. Došlo ke ztrátě denzity ve stratu corneum a stratu granulosum a fragmentaci keratinocytových jader stratum spinosum a stratum basale. GO indukoval pouze mírné poškození strata corneum. Všechny použité nanočástice kromě grafenu formovaly malá depozita ve stratu corneum a velké agregáty na povrchu epidermis. Autoři sledovali také hladinu zástupce skupiny alarminů IL-1α. K zvýšení jeho hladiny došlo pouze u funkcionalizovaných FLG. Zdá se tedy, že z testované skupiny CNM je za kožní iritanty možné považovat pouze funkcionalizované FLG.<sup>28</sup>

Dermální expozice bývá spojena i s expozicí oka. Autoři Yan et al. použili pro hodnocení toxicity CNM pro oko retinální pigmentový epitel (RPE). Epitelové buňky byly exponovány MWCNT, plazmou modifikovanými MWCNT, hydroxylovanými MWCNT a karboxylovanými MWCNT (5–100 mg/ml / 72 h). Nejvyšší koncentrace všech CNM způsobovaly významné snížení viability buněk, uvolňování laktátdehydrogenázy a zesílenou produkci volných radikálů (byly nalezeny apoptotické buňky). Nejvyšší míra oční toxicity byla zaznamenána u nemodifikovaných MWCNT. Karboxylovaná forma MWCNT se jevila jako biokompatibilní.<sup>29</sup> Ou et al. exponovali ARPE-19 (imortalizované lidské retinální buňky) GO a rGO (10–200 µg/ml / 6–72 h). Vedle nárůstu hladiny oxidačního stresu způsobovaly nanočástice také snížení viability a poškození DNA. Částice rGO vykazovaly vyšší míru genotoxicity než částice GO.<sup>30</sup>

Wu et al. zkoumali toxicitu GO vůči lidským epitelovým buňkám rohovky (hCorEC) a lidským epitelovým spojivkovým buňkám (hConEC). Dávky GO 12,5–100  $\mu\text{g/ml}$  nevykázaly během akutní dvouhodinové expozice známky toxicity vůči hCorEC ani vůči hConEC. Celodenní (24hodinová) expozice obou buněčných linií GO však významně zvýšila produkci volných kyslíkových radikálů, což mělo za následek spuštění apoptotických mechanismů.<sup>31</sup> Ve studii An et al. byly kryší rohovkové epitelové buňky (RCEC) vystaveny působení GO a rGO (5–50  $\mu\text{g/ml}$  / 24, 48 a 72 h). Částice GO, v závislosti na čase a dávce, výrazně snižovaly viabilitu buněk. Byl nalezen zvýšený výskyt apoptózy a nekrózy a docházelo i k narušování buněčného cyklu. Obecně, částice GO vykazovaly vyšší míru toxicitu než částice rGO.<sup>32</sup>

Obdobně jako u dermálních expozic, i u expozic oka je nutné zmínit některé pozitivní účinky CNM. Bylo například prokázáno, že uhlíkové nanočástice podporují regeneraci buněk oka, konkrétně jejich růst a diferenciaci. Zambrano-Andazol et al. studovali *in vitro* interakce membrány z rGO s vybranými buněčnými liniemi oka (buňkami pigmentového epitelu lidské sítnice, lidskými rohovkovými epitelovými buňkami CHCE-T, primárními rohovkovými keratinocyty a primárními lidskými rohovkovými limbálními buňkami). Výsledkem byla nízká úroveň genotoxicity a významná indukce dělení a migrace buněk. Experiment *in vivo*, který byl proveden po *in vitro* studii, potvrdil regenerační potenciál rGO membrány.<sup>33</sup>

## 6.2 IN VIVO STUDIE

Také v *in vivo* studiích byla sledována kožní a oční iritace a senzibilace po topické aplikaci CNM. Výsledky jsou v porovnání s výsledky *in vitro* studií komplexnější a poskytují validnější údaje o potenciální rizikovosti CNM pro člověka.

Například Ema et al. zaměřili výzkum na dermální senzibilaci a oční iritaci po aplikaci SWCNT-N (Nikkiso) a SWCNT-SG (*super-growth*) a MWCNT N a M (Mitsui) u králíků a morčat. Doba sledování byla 24 a 48 hodin od aplikace 0,1 % SWCNT-N, 0,5 % SWCNT-SG, 0,25 % MWCNT-N a 1 % MWNT-M do konjunktiválního vaku. Po 24 hodinách se u tří králíků po aplikaci N-MWCNT objevila mírná konjunktivální hyperémie, která však do 48 hodin vymizela. Kožní iritace byla testována pomocí náplastí s nanočásticemi a změny byly hodnoceny za 1, 24, 48 a 72 hodin od jejich odstranění. Byla pozorována mírná hyperémie u tří králíků exponovaných N-MWCNT. Iritace kůže, obdobně jako oční iritace, vymizela do 48 hodin po sejmutí náplastí. U morčat k senzibilizaci kůže nedošlo vůbec. Z tohoto pohledu lze testované nanočástice charakterizovat jako slabé iritanty a senzibilizanty.<sup>34</sup> Experimenty autorů Kim et al. byly zaměřeny na senzibilizaci kůže myší plátky grafenu. Ani nejvyšší koncentrace suspenze grafenu neměly za následek senzibilaci pokožky.<sup>35</sup> Podobné výsledky získali Park et al., kteří aplikovali MWCNT (1,000  $\mu\text{g/ml}$ ) na zdravou a poškozenou (abrazí) pokožku králíků. Po 24 ani 48 hodinách od aplikace nebyly na pokožce zjištěny známky poškození (edém nebo hyperémie).<sup>36</sup> Ani Balakrishna Murthy, Sairam Kishore a Surekha Paneerselvam neuvádí nálezy známek toxického působení MWCNT na kůži a oko potkanů, králíků a morčat.<sup>37</sup>

Vedle SWCNT a MWCNT byly studovány i dermální toxicity fullerenu. Experiment Xin Xia, Nancy Monteiro-Riviere a Jima Riviereho byl zaměřen na dermální absorpci fullerenu  $\text{C}_{60}$ . Pokožka odstavených selat byla exponována po dobu čtyř dnů fullerenu (200  $\mu\text{l}$  nebo 500  $\mu\text{g/ml}$  / 24 h) v toluenu, cyklohexanu, chloroformu a v minerálním oleji. Exponovaná pokožka byla přelepena páskou a byly odebrány vzorky pro histologickou analýzu.

Nanočástice  $C_{60}$  v toluenu, cyklohexanu a chloroformu penetrovaly přes stratum corneum a dosahovaly viabilní epidermis. Nejhlubší penetrace byla pro  $C_{60}$  zjištěna v chloroformu, nejnižší, téměř nulovou penetraci vykázal  $C_{60}$  v minerálním oleji.<sup>38</sup> Ema et al. testovali na králících a morčatech kožní iritaci (50 mg  $C_{60}$ ), kožní senzibilizaci (40 mg  $C_{60}$ ) a oční iritaci (100 mg  $C_{60}$ ) fullerenu  $C_{60}$ . Z výsledků vyplývá, že nebyla pozorována žádná dermální reakce. V případě aplikace do oka byla zjištěna mírná hyperémie, která zcela vymizela do 24 hodin.<sup>39</sup> Ve studii autorů Kata et al. byly účinky fullerenu  $C_{60}$  (v kosmetickém produktu proti vráskám) testovány na dobrovolnících. Studie se účastnilo 23 žen, které používaly krém s fullerenem  $C_{60}$  a skvalenem dvakrát denně (pouze na jednu polovinu obličeje) po dobu osmi týdnů (na druhou polovinu obličeje nanášely krém bez fullerenu). Krém s fullerenem  $C_{60}$  nevyvolal žádnou závažnější (toxickou) reakci, naopak bylo pozorováno zlepšení kvality pokožky a snížení hloubky vrásek.<sup>40</sup> K podobným závěrům došla i studie autorů Miljkovice et al., kteří aplikovali ve skupině 38 dobrovolníků tělové mléko a krém na ruce s přísadkou hyper-harmonizovaného vodního komplexu hydroxylovaného fullerenu  $C_{60}$  (3HFWC). Během čtyřtýdenní (každodenní) aplikace došlo ke zlepšení kvality pokožky a nárůstu množství kolagenu v ní.<sup>41</sup> Souhrnně řečeno, fulleren  $C_{60}$  je v kůži biologicky aktivní, podporuje tvorbu kolagenu a nevykazuje známky dermatotoxicity.

Protektivní vliv na kůži mají pravděpodobně i nanodiamanty (ND). V experimentu autorů Wua et al. byly dvě skupiny myši exponovány UVB záření, přičemž u jedné z nich byla před ozářením provedena topická aplikace ND. U této skupiny bylo po ozáření zjištěno (na rozdíl od skupiny bez aplikace ND) pouze velmi mírné poškození kůže. Částice ND nevykazovaly v experimentu žádné známky dermatotoxicity.<sup>42</sup>

Některé *in vivo* experimenty byly zaměřené čistě na oční toxicitu. Například již zmiňovaní Wu et al. aplikovali po dobu pěti dnů potkanům do spojivkového vaku 50 nebo 100  $\mu\text{g/ml}$  GO. Částice GO indukovaly reverzibilní zarudnutí spojivky a poškození rohovkového epitelu. Jednorázové podání způsobovalo jen mírné obtíže, avšak opakovaná aplikace již patologické procesy v hlubších vrstvách oka vyvolala.<sup>31</sup> Autoři Yan et al. aplikovali do jednoho oka králíků intravitreální injekci GO (0,1, 0,2 nebo 0,3 mg); do druhého oka byl aplikován solný roztok. V oku s GO nedošlo ke zvýšení nitroočního tlaku, narušení zraku či změnám na elektrotretinogramu. Histologická analýza odhalila, že v oku s aplikací GO perzistovalo po ukončení experimentu ještě menší množství GO, k poškození sítnice však podle autorů nedošlo.<sup>43</sup> An et al. aplikovali po dobu 7 dní do pravého oka myši suspenzi GO nebo rGO. Při koncentracích 50 a 100  $\mu\text{g/ml}$  GO byla detekována korneální opacita. U nižší koncentrace (25  $\mu\text{g/ml}$  GO) opacita zjištěna nebyla, nicméně prodloužená doba expozice (10 dní) již opacitu vyvolala. Expozice částicím rGO byla bez biologické odezvy. Histologická analýza prokázala narušení rohovky (s přítomností prozánětlivých buněk) u tkání oka vystavených GO. Částice GO indukovaly neovaskularizaci duhovky, zvyšovaly koncentrace prozánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-6 a IL-8 a koncentraci malondialdehydu (ukazatele oxidačního stresu). Výsledky naznačují přítomnost oční toxicity u GO, zatímco rGO vykazuje spíše biokompatibilitu.<sup>32</sup>

## 6.3 ZÁVĚR

Pokožka je největším orgánem, který je v neustálém kontaktu s vnějším prostředím. Ačkoli funguje jako ochrana a bariéra před průnikem nežádoucích látek do organismu, není nepoškoditelná a její poškození může také zhoršit její ochranné funkce. Studie ohledně dermatotoxicity

přinášejí nekonzistentní závěry. Není tedy možné říci, zda a jak toxické CNM k pokožce jsou. Podobné je to s vystavením oka CNM. Toxicita je úzce limitována jen na některé zástupce CNM. Na druhou stranu se však potvrdily i ochranné účinky CNM. Mnohé z nich (například scaffolds či krycí materiály s nanočásticemi) významně podporují diferenciaci a proliferaci buněk (včetně keratinocytů a kožních fibroblastů) a zvyšují neoangiogenezi, čímž pomáhají při hojení akutních i chronických ran. Nelze rovněž opomenout výrazné protiiinfekční účinky, jež mohou zabránit infikování rány. Pro zvýšení úrovně biokompatibility je možné CNM relativně snadno funkcionalizovat.<sup>44</sup>

## 6.4 LITERATURA

1. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. The Dynamic Anatomy and Patterning of Skin. *Exp Dermatol*. 2016;25(2):92–98. doi:10.1111/exd.12832.
2. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The Human Skin Microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(3):143–155. doi:10.1038/nrmicro.2017.157.
3. Murphrey MB, Miao JH, Zito PM. Histology, Stratum Corneum. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2020. Treasure Island, FL.
4. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M et al. External Antigen Uptake by Langerhans Cells With Reorganization of Epidermal Tight Junction Barriers. *J Exp Med*. 2009;206(13):2937–2946. doi:10.1084/jem.20091527.
5. Baroli B, Ennas MG, Loffredo F, Isola M, Pinna R, López-Quintela MA. Penetration of Metallic Nanoparticles in Human Full-Thickness Skin. *J Invest Dermatol*. 2007;127(7):1701–1712. doi:10.1038/sj.jid.5700733.
6. Sznitowska M, Janicki S, Williams AC. Intracellular or Intercellular Localization of the Polar Pathway of Penetration Across Stratum Corneum. *J Pharm Sci*. 1998;87(9):1109–1114. doi:10.1021/js980018w.
7. Lademann J, Richter H, Meinke MC et al. Drug Delivery With Topically Applied Nanoparticles: Science Fiction or Reality? *Skin Pharmacol Physiol*. 2013;26(4–6):227–233. doi:10.1159/000351940.
8. Monteiro-Riviere NA, Inman AO. Challenges for Assessing Carbon Nanomaterial Toxicity to the Skin. *Carbon N Y*. 2006;44(6):1070–1078. doi:10.1016/j.carbon.2005.11.004.
9. Zhu S, Gong L, Li Y, Xu H, Gu Z, Zhao Y. Safety Assessment of Nanomaterials to Eyes: An Important but Neglected Issue. *Adv Sci*. 2019;6(16):1802289. doi:10.1002/advs.201802289.
10. Dalla Colletta A, Pelin M, Sosa S, Fusco L, Prato M, Tubaro A. Carbon-Based Nanomaterials and Skin: An Overview. *Carbon N Y*. 2022;196:683–698. doi:10.1016/J.CARBON.2022.05.036.
11. Frontiñán-Rubio J, Victoria Gómez M, Martín C, González-Domínguez JM, Durán-Prado M, Vázquez E. Differential Effects of Graphene Materials on the Metabolism and Function of Human Skin Cells. *Nanoscale*. 2018;10(24):11604–11615. doi:10.1039/c8nr00897c.
12. Frontiñán-Rubio J, Llanos-González E, González VJ, Vázquez E, Durán-Prado M. Subchronic Graphene Exposure Reshapes Skin Cell Metabolism. *J Proteome Res*. 2022;21(7):1675–1685. doi:10.1021/ACS.JPROTEOME.2C00064.
13. Salesa B, Tuñón-Molina A, Cano-Vicent A, Assis M, Andrés J, Serrano-Aroca Á. Graphene Nanoplatelets: In Vivo and In Vitro Toxicity, Cell Proliferative Activity, and Cell Gene Expression. *Appl Sci*. 2022;12(2):720. doi:10.3390/APP12020720.
14. Pelin M, Fusco L, León V et al. Differential Cytotoxic Effects of Graphene and Graphene Oxide on Skin Keratinocytes. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–12. doi:10.1038/srep40572.
15. Pelin M, Fusco L, Martín C et al. Graphene and Graphene Oxide Induce ROS Production in Human HaCaT Skin Keratinocytes: The Role of Xanthine Oxidase and NADH Dehydrogenase. *Nanoscale*. 2018;10(25):11820–11830. doi:10.1039/c8nr02933d.



16. McShan D, Yu H. DNA Damage in Human Skin Keratinocytes Caused by Multiwalled Carbon Nanotubes With Carboxylate Functionalization. *Toxicol Ind Health*. 2014;30(6):489–498. doi:10.1177/0748233712459914.
17. Palmer BC, Phelan-Dickenson SJ, Delouise LA. Multi-Walled Carbon Nanotube Oxidation Dependent Keratinocyte Cytotoxicity and Skin Inflammation. *Part Fibre Toxicol*. 2019;16(1):1–15. doi:10.1186/s12989-018-0285-x.
18. Manna SK, Sarkar S, Barr J et al. Single-Walled Carbon Nanotube Induces Oxidative Stress and Activates Nuclear Transcription Factor- $\kappa$ B in Human Keratinocytes. *Nano Lett*. 2005;5(9):1676–1684. doi:10.1021/nl0507966.
19. Ong LC, Tan YF, Tan BS et al. Single-Walled Carbon Nanotubes (SWCNTs) Inhibit Heat Shock Protein 90 (HSP90) Signaling in Human Lung Fibroblasts and Keratinocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2017;329:347–357. doi:10.1016/j.taap.2017.06.024.
20. Saathoff JG, Inman AO, Xia XR, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. In Vitro Toxicity Assessment of Three Hydroxylated Fullerenes in Human Skin Cells. *Toxicol Vitro*. 2011;25(8):2105–2112. doi:10.1016/j.tiv.2011.09.013.
21. Liao KH, Lin YS, MacOsko CW, Haynes CL. Cytotoxicity of Graphene Oxide and Graphene in Human Erythrocytes and Skin Fibroblasts. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2011;3(7):2607–2615. doi:10.1021/am200428v.
22. de Godoy KF, de Almeida Rodolpho JM, Brassolatti P et al. New Multi-Walled Carbon Nanotube of Industrial Interest Induce Cell Death in Murine Fibroblast Cells. *Toxicol Mech Methods*. 2021;31(7):517–530. doi:10.1080/15376516.2021.1930311.
23. Patlolla A, Knighten B, Tchounwou P. Multi-Walled Carbon Nanotubes Induce Cytotoxicity, Genotoxicity and Apoptosis in Normal Human Dermal Fibroblast Cells. *Ethn Dis*. 2010;20(1 Suppl 1):65–72.
24. Tian F, Cui D, Schwarz H, Estrada GG, Kobayashi H. Cytotoxicity of Single-Wall Carbon Nanotubes on Human Fibroblasts. *Toxicol Vitro*. 2006;20(7):1202–1212. doi:10.1016/j.tiv.2006.03.008.
25. Mytych J, Wnuk M, Rattan SIS. Low Doses of Nanodiamonds and Silica Nanoparticles Have Beneficial Hormetic Effects in Normal Human Skin Fibroblasts in Culture. *Chemosphere*. 2016;148:307–315. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.01.045.
26. Safina I, Bourdo SE, Algazali KM et al. Graphene-Based 2D Constructs for Enhanced Fibroblast Support. *PLoS One*. 2020;15(5). doi:10.1371/journal.pone.0232670.
27. Silva FALS, Costa-Almeida R, Timochenco L et al. Graphene Oxide Topical Administration: Skin Permeability Studies. *Materials*. 2021;14(11):2810. doi:10.3390/ma14112810.
28. Fusco L, Garrido M, Martín C et al. Skin Irritation Potential of Graphene-Based Materials Using a Non-Animal Test. *Nanoscale*. 2020;12(2):610–622. doi:10.1039/c9nr06815e.
29. Yan L, Li GX, Zhang S et al. Cytotoxicity and Genotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes With Human Ocular Cells. *Chin Sci Bull*. 2013;58(19):2347–2352. doi:10.1007/s11434-013-5800-8.
30. Ou L, Lv X, Wu Z et al. Oxygen Content-Related DNA Damage of Graphene Oxide on Human Retinal Pigment Epithelium Cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2021;32(2):1–9. doi:10.1007/S10856-021-06491-0.
31. Wu W, Yan L, Wu Q et al. Evaluation of the Toxicity of Graphene Oxide Exposure to the Eye. *Nanotoxicology*. 2016;10(9):1329–1340. doi:10.1080/17435390.2016.1210692.
32. An W, Zhang Y, Zhang X et al. Ocular Toxicity of Reduced Graphene Oxide or Graphene Oxide Exposure in Mouse Eyes. *Exp Eye Res*. 2018;174:59–69. doi:10.1016/j.exer.2018.05.024.
33. Zambrano-Andazol I, Vázquez N, Chacón M et al. Reduced Graphene Oxide Membranes in Ocular Regenerative Medicine. *Mater Sci Eng C*. 2020;114:111075. doi:10.1016/j.msec.2020.111075.
34. Ema M, Matsuda A, Kobayashi N, Naya M, Nakanishi J. Evaluation of Dermal and Eye Irritation and Skin Sensitization Due to Carbon Nanotubes. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2011;61(3):276–281. doi:10.1016/j.yrtph.2011.08.007.

35. Kim SH, Hong SH, Lee JH et al. Skin Sensitization Evaluation of Carbon-Based Graphene Nanoplatelets. *Toxics*. 2021;9(3):62. doi:10.3390/TOXICS9030062.
36. Park YH, Jeong SH, Lee EY et al. Assessment of Dermal Irritation Potential of MWCNT. *Toxicol Environ Health Sci*. 2010;2(2):115–118. doi:10.1007/BF03216492.
37. Murthy PB, Kishore AS, Surekha P. Acute Toxicological Effects of Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNT). In: *Carbon Nanotubes – Growth and Applications*. IntechOpen; 2011. doi:10.5772/18984.
38. Xia XR, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE. Skin Penetration and Kinetics of Pristine Fullerenes (C60) Topically Exposed in Industrial Organic Solvents. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;242(1):29–37. doi:10.1016/j.taap.2009.09.011.
39. Ema M, Matsuda A, Kobayashi N, Naya M, Nakanishi J. Dermal and Ocular Irritation and Skin Sensitization Studies of Fullerene C60 Nanoparticles. *Cutan Ocul Toxicol*. 2013;32(2):128–134. doi:10.3109/15569527.2012.727937.
40. Kato S, Taira H, Aoshima H, Saitoh Y, Miwa N. Clinical Evaluation of Fullerene-C 60 Dissolved in Squalane for Anti-Wrinkle Cosmetics. *J Nanosci Nanotechnol*. 2010;10(10):6769–6774. doi:10.1166/jnn.2010.3053.
41. Miljkovic S, Jeftic B, Sarac D, Matovic V, Slavkovic M, Koruga D. Influence of Hyper-Harmonized Fullerene Water Complex on Collagen Quality and Skin Function. *J Cosmet Dermatol*. 2020;19(2):494–501. doi:10.1111/JOCD.12999.
42. Wu MS, Sun DS, Lin YC et al. Nanodiamonds Protect Skin From Ultraviolet B-Induced Damage in Mice. *J Nanobiotechnology*. 2015;13:35. doi:10.1186/s12951-015-0094-4.
43. Yan L, Wang Y, Xu X et al. Can Graphene Oxide Cause Damage to Eyesight? *Chem Res Toxicol*. 2012;25(6):1265–1270. doi:10.1021/tx300129f.
44. Chauhan N, Saxena K, Jain U. Carbon-Based Nanomaterials in Wound Care Management: A New and Pristine Strategy. *Biomed Mater Devices*. 2023;1:108–121. doi:10.1007/s44174-022-00030-3.

# ZKRATKY

16HBE	lidská bronchiální epiteliální buněčná linie ( <i>human bronchial epithelial cells</i> )
3HFWC	hyper-harmonizovaný vodní komplex hydroxylovaného fullerenu C <sub>60</sub>
A549	alveolární epiteliální buňky A549 ( <i>adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells</i> )
ABCA-1	<i>ATP-binding cassette transporter</i>
ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
ARPE-19	imortalizované lidské retinální buňky
AST	aspartátaminotransferáza
BAL	bronchoalveolární laváž
BEAS-2B	imortalizovaná a nenádorová linie lidských plicních epiteliálních buněk ( <i>bronchial epithelial cells</i> )
BMEC	mozkové mikrovaskulární endoteliální buňky ( <i>bone marrow microvascular endothelial cells</i> )
BSA	bovinní sérový albumin
BUN	<i>blood urea nitrogen</i>
C <sub>60</sub>	fulleren
CaCo2	buněčná linie lidského kolorektálního adenokarcinomu ( <i>human colon adenocarcinoma cell line</i> )
Caco-2	imortalizované lidské buňky kolorektálního adenokarcinomu
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAT	kataláza
CB	saze ( <i>carbon black</i> )
CD	uhlíkové tečky ( <i>carbon dots</i> )
CDH1	kadherin 1
CFU	kolonie tvořící jednotku
CHCE-T	lidské rohovkové epitelové buňky
CNF	uhlíková nanovláknina ( <i>carbon nanofibres</i> )
CNH	uhlíkové nanorohy ( <i>carbon nanohorns</i> )
CNM	uhlíkové nanomateriály ( <i>carbon nanomaterials</i> )
CNP	uhlíkové destičky ( <i>carbon platelets</i> )
CNS	centrální nervová soustava
CNT	uhlíkové nanotrubicice ( <i>carbon nanotubes</i> )
CPPED1	<i>calcineurin-like phosphoesterase domain containing 1</i>
CT	počítačová tomografie
CVD	chemická depozice z plynné fáze

DAMP	<i>damage/danger-associated molecular patterns</i>
DWCNT	dvoustěnné uhlíkové nanotrubičky ( <i>double-walled carbon nanotubes</i> )
EC <sub>50</sub>	polovina maximální účinné koncentrace
EEG	elektroencefalografie
EKG	elektrokardiografie
EPC	endoteliální progenitorové buňky
EPO	eozinofilní peroxidáza
FBN1	fibrilin 1
FBS	fetální bovinní sérum
FDT	fotodynamická terapie
FLG	vícevrstvý grafen ( <i>few layer graphene</i> )
FLGO	několikavrstvý grafen oxid ( <i>few-layer graphene oxide</i> )
FN1	fibronektin
FSF1	fibroblasty z kůže lidského obličeje
FSH	folikuly stimulující hormon
FTT	fototermální terapie
GGT	$\gamma$ -glutamyltransferáza
GIT	gastrointestinální trakt
GNP	grafenové nanodestičky ( <i>graphene nanoplatelets</i> )
GO	oxid grafenu ( <i>graphen oxide</i> )
GO-DOTA	oxid grafenu funkcionalizovaný kyselinou 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctovou
GO-QD	kvantové tečky oxidu grafenu ( <i>graphene oxide quantum dots</i> )
GP	grafenové plátky
GPCR	receptor spřažený s G proteinem ( <i>G protein-coupled receptors</i> )
GQD	grafenové kvantové tečky ( <i>graphene quantum dots</i> )
H2AFX	<i>histone family member X</i>
H9c2	kardiomyoblasty
HaCaT	imortalizované keratinocyty
HASMC	buňky hladké svaloviny aorty ( <i>human aortic smooth muscle cells</i> )
HBEC-3KT	nenádorové buňky lidského bronchiálního epitelu
hConECs	lidské epitelové spojivkové buňky
hCorECs	lidské epitelové buňky rohovky
HEB	hematoencefalická bariéra
HEK-293T	lidské embryonální ledvinné buňky
HepG2	buňky hepatocelulárního karcinomu
HK-2	dospělé lidské buňky proximální tubulárního epitelu
HLF	lidské plicní fibroblasty ( <i>human lung fibroblasts</i> )
HNEpC	primární buňky lidského nosního epitelu
hpf	hodin po fertilizaci
HSC 2012	Hazard Communication Standard
Hsp90	<i>heat shock protein 90</i>
HT29	buňky lidského kolorektálního adenokarcinomu s epiteliální morfologií
HUVEC	endoteliální buňky lidské pupečnickové žíly ( <i>human umbilical vein endothelial cells</i> )
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICAM-1	solubilní intercelulární adhezni molekuly 1 ( <i>intercellular adhesion molecules</i> )
IL	interleukin
LLC-PK1	prasečí buňky proximálního ledvinného tubulu
LOX-1	<i>lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor</i>
LPS	lipopolysacharid

MAMP	<i>microbe-associated molecular patterns</i>
MPO	myeloperoxidáza
MWCNT	vícetěnné uhlíkové nanotrubičky ( <i>multi-walled carbon nanotubes</i> )
MWCNT-PVP	mnohovrstvé uhlíkové nanotrubičky funkcionalizované polyvinylpyrrolidonem
MWCNT-TEPA	MWCNT funkcionalizované tetraetylenpentaminem
NCI-H322	nemalobuněčný bronchoalveolární karcinom
NCM460	epitelové buňky tlustého střeva
ND	nanodiamanty
NET	extracelulární neutrofilové pasti ( <i>neutrofil extracellular traps</i> )
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NHBE	normální lidské bronchiální epitelové buňky
NHDF	lidské dermální fibroblasty
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health
NIR	blízké infračervené záření
NKR-52E	krysi epitelové buňky ledvin
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NLRP3	<i>NOD-like receptor family pyrin domain containing 3</i>
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
Ox-MWCNT	oxidované MWCNT
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PEG	polyethylenglykol
PEG-MWCNT	polyethylenglykolované MWCNT
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PTEN	homolog fosfatázy a TENSinu ( <i>phosphatase and TENsin homolog</i> )
RES	retikuloendoteliální systém
rGO	redukovaný GO
RhE	SkinEthic™ model rekonstruované lidské epidemirs
ROS	volné kyslíkové radikály ( <i>reactive oxygen species</i> )
RPE	retinální pigmentový epitel
RTG	rentgenové záření
SAEC	epitelové buňky nižších etází dýchacích cest ( <i>small airway epithelial cells</i> )
sFLG	malý vícevrstevný grafen ( <i>small few-layer graphene</i> )
SLGO	jednovrstvý grafen oxid ( <i>single-layer graphene oxide</i> )
SOD1	superoxiddismutáza
SWCNT	jednovrstvé uhlíkové nanotrubičky ( <i>single-wall carbon nanotubes</i> )
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TGFB1	transformující růstový faktor $\beta$ ( <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
T-MWCNT	dispergované Tweenem-80
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
VCAM-1	solubilní vaskulární buněčné adhezni molekuly 1 ( <i>vascular cell adhesion molecule</i> )
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor
Vero	buněčná linie epitelialních buněk ledvin z afrického kočkodana zeleného
ZO-1	zonula occludens-1