



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ BUNĚČNÝCH KULTUR K TESTOVÁNÍ CYTOTOXICITY PŘÍRODNÍCH LÁTEK

USE OF CELL CULTURES TO TEST CYTOTOXICITY OF NATURAL SUBSTANCES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Veronika Blažková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK1052/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Veronika Blažková	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Jitka Bokrová	

Název bakalářské práce:

Využití buněčných kultur k testování cytotoxicity přírodních látek

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- přehledná literární rešerše zaměřená zejména na testy cytotoxicity přírodních látek a částic
- charakterizace vybraných přírodních extraktů – optimalizace metod stanovení obsahu polyfenolů, flavonoidů a antioxidační aktivity
- enkapsulace studovaných přírodních extraktů
- testování cytotoxicity volných a enkapsulovaných rostlinných preparátů pomocí cytotoxického testu MTT
- možné využití připravených preparátů v kosmetických přípravcích

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Veronika Blažková
Student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

Abstrakt

Bakalářská práce byla zaměřená na studium buněčných kultur, především na zavedení technik kultivace lidských buněk *in vitro* a optimalizaci jejich využití v testech cytotoxicity. Pozornost byla zaměřena převážně na přírodní látky a liposomy s jejich obsahem, které jsou vhodné k využití do kosmetických přípravků.

V teoretické části byla zpracována literární rešerše zaměřená na rozdělení buněčných kultur, vhodné kultivační podmínky pro *in vitro* testování a přehled cytotoxických testů.

V rámci experimentální části práce byly charakterizovány přírodní extrakty s antimikrobiálním účinkem z hlediska obsahu polyfenolů, flavonoidů a antioxidační aktivity. Dále byly tyto extrakty enkapsulovány do liposomů. Stanovena byla enkapsulační účinnost, distribuce velikosti částic metodou dynamického rozptylu světla a stabilita připravených částic. Také byla sledována její dlouhodobá stabilita ve vodném prostředí a v prostředí gelu. Součástí práce bylo též studium kultivace buněčné kultury lidských keratinocytů a příprava těchto buněk pro testování cytotoxicity vybraných přírodních látek a liposomů metodou MTT.

Abstract

This thesis is aimed on study of cell cultures, primarily on introduction of techniques for cultivation of human cells and optimization of their usage in cytotoxicity tests. The thesis is aimed preferably on natural substances and liposomes that are suitable to be used in cosmetics. Theoretical part contains literature review focused on overview of cell cultures, appropriate cultivation conditions for *in vitro* testing and summary of cytotoxicity tests. Experimental part contains characteristics of natural extracts with antimicrobial effect in terms of content of polyphenols, flavonoids and antioxidant activity.

Further, these extracts were encapsulated into the liposomes. Encapsulation effectivity was determined. Distribution of particles size by dynamic light scattering and finally also stability of prepared particles were also determined. Long-term stability in water and gel environment was tested too. This thesis also contains study of optimization of cell culture of human skin keratinocytes cultivation and use of those cells for testing cytotoxicity of selected natural substances by MTT method.

Klíčová slova

Buněčné kultury, bylinné extrakty, liposomy, antimikrobiální látky, keratinocyty, cytotoxické testy, MTT

Keywords

Cell cultures , herbal extracts, liposomes , antimicrobials, keratinocytes, cytotoxic assays , MTT

BLAŽKOVÁ, V. *Využití buněčných kultur k testování cytotoxicity přírodních látek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 49 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucí práce a děkana FCH VUT.

.....

Podpis studenta

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za možnost pracovat v jejím týmu, za vedení mé práce a její trpělivost. Hlavně bych chtěla také poděkovat Ing. Jitce Bokrové za cenné rady, velkou ochotu, podporu a trpělivost při zpracování mé experimentální části.

Obsah

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	TESTOVÁNÍ CYTOTOXICITY IN VITRO	8
2.1.1	<i>Toxicita</i>	8
2.2	TKÁŇOVÉ A BUNĚČNÉ KULTURY	8
2.2.1	<i>Primární kultury</i>	8
2.2.2	<i>Sekundární buněčné kultury</i>	9
2.2.3	<i>Buněčné linie</i>	9
2.2.4	<i>Typy buněčných kultur</i>	9
2.3	RŮST BUNĚK.....	10
2.4	KULTIVACE BUNĚK A KULTIVAČNÍ PODMÍNKY.....	11
2.4.1	<i>Kultivační média</i>	11
2.4.2	<i>pH</i>	12
2.4.3	<i>CO₂</i>	12
2.4.4	<i>Kyslík</i>	12
2.4.5	<i>Osmolalita, teplota, viskozita</i>	12
2.4.6	<i>Vybavení laboratoře</i>	13
2.4.7	<i>Kryoprezervace kultivovaných buněk</i>	13
2.5	HODNOCENÍ CYTOTOXICITY IN VITRO	13
2.5.1	<i>Toxicita</i>	13
2.5.2	<i>Cytotoxické metody</i>	13
2.5.3	<i>Počítání buněk</i>	14
2.5.4	<i>Cytotoxické testy</i>	14
2.6	VYBRANÉ PŘÍRODNÍ LÁTKY	16
2.6.1	<i>Levandule lékařská</i>	16
2.6.2	<i>Bez černý</i>	17
2.6.3	<i>Jitrocel kopinatý</i>	17
2.6.4	<i>Třapatka nachová</i>	18
2.6.5	<i>Tymián obecný</i>	18
2.6.6	<i>Šalvěj lékařská</i>	19
2.6.7	<i>Rozmarýn lékařský</i>	20
2.6.8	<i>Zázvor obecný</i>	20
2.6.9	<i>Hřebíček vonný</i>	21
2.6.10	<i>Skořice</i>	21
2.7	ANTIOXIDAČNÍ LÁTKY	22
2.7.1	<i>Polyfenoly</i>	22
2.7.2	<i>Flavonoidy</i>	22
2.8	ENKAPSULACE.....	22
2.8.1	<i>Liposomy</i>	23
3	CÍL PRÁCE	24

4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A POMŮCKY	25
4.1.1	<i>Standardní a speciální chemikálie</i>	25
4.1.2	<i>Přístroje a pomůcky.....</i>	25
4.2	CHARAKTERIZACE PŘÍRODNÍCH EXTRAKTŮ	26
4.2.1	<i>Příprava přírodních extraktů</i>	26
4.2.2	<i>Spektrofotometrické stanovení koncentrace polyfenolů</i>	26
4.2.3	<i>Spektrofotometrické stanovení koncentrace flavonoidů.....</i>	26
4.2.4	<i>Spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS.....</i>	26
4.3	PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE ČÁSTIC	27
4.3.1	<i>Příprava liposomových částic.....</i>	27
4.3.2	<i>Stanovení enkapsulační účinnosti</i>	27
4.3.3	<i>Stanovení dlouhodobé stability částic</i>	27
4.3.4	<i>Stanovení koncentrace liposomů pomocí Stewart testu.....</i>	27
4.3.5	<i>Optimalizace metody filtrace liposomů</i>	28
4.3.6	<i>Stanovení velikosti a stability částic pomocí DLS a zeta potenciálu</i>	28
4.4	KULTIVACE BUNĚK	28
4.4.1	<i>Příprava buněk na cytotoxický test</i>	29
4.4.2	<i>MTT test.....</i>	30
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	31
5.1	CHARAKTERIZACE PŘÍRODNÍCH EXTRAKTŮ	31
5.1.1	<i>Příprava přírodních extraktů.....</i>	31
5.1.2	<i>Stanovení koncentrace celkových polyfenolů.....</i>	31
5.1.3	<i>Stanovení koncentrace celkových flavonoidů</i>	32
5.1.4	<i>Stanovení antioxidační aktivity</i>	33
5.2	CHARAKTERIZACE PŘIPRAVENÝCH ČÁSTIC.....	35
5.2.1	<i>Stanovení enkapsulační účinnosti</i>	35
5.2.2	<i>Stanovení dlouhodobé stability částic</i>	36
5.2.3	<i>Stanovení koncentrace liposomů pomocí Stewart testu.....</i>	37
5.2.4	<i>Stanovení velikosti a stability částic pomocí DLS a zeta potenciálu</i>	37
5.3	KULTIVACE BUNĚK	40
5.4	MTT TEST	41
5.4.1	<i>Vyhodnocení testu</i>	44
6	ZÁVĚR.....	45
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	45
8	SEZNAM ZKRATEK.....	49

1 ÚVOD

Hlavní náplní této práce je využití buněčných kultur k testování cytotoxicity přírodních extraktů a připravených liposomů s jejich obsahem. Vybrány byly přírodní látky, které jsou vhodné jak svou vůní, tak svými blahodárnými účinky do kosmetických přípravků.

Hlavní komponentou v kosmetických přípravcích je především obsah antioxidantních látek, což jsou látky, které zachytávají volné radikály a zabraňují tak poškození buněčných kultur a následnému stárnutí kůže. Bylinky, které obsahují tyto aktivní látky, jsou například skořice, echinacea, černý bez, rozmarýn či zázvor. Z vonných přírodních látek byla vybrána levandule či hřebíček, jejichž účinnými látkami jsou silice, které mají zklidňující účinky a pomáhají například při bolestech hlavy a využívají se též k aromaterapii. Dalšími užitečnými účinky přírodních látek je schopnost prokrvování pokožky a hojení ran, které byly objeveny u mateřídoušky, jitrocele a šalvěje.

Předložená práce se zaměřuje na charakterizaci těchto přírodních látek a možností jejich enkapsulace do liposomů. Liposomy jsou uměle vytvořené částice, které napomáhají k transportu a pozvolnému uvolňování aktivních látek do kůže či sliznice. A mohou být tudíž použity nejen jako součást kosmetických přípravků, ale také v potravinářství.

Všechny nové látky či materiály, které se zavádí do lidského organismu, musí být nejprve testovány na toxicitu pro buňky a tkáně. S příchodem liposomů a dalších nanočástic a nanomateriálů je tak nutné testování i těchto částic. Proto i v případě přírodních extraktů enkapsulovaných do liposomů bylo nutné zavedení testů k hodnocení bezpečnosti pro lidské zdraví. K testování bezpečnosti jsou ideální metody *in vitro*, protože vytvářejí reprodukovatelné výsledky rychle a levně bez použití živých zvířat.

Vývoj a výzkum v testování cytotoxicity na buněčných kulturách se v poslední době velmi rozšířil. Testování je nyní nedílnou součástí jak pro farmaceutické společnosti, tak pro kosmetologické firmy, kdy je zapotřebí prověřit bezpečnost jejich produktů před uvedením na trh. Využití buněčných kultur má své výhody převážně v možnosti ve větší míře testovat více vzorků. Můžeme pracovat s charakteristickým buněčným typem, provádět experimenty bez etických problémů. Na druhou stranu se musí brát v potaz, že se kultivované buňky pěstují v uměle vytvořeném prostředí, díky kterému se mohou výsledky míry toxicity mírně lišit. Je zapotřebí citlivé zacházení s buňkami ve speciálních laboratořích za sterilních podmínek a za stálého dozoru. Proto této problematice byla v bakalářské práci věnována zvýšená pozornost.

Vývojem se rozšířilo velké množství různých metod a technik k testování cytotoxicity na buněčných kulturách, kdy se například využívá kolorimetrických metod. Za použití vhodného barviva lze testovat poškození buněk, například s využitím trypanové modři, která prostupuje jen do buněk s narušenou kožní membránou nebo pomocí neutrální červeni, která se hromadí v lysosomech jen živých buněk. Většina testů je velmi rychlá a nenáročná, kdy se snadno rozpoznají živé buňky od těch neživých. V práci byla vybrána jedna kolorimetrická metoda pro experimentální část, a to tzv. MTT test, kdy je žlutý roztok MTT (3-[4, 5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium) redukován v živých buňkách na fialovou sraženinu formazanu, který je pak spektrofotometricky vyhodnocován.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Testování cytotoxicity in vitro

Pojem *in vitro* znamená v překladu do češtiny mimo lidské tělo, tedy ve skle. Jde o testy, které jsou prováděny ve zkumavkách, na sklíčku či Petriho misce ve vhodném prostředí v laboratořích. Využívají se k tomu tkáňové kultury či buněčné linie. Testováním cytotoxicity se stanovují účinky chemických a toxických látek na buňkách. Cytotoxicitou se rozumí schopnost buněk nebo chemických látek ničit jiné buňky [1].

2.1.1 Toxicita

Všechny látky či materiály, které se zavádí do lidského organismu, musí být testovány na toxicitu pro buňky a tkáň. Toxicitou rozumíme míru vlivu, jakým působí jedovaté látky na živý organismus. Vědecký obor zabývající se těmito vlivy, jejich příčinami a důsledky je známý jako toxikologie. Tkáňové kultury se využívají pro hodnocení toxicity akutní, nechronické. Pro akutní toxicitu látek je převážně rozhodující množství působící látky na konkrétní část v těle [2]. Cituje se známá fráze „*Všechny věci jsou jedy...jen dávka určuje jed.*“

2.2 Tkáňové a buněčné kultury

Tkáňové kultury jsou tvořeny více buňkami, které nejsou od sebe odděleny, proto na sebe vzájemně působí jako v organismu. To znamená, že se hojně využívají při testování v kosmetice, např. při testování kožní dráždivosti.

Buněčnými kulturami se rozumí rostlinné, živočišné nebo lidské buňky, které jsou pěstovány uměle vytvořenou technikou v laboratoři. Jsou to buňky, které jsou od sebe odděleny a rostou v jedné vrstvě, kde je nezbytné zajištění optimálních podmínek pro rozmnožování. Díky různým metodám lze pěstovat celou řadu specializovaných buněk.

Primární buněčné kultury a buněčné linie pro testování cytotoxicity lze získat díky organizacím jako je ATCC (American Tissue and Cultures Collection) a ECACC (European Collection of Cell Cultures). Tyhle organizace zajišťují nejen lidské, ale i živočišné a rostlinné buněčné linie. Buňky se uchovávají ve zmražené formě a v laboratořích je možné je kdykoliv obnovit.

Nejnámější buněčnou linií je buněčná linie HeLa, která byla izolována z karcinomu děložního krčku Henrietty Lacksové. Jde o epiteloidní typ buněk. Také buněčná linie, která se užívá přes 50 let a je známa jako buněčná linie L představuje buňky, které byly získány z pojivové tkáně myši a jde o buňky fibroblastoidního typu [3][4].

2.2.1 Primární kultury

Primární kultury neboli primokultury jsou buňky, které jsou získány přímo z odebrané tkáně, kdy se tkáň rozvolní do buněčné suspenze. Tahle suspenze pak obsahuje několik různých buněčných typů a je pak potřeba další kultivace k dosažení určitého typu buněk. Buňky v primokultuře se množí velmi pomalu, ale pak se namnoží do vzniku tzv. monolayeru. Tento souvislý monolayer už pak nadále není schopný dělení. Je pak zapotřebí jej přenést do nových kultivačních nádob, smísit s novým médiem – tzv. pasážování. Tímto způsobem pak vzniká sekundární kultura neboli subkultura [4][5].

2.2.2 Sekundární buněčné kultury

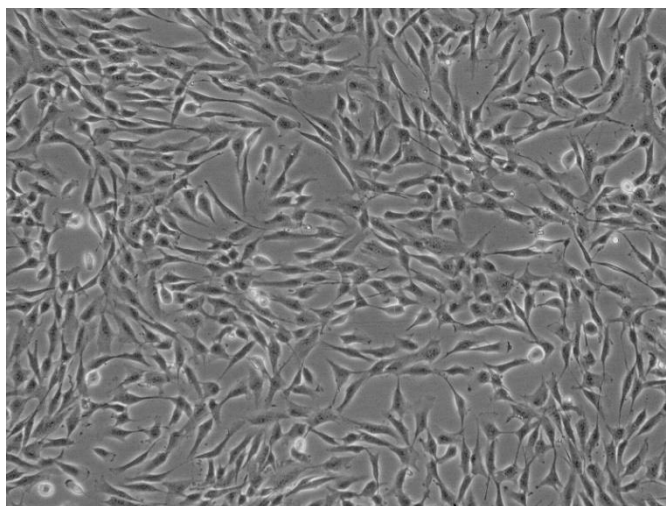
Sekundární buněčné kultury vychází z primárních kultur. Jsou to kultury normálních diploidních buněk, které byly již alespoň jednou pasážovány. Oproti primární buněčným kulturám mají pouze jeden vyselektovaný typ buněk. Nevydrží se dělit donekonečna, po určitém množství dělení buňky zanikají, z důvodu zkracování telomer [4].

2.2.3 Buněčné linie

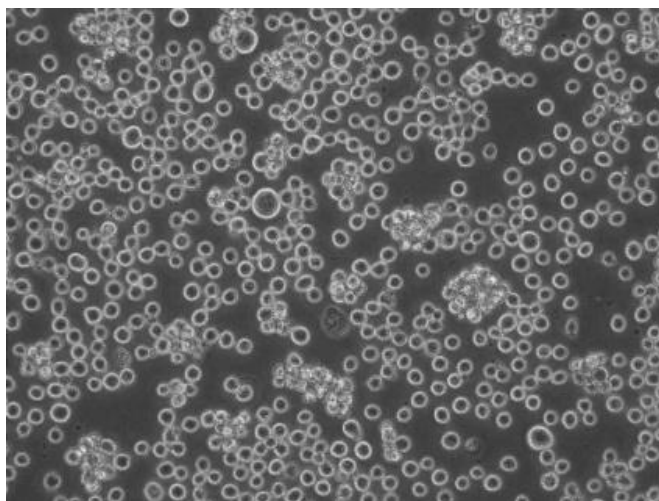
Buněčné linie (imortalizované) jsou schopny se neomezeně buněčně dělit. Buněčné linie vznikají z nádorových buněk nebo selekcí z embryonálních tkání. Tudíž se liší od primárních buněk. Nádorové buňky se lépe kultivují a také množí. U takových buněk nedochází ke zkracování telomer, tedy stárnutí kultury, díky výskytu telomerázy. Buňky z embryonálních tkání se opět snáze pěstují a mají delší životnost. Bývají však náchylnější ke změnám fenotypu [4].

2.2.4 Typy buněčných kultur

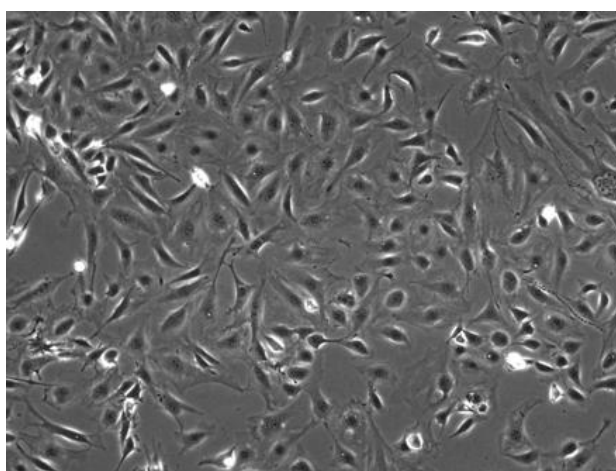
Podle morfologie můžeme mít kultury fibroblastoidních buněk, jsou to buňky protáhlé a rozvětvené, dále lymfoblastoidních buněk, které mají v suspenzi kulovitý tvar a epiteliálních buněk, které mají tvar zploštělý a polygonální [6].



Obrázek 1: Fibroblastoidní buňky [7]



Obrázek 2: Lymfoblastoidní buňky [8]



Obrázek 3: Epiteliální buňky [9]

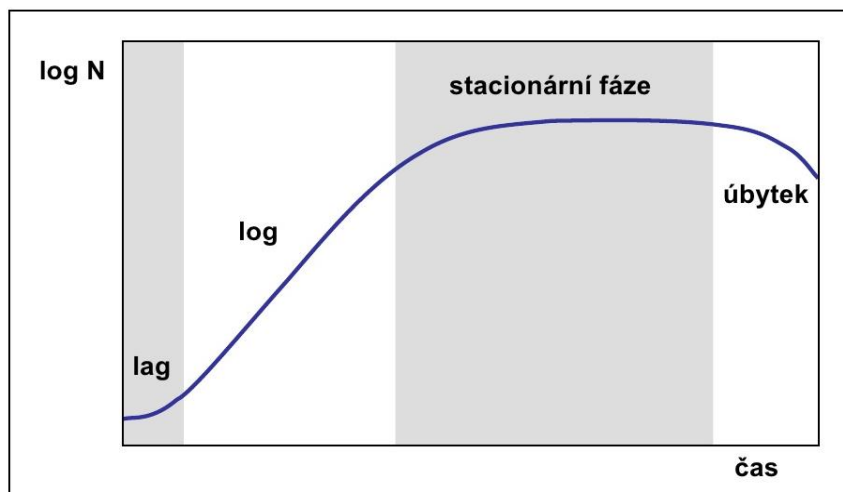
Dále můžeme buněčné kultury rozdělit podle způsobu jejich kultivace.

Suspenzní kultury jsou buňky převážně krevního původu. Je nutné je pěstovat v suspenzi, kdy by případná adheze vedla k transformaci do jiného buněčného typu. Suspenzní kultury jsou tedy volně dispergované v médiu.

Adherentní kultury rostou na vhodném kultivačním povrchu. Nejčastěji se používají plastové (polystyrenové) nádoby či nádoby ze skla. Tady je nutná fáze přilnutí (adherence), ke které slouží elektrostaticky nabitý plast. V některých případech je k přilnutí potřeba povrch potáhnout vhodnou látkou, například elastinem či kolagenem [10][11].

2.3 Růst buněk

Růst buněčné kultury prochází několika fázemi. Při nasazení buněk do kultivačních nádob se nejprve buňky přizpůsobují danému médiu, kdy se nemnoží a připravují se k buněčnému dělení. Je to počáteční fáze, tzv. lag-fáze.



Obrázek 4: Znárodnění rústu buněčné kultury [12]

Při adaptování na dané prostředí se začnou buňky exponenciálně množit. Je to fáze nazývaná log-fáze (logaritmická).

Až se buňky namnoží, dochází k postupnému vyčerpávání živin z média. Rychlost rústu postupně klesá, projevují se inhibiční mechanismy, například kontaktní inhibice, kdy se zastaví dělení živočišných buněk vzájemným dotykem. Této fázi se říká stacionární fáze neboli také plató fáze.

Po vyčerpání živin v médiu dochází k postupnému odumírání buněk. Této fázi se říká fáze úbytku buněk – odumírání.

Většina buněčných kultur dosáhne časem konfluence, to znamená, že se na kultivačním povrchu vytvoří hustá, souvislá vrstva buněk, které se vzájemně dotýkají. Konfluentní kultura je uspořádána do jediné vrstvy (monolayer), pak se další množení zastaví [10].

2.4 Kultivace buněk a kultivační podmínky

Aby buňky bylo možné uchovat po co nejdelší dobu, je potřeba jim zajistit vhodné prostředí s vhodnými podmínkami pro rúst buněk. Je potřeba zajistit vhodné kultivační nádoby, kultivační medium či teplotu a prostředí. Pro kultivaci je důležité zjištění typu kultivovaných buněk a podle toho se řídit při kultivování [6].

2.4.1 Kultivační média

Aby mohly buňky rúst, je potřeba je dát do vhodného kultivačního média, které nahradí extracelulární tekutinu. Jde o roztok, kde se nachází i několik desítek složek. Kultivační média musí dodat buňkám správné živiny, poskytnout správné pH roztoku či osmolaritu [13]. Jednotlivé komponenty média a jejich úloha jsou uvedeny v tabulce:

Tabulka 1: Hlavní komponenty média [13]

Komponenty:	Úloha:
Chlorid sodný	Upravuje osmotický tlak
Anorganické soli	Rovnováha elektrolytů
Hydrogenuhlíčan sodný	Pufrovací kapacita
Glukóza	Zdroj energie

Aminokyseliny	Zdroj dusíku
Vitamíny	Kofaktory
Růstové faktory a hormony	Stimulátor růstu
Antibiotika	Zabránění kontaminaci
Fenolová červeně	Vizuální indikátor pH
Živočišné sérum	Podpora růstu, doplněk



Obrázek 5: Kultivační média [14]

2.4.2 pH

Správné pH kultivačního média pro správný růst buněk se uvádí kolem 7,4. Výběru správného pH roztoku však záleží na typu kultivované buňky. Například fibroblastoidní buňky rostou nejlépe při pH v rozmezí 7,4 – 7,7. Správné pH se udržuje v médiu přidáním acidobazického indikátoru - fenolová červeně. Při pH 7,4 má pak kultivační médium jasně červenou barvu, které se po poklesu pH mění na žlutou barvu, naopak v alkaličtějším prostředí se mění na fialovou. Zežloutnutí média je známkou toho, že ho musíme vyměnit [4].

2.4.3 CO₂

Buňky se kultivují ve speciálních inkubátorech. Atmosféra v inkubátoru se obohacuje o oxid uhličitý, jehož množství se pohybuje okolo 5 %. Zvýšené množství CO₂ se podílí na udržení pH médií s bikarbonátovým pufrům. Také vyšší koncentrace rozpuštěného CO₂ lépe odpovídá poměrům v extracelulární tekutině [15].

2.4.4 Kyslík

Kvůli absenci některých transportních molekul, které se vyskytují v extracelulární tekutině, např. hemoglobinu, se stává kyslík pro buňky toxický. Nenavázaná forma kyslíku způsobuje tvorbu volných radikálů, které narušují buněčné struktury. Z tohoto důvodu je pak potřeba do média přidat antioxidantní látky nebo sérum, které tyto látky již obsahuje [16].

2.4.5 Osmolalita, teplota, viskozita

Správná osmolalita se uvádí mezi 320 a 340 mOsm/kg. Optimální teplota pro kultivování buněk je teplota, která se přibližuje teplotě organismu, tedy 37° C. Míra viskozity je podstatná při použití mechanických míchadel, pokud je totiž příliš nízká, může dojít k poškození [17].

2.4.6 Vybavení laboratoře

Práce s buněčnými kulturami musí probíhat ve velmi sterilním prostředí, aby nedošlo ke vnější kontaminaci. Je nutné pracovat ve vyhrazené laboratoři, aby se minimalizovalo množství kontaminujících částic ve vzduchu. Základním vybavením laboratoře je laminární box, který umožňuje sterilní práci v prostředí s filtrovaným vzduchem. Dále je pro buněčné kultury potřeba inkubátor, kde je přesná teplota vhodná pro kultivaci buněk a také vhodná atmosféra s řízeným přísunem oxidu uhličitého. Mimo jiné je potřeba optický mikroskop vybavený fázovým kontrastem a obvyklé laboratorní přístroje jako je centrifuga, hlubokomrazicí box, vodní lázeň apod. [18].

2.4.7 Kryoprezervace kultivovaných buněk

Kryoprezervace nyní patří mezi základní postupy v buněčné laboratoři. Již kultivované buňky je možné podle potřeby zmrazit a uchovat je tak na delší dobu. Buňky se však musí zmrazit tak, aby nedošlo k jejich poškození. Aby nedošlo k poškození buněk, je nutné přidat do kultivačního média vhodné kryoprotektivum, které ochrání kultivované buňky před poškozením krystalky vody. Nejvíce používané kryoprotektivum je dimethylsulfoxid neboli DMSO [4][18].

2.5 Hodnocení cytotoxicity in vitro

Buňky při kontaktu s toxickou látkou reagují různým způsobem. Dojde-li k poškození, kdy se buňka dostane do abnormálního stavu a může dojít k zániku buňky. Avšak také samovolný zánik buňky je nedílnou součástí fungujícího organismu, sloužící jako regulace počtu buněk. Za fyziologických podmínek buňka aktivuje sebevražedný program a dochází k zániku. Tomuto procesu se říká apoptóza. Naopak, když je buňka vystavena extrémním podmínkám, dochází k zániku buňky. Tato smrt nastane, když poškození nevratně poškozuje buněčnou strukturu nebo buněčné orgány. Tomuto zániku se říká nekróza [19].

2.5.1 Toxicita

Toxicita je měřena jako střední letální koncentrace LC_{50} , je to koncentrace toxické látky, která je schopna usmrtit 50% populace buněk. Cytotoxicita se také hodnotí pomocí hodnoty IC_{50} , je to střední inhibiční koncentrace. Jde o koncentraci, která způsobí 50% inhibici. Čím toxičtější se daná substance, tím nižší vykazuje hodnotu IC_{50} .

Míra cytotoxicity se hodnotí pomocí křivky, která se nazývá *dose-response* křivka. Na osy křivek se vynese závislost koncentrace toxické látky (dávka) a zastoupení přeživších buněk. Tato závislost nám pak představuje hyperbolická křivka. Pokud však použijeme logaritmické vyjádření koncentrace, dostaneme sigmoidní křivku. Hodnota IC_{50} se pak vyjádří jako inflexní bod na sigmoidní křivce [20].

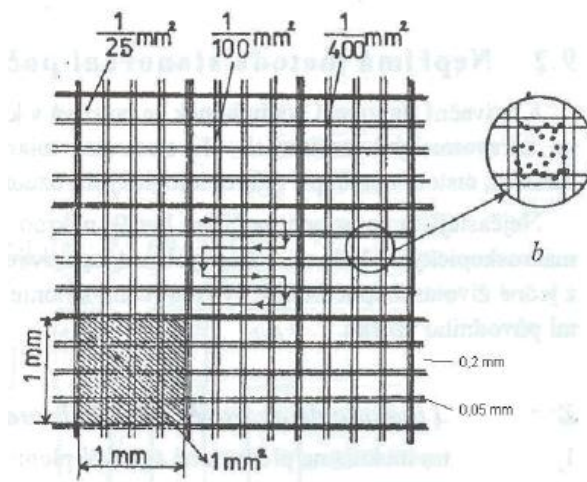
2.5.2 Cytotoxické metody

Cytotoxické testy jsou založeny na různých metodách. Jedna z nejvíce používaných metod je kolorimetrická. Je to optická metoda založená na pozorování zbarvení sledované suspenze. Pomocí spektrofotometru se měří absorbance (pohlcování světla v různých vlnových délkách) použitých barviv. Vzorky jsou mikropipetou dávkovány do určitých více jamkových destiček, nejčastěji do 96 - jamkových, tato destička je pak vyhodnocena pomocí čtečky ve spektrofotometru [19].

Další používanou metodou je průtoková cytometrie, která dosáhla velkého pokroku. U průtokové cytometrie se používá laserový paprsek, díky kterému lze identifikovat chemické a fyzikální vlastnosti zkoumaných látek. Na základě různých optických vlastností buněk lze například stanovit počet buněk v suspenzi [21].

2.5.3 Počítání buněk

Určení počtu buněk je základním postupem při pěstování buněk. Většinou stačí stanovit počet buněk odhadem, kdy se odhaduje počet buněk v zorném poli mikroskopu při daném zvětšení.



Obrázek 6: Bürkerova komůrka [22]

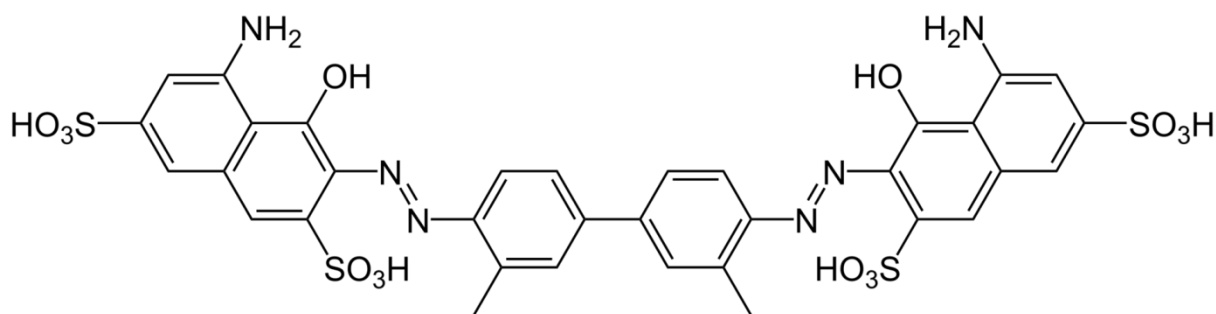
Časově náročnou metodou a pracnou je počítání buněk v cytometrické komůrce, jedná se o přesnější metodu. Nejpoužívanější je Bürkerova komůrka, jde o speciálně upravené podložní sklíčko, které obsahuje dvě mřížky definovaných rozměrů.

Mřížky jsou rozděleny na devět čtvercových polí o délce 1 mm. Na tuto mřížku se nanese suspenze buněk a přikryje se krycím sklíčkem, které se upevní pomocí dvou klipsů. Mezi touto mřížkou a sklíčkem se vytvoří prostor definovaného objemu. Počítáním je zjištěn počet buněk na polích mřížky, dále pak pomocí výpočtu můžeme vyjádřit počet buněk v 1 ml analyzované suspenze buněk. Buňky se počítají pod mikroskopem při určitém zvětšení [22].

2.5.4 Cytotoxické testy

2.5.4.1 Test s trypanovou modří

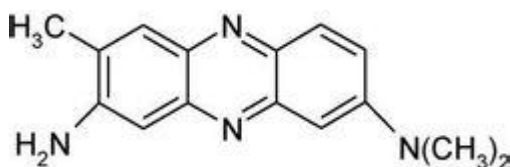
Test s trypanovou modří je velmi levnou a rychlou metodou, díky které poznáme, zda jsou buňky živé či mrtvé. Využívá se toho, že trypanová modř neprostupuje do živých buněk, pouze do buněk s narušenou plazmatickou membránou. Toto azobarvivo se udržuje na mrtvých či poškozených buňkách, které zbarvuje tmavě modrou barvou. Nikdy však neprosteje do nepoškozených buněk. Takto je pak snadné od sebe buňky odlišit. Poškozené či nepoškozené buňky se pak počítají pod mikroskopem například v Bürkerově počítací komůrce [23].



Obrázek 7: Chemický vzorec trypanové modři [24]

2.5.4.2 Test s neutrální červení

Test s neutrální červení je velmi často používaná, levná a jednoduchá kolorimetrická metoda. Test spočívá v tom, že neutrální červeně se v živých buňkách hromadí v lysozomech a obarví buňku. Mrtvé buňky toto barvivo absorbovat nedokážou, to znamená, že se buňky nezbarví. Čím je intenzita zbarvení větší, tím je vyšší životaschopnost buněk. Tento test se vyhodnocuje pomocí spektrofotometrie [25].

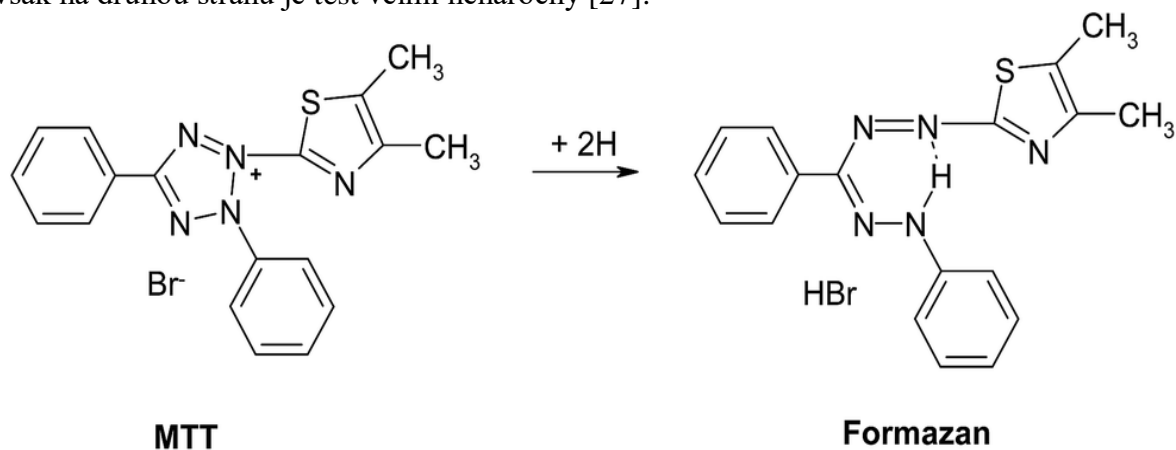


Obrázek 8: Chemický vzorec neutrální červeně [26]

2.5.4.3 MTT test

MTT neboli 3-[4, 5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid je žlutý solubilní roztok tetrazoliové soli. Je to první kolorimetrická metoda, kdy je MTT redukován v živých buňkách mitochondriálními dehydrogenázami na fialové-modrou sraženinu formazanu. Tuto sraženinu je však nutné rozpouštět před samotným měřením. Množství formazanu je vyhodnocováno spektrofotometricky a ukazuje nám životaschopnost buněk.

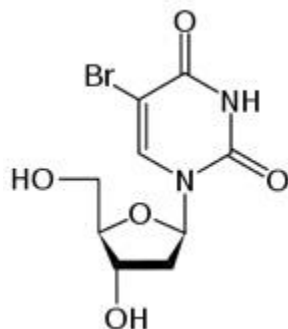
Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk, tudíž čím tmavší barva, tím vyšší je procento živých buněk. Tento test má však pár nevýhod, jako je nedostatečná redukce MTT, a také se ukázalo, že tento test je ovlivněn řadou parametrů, jako například pH média. Avšak na druhou stranu je test velmi nenáročný [27].



Obrázek 9: Chemická reakce MTT na formazan [28]

2.5.4.4 BrdU test

Díky tomuto testu můžeme posoudit buněčný růst, replikaci DNA. Během S fáze buněčného cyklu se BrdU, chemickým názvem 5-brom-2-deoxyuridin začlení do buněčné DNA. Začlenění je možné, protože brdU je analogem prekurzoru DNA – thyminu, což je derivát uridinu. Detekce replikace DNA je pak možná díky reakci specifických protilátek s brdU. Tento test se vyhodnocuje právě v S fázi za pomoci metody fluorescenční mikroskopie [29].



Obrázek 10: Struktura brdU [30]

2.6 Vybrané přírodní látky

2.6.1 Levandule lékařská

Levandule lékařská, latinským názvem *Lavandula angustifolia* je bohatě větvený polokeř, který patří do čeledi hluchavkovitých. Vyskytuje se v západním Středozeří až po Řecko. Sbírá se květ nebo celá kvetoucí nat'. Mezi hlavními účinnými látkami levandule jsou silice – zejména linaliacetát, borneol, geraniol, cineol, a také třísloviny. Dalšími látkami jsou antokyany, pryskyřice a hořčiny.

Levandule má přirozeně antimikrobiální účinek. Uplatňuje se v léčbě revmatismu, dny, úpravě střevní činnosti nebo pomáhá ke snížení krevního tlaku. Mimo jiné se silice levandule využívají v aromaterapii pro své zklidňující účinky a pomáhají při stresu, bolesti hlavy a k lepšímu spánku. Silice mají největší uplatnění, díky své vonné schopnosti, v parfumerii a v kosmetice [31][32].



Obrázek 11: Levandule lékařská [31]

2.6.2 Bez černý

Bez černý latinským názvem *Sambucus nigra* je keř nebo i strom, který patří do čeledi zimolezovitých. Vyskytuje se téměř po celé Evropě. Sbírají se převážně květy nebo plody, ale také i listy, kůra a kořeny. Hlavními účinnými látkami květů jsou glykosidy – rutin, sambunigrin, sliz, cholin, třísloviny, silice a aktivní látky plodů - antokyany, organické kyseliny, hořčiny, silice, vitamin A a B. Listy a kůra jsou jedovaté, obsahují glykosid sambucinigrin a alkaloid sambucin.



Obrázek 12: Bez Černý – okvěti [31]

Květy bezu černého se využívají převážně v léčbě cév, nachlazení, podporují pocení a má močopudné účinky. Bez černý má antimikrobiální účinky, výluhy z květů pomáhají v léčbě akné. Plody mají protizánětlivý účinek, využívají se při potížích trojklaného nervu, kloubů, páteře a také pomáhá při migrénách. Ve formě zábalů se využívají i listy bezu černého v léčbě revmatismu. Bez černý má využití nejen v léčitelství či kosmetice, ale také v potravinářství. Z plodů tzv. bezinek se vyrábí marmelády, vína, sirupy, med či ocet. Plody však musí být tepelně upraveny, čerstvé plody způsobují průjemy [31][33].

2.6.3 Jitrocel kopinatý

Jitrocel kopinatý latinským názvem *Plantago lanceolata* je vytrvalá bylina, která patří do čeledi jitrocelovitých. Výskyt jitrocele je velmi hojný, je zavlečen do mnoha částí světa. Pro léčivé účinky se sbírají listy. Hlavními účinnými látkami listu jsou glykosidy, fenylethanoidy, tříslové kyseliny, slizy, kyselina křemičitá, draslík a vápník. Ve formě sirupů se jitrocel využívá převážně k léčbě dýchacích cest. Zmírňuje dráždění ke kašli a uvolňuje hleny. Nálevy z jitrocele se využívají k léčbě zánětu očí. Žvýkáním semen se snižuje hladina cukru v krvi a může se využít jako projímadlo. Jitrocel má také protizánětlivý účinek a pomáhá k zacelení ran, hojí popáleniny, záněty a vředy. Díky jeho antimikrobiálním účinkům (glykosid aukubin) se uplatňuje i v kosmetice [31][33].



Obrázek 13: *Jitrocel kopinatý* [31]

2.6.4 Třapatka nachová

Třapatka nachová latinským názvem *Echinacea purpurea* je vytrvalá bylina, která patří do čeledi hvězdnicovitých. Echinacea je původem ze Severní Ameriky.



Obrázek 14: *Třapatka nachová* [31]

Nejvíce se v léčitelství užívá kořen, ale také list nebo květ. Obsahuje účinné látky jako estery mastných kyselin, polysacharidy, silice, seskviterpenické alkoholy, trísloviny a další. Její využití se uplatňuje převážně v posílení funkce imunitního systému jako prevence a zvýšení obranyschopnosti. Pro své velké desinfekční, antibakteriální účinky se třapatka využívá i v kožním lékařství [31].

2.6.5 Tymián obecný

Tymián obecný s latinským názvem *Thymus vulgaris* je velmi blízce příbuzný mateřídoušce obecné a patří do čeledi hluchavkovitých. Tymián je velmi aromatická bylina a vyskytuje se jako nízký polokeř.



Obrázek 15: Tymián obecný [31]

Nachází se převážně v jižní Francii, Španělsku a jižní Itálii, ale rozšířil se do dalších částí Evropy. Sbírá se převážně jeho kvetoucí nať. Hlavními účinnými látkami tymiánu jsou jeho silice s obsahem thymolu, karvakrolem, cineolem, pinenem, linalonem a borneolem. Přítomny jsou i třísloviny, flavonoidy, flavonové glykosidy, metylované flavony a různé minerály. Tymián má velké desinfekční účinky, proto se uplatňuje v léčbě dutiny ústní a také celkově trávicího systému, kdy snižuje nadýmání či bolesti v břiše. V domácím léčitelství se využívá v léčbě kašle nebo močového měchýře. Zevně se používá při onemocnění pokožky, pokožku prokrvuje a hojí zanícené rány. Využití má nejen v léčitelství, ale pro své výrazné aroma také ve formě koření k ochucování pokrmů [31][32].

2.6.6 Šalvěj lékařská

Šalvěj lékařská latinským názvem *Salvia officinalis* je vytrvalý, silně aromatický polokeř, který patří do čeledi hluchavkovitých.



Obrázek 16: Šalvěj lékařská [31]

Výskyt je původně v jižní Evropě a v Malé Asii, v ČR je pěstována. Sbírají se převážně listy šalvěje. Hlavními účinnými látkami jsou silice, které obsahují thujon, salviol, cineol, kafr, borneol. Dalšími látkami jsou třísloviny, organické kyseliny (kyselina kávová), triterpenoidy, lakton, vitamíny řady B a další. Šalvěj má velmi široké využití jak v kosmetologii, v léčitelství, tak i pro své aroma k ochucování pokrmů. V léčitelství se používá ke snížení pocení, pomáhá při gynekologických potížích, při zánětech či začínající menstruaci. Její antibiotické účinky se využívají v léčbě angíny, močových cest nebo také s problémy zažívacího ústrojí. Jako zevní použití se využívá k lepšímu hojení ran, při léčbě akné či jako kloktadlo při bolestech v krku [31][32].

2.6.7 Rozmarýn lékařský

Rozmarýn lékařský latinským názvem *Rosmarinus officinalis* je stálezelený, výrazně aromatický polokeř, který patří do čeledi hluchavkovité. Vyskytuje se ve Středozeší, u nás se pěstuje. Sbírá se převážně list. Účinnými látkami rozmarýnu jsou silice – borneol, kafr, limonem, verbenon, dále také flavonoidy, diterpenové hořčiny, trísloviny a další. Rozmarýn se využívá převážně ke zlepšení trávicího systému, dochází ke zvyšování tvorby trávicích šťáv a žluče. Také pomáhá k lepšímu prokrvení, při bolestech svalů, snižuje pocit chladu v končetinách, upravuje krevní tlak. Rozmarýn má silné antioxidační účinky. Využívá se také v parfumerii ve formě vonných olejů a aromalamp. V potravinářství slouží jako koření k ochucení pokrmů. Jako droga se nesmí překračovat doporučená dávka, protože může způsobit křeče. Je též zakázána v průběhu těhotenství, kvůli jejímu působení na dělohu [31][32].



Obrázek 17: Rozmarýn lékařský [31]

2.6.8 Zázvor obecný

Zázvor obecný latinským názvem *Zingiber officinale* je vytrvalá bylina, která patří do čeledi zázvorovitých. Zázvor je původem exotická, vyšlechtěná rostlina, která pochází z Indie. V současnosti se volně už nevyskytuje a pěstuje se v tropických oblastech. Nejvíce užívanou částí zázvoru jsou jeho kořeny – oddenky. Tyto oddenky obsahují silice - seskviterpeny, zingiberin, díky nimž má zázvor aromatickou vůni, také bisaboleon, farnesol, borneol.

Dále obsahuje aktivní látku gingerol, který má za následek typickou hořkost. Také můžeme zvýšením teploty získat zingeron, což je silně aromatická látka. Díky této typické chuti zázvoru a aromatu je jeho největší využití v potravinářství a v parfumerii.

V potravinářství se používá jako koření. Pomáhá při zažívacích potížích, nevolnostech. Také snižuje hladinu cholesterolu. Pro své antioxidační účinky pomáhá jako prevence proti nachlazení. Velké uplatnění nachází i v kosmetologii, kdy pomáhá k prokrvení pokožky a má dezinfekční účinky [32][34].



Obrázek 18: Zázvor obecný - oddenek [34]

2.6.9 Hřebíček vonný

Hřebíčkovce vonný, latinským názvem *Syzygium aromaticum* je stálezelený strom, který patří do čeledi myrtovitých. Hřebíčkovce je původem z Indonézie. Nyní se pěstuje na ostrově Pemba, který tvoří část státu Tanzanie. Sklízí a suší se především poupata – hřebíček. Hlavními účinnými látkami hřebíčku jsou výrazně aromatické silice, které obsahují eugenol a caryophyllen. Dalšími látkami jsou fenolkarbonové kyseliny, třísloviny, flavonoidy a další. Největší využití hřebíčku je v potravinářství ve formě koření. Další využití nalézá v zubním lékařství, kdy pomáhá ve zmírnění bolestivosti a citlivosti zubních nervů, dásní, léčí afty a odstraňuje zápach z úst. Hřebíček také podporuje trávení a snižuje nadýmání. Své využití má i v parfumerii, či využití vonného extraktu v kosmetologii [32][35].



Obrázek 19: Hřebíčkovce vonný [32]

2.6.10 Skořice

Skořice se získává ze skořicovníků, například skořicovníku čínského latinským názvem *Cinnamomum casia*. Skořicovník je tropický strom, který patří do čeledi vavřínovitých. Skořicovník se pěstuje v tropických oblastech například na Cejlonu, v Číně nebo Jávě. Sklízí se především kůra stromu, kdy platí, čím starší, tím více účinných látek. Mezi účinnými látkami jsou převážně silice, které obsahují eugenol, phellandrin a aldehyd kyseliny skořicové.

Dále také obsahuje třísloviny, slizy, pryskyřice a další. Skořice se využívá převážně jako aromatické koření do jídel, ale také i příznivé účinky na lidské tělo. Má velké dezinfekční účinky, antioxidační účinky, pomáhá ke zlepšení trávicího systému a je vhodná při nachlazení. Snižuje cholesterol a hladinu krevního cukru. Skořice také dokáže zahřát tělo v zimních obdobích, protože dokáže rozproudit krev v žilách. U skořice byl také potvrzen

blahodárný účinek na zástavu šíření rakoviny či leukemie. Využívá se v kosmetologii, ale také i jako výborné afrodisiakum [32][34].



Obrázek 20: Hřebíčkovce vonný [32]

2.7 Antioxidační látky

Antioxidační látky jsou látky, které napomáhají k zachycení volných radikálů. Volné radikály jsou vysoce reaktivní molekuly s nepárovými elektrony, které mohou poškodit buněčné membrány, proteiny, lipidy či DNA. Tyto volné radikály vznikají během normálních procesů metabolismu nebo také vlivem okolí. Při rostoucím věku tvorba volných radikálů převládá nad obranným mechanismem. To vede k poškození buněčných kultur a následnému urychlenému stárnutí kůže. Proto jsou tyto látky jedny z nejpoužívanějších v kosmetických produktech [36].

2.7.1 Polyfenoly

Polyfenoly jsou látky obsahující ve své struktuře benzenové jádro s hydroxylovými skupinami. Největší zastoupení polyfenolů je v zeleném a černém čaji. Polyfenoly mají velmi pozitivní vliv na lidské zdraví, působí proti různým chronickým onemocněním, při léčbě rakoviny, cukrovky, kardiovaskulárních problémů [37].

2.7.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou skupinou polyfenolů, které jsou známy jako pigmenty zbarvující například stromy. Největšími zdroji flavonoidů jsou ovoce nebo zelenina, vyskytují se také v čaji či vínu. Vykazují velmi vysoký antioxidační účinek, kdy přitahují volné radikály a tím chrání buňky před toxickým působením škodlivých látek. Účinků je využíváno převážně v medicíně - v léčbě proti různým infekcím či v kosmetologii ve výrobě kosmetických přípravků [37][38].

2.8 Enkapsulace

Enkapsulace je proces, kdy je zachycena aktivní látka v nosném materiálu. Hlavními důvody enkapsulace je tedy ochrana jádra před vnějším prostředím a kontrolované uvolňování aktivní látky [39].

Hlavním důvodem enkapsulace pro kosmetické využití je přenos aktivní látky přes kožní bariéru k dosažení cílové vrstvy kůže. Hlavní kožní bariérou je kožní vrstva stratum corneum, která patří do části pokožky. Tato vrstva má vysoce nepropustný charakter a prostupnost přes

tuto část je jeden z hlavních problémů transdermálního dodání účinné látky. Jednou z metod enkapsulace pro překonání kožní bariéry je tvorba částic, jako jsou například liposomy [40].

2.8.1 Liposomy

Liposomy jsou uměle vytvořené částice - vezikuly, které jsou tvořeny nejčastěji z cholesterolu a přírodně získaných fosfolipidů (vaječný žloutek). Jejich velikost se pohybuje okolo 25 až 5000 nm. Které se vytvářejí převážně jako nosiče, do kterých mohou být zapouzdřeny aktivní látky.

Membrány lipozomů jsou složeny z fosfolipidové dvojvrstvy, která obklopuje vnitřní vodnou část. Fosfolipidy mají amfifilní charakter, skládají se z hydrofilní hlavičky a hydrofobního „ocásku“ složeného z dlouhého uhlovodíkového řetězce. Ve vodném prostředí při zvyšování fosfolipidových molekul dochází ke shlukování těchto látek do dvojvrstev a tvorby právě liposomů. Membrána fosfolipidů je velmi podobná lidské kůži, tudíž se může do ní snáze integrovat a uvolňovat potřebné aktivní látky. Liposomy se tvoří například pomocí ultrazvuku [41][42].

3 CÍL PRÁCE

Cílem předložené bakalářské práce bylo seznámení se s možností využití buněčných kultur k testování cytotoxicity přírodních látek.

V rámci práce byly řešeny následující dílčí úkoly:

- Charakterizace vybraných přírodních extraktů – optimalizace metod stanovení obsahu polyfenolů, flavonoidů a antioxidační aktivity za pomoci spektrofotometrie.
- Seznámení s možností enkapsulace přírodních extraktů.
- Vyhodnocení cytotoxicity připravených preparátů pomocí cytotoxického testu MTT.
- Následné možné využití připravených preparátů v kosmetických přípravcích.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie, přístroje a pomůcky

4.1.1 Standardní a speciální chemikálie

3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid, Sigma-Aldrich (Německo)

ABTS(2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina), Sigma-Aldrich (Německo)

Acutase (Biosera), Biotech (Německo)

Antibiotic-Antomykotic (Biosera), Biotech (Německo)

Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a., Vitrum-LachNer (ČR)

Dodecylsírán sodný, Serva (Německo)

Dusitan sodný, p.a., – Vitrum LachNer (ČR)

Ethanol, p.a., – Vitrum, LachNer (ČR)

Folin-Ciocalteu činidlo, Serva (Německo)

Hexahydrát chloridu hlinitého, p.a., – Vitrum, LachNer (ČR)

Hexahydrát chloridu železitého, p.a., LachNer (ČR)

Hydrogenfosforečnen disodný, p.a., Vitrum-LachNer (ČR)

Hydroxid sodný, p.a., – Vitrum, LachNer (ČR)

Chlorid draselný, p.a., Vitrum-LachNer (ČR)

Chlorid sodný, p.a., Vitrum-LachNer (ČR)

Chloroform, p.a., – Vitrum, LachNer (ČR)

Cholesterol – směs hydroxy-5-cholestenu a cholesten-3 β -olu, Serva (Německo)

Katechin, Sigma-Aldrich (Německo)

KGM-Gold™ Keratinocyte Growth Medium, Biotech ((Německo)

Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (Německo)

Kyselina chlorovodíková, p.a., Vitrum-LachNer (ČR)

Lecithin - sojový, Serva (Německo)

Peroxodisírán draselný, Sigma-Aldrich (Německo)

Sephadex LH-20, Sigma-Aldrich (Německo)

Thiokyanát amonný, p.a., LachNer (ČR)

Trolox(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), Sigma-Aldrich (Německo)

Trypanová modř, Biotech (Německo)

Uhličitan sodný, p.a., – Vitrum, LachNer (ČR)

4.1.2 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy, Boeco (Německo)

Automatické pipety v různém rozsahu objemu – Discovery (SRN) a Biohit (Německo)

Biohazard box, model Airstream, třída II - ESCO, Biotech ((Německo)

CelCulture CO2 inkubátor – ESCO, Biotech (Německo)

Centrifuga, Sartorius Sigma (Německo)

ELISA reader BioTek Elx808, BioTek (Německo)

Inverzní biologický mikroskop, Laboserv (ČR)

Koloidní DLS analyzátor Zetasizer ZS, Malvern (UK)
Optický mikroskop a Software Dino –Capture 2.0 (ČR)
Spektrofotometr Helios γ , Unicam (VB)
Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HS3200, Bandeline (Německo)
Vortex, TK3S, Kartell spa (USA)

4.2 Charakterizace přírodních extraktů

4.2.1 Příprava přírodních extraktů

Na přípravu bylinných extraktů bylo naváženo 0,1 g sušené byliny. Toto množství bylo zalito 10 ml vřelé vody (100 °C). Doba louhování byla 15 min.

4.2.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace polyfenolů

Do zkumavek byl napipetováno 1 ml destilované vody, 1 ml desetkrát zředěného Folin-Ciocalteuova činidla a 50 μ l vzorku. Roztoky byly promíchány na vortexu a po 5 minutách přidán nasycený uhlíčitán sodný. Roztoky byly opět promíchány na vortexu a po 15 minutách byla změřena absorbance při 750 nm. Kalibrační řada byla sestavena z naředěné kyseliny gallové o koncentracích 0,1-0,7 mg/ml (celkem 7 různých koncentrací). Slepý vzorek obsahoval místo vzorku destilovanou vodu.

4.2.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace flavonoidů

Do zkumavek bylo napipetováno 1,5 ml destilované vody, 0,2 ml 5% roztoku dusitanu sodného a 0,5 ml vzorku – naředěný katechin. Roztoky byly promíchány na vortexu a po 5 minutách byl přidán 10% roztok chloridu hlinitého, roztoky byly zase promíchány a ponechány 5 minut stát. Následně byl do zkumavek přidán 5% roztok hydroxidu sodného a 1 ml vody. Naposledy byly roztoky promíchány a po 15 minutách byla změřena absorbance při 510 nm. Pro sestavení kalibrační řady bylo ze zásobního roztoku katechinu o koncentraci 1mg/ml připraveno 6 roztoků o koncentracích 0,5-0,3 mg/ml. Slepý vzorek obsahoval místo vzorku vodu.

4.2.4 Spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS

Na začátek byl připraven kation $ABTS^{\bullet+}$ tak, že byl rozpuštěn ABTS ve vodě na koncentraci 7mM. Radikálový kation byl připraven přidáním peroxodisíranu draselného na konečnou koncentraci 3,45 mM. Tento připravený roztok byl ponechán 12 hodin ve tmě. Před použitím byl $ABTS^{\bullet+}$ zředěn etanolem na absorbanci $0,700 \pm 0,02$, měření bylo při vlnové délce 734 nm-proti etanolu. Před začátkem měření byla zjištěna hodnota A_0 z 1 ml $ABTS^{\bullet+}$ a 10 μ l destilované vody, od které se pak další naměřené hodnoty absorbance odečítaly. Samotné měření probíhalo v zúžené kyvetě, kdy byl přidán 1ml $ABTS^{\bullet+}$ s 10 μ l vzorku a byl sledován pokles absorbance. Po 10 minutách byla daná absorbance zaznamenána. Pro sestavení kalibrační řady byl naředěn roztok Troloxu na rozmezí koncentrací od 50-400 μ g/ml, který byl rozpuštěn v 60 % etanolu. Slepý vzorek byl etanol.

4.3 Příprava a charakterizace částic

4.3.1 Příprava liposomových částic

Nejdříve byly připravené bylinné extrakty o koncentraci 10mg/ml. Do sady kádinek bylo naváženo 10 mg cholesterolu, 90 mg lecitinu a přidán 10 ml extraktu. Roztok byl za pomoci tyčového ultrazvuku promíchán s intenzitou 85% po dobu 1 minuty.

4.3.2 Stanovení enkapsulační účinnosti

Stanovením enkapsulační účinnosti bylo zjištěno, kolik aktivní látky bylo enkapsulováno do liposomů. Účinnost enkapsulace byla zjištěna za pomoci stanovení koncentrace volných polyfenolů. Z rozdílu celkové koncentrace polyfenolů v roztoku (před enkapsulací) a koncentrace po enkapsulaci (neenkapsulované složky) byla zjištěna účinnost enkapsulace a vyjádřena v procentech.

4.3.3 Stanovení dlouhodobé stability částic

Pro stanovení dlouhodobé stability byly liposomové částice uchovány ve vodném prostředí v poměru 1:3 a v prostředí carbomeru ve stejném poměru a skladovány v lednici. Stabilita částic byla vypočtena na základě uvolňování polyfenolů do okolí, kdy byla odečítána hodnota naměřená hned po enkapsulaci od hodnoty naměřené v čase týden, 2 týdny a 2 měsíce od přípravy částic.

4.3.4 Stanovení koncentrace liposomů pomocí Stewart testu

Pro stanovení koncentrace prázdných liposomových částic byla využita metoda s názvem Stewartův test. Tato metoda je založena na schopnosti fosfolipidů tvořit komplex s ferrothiokyanátem amonným. Na přípravu ferrothiokyanátu amonného bylo naváženo 27,03 g hexahydrátu chloridu železitého s 30, 4 g thiokyanátu amonného a doplněno destilovanou vodou do 1 l. Dále bylo připraveno 10 ml roztoku fosfolipidů s chloroformem v koncentraci 0,1 mg/ml. Kalibrační řada byla připravena podle následující tabulky:

Tabulka 2: Kalibrační řada – Stewartův test

Eppendorfova Zkumavka	Standard [ml]	Chloroform [ml]	Ferrothiokyanát [ml]
0	0	1	1
1	0,05	0,95	1
2	0,1	0,9	1
3	0,2	0,8	1
4	0,3	0,7	1
5	0,4	0,6	1
6	0,5	0,5	1

Každá zkumavka byla promíchána na vortexu a centrifugována 10 min při 1000 otáčkách za sekundu. Spodní část byla Pasterovou pipetou odebrána a byla spektrofotricky změřena absorbance při 485 nm.

V případě liposomů bylo při měření koncentrace fosfolipidů pipetováno 0,5 ml roztoku připravených liposomů, 0,5 ml chloroformu a 1 ml ferrothiokyanátu.

4.3.5 Optimalizace metody filtrace liposomů

V práci byla optimalizována i metoda filtrace liposomů-pro jejich oddělení dle velikosti. Filtrace byla provedena pomocí dělení částic v gelové kolonce. Gelové kolona byla připravena pomocí Sephadex LH-20. Byly připraveny kolony s vrstvou 4 cm gelu s průměrem 1cm. Po přípravě kolony byla vždy odstraněna voda pomocí centrifugy. Po odstranění vody z kolony se přidal 1 ml liposomových částic, vzorky byly odstředěny v centrifuze při 600, 800 případně 900 otáčkách po dobu 2 minut.

4.3.6 Stanovení velikosti a stability částic pomocí DLS a zeta potenciálu

Připravené částice byly analyzovány na koloidním analyzátoru Malvern Zetasizer ZS metodou dynamického rozptylu světla. Proměřeny byly připravené liposomové částice se všemi bylinkami jednak neupravené, dále upravené přes 220 nm filtr kvůli sterilitě a také upravené přes Sephadex k docílení vhodné velikosti částic.

Vzorky byly proměřovány v kyvetách a umístěny do přístroje, kde byla naměřena distribuce velikosti částic. V druhém měření byl do kyvety přidán elektrodový nástavec, kterým byl proměřen zeta potenciál. Ze zeta potenciálu byla odvozena stabilita částic.

4.4 Kultivace kožních buněk

Pro MTT test byly vybrány kožní buňky – keratinocyty. Tyto buňky byly uchovány v zamrazeném stavu ve speciálních zkumavkách. Buňky se médiem byly rozpipetovány do kultivačních lahvíček, které byly vloženy a uchovávány v termostatu při teplotě 37° C s 5% obsahem CO₂. Veškerá práce s buňkami probíhala za sterilních podmínek, v rukavicích ve sterilním boxu. Kultivační médium v lahvíčkách bylo měněno podle potřeby 2-3x do týdne.



Obrázek 21: Termostat

Keratinocyty byly kultivovány v komerčním médiu (KGM-Gold™ Keratinocytes Growth Medium). Hotové médium bylo před použitím jen vytaženo z chladničky a ponecháno

vytemperovat na laboratorní teplotu. Buňky v kultivační láhvi byly vytaženy v rukavicích z CO₂ kultivačního boxu.

Pod mikroskopem byl zkontrolován stav buněk v celé lahvičce, zda tam není kontaminace a zda již lahvička kompletně narostla. Pokud nebyl v lahvičce zaznamenán dostatečný počet buněk, bylo pouze vyměněno médium, v případě kdy bylo buňkami porostlé celé dno láhve, byly buňky pasážovány.

Při výměně média bylo v sterilním boxu vylito z lahvičky médium a nahrazeno 5 ml nového média.

Při pasážování bylo opět z lahvičky sterilně vylito médium, buňky byly dvakrát až třikrát pořádně propláchnuty připraveným sterilním PBS pufrem (vždy cca pět mililitrů). Po propláchnutí bylo přidáno 0,5 enzym akutázy a lahvička byla vložena do termostatu (37 ° C) na cca pět až deset minut. Poté bylo pod mikroskopem zkontrolováno, zda došlo k odloučení buněk ode dna lahvičky. Po odloučení všech buněk bylo sterilně přidáno do lahvičky cca 5ml PBS pufru a buňky v něm byly homogenizovány a přeneseny do sterilní centrifugační zkumavky. Poté byly buňky odstředěny (cca 5min, 360g), pak byl pufr slit (buňky byly usazeny v peletce na dně). Do centrifugační zkumavky bylo přidáno médium, buňky v něm byly rozsuspendovány a přeneseny do nové lahvičky, případně rozdělené do několika lahviček (v tomto případě byl čistým médiem doplněn objem na 5 ml na lahvičku). Na závěr bylo zkontrolováno pod mikroskopem, zda byly buňky opravdu v lahvičce a lahvičky byly vráceny do kultivačního termostatu.



Obrázek 22: Kultivační lahvičky s buňkami

4.4.1 Příprava buněk na cytotoxický test

Lahvičky byly vyjmuty z termostatu a nachystány ve sterilním boxu. Z lahvičky bylo sterilně vylito médium, buňky byly dvakrát až třikrát pořádně propláchnuty připraveným sterilním PBS pufrem (vždy cca pět mililitrů). Po propláchnutí bylo přidáno 0,5 enzymu akutázy a lahvička byla vložena do termostatu (37 ° C) na cca pět až deset minut. Poté bylo pod mikroskopem zkontrolováno, zda došlo k odloučení buněk ode dna lahvičky. Po odloučení všech buněk bylo sterilně přidáno do lahvičky cca 5ml PBS pufru a buňky v něm byly homogenizovány a přeneseny do sterilní centrifugační zkumavky. Poté byly buňky odstředěny (cca 5min, 360g), pak byl pufr slit (buňky byly usazeny v peletce na dně). Do

centrifugační zkumavky bylo přidáno malé množství média, buňky v něm byly rozsuspendovány a podrobeny testu viability a následnému počítání buněk.

4.4.1.1 Počítání buněk a test viability s trypanovou modří

Z připravených buněk bylo pipetou odejmuto 10 μ l roztoku a kápnuto na mřížku Bürkerovy komůrky spolu s 10 μ l trypanové modří. Pod mikroskopem se pak sledovalo, zda buňky přijímají toto barvivo nebo nepřijímají a jsou živé. Nadále byly buňky spočítány v každém čtverci mřížky a vypočítán průměr, ze kterého byla následně stanovena koncentrace buněk na 1 ml. Pro zaplnění 60 jamek v mikrotitrační destičce bylo pro test potřeba $1,3 \cdot 10^6$ buněk celkem. Následně se pak vypočetlo, zda výsledné množství buněk bude stačit na provedení testu, případně zda je třeba buňky ředit novým médiem, tak aby jejich koncentrace byla $2 \cdot 10^4$ buněk/100 μ l.

4.4.2 MTT test

Pro stanovení cytotoxicity přírodních extraktů a liposomových částic byl vybrán MTT test. Na MTT test je třeba 96 - jamkovou destičku. Tato destička je tvořena osmi řadami od A po H a dvanácti sloupci. Destička byla rozvrhnutá tak, aby se otestovaly všechny přírodní extrakty s alespoň čtyřmi různými koncentracemi i se vzorky liposomových částic. Analyzovanými vzorky byly všech 10 přírodních extraktů ve 4 koncentracích – 1 g/ml, 0,5 g/ml, 0,1 g/ml a 0,05 g/ml. Dále byly otestovány liposomové částice s hřebíčkem, černým bezem, skořicí, šalvějí, rozmarýnem a echinaceou. Pro porovnání byly otestovány i prázdné liposomy a jako blank byly ponechány buňky bez vzorků.

Nejprve se napipetovaly buňky - 100 μ l do každé jamky, kdy se do krajních jamek destičky napipetoval pufr (PBS) k zamezení případnému vysychání. MTT destička se poté nechala na 24 hodin inkubovat v termostatu.

Po uplynutí 24 hodin se do jamek k buňkám přidaly testované látky v různých koncentracích, vždy 20 μ l. Destička se nechala opět inkubovat 24 hodin. Poté se k buňkám přidalo 20 μ l připraveného MTT (2,5 mg MTT na 1 ml PBS) a po třech hodinách 100 μ l připraveného SDS (1 g SDS na 10 ml PBS). Takto připravená destička se nechala 2 dny ve tmě při laboratorní teplotě. Pomocí přístroje ELISA reader se změřila absorbance při vlnové délce 562 nm.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Charakterizace přírodních extraktů

5.1.1 Příprava přírodních extraktů

Příprava přírodních extraktů byla provedena podle postupu 2.1. Pro případné analýzy byly roztoky centrifugovány. Extrakty byly připraveny z hřebíčku, rozmarýnu, mateřídoušky, levandule, jitrocele, skořice, echinacea, černého bezu, šalvěje a zázvoru.



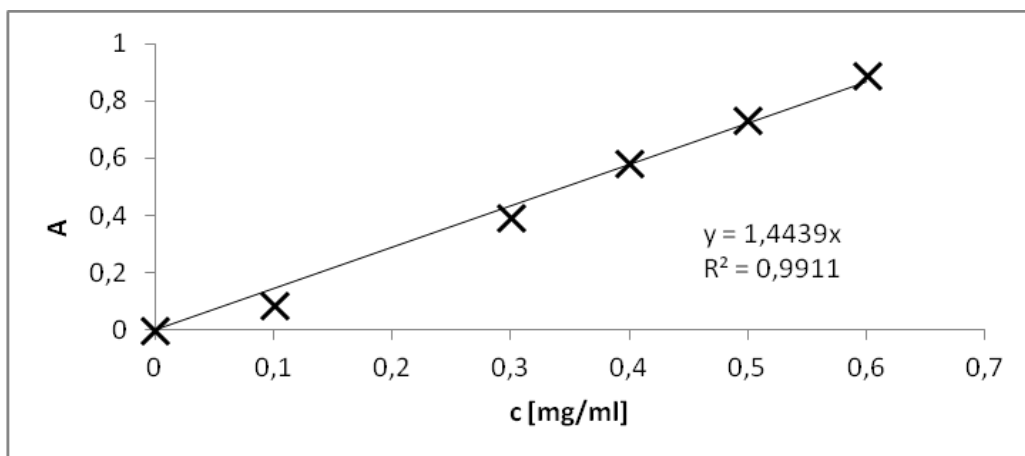
Obrázek 23: Přírodní extrakty – mateřídouška, levandule, rozmarýn, jitrocel, hřebíček



Obrázek 24: Přírodní extrakty – skořice, černý bez, šalvěj, echinacea, zázvor

5.1.2 Stanovení koncentrace celkových polyfenolů

Podle postupu v kapitole 4.2.2 byla stanovena kalibrační závislost kyseliny gallové. Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr.

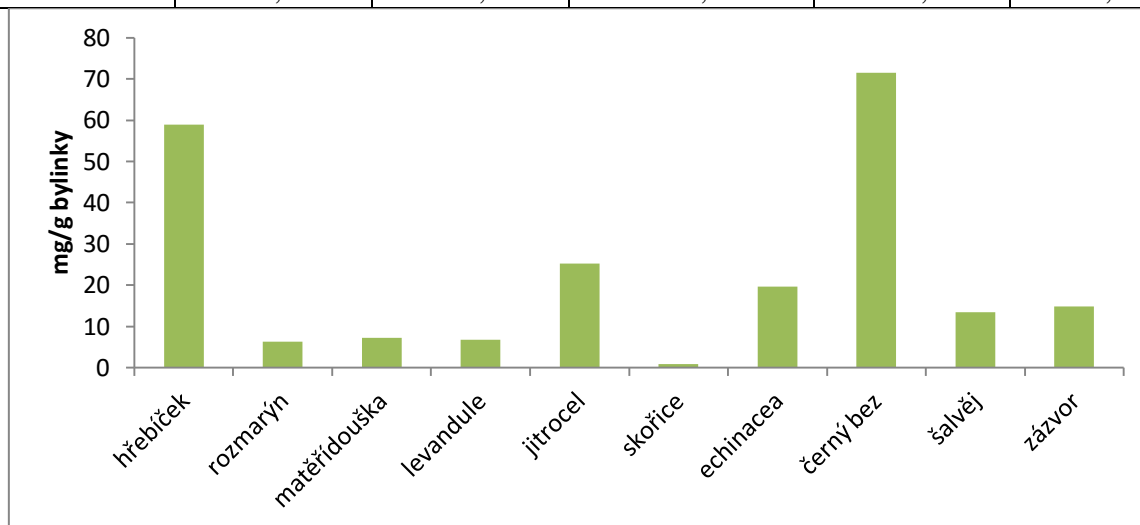


Obrázek 25: Kalibrační závislost polyfenolů

Byla stanovena celková koncentrace polyfenolů v připravených bylinných extraktech jako vzorek. Vypočítaná byla z rovnice regrese kalibrační křivky v miligramech na gram bylinky. Každý extrakt byl naměřen třikrát a z naměřených hodnot vypočítaný průměr. Výsledky viz Tabulka 3.

Tabulka 3: Výsledný obsah polyfenolů v extraktech

bylinka	hřebíček	rozmarnýn	matěřídouška	levandule	jitrocel
c[mg/g]	58,960 ± 0,018	6,279 ± 0,019	7,157 ± 0,021	6,787 ± 0,003	25,279 ± 0,011
bylinka	skořice	echinacea	černý bez	šalvěj	zázvor
c[mg/g]	0,854 ± 0,0003	19,646 ± 0,011	71,496 ± 0,016	13,401 ± 0,002	14,786 ± 0,006

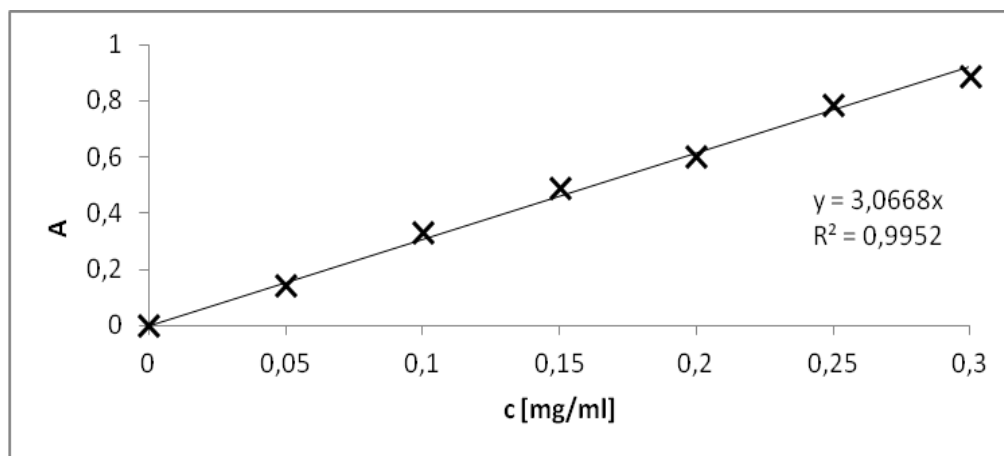


Obrázek 26: Obsah polyfenolů v extraktech

Z grafu (Obrázek 26) jsou viditelné nejvyšší obsahy polyfenolů ve vodném extraktu u černého bezu - 71,5 mg/g a hřebíčku – 58,9 mg/g. Minimální obsah polyfenolů byl u skořice – 0,9 mg/g. Zbytek obsahu polyfenolů u dalších vodných extraktů se pohyboval do 25 mg na gram bylinky.

5.1.3 Stanovení koncentrace celkových flavonoidů

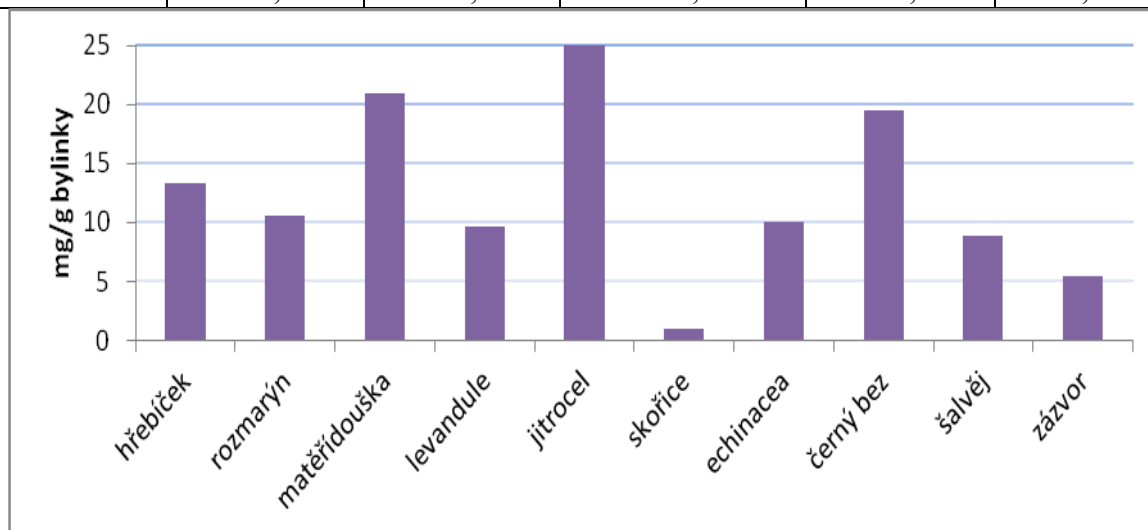
Podle postupu v kapitole 4.2.3 byla stanovena kalibrační závislost katechinu. Celková koncentrace flavonoidů byla provedena v připravených vodných bylinných extraktech jako vzorek. Vypočítaná byla z rovnice regrese kalibrační křivky v miligramech na gram bylinky (Obrázek 27). Každý extrakt byl naměřen třikrát a z naměřených hodnot vypočítaný průměr. Výsledky viz Tabulka 4 a Obrázek 28.



Obrázek 27: Kalibrační závislost flavonoidů

Tabulka 4: Výsledný obsah flavonoidů v extraktech

bylinka	hřebíček	rozmarnýn	matěřídouška	levandule	jitrocel
c[mg/g]	13,391 ± 0,003	10,564 ± 0,001	20,890 ± 0,002	9,717 ± 0,001	25,086 ± 0,001
bylinka	skořice	echinacea	černý bez	šalvěj	zázvor
c[mg/g]	0,999 ± 0,001	9,989 ± 0,002	19,467 ± 0,003	8,902 ± 0,001	5,435 ± 0,001



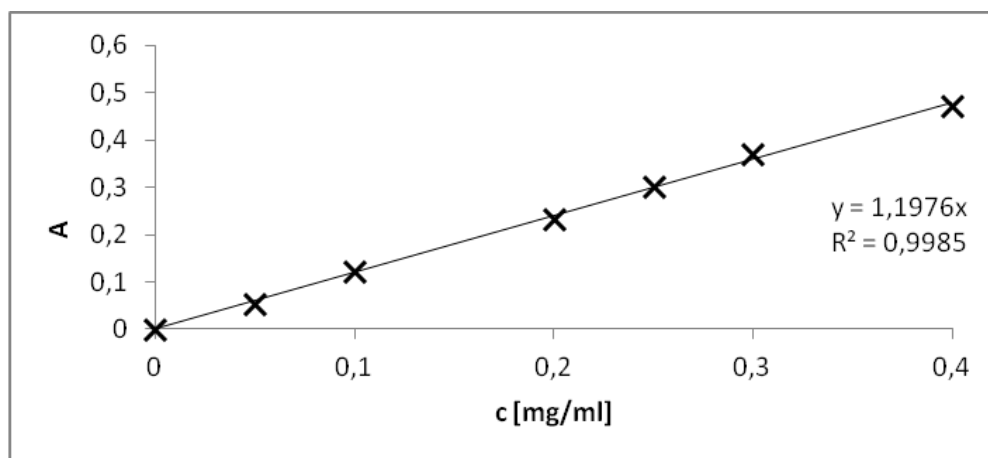
Obrázek 28: Obsah flavonoidů v extraktech

Z grafu (Obrázek 28) jsou viditelné nejvyšší obsahy flavonoidů ve vodném extraktu u jitrocelu - 25,1 mg/g, mateřídoušky – 20,9 mg/g a černého bezu 19,5 mg/g. Minimální obsah flavonoidů byl jednoznačně naměřen u skořice – 1,0 mg/g. Zbytek obsahu flavonoidů se pohyboval kolem 10 mg/g bylinky.

5.1.4 Stanovení antioxidační aktivity

Podle postupu v kapitole 4.2.4 byla stanovena kalibrační závislost Troloxu (Obrázek 29). Antioxidační aktivita byla provedena v připravených vodných bylinných extraktech. Vypočítaná byla z rovnice regrese kalibrační křivky v miligramech na gram bylinky. Každý

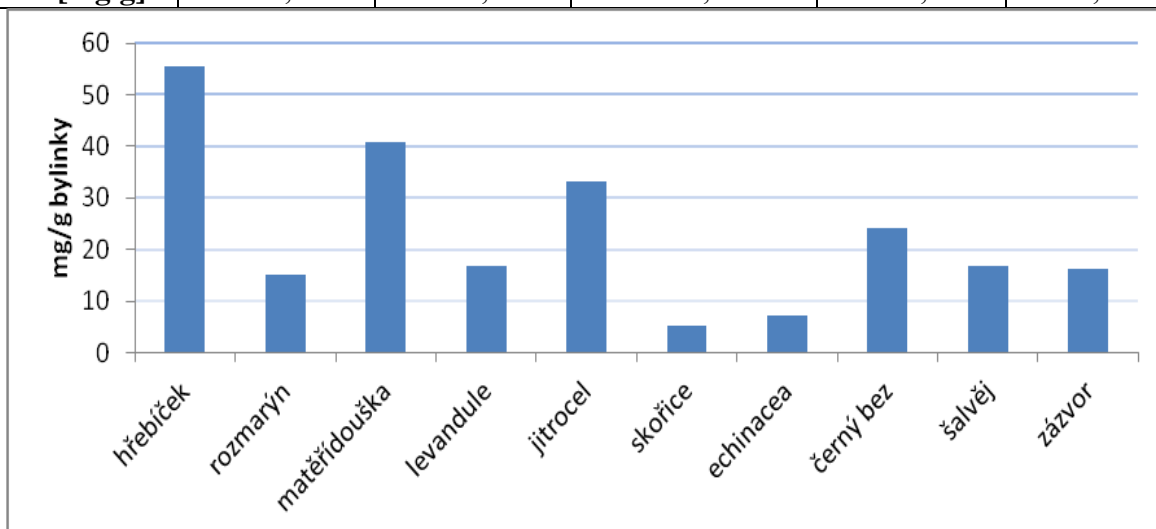
extrakt byl naměřen třikrát a z naměřených hodnot vypočítaný průměr. Výsledky viz Tabulka 5 a Obrázek 30.



Obrázek 29: Kalibrační závislost antioxidační aktivity

Tabulka 5: Antioxidační aktivity

bylinka	hřebíček	rozmarnýn	matěřídouška	levandule	jitrocel
c[mg/g]	55,653 ± 0,001	15,030 ± 0,014	40,915 ± 0,013	16,728 ± 0,007	33,233 ± 0,021
bylinka	skořice	echinacea	černý bez	šalvěj	zázvor
c[mg/g]	5,261 ± 0,006	7,070 ± 0,016	24,076 ± 0,008	16,756 ± 0,005	16,143 ± 0,006



Obrázek 30: Antioxidační aktivity

Z grafu (Obrázek 30) je viditelná nejvyšší antioxidační aktivity ve vodném extraktu u hřebíčku - 55,7 mg/g a mateřídoušky - 40,9 mg/g. Minimální antioxidační aktivity byla naměřena u skořice - 5,3 mg/g.

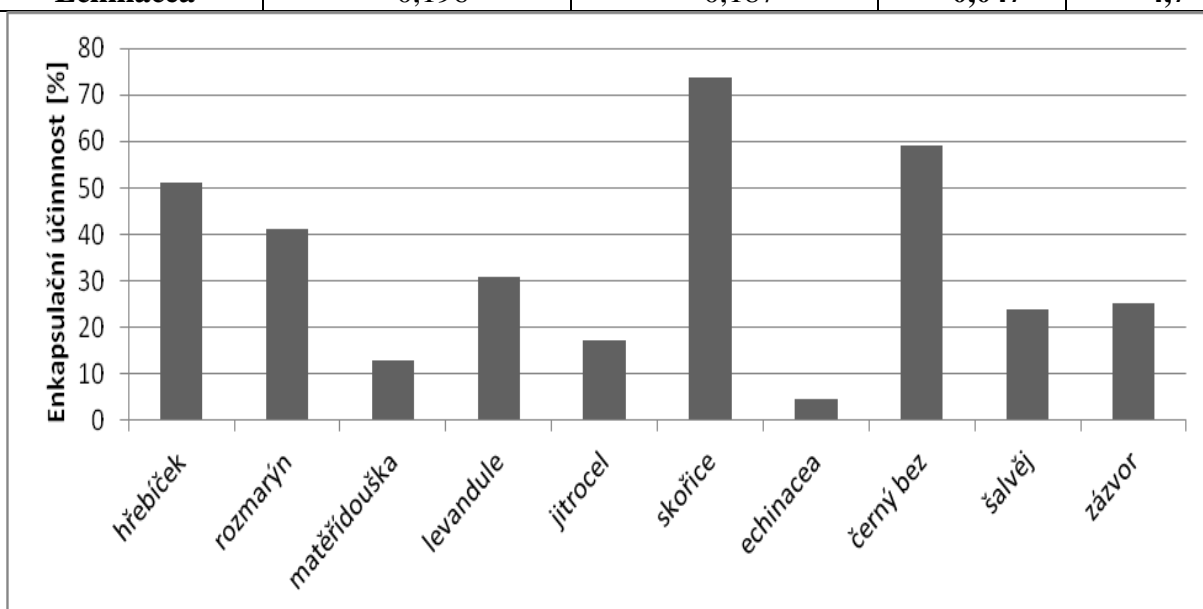
5.2 Charakterizace připravených částic

5.2.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Bylinné extrakty byly enkapsulovány do liposomů (viz postup v kapitole 4.3.2). V těchto enkapsulovaných extraktech byla stanovena spektrofotometricky koncentrace zbylých volných polyfenolů, stejně jako byla stanovena koncentrace polyfenolů ve vzorcích před enkapsulací. Z těchto dvou hodnot byla vypočtena koncentrace enkapsulované složky v liposomech. Všechna měření byla měřena třikrát a z naměřených hodnot vypočítaný průměr.

Tabulka 6: Enkapsulované množství polyfenolů v přírodních extraktech

	Počáteční koncentrace polyfenolů [mg/ml]	Koncentrace polyfenolů po enkapsulaci [mg/ml]	Enkapsulované množství	
			[mg/ml]	[%]
Skořice	0,078	0,020	0,739	73,9
Černý bez	0,715	0,292	0,591	59,1
Hřebíček	1,551	0,757	0,512	51,2
Rozmarýn	0,287	0,169	0,412	41,2
Levandule	0,307	0,212	0,307	30,7
Zázvor	0,148	0,111	0,252	25,2
Šalvěj	0,185	0,140	0,240	24,0
Jitrocel	0,253	0,209	0,174	17,4
Mateřídouška	0,288	0,251	0,129	12,9
Echinacea	0,196	0,187	0,047	4,7



Obrázek 31: Enkapsulační účinnost vyjádřená v procentech

Dle grafu (Obrázek 31) i tabulky (Tabulka 6) můžeme vidět, že nejvíce aktivní látky (polyfenolů) se enkapsulovalo do částic se skořicí 73,9 %, dále s černým bezem 59,1 % a hřebíčkem 51,2 %. Tyto částice také budeme dále podrobovat cytotoxickému testu.

5.2.2 Stanovení dlouhodobé stability částic

Dlouhodobá stabilita byla sledována jednak ve vodném prostředí a také v prostředí viskóznějšího prostředí carbomeru. Byla hodnocena jako množství aktivní látky uvolněné z částic v průběhu dlouhodobého uchovávání. Přírůstek koncentrace v roztoku předpokládá rozpad částice a uvolnění obsahu. Všechny výsledky viz Tabulka 7 a Tabulka 8.

Tabulka 7: Dlouhodobá stabilita částic ve vodném prostředí

	Týdenní stabilita [%]	2 - týdenní stabilita [%]	2 - měsíční stabilita [%]
Hřebíček	8,34	10,78	1,93
Rozmarýn	8,87	20,01	-10,78
Mateřídouška	36,18	36,18	-33,70
Levandule	37,34	53,12	16,70
Jitrocel	8,03	37,24	10,39
Skořice	49,00	4,42	-10,64
Echinacea	-101,88	44,38	-108,13
Černý bez	-0,59	2,12	-9,11
Šalvěj	26,30	27,86	-9,64
Zázvor	15,02	25,23	-37,00

Po týdně vykazovalo nejmenší uvolnění polyfenolů z částic extrakty jitrocele, hřebíčku a rozmarýnu. U zázvoru, mateřídoušky, levandule, šalvěje a skořice došlo k výraznějšímu uvolnění polyfenolů z částic, to znamená, že tyto částice nejsou tak stabilní. U černého bezu a echinacea došlo naopak k poklesu koncentrace uvolněných polyfenolů, což může být způsobeno jejich degradací ve vodném roztoku.

Po dvou týdnech vykazovalo nejmenší uvolnění koncentrace polyfenolů z částic u hřebíčku. U rozmarýnu, zázvoru, šalvěje došlo k výraznějšímu nárůstu koncentrace polyfenolů než před týdnem. U mateřídoušky nebyl žádný rozdíl v nárůstu koncentrace po týdně. Nejvyšší uvolnění polyfenolů vykazovala levandule. U skořice došlo naopak ke snížení koncentrace, to znamená, že degradace převahovala nad jejím uvolňováním.

Po měsíci u všech bylinných extraktů došlo k výraznému poklesu koncentrace uvolněných polyfenolů, což znamená, že opět degradace převahovala nad jejich uvolňováním.

Ve vodném prostředí byla tedy nejstabilnější částicí, částice s hřebíčkem, kdy se po dvou týdnech uvolnilo necelých 11%.

Tabulka 8: Dlouhodobá stabilita částic v prostředí carbomeru

	Týdenní stabilita [%]	2 - týdenní stabilita [%]	2 - měsíční stabilita [%]
Hřebíček	6,75	9,45	-12,48
Rozmarýn	14,30	-7,70	-23,53
Mateřídouška	6,83	-84,47	-86,34

Levandule	18,06	11,38	7,74
Jitrocel	-35,00	-46,05	-83,16
Skořice	-18,17	-14,56	-35,64
Echinacea	-103,75	-101,25	-106,25
Černý bez	3,22	-2,02	-7,43
Šalvěj	60,29	-56,12	-27,99
Zázvor	-19,81	-31,89	-85,76

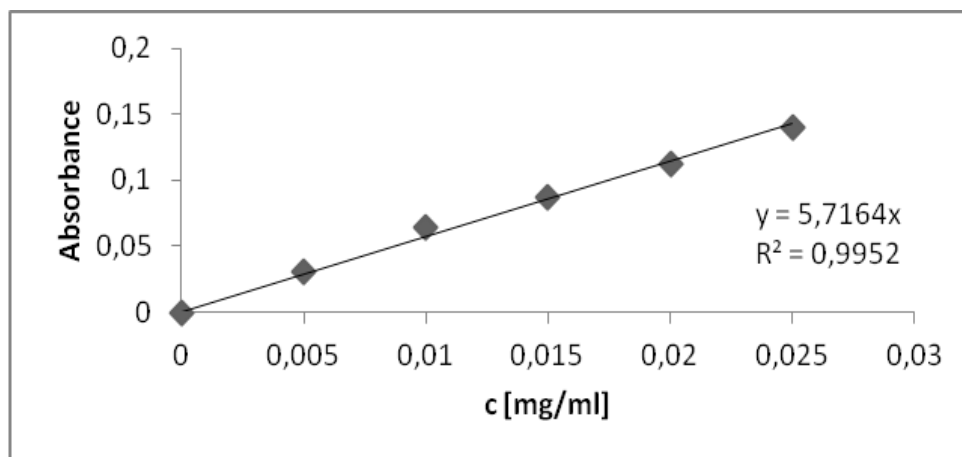
V prostředí carbomeru po týdně vykazovaly nejmenší uvolnění koncentrace polyfenolů částice s černým bezem, hřebíčkem a mateřídouškou. Výraznější nárůst koncentrace byl u rozmarýnu a levandule. U šalvěje došlo k nejvýraznějšímu nárůstu koncentrace o celých 60 %. Záporné hodnoty u ostatních bylinek vykazují to, že obsah jednotlivých látek je menší než hodnota naměřená v čase 0. To mohlo být způsobené degradací polyfenolů ve volném roztoku.

Po týdně došlo pouze u částice s hřebíčkem k uvolnění koncentrace polyfenolů. U zbytku částic došlo k její degradaci. Po dvou měsících už vykazují degradaci všechny částice. V prostředí carbomeru je tedy nejstabilnější částice s hřebíčkem, kdy se po dvou týdnech uvolnilo necelých 10 %.

Při porovnání prostředí vody a carbomeru byly částice stabilnější ve vodném prostředí a nejstabilnější částice byla s hřebíčkem.

5.2.3 Stanovení koncentrace liposomů pomocí Stewartova testu

Byl připraven vzorek prázdných liposomových částic a následně změřena kalibrační řada dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.4. Koncentrace byla vypočtena dle rovnice regrese kalibrační křivky (Obrázek 32). Vzorek liposomových částic byl proměřen třikrát a vypočítán průměr.



Obrázek 32: Kalibrační závislost Stewart testu

Dle kalibrační křivky byla stanovena koncentrace prázdných liposomových částic na $3,630 \pm 0,009$ mg/ml.

5.2.4 Stanovení velikosti a stability částic pomocí DLS a zeta potenciálu

Připravené vzorky byly proměřeny na koloidním analyzátoru Malvern Zetasizer ZS, který dal základní data o částicích jako průměrná velikost částic, distribuce velikosti částic a

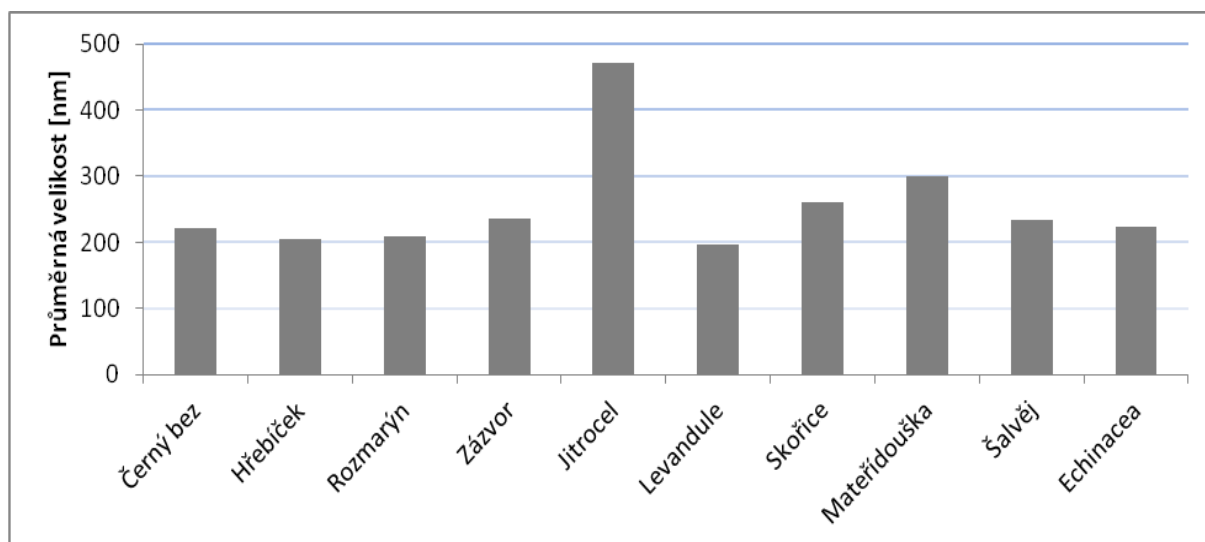
index polydisperzity. Dále také díky elektrodovému nastavení byl proměřen zeta potenciál, díky kterému se dá určit stabilita částic.

5.2.4.1 Průměrná velikost a distribuce částic

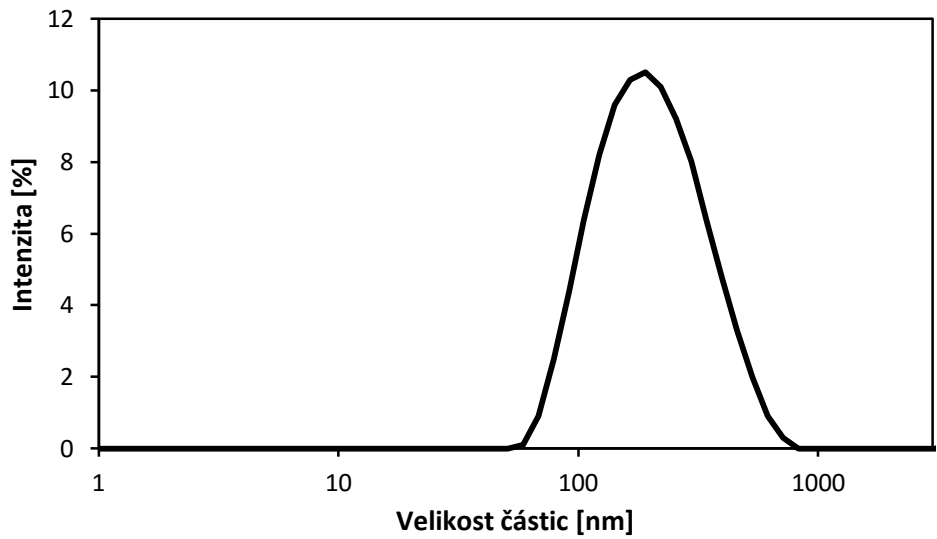
Z výsledků uvedených v následující tabulce (Tabulka 9) je vidět, že největší byly liposomy s enkapsulovaným extraktem z jitrocele jejichž průměrná velikost dosahovala 480 nm, naopak jako nejmenší byly stanoveny liposomové částice s enkapsulovaným extraktem z levandule (196 nm). U částic, které byly filtrovány přes bakteriologický filtr, případně upraveny filtraci pomocí Sephadex LH20 bylo zaznamenáno snížení jejich průměrné velikosti a rovněž snížení indexu polydisperzity.

Tabulka 9: Velikost připravených liposomových částic

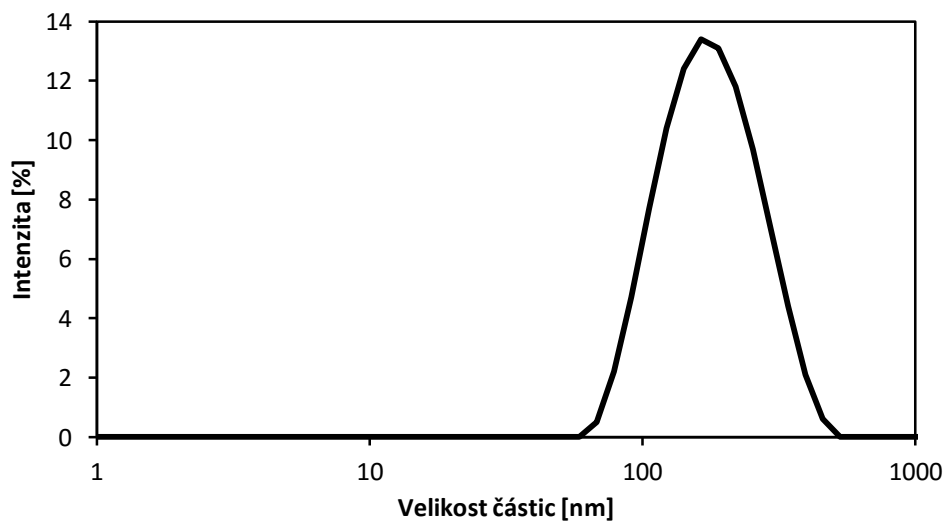
Vzorek	Index polydisperzity	Průměrná velikost částic [nm]
Černý bez	0,251	221,0
Hřebíček	0,229	206,6
Rozmarýn	0,312	208,0
Zázvor	0,366	236,0
Jitrocel	0,251	471,8
Levandule	0,136	196,0
Skořice	0,387	260,0
Mateřídouška	0,272	300,8
Šalvěj	0,310	233,9
Echinacea	0,262	223,5
Prázdné liposomy – sterilní	0,188	144,5
Liposomy se skořicí – sterilní	0,189	168,3
Liposomy s hřebíčkem – sterilní	0,223	184,4
Liposomy s č. bezem – sterilní	0,128	162,9
Prázdné liposomy – Sephadex 600	0,244	177,4
Prázdné liposomy – Sephadex 900	0,233	170,1



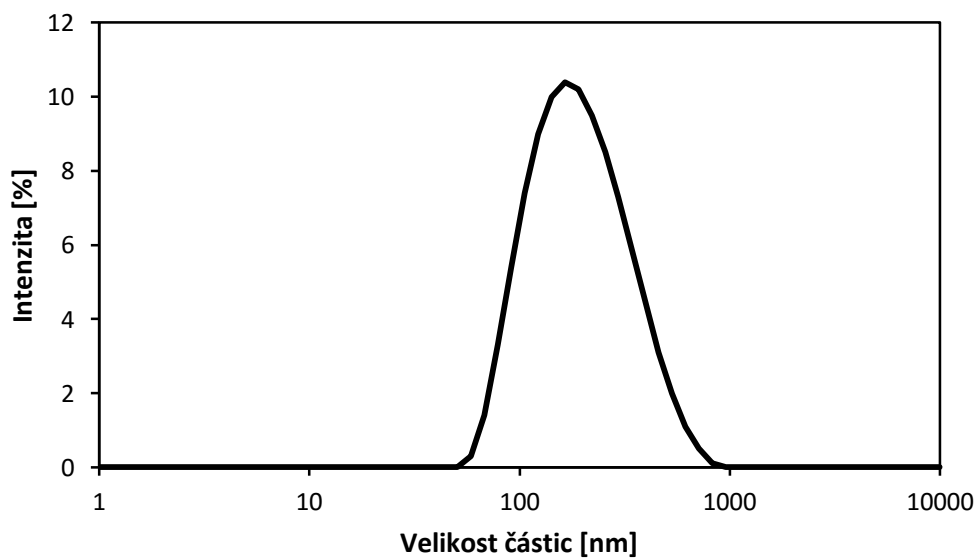
Obrázek 33: Průměr velikosti připravovaných liposomových částic



Obrázek 34: Distribuce liposomových částic s hřebíčkem – sterilní



Obrázek 35: Distribuce liposomových částic s černým bezem – sterilní



Obrázek 36: Distribuce liposomových částic se skořicí – sterilní

5.2.4.2 Zeta potenciál

Z hodnot zeta potenciálů uvedených v následující tabulce (Tabulka 10) lze říci, že všechny liposomy byly stabilní. Za nestabilní se považují částice, u kterých se hodnoty zeta potenciálu pohybují v rozmezí od -30 mV do 30 mV.

Jako nejstabilnější byly vyhodnoceny liposomové šástice s enkapsulovaným extraktem šalvěže, hodnota jejich zeta potenciálu byla -50,6 mV. Nejméně stabilní byly v případě enkapsulace zvolených extraktů liposomy s enkapsulovaným rozmarýnem (-33,6 mV). Celkově byly ale nejméně stabilní liposomy filtrované přes Sephadex při 600 ot./min, tyto částice se s hodnotou -29,2 pohybovaly na hranici stability.

Tabulka 10: Zeta potenciál připravených liposomových částic

Vzorek	ξ – potenciál [mV]	Vzorek	ξ – potenciál [mV]
Černý bez	-42,8	Šalvěj	-50,6
Hřebíček	-43,8	Echinacea	-47,9
Rozmarýn	-33,6	Prázdné liposomy – sterilní	-49,0
Zázvor	-36,4	Liposomy se skořicí – sterilní	-46,3
Jitrocel	-39,8	Liposomy s hřebíčkem – sterilní	-38,7
Levandule	-37,1	Liposomy s č. bezem – sterilní	-41,7
Skořice	-49,6	Prázdné liposomy – Sephadex 600	-29,2
Mateřídouška	-33,9	Prázdné liposomy – Sephadex 900	-34,8

5.3 Kultivace buněk

Buňky byly kultivovány podle postupu v kapitole 4.4. Růst buněk může ovlivnit řada faktorů, jako je počet pasážování, složení media, prostředí. Všechno musí být naprosto sterilní. Před každou výměnou média byly buňky kontrolovány pod mikroskopem, zda rostou správně a zda tvoří vrstvu buněk na dně lahvičky.



Obrázek 37: Keratinocyty



Obrázek 38: Kreatinocyty – mrtvé buňky

Na Obrázek 37 můžeme vidět shluky buněk, které se v lahvičce tvořily. Tyto shluky vedly k odumírání buněk. Důvodem mohla být špatná manipulace s buňkami, výkyvy teplot či už od počátku v zamrazené ampulce. Na Obrázek 38 je vidět výrazné zlepšení v počtu buněk, avšak jejich tvar vykazuje odumírání buněk.

5.4 MTT test

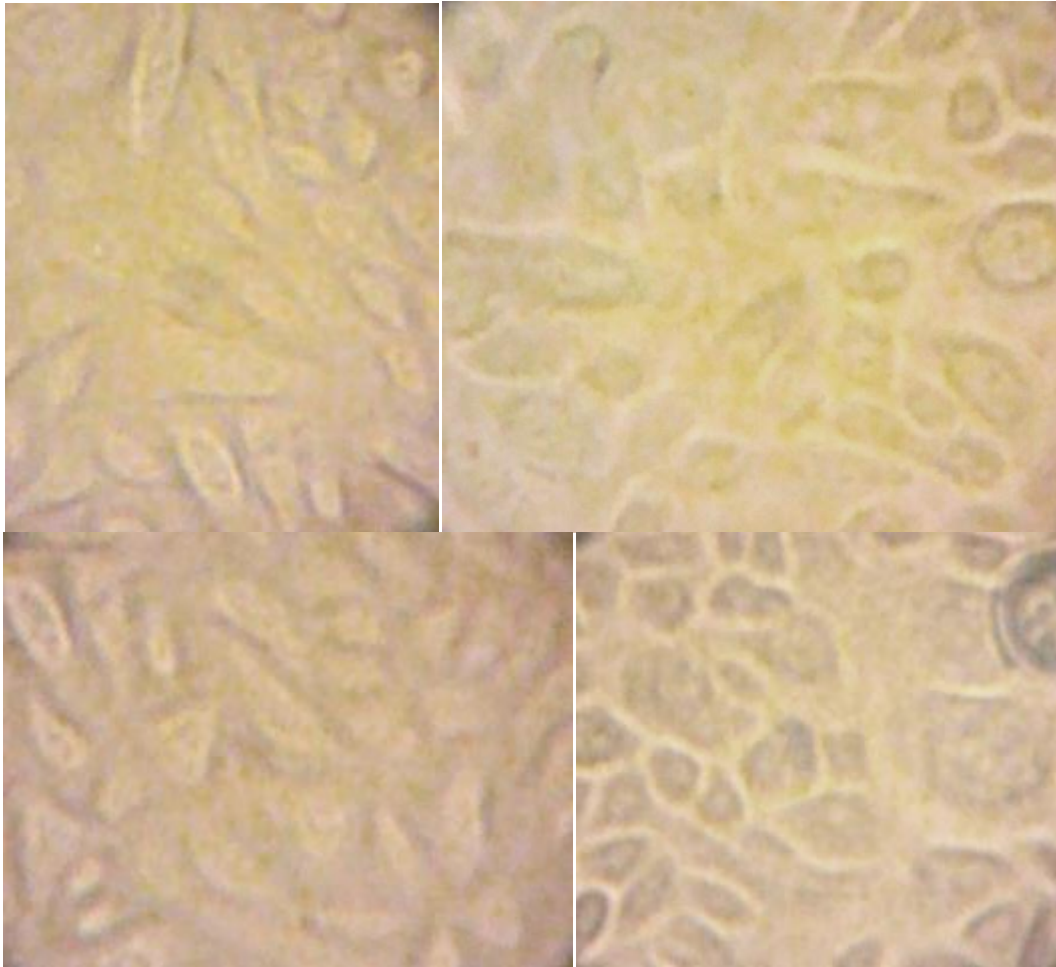
Pro provedení MTT testu bylo zapotřebí nejprve zjistit, zda koncentrace buněk je dostačující. Buňky byly počítány pod mikroskopem (Obrázek 39) v Burkerově komůrce podle postupu v kapitole 4.4.1.1, množství buněk bylo vypočteno na $1,248 \cdot 10^6$ v 6 ml roztoku, což bylo dostačující k provedení testu. Buňky byly také před spočítáním vyfoceny, viz Obrázek 41 a Obrázek 42.



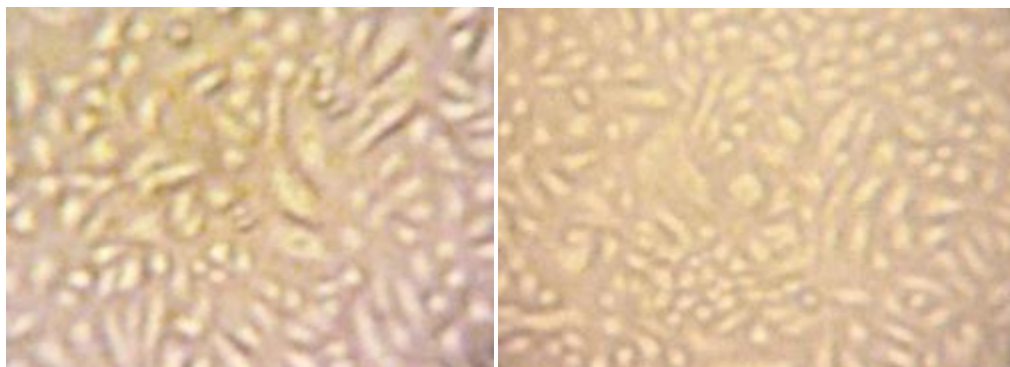
Obrázek 39: Inverzní mikroskop



Obrázek 40: Bürkerova komůrka s buňkami a trypanovou modří



Obrázek 41: Keratinocyty při zvětšení 400x



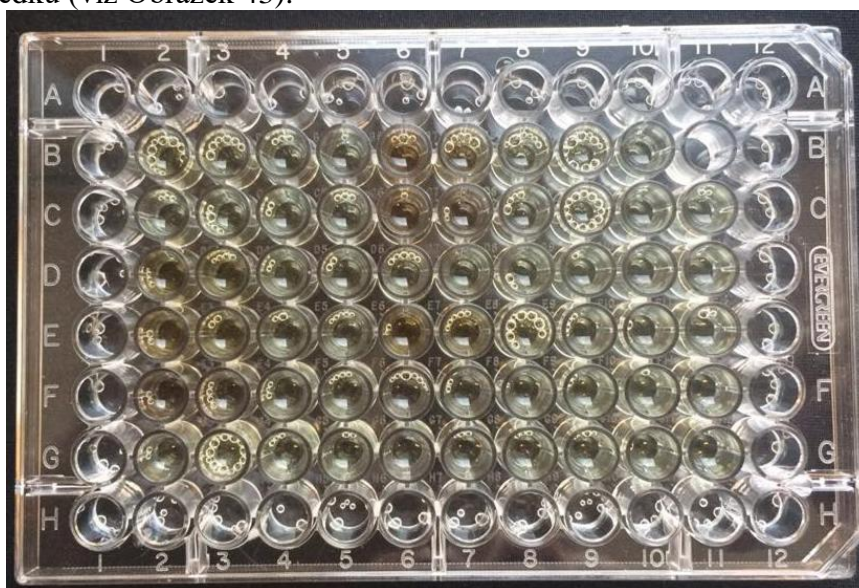
Obrázek 42: Keratinocyty při zvětšení 200x

MTT test byl prováděn na 96 - jamkové destičce podle postupu uvedeného v kapitole 4.4.2. Byly testovány přírodní extrakty hřebíčku, skořice, černého bezu, šalvěže, rozmarýnu, echinacey, mateřídoušky, levandule, zázvoru, jitrocele. Testovány byly liposomy s přírodním extraktem, které měly nejlepší antioxidační účinnost a byly nejvíce stabilní. Byly to liposomy s hřebíčkem, se skořicí, s černým bezem, se šalvějí, s rozmarýnem a echinaceou. Dále pro porovnání byly proměřeny prázdné liposomy a jako blank sloužily buňky bez ovlivnění vzorkem. Rozvržení testu na destičce je znázorněno v následující tabulce (Tabulka 11) (číslo znamená konkrétní ředění).

Tabulka 11: Rozložení testovaných látek na 96-jamkové destičce

PbS	PbS	PbS	PbS	PbS	PbS	PbS	PbS	PbS	PbS	PbS	PbS
PbS	Hřeb.	Hřeb. 2x	Hřeb. 10x	Hřeb. 20x	Mat.	Mat. 2x	Mat. 10x	Mat. 20x	Pr. lip	-	PbS
PbS	Skoř.	Skoř. 2x	Skoř. 10x	Skoř. 20x	Lev.	Lev. 2x	Lev. 10x	Lev. 20x	Pr. Lip 2x	blank	PbS
PbS	Č. Bez	Č. Bez 2x	Č. Bez 10x	Č. Bez 20x	Záz.	Záz. 2x	Záz. 10x	Záz. 20x	Pr. Lip 10x	blank	PbS
PbS	Šal.	Šal. 2x	Šal. 10x	Šal. 20x	Jit.	Jit. 2x	Jit. 10x	Jit. 20x	Pr. lip	blank	PbS
PbS	Rozm.	Rozm. 2x	Rozm. 10x	Rozm. 20x	Lip. hřeb	Lip. Hřeb 2x	Lip. Hřeb 10x	Lip. Hřeb 20x	Lip. Č. bez 10x	Lip. Šal. 10x	PbS
PbS	Ech.	Ech. 2x	Ech. 10x	Ech. 20x	Lip. skoř	Lip. Skoř 2x	Lip. Skoř 10x	Lip. Skoř 20x	Lip. Roz. 10x	Lip. Ech. 10x	PbS
PbS	PbS	PbS	PbS	PbS	PbS	PbS	PbS	PbS	PbS	PbS	PbS

Po nanesení roztoků MTT a SDS, byla stanovena na ELISA readeru absorbance při vlnové délce 595 nm jako počáteční hodnota, z důvodu zabarvení přírodních extraktů a možného ovlivnění výsledků (viz Obrázek 43).

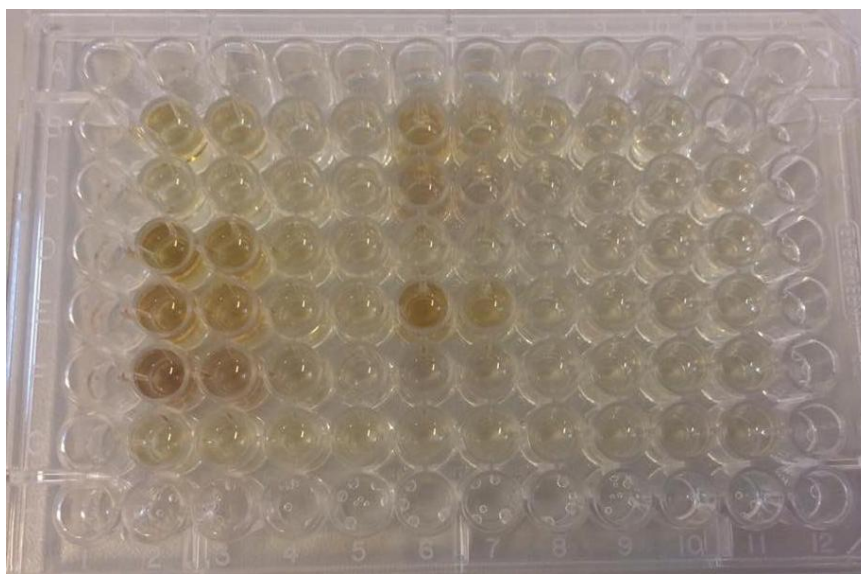


Obrázek 43: Destička s nanesenými vzorky

5.4.1 Vyhodnocení testu

Výsledkem testu je absorbance, která je přímo úměrná životaschopnosti buněk. Čím více je v jamce přeživších buněk, tím tmavší barva a vyšší koncentrace. Živé buňky totiž dokáží přeměnit MTT na fialový formazan. Naměřené hodnoty absorbancí by byly pak přepočítány na procentuální množství, které udává viabilitu buněk. Získané hodnoty se pak vynesou do grafů a proloží se sigmoideální „dose-response“ křivkou, ze které se vypočítá inhibiční koncentrace daných přírodních látek. Tato hodnota udává, při které koncentraci dojde k 50 % usmrcení buněk. Čím nižší hodnota, tím toxičtější látka to je.

Po dvoudenní inkubaci nebyla žádná známka fialového zbarvení ani u blanku (viz Obrázek 44), to znamená, že buňky musely být mrtvé ještě před začátkem aplikace testovaných látek. To znamená, že mohly být buňky narušeny například při centrifugaci.



Obrázek 44: 96-jamková destička - Vyhodnocení testu MTT

Z přehledu dosažených výsledků i z výsledků MTT testu je patrné, že v průběhu práce byly poprvé zavedeny v laboratořích FCH VUT v Brně postupy a testy využívající buněčné kultury. Za tímto účelem byly zavedeny nové postupy kultivace a pasážování lidských keratinocytů a postupy používané při MTT testu. Negativní výsledek může být způsoben nedostatečnou optimalizací podmínek kultivace, s větší pravděpodobností však došlo ke kontaminaci buněk mykoplazmaty, případně nějakými dosud neznámými toxickými vlivy. Testy cytotoxicity budou nadále optimalizovány v navazujících pracích.

6 ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na využití buněčných kultur k testování cytotoxicity přírodních extraktů levandule, černého bezu, jitrocele, skořice, šalvěže, zázvoru, mateřídoušky, echinacey, hřebíčku, rozmarýnu a připravených liposomů s jejich obsahem.

V teoretické části jsou popsány buněčné kultury a jejich kultivace *in vitro*. Podrobněji je tato část zaměřena na kultivační podmínky a možnosti využití buněk k testování cytotoxicity. Dále jsou v teoretické části charakterizovány vybrané přírodní látky a jsou uvedeny možnosti jejich enkapsulace do liposomů k následnému využití v kosmetických přípravcích.

V experimentální části byly připraveny extrakty z vybraných bylin a charakterizovány. Při charakterizaci bylo určeno celkové množství polyfenolů, flavonoidů a jejich antioxidační účinek. Největší množství polyfenolů obsahoval extrakt z černého bezu, největší množství flavonoidů obsahoval extrakt z jitrocele a nejvyšší antioxidační účinek měl extrakt z hřebíčku.

Po charakterizaci byly všechny bylinné extrakty enkapsulovány do liposomových částic. Největší enkapsulační účinnost byla stanovena u skořice, která dosáhla účinnosti 73,9 %, naopak nejmenší enkapsulační účinnost měla echinacea s 4,7 %. Dále prostřednictvím stanovení celkových polyfenolů byla stanovena i dlouhodobá stabilita připravených částic v prostředí vody i carbomeru, kdy bylo spektrofotometricky sledováno uvolňované množství po dobu až dvou měsíců. Částice byly stabilnější ve vodném prostředí, které má méně viskózní charakter. V obou testovaných prostředích byly nejvíce stabilní částice s hřebíčkem.

Stanovení stability připravených částic bylo také provedeno měřením pomocí zeta potenciálu. Všechny částice byly stabilní. Nejstabilnější částicí byla částice s obsahem šalvěže (-50,6 mV). Metodou dynamického rozptylu světla byla následně proměřena i velikost připravených liposomů. Rozmezí velikosti částic se pohybovala od 196 nm do 480 nm, kdy největší částicí byla jitrocelová.

Praktická část byla také zaměřena na práci s lidskými kožními buňkami – keratinocyty, které byly vybrány pro následné provedení cytotoxického testu. Práce s buňkami spočívala v jejím rozpipetování do kultivačních nádob, výměně média, či následnému pasážování. Veškerá práce probíhala za sterilních podmínek ve sterilním boxu. Dále byly buňky podrobeny testu viability s trypanovou modří a počítány na Bürkerově komůrce. Po dosažení dostatečného množství buněk ($1,248 \cdot 10^6$ v 6 ml) byly bylinné extrakty i s připravenými částicemi podrobeny ve čtyřech různých koncentracích cytotoxickému testu MTT. Test je založen na schopnosti živých buněk redukovat MTT na fialovomodrou sraženinu formazanu. Test byl proveden dvakrát, avšak nebyly získány uspokojivé výsledky. Buňky byly ještě před započítáním testu zřejmě poškozeny, případně kontaminovány mykoplazmaty, a proto se fialové zbarvení neobjevilo ani u blanku. Souběžně tyto bylinky byly v jiné bakalářské práci podrobeny testu genotoxicity a v tomto případě nevykazovaly negativní účinky. Proto je předpokládán negativní výsledek i u testů cytotoxicity. Ověřením této teorie a možnostmi využití bylinných extraktů v kosmetice se bude dále zabývat navazující diplomová práce.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] *ScienceCell Research Laboratories* [online]. CA, 2016 [cit. 2016-01-23].
- [2] Základy toxikologie: Prof. RNDr. Jirí Patočka, DrSc. *Toxikology.cz* [online]. České Budějovice: Zdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita, 2005 [cit. 2016-02-24]. Dostupné z: <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=print&sid=10>
- [3] Buněčné a tkáňové kultury. *Biologie a genetika pro bakaláře* [online]. 2014 [cit. 2015-08-02]. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/opvk2014/>
- [4] VEJRAŽKA, Martin, 2008. Buněčné kultury. Molekulární medicína a biotechnologie: soubor přednášek. 1. vyd. Praha: Galén pro 1. LF UK v Praze, s. 81-100. ISBN 978- 807262-535-2.
- [5] *Thermo Fisher Scientific Inc.* [online]. USA [cit. 2016-03-10]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>
- [6] RYAN, John A. *Introduction to animal cell culture.* [online]. In: . USA: Corning Incorporated, 2008 [cit. 2015-11-20]. Dostupné z: http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/img/20297/intro_animal_cell_culture.pdf
- [7] *ScienceCell Research Laboratories* [online]. CA, 2016 [cit. 2016-01-23]
- [8] *RIKEN BioResource Center* [online]. [cit. 2016-01-23]. Dostupné z: <http://ja.brc.riken.jp/>
- [9] WHITEHEAD, R. H. a P. S. ROBINSON. Establishment of conditionally immortalized epithelial cell lines from the intestinal tissue of adult normal and transgenic mice. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology.* 2009, **296**(3), G455-G460. DOI: 10.1152/ajpgi.90381.2008. ISSN 0193-1857. Dostupné také z: <http://ajpgi.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpgi.90381.2008>
- [10] Buněčné a tkáňové kultury. *Biologie a genetika pro bakaláře* [online]. 2014 [cit. 2015-08-02]. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/opvk2014/>
- [11] *Thermo Fisher Scientific Inc.* [online]. USA [cit. 2016-03-10]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>
- [12] GREPLOVÁ, Marta. Buněčné kultury a produkce rekombinantních proteinů. In: *Univerzita Palackého v Olomouci* [online]. Olomouc: Centre of the Region Haná [cit. 2016-01-24]. Dostupné z: <http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BAM/old/03.%20Bunecne%20kultury.pdf>
- [13] PALSSON, Bernhard. a Sangeeta BHATIA. *Tissue engineering.* Upper Saddle River, N.J.: Pearson Prentice Hall, c2004. ISBN 01-304-1696-7.
- [14] *Caisson Laboratories* [online]. US, 2014 [cit. 2016-01-24]. Dostupné z: <http://www.caissonlabs.com/>
- [15] Kultivační podmínky. *Biologie v kostce* [online]. [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: <http://biologie-v-kostce.blogspot.cz/2011/05/243-kultivacni-podminky.html>

- [16] MARTIN Y., VERMETTE P.; Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances; *Biomaterials*; 26(35):7481-7503, 2005
- [17] ČINÁTL, Jaroslav a Miloš NOVÁK. *Tkáňové a buněčné kultury: příprava a pěstování*. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1968.
- [18] UNCHERN, Surachai. *Basic techniques in animal cell culture*. Bangkok, Thailand, 1999.
- [19] CELIS, J. E. *Cell biology: a laboratory handbook*. DOI: 978-012-1647-308.
- [20] BEHL, Berthold, Magarethe KLOS, Michael SERR, Ulrich EBERT, Bodo JANSON, Karla DRESCHER, Gerhard GROSS a Hans SCHOEMAKER. An ELISA-based method for the quantification of incorporated BrdU as a measure of cell proliferation in vivo. *Journal of Neuroscience Methods*. 2006, **158**(1), 37-49. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2006.05.011. ISSN 01650270. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027006002391>
- [21] What is flow cytometry? *News-medical.net* [online]. 2014 [cit. 2016-01-02]. Dostupné z: <http://www.news-medical.net/health/What-is-Flow-Cytometry.aspx>
- [22] VUT BRNO. *Praktikum z mikrobiologie: Přímé stanovení počtu buněk MO počítáním pod mikroskopem, Vitální barvení*. 2008.
- [23] MIRET, S. Comparison of In Vitro Assays of Cellular Toxicity in the Human Hepatic Cell Line HepG2. *Journal of Biomolecular Screening*. 2005, vol. 11, issue 2, s. 184-193.
- [24] WIKIMEDIA FOUNDATION, Inc. *Wikipedia, the free encyclopedia* [online]. 2001 [cit. 2016-01-03]. Dostupné z: http://commons.wikimedia.org/wiki/Main_Page
- [25] MAHTO, S. K., CHANDRA P. a RHEE S. W. In vitro Models, Endpoints and Assessment Methods for the Measurement of Cytotoxicity. *Toxicology and environmental health sciences*. 2010, vol. 2, issue 2, s. 87-93.
- [26] *Svět encyklopedické znalosti* [online]. 2016 [cit. 2016-03-24]. Dostupné z: <http://cs.swewe.org/>
- [27] CIAPETTI, G., E. CENNI, L. PRATELLI, A. PIZZOFRERATO, Bodo JANSON, Karla DRESCHER, Gerhard GROSS a Hans SCHOEMAKER. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials*. 1993, **14**(5), 359-364. DOI: 10.1016/0142-9612(93)90055-7. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0142961293900557>
- [28] AULA, Sangeetha, Samyuktha LAKKIREDDY, Kaiser JAMIL, Atya KAPLEY, A. V. N. SWAMY, Harivardhan Reddy LAKKIREDDY, Gerhard GROSS a Hans SCHOEMAKER. Biophysical, biopharmaceutical and toxicological significance of biomedical nanoparticles. *Biomaterials*. 1993, **14**(5), 359-364. DOI: 10.1039/C5RA05889A. ISBN 10.1039/C5RA05889A. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA05889A>
- [29] BEHL, Berthold, Magarethe KLOS, Michael SERR, Ulrich EBERT, Bodo JANSON, Karla DRESCHER, Gerhard GROSS a Hans SCHOEMAKER. An ELISA-based method for the quantification of incorporated BrdU as a measure of cell proliferation in vivo. *Journal of Neuroscience Methods*. 2006, **158**(1), 37-49. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2006.05.011. ISSN 01650270. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027006002391>

- [30] *Neurogenesis* [online]. WordPress, 2016 [cit. 2016-01-24]. Dostupné z: <http://sites.lafayette.edu/neur401-sp10/>
- [31] *Herbář Wendys* [online]. [cit. 2016-01-02]. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/>
- [32] *Atlas rostlin* [online]. 2010 [cit. 2016-01-02]. Dostupné z: <http://bylinky.atlasrostlin.cz/>
- [33] STAŇKOVÁ-KRÖHNOVÁ, Magdaléna. *Bylinky pro děti a maminky: praktické použití léčivých rostlin pro rodiny s dětmi od jara do zimy*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009, 263 s. ISBN 978-80-247-2312-9.
- [34] *Nazeleno.cz* [online]. 2011 [cit. 2016-01-03]. Dostupné z: <http://www.nazeleno.cz/zazvor-vselek-ktery-muze-i-skodit.aspx>
- [35] *Drpopov.cz* [online]. 2011 [cit. 2016-01-03]. Dostupné z: <http://www.drpopov.cz/hrebickovec-vonny.html>
- [36] ALLEMANN, Bogdan a Baumann L. Antioxidants used in skin care formulations. *Skin Therapy Lett.* 2008, **13**(7), 5-9.
- [37] PANDEY KB, RIZVI SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009;2(5):270-278.
- [38] KUMAR S, PANDEY AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. 2013;2013:162750. doi:10.1155/2013/162750.
- [39] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* [online]. 2011, č. 1, s. 1806-1815 [cit. 2015-12-20]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X11002665>
- [40] CASANOVA, Francisca a Lúcia SANTOS. Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application – a review. *Journal of Microencapsulation*. 2015, **33**(1), 1-17. DOI: 10.3109/02652048.2015.1115900. ISSN 0265-2048. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/02652048.2015.1115900>
- [41] Ultrasonic liposome preparation. *Heilscher - Ultrasound Technology* [online]. 2016 [cit. 2016-01-08]. Dostupné z: <http://www.hielscher.com/ultrasonic-liposome-preparation.htm>
- [42] IMMORDINO ML., DOSIO F., CATTEL L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine*. 2006;1(3):297-315.

8 SEZNAM ZKRATEK

- ECACC - European Collection of Cell Cultures (Evropská organizace poskytující buněčné kultury)
- ATCC - American Tissue and Cultures Collection (Americká organizace skladující tkáně a buněčné kultury)
- LC₅₀ – střední letální dávka 50
- IC₅₀ – střední inhibiční koncentrace
- DMSO – Dimethylsulfoxid
- DNA – Deoxyribonukleová kyselina
- MTT - 3-[4, 5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid
- brdU - bromdeoxyuridin (5-brom-2-deoxyuridin)
- ABTS - 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina
- SDS - Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecylsírán sodný)
- DLS - Dynamic Light Scattering (Dynamický rozptyl světla)