



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

IZOLACE A CHARAKTERIZACE PŘÍRODNÍCH ANTIMYKOTICKÝCH LÁTEK A MOŽNOSTI JEJICH APLIKACE

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF NATURAL ANTIMYCOTICS AND THEIR POTENTIAL APPLICATIONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Eva Dvořáková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1380/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Eva Dvořáková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Izolace a charakterizace přírodních antimykotických látek a možnosti jejich aplikace

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Příprava a charakterizace vybraných rostlinných extraktů
- 2) Stanovení antimykotické aktivity připravených extraktů ve volné i enkapsulované formě a srovnání jejich účinku s antimykotickým léčivem
- 3) Návrh a testování antimykotického přípravku s obsahem přírodní antimykotické složky

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Eva Dvořáková
student(ka)

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Předložená bakalářská práce byla zaměřena na přípravu a charakterizaci produktů s obsahem přírodních antimykotických složek. V teoretické části byla shrnuta aktuální problematika zvýšeného výskytu mykóz a kvasinkovitých onemocnění v souvislosti s rozšířením problému snížené imunity. Dále zde byl popsán problém syntetických léčiv a antimykotik ve srovnání s alternativy přírodního původu. V experimentální části práce pak byly připraveny a charakterizovány vybrané extrakty (vodné, ethanolové a lipidické), které byly následně enkapsulovány do liposomů. Sledován byl obsah polyfenolů, flavonoidů i celková antioxidační aktivita extraktů. U liposomů byla změřena enkapsulační účinnost, velikost, stabilita i dlouhodobá stabilita.

Dále byla v práci sledována antimykotická aktivita jednotlivých extraktů i liposomů vůči kvasince *Candida glabrata*. Pro srovnání byla otestována také antimykotická aktivita komerčního léčiva klotrimazolu. Z připravených extraktů vykazovaly nejvyšší antimykotický účinek lipidické extrakty, proto byly právě tyto extrakty použity k přípravě antimykotických gelů a čípků. Přesněji byly použity lipidické extrakty z lichořeřišnice, skořice, zázvoru a liposomy s jejich obsahem. U těchto přípravků byla taktéž otestována a potvrzena jejich antimykotická aktivita. Na závěr bylo testem cytotoxicity na linii lidských buněk HaCaT prokázáno, že jsou použité extrakty a liposomové částice bezpečné a připravené produkty by tedy mohly do budoucna sloužit jako alternativa synteticky připravených antimykotik.

Klíčová slova:

antimykotika, liposomy, antioxidanty, přírodní léčiva, extrakty, mykózy

Abstract

This bachelor thesis was focused on preparation and characterization of products containing natural antimycotic ingredients. The theoretical part summarizes the current issue of increased presence of mycoses and yeast diseases in connection with the extension of the problem of reduced immunity. Furthermore, the problem of synthetic drugs and antimycotics compared to alternatives of natural origin was described. In the experimental part, selected extracts (aqueous, ethanolic and lipidic) were prepared, characterized and subsequently encapsulated into liposomes. The content of polyphenols, flavonoids and the total antioxidant activity of extracts was measured. In liposomes, the encapsulation efficiency, size, stability and long-term stability were measured.

In addition, the antimycotic activity of individual extracts and liposomes against *Candida glabrata* was studied. For comparison, the antifungal activity of the commercial drug clotrimazole was also tested. Lipidic extracts showed highest antimycotic activity from all of the prepared extracts, which is why these extracts were used to prepare antifungal gels and suppositories. More specifically, lipidic extracts of nasturcium, cinnamon, ginger and liposomes containing them were used. Their antimycotic activity was also tested and confirmed for these preparations. Finally, the cytotoxicity test on the HaCaT human cell line showed that used extracts and liposome particles are safe and that the prepared products could thus serve as an alternative to synthetically prepared antimycotics in the future.

Keywords:

antimycotics, liposomes, antioxidants, natural drugs, extracts, mycoses

DVOŘÁKOVÁ, Eva. *Izolace a charakterizace přírodních antimykotických látek a možnosti jejich aplikace*. Brno, 2019. 60 s. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petra Matoušková, PhD,

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny 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 pouze se souhlasem vedoucího práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Petře Matouškové, PhD. za její obětavost, ochotu, poskytnuté rady a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Ing. Renatě Pavelkové a Ing. Natálii Burešové za dohled, rady i ochotu. V neposlední řadě patří poděkování mému příteli za trpělivost a rodině za podporu a umožnění studia.

Obsah

1	Úvod	10
2	Teoretická část	11
2.1	Mykózy	11
2.1.1	Mykózy způsobené kvasinkovými mikroorganismy.....	11
2.1.2	Mykózy způsobené vláknitými houbami	11
2.1.3	Nejčastěji vyskytující se mykózy	12
2.2	Antimykotika	14
2.2.1	Historie antimykotik.....	14
2.2.2	Polyenová antimykotika	14
2.2.3	Azolová antimykotika	15
2.2.4	Allylaminy.....	16
2.2.5	Ciklopirox.....	16
2.3	Přírodní látky s potenciálním antimykotickým účinkem	17
2.3.1	Zázvor lékařský (<i>Zingiber officinale</i>)	17
2.3.2	Česnek kuchyňský(<i>Allium sativum</i>)	17
2.3.3	Skořicovník pravý (<i>Cinnamomum verum</i>)	17
2.3.4	Lichořeřišnice větší (<i>Tropaeolum majus</i>)	18
2.3.5	Hřebíčkovce kořený (<i>Syzygium aromaticum</i>)	18
2.3.6	Kurkumin	19
2.4	Přírodní versus syntetická antimykotika	19
2.5	Enkapsulace do liposomů.....	20
2.5.1	Výhody aplikace liposomů.....	21
3	Cíl práce.....	22
4	Praktická část.....	23
4.1	Mikroorganismy použité při testování antimykotické aktivity	23

4.2	Použité chemikálie	23
4.3	Použité přístroje a pomůcky	24
4.4	Použitá koření, bylinky a látky pro extrakty	24
4.5	Příprava extraktů	25
4.5.1	Příprava vodných extraktů	25
4.5.2	Příprava ethanolových extraktů.....	25
4.5.3	Příprava lipidických extraktů pomocí přístroje SOXTHERM.....	25
4.6	Charakterizace extraktů.....	26
4.6.1	Stanovení celkových polyfenolů spektrofotometricky.....	26
4.6.2	Stanovení celkových flavonoidů spektrofotometricky.....	26
4.6.3	Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS.....	26
4.7	Příprava liposomů	27
4.7.1	Příprava liposomů z vodných extraktů.....	27
4.7.2	Příprava liposomů z ethanolových extraktů	27
4.7.3	Příprava liposomů z lipidických extraktů pomocí rozpouštění v chloroformu 27	
4.7.4	Příprava liposomů z lipidických extraktů pomocí rozpouštění v hexanu .	28
4.7.5	Příprava liposomů z čistého kurkuminu.....	28
4.7.6	Příprava liposomů s klotrimazolem.....	28
4.8	Charakterizace liposomů.....	28
4.8.1	Stanovení enkapsulační účinnosti	29
4.8.2	Stanovení antioxidačního účinku liposomů	29
4.8.3	Stanovení velikosti liposomů pomocí DLS.....	29
4.8.4	Stanovení stability liposomů pomocí měření Zeta potenciálu	29
4.8.5	Stanovení dlouhodobé stability liposomů	29
4.9	Příprava gelu a jeho optimalizace	30

4.9.1	Příprava gelu č.1 s liposomy zázvoru, skořice a lichořeřišnice	30
4.9.2	Příprava gelu č.2 s liposomy zázvoru a lichořeřišnice	31
4.9.3	Příprava hmoty pro výrobu vaginálních čípků lipidickými extrakty	32
4.9.4	Testování antioxidační aktivity gelu a čípků.....	32
4.10	Testování antimykotické aktivity	33
4.10.1	Příprava tekutého média a kultivace kvasinky <i>C. glabrata</i>	33
4.10.2	Antimykotický test – diluční metoda	33
4.11	Kultivace humánních kožních buněk	33
4.12	Testování cytotoxicity liposomů pomocí MTT testu	34
5	Výsledky a diskuze.....	35
5.1	Obsah polyfenolů v jednotlivých extraktech	35
5.2	Obsah flavonoidů v jednotlivých extraktech	36
5.3	Antioxidační aktivita jednotlivých extraktů.....	38
5.4	Enkapsulační účinnost.....	39
5.5	Antioxidační účinek a dlouhodobá stabilita liposomů	40
5.6	Měření velikosti liposomů	43
5.7	Měření stability a dlouhodobé stability pomocí měření Zeta potenciálu.....	45
5.8	Testování antimykotického účinku	47
5.8.1	Testování antimykotické aktivity extraktů.....	47
5.8.2	Testování antimykotického účinku liposomů	48
5.8.3	Antimykotický účinek prázdných liposomů a liposomů s klotrimazolem	50
5.8.4	Antimykotický účinek léčiva Klotrimazol	50
5.8.5	Antimykotický účinek kombinace liposomů s komerčním léčivem a přírodním lipidickým extraktem.....	50
5.8.6	Antimykotický účinek kombinací liposomů s lipidickými extrakty	51
5.9	Konečné testování připravených gelů a čípků	51

5.10 MTT test cytotoxicity.....	53
6 Závěr.....	54
7 Zdroje	56
8 Seznam použitých zkratek	60

1 Úvod

Problém snížené imunity organismu trápí stále větší množství osob. Setkáváme se s problémem, kdy lékaři předepisují pacientům nadměrné množství léčiv, mnohdy i velmi unáhleně a lidské tělo nestihne samo začít bojovat proti infekci. Stále častěji se setkáváme s případy, kdy přijde člověk s kašlem do ordinace a odchází s širokospektrálními antibiotiky, a to je v dnešní době jedna z hlavních příčin oslabené imunity. Navíc bakterie, kvasinky i jiné patogenní mikroorganismy tak získávají rezistenci vůči rutinně podávaným lékům a našim cílem musí být vývoj stále nových léčivých přípravků. Další kapitolou jsou lidé s vážnými chorobami jako je rakovina či například HIV, kdy člověk pod vlivem chemoterapeutik a dalších organismus zatěžujících léčeb trpí oslabenou imunitou. Právě rezistenci mikroorganismů se týká téma mé bakalářské práce, a to především problému mykóz. Některá dříve používaná antimykotika se prokázala být nevhodnými, ať už s ohledem na jejich cytotoxicitu nebo tím, že přestávají účinkovat a patogenní mikroorganismy se vůči nim staly rezistentními.

Přesněji je cílem této práce představit a ověřit možnosti přírodní léčby mykóz antifungálními látkami v podobě extraktů z rostlin, které již po staletí používali naši předkové k léčbě a jsou příznivější na chod organismu než synteticky vyprodukovaná léčiva. Dalším cílem je vybrat nejvhodnější druh extraktů s nejvyšším antimykotickým účinkem, nejnižší cytotoxicitou a připravit produkt, s pomocí enkapsulace těchto extraktů do liposomových částic, který by byl vhodný k pozdějšímu lékařskému využití.

2 Teoretická část

2.1 Mykózy

Mykózy jsou invazivní infekce vyvolané mikroskopickými houbami. U lidí rozeznáváme čtyři základní skupiny mykóz – povrchové, kutánní, subkutánní a systémové. Zvyšující se výskyt těchto chorob vyžaduje intenzivní hledání účinných léčebných postupů. Mikroskopické houby dělíme na kvasinkovité a vláknité houby (plísně) [1], [2].

2.1.1 Mykózy způsobené kvasinkovými mikroorganismy

Z kvasinkovitých mikroorganismů způsobují mykózy především příslušníci rodu *Candida*. Nejčastěji se jedná o druh *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* a *C. krusei* [1].

Slizniční mykózy se nejčastěji nacházejí v dutině ústní. Kde je častý například akutní zánět, známý pod názvem soor, který postihuje především novorozence, starší osoby, pacienty trpící závažným onemocněním (AIDS, zhoubné nádory) a projevuje se bělavým povlakem na jazyku. Dále se u lidí se zubní protézou vyskytuje tzv. chronická atrofická kandidóza. Kandidy také často vyvolávají zánět vaginální sliznice, se kterým se setká až 75 % žen v průběhu jejich života a mnohé z nich trpí těmito mykózami opakovaně [1].

Systémové kandidózy jsou podstatně hůře diagnostikovatelné, zpravidla je nelze odlišit od jiných infekčních chorob. Postiženy mohou být různé partie trávicího traktu, plíce, ledviny či játra. Kandidóza dolních močových cest se objevuje v důsledku močového katétru nebo v souvislosti s cukrovkou. Mezi další, častěji se u nás vyskytující kvasinkovité mikroorganismy patří druh *Malassezia furfur*, původce onemocnění *pityriasis versicolor* [1].

2.1.2 Mykózy způsobené vláknitými houbami

Z vláknitých hub jsou nejčastějšími původci povrchových mykotických infekcí *dermatofyta*, v případě systémových mykóz *aspergillia* [1].

Mezi *dermatofyta* řadíme rody *Trichophyton*, *Epidermophyton* a *Microsporum*. Z nich způsobuje humánní mykózy kolem 10 druhů. Některá dermatofyta jsou antropofilní, působí na lidský organismus, jiná zoofilní nebo geofilní, kdy se infekce přenese ze zvířat na člověka

(např. psů, koček), nebo z půdy. Dermatofyta, vzhledem k jejich schopnosti využít keratin, mohou vyvolat i vážná onemocnění kůže [1].

Spóry vláknitých hub rodu *Aspergillus* se běžně vyskytují v ovzduší, proto jsou nejčastěji infikovány plíce a paranazální dutiny. Zde dominuje druh *Aspergillus fumigatus*. Často fatálně končí plicní infekcí u osob s oslabenou imunitou a hematologickými chorobami [1].

2.1.3 Nejčastěji vyskytující se mykózy

Mykózy trápí náš organismus od útlého mládí až do vysokého věku [3]. Následující podkapitoly proto dále uvádějí nejčastěji se vyskytující mykózy.

2.1.3.1 Soor

Známou formou kandidózy, která se vyskytuje i u velmi malých dětí je tzv. soor. Většinou se objevuje jako bělavý povlak na jazyku, který se dá setřít. Pod povlakem se nacházejí začervenalá ohraničená místa. Vedle této formy sooru existuje také forma bez bělavých povlaků, ta se objevuje většinou po užívání širokospektrálních antibiotik, projevuje se červeným zbarvením a pálením sliznice v ústech. Soor se vyskytuje i u čerstvě narozených nedonošených novorozenců, kdy je zdrojem infekce matka. Pro léčbu se používá léčivo nystatin, flukonazol, itrakonazol nebo cyklodextrin [3].

2.1.3.2 Vaginální mykóza

Hlavním původcem vaginálních mykóz je *Candida albicans*, která je součástí vaginální mikroflóry, při přemnožení se může ale stát nepříjemnou součástí života žen. Tento druh mykózy způsobuje zarudnutí, svědění a pálení vulvovaginální sliznice. Často se objevuje při užívání perorální antikoncepce, antibiotik nebo při diabetu. Bylo prokázáno, že 75 % žen na světě v reprodukčním věku, alespoň jednou za život tuto mykózu prodělá. Z nichž přibližně 5-8 %, což dělá 150 miliónů žen po celém světě, trpí touto mykózou opakovaně. To vede ke chronickému podráždění vulvovaginální sliznice, které vyžaduje léčbu alespoň k částečné kontrole symptomů, většinou azolovými antimykotiky. Ačkoli je tato léčba účinná pro zklidnění symptomů, kvasinka se stává vůči azolovým antimykotikům rezistentnější, často se proto onemocnění navrácí a způsobuje opakované mykózy. Je tedy nutné stále vyvíjet nová antimykotika [4].

2.1.3.3 *Systémové mykózy u HIV pozitivních pacientů*

Houbovité mikroorganismy jsou pro zdravý organismus většinou neškodné. Při oslabené imunitě, zejména u HIV pozitivních pacientů mohou však způsobit vážná onemocnění. Celosvětově, spolu se zvyšujícím se počtem osob se sníženou imunitou, narůstá počet onemocnění způsobených patogeny jako je *Candida*, *Cryptococcus* a *Pneumocystis*. Bylo odhadnuto, že HIV/AIDS má za následek téměř 10 milionů případů orální kandidózy a 2 miliony případů plicních mykóz ročně. V posledních letech představuje ještě vyšší obavy velmi vysoká mortalita spojená s invazivními houbovými infekcemi, která často dosahuje 50 % navzdory širokému spektru léčiv na trhu [5].

Přestože přesnost odhadů úmrtnosti může být sporná, je velmi pravděpodobné, že houbovité a kvasinkovité infekce, zabíjí kolektivně asi jeden a půl milionu lidí ročně, což je prakticky stejný počet lidí, kteří ročně umírají na tuberkulózu či malárii. Mykózy zůstávají v povědomí lidstva velmi podhodnoceny, a proto je cílem vyvinout další účinná a nová antimykotika [5].

2.1.3.4 *Mykózy u osob s rakovinou*

Invazivní mykotické infekce se objevily jako hlavní příčina úmrtnosti u kriticky nemocných pacientů. Pacienti s rakovinou na jednotkách intenzivní péče mají velké sklony pro invazivní houbové infekce. Převážná většina těchto infekcí je způsobena kvasinkou rodu *Candida*. Výskyt invazivní kandidózy se v posledních dvou desetiletích rapidně zvýšil nejen na jednotkách intenzivní péče ale také na onkologických jednotkách. Včasná diagnostika invazivní kandidózy zůstává výzvou navzdory nově zavedeným mikrobiologickým postupům. Při zpožděném zahájení léčby se rapidně zvyšuje úmrtnost. Hlavní klinické studie účinnosti nových antifungálních přípravků nezahrnují pacienty s rakovinou. V posledních letech se také objevila aspergilóza a mucormykóza, jako významné příčiny morbidit a mortality u pacientů s hematologickým karcinomem na jednotkách intenzivní péče [6].

Dostupnost nových chemoterapeutických látek a transplantačních postupů významně zlepšila míru přežití pacientů s rakovinou. Avšak invazivní mykotické infekce zůstávají významnou terapeutickou výzvou pro lékaře a nadále představují potenciální hrozbu pro pacienty, kteří rakovinu přežijí. Několik infekcí, které byly kdysi považovány za vzácné, se stále častěji hlásí z různých léčebných center. Prvotní a rozhodující je rychlá detekce mykóz

u vysoce rizikových pacientů, včasná diagnóza a vhodná léčba. Tyto postupy se ale komplikují díky rezistenci kvasinek a houbových mikroorganismů k rutinně používaným antimykotikům [7].

Vysoká úmrtnost spojená s těmito vzácnými invazivními plísňovými infekcemi odráží potřebu spolehlivějších, neinvazivních, včasných diagnostických nástrojů a nových antifungálních léků s větší účinností. Průběžný výzkum v mykotické oblasti diagnostiky a terapeutiky by usnadnil zavedení nových, účinnějších antimykotik, včetně imunomodulačních terapií, které nakonec zlepší morbiditu a mortalitu těchto závažných infekcí [7].

2.2 Antimykotika

Antimykotika jsou přirozeně se vyskytující nebo syntetické sloučeniny, které mají *in vitro* i *in vivo* aktivitu proti kvasinkám, kvasinkovitým mikroorganismům nebo plísním. Antimykotika inhibují např. syntézu proteinů, RNA a DNA nebo zvyšují permeabilitu buněčné stěny hub, kdy je důsledkem únik makromolekul z buňky vedoucí k jejímu usmrcení. Z hlediska struktury představují antimykotika rozmanitou skupinu sloučenin. Jako antimykotika působí i některá antibiotika, nenasycené mastné karboxylové kyseliny, některé aromatické kyseliny, deriváty imidazolu atd.[8], [9].

2.2.1 Historie antimykotik

V padesátých letech minulého století bylo k dispozici na trhu pouze několik druhů antimykotických léčiv. Toto se však ke konci šedesátých let dramaticky změnilo zavedením novějších širokospektrálních antimykotik, jako jsou např. jodované trichlorfenoly a imidazoly, které narušují buněčnou membránu houbových buněk. Dále byly vyvinuty léčiva jako itrakonazol nebo flukonazol [10].

2.2.2 Polyenová antimykotika

Tato antimykotika se váží na ergosterol a tím narušují permeabilitu cytoplazmatické membrány. Disponují širokým spektrem účinků. Jedná se o látky produkované *Streptomyces nodosus* [11], [13].

2.2.2.1 Amfotericin B

Používá se pro léčbu systémových a orgánových mykóz. Je lipofilní povahy ale jeho koloidní disperze s deoxycholátem sodným umožňuje rozpustnost ve vodě. Velkou nevýhodou je také mnoho nežádoucích účinků jako např. nefrotoxicita. Má široké spektrum účinku s nízkým výskytem rezistence. Jako jediné antimykotikum působí proti zygomycetám a protozoím. Resistentní vůči Amfotericinu B mohou být vzácně některé druhy kandid jako *C. lusitaniae* nebo kmen *Pseudoallescheria boydii* [11], [12].

Nežádoucí účinky se dělí na ranné a pozdní. Akutní toxicita se projeví několik hodin po infuzi zvracením, horečkou, třesavkou či bolestmi hlavy nebo svalů. Jeho nefrotoxicita je dána jeho vazbou na cholesterol membrán, čímž se poruší membránová permeabilita, a tudíž i pronikání iontů a látek skrz membránu. Hematotoxicita se projevuje anémií, méně leukopenií a trombocytopenií [11], [12], [13].

2.2.2.2 Nystatin a Natamycin

Tato léčiva se na rozdíl od Amfotericinu B používají k lokální léčbě, a to k léčbě kožních a vaginálních mykóz, často v kombinaci s antibiotiky nebo kortikosteroidy. Většinou je seženeme ve formě mastí, krémů, vaginálních globulí či vaginálních mastí [11], [12].

2.2.3 Azolová antimykotika

Azolová antimykotika se používají od 60. let minulého století. První řada těchto syntetických léčiv má strukturu založenou na imidazolu (klotrimazol, mikonazol), novější léčiva mají strukturu založenou na triazolu (flukonazol, itrakonazol). Imidazoly se používají zejména pro léčbu lokálních mykóz, zatímco triazoly našly uplatnění v léčbě systémových mykóz [11], [12].

Mechanismus jejich účinku spočívá v inhibici biochemického procesu vzniku ergosterolu, tím pádem narušuje stabilitu buněčných membrán. Bohužel azolová antimykotika interagují s řadou léčiv jako např. s warfarinem, antiretrovirotiky či imunosupresivy [11], [12], [13].

2.2.3.1 Flukonazol

Flukonazol je antifungální činidlo určené pro léčbu systémových i lokálních mykóz. Toto léčivo působí dobře proti kryptokokům a širokému spektru kandid (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae*, ...), bohužel nepůsobí na kmen *Candida krusei*. Je možné ho užívat ve formě perorální suspenze, sirupu, tobolek či infuzního roztoku [11], [12], [13].

2.2.3.2 Klotrimazol

Klotrimazol se používá pouze pro léčbu lokálních mykóz ve formě krému, pasty, emulze-krému, spreje, vaginálního krému či vaginálních tablet. Je často předepisován pro léčbu vulvovaginální kandidózy [11], [12], [13].

2.2.3.3 Echinokandiny

Tato antimykotika, vyvinutá na začátku 21. století, jsou určena výhradně pro léčbu systémových mykóz, způsobených *non-albicans* kandidami (nebo kmeny *C. albicans* rezistentními k flukonazolu) a aspergilami. Na rozdíl od jiných skupin antimykotik inhibují syntézu glukanů v buněčné stěně. U kandid působí fungicidně. Mají minimální nežádoucí účinky a jsou podávány pouze parenterálně. Chemicky se jedná o složité cyklické lipopeptidy [11], [12], [13].

2.2.4 Allylaminy

Tato léčiva inhibují skvalenepoxidázu, čímž dochází v buněčné membráně k deficienci ergosterolu a akumulaci skvalenu, tudíž působí fungicidně. Jejich účinek je rychlejší než u azolů. Působí na plísňe, ale již méně na kvasinky. Patří mezi ně terbinafin (vhodný k léčbě kožních mykóz, onychomykóz) a naftifin. Nežádoucími účinky jsou alergie, vzácně jaterní toxicita [11], [12].

2.2.5 Ciklopirox

Ciklopirox (jeho triethanolaminová sůl, ciklopiroxolamin) působí inhibičně na transport důležitých látek (např. bílkovin) uvnitř buněk hub. Podává se pouze lokálně jako krém, mast, roztok, globule a šampon. Má protizánětlivý účinek a působí nejen na dermatofyty,

kvasinkovité mikroorganismy ale také na řadu grampozitivních koků. Bohužel, jako nežádoucí účinek, můžeme zmínit alopecii či diskoloraci vlasů [11],[13].

2.3 Přírodní látky s potenciálním antimykotickým účinkem

2.3.1 Zázvor lékařský (*Zingiber officinale*)

Zázvor je nám znám hlavně jako koření, jeho oddenek je však důležitou lékopisnou surovinou. V potravinách a nápojích je běžně používán pro svou charakteristickou pikantní chuť. V lékařství byl používán již ve starověku pro léčbu mnoha chorob, bolestí, zánětů či žaludečních problémů. Mnoho příznivě působících látek v zázvoru (gingeroly) již bylo zkoumáno a ověřeno. Zázvor působí skvěle na snížení množství nadbytečného tuku v těle, působí protizánětlivě a také jako preventivní ochrana před rakovinou. Má také silné antioxidační účinky. Antimykotické účinky ethanolového extraktu byly potvrzeny *in vitro* v několika studiích, je zde ale sporné, jak silný je jeho antifungální účinek bez vlivu ethanolu [14], [15], [16].

2.3.2 Česnek kuchyňský (*Allium sativum*)

Česnek je běžně známou zeleninou, která se používá k přípravě pokrmů po celém světě již od roku 3 000 př.n.l. Tato rostlina je hojně používána v medicíně, jelikož obsahuje mnoho bioaktivních látek, zejména deriváty síry (allicin – hlavní bioaktivní složka), zdroj vitamínů E, C, minerálů a polyfenolů. Jeho chemické složení a antioxidační vlastnosti jsou stále předmětem výzkumu [17], [18].

Vědecké studie prokázaly, že česnek lze použít k prevenci i léčbě mnoha onemocnění jako je ateroskleróza, infarkt myokardu, rakovina, nachlazení, trávicí problémy, bakteriální, virová i plísňová onemocnění. Dle studie, myši, kterým byl pravidelně podáván česnek, bojovaly účinněji proti houbové infekci [17], [18].

Na rozdíl od antibiotik, neoslabuje česnek náš imunitní systém, naopak jej podporuje. Jeho prospěšné vlastnosti jsou způsobeny především silnou antioxidační aktivitou [17], [18].

2.3.3 Skořicovník pravý (*Cinnamomum verum*)

Skořicovník pravý je tropický keř, který dorůstá výšky 10 metrů a pochází z jihovýchodní Asie. Skořice, která se získává z kůry skořicovníku, se používá jako koření, přísada do

bonbonů, zubních past i parfémů. V tradiční medicíně se používá jako antitusikum, antimikrobiální, antifungální, antioxidační a protizánětlivé činidlo. Hlavními složkami skořice jsou cinnamaldehyd, cinamát a kyselina skořicová. Obsah těchto složek se s věkem rostliny zvyšuje. Ve skořici se také nacházejí esenciální oleje např. eugenol [19], [20].

Podle posledních studií může skořice zabránit či zpomalit diabetes, rakovinu tlustého střeva, krvácení i roztroušenou sklerózu. Studie prokázala antifungální účinek ethanolového extraktu skořice na kmenech *C. albicans* a *C. krusei*. Prokazatelnost tohoto účinku a formy léčby je nutné ale dále prověřit [19][20],[21].

2.3.4 Lichořeřišnice větší (*Tropaeolum majus*)

Tato rostlina byla v 16. století převezena do Evropy z Jižní Ameriky. Jedná se o rostlinu s mnohými léčivými účinky a obsahem bioaktivních látek, které jsou snadno absorbovatelné lidským organismem. Květy, listy i semena jsou bohatým zdrojem draslíku, fosforu, vápníku, mědi i železa. Lichořeřišnice má potenciální antimikrobiální, antifungální, hypotenzní i protirakovinové účinky. Antifungální účinky byly potvrzeny na krysách s onychomykózou. Antioxidační účinnost této rostliny je způsobena vysokým obsahem anthokyanů, polyfenolů a vitamínu C. Vzhledem k bohatému obsahu fytochemických látek lze lichořeřišnici použít pro onemocnění dýchacího ústrojí i zažívacího systému. Díky vysokému obsahu kyseliny erukové v semenech umožňuje také léčbu adrenoleukodystrofie [22], [23].

2.3.5 Hřebíčkovce kořenný (*Syzygium aromaticum*)

Hřebíčkovce kořenný, obecně známý jako hřebíček, je středně velký, vždy zelený strom 8–12 m vysoký, původem z východní Indonésie. Komerční část tohoto stromu je jeho nerozvitý sušený pupen, který se sklízí po 4 letech od zasazení, těsně před kvetením tohoto stromu. Hřebíček představuje jeden z hlavních zdrojů fenolických sloučenin, jako jsou flavonoidy, hydroxybenzoové kyseliny nebo hydroxyfenylpropeny. Hlavní bioaktivní složkou hřebíčku je eugenol, který se zde nachází v koncentracích od 9,4–14,65 g ve 100 g čerstvého hřebíčku. Esenciální oleje se v samotném nerozvitém pupenu nacházejí v koncentracích až do 18 %, z toho 89 % z nich je zastoupeno eugenolem a zbylá procenta jsou tvořena např. α -humulenem nebo β -pinenem, limonenem či benzaldehydem [24], [25].

Dle studií bylo potvrzeno, že olej z hřebíčku narušuje funkci cytoplazmatické membrány kvasinek i plísní. Má tedy zajímavý potenciál jako terapeutická možnost proti plísním a kvasinkám patogenních pro člověka. Hřebíček se dá zařadit mezi širokospektrální činidla, která inhibují dermatofyty, dále druhy *Aspergillus* a *Candida*, ale také kandidy rezistentní vůči flukonazolu. Bylo by tedy vhodné dále prostudovat jeho širší využití v lékařství [24], [25].

2.3.6 Kurkumin

Kurkumin je přírodní látka, která je izolována extrakcí z oddenku kurkumovníku dlouhého. Tato rostlina pochází z jižní Asie a je již po staletí využívána v medicíně, v poslední době je ale také důležitým předmětem zkoumání. Největším producentem známého žlutého koření, které známe pod názvem kurkuma, je Indie [26].

Preklinické *in vitro* a *in vivo* studie zaznamenaly velké množství biologických účinků kurkuminu potenciálně využitelných v medicíně, např. protizánětlivý účinek, antioxidační účinek, imunomodulační efekt, indukce apoptózy či protirakovinotvorný účinek. Nevýhodou je jeho hydrofóbnost. Obecně je kurkumin považován za bezpečné léčivo do dávky 12 g denně, musíme ale brát na vědomí, že při podání čistého kurkuminu se zvyšuje díky jeho antikoagulačním a antitrombotickým účinkům krvácivost [26], [27].

V případě antifungálních účinků byl zaznamenán inhibiční účinek na kandidy kmenů vyskytujících se u pacientů s AIDS, které byly izolovány z buněk bukalní sliznice. Tato skutečnost dokazuje, že se kurkumin jeví jako vhodný k léčbě mykotických onemocnění, ale vyžaduje další zkoumání možnosti jeho terapeutického využití [26], [27].

2.4 Přírodní versus syntetická antimykotika

Infekční onemocnění se stala světovým problémem a hlavní příčinou předčasných úmrtí přibližně 50 000 lidí denně. Tato situace je alarmující nejen v rozvojových ale také v rozvinutých zemích, a to díky nevhodnému podávání antibiotik. Léčba pacientů se sníženou imunitou se stává komplikovanější z důvodu zvyšující se rezistenci patogenních mikroorganismů [28].

Nejčastější houbovou infekcí je kandidóza způsobená kvasinkami, většinou druhem *Candida albicans*, což je druh dimorfní houby. Nejvhodnější teplota pro její růst se pohybuje

v rozmezí od 25 do 37 °C. Kolonizuje povrchy perorální a vaginální dutiny i zažívací trakt. Dalšími predispozičními faktory pro kandidózu je HIV/AIDS, stres, nedostatek živin, diabetes či mononukleóza [28].

Syntetické antifungální léky působí ve většině na proces syntézy ergosterolu v buněčné membráně hub. Jejich nevhodným použitím, blokují činnost antibiotik tak, že mění cílové místo účinku či schopnost penetrovat buňky, což může způsobit poškození ledvin, abnormality ve funkci jater nebo zažívací problémy [28].

V současné době se patogenní mikroorganismy stávají stále více odolnějšími vůči léčivům na trhu, a výzkum se zaměřuje na hledání nových antimikrobiálních a antifungálních látek z jiných alternativních zdrojů jako jsou např. rostliny či ovoce. Tím by se mohla snížit nejen cytotoxicita léčiva, ale mohlo by být omezeno i množství vedlejších účinků. Tato léčiva by byla také méně finančně náročná na výrobu. Musíme však zvážit možné alergie a otestovat cytotoxicitu jednotlivých nových léčivých látek [28].

2.5 Enkapsulace do liposomů

Liposomy jsou kulovité útvary složené z dvojvrstvy fosfolipidů o průměru 50–1000 nm, které slouží jako velmi vhodné nosiče pro biologicky aktivní látky. Jejich aplikace má velké možnosti využití nejen v dermatologii, ale také při podávání protirakovinových léčiv. Enkapsulace účinných látek do liposomů snižuje např. jejich cytotoxicitu, zvyšuje dobu cirkulace v krvi a účinnost. Liposomy jsou zvláště účinné při léčbě onemocnění, která ovlivňují fagocyty našeho imunitního systému. Fagocyty analyzují liposomy jako abnormální útočníky a liposomy mají tendenci se v těchto fagocytech hromadit [29].

Výhody a omezení liposomů jako nosičů léčiv závisí především na jejich interakci s buňkami. *In vitro* a *in vivo* studie ukázaly, že převládající interakce liposomů s buňkami je buď jednoduchá adsorpce, nebo následná endocytóza. Fúze s buněčnými membránami se objevuje velmi zřídka. Čtvrtou možnou interakcí je výměna komponentů dvojvrstev, jako jsou cholesterol a lipidy [29].

Tělo se před vnějšími vlivy chrání komplexním imunitním systémem. Při vstupu do těla způsobují větší objekty tvorbu trombů a jejich povrch je zneškodněn obklopením a přilnutím biomakromolekul, zatímco malé částice spolu s mikroorganismy a koloidy jsou zničeny buňkami imunitního systému. Tyto odezvy imunitního systému na částice vniklé do

organismu vyvolaly značnou snahu vyvinout biokompatibilní, biodegradabilní a nerozpoznatelné povrchy [29].

2.5.1 Výhody aplikace liposomů

Podobnost lipidického složení liposomů a membrán v epidermis umožňuje liposomům proniknout skrz membránovou bariéru. To má za následek zvýšení vstřebávání látky do kůže a snížení rychlosti doby vyloučení léčiva ven z organismu. Díky jejich amfipatickému charakteru mohou nést hydrofilní i lipofilní léčiva. Jsou biokompatibilní a biodegradabilní. Díky enkapsulaci některých nestabilních látek do liposomů, můžeme zvýšit právě jejich stabilitu. V dermatologii se i prázdné liposomy stávají velmi oblíbenými, díky jejich schopnosti hydratovat pokožku [30].

3 Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce je připravit antimykotický přípravek na přírodní bázi, který bude moci konkurovat antimykotickým přípravkům na trhu. Tomu předchází příprava různých druhů extraktů z přírodních látek a jejich následná enkapsulace do liposomů. Následuje testování antioxidačních účinků extraktů i částic, dále také testování jejich antimykotické aktivity na kvasince *Candida glabrata* a testování cytotoxicity na kožních buňkách. Tato práce se dá shrnout do následujících bodů:

- Příprava a charakterizace vybraných rostlinných extraktů
- Stanovení antimykotické aktivity připravených extraktů ve volné i enkapsulované formě a srovnání jejich účinku s antimykotickým léčivem
- Návrh a testování antimykotického přípravku s obsahem přírodní antimykotické složky

4 Praktická část

4.1 Mikroorganismy použité při testování antimykotické aktivity

V této práci byl použit referenční kmen kvasinky *Candida glabrata* CCM 8270, z české sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

4.2 Použité chemikálie

Klotrimazol, Sigma-Aldrich (SRN)

Folin- Ciocalteu činidlo- p.a., Lach-Ner (ČR)

Uhličitan sodný- p.a., Lach-Ner (ČR)

Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (SRN)

Dusičnan sodný- p.a., Lach-Ner (ČR)

Ethanol pro UV/VIS 99%, Penta (ČR)

Ethanol 96%, Penta (ČR)

Chloroform, Lach-Ner (ČR)

Methanol, Lach-Ner (ČR)

Hydroxid sodný, Lach-Ner (ČR)

Chlorid hlinitý, Lach-Ner (ČR)

Dusitan sodný, Lach-Ner (ČR)

Katechin, Sigma-Aldrich (SRN)

Lecitin, Sigma-Aldrich (SRN)

Cholesterol, Sigma-Aldrich (SRN)

D-glukóza bezvodá- p.a., LachNer (ČR)

Pepton aus Casein, Roth (SRN)

Agar, HiMedia(India)

Yeast Extrakt Powder, HiMedia(India)

ABTS 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, Sigma-Aldrich (SRN)

Peroxodisíran draselný, Sigma-Aldrich (SRN)

Trolox, Sigma-Aldrich (SRN)

Carbomer, Polygel CA, Miča a Harašta, s.r.o (ČR)

Kakaové máslo, 1. AROMATERAPEUTICKÁ KH a.s. (ČR)

Dulbecco's DMEM/high glucose, with 4,0 mM L-glutamine and phenol red, without sodium pyruvate, Lonza (CH)

Dodecylsírán sodný, Serva (SRN)

MTT, Duchefa Biochemie(NL)

Trypsin Versene EDTA, P-Lab (ČR)

FBS, HyClone (USA)

Antibiotic-Antomycotic 100X(Biosera), Biotech (SRN)

4.3 Použité přístroje a pomůcky

Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (SRN)

Analytické váhy, Boeco (SRN)

Vortex V-1 plus, Biosan (LV)

Centrifuga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen (SRN)

Centrifuga MiniSpin, Eppendorf (SRN)

Magnetická míchačka s ohřevem, Benchmark Scientific (USA)

Koloidní DLS analyzátor ZetaSizer Nano ZS, Malvern (UK)

ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (USA)

Ultrazvukový homogenizátor Bandelin Sonoplus HS3200, Sonorex Technik (SRN)

Spektrofotometr NanoPhotometer, Implen (SRN)

Vakuová rotační odparka Werke RV06-ML, IKA Werke (SRN)

Temperovaná třepačka Heidolph Inkubator 1000, Labicom (ČR)

Temperovaná třepačka Heidolph Promax 1020, Labicom (ČR)

Extraktor typu Soxhlet SOXTHERM, Gerhardt (SRN)

Automatické pipety

CellCulture CO₂ Inkubátor, ESCO (SRN)

Inverzní biologický mikroskop I-101 L-Scientific, Laboserv (ČR)

Laminární box Aura mini, Bioair (ITA)

4.4 Použitá koření, bylinky a látky pro extrakty

Hřebíček celý, Prymat (PL)

Skořice mletá, Prymat (PL)

Zázvor mletý, Prymat (PL)

Česnek sušený, Prymat (PL)

Lichořeřišnice semeno, Léčivé rostliny (ČR)

Kurkumin 95%, Sigma-Aldrich (USA)

4.5 Příprava extraktů

Byly připraveny vodné, ethanolové a olejové extrakty.

4.5.1 Příprava vodných extraktů

K přípravě vodných extraktů byl použit 1 g přírodní látky. Navážka byla louhována v 10 ml destilované vody na třepače po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách byly vzniklé extrakty zfiltrvány a přelity do čisté zkumavky.

4.5.2 Příprava ethanolových extraktů

K přípravě ethanolových extraktů byl použit 1 g přírodní látky. Navážka byla louhována v 10 ml 40% ethanolu na třepače po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách byly vzniklé extrakty zfiltrvány a přelity do čisté zkumavky.

4.5.3 Příprava lipidických extraktů pomocí přístroje SOXTHERM

Do prázdných vysušených extrakčních patron bylo naváženo vždy takové množství látky, aby byla patrona naplněna do tří čtvrtin jejího objemu. Patrony byly navrchu ucpány smotkem vaty a byly vloženy do drátěných držáků extrakčních nádobek. Poté bylo do extrakčních nádobek nalito dostatečné množství hexanu (extrakčního činidla). Extrakční nádoby byly opatrně vloženy do přístroje SOXTHERM a poté následovala extrakce pomocí předem nastaveného programu celkově po dobu 3 hodin a 4 minut. Po skončení extrakce a částečném vychladnutí byly extrakční nádoby vyjmuty z přístroje a jejich obsah byl kvantitativně přenesen do předem vysušené a zvážené slzičkové baňky, která byla přenesena na vakuovou odparku, kde se postupně odpařil zbytkový hexan. Slzičkové baňky byly znovu zváženy na analytických vahách, aby byl zaznamenán výtěžek extrakce. Získaný lipidický extrakt byl uschován ve zkumavkách Eppendorf v chladu, aby nedocházelo k degradaci.

4.6 Charakterizace extraktů

4.6.1 Stanovení celkových polyfenolů spektrofotometricky

Do zkumavek bylo napipetováno 1 ml 10x ředěného Follin-Ciocaltautova činidla, 1 ml destilované vody a 50 μ l vzorku. Roztok byl promíchán a ponechán 5 minut stát při laboratorní teplotě. Do zkumavky byl poté přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Roztok byl opět promíchán a ponechán 15 minut stát při laboratorní teplotě. Po 15 minutách byla změřena absorbance roztoku při vlnové délce 750 nm oproti blanku, kdy byla místo vzorku přidána voda. Množství polyfenolů bylo přepočteno na 1 g přírodní látky (koření).

Pro sestavení kalibrační křivky byla připravena kalibrační řada kyseliny gallové od 0,1 do 0,7 mg/ml. Koncentrace polyfenolů byla vypočítána z kalibrační rovnice $y = 1,0819 x$.

4.6.2 Stanovení celkových flavonoidů spektrofotometricky

Do zkumavky bylo pipetováno 0,5 ml vzorku, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% roztoku dusitanu sodného. Roztok byl promíchán a nechán 5 minut stát při laboratorní teplotě. K roztoku bylo přidáno 0,2 ml 10% chloridu hlinitého. Roztok byl opět promíchán a ponechán stát 5 minut. Poté bylo k roztoku přidáno 1,5 ml 5% roztoku hydroxidu sodného a 1 ml destilované vody. Roztok byl ponechán 15 minut stát při laboratorní teplotě a poté byla měřena absorbance při vlnové délce 510 nm oproti blanku, jímž byla destilovaná voda. Množství flavonoidů bylo přepočteno na 1 g přírodní látky (koření).

Pro sestavení kalibrační křivky byla připravena kalibrační řada katechinu rozpuštěného v ethanolu v koncentračním rozmezí 0,05–0,30 mg/ml. Obsah flavonoidů byl vypočítán z kalibrační rovnice $y = 3,9326 x$.

4.6.3 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS

Roztok ABTS byl rozpuštěn v destilované vodě na koncentraci 7 mmol/l. Reakcí s 2,45 mmol/l peroxodisíranu draselného byl získán radikálový aniont ABTS^{•+}. Takto připravený roztok byl ponechán 12 hodin ve tmě. Před měřením byl roztok ABTS zředěn ethanolem na hodnotu absorbance přibližně $A = 0,700$. Měření bylo prováděno při vlnové délce 734 nm oproti ethanolu. K měření byla použita zúžená kyveta, do které byl napipetován 1 ml ABTS a 10 μ l vzorku. Byl zaznamenán pokles absorbance po 10 minutách.

Jako blank byl použit ethanol. Antioxidační aktivita byla přepočítána na ekvivalentní množství troloxu vztažené na 1 g přírodní látky (koření).

Kalibrační roztok troloxu (rozpuštěný v 60% ethanolu) byl připraven v koncentrační řadě 40–400 µg/ml. Antioxidační aktivita byla počítána z kalibrační rovnice $y = 0,00137 x$.

4.7 Příprava liposomů

Z každého typů testovaných extraktů (vodného, ethanolového i hexanového) byly připraveny liposomy metodou sonikace, a to pomocí tyčového ultrazvukového homogenizátoru.

4.7.1 Příprava liposomů z vodných extraktů

Do kádinky bylo připraveno 10 mg cholesterolu a 90 mg lecitinu, byl přidán 1 ml vodného extraktu a 9 ml destilované vody. Tato směs byla v kádince sonikována pomocí tyčového ultrazvukového homogenizátoru po dobu 1 minuty ve čtvrtminutových intervalech, aby nedošlo k nadměrnému zahřívání vzorku. Připravené liposomy byly slity do čisté zkumavky a uchovány v chladu při teplotě 5 °C.

4.7.2 Příprava liposomů z ethanolových extraktů

Do kádinky bylo připraveno 10 mg cholesterolu a 90 mg lecitinu, byl přidán 1 ml ethanolového extraktu a 9 ml destilované vody. Tato směs byla v kádince sonikována pomocí tyčového ultrazvukového homogenizátoru po dobu 1 minuty ve čtvrtminutových intervalech, aby nedošlo k nadměrnému zahřívání vzorku. Připravené liposomy byly slity do čisté zkumavky a uchovány v chladu při teplotě 5 °C.

4.7.3 Příprava liposomů z lipidických extraktů pomocí rozpouštění v chloroformu

Do kádinky bylo připraveno 10 mg cholesterolu a 90 mg lecitinu. V 1 ml chloroformu bylo rozpuštěno 10 mg lipidického extraktu, tento 1 ml byl také přidán do kádinky spolu s 10 ml destilované vody. Tato směs byla v kádince sonikována pomocí tyčového ultrazvukového homogenizátoru po dobu 1 minuty ve čtvrtminutových intervalech, aby nedošlo k nadměrnému zahřívání vzorku. Kádinka byla vložena na magnetickou míchačku a zde byla ponechána, dokud se neodpařil veškerý chloroform. Poté byly připravené liposomy slity do čisté zkumavky a uchovány v chladu při teplotě 5 °C.

4.7.4 Příprava liposomů z lipidických extraktů pomocí rozpouštění v hexanu

Do kádinky bylo připraveno 10 mg cholesterolu a 90 mg lecitinu. V 1 ml hexanu bylo rozpuštěno 10 mg lipidického extraktu, tento 1 ml byl také vlit do kádinky spolu s 10 ml destilované vody. Tato směs byla v kádince sonikována pomocí tyčového ultrazvukového homogenizátoru po dobu 1 minuty ve čtvrtminutových intervalech, aby nedošlo ke zbytečnému zahřívání. Kádinka byla vložena na magnetickou míchačku a zde byla ponechána, dokud se neodpařil veškerý hexan. Poté byly připravené liposomy slity do čisté zkumavky a uchovány v chladu při teplotě 5 °C.

4.7.5 Příprava liposomů z čistého kurkuminu

Do kádinky bylo připraveno 10 mg cholesterolu a 90 mg lecitinu. V 1 ml 96% ethanolu bylo rozpuštěno 10 mg kurkuminu, tento 1 ml byl také vlit do kádinky spolu s 9 ml destilované vody. Tato směs byla v kádince sonikována pomocí tyčového ultrazvukového homogenizátoru po dobu 1 minuty ve čtvrtminutových intervalech, aby nedošlo ke zbytečnému zahřívání. Poté byly připravené liposomy slity do čisté zkumavky a uchovány v chladu při teplotě 5 °C.

4.7.6 Příprava liposomů s klotrimazolem

Do kádinky bylo připraveno 10 mg cholesterolu a 90 mg lecitinu. V 1 ml 96% ethanolu bylo rozpuštěno 10 mg klotrimazolu, tento 1 ml byl také vlit do kádinky spolu s 9 ml destilované vody. Tato směs byla v kádince sonikována pomocí tyčového ultrazvukového homogenizátoru po dobu 1 minuty ve čtvrtminutových intervalech, aby nedošlo ke zbytečnému zahřívání. Poté byly připravené liposomy slity do čisté zkumavky a uchovány v chladu při teplotě 5 °C.

4.8 Charakterizace liposomů

U liposomů byla zkoumána velikost, Zeta potenciál, index polydisperzity, enkapsulační účinnost, antioxidační účinek a jejich dlouhodobá stabilita (Zeta potenciál a antioxidační účinek) po třech měsících.

4.8.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Byl odebrán malý objem liposomů do zkumavky typu Eppendorf. Toto množství bylo centrifugováno 5 minut (14 000 ot./min), aby se usadily největší částice. Následně byl supernatant opět vložen do nové zkumavky typu Eppendorf a byl centrifugován po dobu 60 minut (11 000 ot./min). Poté byl supernatant slit a liposomy na dně zkumavky byly rozsuspendovány v 1 ml destilované vody. V supernatantu byl stanoven obsah volných polyfenolů (viz 4.6.1) a to jako podíl neenkapsulované složky k celkovému množství složky v původním roztoku.

4.8.2 Stanovení antioxidačního účinku liposomů

Antioxidační účinek liposomů byl vyhodnocen u rozsuspendovaných liposomů (viz 4.8.1) metodou stanovení antioxidační aktivity (viz 4.6.3). Výsledek byl přepočítán na ekvivalentní množství troloxu v 1 ml liposomů.

4.8.3 Stanovení velikosti liposomů pomocí DLS

Roztok liposomů byl před samotným měřením stokrát naředěn destilovanou vodou. Pomocí DLS přístroje Malvern Zetasizer byl vždy třikrát u každého druhu liposomů zjištěn distribuční koeficient a samotná velikost částic.

4.8.4 Stanovení stability liposomů pomocí měření Zeta potenciálu

Roztok liposomů byl stokrát naředěn destilovanou vodou. Do Dip cely byl umístěn tento roztok a Dip cely byla vložena do DLS přístroje Malvern Zetasizer. Zeta potenciál byl měřen u každého druhu extraktu třikrát. Částice se považují za stabilní, pokud je hodnota Zeta potenciálu mimo interval hodnot -25 mV až 25 mV.

4.8.5 Stanovení dlouhodobé stability liposomů

Po 3 měsících byl znovu stanoven antioxidační účinek liposomů (viz. Stanovení antioxidačního účinku liposomů) a byl porovnán s antioxidačním účinkem liposomů ihned po jejich přípravě. Byl také změřen Zeta potenciál všech liposomů (viz. Stanovení stability liposomů pomocí měření Zeta potenciálu) a porovnán se Zeta potenciálem liposomů, který měly liposomy ihned po jejich přípravě.

4.9 Příprava gelu a jeho optimalizace

Byly připraveny gely o třech různých koncentracích carbomeru, aby bylo možno určit, která koncentrace je vhodná pro zevní použití a která je vhodná pro vaginální gel. Nejdříve byl navážen carbomer a poté bylo naváženo takové množství destilované vody, aby carbomer tvořil hmotnostně 1 %, 2 % a 4 %. Tyto dvě složky byly promíchávány tak dlouho, aby byly dokonale smíseny a vytvořily gel.



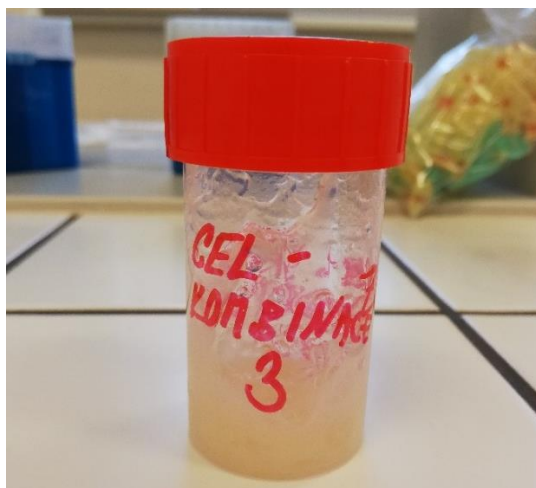
Obrázek 1 Optimalizace přípravy gelů – různé koncentrace carbomeru

4.9.1 Příprava gelu č.1 s liposomy zázvoru, skořice a lichořeřišnice

Byl připraven gel č.1, kde carbomer tvořil hmotnostně 4 %. Pro přípravu 1 g gelu byly naváženy jednotlivé složky dle následující tabulky:

Tabulka 1 příprava gelu č.1

SLOŽKY	MNOŽSTVÍ [g]
Carbomer	0,04
destilovaná voda	3,96
liposomy s lipidickým extraktem ze zázvoru	2,00
liposomy s lipidickým extraktem ze skořice	2,00
liposomy s lipidickým extraktem ze lichořeřišnice	2,00



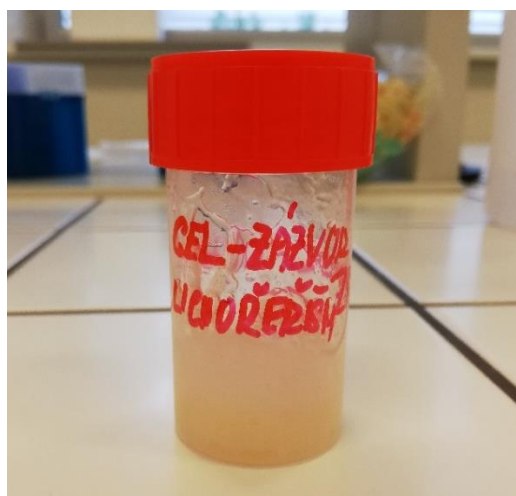
Obrázek 2 Gel s liposomy z lipidických extraktů zázvoru, lichořeřišnice a skořice

4.9.2 Příprava gelu č.2 s liposomy zázvoru a lichořeřišnice

Byl připraven gel č.2, kde carbomer tvořil hmotnostně 4 %. Pro přípravu 10 g gelu byly naváženy jednotlivé složky dle následující tabulky:

Tabulka 2 Příprava gelu č.2

SLOŽKY	MNOŽSTVÍ [g]
Carbomer	0,04
destilovaná voda	3,96
liposomy s lipidickým extraktem ze zázvoru	3,00
liposomy s lipidickým extraktem ze lichořeřišnice	3,00



Obrázek 3 Gel s liposomy z lipidických extraktů zázvoru a lichořeřišnice

4.9.3 Příprava hmoty pro výrobu vaginálních čípků lipidickými extrakty

Byly připraveny dva druhy vaginálních čípků A s nižším a čípky B s vyšším obsahem lipidickým extraktů. K přípravě hmoty bylo ve vodní lázni rozpuštěno kakaové máslo. Po částečném vychladnutí byly přidány lipidické extrakty. Hmota byla ve formě čípků i volně uchována v chladu při teplotě 5 °C. Všechny složky i jejich množství jsou uvedeny v následující tabulce:

Tabulka 3 Příprava čípků

	ČÍPKY A	ČÍPKY B
PŘÍSADA	MNOŽSTVÍ [g]	MNOŽSTVÍ [g]
kakaové máslo	9,5	9,3
lip. extrakt - zázvoru	0,2	0,3
lip. extrakt - lichořeřišnice	0,3	0,4



Obrázek 4 Improvizovaná forma čípků

4.9.4 Testování antioxidační aktivity gelu a čípků

U testování antioxidační aktivity gelu (viz 4.6.3) bylo 10 μ l vzorku nahrazeno 10 mg gelu. Testování antioxidační aktivity čípků probíhalo podobně, ale místo 10 μ l vzorku bylo použito 10 μ l roztoku, kdy bylo 10 mg hmoty pro čípky rozpuštěno v 1 ml ethanolu.

4.10 Testování antimykotické aktivity

Pro testování antimykotické aktivity byla vybrána kvasinka *Candida glabrata*. Pro provedení testu bylo nutné nejprve kvasinku nakultivovat na tekutém médiu.

4.10.1 Příprava tekutého média a kultivace kvasinky *C. glabrata*

Tekuté médium bylo připravováno do Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml. Potřebné množství chemikálií: Yeast Extrakt Powder (10 g/l), Pepton aus Casein (20 g/l), D-glukosa (20 g/l). Tyto suroviny byly doplněny do objemu 50 ml destilovanou vodou a médium bylo sterilováno 35 minut při teplotě 100 °C. Po vychladnutí byla *C. glabrata* přeočkována z agarové plotny do tekutého média a byla ponechána ke kultivaci po dobu 24 h a při teplotě 37 °C. Po 24 hodinách byl odebrán 1 ml inokula do dalšího sterilního tekutého média a s tímto roztokem inokula byl proveden antimykotický test.

4.10.2 Antimykotický test – diluční metoda

Pro tento antimykotický test byla používána mikrotitrační destička pro 96 jamek. Do jamek bylo vždy ve třech opakováních pipetováno 150 µl kvasinkové kultury a 50 µl vzorku (u gelu a čípků vždy množství 25 mg). Nebyl opomenut blank, který byl nutný pro sledování růstu kvasinky. Stanovení antimykotické aktivity bylo provedeno pro samotné extrakty, jejich kombinace, liposomy, gely i čípky. Byla změřena absorbance pomocí spektrofotometrického stanovení v čase 0 a po 24 hodinách při vlnové délce 630 nm. Rozdíl absorbance jamek se vzorky po 24 hodinách byl porovnán s rozdílem absorbance jamek s blankem, a tak byla vypočítána antimykotická aktivita.

4.11 Kultivace humánních kožních buněk

Buňky linie HaCaT byly kultivovány v komerčním médiu DMEM. Médium bylo nutné před použitím vytemperovat na teplotu 37 °C. Práce s buňkami probíhala vždy za sterilních podmínek. Buňky byly kultivovány ve speciálních lavičkách v inkubátoru při teplotě 37 °C, 5% obsahu CO₂ a relativní vlhkosti 90 %. Po vytažení buněk z inkubátoru byly před každou prací pečlivě zkontrolovány jednotlivé lahvičky. Byl sledován celkový stav buněk, jejich morfologie, množství a případné kontaminace. Podle množství buněk bylo buď vyměněno médium (každé dva dny), nebo v případě vysokého procenta konfluence (stavu, kdy buňky zaplní povrch dna nádoby a dostanou se do vzájemného kontaktu) byly buňky pasážovány

(přeneseny) do nové kultivační nádoby. Při výměně média bylo staré médium odstraněno a nahrazeno novým.

Při pasážování bylo postupováno podobně. Po odstranění média byl celý povrch kultivačních lahvíček dvakrát promyt pomocí PBS. Po propláchnutí byla přidána proteáza v adekvátním množství a lahvička s enzymem byla vložena do kultivačního boxu na 10 minut. Po dané době bylo pod mikroskopem zkontrolováno, zda se buňky odloučily ode dna lahvičky. Celý povrch lahvíček byl promyt pomocí PBS a poté byla suspenze buněk napipetována z lahvíček do centrifugačních zkumavek a byla centrifugována 5 minut při 360g (RCF). Následně byl opatrně slit supernatant tak, aby peletky buněk zůstaly usazeny na dně. K buňkám bylo napipetováno médium, v němž byly rozsuspendovány, a byly přeneseny do nové lahvičky. Médium v nové lahvičce bylo doplněno na požadovaný objem. Na závěr byly buňky opět zkontrolovány pod mikroskopem a vráceny do inkubátoru.

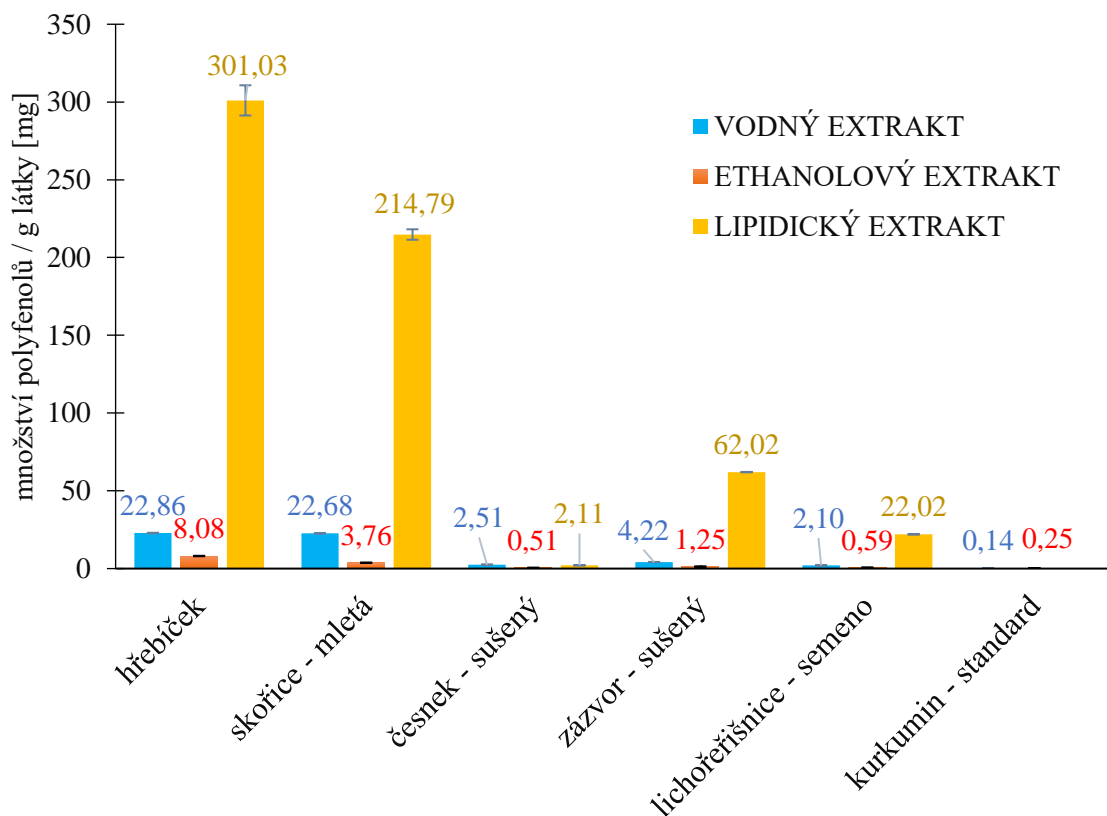
4.12 Testování cytotoxicity liposomů pomocí MTT testu

Po nárůstu buněk na dostatečné množství byly buňky použity k testování cytotoxicity pomocí MTT testu. Buňky byly vhodně zředěny médiem tak, aby jejich výsledná koncentrace byla $2 \cdot 10^4$ buněk/100 μ l. Takto připravená suspenze byla pipetována po 100 μ l na 96 jamkovou destičku. Destička byla zkontrolována pod mikroskopem, jestli se buňky nacházejí v každé jamce, a na 24 hodin byla destička dána do inkubátoru. Poté bylo z jamek odpipetováno médium a přidáno 100 μ l sterilního vzorku v médiu do každé jamky v různých koncentracích. Následně byla destička vrácena na 24 hodin do inkubátoru. Po uplynutí 24 hodin byl odpipetován vzorek a do každé jamky bylo napipetováno 20 μ l MTT o koncentraci 2,5 mg/ml v PBS. Buňky byly ponechány ke kultivaci v inkubátoru po dobu 3 hodin. Nakonec bylo do každé jamky přidáno 100 μ l 10% SDS v PBS. Destička byla ponechána ve tmě při laboratorní teplotě na dalších 24 hodin. Po 24 hodinách byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Viabilita buněk byla vypočítána jako poměr absorbance vzorku vůči kontrole, která obsahovala po celou dobu jen médium.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Obsah polyfenolů v jednotlivých extraktech

Obsah polyfenolů v extraktech byl měřen dle bodu 4.6.1. a je zobrazen v následujících tabulkách (Tabulka 4, Tabulka 5) a na následujícím grafu (Obrázek 5). Každý z extraktů byl analyzován ve třech opakováních a výsledkem je průměrná hodnota a směrodatná odchylka z těchto tří měření v mg polyfenolů na 1 gram látky (koření).



Obrázek 5 Grafický přehled množství polyfenolů v jednotlivých extraktech

Tabulka 4 Přehled množství polyfenolů v jednotlivých extraktech

druh extraktu	vodný	40% ethanolový	lipidický
název	mg polyfenolů/ g látky		
hřebíček	22,86 ± 0,16	8,08 ± 0,14	301,03 ± 9,71
skořice – mletá	22,68 ± 0,17	3,76 ± 0,07	214,79 ± 3,36
česnek – sušený	2,51 ± 0,12	0,51 ± 0,00	2,11 ± 0,03
zázvor – sušený	4,22 ± 0,12	1,25 ± 0,03	62,02 ± 0,13
ličořeřišnice – semeno	2,10 ± 0,05	0,59 ± 0,00	22,02 ± 0,08
kurkumin – standard	0,14 ± 0,00	0,25 ± 0,01	–

Tabulka 5 Množství polyfenolů v 96% ethanolovém extraktu standardu kurkuminu

druh extraktu	96% ethanolový
název	mg polyfenolů/ g látky
kurkumin - standard	169,13 ± 0,34

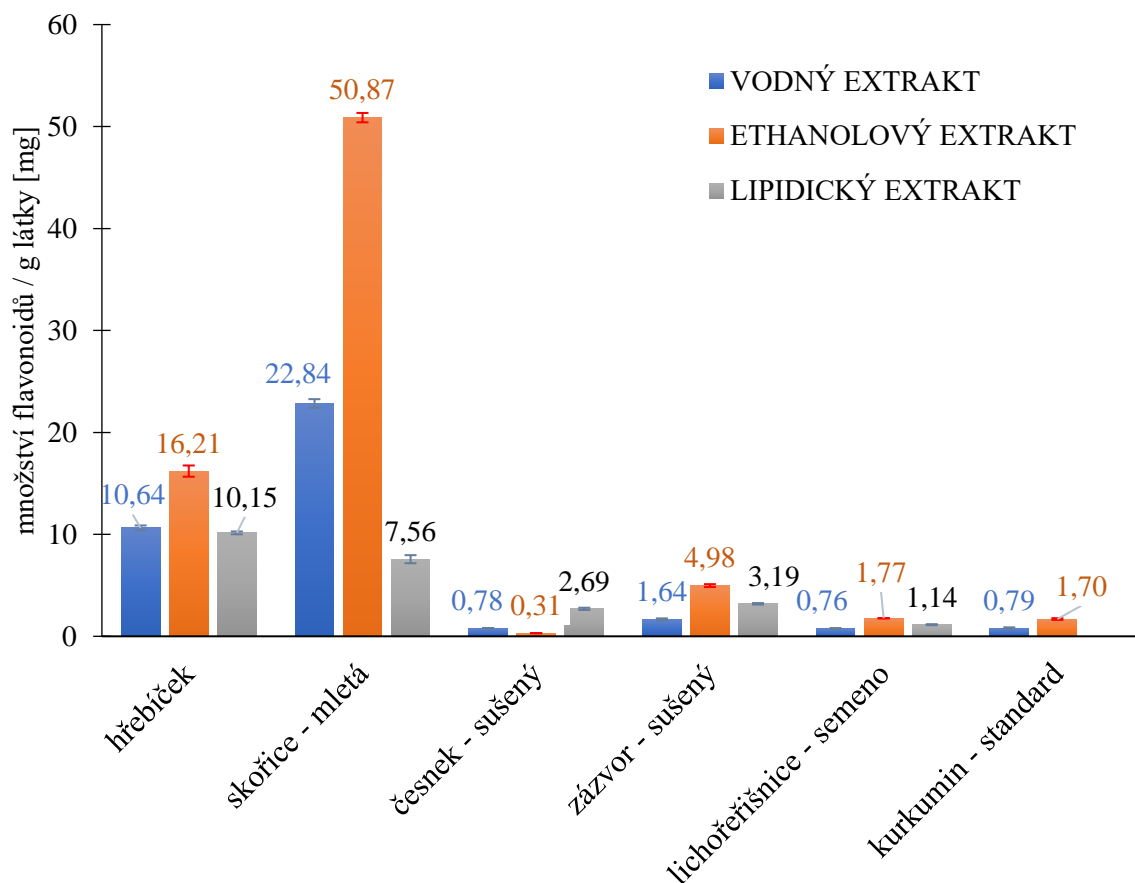
Největší množství polyfenolů bylo naměřeno u lipidických extraktů (s výjimkou česneku, kdy největší množství polyfenolů obsahoval jeho vodný extrakt) a to v pořadí hřebíček, skořice, zázvor a lichořeřišnice. Ve vodných extraktech figuroval opět hřebíček, skořice následoval zázvor, a naopak u hydrofobního kurkuminu byl obsah polyfenolů ve vodném extraktu minimální. Můžeme tedy prohlásit, že z hlediska obsahu polyfenolů jsou nejlépe využitelné lipidické extrakty až na kurkumin. U standardu kurkuminu je nejlépe využitelný 96% ethanolový extrakt.

5.2 Obsah flavonoidů v jednotlivých extraktech

Obsah flavonoidů v extraktech byl měřen dle odstavce 4.6.2. Celkový obsah flavonoidů v extraktech je zobrazen v následující tabulce (Tabulka 6 a Tabulka 7) a na následujícím grafu (Obrázek 6). Každý z extraktů byl analyzován ve třech opakováních a výsledkem je průměrná hodnota a směrodatná odchylka z těchto tří měření v mg flavonoidů na gram látky (koření).

Tabulka 6 Přehled množství flavonoidů v jednotlivých extraktech

druh extraktu	vodný	40% ethanolový	lipidický
název	mg flavonoidů/ g látky		
hřebíček	10,63 ± 0,24	16,20 ± 0,55	10,15 ± 0,14
skořice – mletá	22,84 ± 0,42	50,81 ± 0,46	7,56 ± 0,40
česnek – sušený	0,78 ± 0,03	0,31 ± 0,02	2,85 ± 0,11
zázvor – sušený	1,64 ± 0,11	4,98 ± 0,14	3,19 ± 0,07
lichoreřišnice - semeno	0,76 ± 0,02	1,77 ± 0,01	1,14 ± 0,05
kurkumin – standard	0,79 ± 0,09	1,70 ± 0,09	–



Obrázek 6 Grafický přehled množství flavonoidů v jednotlivých extraktech

Tabulka 7 Množství flavonoidů v 96% ethanolovém extraktu standardu kurkuminu

druh extraktu	96% ethanolový
název	mg flavonoidů/ g látky
kurkumin - standard	155,7 ± 5,34

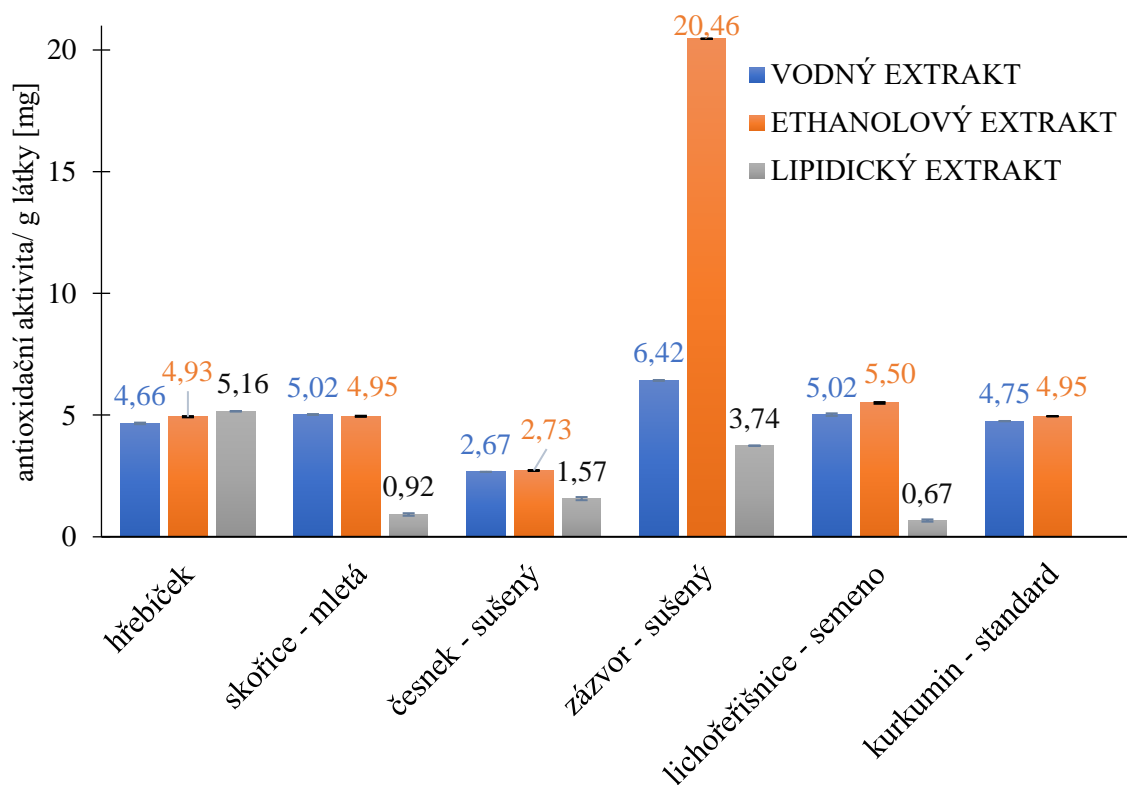
Největší množství flavonoidů bylo naměřeno u ethanolových extraktů (výjimku tvořil jen vzorek česneku, kdy největší množství flavonoidů obsahoval jeho lipidický extrakt) a to v pořadí skořice, hřebíček, zázvor a lichořeřišnice. Ve vodných extraktech figurovala skořice, hřebíček následoval zázvor, česnek a u kurkuminu byl obsah flavonoidů ve vodném extraktu minimální. Můžeme tedy prohlásit, že z hlediska obsahu flavonoidů jsou nejlépe využitelné ethanolové extrakty. Nejvyšší hodnoty flavonoidů vykazoval 96% ethanolový extrakt kurkuminu, jelikož kurkumin je sám o sobě flavonoid. U kurkuminu je problém s jeho hydrofóbností.

5.3 Antioxidační aktivita jednotlivých extraktů

Antioxidační aktivita extraktů byla měřena dle odstavce 4.6.3. Koncentrace flavonoidů byla vypočítána z kalibrační rovnice $y = 0,00137 x$. Antioxidační aktivita jednotlivých extraktů je zobrazena v následujících tabulkách (Tabulka 8 a Tabulka 9) a na následujícím grafu (Obrázek 7). Každý z extraktů byl analyzován ve třech opakováních a výsledkem je průměrná hodnota a směrodatná odchylka z těchto tří měření v mg na gram látky (koření).

Tabulka 8 Přehled antioxidační aktivity jednotlivých extraktů

druh extraktu	vodný	40% ethanolový	lipidický
název	mg antioxidační aktivity/ g látky		
hřebíček	4,66 ± 0,03	4,93 ± 0,03	5,15 ± 0,01
skořice – mletá	5,02 ± 0,02	4,95 ± 0,02	0,92 ± 0,05
česnek – sušený	2,67 ± 0,00	2,73 ± 0,00	1,57 ± 0,06
zázvor – sušený	6,42 ± 0,04	20,46 ± 0,04	3,74 ± 0,00
ličořeřišnice – semeno	5,02 ± 0,05	5,50 ± 0,04	0,67 ± 0,05
kurkumin – standard	4,75 ± 0,00	4,95 ± 0,00	–



Obrázek 7 Grafické znázornění antioxidační aktivity jednotlivých extraktů

Tabulka 9 Přehled antioxidační aktivity 96% ethanolového extraktu kurkuminu

druh extraktu	96% ethanolový
název	mg antioxidační aktivity/ g látky
kurkumin - standard	47,29 ± 0,67

Největší antioxidační aktivitu vykazoval 40% ethanolový extrakt zázvoru, poté i jeho vodný extrakt. Vodné a ethanolové extrakty hřebíčku, skořice, lichořeřišnice a kurkuminu pak vykazovaly podobnou antioxidační aktivitu. V celkovém porovnání měly nejmenší antioxidační aktivitu extrakty z česneku.

5.4 Enkapsulační účinnost

Při měření enkapsulační účinnosti připravených extraktů do liposomů bylo postupováno dle odstavce 4.8.1. Měření bylo provedeno vždy ve třech opakováních a následně byla vypočítána průměrná hodnota enkapsulační účinnosti v procentech.

Tabulka 10 Přehled enkapsulační účinnosti extraktů dle výpočtu obsahu volných polyfenolů

druh extraktu	vodný	40% ethanolový	lipidický
název	enkapsulační účinnost [%]		
hřebíček	91,31	93,20	74,66
skořice – mletá	93,60	96,48	99,44
česnek – sušený	61,06	67,36	97,89
zázvor – sušený	81,90	85,22	81,73
ličořeřišnice – semeno	80,76	84,40	98,82
kurkumin – standard	49,35	56,32	–

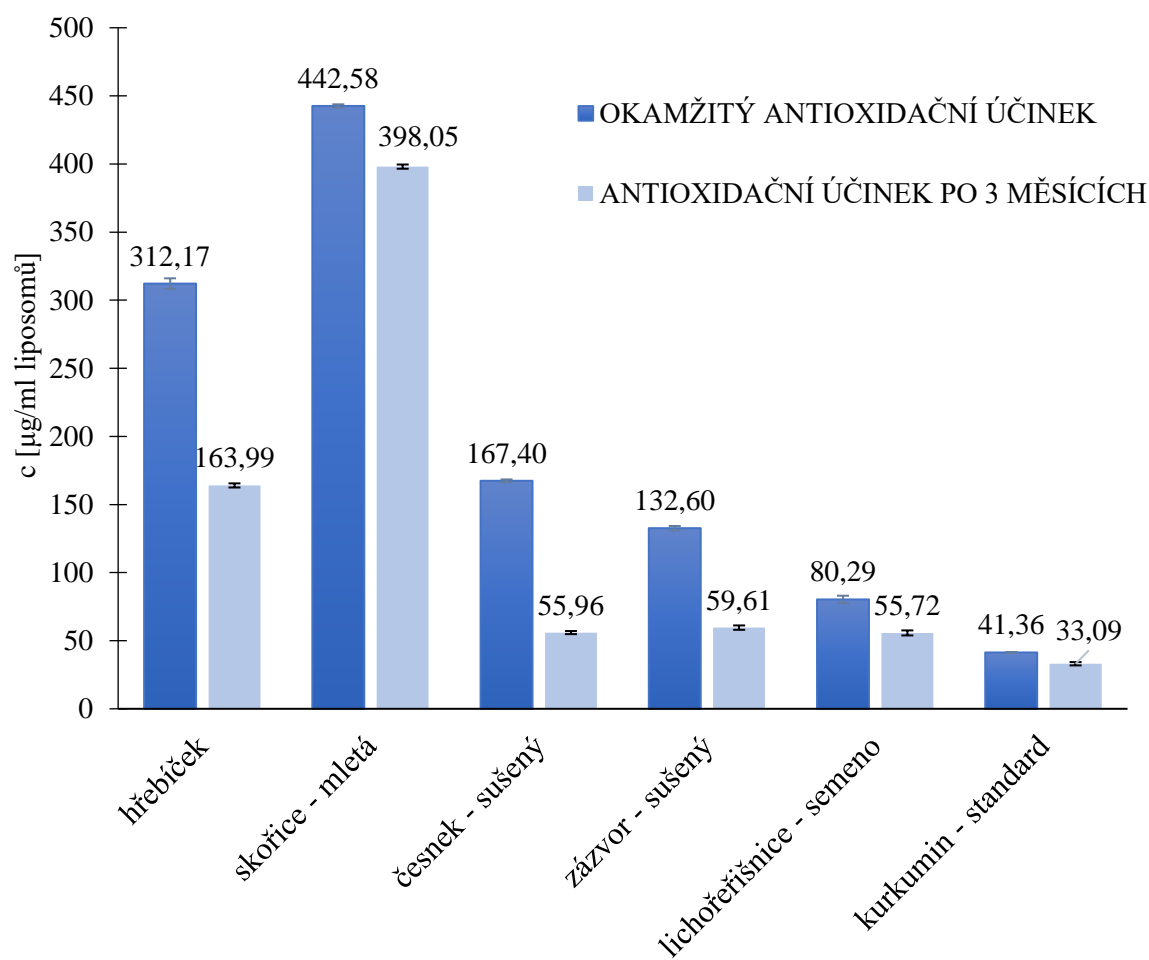
Tabulka 11 Přehled enkapsulační účinnosti extraktu dle výpočtu obsahu volných polyfenolů

druh extraktu	96% ethanolový
název	enkapsulační účinnost [%]
kurkumin - standard	62,38

Nejlepší enkapsulační účinnost vykazovaly liposomy s lipidickým extraktem ze skořice, velmi dobré hodnoty enkapsulační účinnosti měly i ostatní liposomy s extrakty ze skořice. Bohužel nejmenší enkapsulační účinnost vykazovaly liposomy extraktů standardu kurkuminu. U česneku byl nejlépe enkapsulován do liposomů jeho lipidický extrakt, kdy došlo také ke značnému zmírnění zápachu, který byl u jeho neenkapsulované formy velmi silný. Liposomy s vodným a ethanolovým extraktem z česneku, byly výrazně cítit, což lze hodnotit také z hodnoty enkapsulace kolem 60 %.

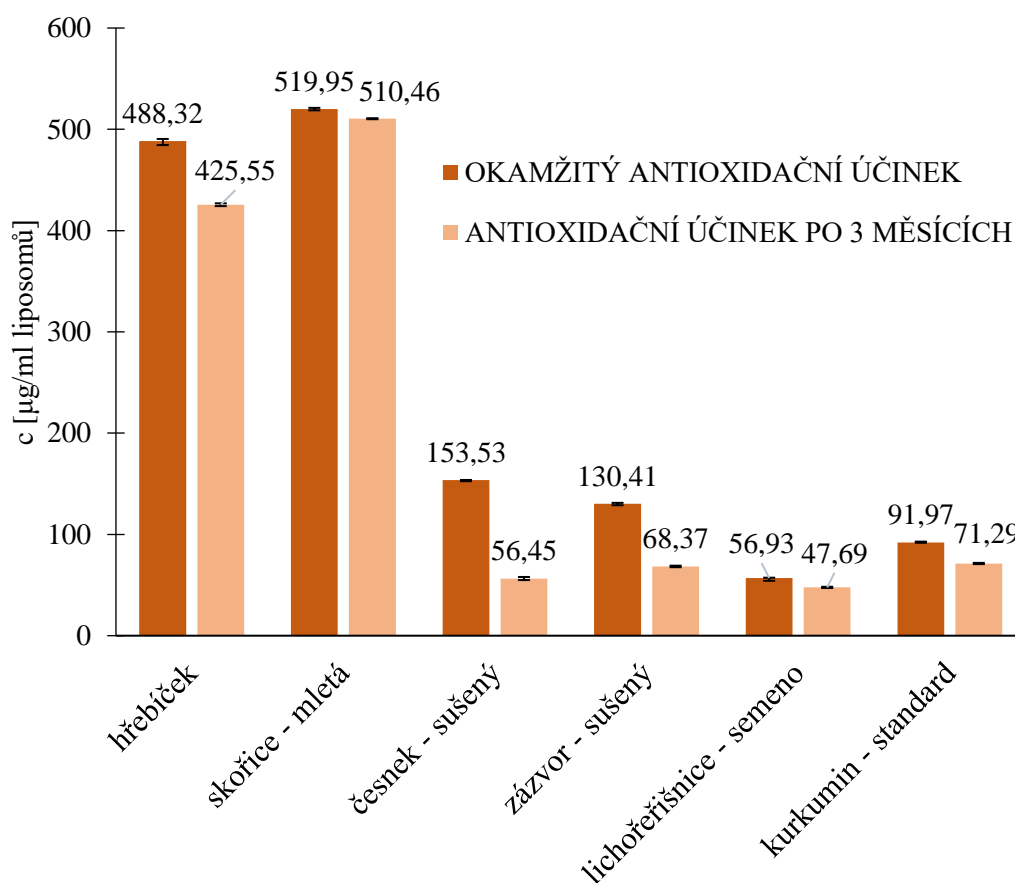
5.5 Antioxidační účinek a dlouhodobá stabilita liposomů

Dle odstavce 4.8.2 byl ve třech opakováních u každého druhu liposomů, ihned po jejich přípravě, změřen jejich antioxidační účinek. Výsledná hodnota antioxidačního účinku byla vyjádřena jako ekvivalent Troloxu. Stejné měření antioxidačního účinku liposomů, dle odstavce 4.8.5, bylo provedeno po třech měsících, abychom mohli srovnat, zda jsou liposomy stabilní a jejich antioxidační účinek přetrvává. Liposomy byly měřeny ve třech opakováních a v grafech je uvedena průměrná hodnota a její směrodatná odchylka v μg na mililitr liposomů. Měření dlouhodobé stability bylo taktéž doplněno o měření Zeta potenciálu (kapitola 5.7). Antioxidační účinek liposomů ihned po přípravě a jeho srovnání po třech měsících můžeme vidět v následujících grafech (Obrázek 8, Obrázek 9 a Obrázek 10).



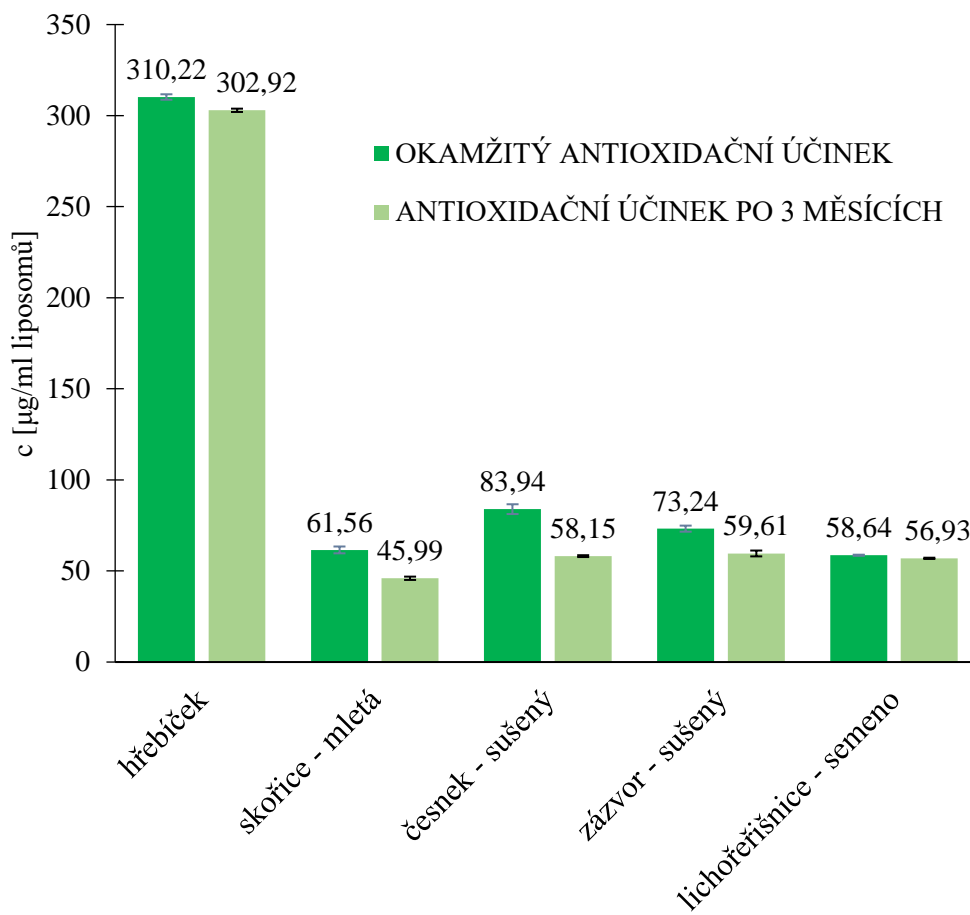
Obrázek 8 Srovnání antioxidačního účinku liposomů z vodných extraktů v intervalu tří měsíců

V grafu (Obrázek 8) můžeme vyčíst, jak antioxidační účinek liposomů z vodných extraktů klesal v pořadí skořice, hřebíček, poté česnek, zázvor, lichořeřišnice a nejnižší antioxidační aktivitu vykazovaly liposomy s vodným extraktem kurkuminu. Po třech měsících lze pozorovat snížení antioxidační aktivity nejvíce u hřebíčku, česneku a zázvoru. Tuto skutečnost lze odůvodnit vodným prostředím, ve kterém byly liposomy uchovávány, či degradací jednotlivých antioxidantů.



Obrázek 9 Srovnání antioxidačního účinku liposomů z ethanolových extraktů v intervalu tří měsíců

Dle dosažených výsledků (Obrázek 9) můžeme konstatovat, že antioxidační účinek liposomů z ethanolových extraktů klesal v pořadí skořice, hřebíček, poté česnek, zázvor, kurkumin a nejnižší antioxidační aktivitu vykazovaly liposomy s ethanolovým extraktem lichořeřišnice. Po třech měsících lze pozorovat pouze mírné snížení antioxidační aktivity. Nejvíce to lze pozorovat u česneku a zázvoru. V průběhu tří měsíců může docházet k degradaci jednotlivých antioxidantů, v případě česneku a zázvoru byla degradace vzorku nejvyšší.



Obrázek 10 Srovnání antioxidačního účinku liposomů z lipidických extraktů v intervalu tří měsíců

Z grafu (Obrázek 10) můžeme vyčíst, že antioxidační účinek liposomů z lipidických extraktů klesal v pořadí hřebíček, poté česnek, zázvor, skořice a nakonec lichořeřišnice. Po třech měsících lze pozorovat pouze minimální snížení antioxidační aktivity. Nejvíce stabilní se jeví liposomy s lipidickým extraktem hřebíčku a lichořeřišnice, jelikož se i po třech měsících jejich antioxidační účinek výrazně neliší od hodnoty detekované ihned po jejich přípravě. Pro přehlednost jsou souhrnné výsledky změn antioxidační aktivity u všech připravených liposomů po jejich tří měsíčním skladování zobrazeny v následující tabulce (Tabulka 12 Procenta původních hodnot antioxidačního účinku liposomů po třech měsících), výsledky jsou vyjádřeny v procentech původní antioxidační aktivity.

Tabulka 12 Procenta původních hodnot antioxidačního účinku liposomů po třech měsících

Procenta původních hodnot antioxidačního účinku liposomů po třech měsících			
liposomy	vodné	ethanolové	lipidické
název	%		
hřebíček	53	87	98
skořice – mletá	90	98	75
česnek – sušený	33	37	69
zázvor – sušený	45	52	81
ličořeřišnice - semeno	69	84	97
kurkumin - standard	80	78	–

5.6 Měření velikosti liposomů

Dle odstavce 4.8.3 byla stanovena velikost všech druhů liposomů obsahujících různé extrakty a také polydisperzní index (PdI). Naše očekávaná velikost částic použitelná v kosmetice byla v rozmezí 100 až 1 000 nm. Hodnoty velikostí (Tabulka 13 a Tabulka 15) a hodnoty polydisperzních indexů (Tabulka 14 a Tabulka 15) můžeme vidět v tabulkách. Pro názornost je výsledek měření distribuce velikosti u jednoho vzorku zobrazen i v grafu (Obrázek 11).

Tabulka 13 Naměřené hodnoty velikosti liposomů obsahujících různé extrakty

druh extraktu	vodný	40% ethanolový	lipidický
název	velikost[nm]		
hřebíček	281,57 ± 8,05	336,80 ± 16,91	226,83 ± 3,89
skořice – mletá	489,40 ± 33,65	270,33 ± 3,56	209,43 ± 5,09
česnek – sušený	202,67 ± 0,68	172,27 ± 4,06	255,80 ± 1,06
zázvor – sušený	158,00 ± 2,51	177,03 ± 4,83	264,80 ± 2,65
ličořeřišnice – semeno	340,77 ± 28,33	330,87 ± 11,66	222,43 ± 3,36
kurkumin – standard	193,40 ± 8,78	581,87 ± 13,03	–

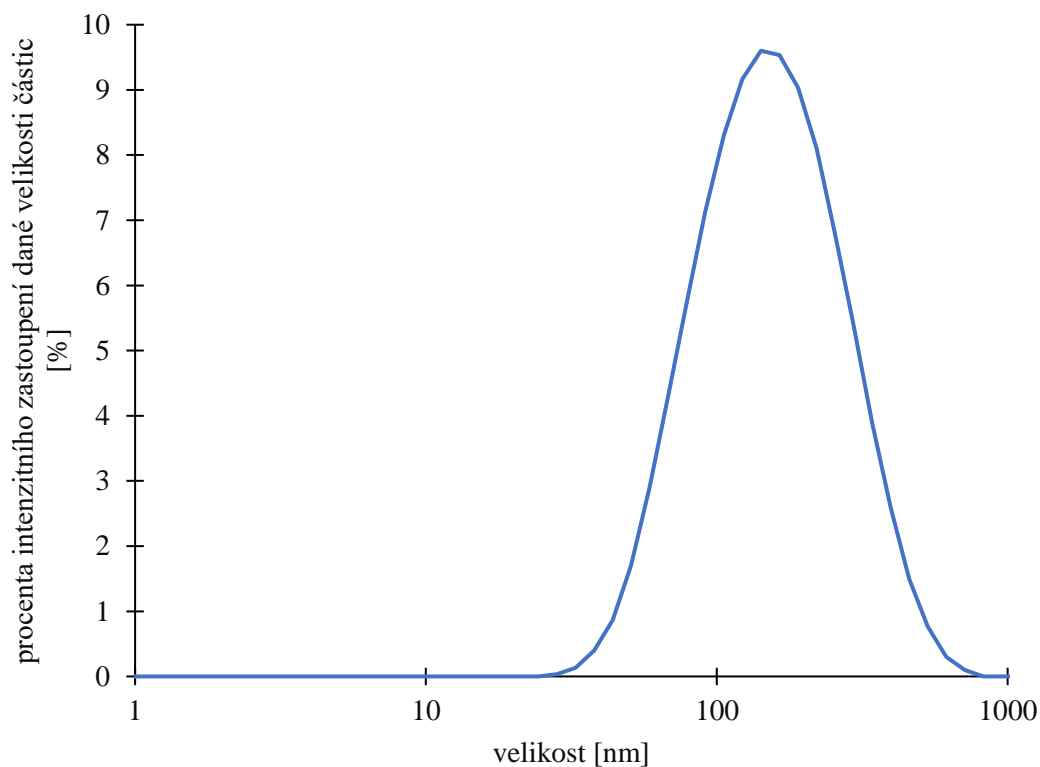
Tabulka 14 Naměřené hodnoty polydisperzních indexů liposomů

druh extraktu	vodný	40% ethanolový	lipidický
název	PdI [-]		
hřebíček	0,30 ± 0,04	0,43 ± 0,03	0,20 ± 0,02
skořice – mletá	0,48 ± 0,02	0,48 ± 0,02	0,20 ± 0,00
česnek – sušený	0,36 ± 0,01	0,25 ± 0,00	0,25 ± 0,02
zázvor – sušený	0,25 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,21 ± 0,01
ličořeřišnice – semeno	0,35 ± 0,00	0,35 ± 0,00	0,16 ± 0,02
kurkumin – standard	0,35 ± 0,02	0,85 ± 0,12	–

Tabulka 15 Velikosti liposomů s 96% ethanolovým extraktem standardu kurkuminu a distribuční koeficient této velikosti

druh extraktu	96% ethanolový	
	velikost [nm]	PdI [-]
kurkumin - standard	384,90 ± 10,59	0,43 ± 0,00

Velikost liposomů je v požadovaném rozmezí, tudíž jsou vhodné pro další použití a dokládá to i PdI, který je u všech vzorků až na liposomy s 40% ethanolovým extraktem pod hodnotou 0,4, značící vyšší polydisperzitu částic. Z dosažených výsledků můžeme dále říci, že velikost liposomů může záviset i na množství antioxidantů, které obsahují. Například u vzorku kurkuminu můžeme pozorovat velké rozdíly ve velikosti liposomů s vodným extraktem a ethanolovými extrakty, kde výrazně menší byly liposomové částice s vodným extraktem, tyto liposomy zároveň vykazovaly výrazně nižší antioxidační aktivitu ve srovnání s liposomy s ethanolovým extraktem. Celkově nejmenší velikost měly liposomy s extrakty zázvoru a česneku. U hodnot indexů polydisperzity lze říci, že pokud se hodnota blíží nule, jedná se o monodisperzní systém, tedy o systém s uniformními částicemi. Liposomy s lipidickými extrakty mají nejnižší polydisperzní index, tudíž jsou nejvíce uniformní ze všech částic. Nejhůře s hodnotami polydisperzního indexu jsou na tom liposomy s 96% ethanolových extraktem standardu kurkuminu, kdy se jedná spíše o polydisperzní systém částic. Můžeme říci, že liposomy s ethanolovými extrakty z kurkuminu nejsou vhodné pro další použití v kosmetice. Naopak liposomy s lipickými extrakty se zdají být nejvhodnějšími.



Obrázek 11 Graf intenzitní distribuce velikosti částic z měření liposomů s vodným extraktem zázvoru

5.7 Měření stability a dlouhodobé stability pomocí měření Zeta potenciálu

Stabilita liposomů byla měřena nejen dle změny antioxidačního účinku, ale také dle Zeta potenciálu neboli elektrokinetického potenciálu, což je jedna z hlavních sil, která zprostředkovává mezičásticové interakce. Pokud má systém dostatečně kladný anebo záporný zeta potenciál je pak elektrostaticky stabilní. Částice mající dostatečně velký náboj, proto se nemohou k sobě přiblížit a agregovat. Za stabilní považujeme částice s hodnotou Zeta potenciálu mimo rozsah od (-25 mV do 25 mV). Naměřené hodnoty Zeta potenciálů i s odchylkami můžeme vidět v následujících tabulkách (Tabulka 16, Tabulka 17). Všechny liposomy lze z měření, které proběhlo ihned po jejich přípravě, považovat za stabilní. Nejméně stabilní byly liposomy s vodným extraktem standardu kurkuminu.

Tabulka 16 Hodnoty Zeta potenciálu jednotlivých druhů liposomů ihned po přípravě

druh extraktu	vodný	40% ethanolový	lipidický
název	zeta potenciál [mV]		
hřebíček	$-38,00 \pm 1,05$	$-33,50 \pm 2,22$	$-30,93 \pm 0,62$
skořice – mletá	$-37,40 \pm 1,85$	$-30,07 \pm 0,66$	$-31,07 \pm 0,63$
česnek – sušený	$-35,53 \pm 0,05$	$-32,80 \pm 3,45$	$-33,20 \pm 0,51$
zázvor – sušený	$-37,10 \pm 0,99$	$-35,30 \pm 1,35$	$-36,37 \pm 0,37$
ličořeřišnice – semeno	$-35,77 \pm 2,43$	$-37,37 \pm 1,17$	$-30,70 \pm 0,64$
kurkumin – standard	$-29,70 \pm 1,45$	$-33,60 \pm 1,50$	–

Tabulka 17 Hodnota Zeta potenciál liposomů s 96% ethanolovým extraktem standardu kurkuminu

druh extraktu	96% ethanolový
název	zeta potenciál [mV]
kurkumin - standard	$-31,00 \pm 0,67$

Naopak celkově nejstabilnější byly částice s vodným extraktem hřebíčku. Nejstabilnějšími liposomy s ethanolovým extraktem byly částice s extraktem lichořeřišnice a nejméně stabilní s extraktem skořice. U lipidických extraktů byl vyhodnocen jako nejstabilnější vzorek s extraktem zázvoru a nejméně stabilní vzorek obsahující extrakt lichořeřišnice.

Tabulka 18 Hodnoty Zeta potenciálu jednotlivých druhů liposomů po třech měsících

druh extraktu	vodný	40% ethanolový	lipidický
název	zeta potenciál [mV]		
hřebíček	$-40,33 \pm 1,03$	$-42,90 \pm 4,92$	$-38,30 \pm 0,14$
skořice - mletá	$-38,53 \pm 1,32$	$-31,40 \pm 0,36$	$-41,13 \pm 1,28$
česnek - sušený	$-29,23 \pm 0,68$	$-34,77 \pm 0,82$	$-33,57 \pm 0,53$
zázvor - sušený	$-37,57 \pm 0,31$	$-39,50 \pm 1,35$	$-33,87 \pm 1,51$
ličořeřišnice - semeno	$-32,77 \pm 0,54$	$-34,07 \pm 0,52$	$-40,33 \pm 1,48$
kurkumin - standard	$-28,93 \pm 0,47$	$-37,87 \pm 1,28$	–

Tabulka 19 Zeta potenciál liposomů s 96% ethanolovým extraktem kurkuminu po 3 měsících

druh extraktu	96% ethanolový
název	zeta potenciál [mV]
kurkumin – standard	$-32,00 \pm 1,42$

Z hlediska dlouhodobé stability lze všechny naměřené hodnoty Zeta potenciálu po třech měsících skladování liposomů ve vodném prostředí prohlásit za velmi dobré a liposomy jsou tak stabilní. Nejstabilnější byl vzorek liposomů s ethanolovým extraktem z hřebíčku.

5.8 Testování antimykotického účinku

Dle odstavce 4.10.2 bylo provedeno testování antimykotické aktivity na kvasince *C. glabrata*.

Antimykotický účinek

- do 20 % je označen symbolem +
- 20 % - 40 % symboly ++
- 40 % - 60 % symboly +++
- 60 % - 80 % ++++
- v případě 100 % účinku +++++
- pro žádný antimykotický účinek byl použit znak –

5.8.1 Testování antimykotické aktivity extraktů

V následující tabulce (Tabulka 20) lze vyčíst, že vodný extrakt zázvoru, lichořeřišnice a kurkuminu neprokázal žádný antimykotický účinek. Žádný z vodných extraktů neměl 100% antimykotický účinek. Nejlépe z vodných extraktů působil extrakt z hřebíčku.

Tabulka 20 Antimykotický účinek vodných extraktů

název	vodné extrakty
hřebíček	+++
skořice – mletá	++
česnek – sušený	+
zázvor – sušený	–
ličořeřišnice – semeno	–
kurkumin – standard	–

V následující tabulce (Tabulka 21) lze vyčíst, že ethanolový extrakt hřebíčku a skořice prokázal 100% antimykotický účinek. Účinný byl také extrakt zázvoru i lichořeřišnice. Naopak 40% ethanolový extrakt kurkuminu neprokázal žádný antimykotický účinek.

Tabulka 21 Antimykotický účinek 40% ethanolových extraktů

název	ethanolové extrakty
hřebíček	+ + + + +
skořice – mletá	+ + + + +
česnek – sušený	+
zázvor – sušený	+ + +
ličořeřišnice – semeno	+ +
kurkumin – standard	–

V tabulce (Tabulka 22) vidíme, že lipidické extrakty jsou ze všech druhů připravených extraktů nejúčinnější a až na lichořeřišnici, která má také skvělý inhibiční účinek na růst kvasinky, vykazují 100% antimykotickou aktivitu.

Tabulka 22 Antimykotický účinek lipidických extraktů

název	lipidické extrakty
hřebíček	+ + + + +
skořice – mletá	+ + + + +
česnek – sušený	+ + + + +
zázvor – sušený	+ + + + +
ličořeřišnice – semeno	+ + + +

Vodný a 40% ethanolový extrakt ze vzorku kurkuminu neměl žádnou antimykotickou aktivitu, pouze u 96% ethanolového extraktu byl antimykotický účinek detekován, přesněji 40 – 60 %.

Tabulka 23 Antimykotický účinek 96% ethanolového extraktu kurkuminu

název	96% ethanolový extrakt
kurkumin – standard	+ + +

5.8.2 Testování antimykotického účinku liposomů

Z liposomů obsahujících vodné extrakty vykazovaly slabý antimykotický účinek pouze liposomy s vodným extraktem hřebíčku a kurkuminu (viz Tabulka 24).

Tabulka 24 Antimykotický účinek liposomů s vodnými extrakty

název	liposomy s vodnými extrakty
hřebíček	–
skořice - mletá	–
česnek - sušený	+
zázvor - sušený	–
ličořeřišnice - semeno	–
kurkumin - standard	+

Z liposomů s ethanolovými extrakty vykazovaly slabý antimykotický účinek do 20 % všechny druhy liposomů až na liposomy s ethanolovým extraktem z lichořeřišnice (viz Tabulka 25).

Tabulka 25 Antimykotický účinek liposomů s ethanolovými extrakty

název	liposomy s ethanolovými extrakty
hřebíček	+
skořice - mletá	+
česnek - sušený	+
zázvor - sušený	+
ličořeřišnice - semeno	–
kurkumin - standard	+

Také všechny liposomy s lipidickými extrakty vykazovaly antimykotický účinek, liposomy s lipidickým extraktem skořice pak vykazovaly ze všech těchto liposomů nejvyšší antimykotický účinek (viz Tabulka 26).

Tabulka 26 Antimykotický účinek liposomů s lipidickými extrakty

název	liposomy s lipidickými extrakty
hřebíček	+
skořice - mletá	++
česnek - sušený	+
zázvor - sušený	+
ličořeřišnice - semeno	+

Liposomy s 96% ethanolovým extraktem také vykazovaly mírný antimykotický účinek (viz Tabulka 27).

Tabulka 27 Antimykotický účinek liposomů s 96% ethanolovým extraktem kurkuminu

název	liposomy s 96% ethanolovým extraktem
kurkumin - standard	+

Liposomy vykazují ve srovnání s extrakty pouze nízký antimykotický účinek díky tomu, že při přípravě je extrakt naředěn velkým množstvím vody (ředění 1:9).

5.8.3 Antimykotický účinek prázdných liposomů a liposomů s klotrimazolem

Prázdné liposomy nevykazovaly žádný antimykotický účinek. Liposomy s klotrimazolem vykazovaly mírný antimykotický účinek do 20 % (viz Tabulka 28).

Tabulka 28 Antimykotický účinek liposomů

název	antimykotický účinek
prázdné liposomy	–
liposomy s clotrimazolem	+

5.8.4 Antimykotický účinek léčiva Klotrimazol

V následující tabulce (Tabulka 29) můžeme pozorovat antimykotický účinek léčiva klotrimazolu v několika koncentracích.

Tabulka 29 Antimykotický účinek klotrimazolu v jeho různých koncentracích

koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]	antimykotická aktivita vůči blanku
14 500,00	+++++
1 450,00	+++++
145,00	+++++
14,50	+
1,45	–

Základní testovanou koncentrací byla koncentrace 14 500 $\mu\text{g/ml}$. I při zředění 100krát můžeme pozorovat 100% inhibiční účinek. Při zředění 10 000krát již nemá klotrimazol žádný inhibiční účinek na růst kvasinky. Pro srovnání běžná antimykotická mast obsahuje 10 mg klotrimazolu na gram masti.

5.8.5 Antimykotický účinek kombinace liposomů s komerčním léčivem a přírodním lipidickým extraktem

Kombinovat komerční léčiva s přírodními není snadné. Nelze totiž přesně určit a odhadnout, jak budou spolu uměle připravené a přírodní látky interagovat v lidském těle. Pro zajímavost byly přesto otestovány tyto kombinace liposomů (viz Tabulka 30). Koncentrace klotrimazolu byla 1 mg na mililitr liposomů.

Tabulka 30 Antimykotický účinek kombinací liposomů s clotrimazolem a přírodními extrakty

název	kombinace liposomů s clotrimazolem
hřebíček	+
skořice - mletá	+
česnek - sušený	-
zázvor - sušený	-
ličořeřišnice - semeno	+
kurkumin - standard	-

Díky těmto výsledkům lze předpokládat, že liposomy spolu opravdu interagují. Slabý antimykotický účinek lze pozorovat pouze u hřebíčku, skořice a lichořeřišnice.

5.8.6 Antimykotický účinek kombinací liposomů s lipidickými extrakty

Jednotlivé přírodní látky v různých kombinacích spolu mohou také interagovat. Účinky těchto kombinací extraktů vykazují synergický efekt nebo naopak antagonistický, proto byly otestovány některé kombinace extraktů. Všechny výsledky jsou shrnuty v následující tabulce (viz Tabulka 31).

Tabulka 31 Antimykotický účinek kombinací jednotlivých extraktů

název	kombinace extraktů
zázvor – česnek	+++++
skořice - hřebíček	+++++
ličořeřišnice - kurkumin	++
zázvor - lichořeřišnice	+++++
skořice - zázvor	+++++

Skoro všechny otestované kombinace až na kombinaci lichořeřišnice – kurkumin vykazovaly 100% inhibici růstu kvasinky. Rozhodně tedy všechny kombinace vykazují synergistický efekt.

5.9 Konečné testování připravených gelů a čípků

Ze všech předchozích výsledků byly jako nejvhodnější pro přípravu konečných produktů z hlediska síly jejich antimykotického účinku vybrány lipidické extrakty a liposomy s lipidickými extrakty skořice, zázvoru a lichořeřišnice. Byl otestován nejen antimykotický účinek vyrobených produktů ale také jejich antioxidační aktivita (4.9.4).

V tabulce níže (viz Tabulka 32) vidíme, že antioxidační aktivita čípků byla mnohem vyšší než u gelů. To bylo ale především způsobeno tím, že v případě gelů byly použity pouze liposomy, na rozdíl od čípků, ve kterých byly použity i extrakty. Přesto i jednotlivé gely vykazovaly určitou antioxidační aktivitu, což je pro nás velmi potěšující.

Tabulka 32 Antioxidační aktivita připravených gelů a čípků

testovaný přípravek	antioxidační aktivita [mg/g přípravku]
gel č.1	0,42 ± 0,00
gel č.2	0,60 ± 0,00
čípky A	4,62 ± 0,01
čípky B	4,82 ± 0,03

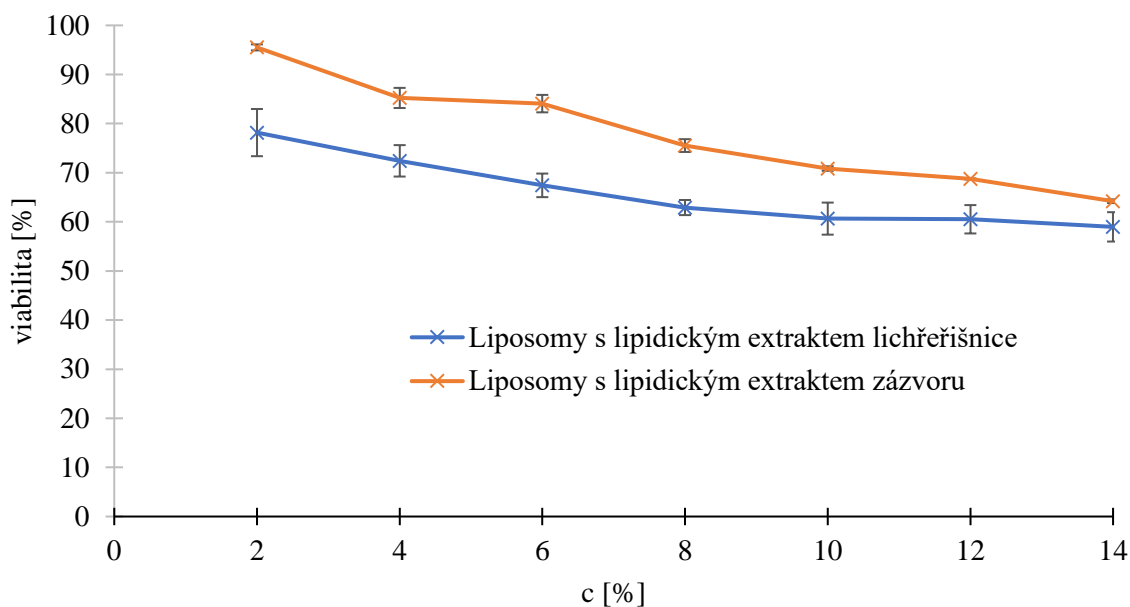
V tabulce (Tabulka 33) vidíme jednotlivé produkty a jejich inhibiční účinek na růst kvasinky. Přestože gely obsahovaly pouze liposomy, jejich částečný antimykotický účinek byl potvrzen. U čípků s vyššími dávkami extraktů byl antimykotický účinek ve srovnání s ostatními produkty nejvýraznější. Pokud by se optimalizovalo dávkování a příprava produktů, mohly by tyto gely a čípky sloužit jako lokální antimykotikum s účinkem srovnatelným s komerčními léčivy, ale v přirozenější alternativě pro lidský organismus.

Tabulka 33 Antimykotický účinek gelů a čípků

název	inhibice
gel	+
gel č.1	+
gel č.2	+
čípky A	++

5.10 MTT test cytotoxicity

Testování cytotoxicity liposomů s lipidickým extraktem zázvoru a lichořeřišnice (4.12) bylo provedeno na immortalizovaných kožních buňkách linie HaCaT. Výsledky jsou uvedeny v následujícím grafu (Obrázek 12).



Obrázek 12 Graf závislosti viability na koncentraci roztoku liposomů

Za hraniční hodnotu viability buněk, kdy testovaný vzorek není cytotoxický, se považuje hodnota LC50. Z dosažených výsledků lze tak konstatovat, že žádný ze vzorků ve všech testovaných koncentracích není cytotoxický.

6 Závěr

Tato bakalářská práce byla zaměřena na testování antimykotického účinku různých přírodních extraktů a liposomů s jejich obsahem s cílem navrhnout, připravit a charakterizovat produkty s obsahem těchto přírodních antimykotických složek. Pro přípravu extraktů byly v této práci použity různé přírodní zdroje aktivních látek a to hřebíček, skořice, zázvor, lichořeřišnice, česnek a standard kurkuminu.

Ze všech těchto přírodních látek byly připraveny vodné, ethanolové (40% ethanol) a lipidické extrakty. U všech extraktů bylo sledováno množství aktivních látek jako množství polyfenolů, flavonoidů a celková antioxidační aktivita vztažená na ekvivalentní množství Troloxu. Nejvíce polyfenolů obsahovaly většinou lipidické extrakty, především pak extrakty hřebíčku (301,03 mg/g) a skořice (214,79 mg/g). U stanovení flavonoidů na tom taktéž byly nejlépe extrakty skořice (50,81 mg/g) a hřebíčku (16,20 mg/g), ale při extrakci do ethanolu. V případě stanovení celkové antioxidační aktivity na tom byly nejlépe ethanolové a vodné extrakty, kde nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval ethanolový extrakt zázvoru (20,46 mg/g).

Všechny připravené extrakty byly enkapsulovány do liposomů. U všech těchto částic byla stanovena jejich velikost a koloidní stabilita. Poté byla stanovena enkapsulační účinnost a dlouhodobá stabilita. Průměrná velikost liposomů se pohybovala od 150 do 600 nm. Stabilita částic byla stanovena měřením Zeta potenciálu, kdy se hodnoty pohybovaly mimo rozmezí -30 mV a 30 mV, a proto mohly být připravené liposomy označeny za stabilní. Nejlepší enkapsulační účinnost z hlediska množství enkapsulovaných polyfenolů vykazovaly liposomy s lipidickým extraktem ze skořice (99,44 %), naopak nejhorší enkapsulační účinnost byla pozorována u liposomů s vodným extraktem kurkuminu (49,35 %).

Dlouhodobá stabilita liposomů byla testována po třech měsících skladování ve vodném prostředí při teplotě 5 °C, kdy byl měřen, jak Zeta potenciál, tak antioxidační účinek. Z výsledků lze usuzovat, že liposomy byly dostatečně stabilní, i když v některých případech (liposomy s vodným a ethanolovým extraktem česneku) jejich antioxidační účinek po třech měsících klesl. Naopak u některých liposomů nedošlo k žádné výrazné změně antioxidačního účinku (liposomy s ethanolovým extraktem skořice a liposomy s lipidickým

extraktem hřebíčku). Pokud bychom chtěli zvýšit stabilitu připravených liposomů, můžeme inkorporovat různé látky do membrány nebo skladovat liposomy v optimálnějších podmínkách, případně využít lyofilizace.

Dále byly provedeny diluční antimykotické testy připravených extraktů i liposomů, včetně jejich kombinací na kvasince *Candida glabrata*. Pro srovnání byl proveden antimykotický test i s komerčním léčivem klotrimazolem a s liposomy s jeho obsahem. Pro kontrolu byly testovány i prázdné liposomy, které jak bylo předpokládáno, nevykazovaly žádnou antimykotickou aktivitu. Z veškerých testovaných vzorků vykazovaly nejvyšší inhibiční účinek lipidické extrakty a liposomy s jejich obsahem, proto lze říci, že jsou nejvhodnější pro přípravu přírodních produktů a léčiv s antimykotickým účinkem.

Pro přípravu antimykotických produktů, přesněji čípků a gelů s antimykotickým účinkem byly vybrány lipidické extrakty a liposomy s lipidickými extrakty ze skořice, zázvoru a lichořeřišnice. Byly připraveny dva druhy čípků a antimykotický gel s liposomy. Následně byla otestována antioxidační aktivita připravených produktů a také jejich antimykotický účinek. Produkty prokázaly jak antioxidační aktivitu, tak i antimykotický účinek. Závěrečné testování vybraných vzorků liposomů s lipidickými extrakty na linii lidských buněk HaCaT prokázalo, že vzorky nemají v použitých koncentracích cytotoxický účinek a jsou tedy vhodné pro topické aplikace.

7 Zdroje

- [1] SVOBODOVÁ, Lucie a Petr HAMAL, 2012. Mykózy a antimykotika. *Interní medicína* [online]. 2012(6), 152-157 [cit. 2019-01-22]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2011/11/07.pdf>
- [2] DIAMANTOVÁ, Dominika. Léčba mykóz. *Interní Medicína*, 2003/12/31 2003, vol. 5, no. 10, p. 8-10. [cit. 2019-01-22]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2003/10/14.pdf>
- [3] SKOŘEPOVÁ, D.M.M. Mykózy u dětí, diagnostika a léčba. *Pediatric pro praxi*, 2013/07/15 2013, vol. 14, no. 3, p. 170-172. [cit. 2019-01-20]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2013/03/06.pdf>
- [4] PETERS, Brian M., Junko YANO, Mairi C. NOVERR, Paul L. FIDEL a Kasturi HALDAR, 2014. Candida Vaginitis: When Opportunism Knocks, the Host Responds. *PLoS Pathogens* [online]. 10(4) [cit. 2019-01-25]. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003965. ISSN 1553-7374. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003965>
- [5] BROWN, Gordon D., Graeme MEINTJES, Jay K. KOLLS, Clive GRAY a William HORSNELL, 2014. AIDS-related mycoses: the way forward. *Trends in Microbiology* [online]. 22(3), 107-109 [cit. 2019-01-25]. DOI: 10.1016/j.tim.2013.12.008. ISSN 0966842X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X13002709>
- [6] SIPSAS, Nikolaos V. a Dimitrios P. KONTOYIANNIS, 2012. Invasive fungal infections in patients with cancer in the Intensive Care Unit. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 39(6), 464-471 [cit. 2019-01-25]. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.11.017. ISSN 09248579. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857912000064>
- [7] NATESAN, Suganthini Krishnan, 2016. Emerging Fungal Infections in Cancer Patients- A Brief Overview. *Medical Mycology: Open Access* [online]. 2(3) [cit. 2019-01-25]. DOI: 10.21767/2471-8521.100016. ISSN 24718521. Dostupné z: <http://mycology.imedpub.com/emerging-fungal-infections-in-cancer-patients-a-brief-overview.php?aid=11075>
- [8] HAMPL, František, Stanislav RÁDL a Jaroslav PALEČEK, 2007. *Farmakochemie*. 2., rozš. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 978-80-7080-639-5.
- [9] ESPINEL-INGROFF, A., 2009. Antifungal Agents. *Encyclopedia of Microbiology* [online]. Elsevier, 2009, 2014, 205-222 [cit. 2019-01-25]. DOI:

10.1016/B978-012373944-5.00331-X. ISBN 9780123739445. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012373944500331X>

[10] SMITH, Edgar B., 1990. History of antifungals. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. 23(4), 776-778 [cit. 2019-01-25]. DOI: 10.1016/0190-9622(90)70286-Q. ISSN 01909622. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/019096229070286Q>

[11] HORÁK, P.P. Terapeutické využití specifických antimykotik. *Pediatr. praxi*, 2011/09/02 2011, vol. 12, no. 4, p. 242-246.

[12] ROZSYPAL, H. Systémová antimykotika. *Solen*, 2008/04/01 2008, vol. 22, no. 1, p. 40-44.

[13] NETT, Jeniel E. a David R. ANDES, 2016. Antifungal Agents. *Infectious Disease Clinics of North America* [online]. 30(1), 51-83 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.1016/j.idc.2015.10.012. ISSN 08915520. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552015001014>

[14] JAIN, Jithesh, et al. Antifungal activity of ginger extract on *Candida albicans*: an in-vitro study. *Journal of Dental Sciences and Research*, 2011, 2.2: 18-21.

[15] SRINIVASAN, Krishnapura, 2017. Ginger rhizomes (*Zingiber officinale*): A spice with multiple health beneficial potentials. *PharmaNutrition* [online]. 5(1), 18-28 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.1016/j.phanu.2017.01.001. ISSN 22134344. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213434416300676>

[16] TŮMOVÁ, D.P.L. Zázvor - využití v terapii a jeho možné interakce s ostatními léčivy. *Solen*, 2009/12/01 2009, vol. 5, no. 6, p. 296-297.

[17] KOPEC, Aneta, Ewa PIATKOWSKA, Teresa LESZCZYNSKA a Elzbieta SIKORA, 2013. Healthy Properties of Garlic. *Current Nutrition & Food Science* [online]. 9(1), 59-64 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.2174/1573401311309010010. ISSN 15734013. Dostupné z:
http://www.eurekaselect.com/106104/article?utm_source=TrendMD&utm_medium=cpc&utm_campaign=Curr_Nutr_Food_Sci_TrendMD_0

[18] BURIAN, J. P., L. V. S. SACRAMENTO a I. Z. CARLOS, 2017. Fungal infection control by garlic extracts (*Allium sativum* L.) and modulation of peritoneal macrophages activity in murine model of sporotrichosis. *Brazilian Journal of Biology* [online]. 77(4), 848-855 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.1590/1519-6984.03716. ISSN 1678-4375. Dostupné z:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842017000400848

- [19] GRUENWALD, Joerg, Janine FREDER a Nicole ARMBRUESTER, 2010. Cinnamon and Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 50(9), 822-834 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.1080/10408390902773052. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390902773052>
- [20] SHEN, Yan, Liu-Nan JIA, Natsumi HONMA, Takashi HOSONO, Toyohiko ARIGA a Taiichiro SEKI, 2012. Beneficial Effects of Cinnamon on the Metabolic Syndrome, Inflammation, and Pain, and Mechanisms Underlying These Effects – A Review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* [online]. 2(1), 27-32 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.1016/S2225-4110(16)30067-0. ISSN 22254110. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2225411016300670>
- [21] MEHDIPOUR, Masoumeh, et al. In vitro antifungal effect of cinnamon extract on candida species. 2018.
- [22] JAKUBCZYK, Karolina, et al. Garden nasturtium (*Tropaeolum majus* L.)-a source of mineral elements and bioactive compounds. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 2018, 69.2: 119-126.
- [23] AGUILAR-VILLANUEVA, Daniel Anderson et al. Efecto del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* "mastuerzo" sobre la micosis inducida por *Trichophyton mentagrophytes* en *Rattus norvegicus*. *Acta méd. Peru* [online]. 2017, vol.34, n.3 [cited 2019-01-26], pp.196-202. Available from: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172017000300006&lng=en&nrm=iso>. ISSN 1728-5917.
- [24] PINTO, E., L. VALE-SILVA, C. CAVALEIRO a L. SALGUEIRO, 2009. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 58(11), 1454-1462 [cit. 2019-01-27]. DOI: 10.1099/jmm.0.010538-0. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.010538-0>
- [25] CORTÉS-ROJAS, Diego Francisco, Claudia Regina Fernandes DE SOUZA a Wanderley Pereira OLIVEIRA, 2014. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* [online]. 4(2), 90-96 [cit. 2019-01-27]. DOI: 10.1016/S2221-1691(14)60215-X. ISSN 22211691. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2221169115301763>
- [26] FRASSOVÁ, Zuzana a Jana RUDÁ-KUČEROVÁ, 2018. Curcumine (Turmeric – *Curcuma longa*) as a Supportive Phytotherapeutic Treatment in Oncology. *Klinicka Onkologie* [online]. 31(1), 15-23 [cit. 2019-01-27]. DOI: 10.14735/amko201815. ISSN 0862495X. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/433/5288.pdf>

- [27] MARTINS, C. V. B., D. L. DA SILVA, A. T. M. NERES, et al., 2008. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 63(2), 337-339 [cit. 2019-01-27]. DOI: 10.1093/jac/dkn488. ISSN 0305-7453. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkn488>
- [28] GOWHAR, Owais, Tasneem TASNEEM, Mewara ARTI a Shah3 IMTIYAZ, 2015. Natural Herbs as Alternative to Synthetic Antifungal Drugs The Future Challenging Therapy. *BRITISH BIOMEDICAL BULLETIN* [online]. 3(4), 440-452 [cit. 2019-01-28]. Dostupné z: <http://www.imedpub.com/articles/natural-herbs-as-alternative-to-synthetic-antifungal-drugs-the-future-challenging-therapy.pdf>
- [29] DARAEE, Hadis, Ali ETEMADI, Mohammad KOUHI, Samira ALIMIRZALU a Abolfazl AKBARZADEH, 2014. Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* [online]. 44(1), 381-391 [cit. 2019-02-13]. DOI: 10.3109/21691401.2014.953633. ISSN 2169-1401. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/21691401.2014.953633>
- [30] DE LEEUW, J, HC DE VIJLDER, P BJERRING a HAM NEUMANN, 2009. Liposomes in dermatology today. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* [online]. 23(5), 505-516 [cit. 2019-02-13]. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2009.03100.x. ISSN 09269959. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1468-3083.2009.03100.x>

8 Seznam použitých zkratek

HIV	Human Immunodeficiency Virus
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
RNA	ribonucleic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
DLS	dynamic light scattering
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
HaCaT	spontaneously immortalized human keratinocyte line
PBS	Phosphate Buffered Salin
RCF	Relative Centrifugal Force
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
LD50	označení pro dávku látky podané testovaným buňkám, která způsobí úhyn 50 % testovaných buněk do 24 hodin