VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

# BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2016 Bc. Kamila Tilšarová

# 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 TESTŮ GENOTOXICITY K CHARAKTERIZACI VYBRANÝCH PŘÍRODNÍCH LÁTEK A ČÁSTIC.

USE OF GENOTOXICITY TESTS TO CHARACTERIZATION OF SOME NATURAL SUBSTANCES AND PARTICLES

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**
BACHELOR'S THESIS


**AUTOR PRÁCE** — **Bc. Kamila Tilšarová**
AUTHOR

**VEDOUCÍ PRÁCE** — **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**
SUPERVISOR



**BRNO 2016**

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

# Zadání bakalářské práce

| | | | |
|---|---|---|---|
| Číslo bakalářské práce: | **FCH-BAK1056/2015** | Akademický rok: | **2015/2016** |
| Ústav: | Ústav fyzikální a spotřební chemie | | |
| Student(ka): | **Bc. Kamila Tilšarová** | | |
| Studijní program: | Chemie a chemické technologie (B2801) | | |
| Studijní obor: | Chemie pro medicínské aplikace (2808R031) | | |
| Vedoucí práce | **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.** | | |
| Konzultanti: | Ing. Petra Matoušková, Ph.D. | | |

## Název bakalářské práce:

Využití testů genotoxicity k charakterizaci vybraných přírodních látek a částic.

## Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:
- přehledná rešerše zaměřená zejména na testy genotoxicity, antimutagenity a antioxidační aktivity
- zavedení testů genotoxicity
- příprava a charakterizace vybraných rostlinných extraktů
- enkapsulace aktivních látek do liposomů
- analýza genotoxicity volných a enkapsulovaných přírodních extraktů.

## 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.

| | | |
|---|---|---|
| Bc. Kamila Tilšarová<br>Student(ka) | prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.<br>Vedoucí práce | prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.<br>Ředitel ústavu |

V Brně, dne 31.1.2016

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

**Abstrakt:**

Při výrobě léčiv, kosmetických výrobků, v potravinářství i jiných biotechnologiích patří testování genotoxicity (neboli změny v genetické informaci, které se nedědí) k běžným krokům procesu před uvedením daného produktu na trh.

Tato bakalářská práce je zaměřena na charakterizaci extraktů z vybraných přírodních látek z hlediska obsahu polyfenolů, flavonoidů a antioxidační aktivity. Dále byly tyto extrakty enkapsulovány do lipozomů a chitosanových částic a cílem bylo jak samotné extrakty, tak částice testovat na možnou genotoxicitu, a to na základě SOS Chromotestu probíhajícího na bakterii *E. coli*.

Provedený genotoxický test neodhalil genotoxické účinky u žádného z čistých extraktů ani testovaných lipozomů.

**Abstract:**

In production of drugs, cosmetics, in food industry and other biotechnologies, testing of genotoxicity (that are changes in genetic information which are not inhereted) is one of the common steps in the process before distribution to the market.

This bachelor´s thesis is focused on the characterization of extracts from chosen natural substances with respect to the content of polyfenols, flavonoides and antioxidant activity. These extracts were encapsulated into liposomes and chitosan particles. The aim was testing possible genotoxicity of whole extracts and particles on possible genotoxicity on the basis of SOS Chromotest performed on bacteria *E. coli*.

This genotoxic assay did not show genotoxic effect of neither pure extracts nor tested liposomes.

**Klíčová slova:** genotoxicita, Escherichia coli, SOS Chromotest, lipozomy

**Key words:** genotoxicity, Escherichia coli, SOS Chromotest, liposomes

TILŠAROVÁ, K. *Využití testů genotoxicity k charakterizaci vybraných přírodních látek a částic.*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 44 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**

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí mé práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. a konzultantkám Ing. Petře Matouškové, Ph.D. a Ing. Jitce Bokrové za vedení, vstřícnost, ochotu a trpělivost při zpracování experimentální části.

# OBSAH

1 Úvod ..... 7
2 Teoretická část ..... 8
2.1 Toxicita a toxické účinky látek ..... 8
2.2 Vybrané přírodní látky ..... 10
2.3 Vybrané typy organických částic ..... 12
2.3.1 Lipozomy ..... 12
2.3.2 Chitosanové částice ..... 12
2.4 Testy genotoxicity ..... 13
2.4.1 Escherichia coli ..... 13
2.4.2 SOS Chromotest ..... 14
3 Cíl práce ..... 15
4 Experimentální část ..... 16
4.1 Použité chemikálie ..... 16
4.2 Použité přístroje a pomůcky ..... 16
4.3 Příprava a charakterizace přírodních látek ..... 17
4.3.1 Stanovení celkových polyfenolů ..... 17
4.3.2 Stanovení celkových flavonoidů ..... 17
4.3.3 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS ..... 17
4.4 Příprava lipozomů ..... 18
4.4.1 Stanovení enkapsulační účinnosti ..... 18
4.4.2 Stanovení dlouhodobé stability ..... 18
4.4.3 Stanovení koncentrace fosfolipidů pomocí Stewartova testu ..... 18
4.4.4 Stanovení velikosti a stability pomocí DLS a zeta potenciálu ..... 19
4.5 Příprava chitosanových částic ..... 19
4.6 SOS Chromotest ..... 19
4.6.1 Příprava vzorků ..... 19
4.6.2 Provedení testu ..... 20
5 Výsledky ..... 21
5.1 Stanovení celkových polyfenolů ..... 21
5.2 Stanovení celkových flavonoidů ..... 22
5.3 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS ..... 24
5.4 Lipozomy ..... 25
5.4.1 Stanovení enkapsulační účinnosti ..... 25
5.4.2 Stanovení dlouhodobé stability ..... 26
5.4.3 Stanovení koncentrace fosfolipidů pomocí Stewartova testu ..... 27

5.4.4 Stanovení velikosti a stability pomocí DLS a zeta potenciálu ..... 28
5.5 Chitosanové částice ..... 30
5.6 SOS Chromotest ..... 32
6 Závěr ..... 39
7 Seznam použité literatury ..... 41

# 1 Úvod

Testování genetické toxicity a mutagenity patří dnes mezi jednotlivé kroky vývoje, produkce a registrace nových produktů ať již v kosmetice, farmacii nebo třeba potravinářství či jiných biotechnologiích. Velmi se dnes také řeší otázka environmentálních dopadů nejrůznějších látek a zároveň to, jak jejich vlivy co nejrychleji testovat. Samotná chemická analýza totiž nestačí k testování genotoxicity a interakcí s biologickými senzory [1].

Toxikologie jako taková má kořeny už v 16. století (například známý alchymista a lékař Paracelsus – vlastním jménem Philippus Aureolus Theophratus Bombastus von Hohenheim), genetická toxikologie vznikla ale až v polovině minulého století, i když první zmínky o travičství a různých účincích látek se objevují už v dobách antiky [2]. Za druhé světové války v roce 1941 objevili (na výzkumu účinků nechvalně proslulého yperitu známého jako hořčičný plyn) skotská genetička a farmaceut Auerbachová a Robson, že vysoce toxické chemikálie jsou odpovědné za změny v genetické struktuře živých organismů [3]. Později byla objevena také souvislost mezi mutagenitou a karcinogenitou [4]. Jak se totiž ukázalo, mutageneze hraje důležitou roli v iniciačním procesu karcinogeneze, protože rakovinné buňky jsou tvořeny buňkami normálními nahromaděním mutací [5, 6].

Mutací přitom rozumíme genetické alternace, které jsou fixní a mohou být děděny (substituce, delece, strukturální či numerické chromozomové aberace), genotoxicitou pak alternace a změny, které nejsou fixní a nedědí se (např. poškození DNA). Genotoxicita ovšem může dospět až k mutacím během procesu buněčného dělení a může být indikátorem pro potenciální karcinogenezi spojenou s působením nějaké chemikálie [7].

Tato práce je zaměřená na sledování možných genotoxických účinků extraktů z vybraných bylin a jejich enkapsulovaných účinných látek v lipozomech a chitosanových částicích na bakterii *E. coli* pomocí SOS Chromotestu. Byliny byly vybrány takové, u kterých již byly prokázány antimikrobiální účinky v rámci předchozích prací.

# 2 Teoretická část

## 2.1 Toxicita a toxické účinky látek

Toxicitu a toxickou látku (neboli něco „škodlivého“) je nutno chápat jako termín relativní, kdy musí být vždy uvedeny konkrétní podmínky a mechanismus, kterým je škodlivý účinek vyvolán. Co je například pro člověka neškodné, může být pro jiné organismy škodlivé a naopak [2].

Toxické účinky látek na živé organismy jsou tedy takové, které negativně ovlivňují některou z podstatných vlastností života, a to:

- přenos genetické informace (dědičnost) a látková přeměna (metabolismus)
- vysoká organizovanost a stupňovité uspořádání
- termodynamická otevřenost (to znamená výměnu hmoty, energie a informací s okolím)
- schopnost samoregulace na principu zpětné vazby
- metabolismus (souhrn reakcí, které zajišťují přeměnu látek a energií), jehož důsledkem je růst
- autoreprodukce (rozmnožování)

Aby bylo možno soustavu považovat za živou, musí být splněny všechny výše uvedené charakteristiky. Napadení jedné z nich pak znamená výrazné snížení životaschopnosti, vyřazení jedné z funkcí znamená zánik života [8]. Příklady negativních vlivů na výše uvedené vlastnosti živých soustav jsou uvedeny v *Tabulce 1*.

Nositeli genetické informace jsou nukleové kyseliny a genotoxické látky mohou způsobovat jejich četné mutace, vývojové deformace nebo vývoj nádorů [8]. Mutagenní látky (mutageny) pak dělíme na chemické, fyzikální a biologické [9]. Chemické mutageny jsou chemikálie, které právě způsobují změny v genetické informaci – působí tak, že většinou alkylují dusíkaté báze v DNA. Mutace mohou být spontánní (vznikající bez známých vnějších příčin, pravděpodobně chybou při replikaci DNA), nebo indukované (vznikající v důsledku působení skrytého vlivu prostředí na DNA) [10]. Podle rozsahu změny rozdělujeme mutace dále na genové (kdy dochází ke změnám v jednotlivých genech – v malém úseku, především v pořadí bází v DNA), chromosomové (změny ve struktuře chromosomů – strukturní chromosomové aberace, týkají se delšího úseku DNA) a genomové (změny v počtu chromosomů). Uvádí se, že asi 80 % mutagenů může mít i karcinogenní účinek. Karcinogeny jsou látky způsobující interakci s DNA a takovou mutaci, která vede ke ztrátě kontroly buněčného dělení. Přitom nádorový proces může vyvolat libovolné množství karcinogenu (v

extrému i jedna molekula). Pokud látky negativně působí na plod v období gravidity a způsobují tak vrozené vady a abnormality, mluvíme o teratogenech [2].

***Tabulka 1.*** *Působení toxikantů na vlastnosti živých soustav [8]*

| | **vlastnosti živých organismů** | **příklady toxického působení** |
|---|---|---|
| 1) | přítomnost nukleových kyselin a bílkovin | Mutagenní látky narušují přenos genetické informace a v řadě případů způsobují inaktivaci bílkovinných enzymů. |
| 2) | hierarchické uspořádání | Vyřazení nižších jednotek z činnosti limituje funkčnost celého organismu. |
| 3) | výměna hmoty, energie, informací | Jedy ovlivňující dýchací řetězec v mitochondriích blokují výměnu energie. |
| 4) | schopnost samoregulace | Karcinogenní látky narušují autoregulační pochody v organismu a dochází k nekontrolovatelnému dělení buněk, neurotoxiny ovlivňují autoregulaci pomocí nervové soustavy. |
| 5) | metabolismus | Metabolické jedy – narušují určité enzymatické reakce. |
| 6) | autoreprodukce, vývoj | Teratogenní látky způsobují vývojové vady u plodu, látky s tzv. estrogenní aktivitou snižují plodnost organismu. |

Kromě látek s mutagenním účinkem jsou i látky, které mají obecně škodlivý účinek a označují se jako toxiny. Stupeň poškození buňky chemikálií je různý: cytopatický účinek je takový, při kterém dojde k zasažení pochodů v buňce, ale buňka je schopná dále přežít, cytostatický účinek způsobuje, že buňka není schopná se dělit (všechny ostatní funkce přitom zůstávají zachovány - toho se využívá zejména při léčbě nádorových onemocnění), při cytotoxickém účinku dochází k usmrcení buňky [2].

Mezi nejnebezpečnější mutageny v mikrobiologii patří ultrafialové světlo o vlnové délce 265 nm, protože DNA nejvíce absorbuje světlo právě této vlnové délky. Působí na ni tak, že tvoří kovalentní vazby mezi thyminy a vznikají tak pyrimidinové dimery. Kovalentní vazba také zabraňuje replikaci DNA, což je pro buňky letální. Mikroorganismy však obsahují ve svých buňkách opravné systémy, které se snaží tyto dimery z DNA odstranit. U bakterií a

kvasinek patří k opravným systémům fotoreparace a reparace bez účasti viditelného světla, přesto některé z nich nepracují přesně, a to právě vede k mutacím. Zjistilo se však také, že opravné systémy fungují i po působení chemických mutagenů [9].

Proto je důležité umět zejména u nově vyvíjených látek – ať už ve farmacii, kosmetice nebo potravinářství testovat a rozpoznat takovéto jejich negativní účinky. Další část práce se zaměří na vybrané přírodní látky, které se v kosmetice buď již běžně používají, nebo jsou naopak nové a je potřeba je testovat.

## 2.2 Vybrané přírodní látky

**Levandule úzkolistá** (*Lavandula angustifolia*) je stálezelený hojně větvený keř, v létě se objevují husté hrozny vonných, sytě purpurových květů. Listy jsou úzké, aromatické a stříbřitě šedé [10].

Levandule má příznivé účinky při nespavosti, neklidu, stresu, zažívacích potížích (plynatost, nauzea, zvracení nebo podrážděný žaludek), bolestech hlavy při migrénách. Pro svou vůni je také hojně využívaná v parfumérství [11].

**Jitrocel kopinatý** (*Plantago lanceolata*) je vytrvalá bylina vyrůstající z krátkého uťatého oddenku, který má bohatý kořenový systém. Listy jsou v přízemní růžici, se 3-7 žilkami. Kvete od poloviny května až do poloviny října [12].

Jitrocel má protizánětlivé, antimikrobiální a stahující účinky. Používá se také na popáleniny, při nachlazení (zejména proti kašli), poruchách trávení, problémech s játry a žlučníkem nebo zánětech močových cest [13].

**Mateřídouška úzkolistá** (*Thymus serpyllum*) je stálezelený polokeř s volnými polštáři drobných, po kmínu vonících tmavě zelených listů. Květy jsou malé, růžovofialové, v koncových květenstvích [10].

Mateřídouška je známá svými příznivými účinky na zažívací trakt, květy pak svými dezinfekčními, antioxidačními a uvolňujícími účinky. Rostlina je bohatá na taniny a fenoly. Oleje získávané destilací jsou pak využívány v kosmetice, farmacii a potravinářství [14].

**Hřebíčkovec kořenný** (*Syzygium aromaticum*) je stálezelený strom, jehož sušená poupata jsou známá jako koření s pronikavou vůní a chutí. Kromě silic obsahuje pryskyřice, flavonoidy a třísloviny. Používá se k povzbuzení trávení, proti bolestem zubů nebo pro povzbuzení srdeční činnosti. Má protizánětlivé, analgetické a dezinfekční účinky [15].

**Rozmarýn lékařský** (*Rosmarinus officinalis*) je stálezelený hustě větvený keř s úzkými a aromatickými listy. Květy jsou malé, purpurově modré až modré a objevují se od poloviny jara do začátku léta [10].

Rozmarýn obsahuje silice (cineol, verbenon, borneol a další), flavonoidy, hořčiny a další látky. Podává se při poruchách trávení, snižuje pocit únavy, uklidňuje, zvyšuje krevní tlak, působí močopudně, protizánětlivě (zejména při zánětech močových cest) a účinné látky např. snižují bolest při revmatismu. Silice obsahují také antioxidanty [16].

**Třapatka nachová** (*Echinacea purpurea*) je vzpřímená trvalka s drsnými, kopinatými, tmavě zelenými listy a velkými jednotlivými karmínově růžovými úbory květů s vypouklými středy, které vyrůstají na silných lodyhách [10].

Echinacea je využívána v tradiční medicíně pro své protizánětlivé a antibakteriální účinky, působí také příznivě na lymfatický systém a posiluje imunitu. Používá se dále při léčbě tyfu, respiračních infekcí a jako prevence proti nezhoubnému zvětšení prostaty [17].

**Bez černý** (*Sambucus nigra*) je opadavý, nepravidelně větvený keř se silně zkorovatělými větvemi a zažloutlými listy. Plochá květenství vonných, hvězdicovitých, krémově bílých květů rozkvétají na začátku léta [10].

Černý bez je dobrý zdroj proteinů, volných a vázaných aminokyselin, nenasycených mastných kyselin, vitamínů, antioxidantů a minerálů. Dále obsahuje polyfenoly (především anthokyaniny, flavonoly, fenolové kyseliny), terpeny a lecitin (nacházející se především v semenech). Příznivě ovlivňuje průběh nemocí spojených s oxidativním stresem, snižuje krevní tlak, hladinu krevní glukózy a stimuluje imunitní systém [18].

**Šalvěj lékařská** (*Salvia officinalis*) je stálezelený nebo polostálezelený hojně větvený keř s aromatickými, šedozelenými listy s bledě zelenými a žlutými skvrnkami [10].

Šalvěj se využívá především jako čaj, který mírní kašel a pomáhá při infekcích průdušek. Má také velký potenciál při léčbě různých nemocí. Extrakty ze šalvěje mají antioxidační, antimikrobiální, protizánětlivé a antidiabetické účinky [19].

**Zázvor lékařský** (*Zingiber officinale*) je známý svou ostrou chutí (která je zapříčiněná především látkou gingerolem). Má příznivé účinky proti nevolnostem, žaludečním problémům a bolestem hlavy. Používá se ale také při nachlazení, proti mořské nemoci, snižuje srážlivost krve a zlepšuje její průtok (čímž působí příznivě na kardiovaskulární systém). Rovněž je známý jako koření [20].

**Skořicovník pravý** (*Cinnamomum verum*), jehož sušená kůra je používána jako koření do jídel, má také antibakteriální účinek. Obsahuje především fenolické, aldehydické a ketonové látky a je používána v tradiční čínské a indické medicíně, v potravinářství, medicíně a kosmetice [21].

Z těchto 10 bylin byly připraveny extrakty a charakterizovány z hlediska obsahových látek polyfenolů, flavonoidů a také antioxidační aktivity. Polyfenoly jsou látky klasifikovatelné na

základě počtu fenolových kruhů, které obsahují. Hlavní skupiny polyfenolů obsažených v potravinách jsou fenolové kyseliny (hydroxybenzoová a hydroxyskořicková kyselina), flavonoidy (flavonoly, flavony, isoflavony, flavonony, flavanoly a antokyanidiny), stilbeny, lignany, kumariny a taniny. Polyfenolické látky se nacházejí především v ovoci, zelenině, zeleném čaji a právě i v bylinkách a koření používaném při vaření. Jsou známé svými protizánětlivými, antioxidačními nebo neuroprotektivními účinky [22].

## 2.3 Vybrané typy organických částic

### *2.3.1 Lipozomy*

Lipozom je kulovitá jedno nebo vícelamelární částice, jejíž lamely jsou složeny z fosfolipidové dvojvrstvy. Jednotlivé molekuly dvojvrstev jsou složeny ze dvou částí – hydrofilní hlavičky a hydrofobního konce. Mají tedy amfifilní charakter a fosfolipidové lipozomy se právě díky tomu používají jako modely biologických membrán. Kromě toho mají využití také při dopravě léčiv. Podle rozpustnosti jsou molekuly léčivých látek inkorporovány do vodní nebo fosfolipidové části. Do lipozomu mohou být takto zabaleny jak hydrofilní, tak hydrofobní látky. Z praktického hlediska bývají lipozomy využívány při ochraně léčivých látek před účinky enzymů, pro usnadnění absorpce, při cílené distribuci léčiv v organismu nebo při uvolňování léčivé látky v cíleném orgánu požadovanou rychlostí.

Lipozomy se podle počtu vrstev dělí na jedno nebo mnoholamelární. Podle velikosti dále rozlišujeme malé jednolamelární (s průměrem 25-50 nm), velké jednolamelární (50-100 nm) a velké mnoholamelární (od 50 až do 10 000 nm) [23].

### *2.3.2 Chitosanové částice*

Chitosan je N-deacetylovaná forma chitinu, což je polysacharid získávaný ze schránek korýšů. Chitosan je pseudo-přírodní biopolymer s kationickým charakterem, je biokompatibilní, biodegradabilní, netoxický a má značné antimikrobiální účinky [24].

V potravinářském průmyslu se dnes značná pozornost upíná také k nanočásticím, jako možnosti jak zlepšit bioaktivní funkci jednotlivých složek potravin – a to při jejich přípravě, skladování a při průchodu zažívacím traktem. Do chitosanových částic mohou být enkapsulovány různé typy molekul, s výhodou i obsahové antioxidační látky (jako polyfenolické sloučeniny) obsažené v rostlinách [25].

## 2.4 Testy genotoxicity

Nejčastěji se k testování genotoxicity používají testy na mikroorganismech s metabolickou aktivací (ty slouží zejména k detekci genových mutací), cytogenetická analýza kostní dřeně hlodavců (k detekci chromosomových aberací) a testy na bakteriích, houbách, kvasinkách nebo hmyzu, které jsou nejrychlejší a také nejméně nákladné. U testů na zvířatech je nejčastější podání testované chemikálie orální, inhalační nebo dermální a každý test musí mít kontrolní skupinu [2].

Většina těchto testů hodnotí zlomy a poškození DNA jako jsou chromozomální aberace, mikrojádra nebo výměna sesterských chromatid [26]. Mezi mikrobiální testy patří např. Amesův test (založen na sledování zpětné mutace, v důsledku které je bakterie *Salmonella typhimurium* schopná přežít na médiu bez histidinu, který normálně syntetizovat neumí [27]), testy na kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*, k buněčným testům řadíme CAPL (cytogenetická analýza aberací chromozomů periferních lymfocytů), testy na *Euglena gracilis* a *Drosophila melanogaster*. Dále jsou to testy tvorby mikrojader, výměny sesterských chromatid, DNA adukty a tzv. kometový test. Ve své bakalářské práci ale budu provádět SOS chromotest na bakterii *E. coli*.

### *2.4.1 Escherichia coli*

Tato bakterie patří mezi čeleď Enterobacteriaceae, která zahrnuje gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky. Tyto druhy mají velký význam z hygienického hlediska, protože např. právě *E. coli* se nachází ve spodní části střev živočichů včetně člověka, bývá z nich také vylučována a může tak být velmi dobrým ukazatelem znečištění fekáliemi. *E. coli* patří mezi nejprozkoumanější mikrobiální druh, a proto velmi často slouží jako modelový organismus pro genetické, fyziologické a biochemické studie. Je také prvním druhem, u kterého byla prozkoumána konjugace buněk a výměna genetického materiálu. *E. coli* zkvašuje cukry (zejména laktózu) za intenzivní tvorby kyselin (mléčné, pyrohroznové, octové a mravenčí – část kyseliny mravenčí se přitom rozkládá na $CO_2$ a vodík) a plynu [28].

Strukturní geny všech enzymů určitého metabolického řetězce jsou umístěny vedle sebe a na chromozomu tvoří tzv. operon. Nejvíce byl prozkoumán *lac* operon právě u bakterie *E. coli*, to znamená ten úsek jejího chromozomu, který zajišťuje indukované využívání laktózy (laktóza je tak induktorem). Tento operon obsahuje 3 strukturní geny: pro enzym β-galaktosidázu štěpicí uvnitř buňky laktózu na monosacharidy glukózu a galaktózu, pro permeázu přenášející laktózu přes cytoplazmatickou membránu a pro enzym transacetylázu, jehož funkce není dosud známa. Těmto strukturním genům ještě předchází úsek zvaný

operátor a promotor, na kterém transkripce operonu začíná. Na opačném konci je terminátor, kde jeho transkripce končí [28].

### *2.4.2 SOS Chromotest*

SOS Chromotest patří mezi mikrobiální testy a probíhá na výše popsané bakterii *E. coli*, nejčastěji je využíván kmen K12 nebo PQ37. Bakterie patří mezi nejjednodušší buňky obsahující DNA a navíc mají velmi komplikovaný systém, pomocí kterého reagují na činidla poškozující DNA. U *E. coli* je tento systém známý jako SOS reparační odpověď. Strukturní gen *lacZ* (pro produkci enzymu β-galaktosidázy) podléhá kontrole genu *sfiA* (což je SOS funkce zahrnutá v procesu inhibice buněčného dělení a aktivovaná je právě při poškození genetické informace). Gen *sfiA* podléhá dále kontrole represoru LexA a ten je v případě SOS odpovědi inaktivován aktivovaným RecA proteinem. Takto pak začne být přepisován *lacZ* gen a produkována β-galaktosidáza, která je detekována (spektrofotometricky) na základě přeměny specifického chromogenního substrátu.

Protože některé koncentrace testovaných látek už působí toxicky, bylo zavedeno jako indikátor toxického vlivu sledování enzymu alkalické fosfatázy (také spektrofotometricky), přičemž pokles její aktivity signalizuje toxicitu. Výsledkem hodnotícím genotoxický efekt je poměr aktivit těchto dvou enzymů.

Kmen *E. coli* PQ37 byl pro SOS Chromotest geneticky upraven tak, aby pouze omezená poškození nebyla opravována a zvýšila se tak citlivost testu, dále je upravena buněčná stěna tak, aby byl umožněn lepší přístup testovaného materiálu do buňky [29].

Tento test byl vyvinut v roce 1982, od té doby je používán a jeho výsledky byly prezentovány ve více než 130 publikacích [30].

Velkou výhodou je to, že tento test dovoluje detekci SOS mutageneze i po vystavení činidlu poškozujícímu DNA. Je schopný testovat genotoxicitu v různých médiích, jako voda z vodovodu nebo odpadní voda [31].

# 3 Cíl práce

Cílem této práce je charakterizace vybraných přírodních látek a testování jejich možných genotoxických nebo naopak antimutagenních účinků na bakterii *E. coli*. Testování probíhalo pomocí SOS Chromotestu.

V této práci byly plněny následující dílčí cíle:

1. Rešerše zaměřená zejména na testy genotoxicity, antimutagenity a antioxidační aktivity
2. Zavedení testů genotoxicity
3. Příprava a charakterizace vybraných rostlinných exktraktů
4. Enkapsulace aktivních látek do lipozomů a chitosanových částic
5. Analýza genotoxicity volných a enkapsulovaných přírodních extraktů

# 4 Experimentální část

## 4.1 Použité chemikálie

Folin-Ciocalteau činidlo, Serva (Německo)

Ethanol (p.a.) – Vitrum, LachNer (ČR)

Sojový lecithin, Serva (Německo)

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

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

Peroxodisíran draselný, Sigma-Aldrich (Německo)

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

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

Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (Německo)

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

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

Katechin, Sigma-Aldrich (Německo)

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

Chitosan, Sigma-Aldrich (Německo)

Tripolyfosfát, Sigma-Aldrich (Německo)

Kyselina octová (p.a.), LachNer (ČR)

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

Thiokyanát amonný (p.a.), LachNer (ČR)

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

Sephadex LH-20, Sigma-Aldrich (Německo)

Carbomer 980, Sino Lion (USA)

## 4.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy, Boeco (Německo)

Vortex, TK3S, Kartell spa (USA)

Centrifuga, Sartorius Sigma (Německo)

Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HS3200, Bandeline (Německo)

Spektrofotometr Helios γ, Unicam (VB)

ELISA reader BioTek Elx808, BioTek (Německo)

Koloidní DLS analyzátor Zetasizer ZS, Malvern (UK)

Laminární box Airstream, ESCO

Inkubátor INCU-Line, VWR (USA)

## 4.3 Příprava a charakterizace přírodních látek

Z levandule, černého bezu, rozmarýnu, mateřídoušky, echinacei, zázvoru, skořice, jitrocele, hřebíčku a šalvěje byly připraveny vodné extrakty. Navážka 0,1 g byla zalita 10 ml vroucí vody a nechána 15 minut louhovat. Extrakty byly charakterizovány z hlediska obsahu polyfenolů, flavonoidů a antioxidační aktivity pomocí ABTS.

### *4.3.1 Stanovení celkových polyfenolů*

K 50 µl každého vzorku byl přidán 1 ml Folin-Ciocalteauova činidla (zředěného destilovanou vodou v poměru 1:9) a 1 ml vody. Po promíchání na vortexu roztoky 5 minut stály při laboratorní teplotě a poté byl ke každému z nich přidán 1 ml nasyceného roztoku $Na_2CO_3$. Směs byla opět promíchána a 15 minut nechána stát při laboratorní teplotě. Po 15 minutách byla měřena absorbance při vlnové délce 750 nm.

Na kalibraci byly použity roztoky kyseliny gallové o koncentracích 0,1-0,7 mg/ml a do blanku bylo místo vzorku přidáno 50 µl vody.

### *4.3.2 Stanovení celkových flavonoidů*

Z každého vzorku bylo odebráno 0,5 ml, přidán 1,5 ml vody a 0,2 ml 5% roztoku $NaNO_2$. Po promíchání na vortexu se nechaly roztoky 5 minut stát a poté k nim bylo přidáno po 0,2 ml 10% $AlCl_3$. Znovu bylo vše promícháno a po 5 minutách bylo přidáno 1,5 ml 1 M NaOH a 1 ml vody. Po 15 minutách byla měřena absorbance při 510 nm.

Na kalibrační roztoky byl použit katechin v 60% ethanolu o koncentracích 0,05-0,30 mg/ml a do blanku bylo opět místo vzorku přidáno 0,5 ml vody.

### *4.3.3 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS*

Do zúžené kyvety bylo napipetováno 10 µl vzorku a 1 ml roztoku $ABTS^{\cdot+}$ (naředěného 96% ethanolem tak, aby absorbance při 734 nm byla 0,7 ± 0,02), který byl připraven smícháním ABTS (c = 7 mmol/dm$^3$) a $K_2S_2O_8$ (c = 2,45 mmol/dm$^3$) a ponechán minimálně 12 h ve tmě. V 10. minutě pak byla měřena absorbance při 734 nm. Jako výchozí hodnota sloužila absorbance 1 ml $ABTS^{\cdot+}$ a 10 µl 60% ethanolu.

Jako standard byl použit roztok Troloxu v 60% ethanolu o koncentraci 50-400 µl/ml.

## 4.4 Příprava lipozomů

Do kádinky bylo naváženo 10 mg cholesterolu a 90 mg lecithinu a tato navážka byla rozpuštěna v 10 ml připravených extraktů. Samotné částice byly připraveny pomocí ultrazvukového homogenizátoru mícháním po dobu 1 minuty s intenzitou 85 %.

### *4.4.1 Stanovení enkapsulační účinnosti*

Z roztoku připravených částic byl odebrán 1 ml do Eppendorfovy zkumavky a 5 minut při 14 000 ot/min byl centrifugován. Poté bylo ze supernatantu odebráno 50 µl na spektrofotometrickou metodu stanovení polyfenolů. Enkapsulační účinnost byla vypočítána jako rozdíl obsahu dané látky před a po enkapsulaci.

### *4.4.2 Stanovení dlouhodobé stability*

1 ml roztoku připravených lipozomů byl napipetován do Eppendorfovy zkumavky a uchován v lednici. Po 10 dnech a 30 dnech bylo vždy odebráno 50 µl na stanovení polyfenolů. Dále byly lipozomy uchovány také v 0,5% karbomeru – do uzavíratelné zkumavky byl napipetován 1 ml lipozomů a 3 ml karbomeru.

### *4.4.3 Stanovení koncentrace fosfolipidů pomocí Stewartova testu*

Nejprve bylo připraveno činidlo – navážka 2,7 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ a 3 g $NH_4SCN$ byla rozpuštěna ve 100 ml destilované vody. Na kalibraci bylo jako standardní roztok použito 100 ml roztoku fosfolipidů rozpuštěných v chloroformu (koncentrace fosfolipidů byla 0,1 mg/ml). Dále byla do Eppendorfových zkumavek pipetována množství jednotlivých roztoků podle *Tabulky č. 2*.

***Tabulka 2.*** *Objemy jednotlivých roztoků pipetovaných na Stewartův test*

| **č. zkumavky** | **standard [ml]** | **chloroform [ml]** | **ferothiokyanát [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 |

Roztoky byly důkladně promíchány na vortexu a poté centrifugovány 10 minut při 1000 ot/min. Pomocí pipety byla z každé zkumavky opatrně odebrána spodní chloroformová vrstva a změřena její absorbance při 485 nm v zúžené křemenné kyvetě.

Na měření koncentrace fosfolipidů bylo pipetováno 0,5 ml roztoku připravených lipozomů, 0,5 ml chloroformu a 1 ml ferothiokyanátu.

### *4.4.4 Stanovení velikosti a stability pomocí DLS a zeta potenciálu*

Po vhodném naředění vzorků (100 krát) připravených lipozomů byl 1 ml těchto vzorků napipetován do kyvety a analyzován na přístroji Zetasizer. Metoda je založena na dynamickém rozptylu světla (DLS, „dynamic light scattering“). Měření byla provedena dvakrát a z hodnot byl vypočítán průměr. Pro měření stability byl na kyvetu přidán elektrodový nástavec.

## 4.5 Příprava chitosanových částic

Do kádinek bylo naváženo 30 mg chitosanu a zalito 10 ml jednotlivých extraktů. Po přidání 0,1 ml kyseliny octové byl roztok míchán po dobu 30 s na ultrazvukovém homogenizátoru s intenzitou 25 %. Během míchání byly postupně přidávány 3 ml 0,5% tripolyfosfátu jako srážecího činidla.

Enkapsulační účinnost, dlouhodobá stabilita, velikost a stabilita chitosanových částic byla měřena stejným způsobem jako v předchozím případě u lipozomů.

## 4.6 SOS Chromotest

### *4.6.1 Příprava vzorků*

Extrakty z vybraných přírodních látek byly připraveny následujícím způsobem: navážka 1 g bylinky byla zalita 5 ml vroucí vody a nechána 15 minut louhovat. Extrakty byly poté sterilizovány přes 200 nm filtr do sterilních Eppendorfových zkumavek.

Vzorky lipozomů byly připraveny stejným způsobem popsaným v kapitole 4.4. (testovány byly lipozomy prázdné, s černým bezem, hřebíčkem, skořicí, levandulí, rozmarýnem a šalvějí). 1 ml takto připravených lipozomů byl ještě přefiltrován přes asi 4 cm vysokou kolonku naplněnou gelem Sephadex LH20, a to pomocí centrifugy při 600 ot/min po dobu 2 minut. Testovány byly jak lipozomy přefiltrované přes kolonu Sephadex LH20, tak lipozomy bez této filtrace. Chitosanové částice byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 4.5 a testovány byly částice s hřebíčkem, černým bezem, skořicí, rozmarýnem, levandulí a šalvějí. Vše bylo před vlastním testováním sterilizováno přes 450 nm filtr do sterilních Eppendorfových zkumavek.

Dále byly testovány na genotoxicitu vzorky lipozomů s enkapsulovaným hřebíčkovým olejem a s extraktem hřebíčku 10x koncentrovanějším, jenž byl poskytnut z paralelně

probíhající práce. Dále byly testovány stříbrné nanočástice připravené v další souběžně měřené práci. Tyto částice byly připraveny redukcí z dusičnanu stříbrného. Následně byly enkapsulovány do lipozomů. Také tyto lipozomy byly testovány na genotoxicitu pomocí SOS chromotestu.

### *4.6.2 Provedení testu*

Celý test byl proveden z komerčního kitu EBPI SOS-CHROMOTEST$^{TM}$. Přes noc (12-16 h) se nechaly nakultivovat lyofilizované bakterie *E. coli* v dodaném živném médiu při 37 °C. Po této době byla kultura zředěna novým médiem na asi 10 ml s absorbancí 0,08 při 630 nm.

Do jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno vždy 10 µl testovaného vzorku, pozitivní kontrolu tvořil roztok 4-NQO (4-nitroquinolin-1-oxid) o koncentraci 10 µg/ml, negativní kontrolu pak sterilní fosfátový pufr nebo DMSO a roztok s buňkami. Vzorky byly ředěny na čtyři různé koncentrace pomocí fosfátového pufru tak, aby celkový objem vzorku byl vždy 10 µl. K nim bylo přidáno 100 µl naředěné suspenze s bakteriemi a vše bylo inkubováno 2 h při 37 °C.

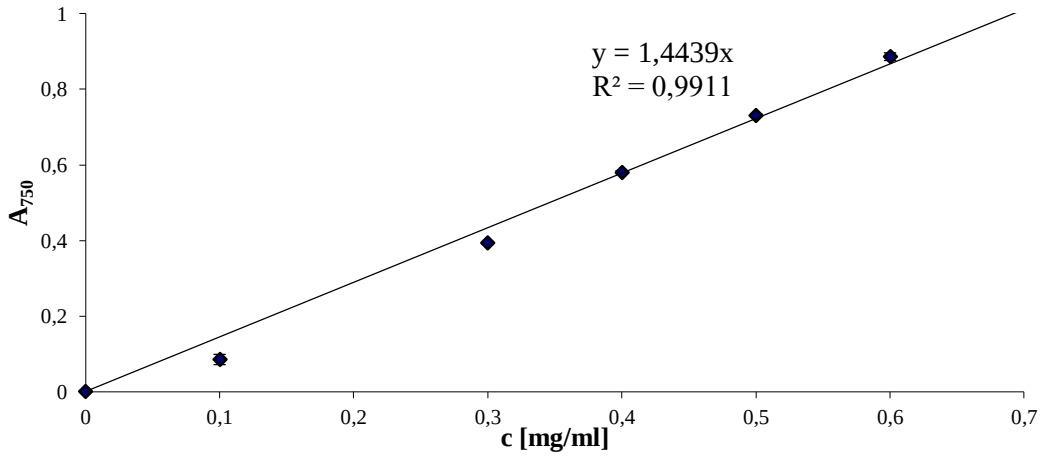
Následně bylo přidáno vždy 100 µl lyofilizované alkalické fosfatázy rozpuštěné v modrém chromogenním činidle a na ELISA readeru byla změřena absorbance při 405 a 630 nm. Poté byla destička inkubována dalších 90 minut při 37 °C a nechána vyvíjet barva. Po této době bylo přidáno 50 µl stop roztoku a opět byla změřena absorbance při 405 a 630 nm.

# 5 Výsledky

Tato práce se zabývá charakterizací vybraných přírodních látek z hlediska obsahových složek (stanovení celkových polyfenolů, flavonoidů) a antioxidační aktivity, dále přípravou lipozomů a chitosanových částic s extrakty z těchto látek a sledováním jejich dlouhodobé stability. Nakonec byly jak extrakty, tak vybrané lipozomy a chitosanové částice otestovány na genotoxicitu pomocí SOS Chromotestu.

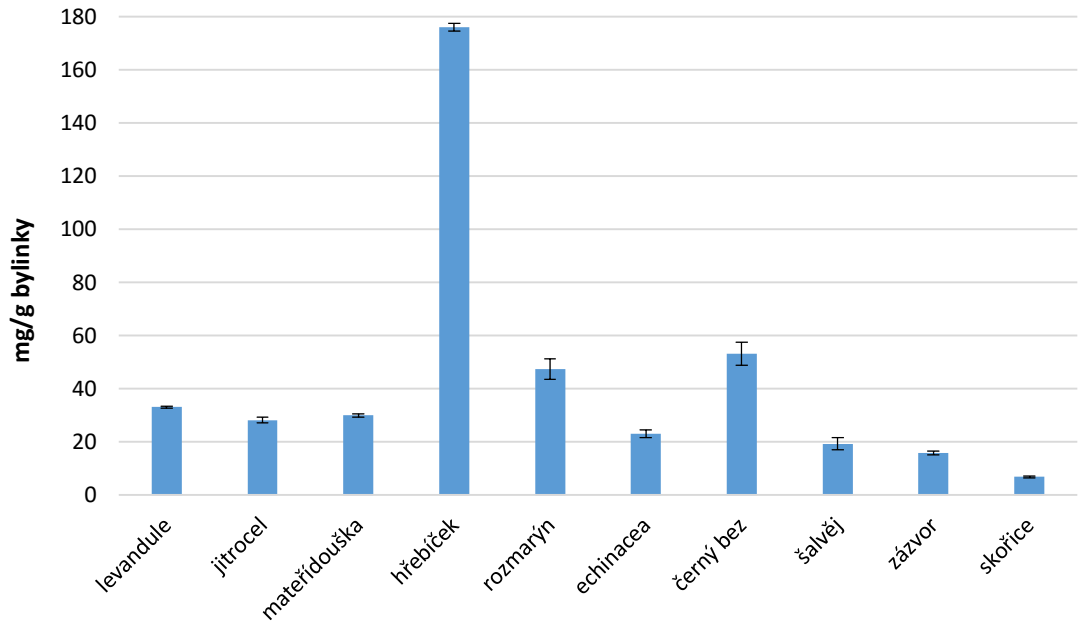
## 5.1 Stanovení celkových polyfenolů

Pro měření obsahu polyfenolů byla sestrojena kalibrační křivka kyseliny gallové (podle výše uvedeného návodu v kapitole 4.3.1), která je na *Obrázku 1*. Měření byla provedena třikrát a z hodnot byl vypočítán průměr.




***Obrázek 1.*** *Kalibrační křivka kyseliny gallové*

Obsah polyfenolů ve vodných extraktech vybraných bylin byl nejvyšší u hřebíčku (175,91 mg/g) a nejnižší u skořice (6,88 mg/g). Výsledky jsou uvedené na *Obrázku 2* a v *Tabulce 3.*



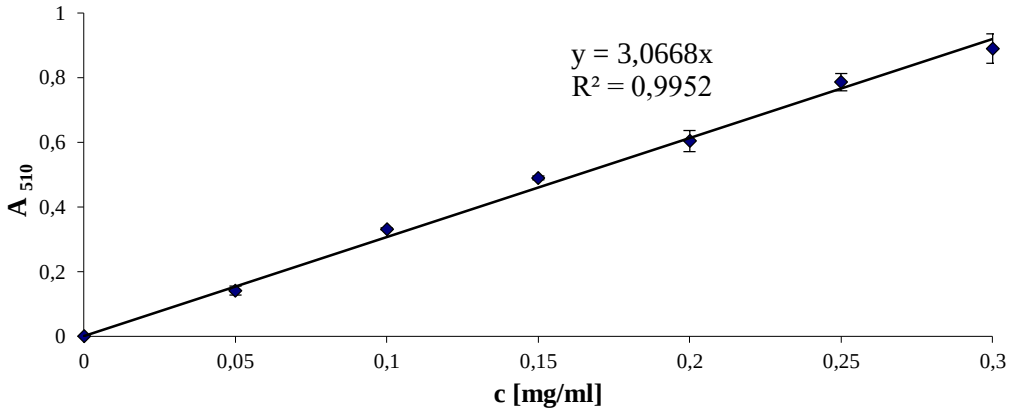

***Obrázek 2.*** *Obsah celkových polyfenolů v jednotlivých extraktech*

***Tabulka 3.*** *Obsah polyfenolů ve vodných extraktech*

| **vodný extrakt** | **obsah polyfenolů [mg/g bylinky]** |
|---|---|
| levandule | 33,04 |
| jitrocel | 28,21 |
| mateřídouška | 29,94 |
| hřebíček | 175,91 |
| rozmarýn | 47,34 |
| echinacea | 23,11 |
| černý bez | 53,12 |
| šalvěj | 19,25 |
| zázvor | 15,81 |
| skořice | 6,88 |

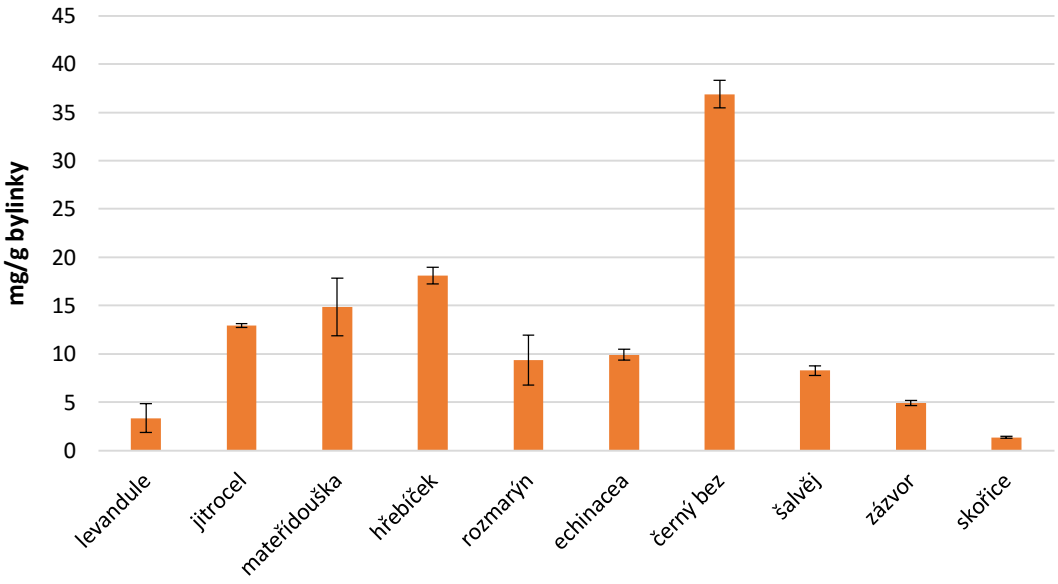
## 5.2 Stanovení celkových flavonoidů

Standardizace byla v tomto případě provedena na katechin, jehož kalibrační křivka je na *Obrázku 3.*




***Obrázek 3.*** *Kalibrační křivka katechinu*

Nejvíce flavonoidů bylo obsaženo ve vodném extraktu černého bezu (36,88 mg/g) a nejmenší obsah flavonoidů měl vodný extrakt skořice (1,37 mg/g). Měření byla provedena třikrát a z hodnot byl vypočítán průměr. Výsledky jsou shrnuty na *0brázku 4* a v *Tabulce 4*.



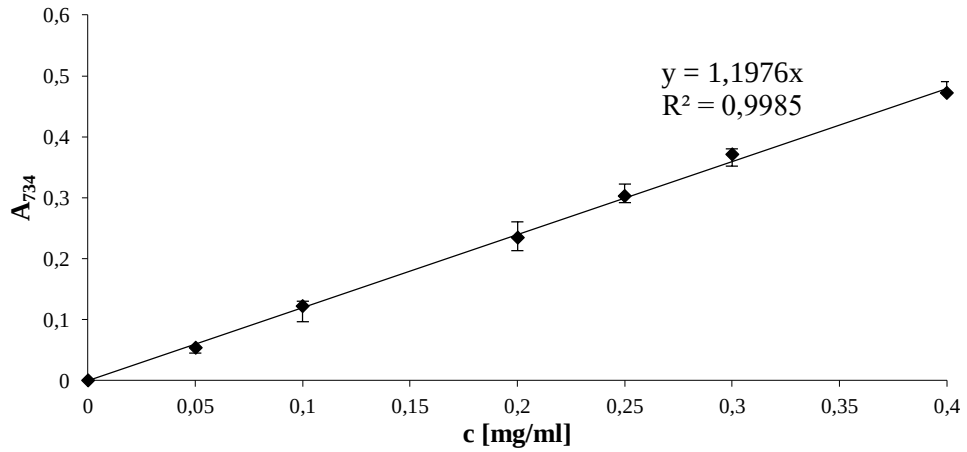

***Obrázek 4.*** *Obsah celkových flavonoidů v jednotlivých extraktech*

***Tabulka 4.*** *Obsah flavonoidů ve vodných extraktech*

| vodný extrakt | obsah flavonoidů [mg/g bylinky] |
|---|---|
| levandule | 3,35 |
| jitrocel | 12,91 |
| mateřídouška | 14,84 |
| hřebíček | 18,13 |
| rozmarýn | 9,36 |
| echinacea | 9,90 |
| černý bez | 36,89 |
| šalvěj | 8,28 |
| zázvor | 4,89 |
| skořice | 1,37 |

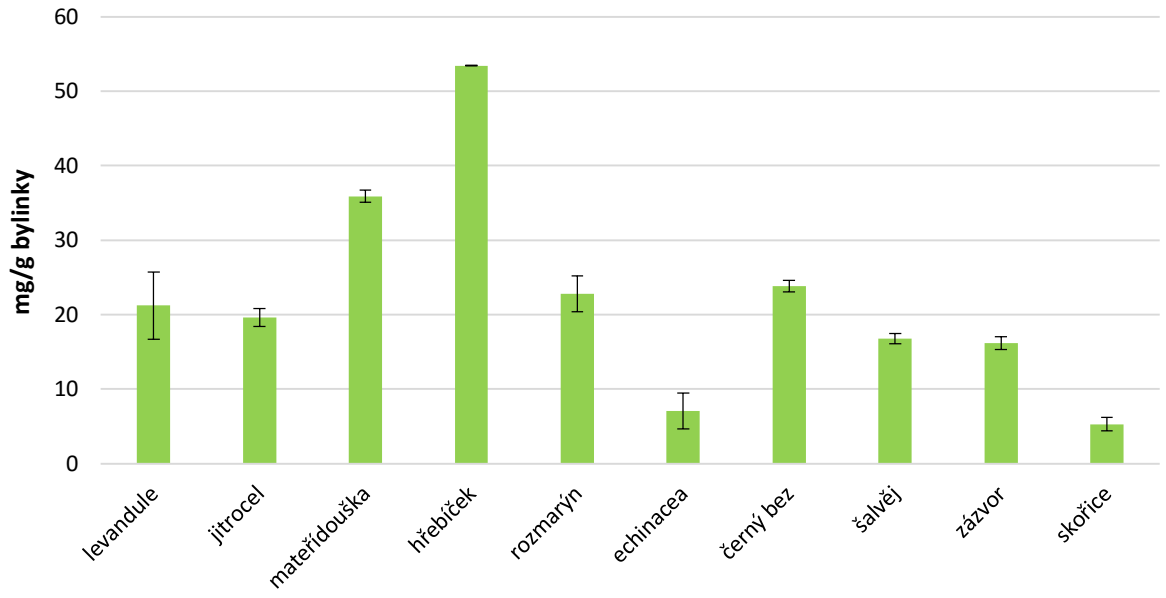
## 5.3 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS

Standardizace se u metody ABTS provádí na Trolox, jehož kalibrační křivka je na *Obrázku 5.*




***Obrázek 5.*** *Kalibrační křivka Troloxu*

Nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena ve vodném extraktu hřebíčku (53,41 mg/g), naopak nejnižší antioxidační aktivitu vykazoval extrakt skořice (5,25 mg/g) – ostatní výsledky jsou na *Obrázku 6* a v *Tabulce 5*. Všechna měření (jak kalibrační křivky, tak jednotlivých extraktů) byla opět provedena třikrát a pro výpočty byl použit průměr z naměřených hodnot.




***Obrázek 6.*** *Antioxidační aktivita jednotlivých extraktů*

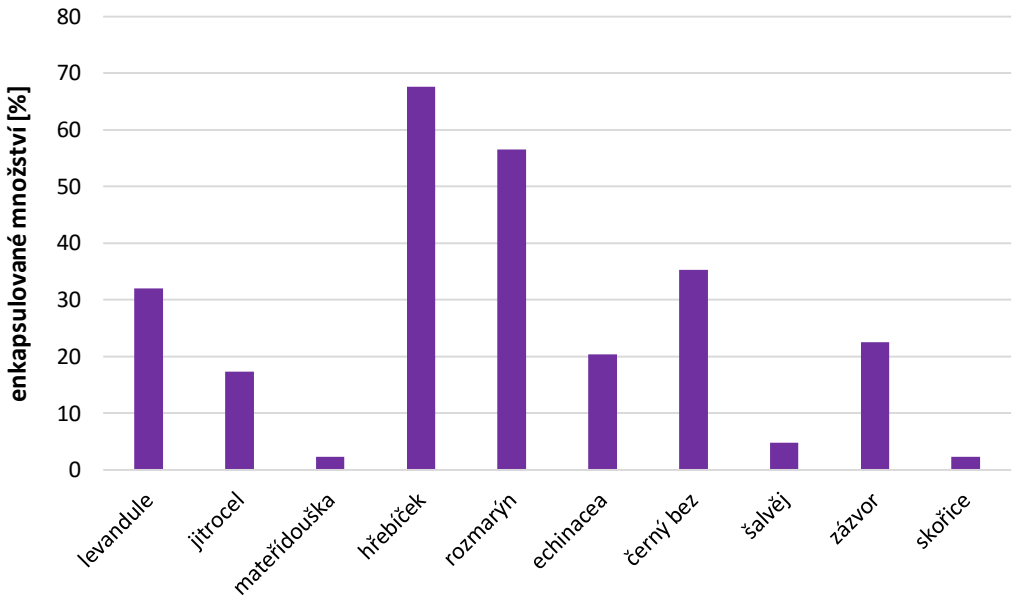
***Tabulka 5.*** *Antioxidační aktivita vodných extraktů*

| **vodný extrakt** | **antioxidační aktivita [mg/g bylinky]** |
|---|---|
| levandule | 21,21 |
| jitrocel | 19,57 |
| mateřídouška | 35,88 |
| hřebíček | 53,41 |
| rozmarýn | 22,80 |
| echinacea | 7,07 |
| černý bez | 23,80 |
| šalvěj | 16,76 |
| zázvor | 16,14 |
| skořice | 5,26 |

## 5.4 Lipozomy

### *5.4.1 Stanovení enkapsulační účinnosti*

Lipozomy s enkapsulovanými extrakty byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 4.4. a po centrifugaci bylo v supernatantu stanoveno spektrofotometricky množství neenkapsulovaných polyfenolů. Měření byla provedena třikrát a z hodnot byl vypočítán průměr, přičemž odchylky od průměru nepřesáhly 4 %. Z rozdílu množství polyfenolů před a po enkapsulaci byla vypočítána enkapsulační účinnost. Výsledky jsou uvedeny na *Obrázku 7*.




***Obrázek 7.*** *Enkapsulační účinnost pro jednotlivé extrakty*

Nejvíce enkapsulovaných polyfenolů bylo v lipozomech s extraktem z hřebíčku (67,57 %) a z rozmarýnu (56,47 %), naopak z extraktů ze skořice nebo mateřídoušky se polyfenoly téměř neenkapsulovaly (enkapsulační účinnost u skořice byla pouze 2,35 % a u mateřídoušky 2,31 %). Výsledky jsou uvedeny také v *Tabulce č. 6.*

***Tabulka 6.*** *Enkapsulační účinnost lipozomů pro jednotlivé extrakty*

| **bylinka** | **enkapsulované množství [mg/ml]** | **enkapsulační účinnost [%]** |
|---|---|---|
| levandule | 0,1057 | 32,01 |
| jitrocel | 0,0489 | 17,35 |
| mateřídouška | 0,0069 | 2,31 |
| hřebíček | 1,1887 | 67,57 |
| rozmarýn | 0,2673 | 56,47 |
| echinacea | 0,0471 | 20,38 |
| černý bez | 0,1872 | 35,25 |
| šalvěj | 0,0092 | 4,80 |
| zázvor | 0,0356 | 22,48 |
| skořice | 0,0016 | 2,35 |

### *5.4.2 Stanovení dlouhodobé stability*

Po 10 a 30 dnech bylo z roztoku připravených lipozomů uchovaných v lednici odebráno vždy 50 µl a bylo sledováno postupné uvolňování polyfenolů. Výsledky jsou uvedeny v *Tabulce 7.*

***Tabulka 7.*** *Dlouhodobá stabilita lipozomů s extrakty*

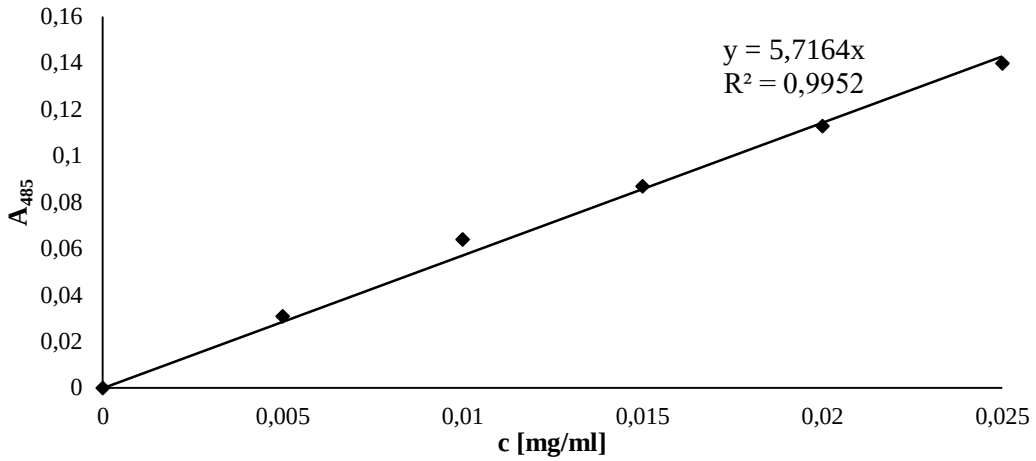
| | **množství uvolněných polyfenolů ve vodném prostředí [%]** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | echi-nacea | č. bez | šalvěj | zázvor | sko-řice | levan-dule | jitro-cel | mateří-douška | hře-bíček | rozma-rýn |
| **po 10 dnech** | -100 | 19,6 | -87,5 | -70 | -100 | -11,79 | 56,1 | -100 | -0,41 | -4,62 |
| **po 30 dnech** | -85,29 | 3,95 | -100 | -20 | -85,71 | -13,76 | -32,6 | -100 | 7,61 | -9,37 |
| **množství uvolněných polyfenolů v karbomeru [%]** | | | | | | | | | | |
| **po 10 dnech** | -98,0 | -43 | 100 | -100 | -100 | 100 | 25,94 | -100 | 39,93 | -7,9 |
| **po 30 dnech** | -100 | 37,9 | 100 | 3,9 | 100 | -42,8 | -100 | 100 | 41,1 | 25,3 |

Připravené lipozomy byly obecně stabilní. V *Tabulce* 7 naznačují kladné hodnoty uvolňování, záporné naopak degradaci. Po 10 dnech se uvolnily polyfenoly pouze z lipozomů s černým bezem a jitrocelem, u zbytku částic převládla jejich degradace nad uvolňováním (u některých vzorků docházelo dokonce až k 100% degradaci, tedy k degradaci všech volných polyfenolů). Po 30 dnech byl u lipozomů s echinaceou, zázvorem, skořicí a hřebíčkem zaznamenán oproti 10 dnům nárůst koncentrace polyfenolů v roztoku, což naznačuje jejich další uvolňování. U zbytku se naopak koncentrace snižovala, což může být způsobeno jejich degradací. Nejvíce polyfenolů se uvolnilo po 10 dnech z lipozomů s jitrocelem, a to více než polovina enkapsulovaného množství (56,1 %).

V 0,5% karbomeru se polyfenoly uvolňovaly více (po 30 dnech z lipozomů se šalvějí a mateřídouškou dokonce 100 %) než ve vodném prostředí. Záporné hodnoty opět naznačují, že polyfenoly degradovaly více než se uvolňovaly.

### *5.4.3 Stanovení koncentrace fosfolipidů pomocí Stewartova testu*

Standardizace byla provedena na roztok fosfolipidů (o koncentraci 0,1 mg/ml) připravený z navážky 0,001 g cholesterolu a 0,009 g lecitinu rozpuštěné ve 100 ml chloroformu. Kalibrační přímka je na *Obrázku č. 8*.




***Obrázek 8.*** *Kalibrační přímka pro Stewartův test*

Touto metodou byla určena koncentrace fosfolipidů v roztoku lipozomů připravených postupem uvedeným v kapitole 4.4. Dále byly měřeny koncentrace fosfolipidů v lipozomech s hřebíčkem a černým bezem a v upravených lipozomech. Výsledky jsou shrnuty v *Tabulce 8.*

***Tabulka 8.*** *Koncentrace fosfolipidů pro jednotlivé druhy lipozomů*

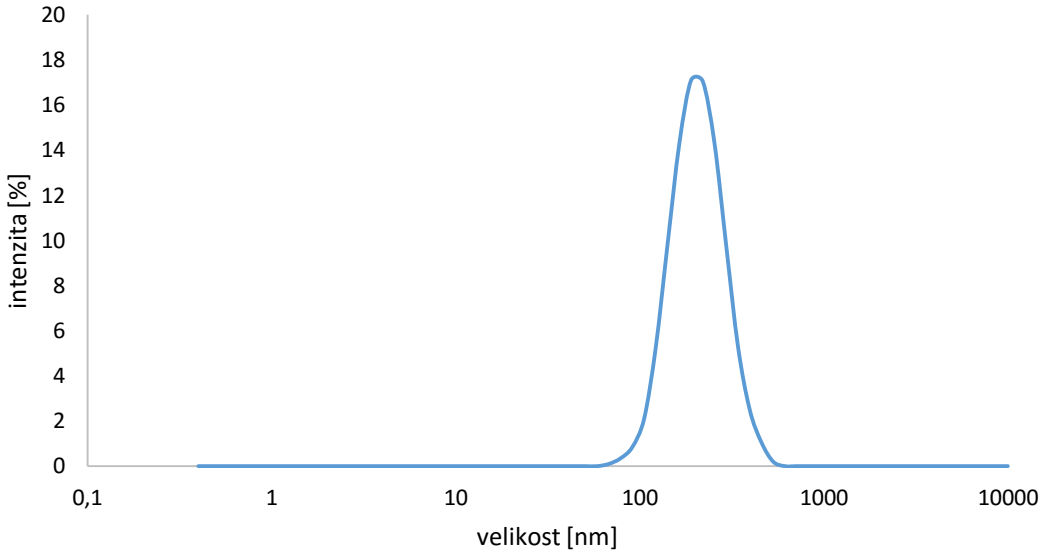
| **lipozomy** | **koncentrace fosfolipidů [mg/ml]** |
|---|---|
| prázdné neupravené | 3,63 |
| neupravené s hřebíčkem | 0,35 |
| neupravené s č. bezem | 0,68 |
| sterilizované s hřebíčkem | 0,72 |
| sterilizované s č. bezem | 0,94 |
| filtrov. Sephadex s hřebíčkem | 0,1 |
| filtrov. Sephadex s č. bezem | 0,12 |

Nejmenší koncentrace fosfolipidů byla naměřena u lipozomů filtrovaných přes gel Sephadex LH20, naopak nejvyšší u lipozomů prázdných neupravených a sterilizovaných přes 450 nm filtr.

### *5.4.4 Stanovení velikosti a stability pomocí DLS a zeta potenciálu*

Velikost lipozomů a jejich stabilita pomocí zeta potenciálu byla měřena postupem popsaným v kapitole 4.4.4 a výsledky jsou uvedeny v *Tabulce 9.* Protože v SOS chromotestu byly testovány lipozomy s enkapsulovanými extrakty z hřebíčku, černého bezu a skořice a tyto částice bylo nutno připravit sterilně přes 450 nm filtr, byla měřena velikost a stabilita také těchto lipozomů. Přes gel Sephadex LH20 byly také odfiltrovány největší a nejmenší lipozomy (pro urychlení filtrace byly centrifugovány při 600 a 900 otáčkách).

Ukázka distribuce velikostí lipozomů s enkapsulovaným extraktem zázvoru je na *Obrázku 9*.




***Obrázek 9.*** *Distribuce velikostí lipozomů se zázvorem*

Z výsledků je vidět, že největší jsou lipozomy s enkapsulovaným extraktem z jitrocele (480 nm), naopak nejmenší z levandule (198,25 nm).

***Tabulka 9.*** *Průměrná velikost lipozomů a jejich zeta potenciál*

| **enkapsulovaná bylina** | **průměrná velikost [nm]** | **zeta potenciál [mV]** |
|---|---:|---:|
| černý bez | 220,5 | -43,05 |
| hřebíček | 206 | -44,6 |
| rozmarýn | 208,35 | -34,95 |
| zázvor | 228 | -36,7 |
| jitrocel | 480,15 | -39,7 |
| levandule | 198,25 | -35,15 |
| skořice | 262,7 | -49,8 |
| mateřídouška | 300,2 | -35,6 |
| šalvěj | 233,2 | -48,9 |
| echinacea | 224,75 | -48,35 |
| sterilizované prázdné | 144,95 | -47,15 |
| sterilizované se skořicí | 169,75 | -45,55 |
| sterilizované s hřebíčkem | 183,8 | -38,85 |
| sterilizované s č. bezem | 163,25 | -41,05 |
| filtrov. Sephadex (600 ot./min) | 179 | -29,4 |
| filtrov. Sephadex (900 ot./min) | 173,5 | -33,95 |

Z hodnot zeta potenciálů lze říci, že všechny připravené lipozomy jsou stabilní. Za nestabilní se totiž považují hodnoty potenciálu v rozmezí od -30 mV do 30 mV. Nejstabilnější jsou lipozomy s enkapsulovaným extraktem šalvěje, protože má nejnižší potenciál (-48,9 mV) nacházející se tak nejdále od hranice nestability. Pouze lipozomy filtrované přes Sephadex LH20 při 600 ot./min byly na hranici stability.

## 5.5 Chitosanové částice

Chitosanové částice byly připraveny způsobem popsaným v kapitole 4.5 a stejně jako u lipozomů u nich byla měřena enkapsulační účinnost (výsledky v *Tabulce 10*), dlouhodobá stabilita, velikost a stabilita. Všechny výsledky jsou uvedeny v *Tabulkách 11* a *12*.

***Tabulka 10.*** *Enkapsulační účinnost chitosanových částic pro jednotlivé extrakty*

| **bylinka** | **enkapsulované množství [mg/ml]** | **enkapsulační účinnost [%]** |
|---|---|---|
| levandule | 0,3124 | 94,55 |
| jitrocel | 0,1473 | 52,21 |
| mateřídouška | 0,2306 | 77,02 |
| hřebíček | 1,2656 | 71,94 |
| rozmarýn | 0,4034 | 85,22 |
| echinacea | 0,1706 | 73,83 |
| černý bez | 0,2881 | 54,24 |
| šalvěj | 0,1533 | 79,62 |
| zázvor | 0,1134 | 71,68 |
| skořice | 0,0633 | 91,95 |

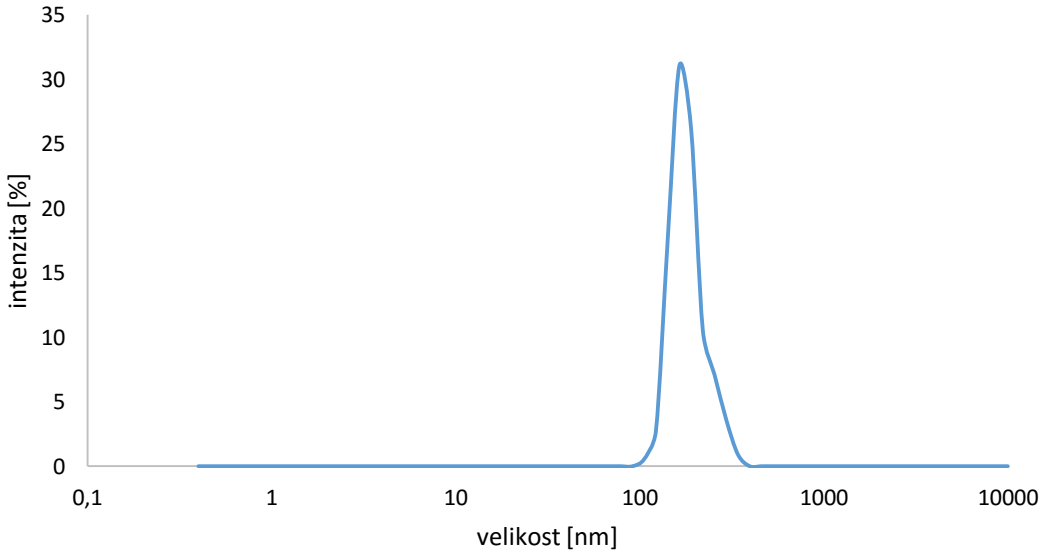
Je vidět, že enkapsulační účinnost je u chitosanových částic mnohem vyšší než u lipozomů. U levandule bylo enkapsulováno až 94,55 % polyfenolů. Naopak nejmenší enkapsulační účinnost byla naměřena u jitrocele (52,21 %).

***Tabulka 11.*** *Dlouhodobá stabilita chitosanových částic*

| | **množství uvolněných polyfenolů z chitosanových částic [%]** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | echi-nacea | č. bez | šalvěj | zázvor | sko-řice | levan-dule | jitro-cel | mateří-douška | hře-bíček | rozma-rýn |
| **po 10 dnech** | -9,61 | 3,13 | 21,39 | -7,3 | 4,74 | -1,92 | -13,32 | -1,40 | -2,52 | -1,32 |
| **po 30 dnech** | 2,84 | 6,09 | 14,0 | -18 | 60,22 | -3,92 | 1,88 | 14,72 | 5,09 | -6,81 |

U částic s extraktem z černého bezu, šalvěje a skořice se polyfenoly po 10 dnech uvolnily, zatímco u zbytku došlo spíše k jejich degradaci (znázorněno opět zápornými znaménky). Po 30 dnech se významnější množství polyfenolů uvolnilo pouze u enkapsulovaného extraktu ze skořice.

Distribuce velikostí chitosanových částic je pro ukázku (částic opět s enkapsulovaným extraktem zázvoru) uvedena na *Obrázku 10*. Chitosanové částice ovšem měly tendenci se shlukovat – je to vidět z průměrných velikostí, které byly mnohem větší než u lipozomů.




***Obrázek 10.*** *Distribuce velikostí chitosanových částic s enkapsulovaným zázvorem*

***Tabulka 12.*** *Průměrná velikost chitosanových částic a jejich zeta potenciál*

| **enkapsulovaná bylina** | **průměrná velikost [nm]** | **zeta potenciál [mV]** |
|---|---|---|
| černý bez | 451,35 | -2,416 |
| hřebíček | 2,91E+04 | 0,4507 |
| rozmarýn | 342,4 | -7,25 |
| zázvor | 7839 | 8,57 |
| jitrocel | 482 | -2,025 |
| levandule | 546,8 | -4,595 |
| skořice | 1872 | -0,56 |
| mateřídouška | 915,55 | 1,39 |
| šalvěj | 880,5 | 13,1 |
| echinacea | 3575 | 33,9 |
| prázdné | 414,8 | -7,505 |

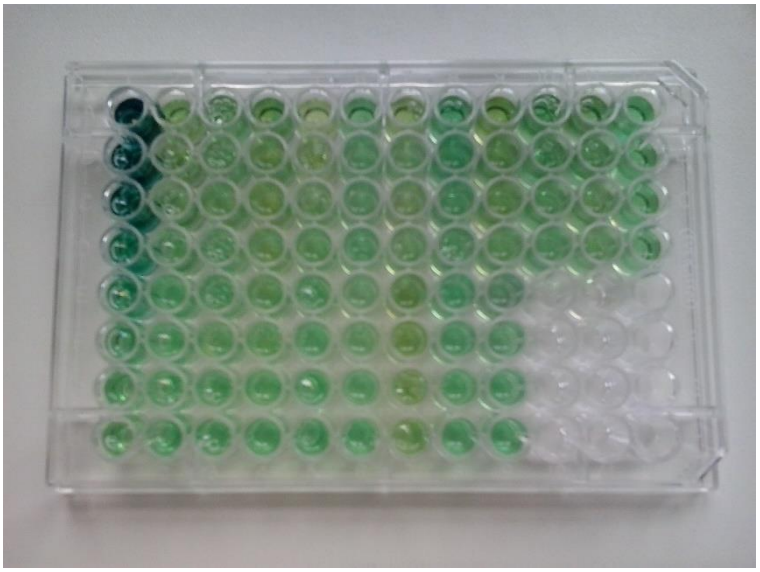
Také z hodnot zeta potenciálů je dále vidět, že stabilní jsou pouze částice s echinaceou (33,9 mV) a právě díky hodnotám potenciálů blízkým nule měly tyto částice tendenci se shlukovat.

V porovnání s lipozomy měly sice chitosanové částice vyšší enkapsulační účinnost, nebyly ale stabilní z hlediska zeta potenciálu a jsou tak náchylnější k agregaci. Z dlouhodobého hlediska byly chitosanové částice stabilní.

## 5.6 SOS Chromotest

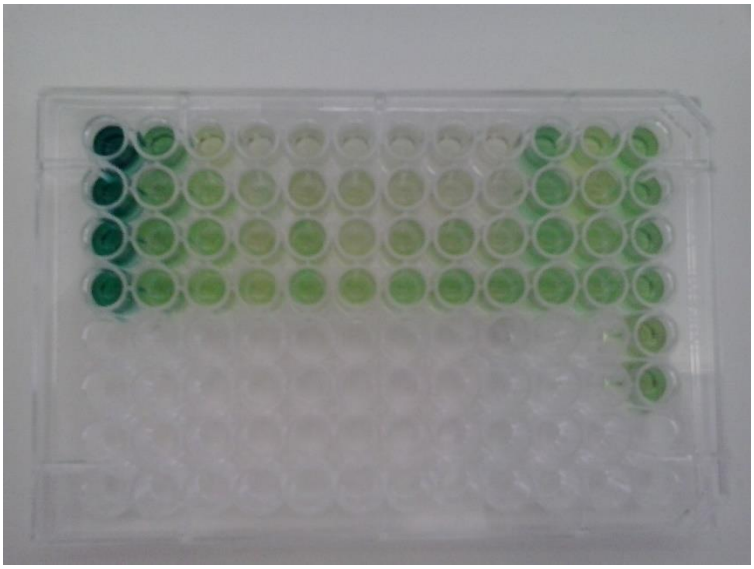
Testování probíhalo podle postupu z kapitoly 4.6.2 a z naměřených hodnot byl pro každou zkušební koncentraci vypočten SOS indukční faktor (SOSIF).

Na *Obrázku 11* je mikrotitrační destička po vyvinutí zelené barvy. V prvním sloupečku je pozitivní kontrola (4-NQO), v dalších jamkách jsou čisté extrakty, lipozomy a stříbrné částice.



***Obrázek 11.*** *Mikrotitrační destička pro SOS chromotest po ukončení testu*

Na *Obrázku 12* je na ukázku destička z dalšího pokusu s testovanými chitosanovými částicemi a lipozomy s levandulí, rozmarýnem a šalvějí.



***Obrázek 12.*** *Mikrotitrační destička po ukončení testu – druhý pokus*

Nejprve ale byla pro každou koncentraci vypočtena aktivita enzymu β-galaktosidázy, a to z naměřených hodnot absorbancí při 630 nm.

$$a_{gal.} = \frac{1000 \cdot \Delta A_{630}}{t},$$

kde $\Delta A_{630}$ je změna absorbance při 630 nm a t je čas mezi oběma měřeními (v minutách – v tomto případě 90). Stejným způsobem byla vypočtena i aktivita alkalické fosfatázy, změna absorbance ale byla brána při 405 nm.

$$a_{fosfat..} = \frac{1000 \cdot \Delta A_{405}}{t},$$

čas t byl také 90 minut.

Dále byla vypočtena specifická aktivita β-galaktosidázy, a to jako poměr aktivit obou enzymů:

$$a_{spec.gal} = \frac{a_{gal}}{a_{fosfat.}}.$$

Nakonec byl vypočten SOS indukční faktor a to následujícím způsobem:

$$SOSIF = \frac{a_{spec.gal}}{a_{spec.gal.-NK}},$$

kde $a_{spec.gal}$ je specifická aktivita tohoto enzymu pro testovaný vzorek a $a_{spec.gal-NK}$ je tato aktivita pro negativní kontrolu.

Výsledky pro všechny testované koncentrace pozitivní kontroly (4-NQO) jsou uvedeny v *Tabulce 13.* Je vidět, že pouze u posledních dvou koncentrací byl SOSIF nižší než 1,5.

***Tabulka 13.*** *SOS indukční faktory pro jednotlivé koncentrace 4-NQO*

| **koncentrace [µg/ml]** | **SOSIF** |
|---|---|
| 10 | 6,5 |
| 5 | 6,3 |
| 2,5 | 5,3 |
| 1,25 | 3,3 |
| 0,625 | 2,3 |
| 0,313 | 1,7 |
| 0,156 | 1,2 |
| 0,078 | 1,1 |

Výsledky průměrných hodnot indukčních faktorů pro všechny testované extrakty a částice jsou uvedeny v *Tabulkách č. 14-18.*

***Tabulka 14.*** *SOS indukční faktory pro testované látky*

| **testovaná látka** | **ředění** | **koncentrace polyfenolů (mg/ml)** | **SOSIF** | **testovaná látka** | **ředění** | **koncentrace polyfenolů (mg/ml)** | **SOSIF** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **zázvor** | 0 | 3,16 | **0,62** | **hřebíček** | 0 | 35,18 | **0,58** |
| | 2 | 1,58 | **1,00** | | 2 | 17,59 | **0,78** |
| | 5 | 0,63 | **0,78** | | 5 | 7,04 | **0,60** |
| | 10 | 0,32 | **0,89** | | 10 | 3,52 | **0,82** |
| **rozmarýn** | 0 | 9,47 | **1,01** | **levandule** | 0 | 6,61 | **1,49** |
| | 2 | 4,73 | **1,00** | | 2 | 3,30 | **1,06** |
| | 5 | 1,89 | **0,77** | | 5 | 1,32 | **0,85** |
| | 10 | 0,95 | **1,03** | | 10 | 0,66 | **0,79** |
| **šlavěj** | 0 | 3,85 | **0,76** | **mateří-douška** | 0 | 5,99 | **0,55** |
| | 2 | 1,93 | **0,68** | | 2 | 2,99 | **0,68** |
| | 5 | 0,77 | **0,71** | | 5 | 1,20 | **0,60** |
| | 10 | 0,39 | **0,72** | | 10 | 0,60 | **0,73** |
| **skořice** | 0 | 1,38 | **0,62** | **černý bez** | 0 | 10,62 | **0,90** |
| | 2 | 0,69 | **0,52** | | 2 | 5,31 | **0,92** |
| | 5 | 0,28 | **0,66** | | 5 | 2,12 | **0,84** |
| | 10 | 0,14 | **0,83** | | 10 | 1,06 | **0,97** |
| **echinacea** | 0 | 4,62 | **0,99** | **jitrocel** | 0 | 5,64 | **1,00** |
| | 2 | 2,31 | **1,05** | | 2 | 2,82 | **1,01** |
| | 5 | 0,92 | **1,01** | | 5 | 1,13 | **0,69** |
| | 10 | 0,46 | **1,02** | | 10 | 0,56 | **0,72** |

***Tabulka 15.*** *SOS indukční faktory pro testované chitosanové částice*

| testovaná látka | ředění | koncentrace polyfenolů (mg/ml) | koncentrace enkapsulovaných polyfenolů (mg/ml) | SOSIF |
|---|---|---|---|---|
| **chitosanové částice skořice** | 0 | 0,069 | 0,063 | **1,66** |
| | 2 | 0,034 | 0,032 | **0,52** |
| | 5 | 0,014 | 0,013 | **0,64** |
| | 10 | 0,007 | 0,006 | **0,51** |
| **chitosanové částice hřebíček** | 0 | 1,759 | 1,266 | **1,48** |
| | 2 | 0,880 | 0,633 | **0,66** |
| | 5 | 0,352 | 0,253 | **0,55** |
| | 10 | 0,176 | 0,127 | **0,55** |
| **chitosanové částice černý bez** | 0 | 0,531 | 0,288 | **1,63** |
| | 2 | 0,266 | 0,144 | **0,95** |
| | 5 | 0,106 | 0,058 | **0,52** |
| | 10 | 0,053 | 0,029 | **0,50** |
| **chitosanové částice prázdné** | 0 | 0,000 | 0,000 | **0,73** |
| | 2 | 0,000 | 0,000 | **0,63** |
| | 5 | 0,000 | 0,000 | **0,51** |
| | 10 | 0,000 | 0,000 | **0,55** |
| **chitosanové částice levandule** | 0 | 0,330 | 0,312 | **2,02** |
| | 2 | 0,165 | 0,156 | **0,88** |
| | 5 | 0,066 | 0,062 | **0,78** |
| | 10 | 0,033 | 0,031 | **0,61** |
| **chitosanové částice rozmarýn** | 0 | 0,473 | 0,403 | **2,29** |
| | 2 | 0,237 | 0,202 | **0,91** |
| | 5 | 0,095 | 0,081 | **0,92** |
| | 10 | 0,047 | 0,040 | **0,56** |
| **chitosanové částice šalvěj** | 0 | 0,193 | 0,153 | **1,52** |
| | 2 | 0,096 | 0,077 | **1,35** |
| | 5 | 0,039 | 0,031 | **1,09** |
| | 10 | 0,019 | 0,015 | **0,60** |

***Tabulka 16.*** *SOS indukční faktory pro testované lipozomové částice*

| testovaná látka | ředění | koncentrace polyfenolů (mg/ml) | koncentrace enkapsulovaných polyfenolů (mg/ml) | koncentrace fosfolipidů (mg/ml) | SOSIF |
|---|---|---|---|---|---|
| **lipozomy skořice** | 0 | 0,069 | 0,016 | 0,780 | **0,88** |
| | 2 | 0,034 | 0,008 | 0,390 | **0,92** |
| | 5 | 0,014 | 0,003 | 0,156 | **1,00** |
| | 10 | 0,007 | 0,002 | 0,078 | **1,01** |
| **lipozomy hřebíček** | 0 | 1,759 | 1,189 | 0,720 | **0,82** |
| | 2 | 0,880 | 0,594 | 0,360 | **0,83** |
| | 5 | 0,352 | 0,238 | 0,144 | **0,94** |
| | 10 | 0,176 | 0,119 | 0,072 | **0,99** |
| **lipozomy černý bez** | 0 | 0,531 | 0,187 | 0,940 | **0,96** |
| | 2 | 0,266 | 0,094 | 0,470 | **0,87** |
| | 5 | 0,106 | 0,037 | 0,188 | **0,95** |
| | 10 | 0,053 | 0,019 | 0,094 | **0,96** |
| **lipozomy prázdné** | 0 | 0,000 | 0,000 | 2,451 | **0,97** |
| | 2 | 0,000 | 0,000 | 1,226 | **0,99** |
| | 5 | 0,000 | 0,000 | 0,490 | **0,99** |
| | 10 | 0,000 | 0,000 | 0,245 | **1,06** |
| **lipozomy levandule** | 0 | 0,330 | 0,106 | 0,664 | **0,91** |
| | 2 | 0,165 | 0,053 | 0,332 | **0,80** |
| | 5 | 0,066 | 0,021 | 0,133 | **0,87** |
| | 10 | 0,033 | 0,011 | 0,066 | **0,53** |
| **lipozomy rozmarýn** | 0 | 0,473 | 0,267 | 0,491 | **0,27** |
| | 2 | 0,237 | 0,134 | 0,246 | **0,46** |
| | 5 | 0,095 | 0,053 | 0,098 | **0,71** |
| | 10 | 0,047 | 0,027 | 0,049 | **0,55** |
| **lipozomy šalvěj** | 0 | 0,193 | 0,009 | 0,672 | **0,53** |
| | 2 | 0,096 | 0,005 | 0,336 | **0,62** |
| | 5 | 0,039 | 0,002 | 0,134 | **0,88** |
| | 10 | 0,019 | 0,001 | 0,067 | **0,59** |

***Tabulka 17.*** *SOS indukční faktory pro testované lipozomové částice upravené pomocí Sephadex LH20*

| testovaná látka | ředění | koncentrace fosfolipidů (mg/ml) | SOSIF |
|---|---|---|---|
| **lipozomy skořice** | 0 | 0,112 | **1,18** |
| | 2 | 0,056 | **1,01** |
| | 5 | 0,022 | **1,09** |
| | 10 | 0,011 | **1,07** |
| **lipozomy hřebíček** | 0 | 0,101 | **1,03** |
| | 2 | 0,051 | **0,98** |
| | 5 | 0,020 | **1,09** |
| | 10 | 0,010 | **1,11** |
| **lipozomy černý bez** | 0 | 0,940 | **0,96** |
| | 2 | 0,123 | **0,97** |
| | 5 | 0,188 | **1,03** |
| | 10 | 0,094 | **0,93** |
| **lipozomy prázdné** | 0 | 0,315 | **0,92** |
| | 2 | 0,158 | **1,05** |
| | 5 | 0,063 | **1,03** |
| | 10 | 0,032 | **1,01** |

***Tabulka 18.*** *SOS indukční faktory pro ostatní testované částice*

| testovaná látka | ředění | SOSIF | testovaná látka | ředění | SOSIF |
|---|---|---|---|---|---|
| **lipozomy hřebíčkový olej** | 0 | **1,26** | **lipozomy stříbrné částice** | 0 | **1,48** |
| | 2 | **0,83** | | 2 | **1,15** |
| | 5 | **0,69** | | 5 | **0,96** |
| | 10 | **0,67** | | 10 | **1,01** |
| **lipozomy hřebíček (vodný extrakt)** | 0 | **1,39** | **stříbrné částice** | 0 | **1,85** |
| | 2 | **1,25** | | 2 | **1,33** |
| | 5 | **1,12** | | 5 | **1,28** |
| | 10 | **1,10** | | 10 | **1,22** |

Na základě výsledků SOS Chromotestu testu lze říci, že vybrané extrakty genotoxické nebyly – za genotoxickou je totiž považována látka, která má SOSIF 1,5 a vyšší [32]. A této hodnoty nedosahoval žádný z testovaných extraktů. Z otestovaných lipozomů také není žádný genotoxický, pouze u nejvyšší koncentrace s enkapsulovanými1 stříbrnými částicemi dosahoval SOSIF hodnoty 1,5. Také u samotných stříbrných částic byla u nejvyšší koncentrace hodnota SOSIF 1,9 (*Tabulka 18*). U chitosanových částic byla nejvyšší koncentrace na hranici toxicity u většiny testovaných částic, u částic s levandulí a rozmarýnem byl navíc SOSIF vypočten na 2,02 a 2,29 (*Tabulka 15*).

Všechny testované látky a částice lze považovat za bezpečné z hlediska genotoxicity (kromě stříbrných částic, lipozomů s obsahem stříbrných částic a koncentrovaných

chitosanových částic s levandulí a rozmarýnem – tam je nutno brát ohled na to, že nejvyšší testované koncentrace jistou míru genotoxicity vykazovaly) a je možné je v kosmetice používat. Tyto látky budou dále testovány v rámci cytotoxických testů.

# 6 Závěr

V dnešní době vývoje nejrůznějších látek, léků a kosmetických přípravků je zapotřebí testovat všechny jejich účinky, které na organismus mohou mít. Některé z nich totiž mohou být velmi vážné, protože mohou reagovat s DNA a ovlivňovat tak syntézu bílkovin nebo genovou expresi, nebo působit na jednu z obecných charakteristik všech živých soustav. To pak značně snižuje odolnost a celkovou šanci organizmu na přežití. Takovým látkám se obecně říká mutageny. Nemusí jít ale vždy o chemikálie, mutageny mohou být také fyzikální nebo biologické. Podle rozsahu poškození dělíme mutace na genové (nebo též bodové), chromozomální a genomové.

Mezi nejpoužívanější testy patří ty na mikroorganizmech, houbách nebo hmyzu. Ke konkrétním testům pak patří mikrobiální Amesův test, test na kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*, testy na organizmech *Euglena gracilis* nebo *Drosophila*. Další testy jsou zaměřené na výměnu sesterských chromatid, tvorbu mikrojader nebo DNA aduktů.

Předložená práce se ale především zaměřila na mikrobiální SOS Chromotest prováděný na bakteriích *E. coli*. Jeho podstatou je spektrofotometrické hodnocení množství enzymu β-galaktosidázy, který je využíván pro zpracování laktózy (na štěpení na monosacharidové jednotky glukózu a galaktózu). *E. coli* je jednou z nejprozkoumanějších bakterií a slouží proto také jako modelový mikroorganizmus nebo jako indikátor znečištění fekáliemi (nachází se totiž často ve střevech živočichů a bývá z nich také vylučována). Tento test je poměrně hojně využíván, jeho provedení je rychlé a jednoduché.

V předložené práci byly nejprve charakterizovány vybrané přírodní látky (vodné extrakty z levandule, jitrocele, mateřídoušky, hřebíčku, rozmarýnu, echinacey, černého bezu, šalvěje, zázvoru a skořice) z hlediska obsahu celkových polyfenolů, flavonoidů a jejich antioxidační aktivity pomocí ABTS. Nejvyšší obsah polyfenolů ve vodných extraktech z vybraných bylin byl stanoven u hřebíčku (175,91 mg/g). Naopak nejvíce flavonoidů bylo obsaženo ve vodném extraktu černého bezu (36,88 mg/g). Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval extrakt hřebíčku (53,41 mg/g).

Dále byly připraveny lipozomové a chitosanové částice pomocí ultrazvuku. Nejvyšší enkapsulované množství polyfenolů bylo stanoveno u lipozomů i chitosanových částic s enkapsulovaným extraktem z hřebíčku. Dále byla stanovena velikost připravených částic a jejich stabilita pomocí zeta potenciálu. Všechny lipozomy byly stabilní, naopak chitosanové částice byly spíše nestabilní. Při dlouhodobé stabilitě byly připravené lipozomy a rovněž chitosanové částice obecně stabilní i po dobu 30 dnů.

Nakonec byly extrakty i částice otestovány na genotoxicitu v SOS Chromotestu. Test neprokázal genotoxické účinky samotných extraktů (hodnota SOSIF nepřekročila 1,5, což je hranice, od které je látka považována za genotoxickou). Lipozomy ani chitosanové částice rovněž nevykazovaly genotoxické účinky (kromě nejvyšší koncentrace chitosanových částic), testované stříbrné částice a lipozomy s těmito částicemi připravené v paralelně probíhající práci ale mírné genotoxické účinky v nejvyšší koncentraci vykazovaly. U nich by tedy bylo nutno brát při aplikaci v kosmetice ohled na potenciální genotoxická rizika. Jinak je jejich použití možno považovat za bezpečné.

# 7 Seznam použité literatury


[1] ALHADRAMI, Hani A. a Graeme I. PATON. 2013. The potential applications of SOS-lux biosensors for rapid screening of mutagenic chemicals. *FEMS Microbiology Letters*. **344**(1): 69-76. DOI: 10.1111/1574-6968.12156. ISSN 03781097. Dostupné také z: http://femsle.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/1574-6968.12156

[2] TICHÝ, Miloň. 2003. Toxikologie pro chemiky: toxikologie obecná, speciální, analytická a legislativa. 2. vyd. Praha: Karolinum, 119 s. ISBN 80-246-0566-X.

[3] FRICKEL, Scott. *Chemical consequences: environmental mutagens, scientist activism, and the rise of genetic toxicology*. New Brunswick, N.J.: Rutgers University Press, c2004, xiii, 197 p. ISBN 08-135-3413-5.

[4] ZEIGER, Errol a Graeme I. PATON. 2004. History and rationale of genetic toxicity testing: An impersonal, and sometimes personal, view. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **44**(5): 363-371. DOI: 10.1002/em.20062. ISSN 0893-6692. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/em.20062

[5] Malachová K. Mutagenita a karcinogenita kontaminant životního prostředí, *Spisy prací Přf OU **82***, (1993)

[6] Bronzetti G. Antimutagens in food, *Tr. Food Sci. Tech. **5***, 390-395, (1994)

[7] MEKENYAN, Ovanes G., Petko I. PETKOV, Stefan V. KOTOV, Stoyanka STOEVA, Verginia B. KAMENSKA, Sabcho D. DIMITROV, Masamitsu HONMA, Makoto HAYASHI, Romualdo BENIGNI, et al. 2012. Investigating the Relationship between in Vitro–in Vivo Genotoxicity: An impersonal, and sometimes personal, view. *Chemical Research in Toxicology*. **25**(2): 363-371. DOI: 10.1021/tx200547s. ISSN 0893-228x. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/em.20062

[8] ANDĚL, Petr. 2011. *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring*. Vyd. 1. Liberec: Evernia, 243, [22] s. ISBN 978-80-903787-9-7.

[9] VODRÁŽKA, Zdeněk. 2002. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, Přer. str. ISBN 80-200-0600-1.

[10] BRICKELL, Christopher et al. *Velká encyklopedie květin a okrasných rostlin*. 1. čes. vyd. Bratislava: Príroda, 1993. ISBN 80-070-0579-X.

[11] Sumeer Gul, Nahida Tun Nisa, Tariq Ahmad Shah, Mohammad Umar Ali Shah, Altaf Bashir Wani. Research output on Lavender. *European Journal of Integrative Medicine*. 2008–2012, **7**(5), 460-466.

[12] RANDUŠKA, Dušan, Ladislav Šomšák, Izabela Háberová. 1986. *Barevný atlas rostlin*. Vyd. 3 Bratislava: Obzor, 640 s.

[13] LIEČIVÉ RASTLINY: Skorocel kopijovitý. *Herbár* [online]. 2016 [cit. 2016-01-03]. Dostupné z: http://www.herbar.org/liecive-rastliny/rastlina/skorocel-kopijovity/

[14] KOZERA, Wojciech, Wojciech KOZERA, Edward MAJCHERCZAK, Elżbieta WSZELACZYŃSKA, Jarosław POBEREŻNY, Tomasz KNAPOWSKI a Bożena BARCZAK. Response of the yield and mineral composition of garden thyme (Thymus vulgaris L.) herbage to various NPK proportions. *Journal of Elemntology*. 2012-9-24, (4/2015): -. DOI: 10.5601/jelem.2015.20.1.802. ISSN 16442296. Dostupné také z: http://jsite.uwm.edu.pl/articles/view/802/

[15] MRÁKOTOVÁ, Alena. *Hřebíček: nejen jako prevence zubního kazu.* In [online]. 2010 [cit. 2016-01-03]. Dostupné z: http://bylinky.zdrave.cz/hrebicek-nejen-jako-prevence-zubniho-kazu/

[16] MAREČEK, František et al. *Zahradnický slovník naučný. 5; R-Ž.* 1. vyd. Praha: ÚZPI, 2001, 674 s. ISBN: 80-7271-075-3.

[17] ERENLER, Ramazan, Isa TELCI, Musa ULUTAS, Ibrahim DEMIRTAS, Fatih GUL, Mahfuz ELMASTAS a Omer KAYIR. Chemical Constituents, Quantitative Analysis and Antioxidant Activities of E chinacea purpurea (L.) Moench and E chinacea pallida (Nutt.) Nutt. *Journal of Food Biochemistry*. 2015, **39**(5): 622-630. DOI: 10.1111/jfbc.12168. ISSN 01458884. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/jfbc.12168

[18] SIDOR, Andrzej, Anna GRAMZA-MICHAŁOWSKA, Musa ULUTAS, Ibrahim DEMIRTAS, Fatih GUL, Mahfuz ELMASTAS a Omer KAYIR. Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (Sambucus nigra) in food – a review. *Journal of Functional Foods*. 2015, **18**(5): 941-958. DOI: 10.1016/j.jff.2014.07.012. ISSN 17564646. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464614002400

[19] AKALIN, Mehmet K., Kubilay TEKIN, Mehmet AKYÜZ, Selhan KARAGÖZ, Fatih GUL, Mahfuz ELMASTAS a Omer KAYIR. Sage oil extraction and optimization by response surface methodology. *Industrial Crops and Products*. 2015, **76**(5): 829-835. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.08.005. ISSN 09266690. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092666901530306X

[20] LIEČIVÉ RASTLINY: Ďumbier lekársky. *Herbár* [online]. 2015 [cit. 2016-01-03]. Dostupné z: http://www.herbar.org/liecive-rastliny/rastlina/dumbier-lekarsky/

[21] ZHANG, Yunbin, Xiaoyu LIU, Yifei WANG, Pingping JIANG, SiewYoung QUEK, Mahfuz ELMASTAS a Omer KAYIR. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*. 2016, **59**(5): 282-289. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.05.032. ISSN 09567135. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713515300219

[22] OPARA, Elizabeth a Magali CHOHAN. Culinary Herbs and Spices: Their Bioactive Properties, the Contribution of Polyphenols and the Challenges in Deducing Their True Health Benefits. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, **15**(10): 19183-19202. DOI: 10.3390/ijms151019183. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: http://www.mdpi.com/1422-0067/15/10/19183/

[23] MUŽÍK, Miroslav, Milan ŘEHULA, Jarmila PLEVOVÁ, Jiří ELIS a Zdeněk BOLELOUCKÝ. *Farmaceutické obaly*. Praha: Avicenum, 1988. Dostupné také z: http://kramerius.mzk.cz/search/handle/uuid:584c8750-cbf3-11e5-bfe7-005056827e52

[24] SOUZA, Vanderlei C., Eduardo NIEHUES a Mara G. N. QUADRI. *Development and characterization of chitosan bionanocomposites containing oxidized cellulose nanocrystals*. DOI: 10.1002/app.43033. ISBN 10.1002/app.43033. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/app.43033

[25] MADUREIRA, Ana Raquel, Adriana PEREIRA a Manuela PINTADO. *Chitosan nanoparticles loaded with 2,5-dihydroxybenzoic acid and protocatechuic acid: Properties and digestion*. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2015.11.007. ISBN 10.1016/j.jfoodeng.2015.11.007. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877415300546

[26] DARRAG, A.M. a D.M. FAYYAD. Genotoxicity of three endodontic sealers by single cell gel-electrophoresis/comet assay. *Tanta Dental Journal*. 2014, vol. 11, issue 2, s. 85-92. DOI: 10.1016/j.tdj.2014.06.001. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1687857414000298

[27] Pokorná Z.: Stanovení mutagenní aktivity zelených krmiv v oblastech s rozdílným stupněm znečištění prostředí, Disertační práce, PřF MU Brno (1996)

[28] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. 2008. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 363 s. ISBN 978-802-0017-031.

[29] Quillardet P., Huisman O., Dari R., Hofnung M. SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – Biological Sciences*. 1982, 79(19): 5971-5975.

[30] TIAN, Zhe, Yoshimitsu ODA, Yu ZHANG, Min YANG a Hongyan LI. 2015. Use of a New Enzyme Extraction System to Improve the Sensitivity of SOS/umu Test and Application to Environmental Samples. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **94**(3): 370-375. DOI: 10.1007/s00128-014-1445-9. ISSN 0007-4861. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007

[31] VASILIEVA S. 2002. SOS chromotest methodology for fundamental genetic research. *Research in Microbiology*. ***153***, 435-440.

[32] Bartos, T., Skarek, M., Cupr, P., Kosubova, P. and Holoubek, I. 2005. Genotoxic activity of a technical toxaphene mixture and its photodegradation products in SOS genotoxicity tests. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 565 (2): 113-120.