



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**STUDIUM INTERAKCÍ BIOMATERIÁLŮ S
HUMÁNNÍMI BUŇKAMI**

STUDY OF INTERACTIONS OF BIOMATERIALS WITH HUMAN CELL CULTURES.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ivana Maslonková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2016



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK1024/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Ivana Maslonková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Jitka Bokrová Ing. Petra Matoušková, Ph.D.	

Název bakalářské práce:

Studium interakcí biomateriálů s humánními buňkami

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- přehledná rešerše o kultivaci a možnostech využití buněčných kultur při testování vlastností biomateriálů
- zavedení metod kultivace vybraných linií buněk
- příprava kombinovaných organicko-anorganických částic
- testování interakcí studovaných biopolymerů a nanočástic s buněčnými kulturami
- testování cytotoxicity.

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.

Ivana Maslonková
Student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

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

ABSTRAKT

Bakalárska práca bola zameraná na zavedenie techník kultivácie ľudských buniek in vitro a optimalizácii ich využitia v testoch cytotoxicity, prípadne na štúdium interakcií s biomateriálmi a s pripravenými organicko-anorganickými nanočasticami. V teoretickej časti boli opísané základné podmienky kultivácie, charakteristika keratinocytov ako bunkových kultúr vhodných pre testovanie, základné charakteristiky pripravovaných častíc a krátka rešerš o najpoužívanejších testoch pre zisťovanie toxicity charakterizovaných častíc. V experimentálnej časti bola prevedená optimalizácia prípravy strieborných častíc, kde bolo ako najvhodnejšie redukčné činidlo vybraná maltóza. Priemerná veľkosť takto pripravených častíc bola 35 nm. V práci bola testovaná aj možnosť prípravy kombinovaných organicko-anorganických častíc. Pripravené boli lipozómové častice, PHB častice, alginátové častice a chitozanové častice, do ktorých boli enkapsulované pripravené strieborné nanočastice. Ako najlepšie z pripravených kombinovaných častíc boli vyhodnotené lipozómové častice pripravené pomocou ultrazvuku. Ako bunkové línie pre skúmanie interakcií častíc s humánnymi bunkami boli vybraté ľudské keratinocyty. V rámci práce boli zavedené metódy kultivácie a pasážovania keratinocytov, boli optimalizované podmienky práce s bunkovými kultúrami a ich využitia k testovaniu cytotoxicity pomocou MTT testu.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

keratinocyty, cytotoxicita, biomateriály, organicko-anorganické častice, nanočastice

ABSTRACT

The bachelor thesis was focused on introducing of techniques of cultivation of human cells in vitro and optimization of their uses in variety of cytotoxicity tests. Further, in this work were studied also interactions of cells with biomaterials and prepared organic-inorganic nanoparticles. In the theoretical part the basic conditions of cell cultivation, the characteristics of keratinocytes as cell cultures, basic characteristics of particles and also short search about the most used tests of cytotoxicity on various cells systems were described. The experimental part was focused on the optimizing the preparation of silver particles, where maltose was chosen as the most appropriate reduction agent. The average size of these prepared particles was 35 nm. The possibility of preparation of combined organic-inorganic particles including liposome particles, PHB particles, alginate particles and chitosan particles was also tested in the thesis. Later, the silver nanoparticles were encapsulated into these organic-inorganic particles as an inorganic component. The liposome particles prepared by ultrasound were evaluated as the most stable of all the other prepared particles. Human keratinocytes were chosen as the cell cultures that were needed for the observation of the particle interactions with human cells. In this work basic methods of cell cultivation and passage were introduced. Conditions of experimental work in cell culture laboratory were setting and possible application of cell cultures to cytotoxicity testing by MTT was tested.

KEYWORDS

keratinocytes, cytotoxicity, bio-materials, organic-inorganic particles, nanoparticles

MASLONKOVÁ, I. *Studium interakcí biomateriálů s humánními buňkami*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. XY s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Ďakujem vedúcej mojej diplomovej práce, prof. RNDr. Ivane Márovej, CSc., za cenné rady, pomoc pri experimentoch a pri spracovávaní tejto práce. Taktiež ďakujem Ing. Petre Matouškové za priateľskú spoluprácu, ochotu a trpezlivosť počas celej doby práce v laboratóriu.

Okrem odbornej spolupráce si cením morálnu podporu počas štúdia, za ktorú vďačím mojej rodine.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1	BUNKOVÉ KULTÚRY	9
2.1.1	<i>Primárne kultúry</i>	<i>9</i>
2.1.2	<i>Bunkové kmene</i>	<i>9</i>
2.1.3	<i>Bunkové línie</i>	<i>9</i>
2.2	KULTIVÁCIA ĽUDSKÝCH BUNIEK	10
2.2.1	<i>Keratínocyty</i>	<i>10</i>
2.2.2	<i>Fibroblasty</i>	<i>11</i>
2.3	NANOČASTICE	11
2.4	LIPOZÓMY	12
2.4.1	<i>Príprava lipozómov</i>	<i>12</i>
2.4.1.1	<i>Metóda TLE</i>	<i>12</i>
2.4.1.2	<i>Ultrazvuková enkapsulácia</i>	<i>12</i>
2.4.1.3	<i>Odparovanie na reverznej fáze</i>	<i>12</i>
2.5	CHITIZÁNOVÉ ČASTICE	12
2.6	STRIEBORNÉ ČASTICE	13
2.7	POLYHYDROXYBUTYRÁT	15
2.8	NANOTOXICITA A OXIDATÍVNY STRES	15
2.9	VÝZNAM TESTOVANIA A KLASIFIKÁCIA TESTOV	16
2.9.1	<i>MTT</i>	<i>16</i>
2.9.2	<i>XTT</i>	<i>17</i>
2.9.3	<i>WST (Water-soluble Tetrazolium salts)</i>	<i>17</i>
2.9.4	<i>Resazurín redudujúci test</i>	<i>18</i>
2.9.5	<i>ATP test</i>	<i>18</i>
2.9.6	<i>LDH test</i>	<i>19</i>
2.9.7	<i>Kaspáza test</i>	<i>19</i>
2.9.8	<i>DCF test</i>	<i>19</i>
2.9.9	<i>ELISA</i>	<i>19</i>
3	CIEĽ PRÁCE	21
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	22
4.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	22
4.2	PRÍSTROJE A POMÔCKY	22
4.3	METÓDY PRÍPRAVY ČASTÍČ	23
4.3.1	<i>Príprava strieborných častíc</i>	<i>23</i>
4.3.2	<i>Príprava lipozómov</i>	<i>23</i>
4.3.3	<i>Príprava PHB častíc</i>	<i>23</i>
4.3.4	<i>Príprava chitizánových častíc</i>	<i>24</i>
4.3.5	<i>Príprava alginátových častíc</i>	<i>24</i>
4.4	OPTIMALIZÁCIA METÓDY FILTRÁCIE LIPOZÓMOV	24

4.5	STANOVENIE KONCENTRÁCIE FOSFOLIPIDOV POMOCOU STEWARTOVÁ TESTU	24
4.6	STANOVENIE VEĽKOSTI A STABILITY ČASTÍČ POMOCOU DLS A ZETA POTENCIÁLU	25
4.7	STANOVENIE VEĽKOSTI ČASTÍČ SPEKTROFOTOMETRICKY	25
4.8	KULTIVÁCIA ĽUDSKÝCH EPIDERMÁLNYCH KERATINOCYTOV	25
4.9	POSTUP MTT TESTOVANIA.....	26
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA	27
5.1	OPTIMALIZÁCIA PRÍPRAVY STRIEBORNÝCH ČASTÍČ	27
5.2	OPTIMALIZÁCIA PRÍPRAVY ORGANICKO-ANORGANICKÝCH ČASTÍČ	30
5.3	STANOVENIE VEĽKOSTI A ZETA POTENCIÁLU ČASTÍČ	33
5.3.1	<i>Stanovenie veľkosti častíc pomocou DLS-analyzátoru</i>	<i>33</i>
5.3.2	<i>Porovnanie stability častíc pomocou zeta potenciálu</i>	<i>36</i>
5.4	VIZUÁLNE ZHODNOTENIE VEĽKOSTI ČASTÍČ.....	37
5.5	METÓDA KULTIVÁCIE BUNKOVÝCH KULTÚR	39
5.5.1	<i>Optimalizácia MTT testu</i>	<i>39</i>
6	ZÁVER.....	42
7	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	44
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	49

1 ÚVOD

Zavádzanie nových liečiv, masťí a kozmetiky do obehu pre bežných spotrebiteľov je v dnešnej dobe striktnejšie ako tomu bolo kedysi. Látky, ktoré sú v obsahu daných produktov sa musia podrobiť viacerým testom, predtým než dostanú povolenie, a to testom genotoxicity a cytotoxicity. Tieto kroky, ktoré vedú k ich uvedeniu na trh sú opatrené vyhláškami a zákonmi Európskej únie.

S príchodom nanomateriálov a nanočastíc je pre potenciálne zdravotné riziká potrebné takisto zaviesť toxikologický výskum týchto nových častíc. Ako už bolo spomenuté, pri zavedení nanomateriálu do spotrebiteľského obehu musí prejsť najskôr hodnoteniami na základe testovania kvôli bezpečnosti pre ľudské zdravie.

Metódy *in vitro* sú ideálne pre tento nanotechnologický výskum, pretože vytvárajú reprodukovateľné výsledky rýchlo a lacno bez použitia živých zvierat. Jednoduché metódy *in vitro* sú tak veľmi cenné pre počiatočné vyhodnotenie očakávanej biokompatibility nových nanočastíc.

Cieľom predkladanej bakalárskej práce je otestovať využitie kožných buniek pre interakciu biomateriálov v testovaní cytotoxicity. Zvolená problematika je skúmaná pomocou použitia MTT testu, ktorý testuje viabilitu keratínocytov ľudskej pokožky vystavených pôsobeniu pripravených častíc v rozmeroch pod jeden mikrometer.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Bunkové kultúry

Bunkové kultúry sú definované ako bunky izolované zo živočícha (vrátane človeka) alebo z rastliny, ktoré sa množia a rastú v priaznivom umelom prostredí. Z tkaniva môžu byť odobrané priamo a následne sa delia enzymaticky, mechanickými prostriedkami pred kultiváciou, môžu byť odvodené z bunkovej línie alebo z bunkových línii, ktoré boli preukázané [1].

Kultúry buniek dnes zaraďujeme medzi súčasť základnej techniky používanej v primárnom aplikovanom výskume aj vo výrobe. Slúžia ako zdroj materiálu predovšetkým pre pokusy, kedy sa stávajú typovo porovnateľné s biologickými modelmi, ako napr. laboratórne zvieratá [2]. Ich využitie vo vede je prínosné najmä kvôli schopnosti produkcie klonov s rovnakým genotypom vo všetkých vytvorených bunkách, ďalej sa využívajú pre výrobu molekulových bielkovín a peptidov [1],[3]. Z hľadiska životnosti sa bunkové kultúry delia do troch skupín: primárne kultúry, bunkové kmene a bunkové línie [3].

2.1.1 Primárne kultúry

Sú to genotypovo definované bunky, ktoré sú prvotne izolované z tkaniva a množia sa za vhodných podmienok, kým nespotrebiť všetok dostupný substrát, čo limituje ich životnosť [2],[4]. Vo fáze, keď je substrát takmer spotrebovaný, bunky musia byť prenesené do druhej nádoby s čerstvým rastovým médium (pasážovanie), aby sa zväčšil priestor pre ďalšiu rast [4]. Hlavným cieľom primárnych kultúr je vyselektovať vhodné bunky, ktoré sú najlepšie prispôbené daným podmienkam. Kultúry buniek presunuté do druhého živného média už nazývame subkultúrou.

Primárne bunkové kultúry by sme typovo mohli rozdeliť na: adhezívne a suspenzné. Adhezívne vyžadujú pre svoj rast prostredie, kde sa môžu uchopiť o pevnú podložku. Tieto bunky sú väčšinou odvodené z tkanív orgánov, ako sú obličky, kde sú nepohyblivé a vložené v spojivovom tkanive. Suspenzné bunky nepotrebiť pre svoj rast pevné ložisko a sú odvodené z buniek krvného systému, pretože tieto bunky sú tiež suspendované v plazme *in vitro*, zaraďujeme sem napr. lymfocyty [5].

2.1.2 Bunkové kmene

Bunkové kmene sú odvodené z buniek primárnej kultúry, bunkovej línie selekciou alebo klonovaním buniek, ktoré majú špecifické vlastnosti a charakteristiku a musia byť definované [1]. Ide o kultúry, ktoré majú diploidný charakter a vydržia sa deliť v priemere 40-50 delení a potom dochádza k proliferácii [2].

2.1.3 Bunkové línie

Sú populáciou buniek z mnohobunkového organizmu, ktoré by za normálnych okolností nepodliehali proliferácii, ale vzhľadom k mutáciám nedochádza k bunkovému starnutiu, čiže sa množia donekonečna. Mutácie sú prirodzené pochody bunky, ale taktiež môžu byť experimentálne vyvolané. Bunkové línie sa teda môžu pestovať dlhšiu dobu *in vitro*. Proces, pri ktorom sa bunka stáva nesmrteľnou sa nazýva transformácia. Bunky sa používajú na testovanie toxicity zlúčenín a liečiv, produkcie eukaryotických proteínov atď [6].

2.2 Kultivácia ľudských buniek

Pri kultivácii buniek sa bunky nachádzajú mimo svojho prirodzeného prostredia, a preto pri kultivácii potrebujú prísun energie a jej zdrojov pre metabolické procesy. Práca s bunkovými kultúrami si vyžaduje vyškolený personál a vybavené laboratórium. Zásadná podmienka pre kultiváciu je tiež sterilita prostredia, ktorá zabraňuje kontaminácii. Súčasťou laboratória pre kultiváciu buniek by mal byť laminárny box, inkubátor s riadenou atmosférou, centrifúga, autokláv a hlbokomraziaci box [6].

Kultivačné podmienky sa značne líšia pre každý typ bunky, ale v nádobe na kultiváciu sa vždy nachádza: substrát alebo médium, rastové hormóny a chemicko-fyzikálne prostredie. Podmienky pri kultivácii by mali, čo najpresnejšie napodobniť fyziologické podmienky *in vivo*. Nemenej zásadnou podmienkou je kultivačná teplota buniek. Bunky sa spravidla kultivujú pri blízkej teplote zdrojového organizmu, pri ľudských bunkách je to teda 37 °C [7].

Ďalším dôležitým parametrom pre kultiváciu ľudských buniek je kultivačné médium, ktoré sa skladuje v priestoroch bez svetla a pri teplote približne 4°C [6]. Dodáva bunkám živiny, musí obsahovať vhodné koncentrácie látok pre život bunky. Medzi najvýznamnejšie látky obsiahnuté v médiách patria anorganické soli, sacharidy, vitamíny, bielkoviny, niektoré peptidy, lipidy, mastné kyseliny a stopové prvky. Médium sa spravidla mení dvakrát až trikrát týždenne. Rastové médium sa dá kúpiť už ako hotový produkt alebo kúpiť vo forme polotovarov, ktoré sa namiešajú podľa uvedeného postupu. Obidve možnosti majú svoje výhody aj nevýhody, čo sa odzrkadľuje na cene, náročnosti prípravy a čase prípravy média. Hotové média bývajú spravidla drahšie, nakoľko sa vynecháva úprava produktu, čo zahŕňa nastavenie pH roztoku, nariadenie spravidla koncentrovaného roztoku sterilnou vodou a doplnenie chýbajúcich zložiek [2]. Komerčné média sa dodávajú sterilné, čiže ďalšia sterilizácia v laboratórium nie je potrebná, ak to nevyžadujú okolnosti [7].

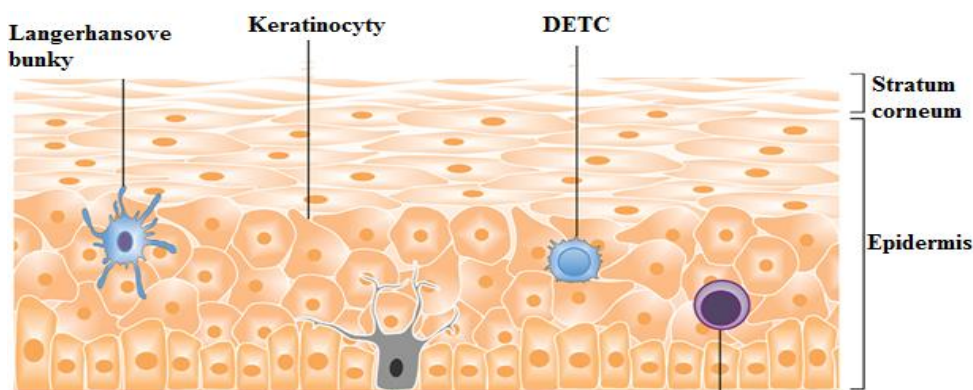
Aby sa predišlo kontaminácii buniek a prostredia, je potrebné pracovať v sterilnom prostredí. Pri kultivácii rozlišujeme dva pojmy: dezinfekcia a sterilita. Dezinfekcia zahŕňa postupy vyhubenia vegetatívnych foriem mikroorganizmov v okolí, zatiaľ čo sterilizáciou sa vyhubia všetky mikroorganizmy počnúc cystami a spórmi [2]. Spôsoby sterilizácie sa delia na fyzikálne a chemické. Medzi fyzikálne zaraďujeme suché teplo (plameň), vlhké teplo (autokláv), pasterizáciu, filtráciu a UV žiarenie. Chemická cesta zahŕňa použitie prchavých látok, ako sú formaldehyd a etylénoxid. Medzi dezinfekčné prostriedky patria prípravky s obsahom halogénov, oxidačné činidlá (H_2O_2), alkoholy, aldehydy, deriváty fenolu a organické amóniové soli [8].

2.2.1 Keratínocyty

Epidermálne keratínocyty zaujímajú špeciálnu funkciu separácie organizmu od jeho vonkajšieho prostredia [9]. Sú súčasťou epidermis, kde tvoria najpočetnejšiu skupinu buniek, ktoré vytvárajú bielkovinu keratín – hlavná stavebná zložka pokožky. Keratínocyty vznikajú z kmeňových buniek v bazálnej vrstve epidermis, nasleduje kontinuálne delenie, ktoré sa po určitom čase zastaví a živé bunky sa premenia na mŕtve bunky korneocyty, ktoré sú na povrchu pokožky odstraňované. Celý proces diferenciácie kožných buniek sa nazýva keratinizácia a trvá 26 – 40 dní [10].

Založenie *in vitro* keratínocytových kultúr slúži ako prerekvizita pre štúdium molekulárnych mechanizmov rastu a diferenciácie. Tieto štúdie sú základom pochopenia patogenézy dermatologických porúch a rozvoja pokrokových liečebných postupov v génovej terapii [11]. Prvé pokusy s kultiváciou tkanivových kultúr sa začali v 80. rokoch 20. storočia a na prelome 20. a 21. storočia nastal mohutný rozvoj tkanivového inžinierstva. Kultivácie tkanív slúžia najmä na testovanie liečiv a materiálov pre klinické a terapeutické účely [12].

Keratínocyty sa stali hlavným bodom záujmu pri testovaní biomateriálov na kožnú dráždivosť na základe ich polohy v epidermálnej časti, dispozícii udržania integrity bariéry stratum corneum a schopnosti produkovať rad zápalových látok [13].



Obr. 1: Schematická ukážka výskytu keratínocytov v epidermis [12].

2.2.2 Fibroblasty

Fibroblasty sú najčastejšie vyskytujúce sa bunky vo väzive a zároveň najvýznamnejšie kvôli svojej produkcii medzibunkovej hmoty. Tieto metabolicky aktívne bunky majú pretiahnutý tvar, vytvárajú vretenovité a hviezdicovité štruktúry, ktoré sa uchytávajú na povrch väzivových vlákien. Zlé hojenie rán a jaziev upozorňuje na nedostatok fibroblastov, ktoré sú zdrojom hlavného materiálu pre zacelenie tkanivových defektov [14]. Fibroblasty boli medzi prvými typmi buniek, ktoré boli rozmnožované ako bunkové kultúry, a to predovšetkým preto, že vyrastajú rýchlo z tkanivového explantátu a zároveň sú prepojené s ostatnými funkčnými proteínmi, ktoré vytvárajú [15]. Pri testovaní biomateriálov sa sleduje proliferácia fibroblastov pri rozličných testoch [16].

2.3 Nanočastice

Nanočastice sú zhľuky atómov definované v rozmeroch od 1 nm do 100 nm. Môžu byť v podobe 1D, 2D a 3D [13]. Tieto častice majú v daných rozmeroch odlišné vlastnosti, než tie isté častice v makro-rozmeroch. V dôsledku zmenšenia častice na nano- rozmer, sa zmení povrch častice, atómy na povrchu budú mať vo svojom okolí menej susedných atómov, a tým sa zvýši ich povrchová energia, čo spôsobí väčšiu reaktivitu nanočastice [17].

Zmenia sa ich charakteristické vlastnosti a to optické, fyzikálno-chemické, katalytický účinok a tvar. V dôsledku týchto zmien sa predpokladá, že nastávajú aj odchýlky vlastností pri interakcii s ostatnými atómami alebo bunkami. Špecifické vlastnosti nanočastíc ich predurčujú k rozsiahlym aplikáciám: pigmenty, liečivá, katalyzátory, kozmetické prípravky, tkanivové inžinierstvo, nosiče liečiv a génov, biodetekcia patogénov, deštrukcia tumorových buniek, antibakteriálne účinky, antimykotické účinky apod. [18].

2.4 Lipozomy

Lipozomy sú vezikulárne systémy obsahujúce fosfolipidovú dvojvrstvu ako bunkové membrány, ktoré pozostávajú z hydrofilnej a hydrofóbnej časti, ktorá obsahuje dlhý uhlíkovodíkový reťazec. Na základe podobnosti lipozómovej membrány s kožnou bariérou sa lipozomy do ľudskej pokožky začleňujú, resp. ňou prenikajú bez väčších zábran.

Hlavnou úlohou lipozomov je uľahčenie prenosu farmaceutických alebo kozmetických enkapsulovaných látok do pokožky. Ďalej sa využívajú aj na prenos proteínov, peptidov, DNA a ribozómov, ktoré sa zúčastňujú dôležitých biochemických procesov. Podľa štruktúry lipozomy rozdeľujeme na unilamelárne, oligolamelárne a multilamelárne. Ak sú zložkou lipozomov neutrálne fosfolipidy, je väčšia šanca, že dané lipozomy budú naklonené následnej agregácii, čo spôsobí rýchlejšiu sedimentáciu častíc [19].

2.4.1 Príprava lipozomov

2.4.1.1 Metóda TLE

Pri tejto metóde sa vytvorí zmes zo sójového lecitínu a cholesterolu, ktorá sa následne zmieša s organickým rozpúšťadlom (metanol a chloroform), ktoré sa odparí na vákuovej rotačnej odparke. Po odparení rozpúšťadla sa na stene banky vytvorí fosfolipidový film. Do banky sa pridá destilovaná voda, ktorá zapríčiní bobtnanie fosfolipidového filmu a spontánne sa začnú vytvárať lipozomy s rozmanitou veľkostnou škálou. Aby sa predišlo polydisperzite vzniknutých lipozomov, ich zmes sa podrobí ultrafiltrácii cez polykarbonátové membrány [20].

2.4.1.2 Ultrazvuková enkapsulácia

Tento spôsob sa používa pre dosiahnutie homogénnej zmesi vzniknutých lipozomov, tzn. pre dosiahnutie úzkej distribúcie veľkostí lipozomov. Ako prvý sa pripraví vodný roztok enkapsulovanej látky, ku ktorému sa pridá lecitín a cholesterol a pomocou ultrazvuku sa zmes premiešava do vzniku lipozomov [20].

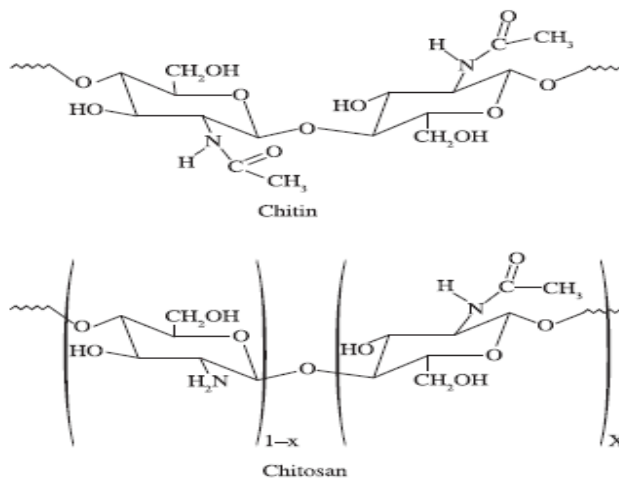
2.4.1.3 Odparovanie na reverznej fáze

Vodný pufor sa priamo zavedie do zmesi organického rozpúšťadla a fosfolipidov za vzniku reverznej micely. Organické rozpúšťadlo sa rovnako ako pri metóde TLE odparí, nie však na vákuovej rotačnej odparke, ale za zníženého tlaku. Po tomto procese sa reverzná micela rozpadne za vzniku fosfolipidových dvojvrstiev. Tieto častice môžu byť pripravené z rôznych typov lipidov alebo zmesi lipidov. Podstatná časť vodnej fázy sa zachytí do vnútra častíc, čo zvyšuje enkapsulačnú efektivitu makromolekulárnych látok rozpustených vo vodnej fáze [20].

2.5 Chitozánové častice

Chitín je hlavnou štruktúrnou polysacharidovou jednotkou článkonožcov, napr. schránky morských kreviet, krabov a druhý najrozšírenejší polysacharid po celulóze. Odhaduje sa, že 10^{10} - 10^{12} ton chitínu sa nasyntetizuje ročne. Z hľadiska priemyselnej výroby je chitín neatraktívny kvôli jeho slabej rozpustnosti. Avšak priemysel sa sústreďuje na výrobu chitozánu, čo je vlastne biomateriál pripravený deacetyláciou polysacharidových častí chitínu. Chitín je v biomase úzko spojený s ďalšími zložkami, ako sú proteíny, lipidy, minerály a pigmenty, pre optimalizáciu chitínu na biologické aplikácie musia byť tieto zložky

kvantitatívne odstránené. Pri demineralizácii sa používajú silné kyseliny, napr. kyselina chlorovodíková a dusičná, pri deprotonizácii vodný roztok hydroxidu sodného [21],[22],[23],[24].



Obr. 2: Štruktúra chitínu a chitozánu [25].

Chitozán sa skladá z molekúl N-acetyl-D-glukosamínu, ktoré sa spájajú 1,4- β -glykozidickou väzbou. Štruktúra je podobná celulóze, avšak na uhlíku C₂ sa namiesto hydroxylovej skupiny viaže acetamidová skupina. Vykazuje dobrú biokompatibilitu, biodegradáciu a hojivé účinky, a preto je najmä súčasťou kozmetiky a medicínskych materiálov. Častice daného polysacharidu možno pripraviť začlenením polyaniontu TPP, ktorý javí netoxicitu, do roztoku chitínu za stáleho miešania. Ďalšie aplikácie chitozánových častíc sú: antibakteriálne činidlá, nosiče pre uvoľnenie proteínov a liekov, nosný transportný systém pre vakcíny, zvýšenie rastu kožných buniek, konzervačné účely, antimikrobiálne textílie pre výrobu oblečenia pre zdravotníctvo a ďalších odborníkov. Z nanočastíc sa môžu pripraviť aj nanovlákná pomocou elektrospinningu. Ďalšou efektívnym krokom môže byť enkapsulácia bioaktívnych látok ako sú probiotiká, vitamíny a enzýmy do chitozánovej štruktúry [21],[22],[23],[24].

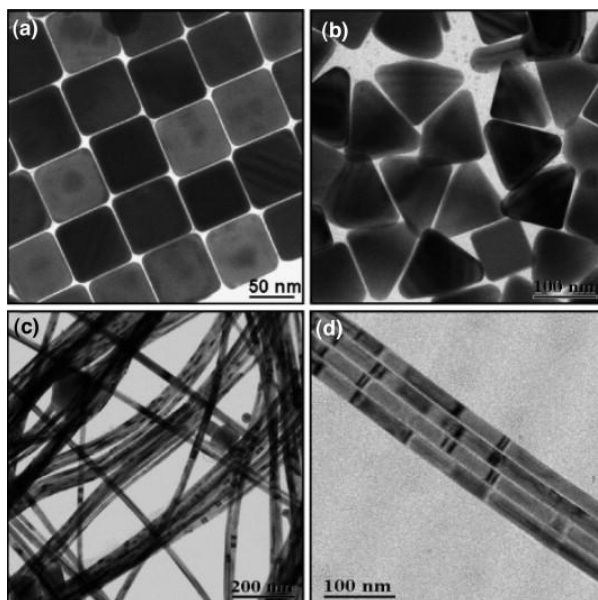
2.6 Strieborné častice

Všeobecne nanočastice kovového charakteru môžu byť pripravené a stabilizované chemickými a fyzikálnymi metódami, ako je chemická redukcia, elektrochemické metódy a fotochemická redukcia, ktorá je najviac rozšírená. Štúdie ukazujú, že veľkosť, morfológia a vlastnosti (fyzikálne a chemické) sú silne ovplyvnené experimentálnymi podmienkami, kinetikou interakcií medzi kovovými iónmi s redukujúcimi činidlami a procesom adsorpcie redukujúceho činidla [26].

Striebro je najznámejšie najmä ako katalyzátor oxidácie metanolu na formaldehyd a etylénu na etylénoxid. Koloidné striebro je zvlášť zaujímavé kvôli charakteristickým vlastnostiam, ako je dobrá vodivosť, chemická stabilita, katalytická a antibakteriálna aktivita. Najbežnejší postup prípravy je chemická redukcia, kde reagenty sú elementárny vodík, citrát, askorbát a sacharidy. Pri redukcii dochádza k prijatiu elektrónu atómu Ag⁺ za vzniku neutrálneho atómu Ag⁰ a následne k aglomerácii do oligomérnych klastrov, ktoré vedú k tvorbe AgNPs. Hlavný parameter, ktorý určuje v najväčšej miere aglomeráciu častíc je zeta

potenciál. Keď sú koloidné častice oveľa menšie než vlnová dĺžka viditeľného svetla, roztok má žltú farbu.

Riadená syntéza AgNPs je založená na procese dvojkrokovej redukcie. Pri prvej redukcii sa použije silné redukčné činidlo s cieľom produkcie malých častíc, ktoré sú v sekundárnej fáze zväčšené slabým redukčným činidlom. Škála častíc v rozsahu veľkosti 20-45 nm sa zväčšuje približne na veľkosť 120-170 nm [26],[27].



Obr. 3: AgNPs (a) štvorce, (b) trojuholníky, (c) nepravidelné vlákna (d) pravidelné vlákna [26].

Strieborné častice sú známe aj svojou antimikrobiálnou vlastnosťou, čím si vyslúžili pozornosť v medicínskych aplikáciách a dokonca bolo dokázané, že zabráňujú naviazaniu HIV vírusu do hostiteľských buniek. Využitie našli aj pri vodnej a vzduchovej filtrácii s cieľom eliminácie mikroorganizmov [26]. O mechanizme antimikrobiálneho účinku sa stále dá diskutovať, nakoľko nebol doteraz presne vysvetlený. Jednou z hypotéz je, že nanočastice striebra majú schopnosť ukotvenia do bakteriálnej bunkovej steny a následne preniknutie ňou, čím spôsobia štrukturálne zmeny v bunkovej membráne, ako je jej priepustnosť a smrť bunky. Popri štrukturálnych zmenách sa na povrchu vytvárajú “jamy”, kde dochádza k akumulácii nanočastíc. Tvorba voľných radikálov nanočasticami sa môže považovať za ďalší z pohľadov na problematiku. Štúdie vykonané pomocou ESR spektrometrie naznačujú, že voľné radikály strieborných častíc pri kontakte s baktériami spôsobia poškodenie bunkovej membrány, tým že z nej vytvoria pórovitú štruktúru, ktorá vedie k lýze bunky [27].

Na základe špecifickým fyzikálno-chemickým vlastnostiam strieborných častíc sa očakáva, že budú mať v budúcnosti každodenné využitie, avšak sú štúdie, ktoré tieto predpoklady popierajú. Usudzujú, že je majú škodlivý efekt na ľudské bunky. Odhaduje sa, že tona striebra uniká ročne do ovzdušia priemyselnou cestou a vo vode sa nachádzajú jeho voľné radikály, ktoré spôsobujú modro-šedé zafarbenie očí, tzv. argyriózu. Vodné roztoky prítomných častíc zas môžu viesť k poškodeniu pečene, obličiek, zažívacieho traktu a dokonca k zmene krvných buniek [27].

2.7 Polyhydroxybutyrát

Polyhydroxybutyrát je jedným z polymérov, ktoré sa začali využívať v biomedicínskych aplikáciách na základe jeho vlastností, ktoré sa s vývojom nových technológií začali požadovať. Jeho atraktivita spočíva v biodegradovateľnosti, biokompatibilite a schopnosti sa ľahko modifikovať. Jedným z príkladov biodegradácie PHB je proces hydrolytickej degradácie jeho štruktúry. Hydrolytickou degradáciou PHB *in vitro* vznikne monomér D-3-hydroxybutánovej (D-3-hydroxymaslovej) kyseliny, ktorý je bežnou zložkou krvi a spolu s acetoacetátom a acetónom predstavuje jednu z troch ketolátok produkovaných v priebehu ketogenézy v tele. Z tohto vyplýva, že PHB môže byť dobre tolerovaná látka *in vivo* [28].

Prítomnosť tohto polyméru bola preukázaná v baktérii *Bacillus megaterium*, kde slúžil ako zásobná forma energie a uhlíku. Zaraďuje sa medzi polyhydroxyalkanoáty a jeho mechanické vlastnosti sa výrazne zlepšia za vzniku kopolyméru s iným polymérom. Tvorba kopolyméru výrazne ovplyvní bod topenia polyhydroxybutyrátu [29].

2.8 Nanotoxicita a oxidatívny stres

S vonkajším prostredím sú v kontakte najviac pľúca, gastrointestinálny trakt a ľudská pokožka. Z tejto trojice sú však najzraniteľnejšie prvé dve spomenuté, zatiaľ čo koža je všeobecne známa ako prekážka pre vstup cudzorodých látok a patogénov. Vzhľadom k svojej malej veľkosti sa môžu nanočastice dostať do obehového a lymfatického systému, a v konečnom dôsledku k telesným tkanivám a orgánom [30]. Niekoľko nedávnych štúdií potvrdilo, že aj napriek ich veľkosti neputujú voľne do biologického systému.

Príkladom sú citrátom stabilizované zlaté nanočastice, ktoré sa dostali cicavčích buniek, no neboli schopné preniknúť do cytoplazmy a jadra, kde by mohli spôsobiť poškodenie na molekulárnej úrovni, nakoľko kovové častice sú výbornými katalyzátormi [31].

Cytotoxicitu predurčuje súčinnosť viacerých faktorov, závisí to na tvare, veľkosti, zloženia a netreba zabúdať aj na fyziológiu a aktuálny stav organizmu [30],[31]. Vplyv rozmeru nanočastíc nie je v ľudskom organizme dokonale preskúmaný na molekulárnej úrovni. Sú dôkazy cytotoxicity u potkanov, kde zavedenie nanočastíc striebra do pečenečných buniek v nízkej koncentrácii spôsobili oxidatívny stres a znehodnotenie mitochondrie. Pri skúmaní *in vitro* u myši zárodočnej línie kmeňových buniek nastala porucha mitochondriálnej funkcie a únik častíc cez bunkové membrány. Jeden z výskumov u ľudí dokazuje, že môže byť u mužov cez krv narušená semenníková bariéra, kde sa začnú častice ukladať a budú mať negatívny vplyv na spermie. Treba však ohľadávať na to, že všetky tieto experimenty boli skúmané pri *in vitro* podmienkach, čo sa nedá exaktne porovnať s *in vivo* podmienkami [27].

Oxidatívny stres je stav, pri ktorom dochádza k zmene pomeru prooxidačných faktorov a antioxidačných faktorov. Táto zmena môže nastať v dôsledku nadmernej tvorby prooxidačne pôsobiacich látok alebo nedostatočnou činnosťou antioxidačných systémov. Medzi prooxidačné faktory zaraďujeme voľné radikály, ktoré obsahujú nespárené elektróny a taktiež aj molekuly, ktoré sú schopné produkovať radikály alebo svojím katalytickým účinkom napomáhať produkcii radikálov. Antioxidačné faktory bránia organizmus pred vplyvom voľných radikálov a tým zabraňujú oxidatívne stresu. Molekuly s voľným elektrónom môžu spôsobiť zmenu štruktúry a funkcie biologicky významných molekúl (sacharidy, lipidy, proteíny, DNA) organizmu [32].

2.9 Význam testovania a klasifikácia testov cytotoxicity

Ako už bolo spomenuté v kapitole 2.3, nanomateriály menia výrazne svoj charakter, ak sú upravené do nano-rozmeru. S príchodom nanomateriálov a nanočastíc sa zvýšila teda miera zdravotného rizika obyvateľstva. Pre potenciálne zdravotné riziká je potrebné zaviesť toxikologický výskum nových častíc pre zabezpečenie ochrany živých organizmov. Pre porovnanie niektoré vírusy merajú 10-300 nm, pričom dĺžka 1 nm sa dá prirovnať k 10 atómom vodíka [33].

Pri zavedení nanomateriálu do spotrebiteľského obehu musí prejsť najskôr hodnoteniami na základe testovania kvôli bezpečnosti pre ľudské zdravie. Toto opatrenie je len vyústením situácie, ktorá nastáva v domácnostiach, kde každodenne ľudia prichádzajú do kontaktu s nanomateriálmi ako súčasťou najmä kozmetiky, ktorá slúži na dopravu účinných látok do pokožky [35].

Metódy *in vitro* sú ideálne pre nanotechnologický výskum, pretože vytvárajú reprodukovateľné výsledky rýchlo a lacno bez použitia živých zvierat. Jednoduché metódy *in vitro*, ktoré produkujú špecifické a kvantitatívne merania toxicity, sú veľmi cenné pre počiatočné vyhodnotenie očakávanej biokompatibility nových nanočastíc [36].

Tab. 1: Rozdelenie testov na charakteristiku bunky (modifikovaná tabuľka) [37].

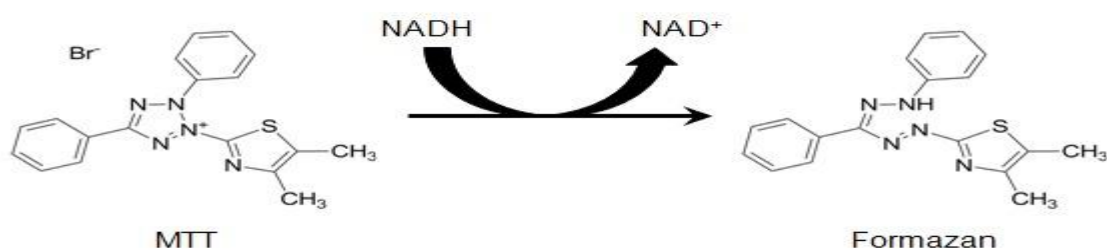
Test cytotoxicity	Princíp detekcie	Nanočastice
Životaschopnosť bunky		
MTT	kolorimetrické	uhlíkové
LDH	kolorimetrické	kovové
Annexin V	fluorimetrické	chitozánové a uhlíkové
Kaspáza	fluorimetrické	kovové
Stresová odpoveď		
DCF	fluorimetrické	uhlíkové
Zápalová odpoveď		
ELISA	kolorimetrické	uhlíkové a oxidy kovov

2.9.1 MTT

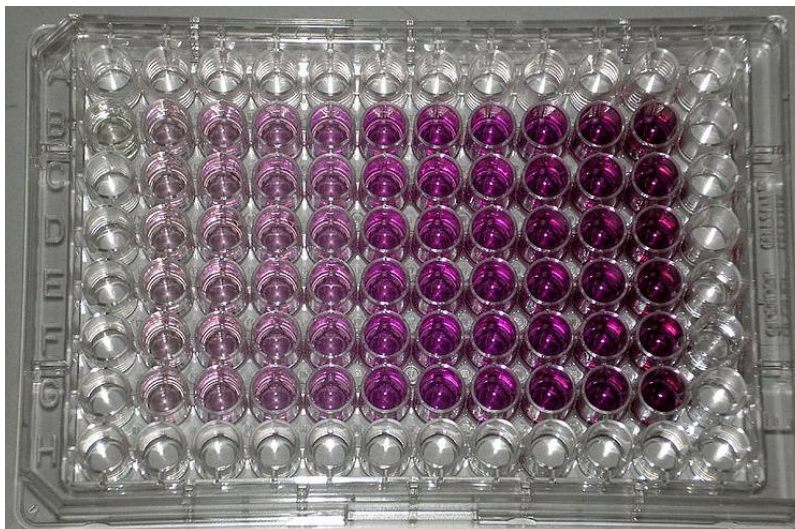
Je kolometrický test na hodnotenie bunkovej metabolickej aktivity. Žltý MTT (3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) sa mitochondriálnymi enzýmami dýchacieho reťazca redukuje na formazánový derivát fialovej farby, ktorý zostane vnútri buniek v nerozpustnej forme.

Farbivo sa uvoľní z buniek za použitia detergentu (SDS, laurolysiran sodný) a okyslenia, rozpustí sa a vznikne číry roztok k fotometrickému stanoveniu [38]. Zmeria sa absorbancia pri vlnovej dĺžke 595 nm oproti destilovanej vode. Za redukciu MTT na formazán je zodpovedná oxidoreduktáza NADH (nikotínamidadenín dinukleotid) [39].

MTT testy sa vykonávajú zvyčajne v tme, keďže reagent je svetlo senzitívny. Nevýhodou tohto testu je exocytóza kryštálov formazánu, vedie k skresleniu výsledkov [39].



Obr. 4: Štruktúra MTT a jeho redukcia na formazan koenzýmom NADH [42].



Obr. 5: Doštička po uvoľnení formazánu z buniek. Najtmavšia fialová farba odzrkadľuje najväčšiu koncentráciu buniek [38] .

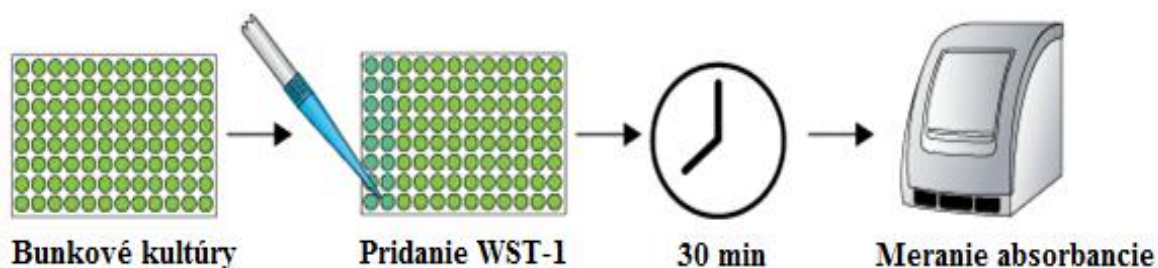
2.9.2 XTT

Tento test sa zaviedol ako obmena MTT testu, aby sa zvýšila citlivosť testovania a zvýšil dynamický rozsah. Zlúčenina (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) sa mení na soľ formazánu, ktorý je vo vode rozpustný, čiže pridanie ďalších reagentov a okyslenie nie je potrebné. Táto alternatíva vznikla zavedením pozitívneho alebo negatívneho náboja, hydroxylovej alebo sulfonátovej skupiny na fenylový kruh tetrazóliovej soli [39]. XTT je jemne žltá zlúčenina, ktorá sa po redukcii zafarbí na svetlo oranžovú farbu . Zmena farby je odzrkadená rozpadom pozitívnej kvartérnej štruktúry tetrazoliového kruhu. Redukcia XTT väčšinou býva doprevádzaná medziproduktom – elektrón-akceptórnym PMS, lebo samotná detekčná reakcia XTT by nepostačovala na zmeranie optimálnych výsledkov. Zistenia naznačujú, že PMS sprostredkúva reakciu XTT tým, že aktivuje elektróny na bunkovom povrchu alebo na mieste v plazmatickej membráne, ktoré je ľahko prístupné a vytvorí reaktívny medziprodukt, ktorý potom reaguje s XTT za vzniku formazánu [40].

2.9.3 WST (Water-soluble Tetrazolium salts)

WST sú ďalšou zo série vo vode rozpustných farbív pre MTT testy, vytvorené pre rozšírenie absorpčných spektier vzniknutých formazómov. Jedným z reagentov je WST-1 [38]. Takisto tu nastáva redukcia tetrazoliových solí na rozpustné komponenty [41]. Výhodou použitia

WST-1 je jeho rýchla odozva, výsledky sú dostupné v priebehu 2-4 hodín a ďalej analyzované spektrofotometrom [42].



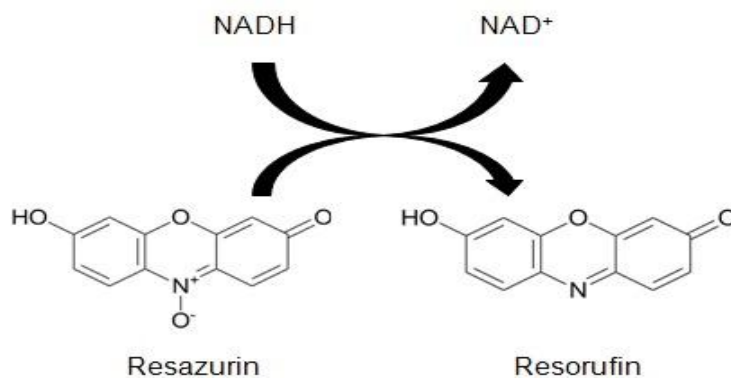
Obr. 6: Schéma merania životaschopných buniek za použitia reagentu WTS-1[43].

2.9.4 Resazurín redukujúci test

Resazurín je ďalším redoxným indikátorom, ktorý deteguje životaschopnosť buniek, môže byť rozpustený vo fyziologických roztokoch, čo sa prejaví modrým zafarbením. Zmes fyziologického roztoku a resazurínu sa priamo pridá do buniek v kultúre.

Ak má bunka funkčný metabolizmus, tak redukciou vznikne produkt resorufín, ktorý je ružový a vykazuje fluorescenciu. Nie je nutnosť v priebehu testovania prídavok medziproduktu, ale ak je prítomný, tak urýchli generáciu signálu. Fluorescenčná analýza sa preferuje voči absorpčnej kvôli vyššej citlivosti.

Inkubačná doba je obvykle 1-4 hodiny, závisí to na metabolickej aktivite buniek, type bunky, hustote buniek na jamku a iných testovacích podmienkach. Hlavné výhody sú, že resazurín je relatívne lacný a odozvy sú citlivejšie. Tento postup testovania sa tie môže spojiť s inými testami pre získanie podrobnejšieho mechanizmu cytotoxicity [44].



Obr. 7: Redukcia resazurínu [44].

2.9.5 ATP test

Je technologicky vyspelejší, kvôli metodike založenej na báze luminiscencie a umožňuje meranie toxicity in vitro, ktoré je vykonané so značnou presnosťou [45]. Meranie ATP pomocou luciferázy, ktorá produkuje fotóny svetla (svetlušky) je najčastejšie. Keď bunky strácajú celistvosť membrány, strácajú schopnosť syntetizovať ATP a tým aj endogénne ATPázy vyčerpávajú zostávajúce ATP z cytoplazmy. Hoci schopnosť luciferázy sa používa niekoľko desiatok rokov, technológovia sa snažia vynájsť detekčné činidlo, ktoré by malo dlhodobjší luminiscenčný signál. ATP test je najrýchlejší na detekciu životaschopných buniek a najcitlivejší. Luminiscenčný signál sa stabilizuje v priebehu 10 minút a po pridaní

reakčného činidla luminiskuje viac než 5 hodín. V priebehu pokusu sa živé bunky nemusia inkubovať, čo prispieva k rýchlemu sledu ostatných krokov. Možno detegovať menej než 10 buniek v jamke, a preto sa radí medzi najcitlivejšie analytické [44].

2.9.6 LDH test

LDH test je ďalší postup, ako určiť nekrózu buniek. Základný princíp je, že LDH (laktát dehydrogenáza, cytoplazmatický enzým) sa po poškodení bunky z nej uvoľní do fluidnej časti krvi alebo plazmy [46]. Uvoľnený enzým katalyzuje oxidáciu laktátu na pyruvát a súčasne sa NAD^+ redukuje na NADH. Miera zníženia NAD^+ sa meria ako zvýšenie absorbancie pri 340 nm [47].

To znamená, že hladina LDH je všeobecným indikátorom tkaniva a bunkového poškodenia. Jeho zvýšenie sa môže prejaviť aj u iných telových tekutín, kedy to indikuje prítomnosť chorôb v tele. LDH je enzým vyskytujúci sa takmer vo všetkých bunkách rovnako aj u baktérií [48].

2.9.7 Kaspázový test

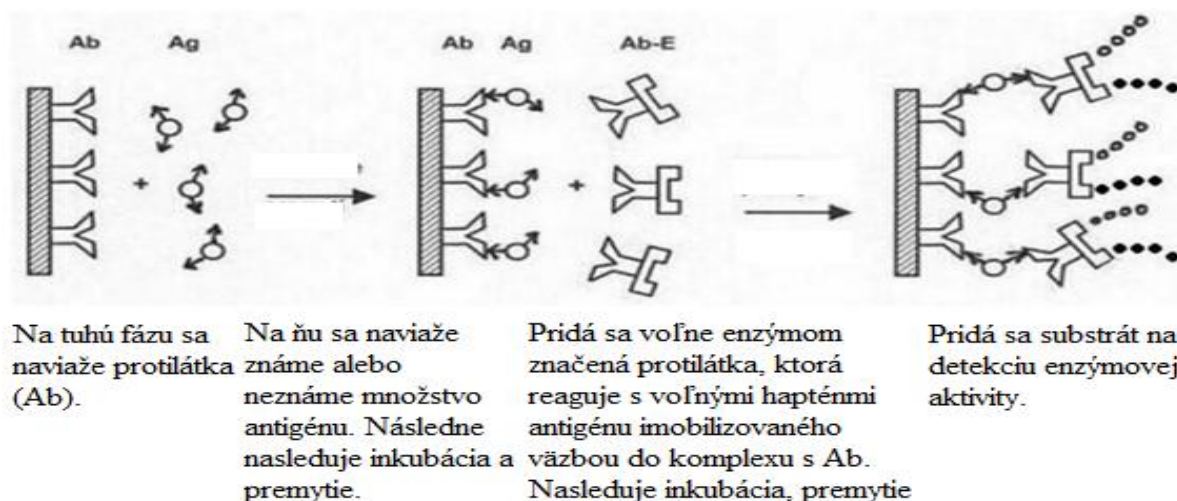
Charakteristickým rysom skorého štádia apoptózy je aktivácia enzýmov kaspáz, ktoré sa podieľajú na štiepení proteínových substrátov a následnom rozpade bunky [49]. Aktivácia kaspázy je centrálny biochemický proces [50]. Počas testovania sa používa multijamková doska [51]. Kaspázy tvoria rodinu príbuzných enzýmov, ktoré sú syntetizované ako neaktívne prekursori a sú aktivované v dôsledku signalizácie vyvolanej zvonku, ktorá môže byť vyvolaná rôznymi faktormi [52].

2.9.8 DCF test

Je založený na báze merania antioxidantu alebo ROS aktivity. Bunky sa kultivujú v 96-jamkovej doštičke a potom sa inkubujú spolu s $\text{H}_2\text{-DCF}$ (2',7'-dichlorodihydrofluoresceín diacetát), ktorý priepustný cez membránu. DCF-HA nefluoreskuje, ale v cytoplazme podlieha štiepeniu esteráz a stáva sa fluoreskujúcou molekulou DFA. Fluorescencia DFA je silne závislá na pH, navyše nanočastice na báze uhlíka (biopolyméry) môžu absorbovať svetlo a fluorescencia môže byť predčasne ukončená [37].

2.9.9 ELISA

Metóda ELISA bola prvýkrát popísaná v roku 1971 a umožňuje jednoduchú a presnú kvantifikáciu zápalových markerov v supernatante bunkových kultúr pomocou protilátok a enzymatických detekčných reakcií.



Obr. 8: Princíp sendvičovej Elisy (modifikovaný obrázok) [53].

Najčastejšie testované ľudské a myšacie zápalové markery sú chemokíny interleukín-8 (IL-8) , $\text{TNF-}\alpha$ a IL-6. V niektorých prípadoch sú merané aj IL- 1β , ako aj ostatné cytokíny a faktor stimulujúci lymfocyty. Veľa nanočastíc je vyrábaných v nesterilných podmienkach, môžu byť kontaminované baktériami alebo endotoxínami, ktoré neskôr môžu tiež vyvolať zápalovú reakciu [37].

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom bakalárskej práce bolo zavedenie techník kultivácia ľudských buniek in vitro a optimalizácie ich potenciálne využitie v testoch cytotoxicity, prípadne na štúdium interakcií s biomateriálmi a nanočasticami. Za týmto účelom boli spravené nasledujúce čiastkové kroky:

- spracovanie rešerše o kultivácii a možnostiach využitia bunkových kultúr pri testovaní vlastností biomateriálov
- zavedenie metód kultivácie vybraných línií
- príprava kombinovaných organicko-anorganických častíc
- testovanie interakcií študovaných biopolymérov a nanočastíc s bunkovými kultúrami
- testovanie cytotoxicity

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité chemikálie

3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid, Sigma-Aldrich (SRN)
Acutase (Biosera), Biotech (SRN)
Alginát sodný, Sigma-Aldrich (SRN)
Amoniak, Serva (SRN)
Antibiotic-Antomykotic (Biosera), Biotech (SRN)
Chizotán, Sigma-Aldrich (SRN)
Chlorid draselný p.a., Vitrum-LachNer (ČR)
Chlorid sodný p.a., Vitrum-LachNer (ČR)
Chlorid vápenatý p.a., Vitrum-LachNer (ČR)
Chloroform, VWR Chemicals BDH PROLABO (IRL)
Cholesterol, Serva (SRN)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Vitrum-LachNer (ČR)
Dodecylsírán sodný, Serva (SRN)
Dusičnan strieborný, Sigma-Aldrich (SRN)
Fruktóza p.a., Vitrum-LachNer (ČR)
Glukóza p.a., Vitrum-LachNer (ČR)
Hydroxid sodný p.a., Vitrum-LachNer (ČR)
Hydrogenfosforečnen disodný p.a., Vitrum-LachNer (ČR)
KGM-Gold™ Keratinocyte Growth Medium, Biotech (SRN)
Kyselina chlorovodíková 35%, Vitrum-LachNer (ČR)
Kyselina octová 98%, Vitrum-LachNer (ČR)
Laktóza p.a., Vitrum-LachNer (ČR)
Lecitín, Serva (SRN)
D-(+)-maltóza p.a., Vitrum-LachNer (ČR)
Metanol p.a., Vitrum-LachNer (ČR)
Trypanová modř, Biotech (SRN)
Polyhydroxybutyrát, Biomer (SRN)
Sephadex LH-20, Sigma-Aldrich (SRN)
Tripolyfosfát sodný, Sigma-Aldrich (SRN)

4.2 Prístroje a pomôcky

Analytické váhy – Boeco (SRN)
Automatické pipety v rôznom rozsahu objemu – Discovery (SRN) a Biohit (SRN)
Biohazard box, model Airstream, trieda II - ESCO, Biotech (SRN)
CelCulture CO2 inkubátor – ESCO, Biotech (SRN)
ELISA Reader BioTek ELx808 (USA)
Inverzní biologický mikroskop, Laboserv (ČR)
Koloidní DLS analyzátor ZetaSizer Nano ZS: Malvern (UK)
Mikrocentrifuga Sartorius – Sigma (SRN)
NanoPhotometer P-Class P 300 – Implen (DE)
Optický mikroskop a Software Dino – Capture 2.0 (ČR)

Spektrofotometr – Helios γ , Unicam (VB)

Ultrazvuk – PS02000 Ultrasonic Compact Cleaner 1,25L, PowerSonic (SRN)

Ultrazvukový homogenizátor – Bandelin Sonoplus- Sonorex Technik (SRN)

Vákuová rotačná odparka – IKA Werke R V06-ML (SRN)

Vortex – Genius 3, IKA Vortex (SRN)

4.3 Metódy prípravy častíc

4.3.1 Príprava strieborných častíc

Príprava nanočastíc striebra prebiehala v amoniakálnom prostredí za použitia redukujúcich cukrov, použité boli glukóza, fruktóza, laktóza a maltóza. Do čistej kadičky obalenej hliníkovou fóliou sa pipetovalo 5 ml roztoku dusičnanu strieborného o koncentrácii 0,9 mg/ml, pridalo sa 5 ml roztoku sacharidu o koncentrácii 3,6 mg/ml, 1,2 ml roztoku amoniaku (0,2 %) a 1 ml hydroxidu sodného (11,2 mg/ml). Celý systém sa miešal po dobu 30 minút v tme pri laboratórnej teplote za vzniku strieborných nanočastíc.

4.3.2 Príprava lipozómov

Celkovo boli vytvorené 3 druhy lipozómov: lipozómy na odparke a lipozómy pripravené pomocou ultrazvuku s použitím a bez použitia chloroformu.

U lipozómov na odparke bolo 80 mg lecitínu a 10 mg cholesterolu rozpustených v 8 ml chloroformu a 2 ml metanolu. Táto zmes sa preliala do odparovacej banky a odparila sa na rotačnej vákuovej odparke. Do banky sa pridalo 10 ml destilovanej vody a na rozpustenie filmu na stenách nádoby sa použil ultrazvuk. V prípade prípravy kombinovaných častíc s AgNPs, bol miesto destilovanej vody pridaný roztok AgNPs. Použitý bol 10-krát nariedený roztok pripravených AgNPs. V prípade prípravy ďalšieho typu kombinovaných častíc boli odcentrifugované AgNPs, pridané už do roztoku lecitínu a cholesterolu. Použitý bol 10-krát nariedený roztok pripravených AgNPs. Ďalší postup bol zhodný s prípravou prázdnych lipozómových častíc.

U lipozómov na ultrazvuku bolo 80 mg lecitínu a 10 mg cholesterolu rozpustených v 1 ml chloroformu. Táto zmes sa preliala do 10 ml destilovanej vody a na ultrazvuku bola po dobu 1 minúty homogenizovaná. V prípade prípravy kombinovaných častíc s AgNPs, bol miesto destilovanej vody pridaný 10-krát nariedený roztok pripravených AgNPs. V prípade prípravy ďalšieho typu kombinovaných častíc boli odcentrifugované AgNPs pridané už do roztoku lecitínu a cholesterolu a ďalší postup bol zhodný s prípravou prázdnych lipozómových častíc.

U lipozómov na ultrazvuku boli častice pripravené aj bez použitia chloroformu. 80 mg lecitínu a 10 mg cholesterolu boli pridané do 10 ml destilovanej vody a na ultrazvuku bola táto zmes po dobu 1 minúty homogenizovaná. V prípade prípravy kombinovaných častíc s AgNPs bol miesto destilovanej vody pridaný 10-krát nariedený roztok pripravených AgNPs. Lipozómy s obsahom chloroformu boli na záver miešané na magnetickej miešačke do úplného odparenia chloroformu.

4.3.3 Príprava PHB častíc

U prípravy PHB častíc bol využitý ultrazvuk. 10 mg PHB, 80 mg lecitínu a 10 mg cholesterolu boli rozpustené v 1 ml chloroformu. Táto zmes sa preliala do 10 ml destilovanej vody a na ultrazvuku bola po dobu 1 minúty homogenizovaná.

V prípade prípravy kombinovaných častíc s AgNPs, bol miesto destilovanej vody pridaný 10-krát nariedený roztok pripravených AgNPs. V prípade prípravy ďalšieho typu kombinovaných častíc boli odcentrifugované AgNPs pridané už do roztoku PHB, lecitínu a cholesterolu a ďalší postup bol zhodný s prípravou prázdnych lipozómových častíc. Častice boli na záver miešané na magnetické miešačke do úplného odparenia chloroformu.

4.3.4 Príprava chitozánových častíc

30 mg chitozátu bolo pridaných k 10 ml destilovanej vody s prídavkom 0,2 ml kyseliny octovej. Táto zmes bola homogenizovaná tyčovým ultrazvukom za súčasného pridávania 3 ml zrážacieho roztoku (TPP; 1 mg/ml). V prípade prípravy kombinovaných častíc s AgNPs, bol miesto destilovanej vody pridaný 10-krát nariedený roztok pripravených AgNPs.

4.3.5 Príprava alginátových častíc

30 mg alginátu bolo pridaných k 10 ml destilovanej vody. Táto zmes bola homogenizovaná tyčovým ultrazvukom za súčasného pridávania 3 ml zrážacieho roztoku (chlorid vápenatý; 1 mg/ml). V prípade prípravy kombinovaných častíc s AgNPs, bol miesto destilovanej vody pridaný 10-krát nariedený roztok pripravených AgNPs. V prípade prípravy ďalšieho typu kombinovaných častíc boli odcentrifugované AgNPs pridané do roztoku alginátu a ďalší postup bol zhodný s prípravou prázdnych častíc.

4.4 Optimalizácia metódy filtrácie lipozómov

V prípade prípravy kombinovaných organicko-anorganických častíc bola optimalizovaná metóda ich filtrácie pre oddelenie neimobilizovaných strieborných častíc. Filtrácia bola vykonaná pomocou delenia častíc v gélovej kolónke. Gélová kolóna bola pripravená pomocou Sephadex LH-20. Pripravili sa kolóny s vrstvou 4 cm gélu s priemerom 1cm. Po pripravení kolóny sa odstredila voda pomocou centrifúgy. Po odstránení vody z kolóny sa pridal 1 ml lipozómových častíc a vzorky boli ponechané sa odstred'ovaniu v centrifúge pri 600, 800, 900 otáčkach na 2 minúty pre rozdelenie častíc podľa ich veľkosti.

4.5 Stanovenie koncentrácie fosfolipidov pomocou Stewartova testu

Najprv bolo pripravené činidlo - navážka 2,7 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 3 g NH_4SCN bola rozpustená v 100 ml destilovanej vody. Na kalibráciu bolo ako štandardný roztok použitý 100 ml roztoku fosfolipidov rozpustených v chloroforme (koncentrácia fosfolipidov bola 0,1 mg/ml). Ďalej bolo do Eppendorfových skúmaviek pipetované množstvo jednotlivých roztokov podľa Tabuľky č. 2.

Tab.2: Objemy jednotlivých roztokov pipetovaných na Stewartov test.

Č. skúmavky	Štandard [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 boli dôkladne premiešané na vortexe a potom centrifugované 10 minút pri 1000 ot/min. Pomocou pipety bola z každej skúmavky opatrne odobraná spodná chloroformová vrstva a zmeraná jej absorbancia pri 485 nm v zúženej kremennej kyvete. Na meranie koncentrácie fosfolipidov bolo pipetovaných 0,5 ml roztoku pripravených lipozómov, 0,5 ml chloroformu a 1 ml ferothiokyanátu.

4.6 Stanovenie veľkosti a stability častíc pomocou DLS a zeta potenciálu

Po vhodnom zriedení vzoriek (100-krát) pripravených častíc bol 1 ml týchto vzoriek napipetovaných do kyvety a analyzovaný na prístroji Zetasizer. Metóda je založená na dynamickom rozptylu svetla (DLS, "Dynamic Light Scattering"). Merania boli vykonané dvakrát a z hodnôt bol vypočítaný priemer. Pre meranie stability pomocou zeta potenciálu bol na kyvetu pridaný elektródový nástavec.

4.7 Stanovenie veľkosti častíc spektrofotometricky

Veľkosť a množstvo pripravených strieborných častíc vo vzorke boli takisto merané pomocou spektrofotometra, kde sa merali spektrá častíc v rozmedzí od 300-600 nm. V tomto spektre sa interakciou strieborných nanočastíc so žiarením prejaví prítomnosťou tzv. plazmonického píku. Poloha a šírka plazmonického píku je závislá predovšetkým od veľkosti a tvaru nanočastice. Pre guľovité častice sa typicky pohybuje v rozmedzí 400-530 nm. Absorpčné maximum v oblasti 400 nm značí prítomnosť častíc s veľkosťou 10 nm, naopak maximum v oblasti 530 nm je typické pre strieborné častice s veľkosťou 100 nm.

4.8 Kultivácia ľudských epidermálnych keratínocytov

Keratínocyty boli kultivované v komerčnom médiu (KGM-Gold™ Keratinocyte Growth Medium). Hotové médium bolo len pred použitím vytiahnuté z chladničky a ponechané temperovať vonku na laboratórnu teplotu. Bunky v kultivačnej fľaši boli vytiahnuté v rukaviciach z CO₂ kultivačného boxu.

Pod mikroskopom bol skontrolovaný stav buniek v celej fľaštičke, či tam nie je kontaminácia a či je už fľaštička kompletne porastená bunkami. Pokiaľ nebol v fľaštičke zaznamenaný dostatočný počet buniek, bolo iba vymenené médium, v prípade keď bolo bunkami porastené celé dno fľaše, boli bunky pasážované.

Pri výmene média bolo v sterilnom boxe vyliate z fľaštičky médium a nahradilo sa 5 ml nového média. Pri pasážovaní bolo opäť z fľaštičky sterilne vyliate médium, bunky boli dvakrát až trikrát poriadne prepláchnuté pripraveným sterilným PBS pufrom (vždy cca päť mililitrov). Po prepláchnutí bolo pridané 0,5 ml enzýmu akutázy a fľaštička bola vložená do termostatu (37 ° C) na cca päť až desať minút. Potom bolo pod mikroskopom skontrolované, či došlo k odlúčeniu buniek odo dna fľaštičky. Po odlúčení všetkých buniek bol sterilne pridaný do fľaštičky cca 5ml PBS pufru a bunky v ňom boli homogenizované a prenesené do sterilnej centrifugačnej skúmavky. Potom boli bunky centrifugované (cca 5min, 360g), následne sa zliat pufor (bunky boli usadené v peletke na dne). Do centrifugačnej skúmavky bolo pridané médium, bunky v ňom boli rozsuspendované a prenesené do novej fľaštičky, prípadne rozdelené do viacerých fľaštičiek (v tomto prípade bol čistým médiom doplnený objem na 5 ml na fľaštičku. Na záver bolo skontrolované pod mikroskopom, či boli bunky naozaj v fľaštičke a fľaštičky boli vrátené do kultivačného termostatu.

4.9 Postup MTT testovania

Keď bolo vo fľaštičke dostatočné množstvo buniek, boli bunky použité na testovanie cytotoxicity pomocou MTT testu. Z fľaštičky bolo sterilne vyliate médium, bunky boli dvakrát až trikrát poriadne prepláchnuté pripraveným sterilným PBS pufrom (vždy cca päť mililitrov). Po prepláchnutí bolo pridané 0,5 enzýmu akutázy a fľaštička bola vložená do termostatu (37 ° C) na cca päť až desať minút. Potom bolo pod mikroskopom skontrolované, či došlo k odlúčeniu buniek od dna fľaštičky. Po odlúčení všetkých buniek bol sterilne pridaný do fľaštičky cca 5 ml PBS pufru a bunky v ňom boli homogenizované a prenesené do sterilnej centrifugačnej skúmavky. Potom boli bunky centrifugované (cca 5min, 360g), následne sa zliat pufor (bunky boli usadené v peletke na dne). Do centrifugačnej skúmavky bolo pridané malé množstvo média, bunky v ňom boli rozsuspendované. Následne bola spočítaná koncentrácia buniek počítaním na Bürkerovej komôrke.

Bunky boli vhodne zriedené novým médiom tak, aby ich koncentrácia bola $2 \cdot 10^4$ buniek/100 μ l. Takto pripravená suspenzia buniek bola po 100 μ l rozpipetovaná na 96-jamkovú doštičku. Doštička bola skontrolovaná pod mikroskopom, či boli bunky naozaj prenesené a na 24 hodín boli bunky v doštičke vrátené do kultivačného termostatu. Potom boli pridané (vždy po 20 μ l) sterilné testované častice v rôznych koncentráciách a následne boli bunky inkubované počas 24 hodín. Napokon bolo pridané sterilné MTT (20 μ l) v koncentrácii 2,5 mg/ml v PBS pufri a bunky boli ďalej inkubované v kultivačnom termostate počas troch hodín. Na záver bolo pridané po 100 μ l 10% roztok SDS v PBS pufri a doštička bola ponechaná v tme pri laboratórnej teplote ďalších 24 hodín. Po 24 hodinách bola zmeraná absorbanca pomocou ELISA readeru pri 560 nm.

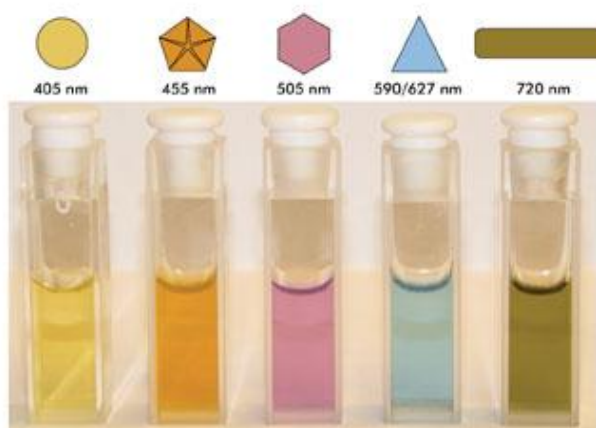
5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Optimalizácia prípravy strieborných častíc

Príprava strieborných častíc bola prevedená v kapitole 4.3.1. V priebehu prípravy bolo potrebné dbať na čistotu príslušných použitých kadičiek a ostatných preparátov, aby sa zamedzilo interakcii strieborných častíc s nečistotami. V rámci optimalizácie strieborných častíc sa ako redukčné činidlá použili: maltóza, glukóza, fruktóza a laktóza.

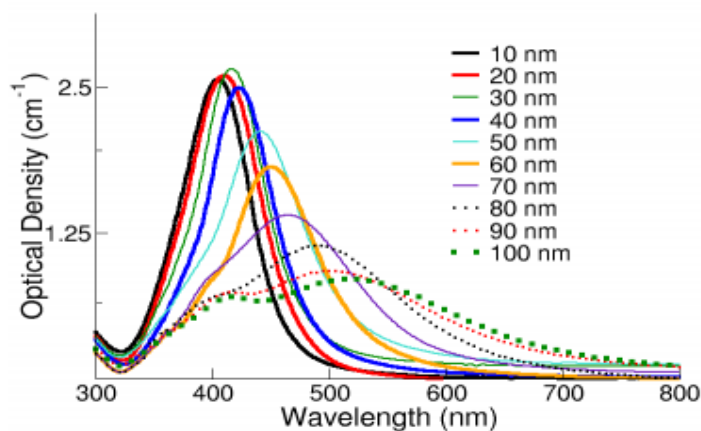
Veľkosť a množstvo pripravených strieborných častíc vo vzorke boli merané pomocou spektrofotometra podľa postupu v kapitole 4.7.

Boli merané spektrá častíc v rozmedzí od 300-600 nm. V tomto spektre bol pozorovaný plazmonický pík, ktorého intenzita určovala koncentráciu častíc v roztoku, poloha jeho maxima určovala taktiež veľkosť pripravených častíc.



Obr. 9: Farba roztokov strieborných nanočastíc rôznych tvarov [57].

Poloha a šírka plazmonického píku je závislá predovšetkým od veľkosti a tvaru nanočastice (Obr. 8). Pre guľovité častice sa typicky pohybuje v rozmedzí 400-530 nm. Absorpčné maximum v oblasti 400 nm značí prítomnosť častíc s veľkosťou 10 nm, naopak maximum v oblasti 530 nm je typické pre strieborné častice s veľkosťou 100 nm (Obr. 9).

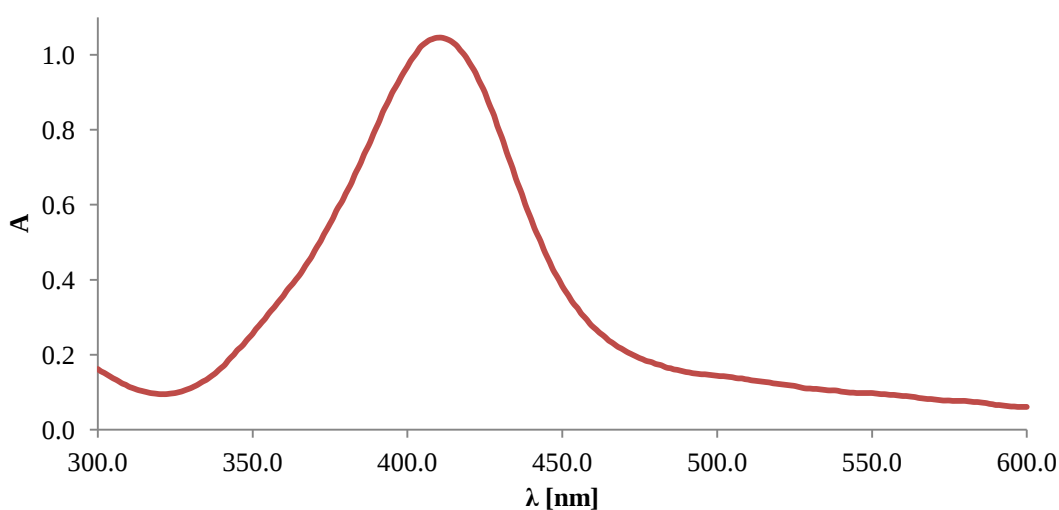


Obr. 10: Poloha a šírka plazmonického píku guľových strieborných nanočastíc v závislosti od ich veľkosti [58].

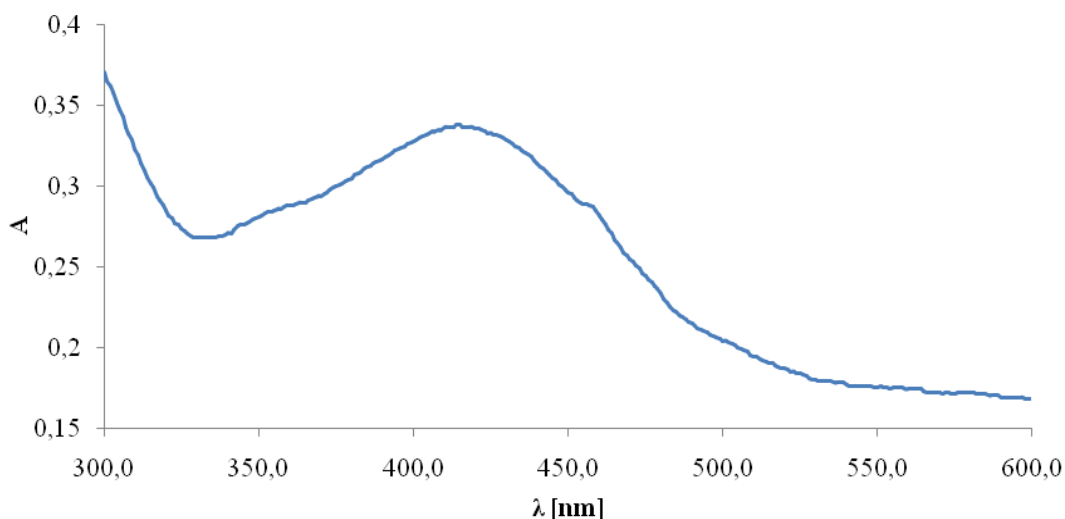
Ako najvhodnejšie redukčné činidlo bola nakoniec vybraná maltóza. Maximum absorpčné pásu strieborných častíc o veľkosti 40-60 nm sa pohybuje okolo 420 nm vlnovej dĺžky. Z toho vyplýva, že podľa Graf 1 boli najoptimálnejšie častice pripravené za použitia maltózy a laktózy, kde sa v prvom prípade nachádzalo maximum píku pri 411 nm a v druhom prípade pri 421 nm.

Ďalším faktorom posúdenia vhodného redukčného činidla bola vizuálna stránka pripravených častíc, nakoľko pri príprave strieborných častíc za použitia maltózy výsledný roztok bol sfarbený dožltá a za použitia laktózy mal výsledný roztok šedú farbu, čo naznačuje vysokú agregáciu častíc (Obr. 10).

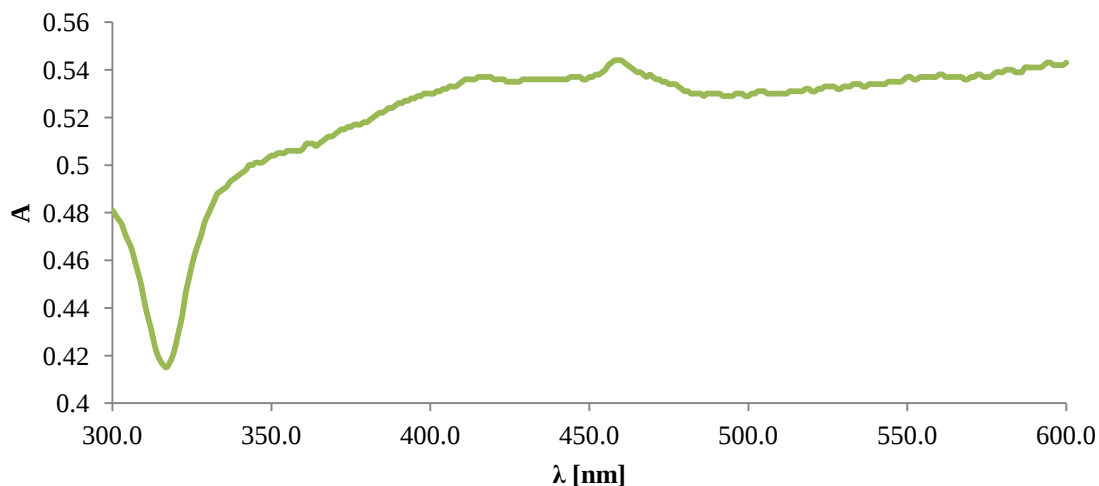
Taktiež z hľadiska symetrickosti absorpčného pásu je pík za použitia laktózy nesymetrický (Graf 2), zatiaľ čo absorpčné spektrum za použitia maltózy vytvára optimálny symetrický pík (Graf 1).



Graf 1: Absorpčný pás strieborných častíc za použitia redukčného činidla maltózy.



Graf 2: Absorpčný pás strieborných častíc za použitia redukčného činidla laktózy.

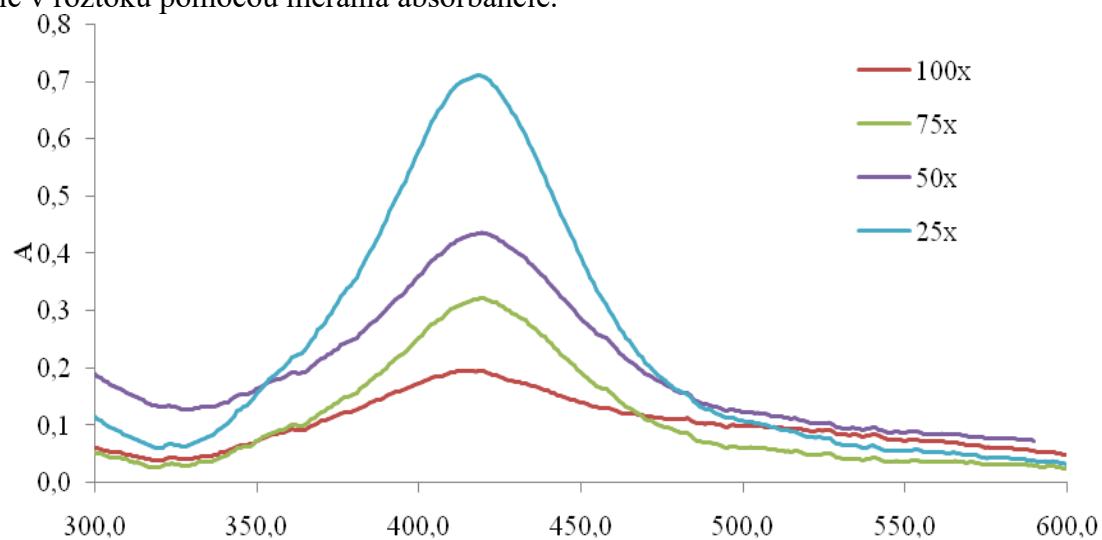


Graf 3: Absorpčný pás strieborných častíc za použitia redukčného činidla glukózy.



Obr. 10: Koloidné striebro vo viacerých štádiách agregácie (modifikovaný obrázok) [55].

V priebehu riedenia pripravených strieborných nanočastíc intenzita absorbancie priamo úmerne klesá so znižujúcou sa koncentráciou AgNPs v roztoku, čo zobrazuje Graf 4: , kde sú AgNPs riedené 100x, 75x, 50x a 20x. Bola teda potvrdená možnosť stanovenia koncentrácie častíc v roztoku pomocou merania absorbancie.



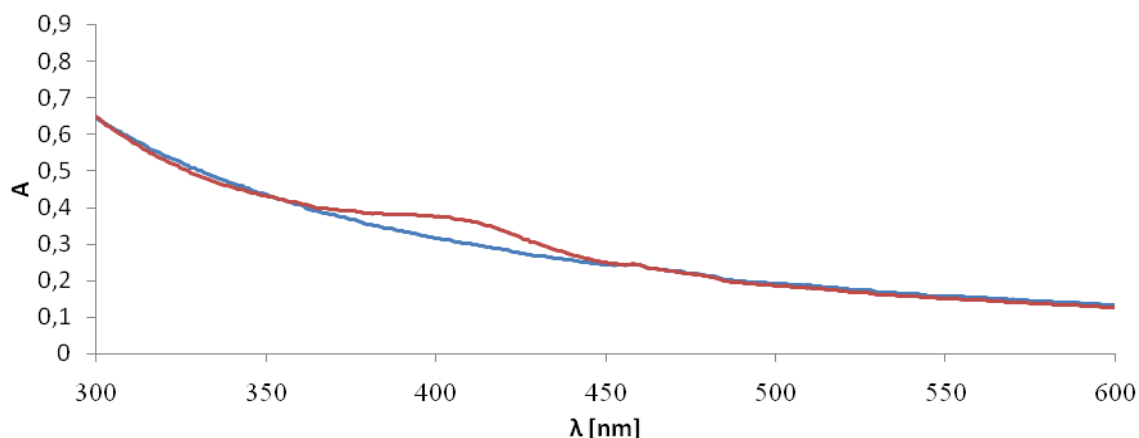
Graf 4: Kalibračná krivka koncentrácie AgNPs.

Koncentrácia strieborných nanočastíc pripravených redukciou v amoniakálnom prostredí za použitia maltózy bola v spolupráci s kolegami z Centra materiálového výskumu na FCH VUT v Brne stanovená absorpčnou spektrometriou s indukčne viazanou plazmou. Koncentrácia pripravených strieborných nanočastíc bola 327,83 mg/l.

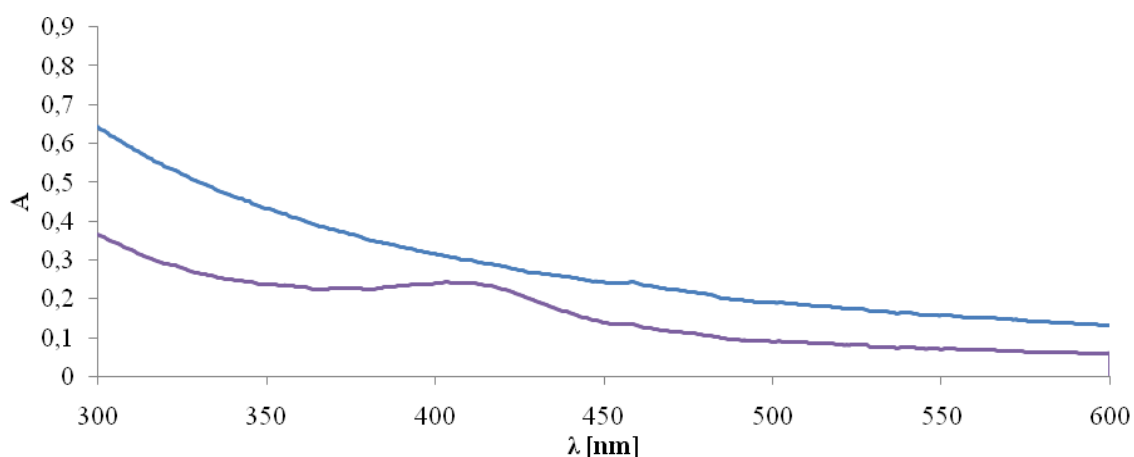
5.2 Optimalizácia prípravy organicko-anorganických častíc

V práci bola testovaná možnosť prípravy kombinovaných organicko-anorganických častíc. Pripravené boli lipozómové častice, PHB častice, alginátové častice a chitozánové častice, do ktorých boli enkapsulované pripravené strieborné nanočastice. Menované častice boli pripravené podľa postupov uvedených v kapitole 4.3.

Úspešnosť enkapsulácie strieborných nanočastíc bola pozorovaná pomocou merania spektier častíc v rozmedzí od 300 do 600 nm. V tomto spektre bol pozorovaný plazmonický pík strieborných nanočastíc, ktorý sa v prípade ich prítomnosti v roztoku vyskytoval v oblasti 410-420 nm.



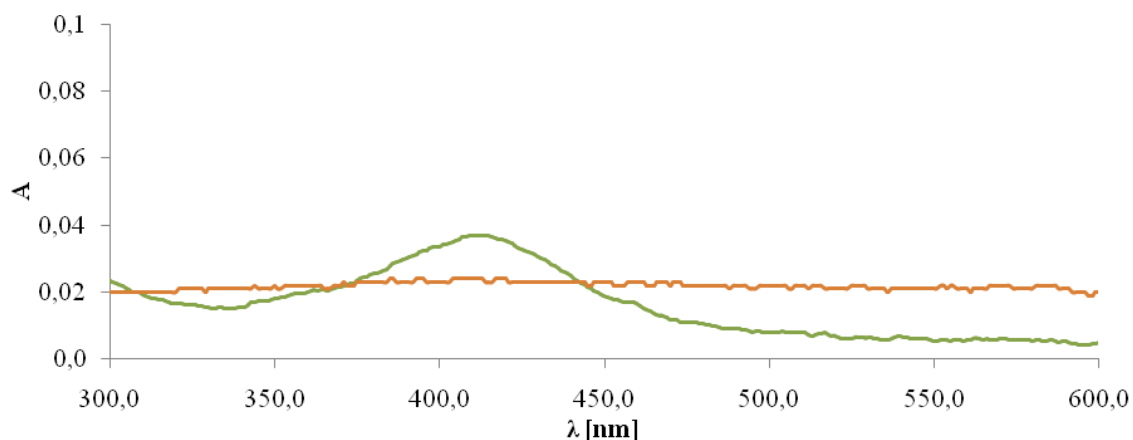
Graf 5: UV-VIS spektrum prázdnych PHB častíc (modrá) a kombinovaných častíc s centrifugovanými AgNPs (červená).



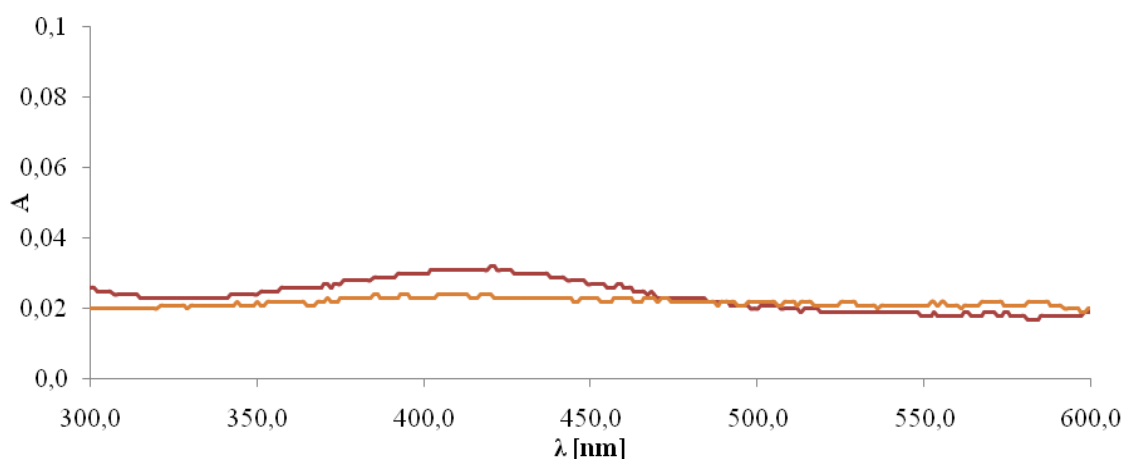
Graf 6: UV-VIS spektrum prázdnych PHB častíc (modrá) a kombinovaných častíc s AgNPs (fialová).

Pri kombinovaných PHB časticiach bola pri oboch testovaných vzorkách potvrdená, vďaka prítomnosti píku strieborných nanočastíc, ich prítomnosť v roztoku.

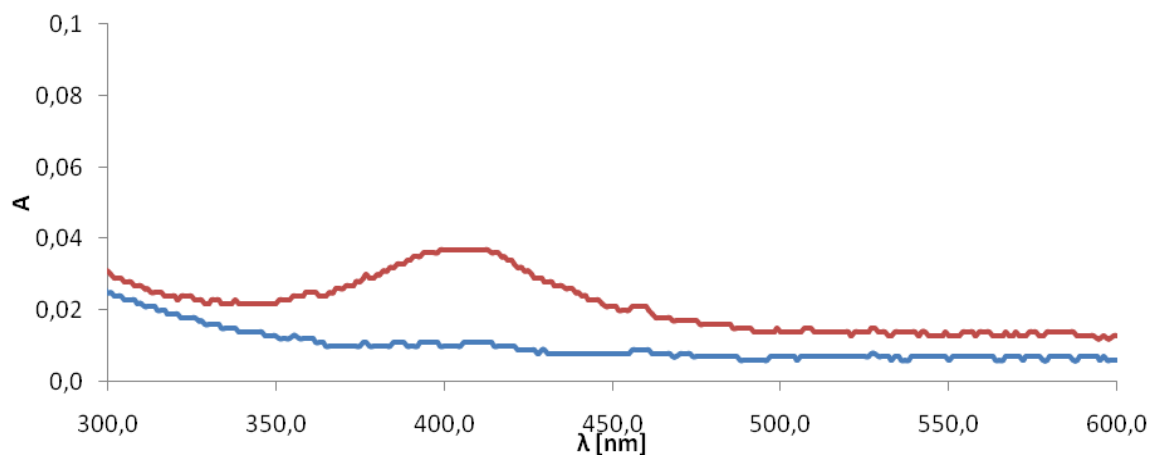
Ďalej bola sledovaná príprava kombinovaných alginátových častíc. Tu bol obsah strieborných častíc opäť potvrdený v oboch testovaných vzorkách. U vzorky, ako je zrejmé z grafu 8, kde boli k enkapsulácii využité centrifugované strieborné nanočastice, však bola ich koncentrácia vo vzorke veľmi nízka.



Graf 7: UV-VIS spektrum prázdnych alginátových častíc (žltá) a kombinovaných častíc s AgNPs (zelená).

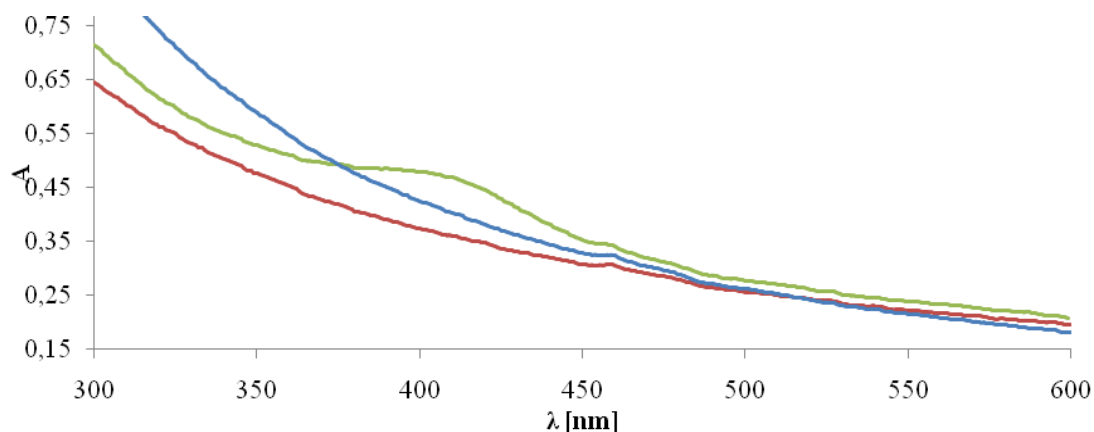


Graf 8: UV-VIS spektrum prázdnych alginátových častíc (žltá) a kombinovaných častíc so zcentrifugovanými AgNPs (červená).



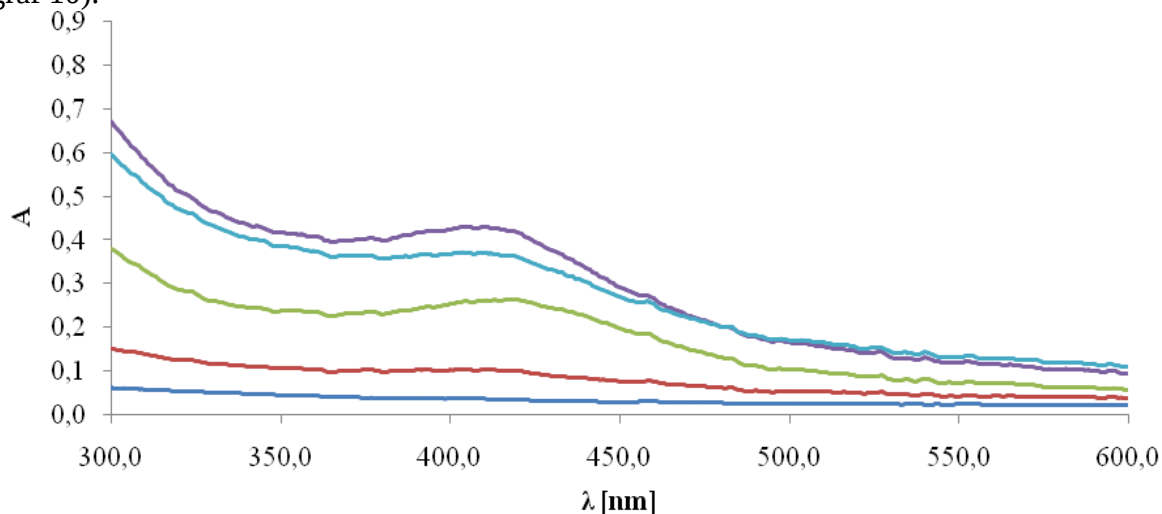
Graf 9: UV-VIS spektrum prázdnych chitozánových častíc (modrá) a kombinovaných častíc s AgNPs (červená).

Ďalej bola sledovaná príprava kombinovaných chitozánových častíc. U chitozánových častíc bol taktiež potvrdený obsah strieborných nanočastíc zaznamenaný, predovšetkým u vzorky s enkapsulovaným roztokom strieborných nanočastíc (graf 9). V prípade enkapsulácie centrifugovaných strieborných nanočastíc bola koncentrácia vo vzorke veľmi nízka.



Graf 10: UV-VIS spektrum prázdnych lipozómov pripravených na odparke (modrá), kombinovaných lipozómov so zcentrifugovanými AgNPs (červená) a kombinovaných lipozómov s AgNPs (zelená).

Pri príprave lipozómov na odparke sú výsledky podobné ako u chitozánových častíc. V prípade enkapsulácie roztoku strieborných častíc bola prítomnosť striebra zaznamenaná, v prípade enkapsulácie zcentrifugovaných strieborných častíc nebola ich prítomnosť zrejmalá (graf 10).



Graf 11: UV-VIS spektrum prázdnych lipozómov (tm. modrá) a kombinovaných častíc s AgNPs - lipozómy s zcentr. AgNPs za použitia chloroformu (červená), lipozómy so zcentr. AgNPs (zelená), lipozómy s AgNPs s chloroformom (fialová), lipozómy s AgNPs s (sv. modrá).

Pri príprave lipozómov pripravených na ultrazvuku sa dosiahli najlepšie výsledky, predovšetkým u častíc pripravených bez použitia chloroformu. U oboch testovaných kombinovaných vzoriek častíc bola vďaka absorpčnému píku striebra očividná jeho prítomnosť. U lipozómov pripravených s použitím chloroformu bol obsah striebra stanovený iba v prípade enkapsulácie roztoku strieborných častíc, v prípade enkapsulácie centrifugovaných strieborných častíc nebola ich prítomnosť vo vzorke jednoznačná (Graf 11).

5.3 Stanovenie veľkosti a zeta potenciálu častíc

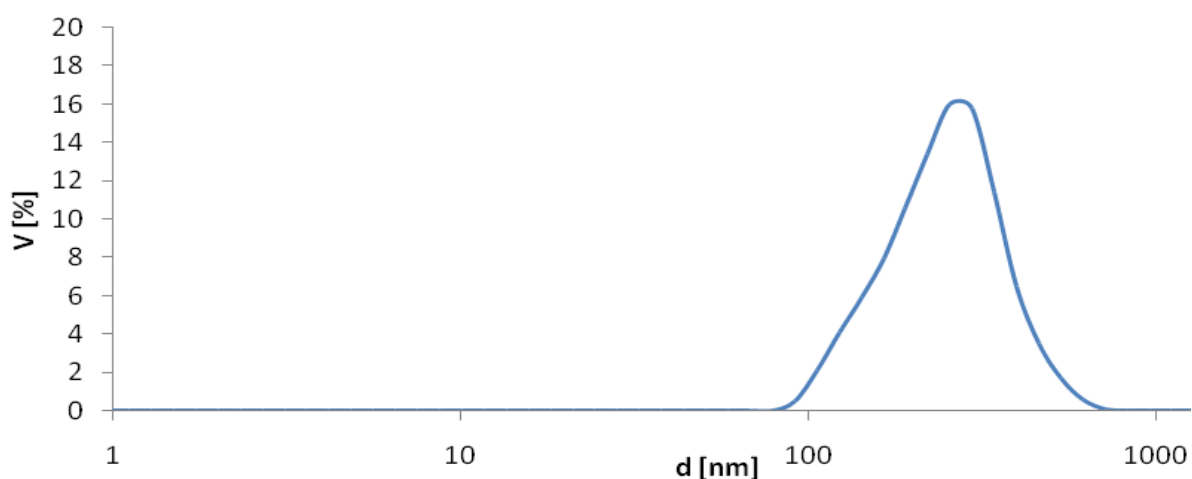
5.3.1 Stanovenie veľkosti častíc pomocou DLS-analyzátoru

Veľkosť pripravených častíc sa merala na základe Brownovho pohybu častíc, ktoré boli zdrojom rozptýleného svetla po ožiarení laserom pri vlnovej dĺžke 633 nm v DLS analyzátore [54].

V Tab. 3 sú uvedené priemernej veľkosti testovaných častíc a hodnoty ich disperzity.

Tab. 3: Namerané charakteristiky častíc.

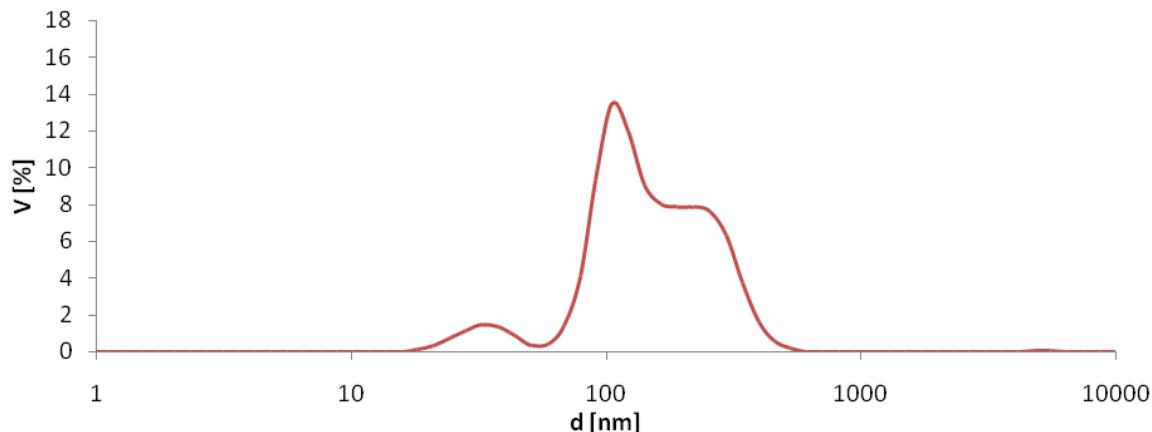
Vzorka	Častice	Priemerná veľkosť [nm]	Polydisperzita
1	Prázdne PHB častice	251	0,345
2	PHB + AgNPs	155	0,287
3	PHB + zcentrifugované AgNPs	260	0,268
4	Prázdne lipozómy pripravené na odparke	263	0,346
5	Lipozómy na odparke + AgNPs	255	0,537
6	Lipozómy na odparke + zcentrifugované AgNPs	305	0,467
7	Lipozómy na ultrazvuku bez chloroformu	161	0,200
8	Lipozómy na ultrazvuku + AgNPs	313	0,277
9	Lipozómy na ultrazvuku + zcentri. AgNPs	104	0,252
10	Lipozómy na ultrazvuku s chloroformom	212	0,186
11	Lipozómy + AgNPs s chloroformom	105	0,231
12	Lipozómy + zcentri. AgNPs s chloroformom	91	0,225
13	Prázdne alginátové častice	697	0,648
14	Alginátové častice + AgNPs	156	0,452
15	Alginátové častice + zcentrifugované AgNPs	258	0,344
16	Prázdne chitozánové častice	325	0,366
17	Chitozánové častice + AgNPs	548	0,617
18	AgNPs	35	0,151



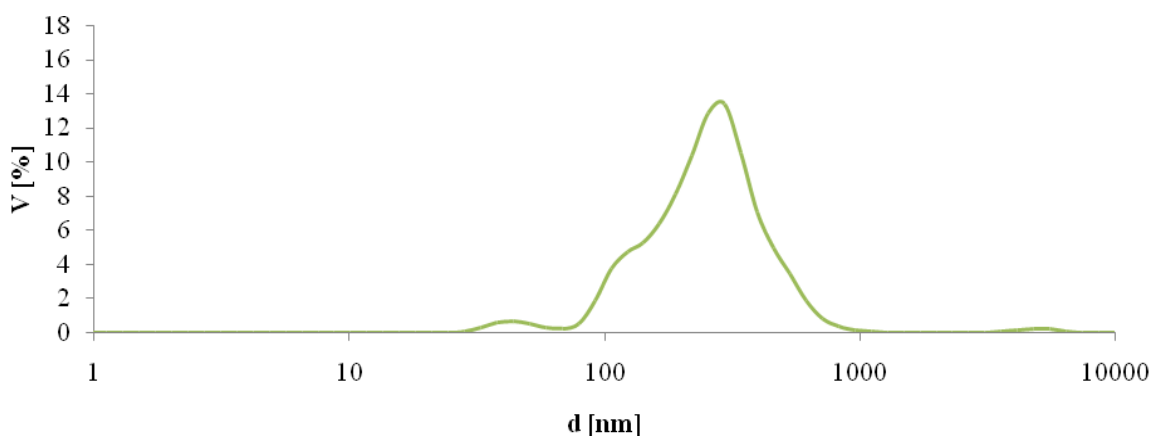
Graf 12: Distribúcia veľkosti prázdnych PHB častíc.

Pri stanovení veľkosti kombinovaných organicko-anorganických častíc bola v grafe distribúcie ich veľkosti (Graf 12) sledovaná prítomnosť voľných neenkapsulovaných strieborných nanočastíc.

Z grafov 13 a 14, ktoré ukazujú distribúciu veľkosti PHB častíc, možno vyčítať prítomnosť aj malých nanočastíc o priemernej veľkosti pohybujúce sa okolo 50 nm, zrejme sa jedná o voľné neenkapsulované nanočastice striebra. U PHB častíc teda nedošlo k enkapsulácii všetkých strieborných nanočastíc.

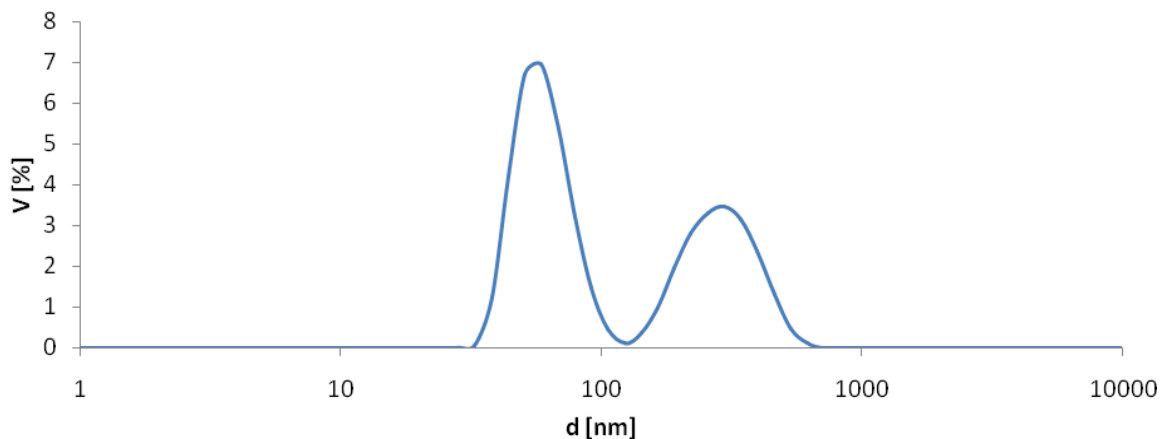


Graf 13: Distribúcia veľkosti PHB častíc s prídavkom AgNPs.

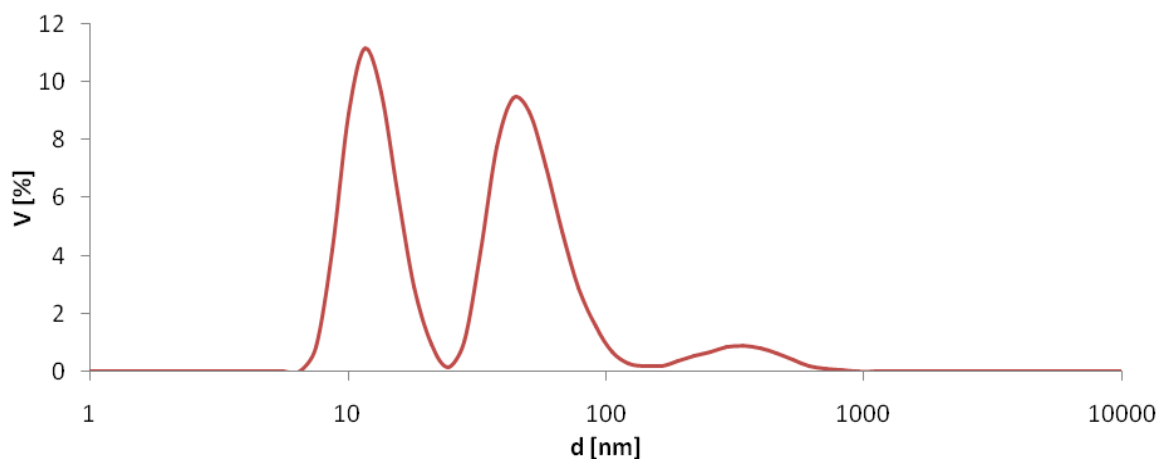


Graf 14: Distribúcia veľkosti PHB častíc s prídavkom zcentrifugovaných AgNPs.

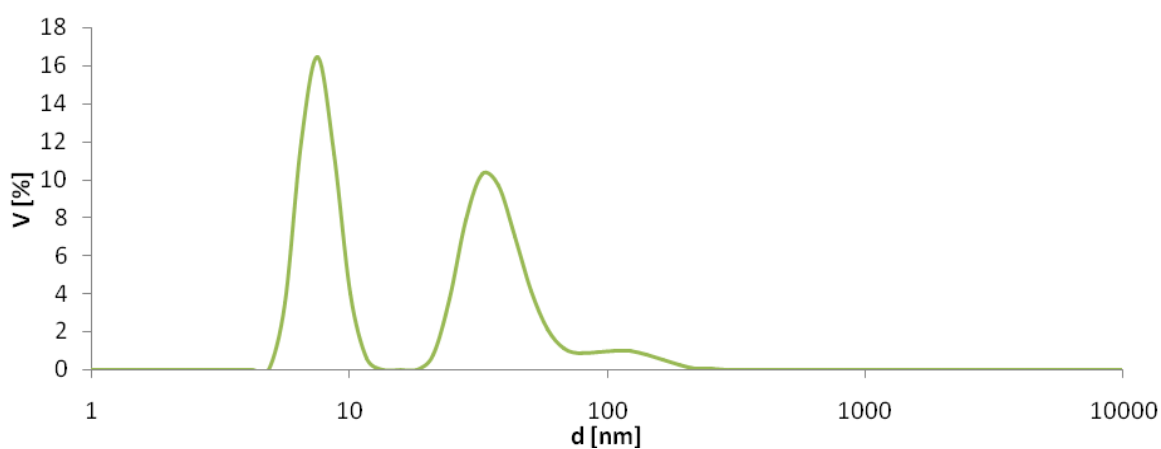
Obdobné výsledky ako v prípade PHB častíc boli dosiahnuté aj u testovaných polysacharidových častíc. Aj tu je zrejماً prítomnosť voľných neenkapsulovaných strieborných nanočastíc (graf 16, 17).



Graf 15: Distribúcia veľkosti prázdnych alginátových častíc.

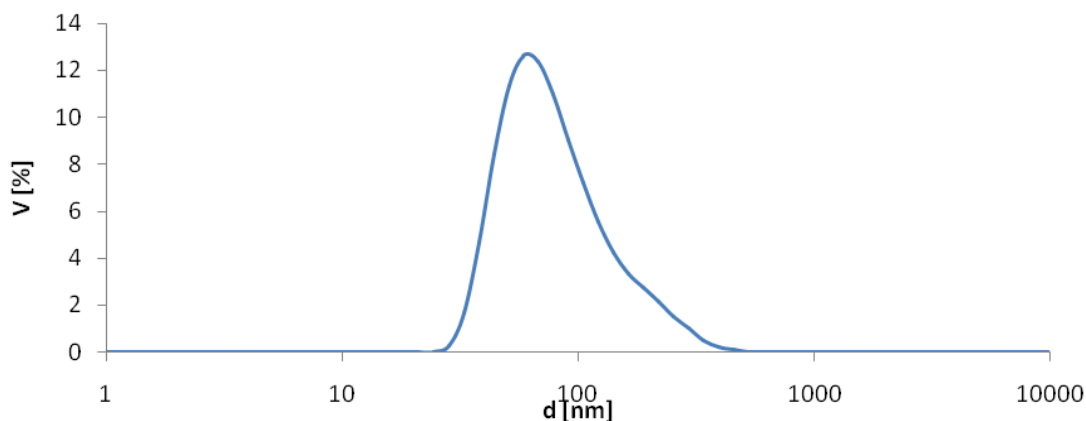


Graf 16: Distribúcia veľkosti alginátových častíc s AgNPs.

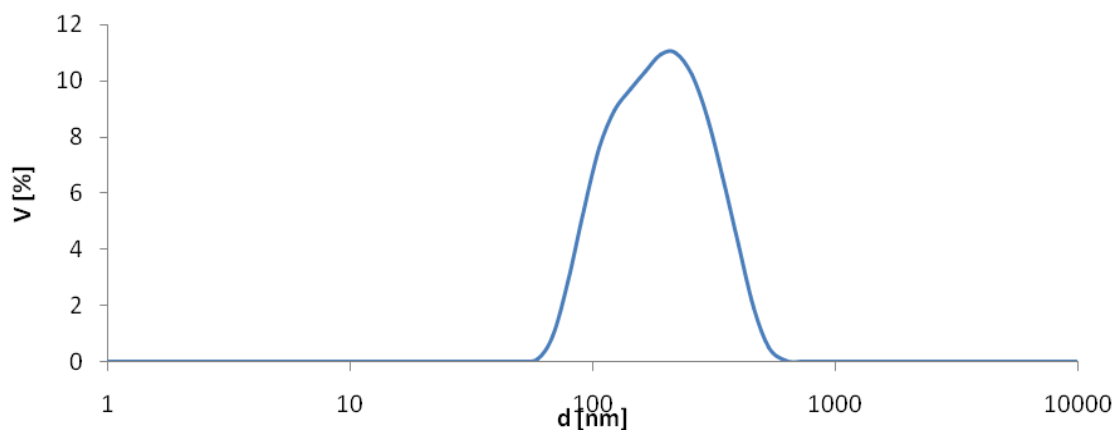


Graf 17: Distribúcia veľkosti alginátových častíc so zcentrifugovanými AgNPs.

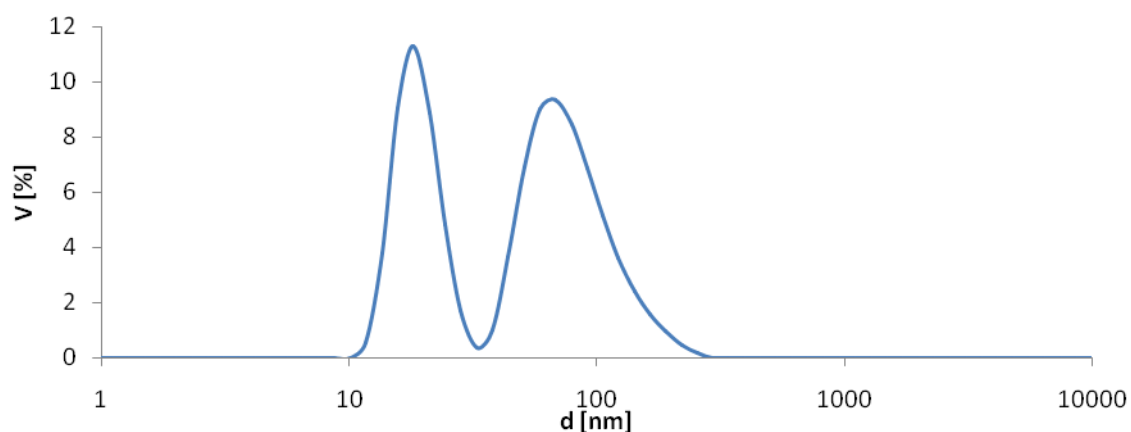
Iba v prípade prípravy kombinovaných lipozómových častíc pripravených pomocou ultrazvuku (predovšetkým u častíc pripravených bez prídavku chloroformu), nebol pozorovaný pík neenkapsulovaných strieborných častíc (graf 18 a 19). Možno tak predpokladať úspešnú enkapsuláciu/imobilizáciu strieborných nanočastíc do týchto lipozómov.



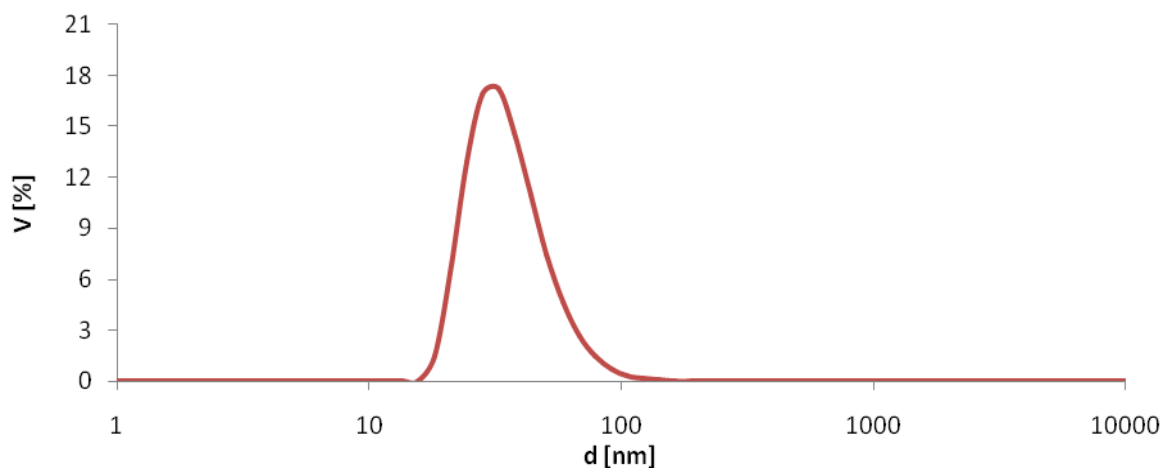
Graf 18: Distribúcia veľkosti lipozómov so zcentrifugovanými AgNPs bez prídavku chloroformu.



Graf 19: Lipozómy pripravené s AgNPs bez pridania chloroformu.



Graf 20: Lipozómy pripravené pomocou ultrazvuku so zcentrifugovanými AgNPs a prídavkom chloroformu



Graf 21: Pripravené strieborné nanočastice.

Na záver bola premeraná aj distribúcia veľkosti samotných strieborných nanočastíc (graf 21), ktoré boli pripravené za pomoci maltózy podľa návodu uvedenom v kapitole 4.3.1.

5.3.2 Porovnanie stability častíc pomocou zeta potenciálu

Na základe zeta potenciálu sa určila stabilita častíc v roztoku. Nestabilné častice majú zeta potenciál medzi -30 mV až 30 mV [56].

Z nasledujúcej tabuľky vyplýva, že najmenej stabilné boli polysacharidové častice, naopak všetky pripravené lipozómové častice boli stabilné.

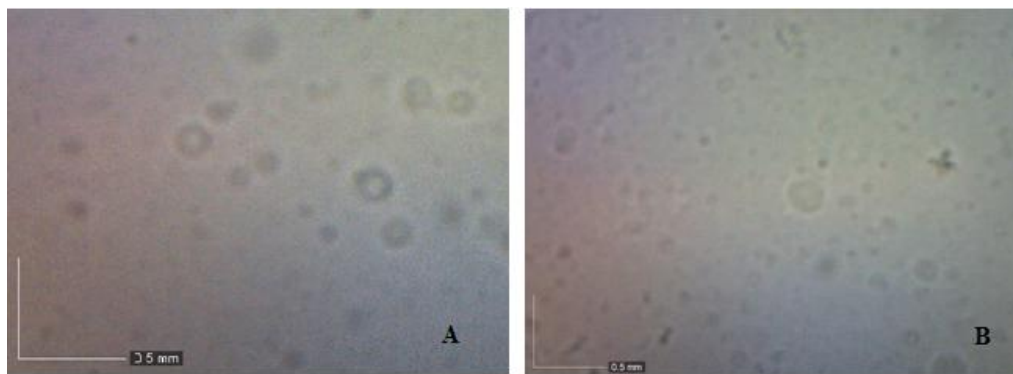
U polysacharidových častíc bola najnižšia stabilita stanovená u prázdnych častíc, kde bola nameraná hodnota zeta potenciálu pre chitozánové častice 23,9, hodnota zeta potenciálu alginátových častíc bola -25,8. Je zaujímavé, že vplyvom enkapsulácie roztoku strieborných nanočastíc do oboch testovaných polysacharidových častíc došlo k zvýšeniu ich stability.

Tab. 4: Namerané hodnoty zeta potenciálu

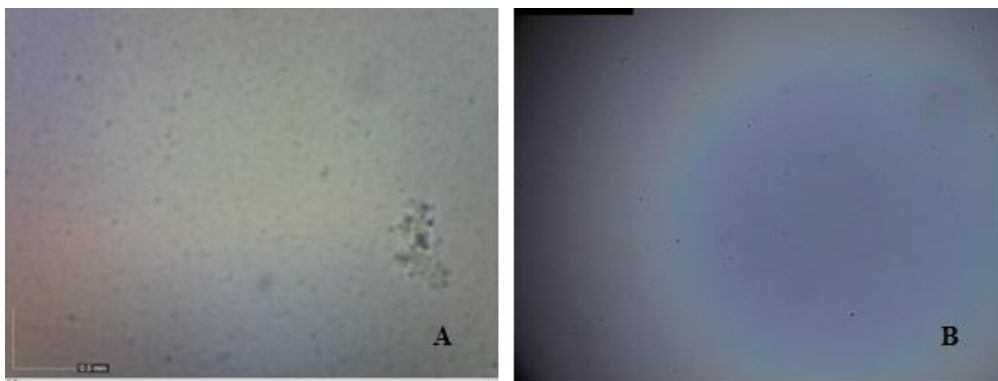
Vzorka	Častice	Zeta potenciál
1	Prázdne PHB častice	-41,5
2	PHB + AgNPs	-42,9
3	PHB + zcentrifugované AgNPs	-43,2
4	Prázdne lipozómy pripravené na odparke	-39,9
5	Lipozómy na odparke + AgNPs	-65,8
6	Lipozómy na odparke + zcentrifugované AgNPs	-54,1
7	Lipozómy na ultrazvuku bez chloroformu	-38,8
8	Lipozómy na ultrazvuku + AgNPs	-41,8
9	Lipozómy na ultrazvuku + zcentri.. AgNPs	-39,1
10	Lipozómy na ultrazvuku s chloroformom	-43,8
11	Lipozómy + AgNPs s chloroformom	-40,6
12	Lipozómy + zcentri. AgNPs s chloroformom	-38,8
13	Prázdne alginátové častice	-25,8
14	Alginátové častice + AgNPs	-40,1
15	Alginátové častice + zcentrifugované AgNPs	-28,5
16	Prázdne chitozánové častice	23,9
17	Chitozánové častice + AgNPs	37,1
18	AgNPs	-23,6

5.4 Vizuálne zhodnotenie veľkosti častíc

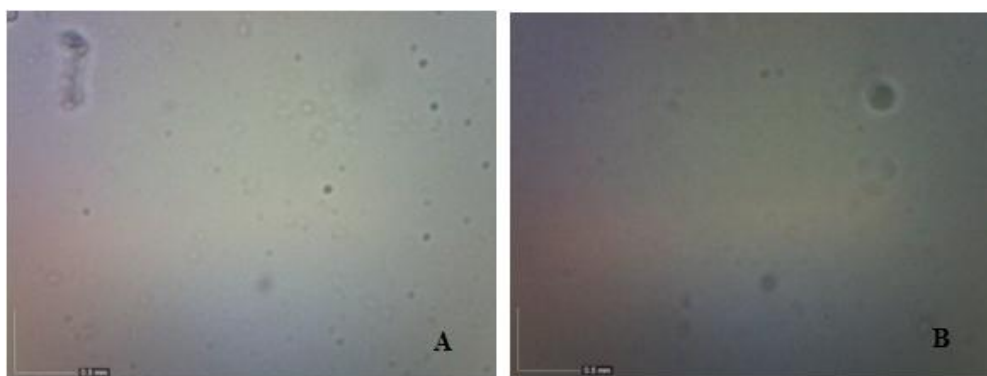
Pripravené častice boli sledované aj pomocou svetelného mikroskopu. Nasledujúce obrázky (Obr.11-13) zobrazujú niektoré pripravené častice, z ktorých môžeme usudzovať ich približnú veľkosť. Z obrázkov je zrejmé že lipozómy pripravené na odparke majú väčšiu veľkosť než lipozómy pripravené na ultrazvuku. Pri PHB časticách môžeme vidieť, že ich veľkostná distribúcia je homogénna, čo neplatí u lipozóm na odparke, kde sa pripravili častice s rôznou veľkosťou. Tieto výsledky sú v zhode s výsledkami získanými metódou DLS (Tab.3).



Obr. 11: (A) prázdne lipozómy pripravené na odparke, (B) lipozómy pripravené na odparke so zriedenými AgNPs; zväčšenie 640x.



Obr. 12: (A) prázdne PHB častice, (B) PHB častice so zcentrifugovanými AgNPs; zväčšenie 400x.



Obr. 13: (A) alginátové častice so zriedenými AgNPs, (B) lipozómy pripravené na ultrazvuku s chloroformom a AgNPs; zväčšenie 640x

Ako najlepšie z pripravených kombinovaných častíc boli vyhodnotené lipozómové častice pripravené pomocou ultrazvuku bez použitia chloroformu. Tieto častice boli spoločne so samotnými striebornými nanočasticami v súbežne meraných bakalárskych prácach ďalej testované. Stanovený bol ich antimykotický účinok a takiež boli tieto častice podrobené testovaniu genotoxicity.

Antimykotická aktivita bola stanovená voči kmeňu *Candida glabrata*. Antimykotický účinok bol však zaznamenaný len u koncentrovaných strieborných nanočastíc, kde bol po celých 24 hodín úplne zastavený rast kvasinkových buniek. U 10x zriedených strieborných nanočastíc a u lipozómov s ich obsahom však už nebola zaznamenaná žiadna antimykotická aktivita [59].

Tab. 5: SOS indukčné faktory

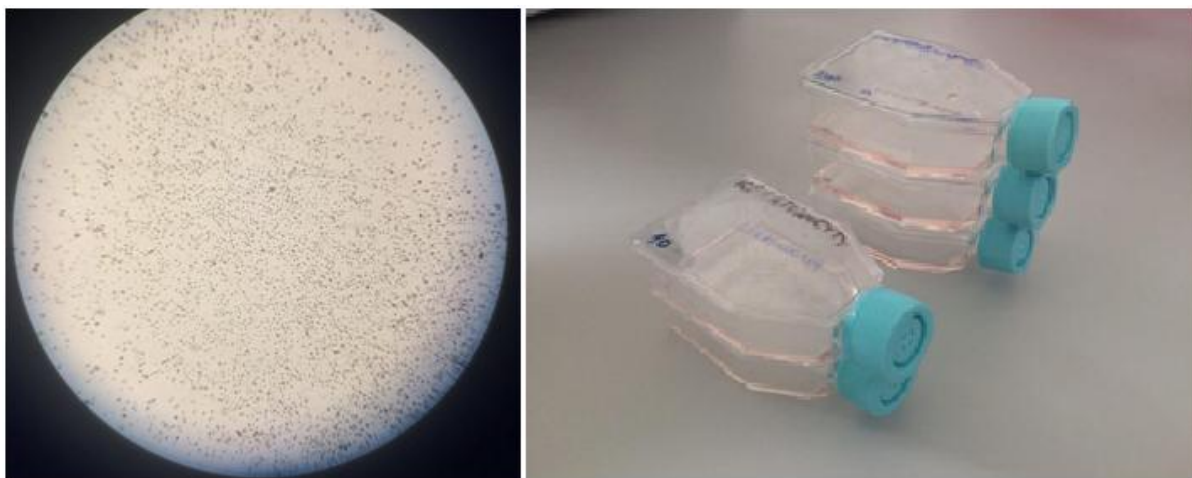
testovaná látka	riedenie	SOSIF
lipozómy + strieborné častice	0	1,48
	2	1,15
	5	0,96
	10	1,01
strieborné častice	0	1,85
	2	1,33
	5	1,28
	10	1,22

Testovanie genotoxicity prebiehalo pomocou kitu SOS chromotest na baktériách *E.coli*. Z nameraných hodnôt pre každú koncentráciu testovanej vzorky bol vypočítaný SOS indukčný faktor (SOSIF). Za genotoxickú je potom považovaná látka, ktorá má SOSIF 1,5 a vyššie. Indukčné faktory testovaných strieborných nanočastíc a lipozómov s ich obsahom sú uvedené v Tab. 5. Z výsledkov je zrejmé, že z testovaných vzoriek mali mierne genotoxické účinky len koncentrované strieborné nanočastice [60].

5.5 Metóda kultivácie bunkových kultúr

Ako bunkové línie pre skúmanie interakcií častíc s humánnymi bunkami sme si vybrali ľudské keratínocyty, ktoré sú súčasťou stavby ľudskej pokožky, a teda po aplikovaní liečiva kožnou formou prichádzajú ako prvé do kontaktu s podaným liečivom.

Bunky sa množili *in vitro* v laboratóriu v špeciálnom termostate, kde sa udržiavala teplota 37 °C a cirkuloval oxid uhličitý ako ochranná atmosféra. Pri poklese alebo náraste teploty by bunky zahynuli, nakoľko by už teplota nebola rovnaká ako v ich pôvodnom prostredí. Práca s bunkami sa vykonávala v laminárnom boxe a pritom sa dbalo na sterilitu prostredia, aby sa žiadne mikroorganizmy nedostali s bunkami do kontaktu. Cez týždeň sa bunkám vymieňalo médium 2-3-krát, záležalo to od ich rýchlosti množenia, ktorá sa sledovala pod inverzným mikroskopom. Ak ich koncentrácia v nádobke bola dostatočná, mohli byť použité k testovaniu, ale predtým sa ich presná koncentrácia spočítala na Bürkerovej komôrke.



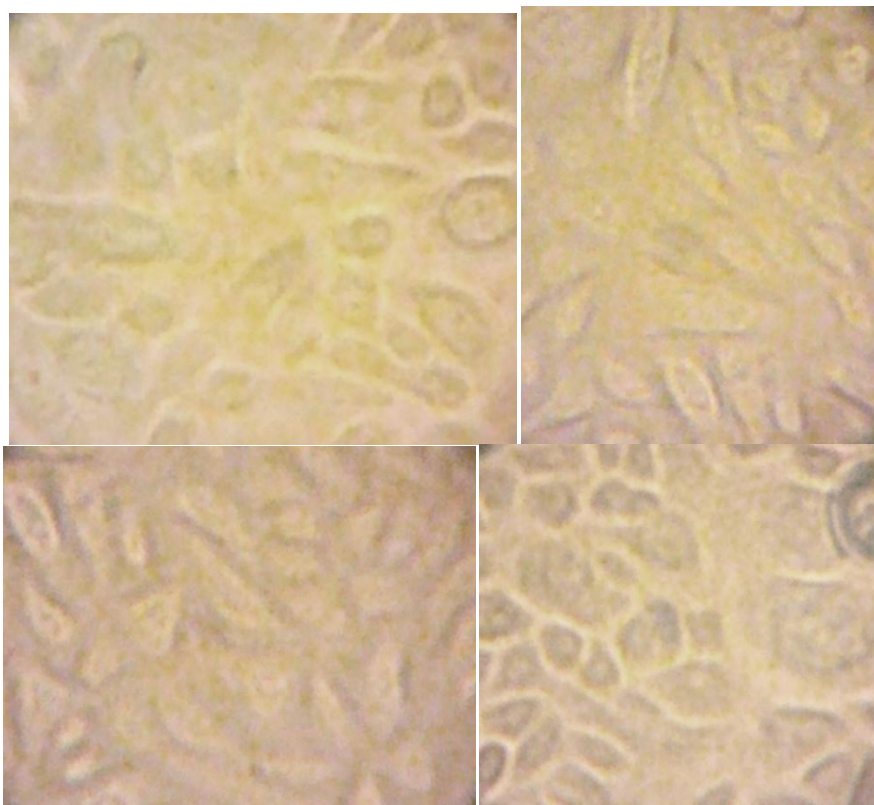
Obr. 14: Prvý obrázok zobrazuje mŕtve keratínocyty. Na druhom obrázku sú zobrazené špeciálne nádoby na kultiváciu keratínocytov.

5.5.1 Optimalizácia MTT testu

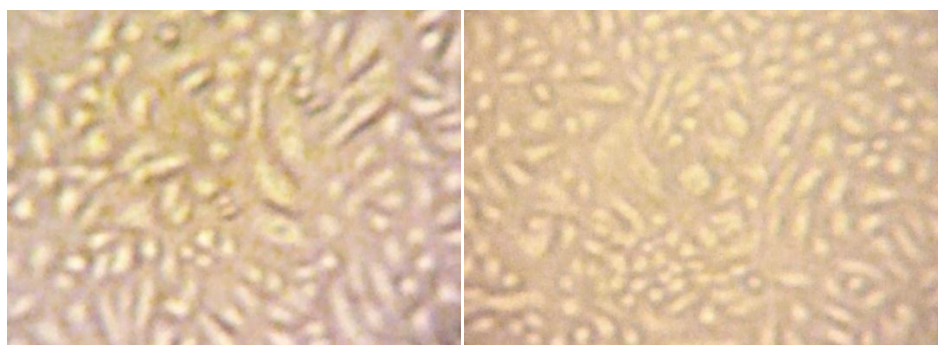
Pred začatím samotného testovania bolo nutné nakultivovať potrebné množstvo buniek a spočítať ich na Bürkerovej komôrke pod inverzným mikroskopom. Všetky vykonávané úkony sa prevádzali v rukaviciach, aby nedošlo ku kontaminácii kultúr. V procese výmeny média a pasážovania v priebehu kultivácie keratínocytov nedošlo ku kontaminácii kultúr, čo naznačoval číry nezakalený roztok buniek a média v špeciálnych nádobkách (Obr.14), na ktorých sa z vnútornej strany prichytili keratínocyty a vytvorili malé fliačky viditeľné na dennom svetle pri správnom sklone nádoby.

Pri prvom pokuse MTT testu sa použili bunky z 10. pasáže. Bunky nemali správnu morfológiu, a preto zrejme počas testu začali rýchlo hynúť. Kvôli tejto skutočnosti a nesprávnom spočítaní buniek sa prvý MTT test nepodaril.

Tiež sa domnievame, že použité postupy prípravy buniek pred a počas testovania neboli dokonale zoptimalizované. Testy cytotoxicity sa robili po dvoch mesiacoch kultivácie keratínocytov, lebo ich rozmnožovanie bolo pomalé a ak sa rozmnožili do vhodnej koncentrácie, tak v istej fáze rastu začali vymierať. Po rozmrazení inej ampulky buniek (Obr. 15) bolo vidieť výrazné zlepšenie nielen v počte buniek, ale aj v ich tvare.



Obr. 15: Keratínocyty (zväčšené 400x).



Obr. 16: Keratínocyty (zväčšené 200x).

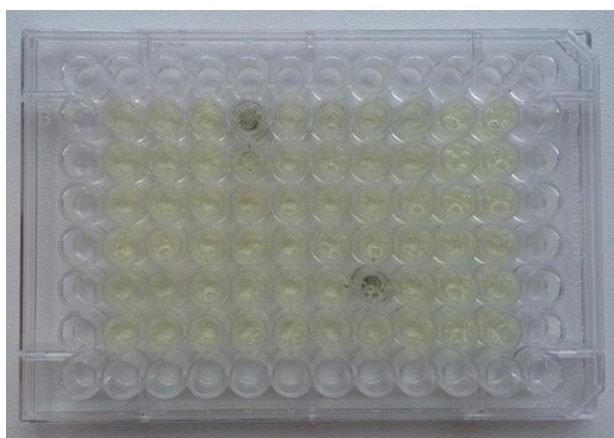
Pri druhom testovaní bol tak stav buniek priaznivejší (obr. 15 a 16), nakoľko boli väčšie než predchádzajúce a koncentrácia v nádobke bola optimálna.

Dali sme testovať lipozómy pripravené na ultrazvuku a odparke, ďalej alginátové, chitozánové a PHB častice a tiež samotné strieborné častice vždy v riedení 5x, 10x a 20x.

Test bol vykonaný podľa návodu uvedeného v kapitole 4.9. V 3. deň sme tak pridali MTT soľ a potom SDS. Živé bunky mali zredukovať žltú soľ MTT pomocou enzýmu sukcinát-dehydrogenázy na fialovú soľ formazán, ktorá by sa uvoľnila z buniek pridaním látky SDS.

Výsledné zafarbenie jamiek s bunkami a časticami sa zmeralo kolometrickou metódou na ELISA readeri, kde by mali najväčšiu absorbanciu vykazovať jamky so živými bunkami. Ak by klesla absorbancia v ostatných jamkách pod 75%, znamenalo by to, že častice testované v príslušných jamkách zabili bunky a sú tak cytotoxické.

Avšak dané tvrdenia sa nám nepodarilo preukázať, nakoľko po dvoch dňoch inkubácie buniek v záverečnej fáze testovania sa nezredukovala MTT soľ a všetky jamky boli sfarbené dožltá (Obr.17), čo bolo znakom úmrtia buniek ešte pred testovaním. Dôvodom nevydareného experimentu bolo opätovné nesprávne spočítanie buniek, prípadne došlo k úhynu buniek počas centrifugácie v 1.deň.



Obr. 17: Doštička s testovanými keratínocytmi po pridaní MTT soli po dňoch inkubácie s SDS.

Z prevedených experimentov je zrejmé, že práca s bunkovými kultúrami vyžaduje dlhšiu skúsenosť a optimalizáciu každého z jednotlivých krokov postupu testovania cytotoxicity počínajúc kultiváciou a pasážovaním buniek v správnom čase, prácou s inverzným mikroskopom a vlastnou realizáciou MTT testu. Testovanie cytotoxicity bude postupne optimalizované v nadväzujúcich prácach.

6 ZÁVER

Bakalárska práca bola zameraná na zavedenie techník kultivácia ľudských buniek *in vitro* a ich potenciálne využitie v testoch cytotoxicity, prípadne na štúdium interakcií s biomateriálmi a nanočasticami.

V teoretickej časti boli opísané základné podmienky kultivácie, charakteristika keratínocytov – ako bunkových kultúr vhodných pre testovanie, základné charakteristiky pripravovaných častíc a krátka rešerš o najpoužívanejších testov pre zisťovanie toxicity charakterizovaných častíc.

V experimentálnej časti bola prevedená optimalizácia prípravy strieborných častíc. Príprava nanočastíc striebra prebiehala v amoniakálnom prostredí za použitia redukujúcich cukrov. Veľkosť a množstvo pripravených strieborných častíc vo vzorke boli merané pomocou absorpčných spektier častíc v rozmedzí od 300-600 nm. V tomto spektre bol pozorovaný plazmonický pík, ktorého intenzita určovala koncentráciu častíc v roztoku, poloha jeho maxima určovala taktiež veľkosť pripravených častíc. Ako najvhodnejšie redukčné činidlo bola vybraná maltóza. Maximum absorpčného pásu týchto strieborných častíc sa pohyboval pri 411 nm, čo odpovedá časticiam o veľkosti 30-40 nm. Táto veľkosť častíc bola potvrdená rovnako aj meraním metódou DLS. Koncentrácia strieborných nanočastíc bola stanovená absorpčnou spektrometriou s indukčne viazanou plazmou. Koncentrácia pripravených strieborných nanočastíc bola 327,83 mg/l.

V práci bola testovaná aj možnosť prípravy kombinovaných organicko-anorganických častíc. Pripravené boli lipozómové častice, PHB častice, alginátové častice a chitozánové častice, do ktorých boli enkapsulované pripravené strieborné nanočastice. Úspešnosť enkapsulácie strieborných nanočastíc bola opäť pozorovaná pomocou merania spektier častíc, kde bol pozorovaný plazmonický pík strieborných nanočastíc, ktorý sa v prípade ich prítomnosti v roztoku vyskytoval v oblasti 410-420 nm.

Ako najlepšie z pripravených kombinovaných častíc boli vyhodnotené lipozómové častice pripravené pomocou ultrazvuku bez použitia chloroformu. Tieto častice boli spoločne so samotnými striebornými nanočasticami v súbežne meraných bakalárskych prácach ďalej testované. Stanovený bol ich antimykotický účinok a tiež boli tieto častice podrobené testovaniu genotoxicity. Antimykotická aktivita bola stanovená voči kmeňu *Candida glabrata*. Antimykotický účinok bol však zaznamenaný len u koncentrovaných strieborných nanočastíc, kde bol po celých 24 hodín úplne zastavený rast kvasinkových buniek. Testovanie genotoxicity prebiehalo pomocou kitu SOS chromotest na baktériách *E.coli* a mierne genotoxické účinky mali len koncentrovanej strieborné nanočastice.

Z hľadiska zeta potenciálu boli najmenej stabilné polysacharidové častice, naopak všetky pripravené lipozómové i PHB častice boli stabilné.

Ako bunkové línie pre skúmanie interakcií častíc s humánnymi bunkami boli vybrané ľudské keratínocyty. V predloženej práci boli zavedené do prevádzky všetky základné metódy manipulácie s bunkovými kultúrami. Bunky sa množili *in vitro* v laboratóriu v špeciálnom termostate, kde sa udržiavala teplota 37 °C a 5 % koncentrácia oxidu uhličitého. Keratínocyty boli orientačne využité k prevedeniu MTT testu, ktorým sa sledovala interakcia častíc s keratínocytmi ako predmetom skúmania cytotoxicity, čo by ďalej určilo použitie pripravených častíc do kozmetiky. Avšak kompletný MTT test sa nepodarilo realizovať

v časovom úseku robenia bakalárskej práce a preto bude ďalej optimalizovaný v nadväzujúcich prácach. Využitie MTT testu cytotoxicity k testovaniu biologických účinkov materiálov, častíc a zložiek potravín, doplnkov a liečiv je dôležitou súčasťou overenia ich bezpečnosti pred uvedením na trh.

.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] *Introduction to Cell Culture* [online]. [cit. 2016-02-23]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>
- [2] VEJRAŽKA, Martin – *Buněčné kultury* [online]. [cit. 2016-02-23]. Dostupné z : <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecnekultury-vejrazka.pdf>
- [3] *Štúdium buniek v in vitro podmienkach I.* [online]. [cit. 2016-04-02]. Dostupné z: https://staryweb.fns.uniba.sk/fileadmin/user_upload/editors/biol/kzf/2b.pdf
- [4] Buněčné kultury. Wikiskripta [online]. [cit. 2016-03-30]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Bun%C4%9B%C4%8Dn%C3%A9_kultury
- [5] <https://moodle.kent.ac.uk/external/mod/book/view.php?id=2604&chapterid=160>
- [6] KULTIVÁCIA BUNIEK - POPIS METÓDY. *Virtuálne laboratórium molekulárnej biológie* [online]. [cit. 2016-03-30]. Dostupné z: http://www.kbg.fpv.ukf.sk/LMB/VLMB/kultivacia_popis.html
- [7] Cell culture. Wikipedia [online]. [cit. 2016-03-30]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_culture
- [8] MIKROBIOLÓGIA. *NaturalSciences* [online]. [cit. 2016-03-30]. Dostupné z: <http://www.naturalsciences.weblahko.sk/MIKROBIOLOGIA.html>
- [9] Eckert, R L, and E A Rorke. "Molecular Biology of Keratinocyte Differentiation." *Environmental Health Perspectives* 80 (1989): 109–116. Print. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1567608/?page=1>
- [10] *Kosmetika a kosmetologie* [online]. [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: [file:///C:/Users/Ivana/Downloads/03_K%C5%AF%C5%BEE%20jako%20p%C5%99edm%C4%9Bt%20kosmetick%C3%A9%20p%C3%A9%20C4%8De%20I%20\(K+K\).pdf](file:///C:/Users/Ivana/Downloads/03_K%C5%AF%C5%BEE%20jako%20p%C5%99edm%C4%9Bt%20kosmetick%C3%A9%20p%C3%A9%20C4%8De%20I%20(K+K).pdf)
- [11] DAHM, A. M., A. BRUIN, A. LIMAT, C. TSCHARNER, M. WYDER a M. M. SUTER. Cultivation and characterisation of primary and subcultured equine keratinocytes. *Equine Veterinary Journal* [online]. 2002, **34**(2), 114-120 [cit. 2016-04-03]. DOI: 10.2746/042516402776767187. ISSN 04251644. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.2746/042516402776767187>
- [12] CHONG, Shu Zhen, Maximilien EVRARD a Lai Guan NG. Lights, Camera, and Action: Vertebrate Skin Sets the Stage for Immune Cell Interaction with Arthropod-Vectored Pathogens. *Frontiers in Immunology* [online]. 2013, **4**, - [cit. 2016-03-11]. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00286. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00286/abstract>
- [13] NEWBY, Craig S., Robert M. BARR, Malcolm W. GREAVES a Anthony I. MALLETT. Cytokine Release and Cytotoxicity in Human Keratinocytes and Fibroblasts Induced by Phenols and Sodium Dodecyl Sulfate: Vertebrate Skin Sets the Stage for Immune Cell Interaction with Arthropod-Vectored Pathogens. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2000, **115**(2), 292-298 [cit. 2016-03-11]. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2000.00056.x. ISSN 0022202x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15409595>
- [14] DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3240-4.

- [15] Campisi, Judith, Physiological Changes, Fibroblast Cells. [cit. 2016-15-4]. Dostupné z: <http://www.encyclopedia.com/doc/1G2-3402200318.html>
- [16] *Fibroblast proliferation assay* [online]. [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: <http://www.nanoiris.be/files/Flyer%20Fibrosis.pdf>
- [17] FU, Peter P., Qingsu XIA, Huey-Min HWANG, Paresh C. RAY a Hongtao YU. Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. 2014, 22(1), 64-75 [cit. 2016-01-31]. DOI: 10.1016/j.jfda.2014.01.005. ISSN 10219498. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949814000064>
- [18] SALATA, OV. *Journal of Nanobiotechnology* [online]. 2(1), 3- [cit. 2016-01-31]. DOI: 10.1186/1477-3155-2-3. ISSN 14773155. Dostupné z: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/2/1/3>
- [19] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2013, 8(1), 102- [cit. 2016-02-10]. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. ISSN 1556-276x. Dostupné z: <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- [20] HAMPL, František. 6. BIOMIMETIKA - ORGANIZOVANÉ VRSTVY, LIPOSOMY. [online]. [cit. 2016-02-10]. Dostupné z: http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2005/6_Hampl.pdf
- [21] NOH, Hyung Kil, Sung Won LEE, Jin-Man KIM, et al. Electrospinning of chitin nanofibers: Degradation behavior and cellular response to normal human keratinocytes and fibroblasts. *Biomaterials* [online]. 2006, 27(21), 3934-3944 [cit. 2016-01-29]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.03.016. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961206002468>
- [22] PERCOT, Aline, Christophe VITON, Alain DOMARD, et al. Optimization of Chitin Extraction from Shrimp Shells: Degradation behavior and cellular response to normal human keratinocytes and fibroblasts. *Biomacromolecules* [online]. 2003, 4(1), 12-18 [cit. 2016-01-29]. DOI: 10.1021/bm025602k. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm025602k>
- [23] SOUTTER, Will. Chitosan Nanoparticles - Properties and Applications. *Azonano* [online]. [cit. 2016-02-30]. Dostupné z: <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3232#7http://www.scielo.br/pdf/bjce/v28n3/v28n3a01.pdf>
- [24] Zhao, Li-Ming, et al., Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers [online]. 2011, 28(3) 353-362 [cit. 2016-01-29]. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-66322011000300001&script=sci_arttext&tlng=es
- [25] GOY, Rejane C.; BRITTO, Douglas de ASSIS, Odilio B. G.. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros* [online]. 2009, vol.19, n.3 [cited 2016-03-02], pp.241-247. ISSN 1678-5169. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>.
- [26] SHARMA, Virender K., Ria A. YNGARD a Yekaterina LIN. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2009, 145(1-2), 83-96 [cit. 2016-01-30]. DOI: 10.1016/j.cis.2008.09.002. ISSN 00018686. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868608001449>

- [27] PRABHU, Sukumaran a Eldho K POULOSE. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters* [online]. 2012, 2(1), 32- [cit. 2016-01-30]. DOI: 10.1186/2228-5326-2-32. ISSN 2228-5326. Dostupné z: <http://www.inl-journal.com/content/2/1/32>
- [28] ERRICO, Cesare, Cristina BARTOLI, Federica CHIELLINI a Emo CHIELLINI. Poly(hydroxyalkanoates)-Based Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. 2009, 2009, 1-10 [cit. 2016-03-12]. DOI: 10.1155/2009/571702. ISSN 1110-7243. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2009/571702/>
- [29] Polyhydroxyalkanoáty - prirodzene odbourateľné plasty [online]. OBRUČA, Stanislav. 13. júl 2007. [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: <http://www.inovace.cz/novinky/726-polyhydroxyalkanoaty-prirozene-odbouratelne-plasty>
- [30] BUZEA, Cristina; PACHECO, Ivan I.; ROBBIE, Kevin. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* [online]. 2007, 2(4), 17-5172 [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: <https://arxiv.org/ftp/arxiv/papers/0801/0801.3280.pdf>
- [31] FISCHER, Hans C a Warren CW CHAN. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2007, 18(6), 565-571 [cit. 2016-01-31]. DOI: 10.1016/j.copbio.2007.11.008. ISSN 09581669. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166907001553>
- [32] Oxidatívny stress a kardiovaskulárne ochorenia: možnosti liečby [online]. ČAPRNDA, Martin. [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: <http://www.skp-casopis.sk/obsah/2005-03/oxidativny-stres-a-kardiovaskularne-ochorenia-moznosti-liecby>
- [33] Towards a method for cytotoxicity screening of nanomaterials [online]. 2015. [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: <https://ec.europa.eu/jrc/en/news/towards-method-cytotoxicity-screening-nanomaterials>
- [34] Nanočastice a najnovšie poznatky o ich vplyve na zdravie [online]. FABIÁNOVÁ, Eleonóra. [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: file:///C:/Users/Ivana/Downloads/Zdravotne_rizika.pdf
- [35] EÚ prísnejšia na nanočastice v kozmetike. FABIÁNOVÁ, Eleonóra. *Euractiv* [online]. [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: <http://euractiv.sk/slovensko-v-ep/eu-prisnejsia-na-nanociastocky-v-kozmetike-012513/>
- [36] SHARIFI, Shahriar, Shahed BEHZADI, Sophie LAURENT, M. LAIRD FORREST, Pieter STROEVE a Morteza MAHMOUDI. Toxicity of nanomaterials. *Chem. Soc. Rev* [online]. 2012, 41(6), 2323-2343 [cit. 2016-03-13]. DOI: 10.1039/C1CS15188F. ISSN 0306-0012. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C1CS15188F>
- [37] KROLL, Alexandra, Mike H. PILLUKAT, Daniela HAHN a Jürgen SCHNEKENBURGER. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2009, 72(2), 370-377 [cit. 2016-02-01]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.08.009. ISSN 09396411. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641108003251>
- [38] MTT test [online]. [cit. 2016-03-30]. Dostupné z: <http://lem.ocol.cz/cs/info/mtt-test>
- [39] Stanovení metabolické aktivity buněk MTT testem. *WikiSkripta* [online]. [cit. 2016-03-04]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Staven%C3%AD_metabolick%C3%A9_aktivit_y_bun%C4%9Bk_MTT_testem

- [40] XTT Cell Proliferation Assay Kit (Manuál) <https://www.atcc.org/~media/56374CEEC36C47159D2040410828B969.ashx>
- [41] WST-1 Cell Proliferation Assay Kit. *Caymanchem* [online]. [cit. 2016-03-30]. Dostupné z: <https://www.caymanchem.com/Product.vm/catalog/10008883>
- [42] Cell Proliferation Reagent WST-1. *Sigmaaldrich* [online]. [cit. 2016-03-30]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/cellproro?lang=en>
- [43] Easy, Colorimetric Test for Cell Growth. *Clontech* [online]. [cit. 2016-03-30]. Dostupné z: http://www.clontech.com/CN/Support/Applications/Cell_Biology/Measure_Cell_Proliferation
- [44] Riss L. Terry, Moravec A. Richard, Niles L. Andrew, et al. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2015 Jun 29]. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Dostupné: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- [45] ULUKAYA, Engin, Ferda OZDIKICIOGLU, Arzu Yilmaztepe ORAL a Meral DEMIRCI. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology in Vitro* [online]. 2008, 22(1), 232-239 [cit. 2016-02-01]. DOI: 10.1016/j.tiv.2007.08.006. ISSN 08872333. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233307002287>
- [46] CHAN, Francis Ka-Ming, Kenta MORIWAKI, María José DE ROSA a Meral DEMIRCI. Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase Activity. *Toxicology in Vitro* [online]. 2008, 22(1), 65 [cit. 2016-02-01]. DOI: 10.1007/978-1-62703-290-2_7. ISSN 08872333. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-290-2_7
- [47] LIN, Weisheng, Yue-wern HUANG, Xiao-Dong ZHOU a Yinfang MA. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2006, 217(3), 252-259 [cit. 2016-02-01]. DOI: 10.1016/j.taap.2006.10.004. ISSN 0041008x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X06003528>
- [48] The Test. *Labtestsonline* [online]. [cit. 2016-03-30]. Dostupné z: <https://labtestsonline.org/understanding/analytes/ldh/tab/test/>
- [49] Caspase Activity Assays. *Thermofisher* [online]. [cit. 2016-03-30]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/sk/en/home/life-science/cell-analysis/cell-viability-and-regulation/apoptosis/caspase-activity-assays.html>
- [50] MOR, MOR, Gil. a Ayesha B. ALVERO. *Apoptosis and cancer: methods and protocols*. Totowa, N.J.: Humana Press, c2008. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), v. 414. ISBN 978-159-7453-394.
- [51] Caspase-Glo® 3/7 Assay Technical Bulletin. *Promega* [online]. [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-37-assay-protocol/>
- [52] KAUFMANN, Scott H., Sun-Hee LEE, X. Wei MENG, et al. Apoptosis-associated caspase activation assays: Limitations and challenges. *Methods* [online]. 2008, 44(3), - [cit. 2016-02-01]. DOI: 10.1016/j.ymeth.2007.11.005. ISSN 10462023. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104620230700214>

- [53] Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/2894640/>
- [54] *Využití dynamického rozptylu světla k měření viskozity* [online]. KALINA, Michal. [cit. 2016-04-29]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/vyuziti-dynamickeho-rozptylu-svetla-k-mereni-viskozity>
- [55] MULFINGER, Lorraine, Sally D. SOLOMON, Mozghan BAHADORY, Aravindan V. JEYARAJASINGAM, Susan A. RUTKOWSKY a Charles BORITZ. *Synthesis and Study of Silver Nanoparticles* [online]. [cit. 2016-05-08]. DOI: 10.1021/ed084p322. ISBN 10.1021/ed084p322. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed084p322>
- [56] *Stabilita suspenzí a disperzí – Proč jsou parametry jako velikost částic, zeta potenciál a reologické vlastnosti tak důležité?* [online]. 2011, 21(4) [cit. 2016-05-08]. Dostupné z: http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/CHEMAGAZIN_XXI_4_cl_3.pdf
- [57] LEDs lead to change for some silver. *Photonics* [online]. [cit. 2016-05-10]. Dostupné z: <http://www.photonics.com/Article.aspx?AID=41849>
- [58] Silver Nanoparticles: Optical Properties. *Nanocomposix* [online]. [cit. 2016-05-10]. Dostupné z: <http://nanocomposix.eu/pages/silver-nanoparticles-optical-properties#toc>
- [59] GREVENSTUK, Tomás, Sandra GONÇALVES, Telma DOMINGOS, Célia QUINTAS, Justin VAN DER HOOFT, Jacques VERVOORT a Anabela ROMANO. Inhibitory activity of plumbagin produced by *Drosera intermedia* on food spoilage fungi. *Journal of the science of food and agriculture* [online]. Červen 2012, roč. 92, č. 8, s. 1638–42. [cit. 2016-05-09]. doi 10.1002/jsfa.5522. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.5522>
- [60] Quillardet P, Huisman O, D'Ari 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*. 1982, 79(19) [cit. 2016-05-08]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC347033>

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

AgNPs	nanočastice striebra
TPP	tripolyfosfát sodný
PHB	polyhydroxybutyrát
PBS	fosfátový pufor (Phosphate Buffered Saline)
MTT	3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
SDS	dodecylsírán sodný