



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**PŘÍPRAVA NANOČÁSTIC A NANOVLÁKEN A JEJICH
VYUŽITÍ V PŘÍPRAVCÍCH PROTI AKNĚ**

PREPARATION OF NANOPARTICLES AND NANOFIBERS FOR APPLICATION IN ANTI-ACNE PRODUCTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. et Bc. Kamila Tilšarová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1155/2017
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. et Bc. Kamila Tilšarová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Příprava nanočástic a nanovláken a jejich využití v přípravcích proti akné

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) příprava nanočástic a nanovláken s obsahem aktivní složky
- 2) charakterizace účinku částic a vláken na mikroorganismy a humánní buňky
- 3) využití připravených materiálů jako složek přípravků proti akné

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

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

Bc. et Bc. Kamila Tilšarová
student(ka)

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Diplomová práce byla zaměřena na přípravu a charakterizaci nanočástic a nanovláken s obsahem aktivních látek z vybraných bylin s cílem aplikovat tyto materiály v přípravcích proti akné. Testovány byly různé typy extraktů, u kterých byl sledován obsah polyfenolů, flavonoidů a antioxidační aktivita. Extrakty byly dále enkapsulovány do liposomů a vláken z polyhydroxybutyrátu.

U připravených liposomů a vláken byla sledována především antioxidační aktivita a antimikrobiální aktivita vůči kmenu *Propionibacterium acnes*. Liposomové částice byly následně aplikovány i do kosmetických emulzí. Tyto krémy vykazovaly vysokou antioxidační aktivitu a vynikající stabilitu stanovenou pomocí analytické centrifugace.

Také připravená nanovláknna vykazovala vysokou antioxidační aktivitu a rovněž byl prokázán jejich antimikrobiální účinek. Připravené částice i vlákna byly na závěr otestovány z hlediska jejich bezpečnosti při kontaktu s humánními buňkami. Při vhodné koncentraci nebyl prokázán žádný cytotoxický účinek a testované materiály lze tak využít při aplikacích při problémech s akné.

Klíčová slova: akné, MTT test, nanovláknna, nanočástice, *Propionibacterium acnes*

Abstract

The diploma thesis was focused on the preparation and characterization of nanoparticles and nanofibres with active substances from chosen herbs with the aim to apply this materials to the products against acne. Various types of extracts were tested on the content of polyphenols, flavonoids and antioxidation activity. These extracts were encapsulated to the liposomes and fibres of polyhydroxybutyrate.

Prepared liposomes and fibres were tested mainly on antioxidation activity and antimicrobial activity against the strain *Propionibacterium acnes*. Then, liposomes were applied to cosmetic emulsions. These creams reported high antioxidation activity and excellent stability determined by analytical centrifugation.

Prepared nanofibres also reported high antioxidation activity and antimicrobial effect as well. Finally, particles and fibres were tested in contact with human cells. In appropriate concentration, there was no cytotoxic effect and tested materials can be used in applications on problems with acne.

Key words: acne, MTT test, nanofibres, nanoparticles, *Propionibacterium acnes*

TILŠAROVÁ, K. *Příprava nanočástic a nanovláken a jejich využití v přípravcích proti akné*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 71 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petra Matoušková, Ph.D..

Prohlášení

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

.....

Podpis studenta

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí mé práce Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za vedení, vstřícnost, cenné rady a velkou trpělivost. Děkuji také Ing. Renatě Pavelkové za pomoc s experimentální částí a prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za možnost pracovat v jejím týmu.

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Akné.....	9
2.1.1	Propionibacterium.....	11
2.2	Hodnocení antimikrobiálních účinků.....	11
2.2.1	Diluční metody.....	12
2.2.2	Difuzní metody.....	12
2.2.3	Epsilon test.....	12
2.3	Cytotoxicita a MTT test.....	12
2.3.1	Keratinocyty.....	13
2.4	Použití nanočástic a nanovláken v kosmetice.....	14
2.4.1	Nanočástice.....	15
2.4.2	Nanovlákná.....	17
2.5	Možnosti přípravy nanočástic a nanovláken.....	17
2.5.1	Příprava liposomů.....	17
2.5.2	Příprava nanovláken.....	17
2.6	Charakterizace nanočástic a nanovláken.....	19
2.6.1	Nanočástice.....	19
2.6.2	Nanovlákná.....	19
2.7	Vybrané přírodní látky.....	19
2.7.1	Aktivní obsahové látky.....	20
2.8	Kosmetické přípravky.....	20
2.8.1	Stabilita emulzí a HLB číslo.....	21
2.9	Komerčně dostupná kosmetika proti akné.....	22
2.9.1	Aktivní látky v přípravcích proti akné.....	22
3	Cíl práce.....	26
4	Experimentální část.....	27
4.1	Použité chemikálie.....	27
4.1.1	Chemikálie použité na přípravu extraktů a jejich charakterizaci.....	27
4.1.2	Chemikálie použité na přípravu nanočástic a nanovláken.....	27
4.1.3	Chemikálie použité na přípravu kosmetických přípravků.....	27
4.1.4	Chemikálie použité na kultivaci testovacích mikroorganismů.....	28
4.1.5	Chemikálie použité na kultivaci keratinocytů a MTT test.....	28
4.2	Použité přístroje a pomůcky.....	28
4.3	Použité mikroorganismy.....	29

4.4	Použité humánní buňky.....	29
4.5	Příprava a charakterizace extraktů z přírodních látek.....	29
4.5.1	Stanovení celkových polyfenolů.....	30
4.5.2	Stanovení celkových flavonoidů.....	30
4.5.3	Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS.....	31
4.6	Příprava a charakterizace liposomů.....	31
4.6.1	Stanovení enkapsulační účinnosti.....	31
4.6.2	Stanovení týdenní a měsíční stability.....	32
4.6.3	Stanovení velikosti a koloidní stability.....	32
4.6.4	Stanovení krátkodobé stability.....	32
4.6.5	Stanovení antioxidační aktivity.....	32
4.6.6	Stanovení koncentrace fosfolipidů pomocí Stewartova testu.....	32
4.7	Příprava a charakterizace nanovláken.....	33
4.7.1	Electrospinning.....	33
4.7.2	Stanovení antioxidační aktivity nanovláken.....	33
4.7.3	Stanovení krátkodobé stability nanovláken.....	33
4.7.4	Charakterizace nanovláken pomocí FTIR-ATR.....	33
4.8	Příprava kosmetických přípravků.....	33
4.8.1	Stanovení antioxidační aktivity krémů.....	34
4.8.2	Stanovení stability krémů pomocí analytické centrifugy.....	34
4.9	Antimikrobiální testy.....	34
4.9.1	Kultivace mikroorganismů.....	34
4.9.2	Příprava médií.....	34
4.9.3	Bujónová diluční metoda.....	34
4.9.4	Agarová disková metoda.....	35
4.10	Kultivace keratinocytů a MTT test.....	35
5	Výsledky.....	37
5.1	Charakterizace extraktů.....	37
5.1.1	Stanovení celkových polyfenolů.....	37
5.1.2	Stanovení celkových flavonoidů.....	38
5.1.3	Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS.....	39
5.2	Charakterizace částic.....	40
5.2.1	Stanovení enkapsulační účinnosti.....	40
5.2.2	Stanovení týdenní a měsíční stability.....	41
5.2.3	Stanovení velikosti a koloidní stability.....	42
5.2.4	Stanovení krátkodobé stability.....	43
5.2.5	Stanovení antioxidační aktivity.....	43

5.3	Antimikrobiální testy.....	43
5.3.1	Bujónová diluční metoda.....	44
5.3.2	Agarová difuzní metoda.....	48
5.4	Charakterizace nanovláken.....	48
5.4.1	Antioxidační aktivita nanovláken.....	48
5.4.2	Antimikrobiální aktivita nanovláken.....	49
5.4.3	Krátkodobá stabilita nanovláken.....	50
5.4.4	Charakterizace pomocí FTIR-ATR.....	51
5.5	Stanovení antioxidační aktivity krémů.....	52
5.6	Stanovení stability krémů pomocí analytické centrifugy.....	53
5.7	MTT test.....	55
6	Závěr.....	60
7	Seznam použité literatury.....	62
8	Seznam použitých zkratk.....	68
9	Přílohy.....	69
9.1	Postupné uvolňování polyfenolů z liposomů.....	69

1 Úvod

Kůže je nejen „obalem“ našeho těla, ale má i řadu životně významných a také nezbytných funkcí. Je proto důležité se o ni starat i pokud je zdravá [1].

Kožní problémy a akné trápí nemalé množství populace po celém světě. Přesto, že je akné spojováno především s mladistvou populací, stále častěji se objevuje také u dospělých (a to především žen) [2]. Čím dál více pacientů s takovýmto typem onemocnění, ale i běžní spotřebitelé kosmetických výrobků, chtějí raději produkty přírodního rostlinného původu než konvenční chemicky syntetizované. Důvodem je především to, že přírodní produkty jsou spotřebiteli vnímány a považovány za bezpečnější a šetrnější. Výrobky s přírodními aktivními látkami se pak souhrnně označují jako kosmeceutika a na rozdíl od běžných přípravků nejsou však tyto přírodní složky regulovány a tím pádem také postrádají farmaceutickou kvalitu, deklarovanou bezpečnost a účinnost [3].

Původní a klasická léčba akné především antibiotiky bývá dobře snášena a je účinná, nemá však preventivní efekt a problémem je také stále se zvyšující rezistence (především k tetracyklinu a erytromycinu, dále se používají clindamycin nebo chloramfenikol). Antibiotika tedy nemohou být aplikována dlouhodoběji a je třeba u nich velmi dbát na pravidelnost.

Cílem mé diplomové práce je proto sledovat aktivní látky v olejových, vodných a ethanolových extraktech zvolených bylin a stanovení jejich antimikrobiální účinky proti bakterii svázané s výskytem akné *Propionibacterium acnes*. Pro zvýšení stability budou účinné látky enkapsulovány do různých typů částic a také nanovláken. Kromě samotných přírodních extraktů bude zkoumána možnost kombinace s vybranými léčivy s antimikrobiálními účinky a také aplikace do konkrétních kosmetických produktů. Nedílnou součástí bude také testování bezpečnosti takových přípravků, a to pomocí testu viability na lidských kožních buňkách keratinocytech - tzv. MTT testu.

2 Teoretická část

2.1 Akné

Akné patří mezi multifaktoriální onemocnění s mnoha příčinami. I přesto bývá stále považováno pouze za problematickou, precitlivělou pleť. Jedná se přitom o neinfekční zánětlivé onemocnění mazových žláz a vlasových folikulů. Činnost mazových žláz je řízena hormonálně, proto jsou hormony (především pak pohlavní – androgeny a estrogeny) při vzniku akné velmi podstatné. Mezi nejúčinnější a nejvýznamnější androgeny kůže patří dihydrotestosteron vznikající z testosteronu působením enzymu 5-alfa reduktázy, která se nachází v kůži, v mazových žlázách a vlasových folikulech. Androgeny působí na mazové žlázy vždy povzbudivě a dochází ke zvýšené tvorbě mazu, zároveň ale záleží na lokalitě (nejvíce mazových žláz se nachází na obličeji, v horní polovině trupu a horní polovině zad – tedy na místech typických pro výskyt akné). Estrogeny naopak činnost mazových žláz spíše utlumují.

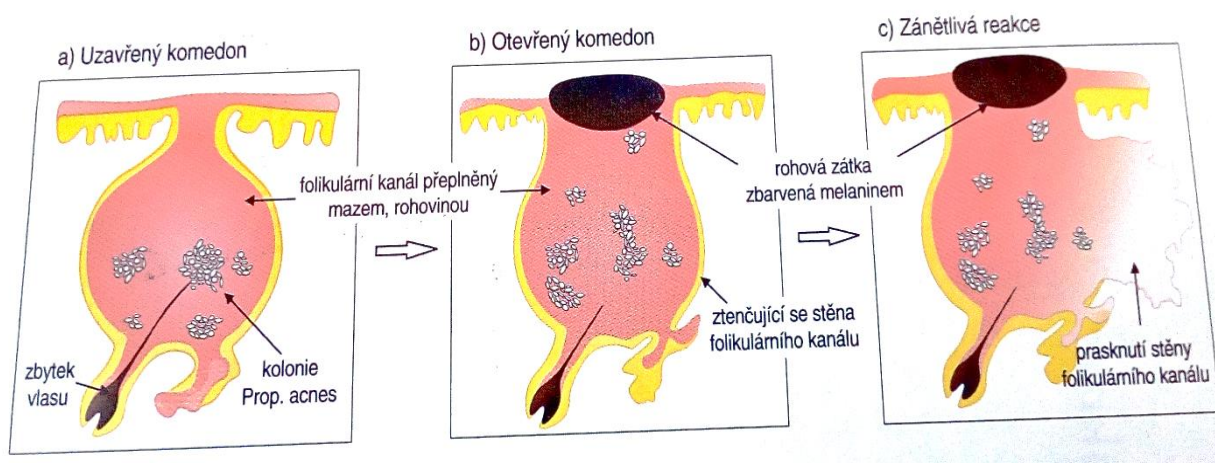
Na celkovém vzniku akné se podílí především vnitřní faktory, a to [1]:

- Zvýšená tvorba mazu (seborea) – na základě zvýšené činnosti mazových žláz, za kterou odpovídají výše zmíněné androgeny (dále ještě hormony podvěsku mozkového, štítné žlázy a působení centrálního nervového systému).
- Zvýšená a zrychlená produkce zrohovatělých buněk ve folikulech a ve vývodech mazových žláz. Tyto buňky mají vyšší přilnavost, což ztěžuje jejich odlučování, blokují uvolňování mazu na povrch kůže a ucpávají vývody folikulů.
- Bakteriální mikroflóra – především jde o mikroorganismus *Propionibacterium acnes*, jehož kolonie osidlují hlubší části folikulů, kde je anaerobní prostředí. Jeho působení na vznik zánětu při akné je ale nepřímé – projevy zarůžovělých pupínků jsou důsledkem vytváření a působení protilátek proti této bakterii. Teprve nadměrné množství mazu tvoří příznivé prostředí pro narůstání počtu propionibakterií – tím se také zvyšuje počet jimi produkováných aktivních látek, které přispívají ke vzniku komedonu i k zánětlivé reakci. *Propionibacterium acnes* totiž produkuje enzymy lipázy štěpící tuky na mastné kyseliny. Některé z nich působí nepříznivě na stěnu folikulu, který praská a přítomné bílé krvinky pak reagují na jeho obsah jako na cizí těleso a dochází ke vzniku uzlíčku (granulomu). Tato reakce je ale zcela individuální a odráží se v klinickém projevu akné.
- Dědičnost – určuje rozsah velikosti a intenzitu funkce mazových žláz a především zvýšenou citlivost androgenních receptorů pro androgeny.

- Psychosomatické souvislosti – akné zhoršují např. různé stresy, význam dále může mít např. chronická zácpa, ale i jiná ložiska infekce (zubní vácíky, chronické záněty krčních mandlí...), nebo horečnatá onemocnění s nadměrným pocením. Mohou se podílet také některé potraviny, sluneční záření, mechanické dráždění, škrábání a intenzivní vymačkávání aknézních projevů, chemické látky nebo kosmetické krémy.
- Některé léky – především bromidy, jodidy a chloridy, dále vitamin B12, steroidní hormony, některé léky na epilepsii, psychofarmaka a další.

Projevy akné se tedy začnou tvořit tak, že se ve vývodech folikulů začnou hromadit rohové šupinky a maz, dochází k jejich ucpání a tvoří se mikrokomedony. Dalším hromaděním tohoto obsahu se projevují již okem patrné známky na kůži v podobě uzavřených komedonů – „bílých hlaviček“. Ty představují ještě nerozšířené ústí vývodu folikulů, dalším plněním dochází k rozšiřování tohoto ústí a na povrchu kůže se začínají objevovat otevřené komedony – „černé hlavičky“, jejichž zbarvení je dáno oxidací melaninu [1].

Následují zánětlivé projevy, jako pupínky, neštovičky, uzly, vředy nebo infiltráty vzniklé uzavřením vývodu, kde se tvoří vhodné prostředí pro bakterie, kvasinky a stafylokoky. Pokud je zánět těžký a dojde ke zničení celé mazové žlázy, vzniká jizva. Celkové schéma je uvedeno na **Obr. 1**.



Obr. 1 Vznik komedonů a zánětu [1]

Existuje mnoho typů aknézního onemocnění, většinou se ale jeví velmi podobně, což je dáno postižením stejné lokality. Příčiny jsou ovšem dány poměrem jednotlivých faktorů, jejichž účinky se mohou sčítat [1]:

Typy akné jsou děleny do 3 základních skupin [1]:

- formy akné podmíněné vnitřními dispozicemi – především *acne vulgaris* s dalšími klinickými formami (dle závažnosti)
- formy akné podmíněné zevními faktory
- *akneiformní* formy akné – vedlejší projev užívání některých léků

2.1.1 *Propionibacterium*

Jak již bylo zmíněno významný vliv na tvorbu projevů akné má i mikrobiální mikroflóra především *Propionibacterium acnes*.

Jedná se o grampozitivní, nesporulující anaerobní bakterii, která má tvar kyjovité tyčinky. Bakterie rodu *Propionibacterium* se v lidském těle vyskytují běžně např. v zažívacím traktu, v kůži, v ústní dutině, vnějším zvukovodu, očních spojivkách [3], dále je nalezneme v mléce a mléčných výrobcích, v půdě nebo ve vodě. Rod zahrnuje bakterie propionového kvašení, při kterém je kyselina mléčná zkvašována na kyselinu propionovou, octovou a na oxid uhličitý. Tyto bakterie jsou také využívány v potravinářství při výrobě sýrů [4].

Propionibacterium acnes běžně kolonizuje především kůži, nalezneme ho však i na ostatních zmíněných částech lidského těla. Největší koncentrace této bakterie je v místech s velkou tvorbou mazu, tedy na tváři, pokožce hlavy a horní polovině trupu. *Propionibacterium acnes* bude v předložené práci použit jako jeden z testovacích mikroorganismů v antimikrobiálních testech.

2.2 Hodnocení antimikrobiálních účinků

Mikrobiologie je vědou studující živé organismy mikroskopické velikosti – tedy mikroorganismy, mezi které se řadí protozoa, houby (tedy plísně a kvasinky), bakterie a viry.

Mikroorganismy se vyskytují všude kolem nás a jsou také součástí nás samotných. V kůži se za normálních okolností vyskytují bakterie především rodu *Staphylococcus* (*S. epidermidis*, *S. hominis* a další). V místech s vyšší koncentrací triglyceridů v mazu se vyskytují bakterie, které mají schopnost produkce lipázy (lipofilní korynebakterie, anaerobní propionibakterie, brevibakterie). Z hub se v lidské kůži vyskytují kvasinky rodu *Candida*, *Torulopsis*, *Pityrosporum*. Normální flóra kůže je ale ovlivněna jejími vlastnostmi jako je vlhkost, umístění mazových a potních žláz a kontaminací ze sousedních sliznic (nos, konečník) [6].

Ke správné identifikaci mikroorganismů je potřeba je kultivovat, musí být poskytnuty vhodné živiny a zajištěny optimální fyzikální podmínky [7].

Pro zjišťování antimikrobiálních účinků jsou využívány mikroorganismy, na kterých jsou dané látky testovány. Metody dělíme na diluční a difuzní [8], [9]. K testování byly vybrány kromě *Propionibacterium acnes* také zástupce gramnegativního druhu bakterií *Serratia marcescens* a grampozitivní *Micrococcus luteus* [5].

2.2.1 Diluční metody

Pomocí těchto metod zjišťujeme hladinu MIC, což je nejnižší koncentrace dané látky, která viditelně inhibuje růst daného mikroorganismu. Slouží také ke kvantifikaci.

Do kultivačního média se přidává přesné množství testované látky a hodnotí se absence růstu mikroorganismu. Mezi diluční metody patří agarová a bujónová diluční metoda [8], [9].

2.2.2 Difuzní metody

Principem je difuze testované látky ze zdroje do okolí, díky čemuž vzniká klesající gradient koncentrace, který zabrání růstu mikroorganismu. Hodnoceny jsou pak tzv. inhibiční zóny.

Metody jsou prováděny na pevných půdách, na jejichž povrchu jsou zaočkovány testovací mikroorganismy [8], [9].

2.2.3 Epsilon test

E-test je metodou kombinující předchozí difuzní i diluční metody, lze pomocí něho stanovit také hodnotu MIC.

Na agar s naneseným testovacím mikroorganismem jsou aplikovány E-testové proužky. Ty na svých krajích mají koncentrační gradient testované látky, která proniká do média a ovlivňuje růst. Následně je po ukončení kultivace vytvořena elipsoidní inhibiční zóna a hodnota MIC se odečítá v místě průniku okraje proužku s hranicí růstu bakterií [10].

2.3 Cytotoxicita a MTT test

Účinky škodlivých látek na buňky může být různý. V některých případech škodlivá látka mění některé buněčné procesy, přičemž životaschopnost buňky je zachována. Pak se jedná o cytopatický efekt. Jindy nejsou poškozeny základní funkce buňky udržující její vitalitu, ale buňka se nemůže dělit a mluvíme tak o cytostatickém efektu. Je-li buňka úplně usmrcena, jedná se o cytotoxický efekt [11].

Při ireverzibilním poškození nemusí dojít k jejímu zániku ihned, buněčné funkce často odpadávají a buňka degeneruje. I přesto, že buňky mají obvykle velkou regenerační

schopnost, nedokáží obnovit (při ireverzibilním poškození) orgány, které mají vlastní DNA – tedy jádro a mitochondrie [11].

Většina látek působí tak, že zasahuje do mechanismů, které vytvářejí a udržují strukturu buňky na úrovni molekulární, submikroskopické a mikroskopické. Postižení buněčných struktur bývá komplexní a mechanismus není přesně znám [11].

Všechny životní procesy jsou závislé na dodávce energie – především z makroergických vazeb organických fosfátů – nejčastěji ATP. Tato energeticky bohatá molekula je získána štěpením uhlíkatého řetězce glukózy v glykolýze, nebo oxidační fosforylací (oxidací vodíku z organických látek). Oxidační fosforylace je lokalizována na vnitřní membráně mitochondrie, poškozena může být porušením struktury membrány mitochondrie, odpojením oxidace od fosforylace ADP na ATP, nebo zásahem do přenosu energie při fosforylacích [11].

Při zjišťování cytotoxických účinků látek se používají cytotoxické testy viability (životaschopnosti) buněk. Jeden z nich, MTT test, je založen na schopnosti buněčné NAD(P)H dependentní dehydrogenázy (přítomné v mitochondrii živé buňky) redukovat MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) tetrazoliové barvivo (žlutá barva) na nerozpustný formazan (fialová barva) [12]. Ten zůstává uvnitř buněk ve formě granulí a po přidání detergentu (např. SDS) a okyselení se barvivo uvolní a rozpustí. Vzniklý roztok je hodnocen spektrofotometricky a intenzita fialové barvy je úměrná počtu živých buněk [13].

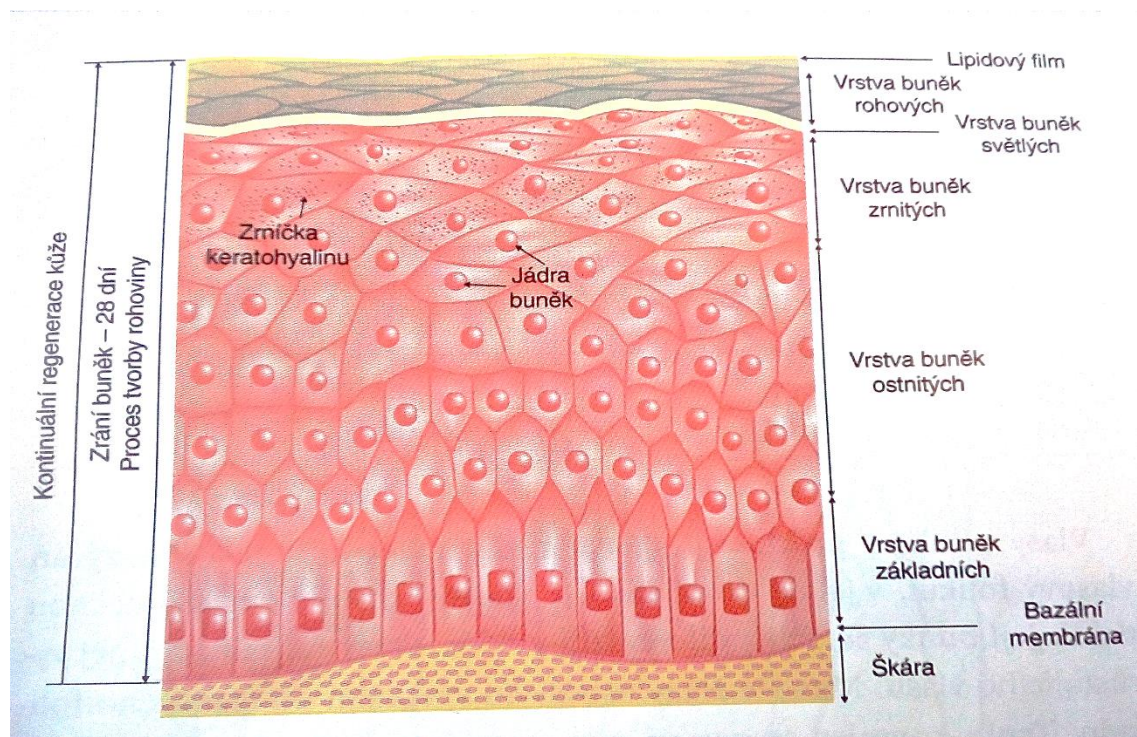
MTT bude v této práci prováděn na lidských kožních buňkách – keratinocytech.

2.3.1 Keratinocyty

Keratinocyty jsou hlavními typy buněk epidermis (pokožky). Mimo ně se zde vyskytují také melanocyty produkující pigment melanin, antigen-prezentující Langerhansovy buňky a hmatové Merkelovy buňky. Keratinocyty tvoří v epidermis pět vrstev – bazální (s mitoticky se dělícími buňkami, nachází se zde i melanocyty a Merkelovy buňky), ostnitá (zde probíhá produkce keratinu a dalších proteinů, jsou zde také Langerhansovy buňky), zrnitá (zde buňky podléhají procesu keratinizace), světlá a rohová (tvořená odumřelými zrohovatělými buňkami složenými většinou z keratinu). Celkové schéma je znázorněno na **Obr. 2** [14].

Thloušťka epidermis se liší na jednotlivých částech těla (např. na dlaních a chodidlech je vrstva silnější než na hlavě) a mění se od 75 μm do 1,4 mm [14].

Při poranění kůže podporují keratinocyty zánětlivý proces produkcí cytokinů a tím napomáhají celkovému procesu hojení [15].



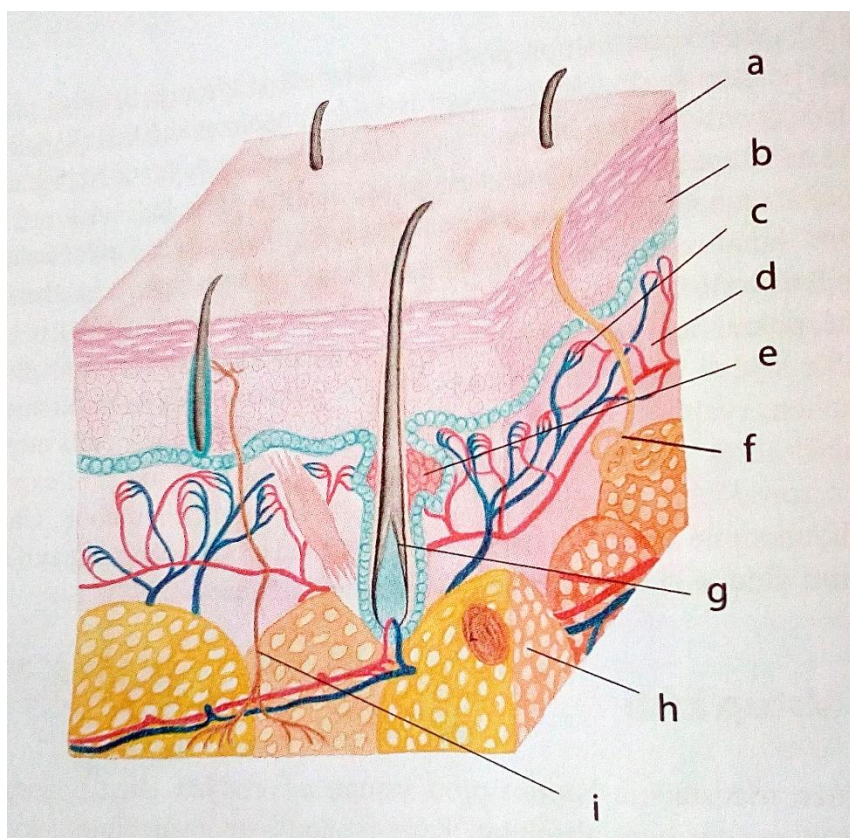
Obr. 2 Skladba epidermis [1]

2.4 Použití nanočástic a nanovláken v kosmetice

Jak již bylo řečeno, lidská kůže (a hlavně pak rohová vrstva) slouží jako bariéra proti proniknutí cizorodých látek [16], [17]. Cizorodé látky tak do lidského těla nemohou vstupovat, anebo pronikají, ale pouze v malé míře. Látky mohou do těla pronikat intercelulárně (procházet mezibuněčnými prostory), nebo transcelulárně (prostupovat samotnými buňkami). Z hlediska průniku cizorodých látek je nejdůležitější ochranná vrstva zrohovatělá vrstva, tzv. stratum corneum [18].

Díky této vrstvě je kůže pro většinu látek těžko propustná, mírně propustná však stratum corneum může být pro lipofilní, tak i pro hydrofilní látky. Povrch kůže není kompaktní a tak mohou látky pronikat cestou přes mazové žlázy, cestou potních žláz, nebo přes vlasový folikul. Obecně platí, že v tucích rozpustné látky se vstřebávají nejvíce žlázami mazovými, látky ve vodě rozpustné zase žlázami potními.

Ostatní vrstvy pokožky (na **Obr. 3**) mají již hydrofilnější charakter než stratum corneum. Lipofilní látky však mohou difundovat buněčnými membránami až do hlubších vrstev a ze škáry a podkoží následně až do oběhového systému [18].



Obr. 3 Schematické znázornění průřezu lidskou kůží [18]

a – keratinizovaná vrstva *stratum corneum*; **b** – *epidermis*; **c** – krevní kapilára; **d** – škára, *dermis*; **e** – mazová žláza; **f** – potní žláza; **g** – vlas; **h** – tuková tkáň v podkoží; **i** – nerv

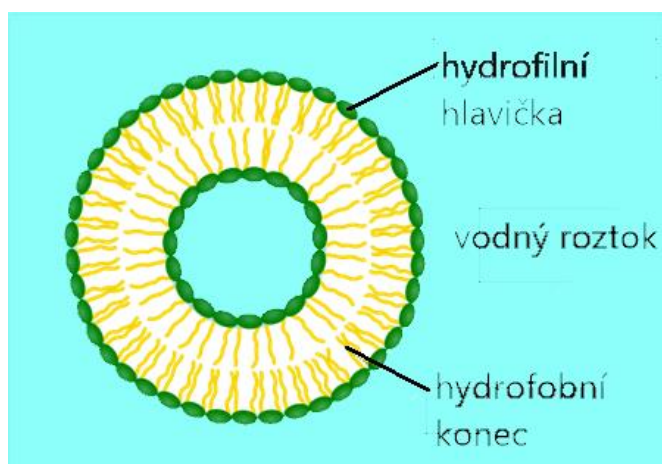
2.4.1 Nanočástice

Při používání kosmetických přípravků je žádoucí, aby se aktivní látky přes kůži dostaly. Proto se v kosmetice používají takzvané nosičové systémy (*delivery systems*). Ty totiž zvyšují propustnost aktivních látek a regulují jejich koncentraci jak v samotném přípravku, tak poté v kůži. Nosičové systémy však především zaručují uvolnění aktivní látky až v daném místě účinku. Pro kosmetické výrobky pak platí, že se aktivní látka má držet ve vrchních vrstvách pokožky a nemá se absorbovat do hlubších vrstev.

Schopnost nosičových systémů uvolňovat aktivní látku postupně dále umožňuje použití takových látek, které jsou ve vyšších koncentracích dráždivé, nebo mají být uvolňovány po delší dobu. Mezi další výhody patří zajištění stability a ochrana samotné aktivní látky proti vnějším vlivům jako je světlo, kyslík nebo teplo. Mohou být také maskovány nepříjemné organoleptické vlastnosti, u těkavých látek lze zabránit jejich vypařování [16].

Zmiňované nosičové systémy dělíme na vezikulární (liposomy, niosomy, transfersomy), emulzní (mikroemulze, nanoemulze) a částicové (mikro a nanočástice) [16].

Liposomy jsou dnes využívány v potravinářství, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu [16]. Jsou to kulovité vezikulární jedno nebo vícelamelární částice. Lamely jsou složeny z fosfolipidové dvojvrstvy, která má hydrofilní hlavičku a hydrofobní konec (viz. **Obr. 4**), což zaručuje amfifilní charakter liposomů. Můžeme tak do nich inkorporovat jak hydrofilní, tak hydrofobní látky. Velikost mají od 25 až do 10 000 nm [19]. Jejich nevýhodou je nižší stabilita fosfolipidové dvojvrstvy, která ale může být zvýšena např. potažením polysacharidovou vrstvou. Další z vezikulárních systémů byly vyvinuty právě na základě liposomů [16].



Obr. 4 Schéma liposomu, převzato a upraveno z [20]

Niosomy jsou biokompatibilní a biodegradovatelné vezikuly složené z neiontových povrchově aktivních látek (surfaktantů) a v některých případech z cholesterolu nebo jeho derivátů (pro zlepšení stability dvojvrstvy surfaktantu). Pro snížení rizika agregace jednotlivých částic, zvýšení enkapsulační účinnosti a zvýšení následného průniku do kůže se používají nabitě molekuly. Niosomy jsou také stabilnější a jednodušší na přípravu než liposomy, a to díky vyšší odolnosti surfaktantů proti oxidaci a vyšším teplotám [16].

Transfersomy jsou deformovatelné vezikuly tvořené fosfolipidy a aktivátory. Těmi bývají jednořetězcové surfaktanty s velkým poloměrem zakřivení, které zvyšují pevnost dvojvrstvy. Díky tomu jsou pak transfersomy při průniku do kůže elastické a odolné proti prasknutí [16].

Dalším typem vezikulů jsou ethosomy, což jsou fosfolipidové vezikuly s vysokým obsahem ethanolu (až 50 %). Jsou také dobře deformovatelné a dobře pronikají kůží do hlubších vrstev než třeba transfersomy, mají ale nižší stabilitu vůči oxidativním procesům [16].

Lipidovými nanočásticemi pak rozumíme koloidní nanoemulzní disperzi O/V. Kapalný olej je nahrazen pevnými lipidy (v případě pevných lipidových nanočástic), nebo směsí

pevných a kapalných lipidů (pak vznikají nanostrukturované lipidové nosiče). Oproti liposomům degradují *in vivo* pomaleji.

Nano/mikročástice v sobě zahrnují nano/mikrosféry (skládající se z rozptýlené aktivní látky v polymerní matrici) a nano/mikrokapsle (tvořící zásobárnu s jádrem a obalem jako bariérou chránící aktivní látku). Bývají v kosmetice používány zejména jako konzervační a antibakteriální látky. Jejich příprava probíhá nejčastěji sprejovým sušením [16].

2.4.2 Nanovlákná

S rozvojem nanotechnologií roste také zájem o výzkum nanovláken. Největší rozvoj zaznamenala technika electrospinningu, pomocí které lze připravit nanovlákná o průměru od desítek nanometrů po jednotky mikrometrů. Důležitou vlastností nanovláken je vysoký poměr povrchu k objemu. Mohou tak být využita pro vysoce efektivní filtrace, v tkáňovém inženýrství jako scaffoldy nebo jako krytí ran.

Mezi hojně využívaný polymer pro přípravu nanovláken patří PHB (poly-(3-hydroxybutyrát)). Jde o přírodní, plně degradabilní a biokompatibilní polymer produkovaný některými mikroorganismy [21]. Dalšími využívanými materiály jsou želatina, chitosan, polyuretany, algináty, polycaprolakton, polyvinylalkohol, karboxymethyl celulóza, kyselina polymléčná a další [22].

2.5 Možnosti přípravy nanočástic a nanovláken

2.5.1 Příprava liposomů

Možností přípravy liposomů je více. Obecně zahrnuje rozptýlení lipidových molekul ve vodné fázi. Pro samotný vznik liposomů se používají metody mechanické (pomocí ultrazvuku, odpařováním na tenké vrstvě, mikrofluidizací nebo extruzí), nahrazení organického rozpouštědla vodným médiem (injekce ethanolu, odpařování reverzní fáze) nebo odstranění detergentu [16].

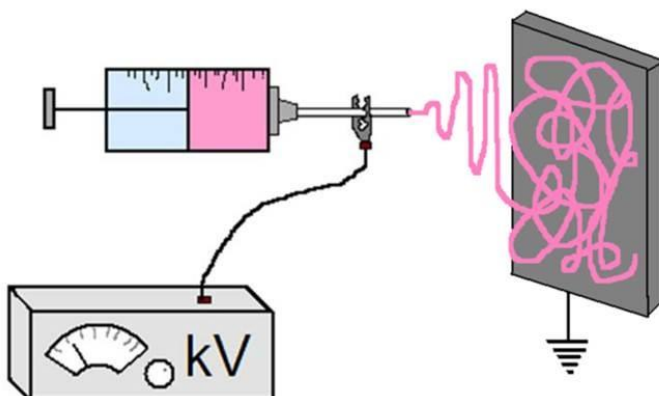
2.5.2 Příprava nanovláken

Nanovlákná bývají připravována nejčastěji metodou electrospinningu, nebo pomocí rotačního zvlákňování.

Principem electrospinningu je produkce tenkých polymerních vláken z roztoku polymeru, a to působením elektrostatické síly. Na konec kapiláry, ve které je roztok polymeru, je aplikováno elektrické pole, což indukuje náboj na povrchu kapaliny. Jak se elektrické pole zvětšuje, kapka na konci kapiláry se začne prodlužovat a tvořit tzv. Taylorův kužel. Až stále

se zvětšující elektrostatická síla překoná povrchové napětí, je ze špičky Taylorova kužele vystříknut tenký proud nabitě kapaliny, ze které se začne odpařovat rozpouštědlo. Vzniklé polymerní vlákno je v pevném skupenství zachycováno na kovovém kolektoru [23].

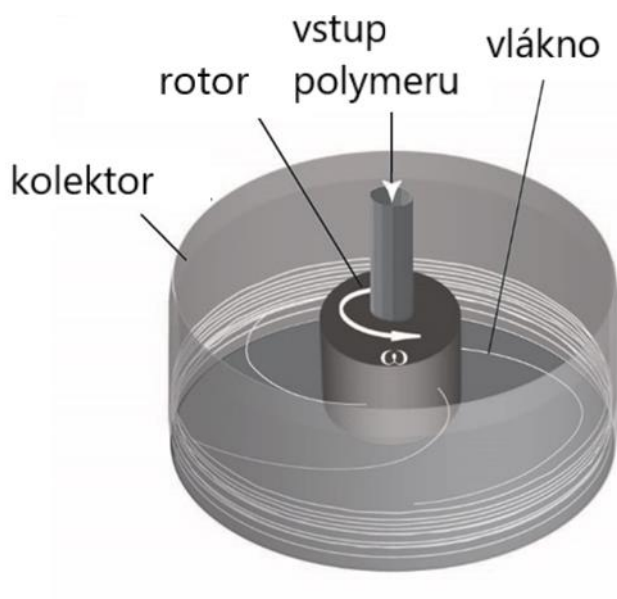
Aparatura, jejíž schéma je na **Obr. 5**, obsahuje tři komponenty – zdroj vysokého napětí, jehlu napojenou na stříkačku s roztokem polymeru a uzemněný kolektor [24].



Obr. 5 Schéma electrospinningu [25]

Další možností přípravy nanovláken je rotační zvlákňování (forcespinning), které využívá vnější odstředivou sílu. Velikou výhodou je rychlost produkce vláken a také velké množství materiálů, které lze použít – polymery, kovy, kompozity nebo keramiku [26].

Geometrii a morfologii vláken lze kontrolovat pomocí rotační rychlosti, systému sbírání vznikajících vláken a teploty [27]. Celkové schéma je vidět na **Obr. 6**.



Obr. 6 Schéma rotačního zvlákňování, převzato a upraveno z [28]

2.6 Charakterizace nanočástic a nanovláken

2.6.1 Nanočástice

Velikost částic se v mikrod disperzních soustavách měří často metodou DLS – dynamického rozptylu světla. Principem je fluktuace intenzity rozptýleného světla ze zdroje díky Brownovu pohybu, kterému částice podléhají [29].

Koloidní stabilita a míra tendence částic agregovat je pak vyjádřena zeta potenciálem. Jde o potenciál na rovině skluzu mezi částicí a sdrúženou dvojvrstvou s obklopujícím rozpouštědlem. Nízký zeta potenciál (v rozmezí -30 až 30 mV) bude značit, že částice se nebudou odpuzovat dostatečně k tomu, aby se zabránilo jejich shlukování [30].

2.6.2 Nanovlákná

Úspěšnost enkapsulace aktivních látek u připravených nanovlákná byla v této práci analyzována technikou FTIR (infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací). Podstatou metody je interakce infračerveného záření (což je záření o vlnové délce 0,5 až 800 nm, a tedy vlnótech 20 až 12 500 cm⁻¹) se studovanou hmotou. Energie fotonů infračerveného záření postačuje pouze ke změně rotačně-vibračního stavu molekuly. A tyto získané hodnoty vibračních energií souvisí s pevností vazeb, geometrií a hmotností jader. Tato technika tedy slouží zejména k identifikaci a charakterizaci struktury látek [31].

2.7 Vybrané přírodní látky

Heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla*) je jednoletá, bohatě kořenující rostlina s úbory s bílými trubkovitými a žlutými terčovými květy. Pochází z východu Středomoří a u nás roste na rumišťích, v polích a u cest. Je to významná léčivá rostlina, z květů se připravují čaje, odvary anebo lze používat i zevně [32].

Díky obsahovým látkám tiší záněty a křeče, působí příznivě při vnějších zánětech, na kožní ekzémy nebo při popáleninách [33] [34].

Kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*) roste hojně na rumišťích, v křovinách a na pasekách. V době válek sloužila také jako přadná surovina [32]. Lze ji zpracovat jako zeleninu na způsob špenátu, vylišovaná šťáva je bohatá na vitaminy a zmírňuje např. jarní únavu.

Jako léčivka působí proti artritidě, revmatu a proti onemocněním močových cest a prostaty. Ve formě čaje slouží k celkovému pročištění organismu [33]. Díky chlorofylu má významné protizánětlivé účinky, v kosmetických přípravcích se používá k redukci pachů a pocení, na ekzémy, popáleniny, po zalití horkou vodou se používá také na akné [35].

Jetel luční (*Trifolium pratense*) roste na loukách, pastvinách a okrajích cest. Už od 18. století sedláci vysévali jetel, který jim sloužil jako krmivo, ale také jako hnojivo bohaté na dusík. Kvete od června do září.

Léčebné účinky jetele jsou spojeny s mírněním potíží v období klimakteria [33]. Má dezinfekční a stahující účinky, používá vnitřně i na zanícené a hnisavé rány, ekzémy, nebo při revmatitidě [36].

Řebříček obecný (*Achillea millefolium*) roste na loukách, pastvinách a u cest [32]. Obsahuje podobné éterické oleje jako heřmánek, pomáhá hojit rány a zmírňovat zažívací potíže, při cévních onemocněních (upravuje tlak), zastavuje krvácení. Pomáhá také při vyrážkách, poraněních kůže nebo akné [37]. Kvete od června do října [33].

2.7.1 Aktivní obsahové látky

Mezi hlavní aktivní látky patří polyfenoly známé svými antioxidačními, protizánětlivými, neuroprotektivními, protirakovinnými, anti-diabetickými a antimikrobiálními vlastnostmi. Jedná se o rozsáhlou skupinu strukturně odlišných látek, které jsou klasifikovány na základě počtu fenolových kruhů (což jsou aromatické kruhy s navázanými hydroxylovými skupinami). Hlavními třídami polyfenolů jsou fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany. Mezi další skupiny se pak řadí kumariny a taniny [38].

Antioxidační aktivitou rozumíme schopnost předcházet oxidaci molekul produkujících volné radikály a také ukončovat řetězové reakce způsobené těmito volnými radikály a předcházet tak oxidačnímu stresu. Jak už bylo zmíněno výše, bohatým zdrojem přírodních antioxidantů jsou právě fenolické látky obsažené v rostlinách, ovoci a zelenině [39].

2.8 Kosmetické přípravky

Většina kosmetických přípravků jsou emulze, která je definována jako kapičky tekutiny nebo krystaly (vnitřní fáze) dispergované v kapalině (kontinuální fáze). Podle toho, zda je vnitřní prostředí lipofilní (např. olej, parafin) a dispergované ve vodném prostředí, nebo naopak vodné prostředí dispergované v lipofilním, rozlišujeme typ emulze O/V (olej ve vodě), nebo V/O (voda v oleji) [40].

Základní krémy bývají složeny z následujících ingrediencí: emolienty (10 – 40 %), humektanty (1 – 5 %), zahušťovadla (0,1 – 0,5 %), emulgátory (1 – 5 %), stabilizátory (0,01 – 0,2 %), konzervanty (0,01 – 0,5 %) a neutralizátory (0,01 – 0,05 %) [16].

Emolienty jsou hydrofobní sloučeniny, které mají zabránit vypařování vody z pokožky tvorbou okluzivního filmu. Humektanty jsou naproti tomu hydrofilní molekuly, které přitahují

vodu do rohové vrstvy. Zahušťovadla jsou určena k dosažení správné konzistence a reologických vlastností produktu. Emulgátory mají hydrofobní i hydrofilní charakteristiku, hromadí se na rozhraní obou fází a tvoří tak emulzi. Dělíme je na iontové a neiontové. Konzervanty zabráňují růstu mikroorganismů v produktu a stabilizátory zajišťují jeho fyzikálně-chemickou integritu. Velmi důležitou složkou kosmetických výrobků jsou aktivní látky jako UV filtry, antioxidanty, látky proti akné a další [16].

Co se týká olejové složky, lze její složení volit podle konkrétního typu pleti. Pro pleť suchou je dobrý olej mandlový, avokádový nebo olivový. Pro smíšenou olej z jojoby nebo hroznových jadérek. Na zralou pleť je dobré použít olej šípkový nebo pupalkový. Na problematickou pleť je vhodný olej z černého kmínu nebo jojoby [41].

2.8.1 Stabilita emulzí a HLB číslo

V systému hydrofilně-lipofilní rovnováhy jde o rovnováhu mezi hydrofilní a lipofilní částí molekuly (HLB = hydrophilic-lipophilic balance). Na základě této hodnoty pro olejovou fázi emulze se potom volí vhodný emulgátor se stejným číslem. HLB lze tedy vypočítat na základě HLB hodnoty olejové směsi jako (rovnice (1)):

$$HLB_{požad.} = \sum HLB_i \cdot x_i \quad (1)$$

kde HLB_i a x_i je HLB hodnota a hmotnostní podíl i-té složky.

Hydrofilní emulgátory pro emulze O/V budou mít hodnotu HLB vyšší než 11, lipofilní pro emulze V/O pak nižší než 9 [42].

Při výrobě emulzí ovšem musíme brát v úvahu kompatibilitu s ostatními složkami, viskozitu a velikost jednotlivých kapiček emulze, protože toto všechno ovlivňuje stupeň krémování nebo rozdělování fází. Většinou se proto volí kombinace dvojice emulgátorů, jeden s vysokým, druhý s nízkým HLB číslem. Následně se pozoruje, jaké celkové HLB číslo tvoří stabilní emulzi. Hodnoty HLB některých emulgátorů lze nalézt v literatuře nebo přímo v katalozích dodavatelů [43].

Problémem u emulzí bývá jejich nestabilita spojená s procesem tzv. krémovatění, který je způsobený rozdílem hustot jednotlivých fází. To pak vede k jejich oddělování [44]. Částice s vyšší hustotou než disperzní prostředí se budou pohybovat a usazovat ve směru gravitačního zrychlení, částice s menší hustotou pak proti němu. Usazování pouze v gravitačním poli je ale obvykle relativně pomalé, proto nahrazujeme gravitační zrychlení zrychlením odstředivým [45].

Pro účely analyzování stability emulzí je tak používána sedimentační analýza pomocí analytické centrifugy. Tato metoda bývá dále používána ke zjišťování molekulové hmotnosti částic, sedimentačního koeficientu a dalších hydrodynamických vlastností [46].

Vzorek je umístěn do kyvety a principem metody je sledování profilu transmitance blízkého infračerveného záření ve zvolených intervalech. Sedimentace se projeví vyčerením a zvýšením transmitance v části vzorku a také tvorbou sedimentu a tím pádem snížením transmitance [45].

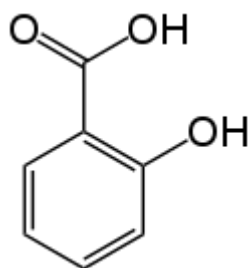
2.9 Komerčně dostupná kosmetika proti akné

Téměř všichni výrobci kosmetiky mají ve své nabídce produkty určené pro aknézní pleť, často jde o celé řady pečujících přípravků. Můžeme tak koupit krémy, čisticí gely, micelární vody a tonika, nebo třeba pleťové masky. Jejich účelem je především redukovat tvorbu mazu, zklidňovat pleť, tlumit projevy zánětu a působit antibakteriálně [47], [48], [49], [50], [51].

2.9.1 Aktivní látky v přípravcích proti akné

Mezi nejčastěji používané aktivní látky patří extrakty či esenciální oleje (nejčastěji z australského čajovníku známého jako tea tree, šalvěje, levandule a mnoha dalších) [47], [49], [51].

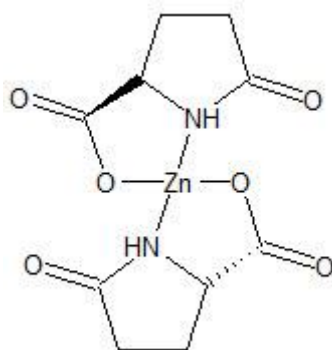
Další často využívanou látkou je kyselina salicylová [48], [50], [51]. Ta je pro své komedolytické a desmolytické vlastnosti často využívána při léčbě akné, pro redukci pih a jiných pigmentových skvrn. Bývá také využívána jako povrchový chemický peeling pro omlazení pleti. Koncentrace při takovémto použití je uváděna poměrně vysoká, 20 – 30 %, v kosmetických produktech je pak její koncentrace povolena do 3 % (v Číně je povolená koncentrace kyseliny salicylové v kosmetice pouze do 2 %) [52]. Vzorec kyseliny salicylové je na **Obr. 7**.



Obr. 7 Vzorec kyseliny salicylové [53]

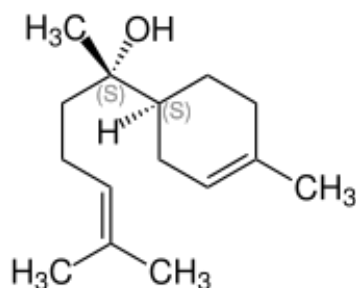
Antibakteriální a antimykotickou látkou používanou v kosmetice je piroctone olamine (obchodní název je pak Octopirox) [47], [50]. Jde o ethanolaminovou sůl derivátu hydroxamové kyseliny – piroctonu. Je to hydroxypyridonová antimykotická látka [54]. Poprvé byla syntetizována roku 1979 v Německu firmou Schwarzkopf-Henkel. Bývá často součástí šampónů proti lupům jako antimikrobiální složka proti kvasince rodu *Malassezia*. Ta štěpí kožní maz na volné mastné kyseliny, které spolu s mikrobiálními peroxidázami dráždí pokožku a způsobují její šupinkovatění (což může být problém i při vzniku akné). Piroctone olamine má schopnost pronikat buněčnými membránami a tvořit komplexy s ionty železa a inhibovat tak energetický metabolismus v mitochondriích patogenů, působení je ale komplexní a ne úplně známé [55].

Látka označovaná jako Zincidone, je zinečnatá sůl kyseliny L-pyrrolidon karboxylové (L-PCA). Má hydratační a zvlhčující účinky na pokožku a pomáhá regulovat tvorbu kožního mazu. L-PCA vzniká cyklizací kyseliny L-glutamové, která je aminokyselinou rostlinného původu. Zinek je pak schopný inhibovat již výše zmiňovaný enzym 5- α -reduktázu, který testosteron hydrogenuje na dihydrotestosteron (a ten je významným androgenem kůže). Zincidone má také účinek proti proliferaci přímo bakterie *Propionibacterium acnes* [56]. Vzorec je na **Obr. 8**.



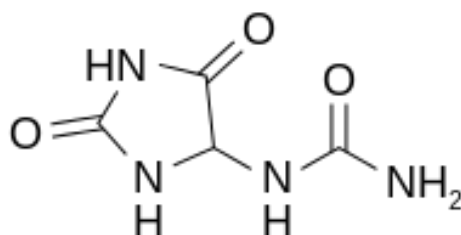
Obr. 8 Vzorec Zincidonu [57]

Významnou látkou využívanou v kosmetice je také alfa-bisabolol [47]. Je to malá molekula seskviterpenického alkoholu izolovaná z esenciálních olejů celé řady rostlin (heřmánek, řebříček, šalvěj, obecně rod hvězdnicovité a další), stromů a keřů. Poprvé byla tato látka izolovaná v roce 1951 z esenciálního oleje heřmánku pravého, který ho může obsahovat až 50 %. Alfa bisabolol má významné antioxidační, protizánětlivé, fungicidní, antibiotické a zklidňující účinky, působí proti infekcím a jako anticholinesteráza. Podporuje také transdermální přenos léčiv [58], [59]. Vzorec bisabololu je na **Obr. 9**.



Obr. 9 Vzorec alfa-bisabololu [60]

V produktech pro péči o pokožku se také často používá allantoin [49]. Je to organická látka na bázi močoviny, známá jako hlavní zásobní a přenosová forma dusíku v některých rostlinách (hojně v kostivalu lékařském), která vzniká degradací purinů [61]. Allantoin je používán zejména na hojení vředů, popálenin, špatně se hojících ran obecně, k léčbě psoriázy (neboli lupénky) nebo k ošetření suché pokožky. Kosmetických produktů, kde lze najít allantoin, je celá řada, např. různé krémy, balzámy na rty, masti a krémy na spáleniny od slunce, vlasové přípravky atd. Povolené koncentrace v kosmetice se uvádějí od 0,1 do 2 % [62]. Vzorec allantoinu je na **Obr. 10**.



Obr. 10 Vzorec allantoinu [63]

Další rostlinnou složkou je flavonoid silymarin extrahovaný ze semen a plodů bodláku ostropestřce mariánského. Extrakty z ostropestřce jsou využívány již po celá staletí k léčbě nemocí jater, žlučníku či sleziny. V současné době se topicky silymarin používá při léčbě melanomových i nemelanomových rakovin kůže, lupénky, atopické dermatitidy, akné, při hojení ran, nebo popálenin od slunce [64].

3 Cíl práce

Cílem práce je příprava nanočástic a nanovláken s obsahem aktivních látek z vybraných bylin, testování jejich antimikrobiálního účinkem zejména vůči *Propionibacterium acnes*, ověření jejich bezpečnosti při kontaktu s humánními buňkami a jejich aplikace v přípravcích proti akné.

V této práci byly plněny následující dílčí cíle:

1. Příprava nanočástic a nanovláken s obsahem aktivní složky
2. Charakterizace účinku částic a vláken na mikroorganismy a humánní buňky
3. Využití připravených materiálů jako složek přípravků proti akné

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie použité na přípravu extraktů a jejich charakterizaci

Folin-Ciocalteu činidlo, Serva (Německo)

Ethanol (p.a.), Vitrum, LachNer (ČR)

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

Peroxodisíran draselný, Sigma-Aldrich (Německo)

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

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

Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (Německo)

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

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

Katechin, Sigma-Aldrich (Německo)

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

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

Methanol (p.a.), LachNer (ČR)

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

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

Ampicilin sodium salt, Sigma-Aldrich (Německo)

Penicillin G sodium salt, Sigma-Aldrich (Německo)

Streptomycin sulphate salt, Sigma-Aldrich (Německo)

4.1.2 Chemikálie použité na přípravu nanočástic a nanovláken

Sojový lecithin, Sigma-Aldrich (Německo)

Cholesterol, Sigma-Aldrich (Německo)

Polyhydroxybutyrát, Hydal, FCH VUT (ČR)

Tetraethylamonium bromid, Sigma Aldrich (Německo)

4.1.3 Chemikálie použité na přípravu kosmetických přípravků

Dimethicone 350 cs – Míča a Harašta s.r.o., Blansko (ČR)

Ercawax MB1 - Míča a Harašta s.r.o., Blansko (ČR)

Parafinový olej - Míča a Harašta s.r.o., Blansko (ČR)

Vazelina bílá - Míča a Harašta s.r.o., Blansko (ČR)

Glycerin bezvodý (p.a.) – LachNer (ČR)

Euxyl K-703 – Schülke&Mayr GmbH (Německo)

Cetylalkohol - Míča a Harašta s.r.o., Blansko (ČR)

4.1.4 Chemikálie použité na kultivaci testovacích mikroorganismů

Nutrient Broth (NB) – Himedia (Indie)

Agar – Himedia (Indie)

Brain Heart Infusion Broth (BHI) – Himedia (Indie)

4.1.5 Chemikálie použité na kultivaci keratinocytů a MTT test

Médium KGM Gold Single Qouds – Lonza (Švýcarsko)

Dodecylsírán sodný – Serva, (Německo)

MTT – Duchefa Biochemie (Nizozemí)

Trypsin – Versene EDTA, P-Lab (ČR)

FBS fetální bovinní sérum – HyClone (USA)

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

Antibiotic-Antimycotic 100X (Biosera) – Biotech (Německo)

4.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy, Boeco (Německo)

Vortex, TK3S, Kartell spa (USA)

Centrifuga, Sartorius Sigma (Německo)

Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HS3200, Bandeline (Německo)

Spektrofotometr Helios γ , Unicam (VB)

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

Magnetická míchačka s ohřevem, Lavat – Verkon (ČR)

Vakuová rotační odparka Werke RV06-ML: IKA (Německo)

Temperovaná třepačka, Heidolph Inkubator 1000, Labicom (ČR)

Cell Culture CO₂ inkubátor, ESCO (Německo)

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

Koloidní DLS analyzátor Zetasizer ZS, Malvern (UK)

ELISA reader BioTek ELx808 (USA)

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

Michačka Werke RW11 basic: IKA (Německo)

Vodní lázeň Laboplay, Unimed (ČR)

NE-1000 Single Syringe Pump, Labicom (ČR)

FTIR-ATR spektrometr Nicolet iS 50 FT-IR (USA)

LUMisizer – Dispersion analyzer, Lum (USA)

Regulovatelný zdroj napětí

4.3 Použité mikroorganismy

Micrococcus luteus CCM 1569 pocházející z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně

Serratia marcescens CCM 8587 pocházející z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně

Propionibacterium acnes CCM 3344 pocházející z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně

4.4 Použité humánní buňky

HaCaT (300493) Human keratinocytes cell line, permanent cell line, Cell Line Service, Germany.

4.5 Příprava a charakterizace extraktů z přírodních látek

Vybrané byliny (na Obr. 11) byly zakoupeny v Léčivých bylinách a byly z nich připraveny vodné, ethanolové a lipidové extrakty.



Obr. 11 Použité byliny

Vodné extrakty byly připraveny z navážky 1 g bylinky, která byla zalita 15 ml vody a ponechána extrahovat 24 h na třepačce při 30 °C. Poté byly extrakty přefiltrovány přes gázu a dále analyzovány a použity k enkapsulaci.

Na ethanolové extrakty byl navážen také vždy po 1 g byliny, který byl zalit 15 ml 50% ethanolu a nechán 24 hodin louhovat na třepačce při 30 °C. Extrakty byly poté přefiltrovány přes gázu, charakterizovány z hlediska obsahu polyfenolů, flavonoidů a antioxidační aktivity pomocí ABTS a následně použity k enkapsulaci.

Na přípravu lipidových extraktů metodou podle Folche bylo naváženo vždy 10 g bylinky, navážka byla zalita 200 ml extrakční směsí methanolu a chloroformu v poměru 1:2 a ponechána extrahovat přes. Poté byla směs přefiltrována přes filtrační papír a vzorek z filtru byl opět převeden do kádinky a zalit dalšími 100 ml extrakční směsí. Extrakce probíhala na třepačce 1 hodinu. Následně byla směs přefiltrována a k oběma spojeným filtrátům bylo přidáno 50 ml destilované vody. Po oddělení fází byla spodní chloroformová fáze zbavená zbytkové vody filtrací přes bezvodý síran sodný, následně byl chloroform v baňce s kulatým dnem odpařen na vakuové rotační odparce při 40 °C. Vyextrahované lipidy byly uchovány v chloroformu v lahvičkách z tmavého skla při teplotě 4°C k následnému použití.

4.5.1 Stanovení celkových polyfenolů

K 50 µl testovaného vzorku byl přidán 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla (zředěného destilovanou vodou v poměru 1:9) a 1 ml vody. Po promíchání na vortexu byly ponechány roztoky 5 minut při laboratorní teplotě. Poté byl ke každému vzorku přidán 1 ml nasyceného roztoku Na₂CO₃. Směs byla opět promíchána a 15 minut ponechána stát při laboratorní teplotě. Po 15 minutách byla měřena absorbance při vlnové délce 750 nm oproti blanku, kde byl vzorek nahrazen příslušným rozpouštědlem.

U olejových extraktů bylo nejprve nutné jejich rozpuštění v ethanolu a dále byl postup stejný jako u ostatních testovaných extraktů.

Pro kalibraci metody byly použity roztoky kyseliny gallové o koncentracích 0,1-0,7 mg/ml a do blanku bylo místo vzorku přidáno 50 µl vody a její rovnice je (rovnice (2)):

$$y = 1,0069x; R^2 = 0,9945 \quad (2)$$

4.5.2 Stanovení celkových flavonoidů

Z každého vzorku (úprava olejových extraktů před stanovením byla stejná jako u měření koncentrace polyfenolů) bylo odebráno 0,5 ml, následně bylo přidáno 1,5 ml vody a 0,2 ml 5% roztoku NaNO₂. Po promíchání na vortexu se roztoky ponechaly 5 minut stát a poté k nim bylo napipetováno po 0,2 ml 10% AlCl₃. Znovu bylo vše promícháno a po 5 minutách bylo přidáno 1,5 ml 1 M NaOH a 1 ml vody. Po 15 minutách byla měřena absorbance při 510 nm oproti blanku, kde byl vzorek nahrazen příslušným rozpouštědlem.

Na kalibrační roztoky byl u této metody použit katechin v 60% ethanolu o koncentracích 0,05-0,30 mg/ml. Rovnice získané kalibrační přímkou je (rovnice (3)):

$$y = 2,5862x; R^2 = 0,9968 \quad (3)$$

4.5.3 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS

Do zúžené kyvety bylo napipetováno k 1 ml roztoku ABTS^{•+} (naředěného 96% ethanolom tak, aby absorbance při 734 nm byla $0,7 \pm 0,02$) 10 μ l vzorku. V 10. minutě pak byl měřen pokles absorbance při 734 nm. Jako blank byl použit 1 ml naředěného roztoku ABTS^{•+} a 10 μ l příslušného rozpouštědla. Použitý zásobní roztok ABTS^{•+} byl připraven smícháním ABTS ($c = 7 \text{ mmol/dm}^3$) a K₂S₂O₈ ($c = 2,45 \text{ mmol/dm}^3$) a vlastním stanovením ponechán minimálně 12 h ve tmě.

Jako standard byl při tomto stanovení použit roztok Troloxu, který byl připraven v 60% ethanolu o koncentraci 50-400 μ l/ml. Rovnice kalibrační přímkou je (rovnice (4)):

$$y = 0,0011x; R^2 = 0,9957 \quad (4)$$

4.6 Příprava a charakterizace liposomů

Do kádinky bylo naváženo 20 mg cholesterolu a 180 mg lecithinu, tato navážka byla smísena s 10 ml připravených vodných nebo ethanolových extraktů (ty byly nejprve naředěny z 50% na 10% roztoky). Samotné částice byly připraveny pomocí ultrazvukového homogenizátoru sonifikací po dobu 1 minuty s intenzitou 85 %.

Pro přípravu liposomů z lipidových extraktů bylo navážené množství 20 mg příslušného extraktu rozpuštěno v 1 ml chloroformu společně se 160 mg lecithinu a 20 mg cholesterolu. Následně byl do kádinky obsahující 10 ml destilované vody přidán tento připravený chloroformový roztok a směs byla míchána pomocí ultrazvukového homogenizátoru 1 minutu s intenzitou 85 %. Zbytkový chloroform byl odpařen na magnetické míchačce s ohřevem při 50 °C.

4.6.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Roztok částic byl ihned po přípravě centrifugován 60 minut při 11 000 ot/min. Poté bylo ze supernatantu odebráno 50 μ l na spektrofotometrickou metodu stanovení polyfenolů. Enkapsulační účinnost byla vypočítána jako rozdíl obsahu dané látky před a po enkapsulaci.

4.6.2 *Stanovení týdenní a měsíční stability*

Po jednom týdnu/měsíci byl roztok částic uchovávaný ve vodném prostředí opět zcentrifugován 60 minut při 11 000 ot/min. a ze supernatantu bylo odebráno 50 µl pro stanovení uvolněných polyfenolů.

4.6.3 *Stanovení velikosti a koloidní stability*

Roztok částic byl 100 krát naředěn destilovanou vodou, 1 ml takto naředěného roztoku byl napipetován do kyvety a analyzován na přístroji Zetasizer metodou DLS (dynamického rozptylu světla). Pro měření stability pomocí zeta potenciálu byl na kyvetu přidán elektrodový nástavec. Měření byla provedena třikrát.

4.6.4 *Stanovení krátkodobé stability*

1 ml roztoku částic byl zcentrifugován 60 minut při 11 000 ot./min, supernatant byl odebrán a liposomové částice byly následně rozsuspendovány v testovaném modelovém prostředí (voda, ethanol). V časech 0, 5, 10, 20, 30 a 60 minut byl poté měřen obsah uvolněných polyfenolů (podle popisu v kapitole 4.5.1).

4.6.5 *Stanovení antioxidační aktivity*

Podle postupu z kapitoly 4.5.3 bylo do zúžené kyvety napipetováno: 1 ml ABTS a 10 µl vzorku liposomů, v 10. minutě byl pak sledován pokles absorbance.

4.6.6 *Stanovení koncentrace fosfolipidů pomocí Stewartova testu*

U liposomů testovaných na cytotoxicitu byl měřen také obsah fosfolipidů. Do 15 ml centrifugační zkumavky bylo pipetováno 50 µl vzorku, 450 µl vody, 2 ml roztoku ferothiokyanátu amonného (vzniklého smícháním 0,1 M roztoku chloridu železitého a 0,4 M roztoku thiokyanátu amonného) a 3 ml chloroformu. Po promíchání na vortexu (asi 20 sekund) byly roztoky centrifugovány 5 minut při 1000 ot/min, pak 15 – 20 minut stály ve tmě při laboratorní teplotě. Následně byla odebrána spodní chloroformová vrstva a analyzována měřením absorbance při 430 nm v křemenných kyvetách. Jako blank byl použit chloroform a na kalibrační křivku byl použit roztok lecithinu v chloroformu o koncentracích 0 – 0,24 mg/ml. Rovnice kalibrační přímky je (rovnice (5)):

$$y = 1,257x; R^2 = 0,9952 \quad (5)$$

4.7 Příprava a charakterizace nanovláken

4.7.1 Electrospinning

Stříkačka s připravenými 20 ml chloroformového roztoku PHB a příslušnými olejovými extrakty byla upevněna do pumpy. Ke konci stříkačky a na kolektor byly upevněny elektrody zdroje vysokého napětí (vzdálenost kolektoru od konce stříkačky byla 15 cm). Pumpa byla nastavena na průtok 4 ml/hod a byl spuštěn zdroj vysokého napětí (15 kV).

4.7.2 Stanovení antioxidační aktivity nanovláken

Z nanovláken připravených elektrospinningem byl odstříhnut 1 cm². Do Eppendorfký byly napipetovány 2 ml ABTS a vložen předem zvážený vzorek vláken, po 10 minutách byl sledován pokles absorbance podle popisu v kapitole 4.5.3.

4.7.3 Stanovení krátkodobé stability nanovláken

U nanovláken byla měřena také krátkodobá stabilita v modelových prostředích – ve vodě, ethanolu a 50% ethanolu. Z nanovláken připravených elektrospinningem byl odstříhnut 1 cm² a po zvážení ponořen do 2 ml daného modelového prostředí. V časech 0, 5, 10, 20, 30 a 60 minut byl měřen obsah uvolněných polyfenolů (podle popisu z kapitoly 4.5.1).

4.7.4 Charakterizace nanovláken pomocí FTIR-ATR

Nanovlákná obsahující lipidové extrakty byly analyzovány technikou FTIR-ATR, a to za následujících podmínek:

- jednoodrazový diamantový ATR nástavec
- pozadí: vzduch
- měření: rozlišení 8, průměr 64 skenů

4.8 Příprava kosmetických přípravků

Na přípravu 50 ml 10% emulze O/V byly naváženy a napipetovány jednotlivé složky tak jak je uvedeno v **Tabulka 1**.

Tabulka 1 Složení krémového základu

vodná fáze		olejová fáze	
surovina	navážka/objem	surovina	navážka/objem
destilovaná voda	42 ml	Ercawax BM1	1,25 g
86,6% glycerol	3 ml	cetylalkohol	1,5 g
Euxyl K-703	0,25 ml	bílá vazelína	0,75 g
		parafrinový olej	2 ml
		dimethicone	0,75 ml

Navážky v kádinkách byly vloženy do vodní lázně vyhřáté na 80 °C, po vytemperování na příslušnou teplotu a vyjmutí z lázně byla vodná fáze míchána na míchačce a k ní byla postupně přikapávána olejová fáze, poté bylo vše mícháno do vychladnutí (asi 2 hodiny).

Pro vytvoření krému s liposomy s příslušnými extrakty bylo 5 ml vody z vodné fáze nahrazeno roztokem liposomů, který byl během procesu emulgace přidáván do krémového základu.

4.8.1 Stanovení antioxidační aktivity krémů

U připravených krémů s obsahem liposomů byla měřena rovněž jejich antioxidační aktivita, kdy 10 mg emulze bylo rozpuštěno v 1 ml ethanolu, dále byl postup stejný jako v kapitole 4.5.3.

4.8.2 Stanovení stability krémů pomocí analytické centrifugy

Vybrané vzorky byly analyzovány na analytické centrifuze při nastavení: 25 °C, 2 000 g a době centrifugace 210 minut.

4.9 Antimikrobiální testy

4.9.1 Kultivace mikroorganismů

Pro testování antimikrobiálních účinků byly použity bakteriální kmeny *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens* a *Propionibacterium acnes*. Kultivace probíhala na třepačce při 37 °C po dobu 24 hodin a mikroorganismy byly očkovány na kapalná i tuhá média, vždy ve sterilním boxu.

4.9.2 Příprava médií

Jako kapalné médium bylo použito Nutrient Broth (NB), pro *Propionibacterium acnes* pak Brain Heart Infusion Broth (BHI). Navážka 2,5 g/100 ml NB, nebo 3,7 g/100 ml BHI byla rozpuštěna ve 100 ml destilované vody. Pro přípravu tuhého média bylo k navážce kapalného média přidáno ještě 2,5 g agaru.

Oba druhy médií byly před zaočkováním sterilizovány v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem při 100 °C po dobu 35 minut. Tuhé médium bylo po sterilizaci ještě za horka nalito do Petriho misek.

4.9.3 Bujónová diluční metoda

Pro testování byly použity bakterie všech testovaných kmenů po 24 hodinách kultivace. Buňky byly vhodně zředěny sterilním NB/BHI médiem (aby absorbance při 630 nm byla 0,1).

Takto připravené buňky byly po 150 μ l (v případě *Propionibacterium acnes* to bylo 225 μ l) pipetovány do 96 jamkové mikrotitrační destičky. Dále bylo přidáno 50 μ l vzorku (u *Propionibacterium acnes* to bylo 75 μ l, jako blank bylo použito 50 (75) μ l vody, případně jiného použitého rozpouštědla). V čase 0 a po 24 hodinách (kultivováno při 37 °C na třepačce) byla měřena absorbance při 630 nm.

Pro otestování antimikrobiálního účinku nanovláken byl použit kmen *Propionibacterium acnes*, který byl při tomto testu kultivován v příslušném médiu v 15 ml sterilních zkumavkách se zváženími testovanými vláknennými vzorky. V čase 0 a po 24 hodinách kultivace při 37 °C na třepačce byla měřena absorbance při 630 nm ve srovnání s kultivací bez přítomnosti vláken.

4.9.4 Agarová disková metoda

Na Petriho misky s agarem byla naočkováána 24 hodinová kultura bakteriálních buněk *Micrococcus luteus* (100 μ l) a důkladně rozestřena sterilní hokejkou. Po 20 minutách byly na připravený povrch nanесeny vzorky krémů. Po 24 hodinách kultivace při 37 °C byly pozorovány vzniklé inhibiční zóny.

4.10 Kultivace keratinocytů a MTT test

Lidské kožní buňky keratinocyty byly kultivované v komerčním médiu (KGM Gold Single Quods). Kultivace probíhala v kultivačních lahvičkách v inkubátoru při 37 °C a s 5% obsahem CO₂. Zásobní lahev s médiem byla uchovávána v ledničce při 4 °C a při výměně média byla vždy vytemperovaná na laboratorní teplotu. Před výměnou byly buňky zkontrolovány pod inverzním mikroskopem na přítomnost kontaminace a rovněž aby byla zkontrolována přilnavost buněk ke dně nádoby. Výměna probíhala za sterilních podmínek a bylo vždy použito 5 ml nového média.

Před testováním bylo médium z lahvičky sterilně vylito a buňky byly dvakrát až třikrát propláchnuty sterilním PBS puřem (cca 5 ml na jedno propláchnutí). Poté bylo přidáno 0,5 ml trypsinu a lahvička byla vložena do termostatu (37 °C) na 5 až 10 minut. Pod mikroskopem bylo zkontrolováno, že došlo k odloučení buněk ode dna lahvičky. Následně bylo přidáno 5 ml sterilního PBS puřru, buňky v něm byly rozsuspendovány a přeneseny do sterilní centrifugační zlumavky. Centrifugovány byly 5 minut při 360 g, puřr byl slit a k buňkám bylo přidáno malé množství média, ve kterém byly rozsuspendovány. Potom byla určena koncentrace buněk počítáním v Bürkerově komůrce (vždy poměr 1:1 médium

s buňkami a trypanová modř), které pak byly naředěny médiem na koncentraci $2 \cdot 10^4$ buněk/100 μ l.

Takto připravené buňky byly napipetovány na 96 jamkovou destičku (po 100 μ l), pod mikroskopem byla zkontrolována jejich přítomnost a destička byla na 24 hodin umístěna do kultivačního termostatu.

Po 24 hodinách bylo přidáno 100 μ l sterilního testovaného vzorku liposomů v různých koncentracích (po zředění roztoku částic vodou 1:1 a přefiltrování přes sterilní 200 nm filtr byly dále médiem zředěny na 2 – 14 %) a buňky byly inkubovány dalších 24 hodin. Poté bylo přidáno vždy 20 μ l sterilního MTT o koncentraci 2,5 mg/ml ve sterilním PBS pufru a buňky byly inkubovány 3 hodiny v termostatu. Nakonec bylo přidáno po 100 μ l 10% SDS v PBS pufru a destička byla ponechána ve tmě při laboratorní teplotě dalších cca 24 hodin. Na ELISA readeru byla poté změřena absorbance při 562 nm.

Jako kontrola bylo použito vždy 100 μ l média, pokud by absorbance vzorků klesla pod 50 % absorbance této kontroly, byly by považovány za cytotoxické.

Při testování nanovláken byl postup obdobný, pouze byla použita 6 jamková destička, do které byly vloženy zvážené kousky vláken.

5 Výsledky

Předložená diplomová práce byla zaměřena na přípravu a charakterizaci nanočástic a nanovláken s obsahem aktivních látek z vybraných bylin. Přesněji byly připraveny liposomové částice a vlákna z polyhydroxybutyrátu (PHB), do nichž byly enkapsulovány různé typy extraktů (vodné, ethanolové, olejové) z heřmánku, kopřivy, řebříčku a jetele.

Extrakt byly nejprve charakterizovány z hlediska obsahu polyfenolů, flavonoidů a jejich antioxidační aktivity. U připravených extraktů, ale i u materiálů s jejich obsahem, byla následně testována jejich antimikrobiální aktivita a to zejména vůči mikroorganismu *Propionibacterium acnes*. Důvodem byla možná aplikace těchto složek do přípravků proti akné. Připravené částice i vlákna byly rovněž otestovány z hlediska jejich stability a bezpečnosti při kontaktu s humánními buňkami.

5.1 Charakterizace extraktů

Podle postupu uvedeného v kapitole 4.5 byly ze zvolených bylin připraveny vodné, ethanolové a lipidové extrakty. U testovaných extraktů byla následně provedena základní charakterizace, stanoven byl celkový obsah polyfenolů, celkový obsah flavonoidů a antioxidační aktivita. Při přípravě olejových extraktů byl stanoven i obsah lipidických látek v testovaných bylinách. Výtěžky byly přepočítány na g/100 g byliny a výsledky jsou uvedeny v následující tabulce (**Tabulka 2**).

Tabulka 2 Výtěžnost extrakce dle Folche

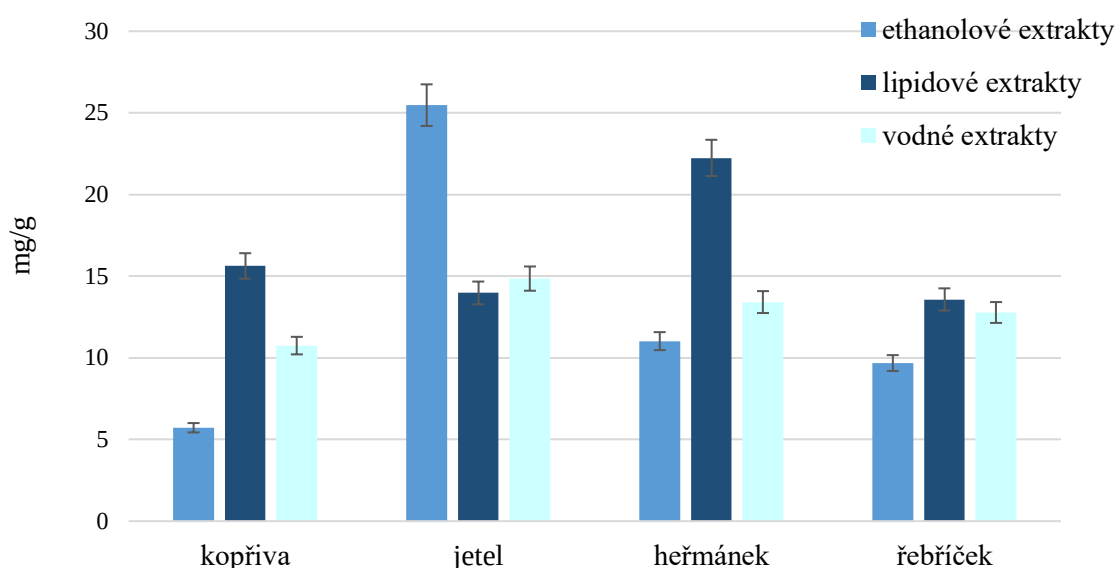
bylina	obsah lipidů [g/100 g]
kopřiva	1,50 ± 0,02
jetel	2,44 ± 0,03
heřmánek	2,58 ± 0,03
řebříček	1,58 ± 0,01

5.1.1 Stanovení celkových polyfenolů

Celkový obsah polyfenolů v extraktech byl stanoven spektrofotometricky. Podle návodu v kapitole 3.3.1 byla sestrojena kalibrační přímka kyseliny gallové a z lineární regrese stanovené kalibrační závislosti byla vypočtena koncentrace polyfenolů ve vzorku. Každý extrakt byl měřen třikrát a hodnoty byly zprůměrovány. Výsledná koncentrace byla přepočítána na miligram polyfenolů na gram byliny. Dosažené výsledky jsou uvedeny v následujícím grafu (**Obr. 12**).

Z výsledků je jasné patrné, že nejvyšší obsah fenolických látek byl ve většině případů naměřen v olejových, tedy lipidických extraktech (z těchto lipidických extraktů pak nejvyšší množství polyfenolů obsahoval extrakt z heřmánku). Výjimkou byl pouze vzorek jetele, u kterého bylo nejvíce polyfenolů stanoveno u ethanolového extraktu a naopak jeho lipidický extrakt obsahoval polyfenolů nejméně.

Celkově bylo nejvíce polyfenolů obsaženo v ethanolovém extraktu z jetele, a to 25,47 mg/g. Naopak nejméně bylo stanoveno polyfenolů v ethanolovém extraktu z kopřivy (5,72 mg/g). V případě vodných extraktů bylo dosaženo srovnatelných výsledků u všech testovaných vzorků bylin.



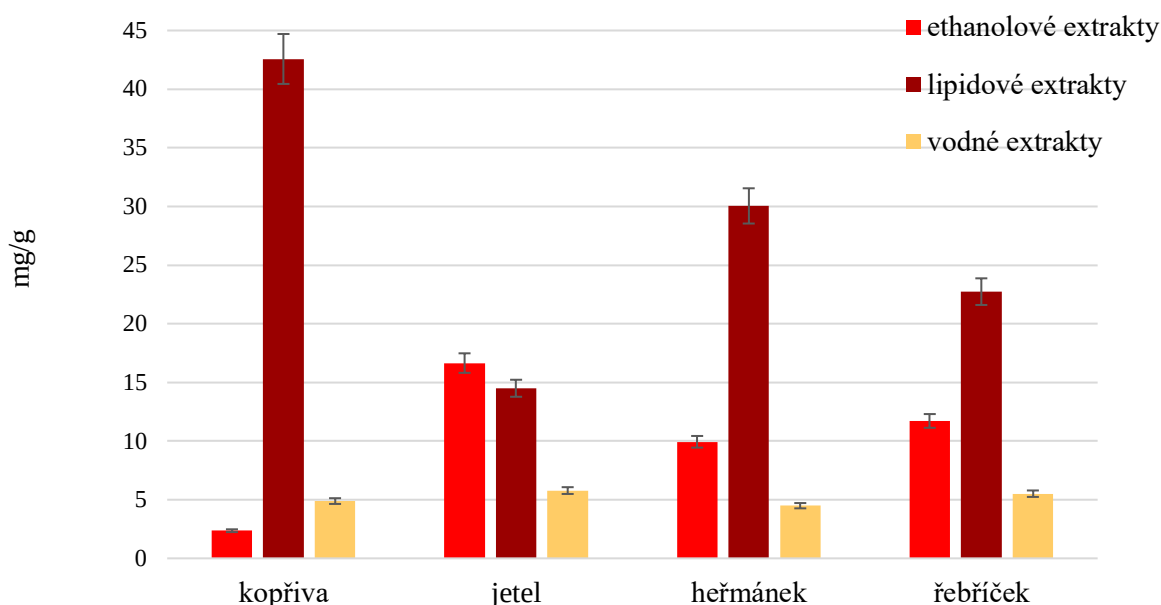
Obr. 12 Obsah celkových polyfenolů v jednotlivých typech extraktů

5.1.2 Stanovení celkových flavonoidů

Podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2 byla sestrojena kalibrační přímka katechinu. Stejně jako u stanovení celkových polyfenolů byla i celková koncentrace flavonoidů v extraktech stanovena spektrofotometricky a vypočítána z lineární regrese stanovené kalibrační závislosti. Každý extrakt byl měřen třikrát a hodnoty byly zprůměrovány. Výsledná koncentrace byla přepočítána na miligram flavonoidů na gram byliny.

Obr. 13 shrnuje naměřené obsahy flavonoidů v jednotlivých extraktech. Z dosažených výsledků je patrný obdobný trend jako v případě stanovení polyfenolů. Nejvyšší obsah flavonoidů tedy obsahovaly především lipidické extrakty a pouze u jetele měl nejvyšší obsah těchto aktivních látek ethanolový extrakt.

Celkově nejnižší obsah flavonoidů byl stanoven v ethanolovém extraktu z kopřivy, a to 2,36 mg/g byliny, nejvyšší naopak v lipidovém extraktu z kopřivy (42,57 mg/g). V případě vodných extraktů bylo opět dosaženo srovnatelných výsledků u všech testovaných vzorků bylin.

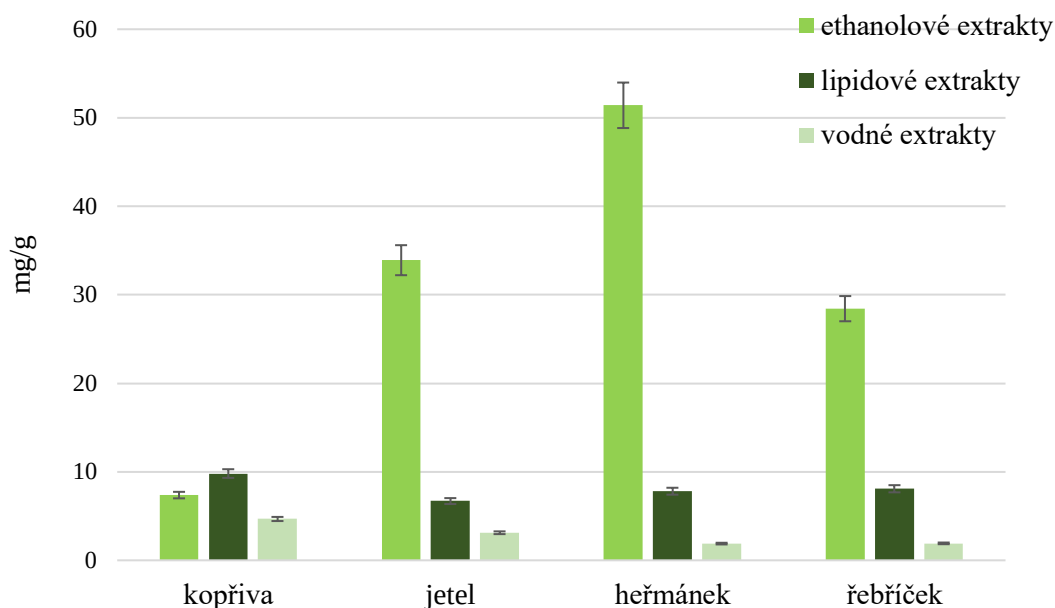


Obr. 13 Obsah celkových flavonoidů v jednotlivých typech extraktů

5.1.3 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS

Kalibrační přímka troloxu byla sestrojena podle postupu z kapitoly 3.3.3. Antioxidační aktivita byla stanovena spektrofotometricky a vypočítána z lineární regrese stanovené kalibrační závislosti. Každý extrakt byl měřen třikrát a hodnoty byly zprůměrovány. Výsledná koncentrace byla přepočítána na miligram flavonoidů na gram byliny. Získané výsledky pro jednotlivé extrakty jsou shrnuty na **Obr. 14**.

Z grafu je jasné patrné, že nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovaly především ethanolové extrakty. Celkově nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena v ethanolovém extraktu z heřmánku (51,41 mg/g), nejnižší naopak ve vodném extraktu z heřmánku (1,89 mg/g).



Obr. 14 Antioxidační aktivita jednotlivých typů extraktů

5.2 Charakterizace částic

Podle postupu uvedeného v kapitole 3.4 byly připraveny liposomové částice. Liposomy byly připraveny s obsahem vodných, ethanolových i lipidických extraktů. Celkově bylo tedy připraveno 12 různých typů liposomů, které byly podrobeny základní charakterizaci. Stanovena byla enkapsulační účinnost, velikost částic a jejich koloidní stabilita. Dále byla sledována jejich antioxidační aktivita, stabilita ve vodném prostředí a rychlost uvolňování aktivních látek v různých modelových podmínkách.

5.2.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Liposomy se všemi druhy extraktů byly ihned po jejich přípravě centrifugovány a následně byla stanovena jejich enkapsulační účinnost (viz. kapitola 3.4.1).

Výsledky pro všechny typy liposomů jsou uvedeny v **Tabulka 3**.

Nejvyšší procento polyfenolů bylo enkapsulováno do liposomů s lipidovým extraktem z řebříčku, a to více než 94 %, nejméně pak do liposomů s vodným extraktem z kopřivy (17,21 %).

Tabulka 3 Enkapsulační účinnost liposomů

ethanolové liposomy	enkapsulováno polyfenolů [mg/ml]	enkapsulační účinnost [%]
kop.	0,328 ± 0,005	85,94
jet.	1,256 ± 0,013	73,98
heřm.	0,317 ± 0,001	43,18
řebř.	0,292 ± 0,002	45,23
lipidové liposomy	enkapsulováno polyfenolů [mg/ml]	enkapsulační účinnost [%]
kop.	0,401 ± 0,001	77,03
jet.	0,407 ± 0,005	87,42
heřm.	0,608 ± 0,006	81,98
řebř.	0,429 ± 0,004	94,73
vodné liposomy	enkapsulováno polyfenolů [mg/ml]	enkapsulační účinnost [%]
kop.	0,123 ± 0,038	17,21
jet.	0,406 ± 0,028	40,97
heřm.	0,329 ± 0,012	36,92
řebř.	0,223 ± 0,003	26,14

5.2.2 Stanovení týdenní a měsíční stability

Po týdnu/měsíci bylo sledováno množství uvolněných polyfenolů z připravených liposomů (viz. kapitola 4.4.2). Výsledné množství bylo vztaženo na enkapsulované množství a vyjádřeno v procentech. Výsledky jsou shrnuty v **Tabulka 4**.

Tabulka 4 Týdenní stabilita liposomů

ethanolové liposomy	uvolněno polyfenolů [%]
kop.	2,88
jet.	23,18
heřm.	30,30
řebř.	17,73
lipidové liposomy	uvolněno polyfenolů [%]
kop.	0
jet.	0
heřm.	0
řebř.	1,27
vodné liposomy	uvolněno polyfenolů [%]
kop.	0
jet.	0
heřm.	0
řebř.	80,96

Nejvíce polyfenolů se uvolnilo z liposomů s vodným extraktem z řebříčku (80,96 %), nejméně (necelá 3 %) naopak z liposomů s ethanolovým extraktem z kopřivy. U liposomů s lipidovými a vodnými extrakty nebylo až na extrakt z řebříčku detekováno žádné uvolněné

množství polyfenolů. Podle postupu uvedeném v kapitole 4.4.2 byla tato stabilita měřena i po jednom měsíci, žádné další uvolňování polyfenolů však nebylo zaznamenáno.

5.2.3 Stanovení velikosti a koloidní stability

Velikost částic a jejich zeta potenciál byl měřen postupem uvedeným v kapitole 4.4.3 a výsledky jsou shrnuty v **Tabulka 5**.

Tabulka 5 Průměrná velikost a zeta potenciál liposomů

ethanolové liposomy	průměrná velikost [nm]	PDI	zeta potenciál [mV]
kop.	142,73 ± 0,25	0,17 ± 0,01	-46,43 ± 2,95
jet.	147,37 ± 1,76	0,22 ± 0,00	-47,03 ± 0,97
heřm.	141,07 ± 0,40	0,17 ± 0,01	-61,23 ± 0,84
řebř.	133,30 ± 1,15	0,17 ± 0,01	-48,53 ± 0,40
olejové liposomy	průměrná velikost [nm]	PDI	zeta potenciál [mV]
kop.	177,53 ± 1,94	0,22 ± 0,01	-53,20 ± 1,84
jet.	272,80 ± 2,99	0,38 ± 0,01	-55,63 ± 1,43
heřm.	144,10 ± 1,56	0,21 ± 0,01	-53,07 ± 0,71
řebř.	179,20 ± 1,25	0,23 ± 0,00	-53,60 ± 1,21
prázdné	158,00 ± 3,04	0,25 ± 0,04	-56,90 ± 0,30
vodné liposomy	průměrná velikost [nm]	PDI	zeta potenciál [mV]
kop.	474,27 ± 13,74	0,17 ± 0,02	-27,37 ± 0,15
jet.	166,47 ± 3,07	0,25 ± 0,01	-46,27 ± 1,86
heřm.	194,07 ± 10,80	0,31 ± 0,03	-45,33 ± 3,48
řebř.	180,30 ± 14,81	0,30 ± 0,05	-40,73 ± 1,20

Z výsledků je vidět, že největší velikost měly liposomy s vodným extraktem z kopřivy (474,27,8 nm), tyto částice měly ale zároveň nejmenší index polydisperzity (0,17). Naopak nejmenšími byly liposomové částice s ethanolovým extraktem z řebříčku (133,3 nm).

Index polydisperzity se pohybuje v rozmezích 0 – 1. U většiny testovaných liposomů se index polydisperzity nacházel pod hodnotou 0,3. Obecně nejnižší index polydisperzity pak měly liposomy s ethanolovými extrakty. Z dosažených výsledků lze tak konstatovat, že připravené liposomové částice byly málo polydisperzní a tedy z hlediska velikosti uniformní.

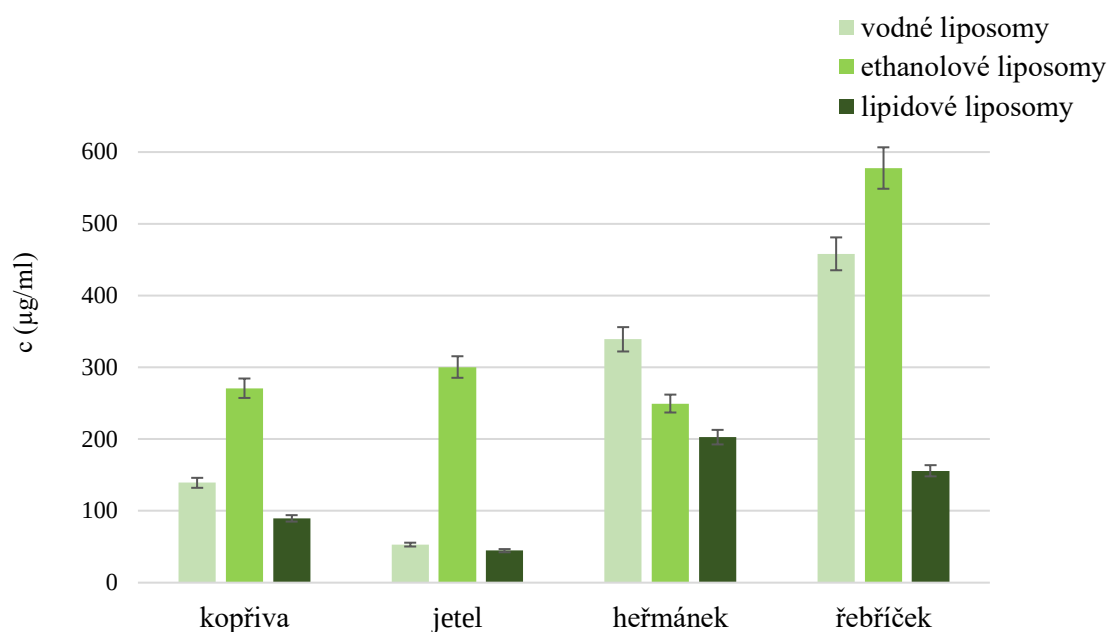
Co se týče koloidní stability, můžeme z příslušných hodnot zeta potenciálů říci, že všechny připravené liposomy byly stabilní. Žádná z naměřených hodnot kromě liposomů s vodným extraktem z kopřivy (-27,4 mV) totiž nebyla v rozmezí -30 mV až 30 mV, tedy v mezích, kdy jsou částice považovány za nestabilní. Nejvyšší absolutní hodnotu zeta potenciálu měly liposomy s enkapsulovaným ethanolovým extraktem z heřmánku (-61,23 mV), lze je tedy považovat za koloidně nestabilnější.

5.2.4 Stanovení krátkodobé stability

Krátkodobá stabilita připravených částic byla sledována pomocí uvolňování polyfenolů do modelových prostředí (viz. kapitola 4.6.4). Výsledky pro všechny typy částic jsou shrnuty na obrázcích v přílohách. Na **Obr. 35** až **Obr. 40** je vidět, že se polyfenoly uvolňovaly postupně. Nejméně se tyto aktivní látky uvolňovaly z liposomů s ethanolovými extrakty (do obou modelových prostředí), nejvíce naopak z liposomů s vodnými extrakty do vody.

5.2.5 Stanovení antioxidační aktivity

Bylo postupováno podle postupu z kapitoly 4.6.5 a výsledky jsou shrnuty na **Obr. 15**.



Obr. 15 Antioxidační aktivita liposomů

Z dosažených výsledků je jasné patrné, že nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovaly liposomy s ethanolovým extraktem z řebříčku (a to 577,73 µl/ml), nejnižší naopak liposomy s lipidovým extraktem z jetele (44,55 µg/ml). Obecně je vidět, že nejvyšší antioxidační aktivitu měly liposomy s ethanolovými extrakty, naopak nejnižší antioxidační aktivitu vykazovaly liposomové částice s lipidovými extrakty.

5.3 Antimikrobiální testy

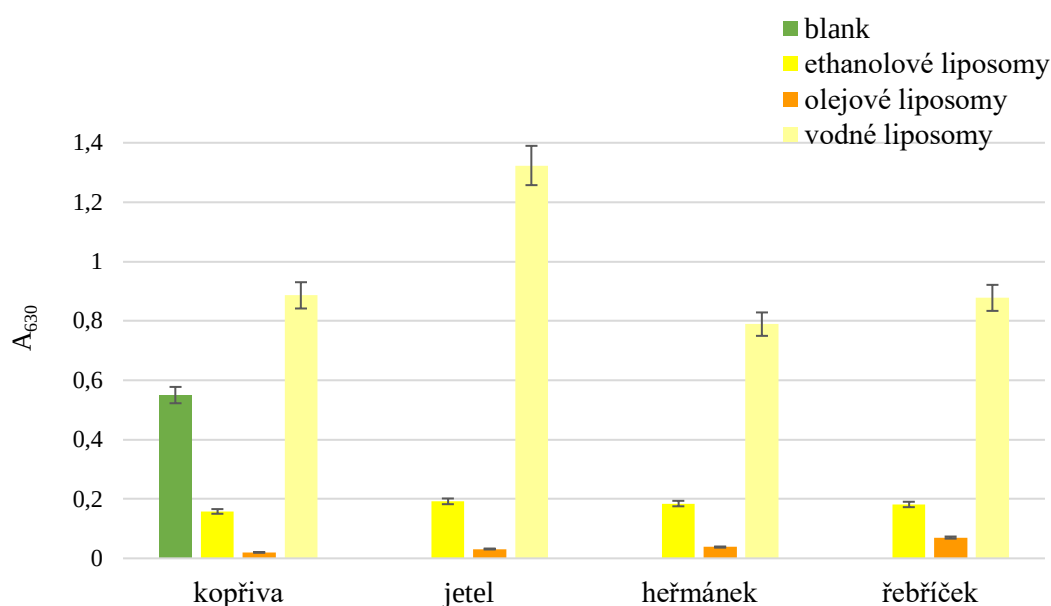
Antimikrobiální aktivita liposomů s obsahem rostlinných extraktů byla testována na třech kmenech bakterií - *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens* a *Propionibacterium acnes*.

Byly prováděny dva druhy antimikrobiálních testů – diluční metoda byla použita pro testování liposomových částic a difúzní metoda, která byla následně použita pro stanovení antimikrobiálního účinku připravených kosmetických emulzí s obsahem liposomů.

5.3.1 Bujónová diluční metoda

Tento typ antimikrobiálního testu byl proveden podle popisu uvedeného v kapitole 4.8.3 a testovány byly všechny typy liposomů. Testovacími mikroorganismy byly grampozitivní *Micrococcus luteus* a *Propionibacterium acnes* a gramnegativní *Serratia marcescens*.

Získání výsledky pro *Micrococcus luteus* jsou uvedeny na **Obr. 16** a souhrnně shrnuty v **Tabulka 6**, kde byla antimikrobiální účinnost vyjádřena v procentech.



Obr. 16 Diluční test liposomů na *Micrococcus luteus*

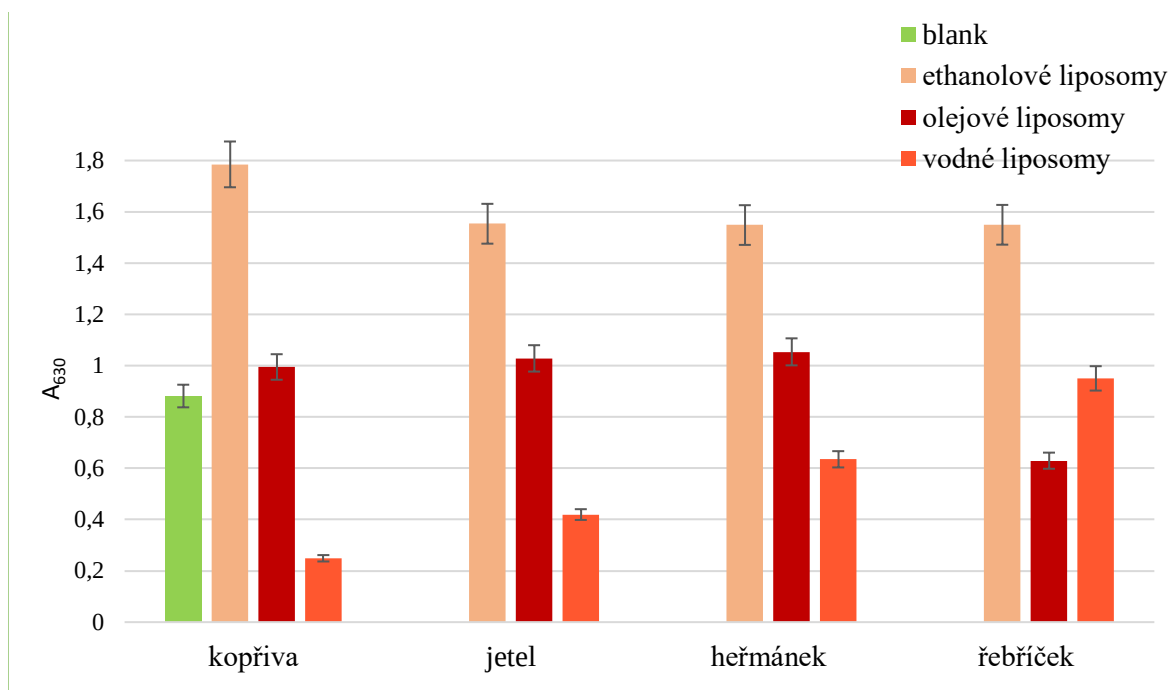
Z grafu je vidět, že liposomy s lipidovými i ethanolovými extrakty měly antimikrobiální účinek na tento mikroorganismus (absorbance znázorňující nárůst buněk byly nižší než u blanku). Liposomy s vodnými extrakty naopak podporovaly růst mikroorganismu. Nejúčinnější byly liposomové extrakty s lipidickými extrakty. V případě enkapsulovaných lipidických extraktů z kopřivy, jetele a heřmánku bylo navíc dosaženo tzv. minimální inhibiční koncentrace (nárůst buněk za 24 hodin nepřesáhl absorbančí 0,05). Těsně nad touto hranicí se pohybovaly s účinností (87,3) i liposomové částice s lipidickým extraktem z řebříčku.

Tabulka 6 Srovnání antimikrobiální aktivity liposomů vůči kmenu *Micrococcus luteus*

	množství inhibovaných buněk [%]		
	olejové liposomy	ethanolové liposomy	vodné liposomy
kopřiva	96,4	71,3	ND
jetel	94,3	65,1	ND
heřmánek	93,1	66,5	ND
řebříček	87,3	67,0	ND

Pozn. ND=nedetekováno

Výsledky stanovení antimikrobiální aktivity liposomů pro *Serratia marcescens* jsou uvedeny na **Obr. 17** a souhrnně shrnuty v **Tabulka 7**, kde byla inhibiční účinnost vyjádřena v procentech.



Obr. 17 Diluční test na *Serratia marcescens*

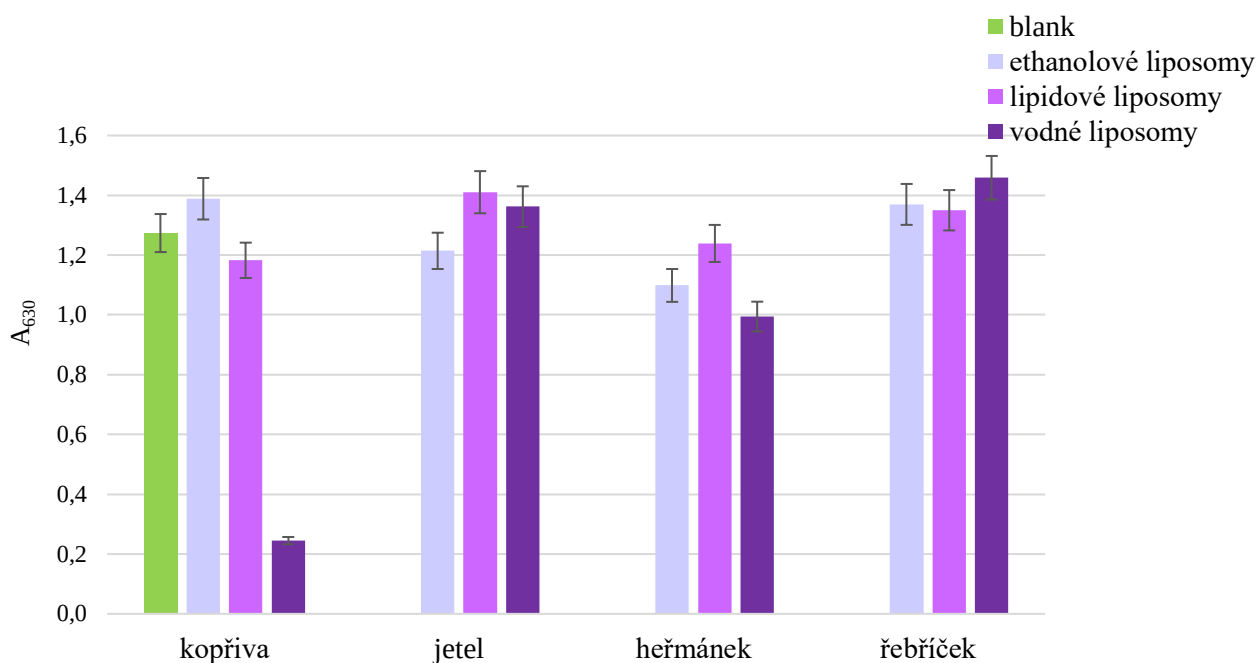
Z výsledků je tentokrát vidět, že antimikrobiální účinek vykazovaly pouze liposomy s olejovým extraktem z řebříčku a vodné liposomy s extraktem z kopřivy, jetele a heřmánku. Všechny ostatní liposomové částice růst daného mikroorganismu spíše podporovaly.

Tabulka 7 Srovnání antimikrobiální aktivity liposomů vůči kmenu *Serratia marcescens*

	množství inhibovaných buněk [%]		
	olejové liposomy	ethanolové liposomy	vodné liposomy
kopřiva	ND	ND	71,76
jetel	ND	ND	52,42
heřmánek	ND	ND	27,98
řebříček	28,61	ND	ND

Pozn. ND=nedetekováno

Výsledky testu antimikrobiální aktivity liposomů na *Propionibacterium acnes* jsou uvedeny na **Obr. 18** a souhrnně shrnuty v **Tabulka 8**, kde byla antimikrobiální účinnost testovaných vzorků vyjádřena v procentech.



Obr. 18 Diluční test na *Propionibacterium acnes*

Z dosažených výsledků je jasné patrné, že nejvyšší účinek na tuto bakterii měly liposomy s vodným extraktem z kopřivy a z heřmánku, alespoň minimální účinek vykazovaly i liposomové částice s ethanolovým extraktem z jetele a heřmánku a liposomy s lipidovým extraktem z kopřivy. Ostatní vzorky liposomů inhibiční účinky nevykazovaly.

Tabulka 8 Srovnání antimikrobiální aktivity liposomů vůči kmenu *Propionibacterium acnes*

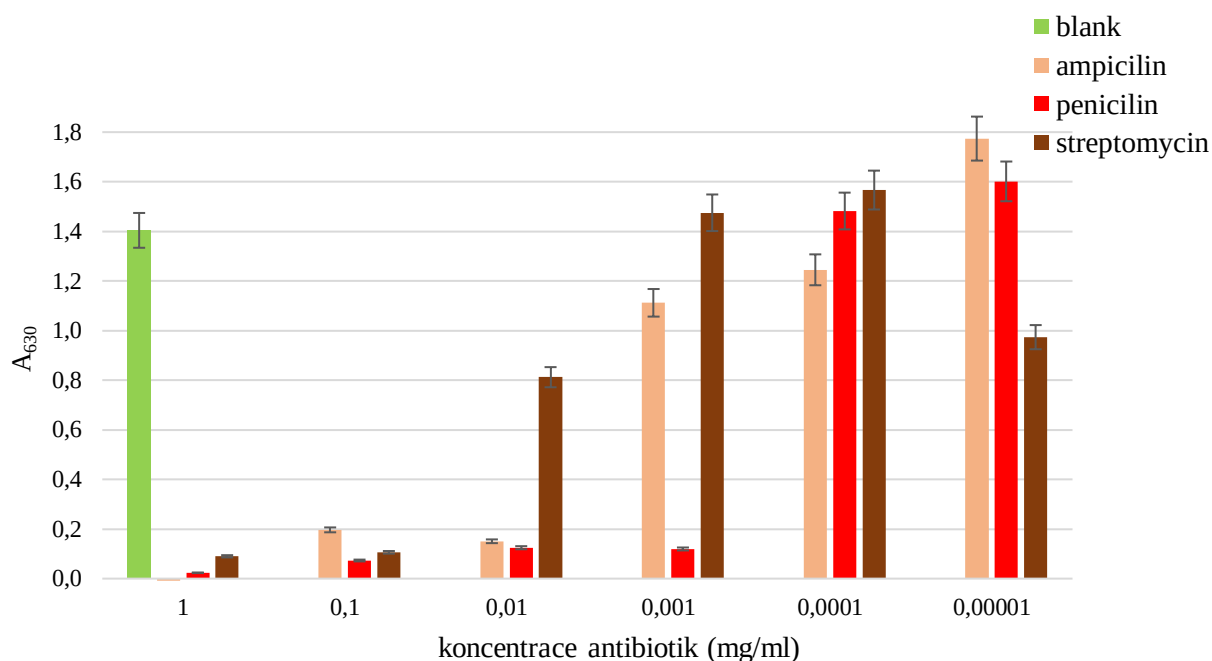
	množství inhibovaných buněk [%]		
	olejové liposomy	ethanolové liposomy	vodné liposomy
kopřiva	ND	ND	80,78
jetel	ND	4,67	ND
heřmánek	2,72	13,75	21,29
řebříček	ND	ND	ND

Pozn. ND=nedetekováno

Jelikož většina testované liposomových částic nevykazovala vůči kmenu *Propionibacterium acnes* inhibiční účinek, byla na tomto kmenu otestována ještě 3 různá antibiotika – ampicilin, penicilin a streptomycin, vždy v koncentracích 1 – 0,00001 mg/ml. Výsledky jsou shrnuty na **Obr. 19**.

Do koncentrace 0,01 mg/ml inhibovala růst kmene *Propionibacterium acnes* všechna antibiotika. Nejnižší hodnota MIC byla naměřena pro ampicilin, a to 0,1 µg/ml, pro penicilin byla tato hodnota 1 µg/ml a pro streptomycin 0,01 mg/ml. Poslední zmíněná koncentrace (0,01 mg/ml) byla použita pro další testování, kdy byla k testování antimikrobiální aktivity použita směs antibiotik o této koncentraci a připravených liposomů v poměru 1:1.

Synergický účinek, tedy navýšení antimikrobiální aktivity antibiotik ve srovnání se vzorky bez přítomnosti liposomů, se však podařilo prokázat pouze u vodných liposomů v kombinaci se streptomycinem.

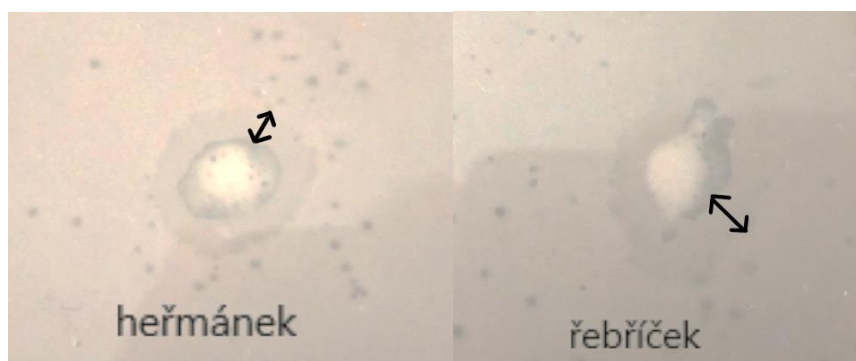


Obr. 19 Diluční test na *Propionibacterium acnes* s antibiotiky

5.3.2 Agarová difuzní metoda

Tento typ testu byl proveden podle popisu z kapitoly 4.9.4 a testovány byly připravené kosmetické emulze obsahující připravené liposomy. Testovacím mikroorganismem byl tentokrát pouze grampozitivní *Micrococcus luteus*, u vzorků byla sledována schopnost inhibice růstu daného mikroorganismu. Tento test byl ovšem z důvodu obtížné manipulovatelnosti se vzorky emulzí pouze orientační, protože nebylo možné určit přesné množství vzorku nanesené na Petriho misku.

Téměř u žádného z testovaných vzorků krémů nebyly pozorovány inhibiční zóny, pouze u emulze s liposomy z ethanolových extraktů z heřmánku a řebříčku byla vidět velmi slabá, 3 mm inhibiční zóna. Výsledek je na **Obr.20**.



Obr.20 Difuzní test emulzí s ethanolovými liposomy

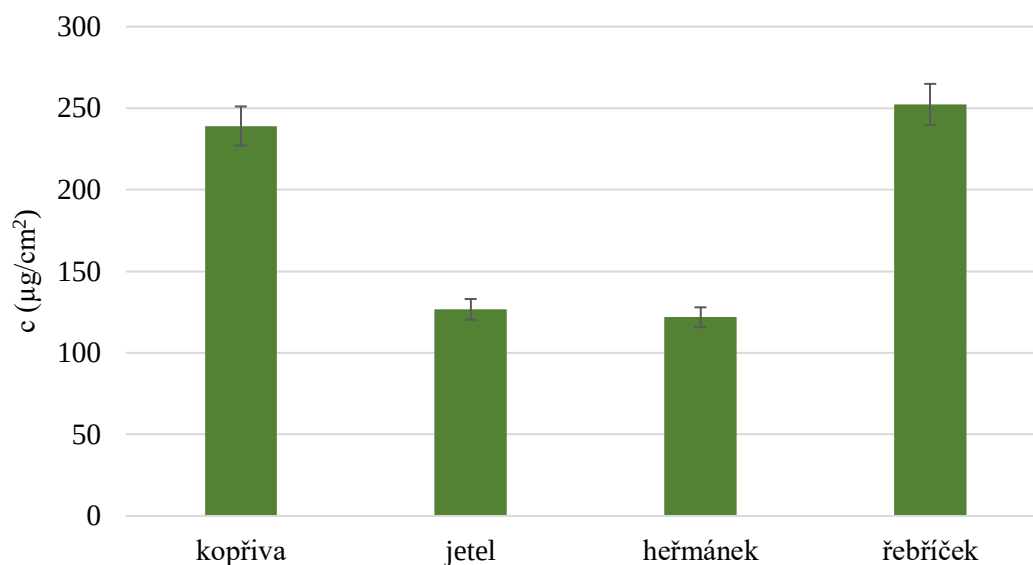
5.4 Charakterizace nanovláken

U připravených nanovláken z polyhydroxybutyrátu byla testována především jejich antioxidační a antimikrobiální aktivita. Dále byla pozorována rychlost uvolňování aktivních látek v různých modelových prostředích.

5.4.1 Antioxidační aktivita nanovláken

PHB nanovlákná s obsahem olejových extraktů byla připravena podle popisu uvedeného v kapitole 4.7 a jejich antioxidační aktivita byla měřena metodou uvedenou v kapitole 4.7.3. Naměřené hodnoty antioxidační aktivity pro vlákna připravená metodou elektrospinningu jsou uvedeny na **Obr. 21**.

Obecně byla tato aktivita poměrně vysoká. Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovaly vlákna s olejovým extraktem z řebříčku ($252,27 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), nejnižší antioxidační aktivita pak byla stanovena u vláken s obsahem extraktu z heřmánku ($121,82 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).



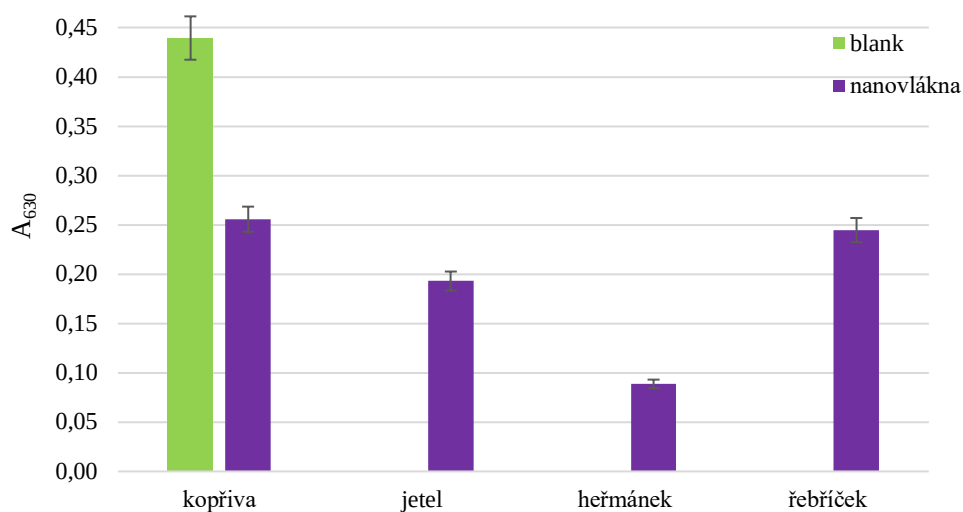
Obr. 21 Antioxidační aktivita nanovláken s olejovými extrakty připravených pomocí elektrospinningu

5.4.2 Antimikrobiální aktivita nanovláken

Připravená vlákna byla podrobena rovněž testování antimikrobiální aktivity vůči kmenu *Propionibacterium acnes*. Před provedením antimikrobiálního testu byly použité vzorky nanovláken zváženy, navážky jsou uvedeny v **Tabulka 9** a dosažené výsledky jsou shrnuty v následujícím grafu (**Obr. 22**).

Tabulka 9 Navážky jednotlivých typů nanovláken na antimikrobiální test

nanovlákná s extraktem z:	navážka [mg]
kopřiva	2,1
jetel	1,2
heřmánek	4,2
řebříček	2,8



Obr. 22 Diluční test nanovláken

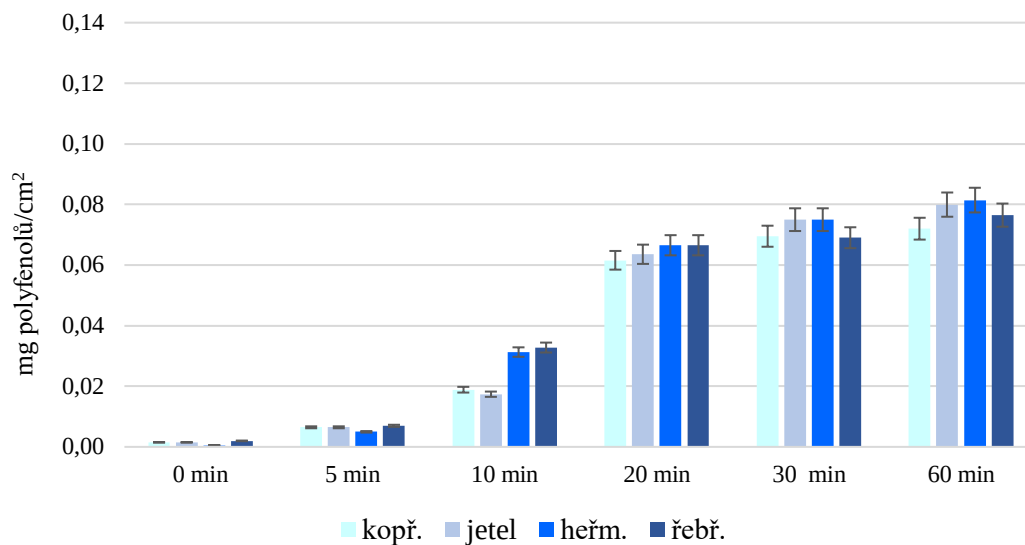
Je vidět, že antimikrobiální účinek na *Propionibacterium acnes* měla všechna připravená nanovlákná, nejvyšší inhibiční účinek byl stanoven u vláken s extraktem z heřmánku. Nicméně u těchto vláken byla použita nejvyšší navážka, proto byla antimikrobiální aktivita vyjádřena v procentech a rovněž vztažena na navážku vláken. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce (**Tabulka 10**).

Tabulka 10 Srovnání antimikrobiální aktivity vláken vůči kmenu *Propionibacterium acnes*

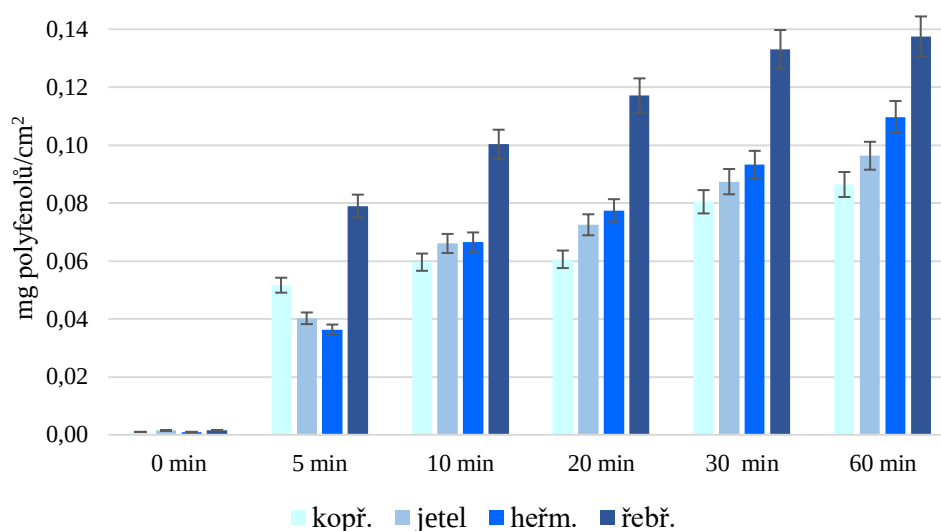
obsažený lipidický extrakt	množství inhibovaných buněk [%]	množství inhibovaných buněk [%/mg vláken]
kopřiva	41,7	19,9
jetel	56,0	46,7
heřmánek	79,7	19,0
řebříček	44,2	15,8

5.4.3 Krátkodobá stabilita nanovláken

Krátkodobá stabilita byla měřena pomocí sledování uvolňování polyfenolů do modelového prostředí (podle popisu v kapitole 4.7.4). Výsledky jsou uvedeny na **Obr. 23** a **Obr. 24**.



Obr. 23 *Postupné uvolňování polyfenolů z nanovláken do vody*

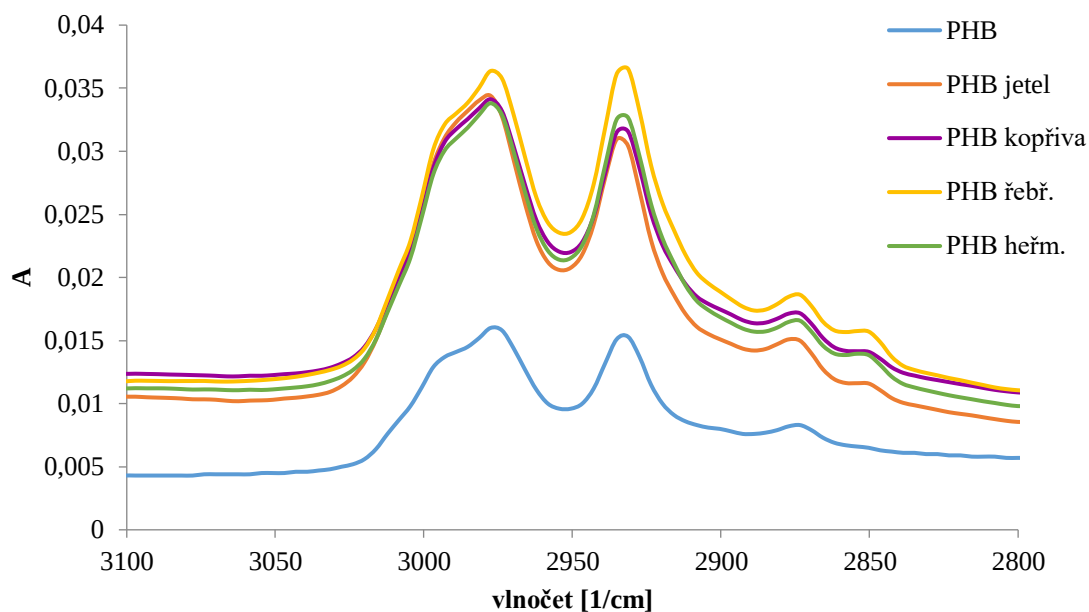


Obr. 24 *Postupné uvolňování polyfenolů z nanovláken do ethanolu*

Do ethanolu se polyfenoly začaly uvolňovat dříve než do vody – výrazněji už v 5. minutě, poté bylo uvolňování pozvolnější. U vody bylo větší množství polyfenolů uvolněno až po 20 minutách a i celkové množství uvolněných polyfenolů bylo v tomto prostředí nižší.

5.4.4 Charakterizace pomocí FTIR-ATR

Připravená nanovláknina byla analyzována pomocí infračervené spektrometrie a porovnána s PHB nanovláknou bez přídavku extraktů podle popisu v kapitole 4.7.4 a oblasti spekter, kde byly pozorovány rozdíly, jsou na **Obr. 25**.

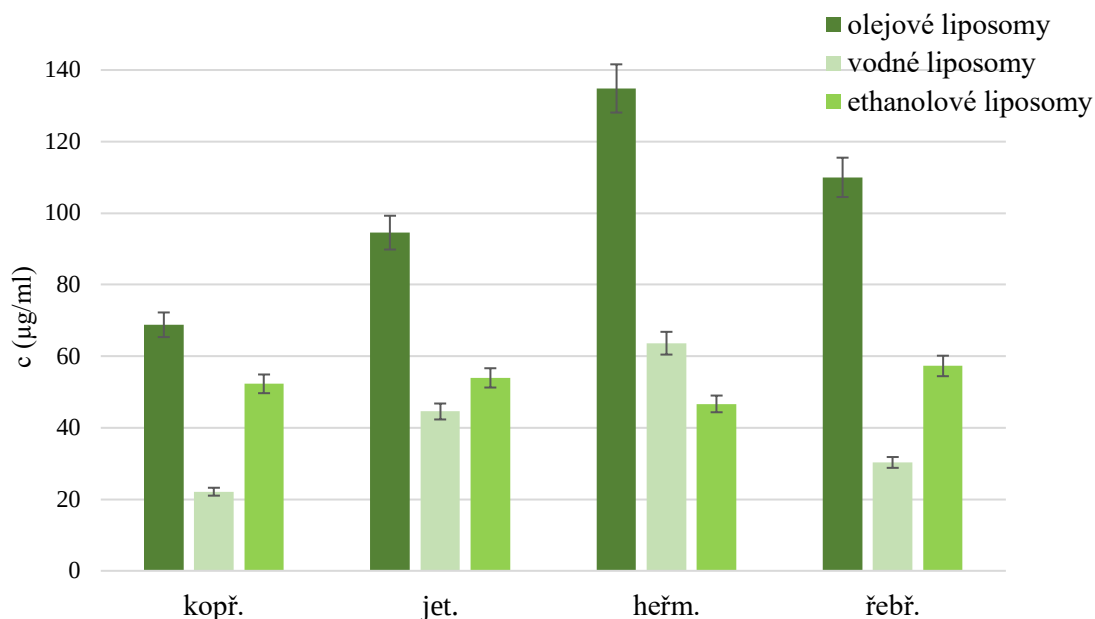


Obr. 25 Porovnání nanovláken s extrakty a bez nich

Nejviditelnější rozdíl byl vidět na pozici 2850 cm^{-1} , která značí aldehydicke skupiny (aldehydy jsou jednou z hlavních složek rostlinných silic, tedy i izolovaných olejů). Pík v této poloze je viditelný jen u vláken s extrakty, u prázdných vláken přítomný není. Lze tedy říci, že u vláken s extrakty se prokázala jejich přítomnost. Nejvyšší pík v této oblasti byl zaznamenán u vzorku s lipidovým extraktem z řebříčku, u tohoto vzorku byla rovněž stanovena nejvyšší antioxidační aktivita.

5.5 Stanovení antioxidační aktivity krémů

U připravených kosmetických emulzí s obsahem liposomů nebyla stanovena výrazná antimikrobiální aktivita. Proto byla u těchto vzorků dále stanovena rovněž jejich antioxidační aktivita podle postupu uvedeného v kapitole 4.8.1 a získané výsledky jsou shrnuty v následujícím grafu (**Obr. 26**).



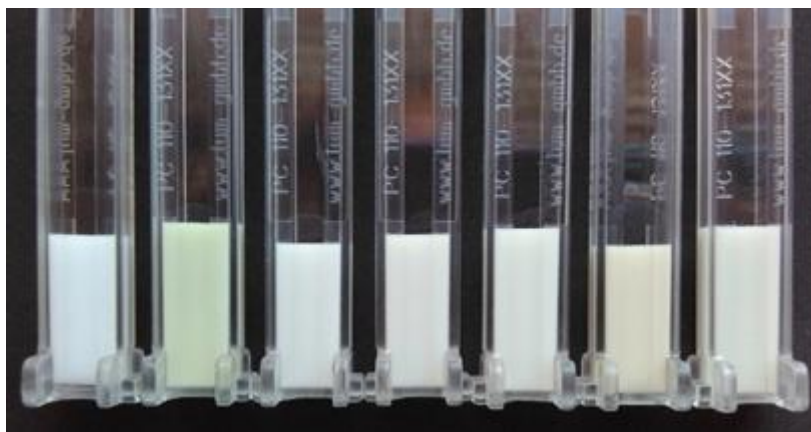
Obr. 26 Antioxidační aktivita emulzí

Z dosažených výsledků lze konstatovat, že všechny testované krémy vykazovaly antioxidační aktivitu, která může být nápomocna při urychlení procesu hojení zánětlivých projevů akné.

Obecně měly emulze s liposomy s lipidovými extrakty nejvyšší antioxidační aktivitu, nejnižší pak emulze obsahující liposomy s vodnými extrakty. Celkově nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena u emulze s liposomy obsahující lipidový extrakt z heřmánku (a to 134,85 µg/ml).

5.6 Stanovení stability krémů pomocí analytické centrifugy

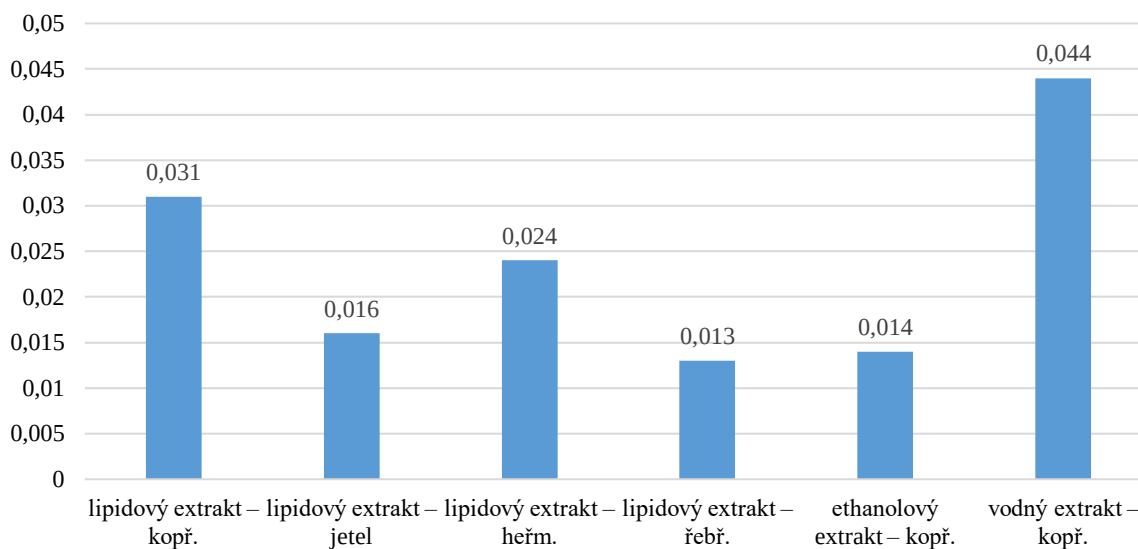
Na závěr byly připravené kosmetické emulze podrobeny i testům stability. Analytická centrifuga byla nastavena na parametry popsané v kapitole 4.8.2, analyzováno bylo celkem 6 vybraných vzorků krémů a to krémy s liposomy obsahující lipidové extrakty a dále liposomy s ethanolovým a vodným extraktem z kopřivy. Nejprve byly vzorky centrifugovány po dobu 3,5 hodiny. Po uplynulé této testované doby však emulze vykazovaly absolutní stabilitu, byly proto analyzovány se stejnými parametry po dalších 17 hodin, ale i po této době byly všechny vzorky zcela stabilní (jak je vidět na **Obr. 27**). Nakonec probíhala analýza ještě další 6 hodin při 4 000 ot/min. Hlavní sledované parametry, tedy indexy nestability, jsou uvedeny v **Tabulka 11** a na **Obr. 28**.



Obr. 27 Vzorky emulzí po analytické centrifugaci

Tabulka 11 Indexy nestability pro analyzované emulze

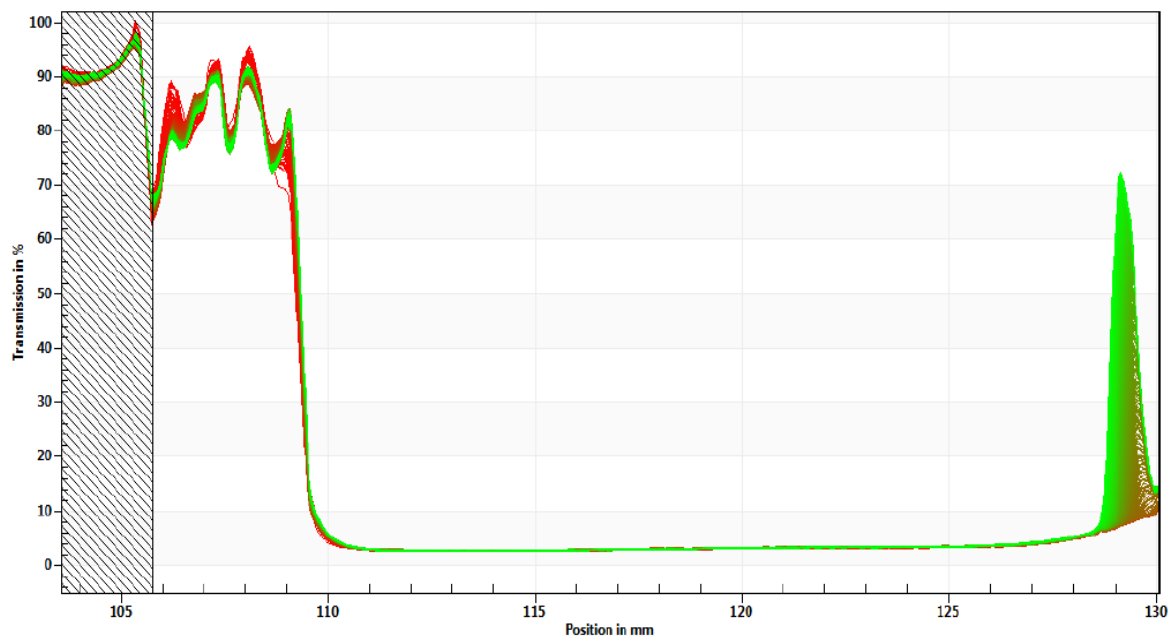
typ přidaných liposomů	index nestability – po 17 h	index nestability – po 6 h
lipidový extrakt – kopř.	0,007	0,031
lipidový extrakt – jetel	0,008	0,016
lipidový extrakt – heřm.	0,008	0,024
lipidový extrakt – řebř.	0,007	0,013
ethanolový extrakt – kopř.	0,010	0,014
vodný extrakt – kopř.	0,020	0,044



Obr. 28 Indexy nestability po následné 6 hodinové analýze

Čím menší hodnota indexu nestability, tím je vzorek stabilnější. Je vidět, že celkově jsou všechny vzorky po celkově 26,5 hodinách centrifugace velmi stabilní.

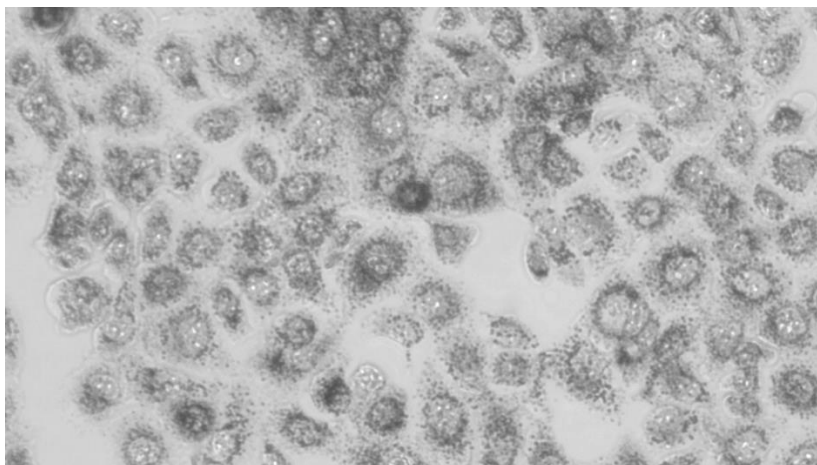
Nejmenší hodnota indexu nestability byla naměřena u vzorku emulze s liposomy s lipidovým extraktem z řebříčku (0,013). Ukázka závislosti transmitance na poloze v kyvetě je uvedena na **Obr. 29** a pro ostatní vzorky byly tyto závislosti velmi podobné.



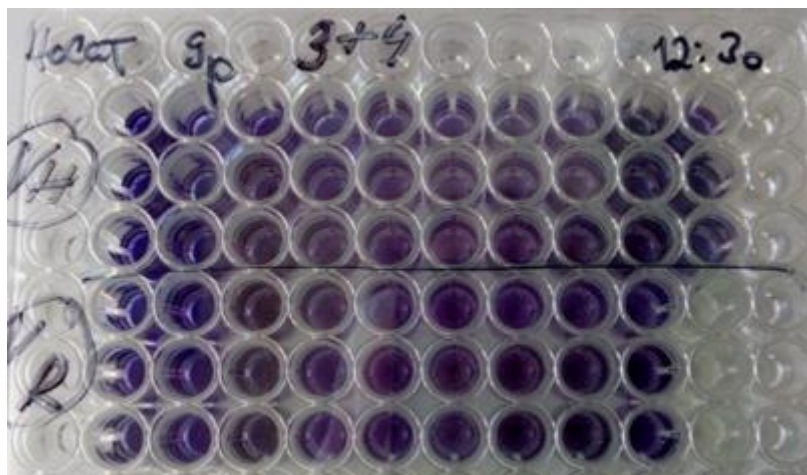
Obr. 29 Závislost transmitance na poloze v kyvetě pro vzorek emulze s liposomy s lipidovým extraktem z kopřivy

5.7 MTT test

Test cytotoxicity byl proveden na keratinocytech, a to podle postupu popsáno v kapitole 4.10. Testovány byly liposomy s vodnými a lipidovými extrakty a také připravená nanovlákná. Na **Obr. 30** jsou vidět keratinocyty po provedení testu ještě s nerozpustnými granulemi formazamu, na **Obr. 31** je pak ukázka MTT testu po jeho provedení.



Obr. 30 Lidské keratinocyty s granulemi formazamu, zvětšení 200 krát

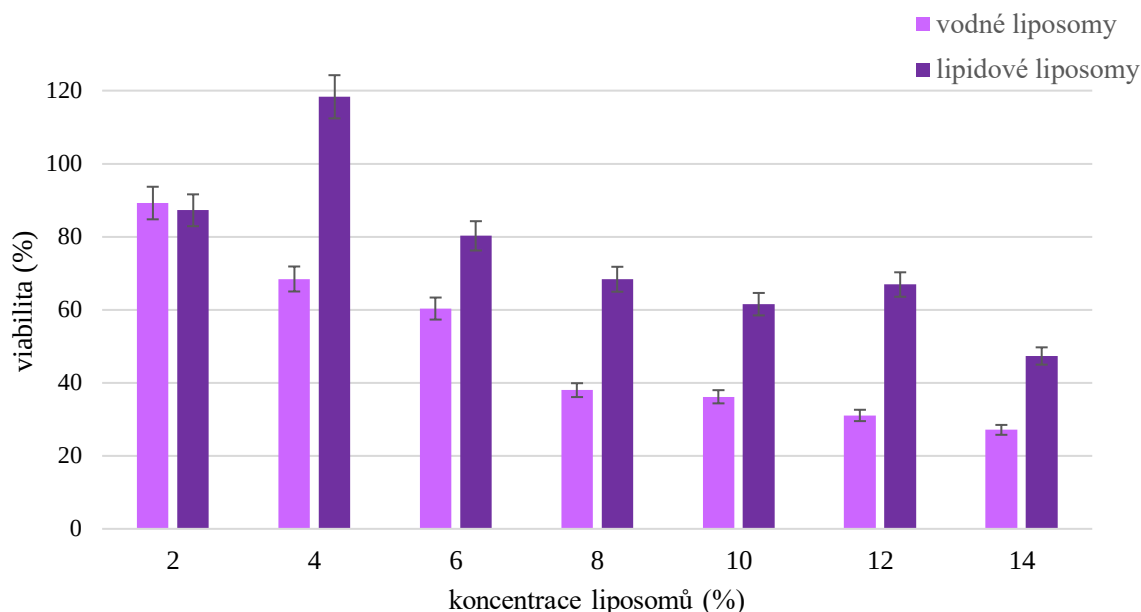


Obr. 31 Destička s hotovým MTT testem

Ukázka výsledků testu cytotoxicity pro testované liposomy s vodným a lipidovým extraktem z kopřivy a také jejich složení (obsah fosfolipidů stanovený pomocí Stewartova testu a množství enkapsulovaných polyfenolů), jsou shrnuty v **Tabulka 12** a na **Obr. 32**.

Tabulka 12 Ukázka složení testovaných liposomů s extrakty z kopřivy

koncentrace liposomů [%]	obsah enkapsulovaných polyfenolů [μg]	obsah lecithinu [μg/ml]
vodné liposomy - kopřiva		
2	2,466	8,325
4	4,933	16,649
6	7,399	24,974
8	9,865	33,299
10	12,332	41,624
12	14,798	49,948
14	17,264	58,273
lipidové liposomy – kopřiva		
2	8,025	2,775
4	16,049	5,550
6	32,099	8,325
8	32,099	11,100
10	40,123	13,875
12	48,148	16,649
14	56,172	19,424



Obr. 32 Test cytotoxicity liposomů s extrakty z kopřivy

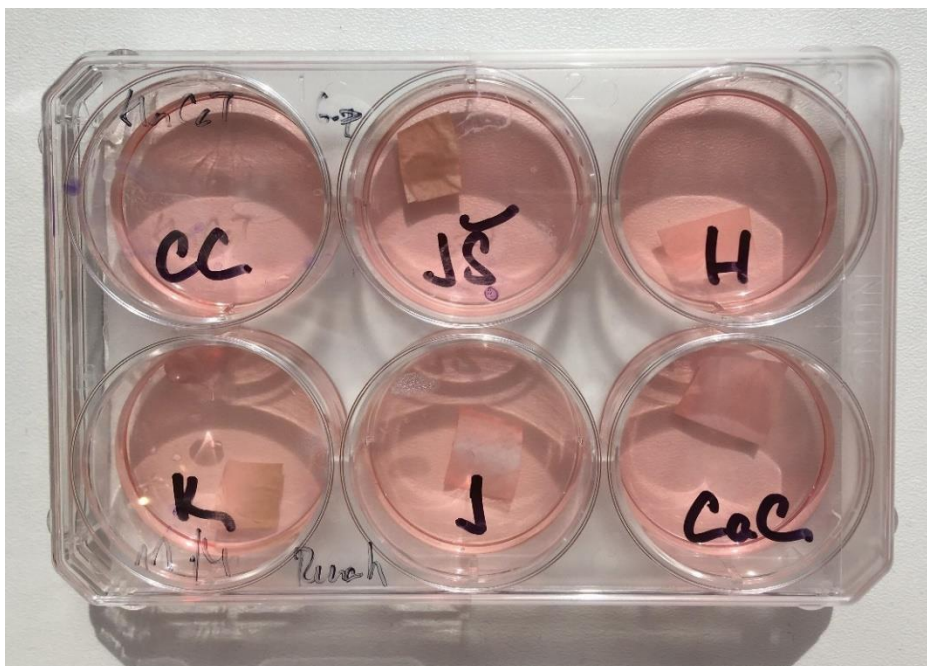
Je vidět, že hranici 60 % přeživších buněk, pod kterou je vzorek považován za cytotoxický, překročily lipidové liposomy v koncentraci nad 12 %, u vodných byla tato koncentrace 6 %. Pro všechny ostatní testované typy liposomů jsou výsledky cytotoxického testu shrnuty v **Tabulka 13**.

Tabulka 13 Výsledek testu cytotoxicity pro liposomy

vodné liposomy	jetel	heřm.	řebř.	lipidové liposomy	jetel	heřm.	řebř.	prázdné
vyhovují do koncentrace	8 %	8 %	8 %		14 %	12 %	4 %	6 %

Kromě vzorku liposomů s lipidových extraktem z řebříčku, který byl vyhovující ve všech testovaných koncentracích, byly ostatní testované liposomy cytotoxické vždy nad určitou koncentrační hranicí.

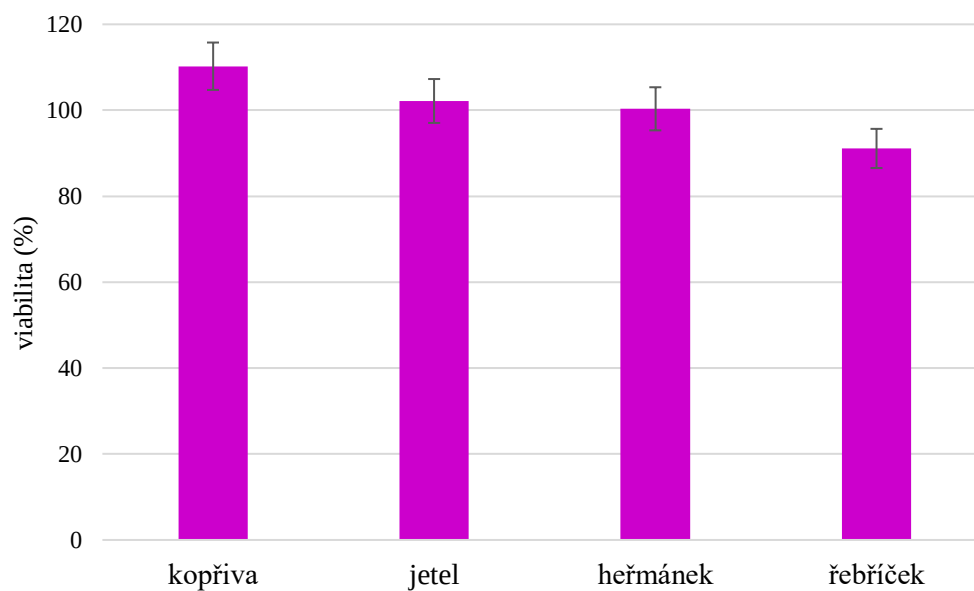
Kromě liposomů byly testům cytotoxicity podrobeny rovněž připravené vzorky vláken. Na **Obr. 33** je 6 jamková destička s testovaným vzorky nanovláken, jejich hmotnosti a výsledky MTT testu jsou uvedeny v **Tabulka 14** a na **Obr. 34**.



Obr. 33 Destička s buňkami a vzorky nanovláken

Tabulka 14 Výsledky MTT testu nanovláken

nanovláčna s extraktem z:	hmotnost [mg]	viabilita buněk [%]
kopriva	3,1	110,25
jetel	8,6	102,16
heřmánek	8,3	100,34
řebříček	10,9	91,12



Obr. 34 Výsledky MTT testu nanovláken

Na základě dosažených výsledků lze říci, že žádné z testovaných nanovláken při použité koncentraci nevykazovala cytotoxicitu. Je zajímavé, že vlákna i při použití výrazně nižšího množství při testech antimikrobiální aktivity vykazovala inhibiční účinek na kmen *Propionibacterium acnes*. Je tedy možné říci, že připravená nanovlákná s obsahem lipidických extraktů zvolených bylin je možné použít k lokálním aplikacím na pokožku bez negativních efektů na kožní buňky a se současným antimikrobiálním účinkem jsou vhodná při aplikacích při problémech s akné.

6 Závěr

Předložená diplomová práce byla zaměřena na přípravu a charakterizaci nanočástic a nanovláken s obsahem aktivních látek z vybraných bylin s cílem aplikovat tyto materiály v přípravcích proti akné.

V práci byly připraveny vodné, ethanolové a olejové extrakty z heřmánku, kopřivy, řebříčku a jetele. U připravených extraktů byla nejprve provedena základní charakterizace, stanoven byl celkový obsah polyfenolů, celkový obsah flavonoidů a antioxidační aktivita. Z dosažených výsledků lze konstatovat, že nejvyšší obsah polyfenolů i flavonoidů vykazovaly lipidické extrakty. Naopak nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovaly především extrakty ethanolové.

Dále byly připraveny liposomové částice a vlákna z polyhydroxybutyrátu (PHB), do nichž byly enkapsulovány charakterizované extrakty. Připravené částice i vlákna byly rovněž charakterizovány. U liposomů byla stanovena enkapsulační účinnost, velikost a koloidní stabilita. Dále byla sledována i jejich antioxidační aktivita, stabilita ve vodném prostředí a rychlost uvolňovaná aktivních látek v různých modelových podmínkách.

Nejvyšší enkapsulační účinnosti bylo dosaženo u lipidických extraktů. Při stanovení antioxidační aktivity však tyto částice vykazovaly nejnižší aktivitu, nejvyšší antioxidační aktivitu pak vykazovaly liposomy s ethanolovými extrakty. Průměrná velikost připravených liposomů se pohybovala v rozmezí od 130 – 500 nm a z hlediska koloidní stability měřené pomocí zeta potenciálu byly všechny testované částice stabilní. Liposomové částice byly rovněž relativně stabilní při dlouhodobém uchovávání ve vodném prostředí a při testování v modelových podmínkách bylo potvrzeno pozvolné uvolňování aktivních látek.

U připravených liposomů byla následně testována rovněž jejich antimikrobiální aktivita a to vůči kmenům *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens* a *Propionibacterium acnes*. Vůči kmenu *Micrococcus luteus* vykazovaly antimikrobiální účinky všechny liposomové částice s lipidickými i ethanolovými extrakty. Na kmen *Serratia marcescens* pak naopak působily inhibičně především liposomy s vodnými extrakty. Vůči kmeni *Propionibacterium acnes* působily antimikrobiálně liposomy s vodným extraktem z kopřivy a z heřmánku. Ostatní částice neměly žádný inhibiční účinek, nebo pouze minimální. Vůči kmenu *Propionibacterium acnes* byla otestována ještě 3 různá antibiotika – ampicilin, penicilin a streptomycin. MIC pro ampicilin byla stanovena na 0,1 µg/ml, pro penicilin 1 µg/ml a pro streptomycin 0,01 mg/ml. Liposomové částice byly následně aplikovány do kosmetických emulzí.

U těchto krémů nebyla bohužel stanovena výrazná antimikrobiální aktivita, testované krémy ale vykazovaly vysokou antioxidační aktivitu, která může být nápomocna při urychlení procesu hojení zánětlivých projevů akné. Dále byly připravené kosmetické emulze podrobeny i testům stability s využitím analytické centrifugy, zde byla prokázána vynikající stabilita.

V práci byla dále charakterizována nanovláknina z polyhydroxybutyrátu s obsahem lipidických extraktů zvolených bylin, následně byla přítomnost těchto extraktů ve vláknech potvrzena pomocí infračervené spektrometrie. U vláknenných vzorků byla dále testována především jejich antioxidační a antimikrobiální aktivita. Pozorována byla i rychlost uvolňování aktivních látek v různých modelových prostředích. Z dosažených výsledků lze konstatovat, že všechny testované vzorky vykazovaly velmi dobrou antioxidační aktivitu. Rovněž byl prokázán jejich antimikrobiální účinek na kmen *Propionibacterium acnes* a pozvolné uvolňování enkapsulovaných aktivních látek.

Na závěr byly připravené liposomové částice a vlákna otestovány i z hlediska jejich bezpečnosti při kontaktu s humánními buňkami. Na základě dosažených výsledků lze říci, že žádný z testovaných typů liposomů při vhodné koncentraci nevykazoval cytotoxicitu.

Rovněž u vláken nebyl při použité koncentraci pozorován cytotoxický efekt. Díky jejich výraznému antimikrobiálnímu a antioxidačnímu účinku lze tedy připravená nanovláknina s obsahem lipidických extraktů zvolených bylin použít například k lokálním aplikacím na pokožku při problémech s akné.

7 Seznam použité literatury

- [1] RULCOVÁ, Jarmila. Akné: příčiny, projevy a terapeutické možnosti: rady lékaře. Praha: Triton, 2005. ISBN 80-7254-661-9.
- [2] FABBROCINI, Gabriella, Claudia CAPASSO, Marianna DONNARUMMA, Mariateresa CANTELLI, Michel LE MAÎTRE, Giuseppe MONFRECOLA a Enzo EMANUELE. A peel-off facial mask comprising myoinositol and trehalose-loaded liposomes improves adult female acne by reducing local hyperandrogenism and activating autophagy. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2017, 16: 480-484.DOI: 10.1111/jocd.12340.
- [3] REUTER, Juliane, Irmgard MERFORT a Christoph M. SCHEMPP. Botanicals in dermatology: An Evidence-Based Review. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2010, 11(4), 247-267.
- [4] ALI, Anser, Yong Hee KIM, Jin Young LEE, SeungHyun LEE, Han Sup UHM, Guangsup CHO, Bong Joo PARK a Eun Ha CHOI. Inactivation of *Propionibacterium acnes* and its biofilm by non-thermal plasma.*Curret applied Physics*. 2014, 14(2): 142-148.DOI: 10.1016/j.cap.2013.12.034. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567173914000194>
- [5] KLABAN, Vladimír. Svět mikrobů: malý mikrobiologický slovník. Hradec Králové: Gaudeamus, 1999. ISBN 80-7041-639-4.
- [6] BEDNÁŘ, Marek. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Praha: Marvil, 1996. Dostupné také z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:4b8795c0-ebe2-11e3-a2c6-005056827e51>
- [7] PEUTHERER, John Forrest, Richard C. B. SLACK a David GREENWOOD. Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogenese, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie. Vyd. 1., čes. Praha: Grada, 1999. ISBN 80-7169-365-0.
- [8] TENOVER F.C., SWENSON J.M., O'HARA C.M., STOCKER S.A. Ability of commercial and reference antimicrobial susceptibility testing methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *Journal of clinical microbiology*. 1995, 33(6): 1524-1527.
- [9] WIEGAND I., HILPERT K., HANCOCK R.E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*. 2008, 3(2): 163-175.
- [10] SCHWALBE R., STEELE-MOORE L., GOODWIN A.C.. Antimicrobial susceptibility testing protocols. Crc Press. 2007.
- [11] RIEDL, Ota a Vladimír VONDRÁČEK. Klinická toxikologie: toxikologie léků, potravin, jedovatých živočichů a rostlin aj. 5., přeprac. vyd. Praha: Avicenum, 1980. Dostupné také z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:b178a900-d60a-11e5-ab98-005056827e52>

- [12] TITTIKPIN, Nassifatou Koko, Frédéric NANA, Stéphane FONTANAY, et al. Antibacterial activity and cytotoxicity of *Pterocarpus erinaceus* Poir extracts, fractions and isolated compounds. *Journal of Ethnopharmacology*. 2018, 212: 200-207. DOI: 10.1016/j.jep.2017.10.020. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874117314344>
- [13] BONCLER, Magdalena, Marek RÓŻALSKI, Urszula KRAJEWSKA, Anna PODSEDEK, Cezary WATALA, Susumu NAKAE a Mamitaro OHTSUKI. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2014, 69(1). DOI: 10.1016/j.vascn.2013.09.003. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1056871913003006>
- [14] MESCHER, Anthony L. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. 13th edition. McGraw-Hill Education, 2013. ISBN 978-0-07-178033-9.
- [15] OSHIO, Tomoyuki, Mayumi KOMINE, Hidetoshi TSUDA, Shin-ichi TOMINAGA, Hirohisa SAITO, Susumu NAKAE a Mamitaro OHTSUKI. Nuclear expression of IL-33 in epidermal keratinocytes promotes wound healing in mice. *Journal of Dermatological Science*. 2017, 85(2): 106-114. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2016.10.008. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923181116308805>
- [16] COSTA, Raquel, Lúcia SANTOS, Stéphane FONTANAY, et al. Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants. *Powder Technology*. 2017, 322: 402-416. DOI: 10.1016/j.powtec.2017.07.086. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032591017306320>
- [17] BELHAJ, N., E. ARAB-TEHRANY, E. LOING, et al. Skin delivery of hydrophilic molecules from liposomes and polysaccharide-coated liposomes. *International Journal of Cosmetic Science*. 2017, 39(4): 435-441. DOI: 10.1111/ics.12394. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ics.12394>
- [18] LINHART, Igor. Toxikologie: interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky. 2., upr. a rozš. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2014. ISBN 978-80-7080-877-1.
- [19] MUŽÍK, Miroslav, Milan ŘEHULA, Jarmila PLEVOVÁ, Jiří ELIS a Zdeněk BOLELOUCKÝ. Farmaceutické obaly. Praha: Avicenum, 1988. Dostupné také z: <http://kramerius.mzk.cz/search/handle/uuid:584c8750-cbf3-11e5-bfe7-005056827e52>
- [20] LIPOZOMY. Wikiskripta [online]. 2018 [cit. 2018-01-29]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Lipozomy#/media/File:Liposome_scheme-en.svg
- [21] FRYCZKOWSKI, R., T. KOWALCZYK, E. LOING, et al. Nanofibres from polyaniline/polyhydroxybutyrate blends. *Synthetic Metals*. 2009, 159(21): 2266-2268. DOI: 10.1016/j.synthmet.2009.09.008. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379677909004809>

- [22] MORSYA, R., M. HOSNYB, F. REICHAB a T. ELNIMRA. Developing a potential antibacterial long-term degradable electrospun gelatin-based composites mats for wound dressing applications. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2017, 2017(114), 8–12 [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381514817300354>
- [23] FRENOT, A., I. S. CHRONAKIS. Polymer nanofibres assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 2003, 8: 64-75.
- [24] Electrospinning versus microfluidic spinning of functional fibers for biomedical applications. *Biomaterials* [online]. 2017, 2017(114), 121–143 [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961216305890>
- [25] ELECTROSPINNING. *Åbo Akademi University* [online]. 2018 [cit. 2018-01-29]. Dostupné z: <http://www.abo.fi/fakultet/en/analytkforskning>
- [26] RIAHI, Daniel N. Modeling and computation of nonlinear rotating polymeric jets during forcespinning process. *International Journal of Non-Linear Mechanics* [online]. 2017, 2017(92), 1–7 [cit. 2018-02-07]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020746217301294>
- [27] Materials today. The University of Texas, 2010, 13(11). ISSN 1369 7021.
- [28] DISEASE BIOPHYSICS GROUP: Bio-Inspired Nanotextiles. *Harvard* [online]. 2018 [cit. 2018-02-07]. Dostupné z: <http://diseasebiophysics.seas.harvard.edu/research/nanotextiles/>
- [29] KVÍTEK, Libor, Radko NOVOTNÝ a Petr PIKAL. Stanovení velikostní distribuce částic anorganických disperzí metodou dynamického rozptylu světla. *Chemické listy* [online]. 1998(92), 431-433 [cit. 2018-02-13]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998_05_431-433.pdf
- [30] Stabilita suspenzí a disperzí – Proč jsou parametry jako velikost částic, zeta potenciál a reologické vlastnosti tak důležité? *Chemagazín* [online]. 2011, 2011(2), 6-8 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: http://www.anamet.cz/sites/all/storage/Anamet_Suspenze.pdf
- [31] KANIA, Partik. *Infračervená spektrometrie* [online]. VŠCHT Praha [cit. 2018-02-13]. Dostupné z: <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infra%C4%8Derven%C3%A1+spektrometrie.pdf?redirected>
- [32] NOVÁK, František Antonín. Velký obrazový atlas rostlin. 2. vyd. Praha: Artia, 1989.
- [33] BELLMAN, Heiko. Poznáváme rostliny: přes 900 druhů rostlin, mechorostů a hub. Praha: Knižní klub, 2016. ISBN: 978-80-242-5162-2.
- [34] LIEČIVÉ RASTLINY: Rumanček kamilkový. *Herbár* [online]. 2018 [cit. 2018-01-18]. Dostupné z: <http://www.herbar.org/liecive-rastliny/rastlina/rumancek-kamilkovy/>

- [35] LIEČIVÉ RASTLINY: Píhlava dvojdomá. *Herbár* [online]. 2018 [cit. 2018-02-02]. Dostupné z: <http://www.herbar.org/liecive-rastliny/rastlina/prhlava-dvojdoma/>
- [36] LIEČIVÉ RASTLINY: Ďatelina lúčna. *Herbár* [online]. 2018 [cit. 2018-02-02]. Dostupné z: <http://www.herbar.org/liecive-rastliny/rastlina/datelina-lucna/>
- [37] LIEČIVÉ RASTLINY: Rebríček obyčejný. *Herbár* [online]. 2018 [cit. 2018-02-02]. Dostupné z: <http://www.herbar.org/liecive-rastliny/rastlina/rebricek-obycajny/>
- [38] OPARA, Elizabeth a Magali CHONAN. Culinary Herbs and Spices: Their Bioactive Properties, the Contribution of Polyphenols and the Challenges in Deducing Their True Health Benefits. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, **15**(10): 19183 – 19202. DOI: 10.3390/ijms151019183. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/15/10/19183/>
- [39] ZHANG, Xiao-Xiao, Qian-Qian SHI, Duo JI, Li-Xin NIU a Yan-Long ZHANG. Determination of the phenolic content, profile, and antioxidant activity of seeds from nine tree peony (*Paeonia* section *Moutan* DC.) species native to China. *Food Research International* [online]. 2017, 2017(97), 141–148 [cit. 2018-03-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996917301072>
- [40] Handbook of cosmetic science and technology. 2nd ed. New York: Taylor, 2006, 1003 s.
- [41] JEDNODUCHÝ DOMÁCÍ PLEŤOVÝ KRÉM. *Alena Jindrová: přírodní péče o zdraví a krásu* [online]. 2018 [cit. 2018-02-02]. Dostupné z: <http://www.alenajindrova.cz/jednoduchy-domaci-pletovy-krem/>
- [42] The HLB system: A time-saving Guide to Emulsifier Selection [online]. Wilmington, Delaware: ICI Americas Inc., 1980 [cit. 2018-02-05]. Dostupné z: http://www.firp.ula.ve/archivos/historicos/76_Book_HLB_ICI.pdf
- [43] CHENG, Yuen S., Ka W. LAM, Ka M. NG, et al. An integrative approach to product development—A skin-care cream. *Computers & Chemical Engineering*. 2009, **33**(5): 1097-1113. DOI: 10.1016/j.compchemeng.2008.10.010. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098135408002068>
- [44] Pešák, M., *Lékové formy*. Vysoká škola chemicko-technologická, 2008, akt. 4.2. 2008
- [45] *Stanovení sedimentační stability emulzí* [online]. b.r. [cit. 2018-03-01]. Dostupné z: http://tresen.vscht.cz/tmt/ESO/LOTP/LOTP_09_emulse.pdf
- [46] VANĚK, Ondřej a Karel BEZOUŠKA. Analytická centrifuga a její využití v biochemické laboratoři. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2010, 104(12), 1155–1162.
- [47] PLEŤOVÁ KOSMETIKA. *SynCare* [online]. 2018 [cit. 2018-04-25]. Dostupné z: <https://www.syncare.cz/obchod/pletova-kosmetika>
- [48] CHALLENGE ACNE: Všechno, co jste kdy chtěli vědět o akné. *Eucerin* [online]. 2018 [cit. 2018-04-25]. Dostupné z: <https://www.eucerin.cz/acne>
- [49] AKNÉ. *Dermacol* [online]. 2018 [cit. 2018-04-25]. Dostupné z: <https://www.dermacol.cz/vyhledavani/?q=akn%C3%A9>

- [50] INFOAKNÉ. *La Roche-Posay* [online]. 2018 [cit. 2018-04-25]. Dostupné z: http://www.laroche-posay.cz/clanek/Infoakne-cz/a25758.aspx?gclid=CjwKCAjwzoDXBRBbEiwAGZRleDrGAQqctJRTSv7LPYufcZaKcBPYoO-6yib5tY_oU8HG8XkfQHxebRoCrm8QAvD_BwE
- [51] PÉČE PROTI NEDOKONALOSTEM. *Garnier* [online]. 2018 [cit. 2018-04-25]. Dostupné z: <http://www.garnier.cz/p%c3%a9%c4%8de-o-ple%c5%a5/beauty/podle-pot%c5%99eby/p%c3%a9%c4%8de-proti-nedokonlostem>
- [52] ZHAO, Qingliang, Cuixia DAI, Shanhui FAN, Jing LV a Liming NIE. *Synergistic efficacy of salicylic acid with a penetration enhancer on human skin monitored by OCT and diffuse reflectance spectroscopy*. DOI: 10.1038/srep34954. ISBN 10.1038/srep34954. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/srep34954>
- [53] SALICYLIC ACID. *Wikipedia* [online]. 2018 [cit. 2018-04-25]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Salicylic_acid?oldid=269784484#/media/File:Salicylic-acid-skeletal.svg
- [54] YOUN, Hae Jeong, Soo Young KIM, Minji PARK, Won Hee JUNG, Yang Won LEE, Yong Beom CHOE a Kyu Joong AHN. Efficacy and Safety of Cream Containing Climbazole/Piroctone Olamine for Facial Seborrheic Dermatitis: A Single-Center, Open-Label Split-Face Clinical Study. *Annals of Dermatology*. 2016, **28**(6): 733-739. DOI: 10.5021/ad.2016.28.6.733. Dostupné také z: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5021/ad.2016.28.6.733>
- [55] DO COUTO, Fabíola Maria Marques, Silene Carneiro DO NASCIMENTO, Silvio Francisco Pereira JÚNIOR, Vanessa Karina Alves DA SILVA, André Ferraz Goiana LEAL, Rejane Pereira NEVES a Kyu Joong AHN. *Antifungal activity of the piroctone olamine in experimental intra-abdominal candidiasis: A Single-Center, Open-Label Split-Face Clinical Study*. DOI: 10.1186/s40064-016-2130-8. ISBN 10.1186/s40064-016-2130-8. Dostupné také z: <http://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/s40064-016-2130-8>
- [56] ZINCIDONE. *Aston Chemicals* [online]. 2015 [cit. 2018-04-25]. Dostupné z: <http://www.aston-chemicals.com/single-product?id=1250>
- [57] PRODUCTS: ZINCIDONE. *Ningbo BestDrug Pharmaceutical* [online]. 2014 [cit. 2018-04-25]. Dostupné z: <http://www.bestdrugltd.com/pro-detail-e/id/51.html>
- [58] SAMPAIO, Tiago Lima, Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de MENEZES, Marcus Felipe Bezerra DA COSTA, et al. Nephroprotective effects of (–)- α -bisabolol against ischemic-reperfusion acute kidney injury. *Phytomedicine*. 2016, **23**: 1843-1852. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.11.008. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711316302124>
- [59] WERNER, Milena, Marianne HERLING, Birgit GARBE, et al. Determination of the Influence of the Antiphlogistic Ingredients Panthenol and Bisabolol on the SPF Value in vivo. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2017, **30**: 284-291. DOI: 10.1159/000480301. Dostupné také z: <https://www.karger.com/Article/FullText/480301>

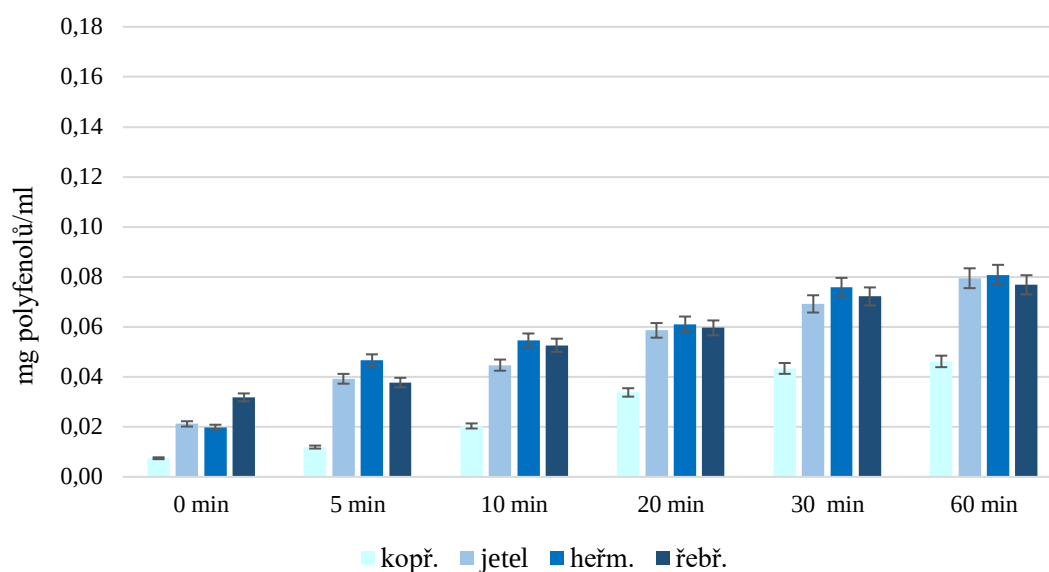
- [60] (-)- α -BISABOLOL. *Wikipedia* [online]. 2018 [cit. 2018-04-25]. Dostupné z: [https://de.wikipedia.org/wiki/\(%E2%80%93\)-%CE%B1-Bisabolol#/media/File:\(%E2%80%93\)-alpha-Bisabolol_Structural_Formula_V1.svg](https://de.wikipedia.org/wiki/(%E2%80%93)-%CE%B1-Bisabolol#/media/File:(%E2%80%93)-alpha-Bisabolol_Structural_Formula_V1.svg)
- [61] CASTRO, Ana H. F., et al. Influence of Photoperiod on the Accunulation of Allantoin in Comfrey Plants. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 2001, **13**(1): 49-54. Dostupné z: <http://www.scielo.br/pdf/rbfv/v13n1/9272.pdf>
- [62] SAQIB, Muhammad, Baohua LOU, Mohamed Ibrahim HALAWA, et al. Chemiluminescence of Lucigenin–Allantoin and Its Application for the Detection of Allantoin. *Analytical Chemistry*. 2017, 89: 1863-1869. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b04271. ISBN 10.1021/acs.analchem.6b04271. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.6b04271>
- [63] ALLANTOIN. *Wikipedia* [online]. 2017 [cit. 2018-04-25]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Allantoin#/media/File:Allantoin.svg>
- [64] DORJAY, Konchok, Tasleem ARIF, Mohammad ADIL, et al. Silymarin: An Interesting Modality in Dermatological Therapeutics. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*. 2018, **84**(2): 238-243. DOI: 10.4103/ijdv.IJDVL_746_16. ISBN 10.4103/ijdv.IJDVL_746_16. Dostupné také z: <http://www.ijdv.com/preprintarticle.asp?id=223706>

8 Seznam použitých zkratk

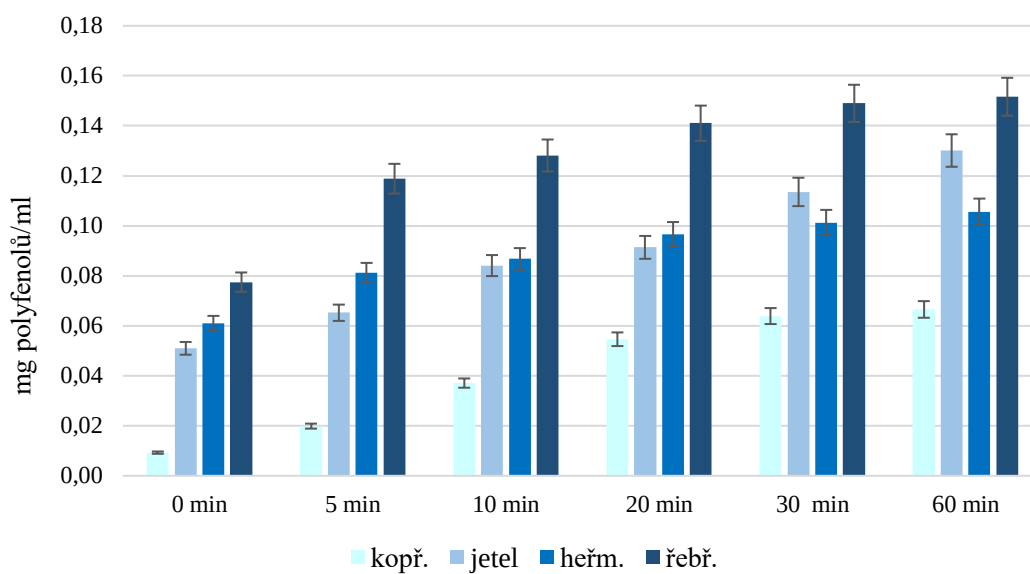
MTT	methy-thiazolyl-tetrazolium
MIC	minimální inhibiční koncentrace
ATP	adenosin trifosfát
ADP	adenosin difosfát
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
FTIR	Fourier transformation Infrared spectroscopy
O/V	emulze „oleje ve vodě“
V/O	emulze „vody v oleji“
PHB	poly(3-hydroxybutyrát)
HLB	hydrophilic-lipophilic balance
DLS	dynamic light scattering
PDI	polydispersity index
PBS	phosphate buffered saline
SDS	sodium dodecylsulphate
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
kop.	kopřiva
jet.	jetel
heřm.	heřmánek
řebř.	řebříček

9 Přílohy

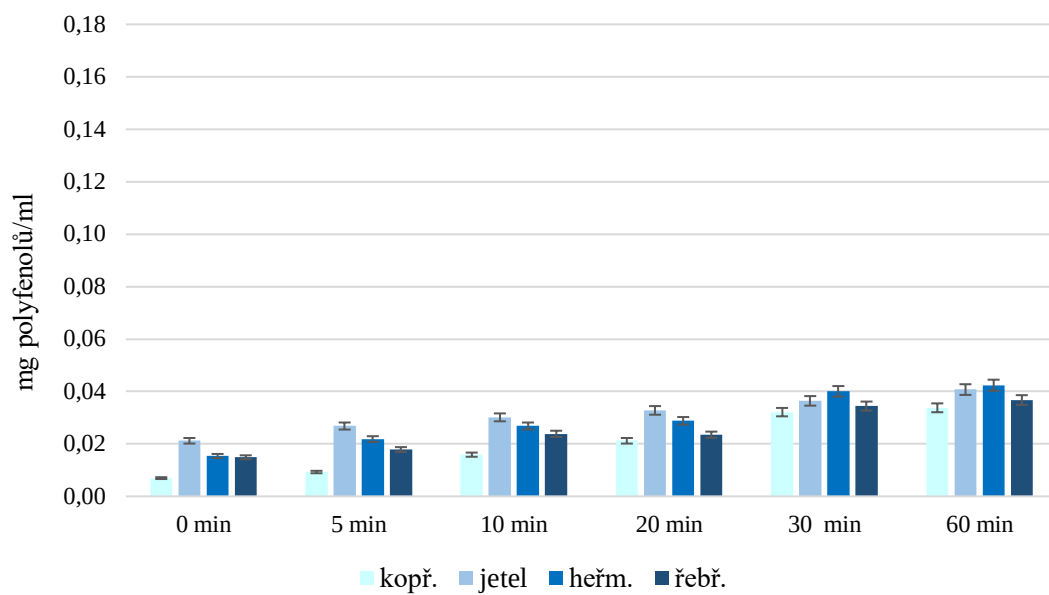
9.1 Postupné uvolňování polyfenolů z liposomů



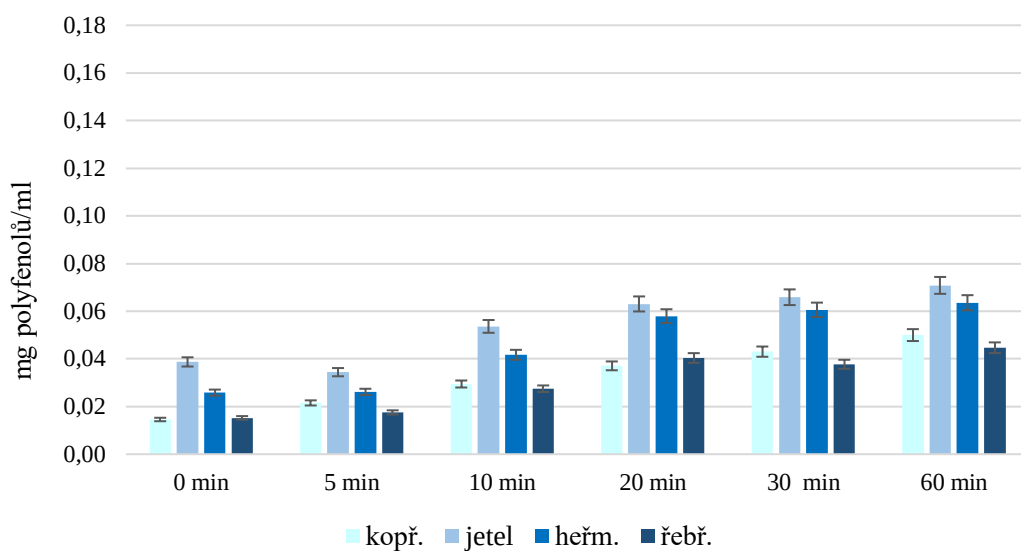
Obr. 35 Postupné uvolňování polyfenolů z liposomů s vodnými extrakty do ethanolu



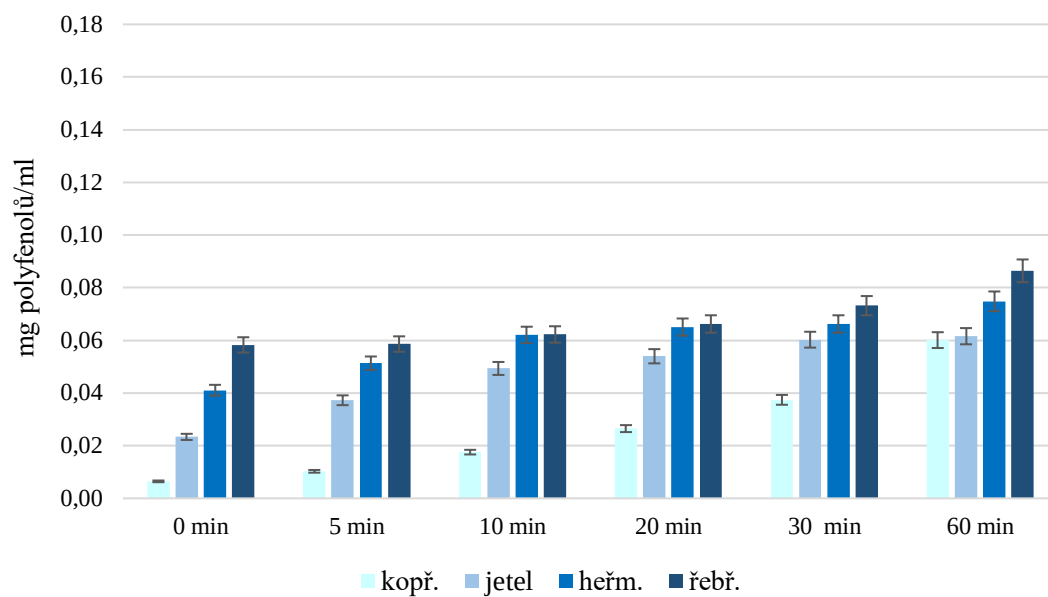
Obr. 36 Postupné uvolňování polyfenolů z liposomů s vodnými extrakty do vody



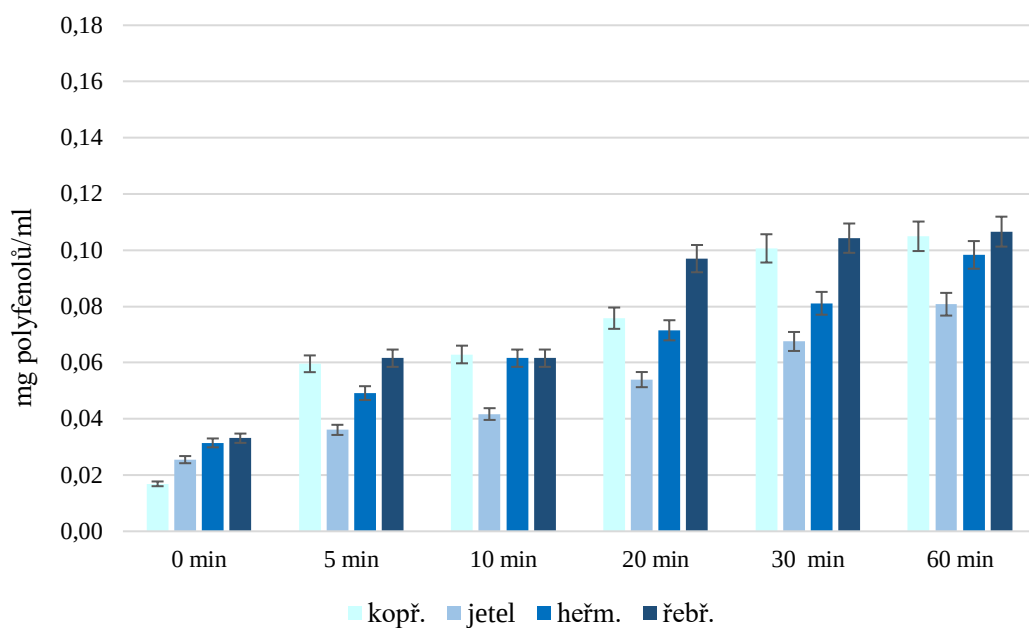
Obr. 37 *Postupné uvolňování polyfenolů z liposomů s ethanolovými extrakty do ethanolu*



Obr. 38 *Postupné uvolňování polyfenolů z liposomů s ethanolovými extrakty do vody*



Obr. 39 *Postupné uvolňování polyfenolů z liposomů s lipidovými extrakty do ethanolu*



Obr. 40 *Postupné uvolňování polyfenolů z liposomů s lipidovými extrakty do vody*