



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

INTERAKCE ČÁSTIC A
VLÁKEN NA BÁZI PHA S
LIDSKÝMI BUŇKAMI

INTERACTION OF PHA-BASED PARTICLES AND FIBRES WITH HUMAN CELLS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Matej Tarageľ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1224/2017
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Matej Taragel'**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Interakce částic a vláken na bázi PHA s lidskými buňkami

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše – příprava nanomateriálů na bázi PHA, buněčné kultury
- 2) optimalizace metod přípravy nanočástic a nanovláken s obsahem PHA
- 3) analýza struktury a charakterizace připravených materiálů
- 4) optimalizace kultivace kultury lidských keratinocytů
- 5) studium interakce částic a vláken na bázi PHA s humánními buňkami

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2018

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

Matej Taragel'
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Bakalárska práca sa zaoberá optimalizáciou prípravy nanočastíc a nanovlákiem na báze polyméru PHA a ich následným pôsobením na živú ľudskú kožnú bunku. Teoretická časť zahŕňa možnosti prípravy a charakterizácie nanomateriálov, predovšetkým nanočastíc na báze polyhydroxyalkanoátov spolu s ich fyzikálnymi, biologickými a chemickými vlastnosťami. Následne sú popísané metódy charakterizácie lipozómov, ich rozdelenie, príprava a vlastnosti. Ďalej sa práca zameriava na testy cytotoxicity, kultiváciu ľudských buniek a všeobecné k vybraným bunkovým líniam.

Praktická časť sa už zaoberá samotnou optimalizáciou prípravy lipozómových častíc a vlákien obohatených o PHA. Nasledovala ich charakterizácia a sledovanie dlhodobej stability a interakcie týchto nanomateriálov s živými HaCaT bunkami. Boli prevedené a vyhodnotené cytotoxické a genotoxické testy spolu so stanovením zvyškových fosfolipidov.

Abstract

This bachelor thesis deals with the preparation and characterization of PHA based nanoparticles and nanofibers and their subsequent influence on the living human skin cell. Theoretical part is aimed at polyhydroxyalkanoates, preparation of PHA based nanoparticles and nanofibers and methods of their physical, biological and chemical characterization. Further, the theory of liposomes, their classification, preparation and physical and chemical properties are discussed too. Next, the theoretical part focuses on the cultivation of human cells and general information on selected cell lines.

The experimental part is focused on the optimization of the preparation of liposomes and fibers enriched by PHA. Further, characterization of stability and interactions of these nanomaterials with human HaCaT cells was proved. Cytotoxic and genotoxic tests were performed and determination of concentration of phospholipids in prepared particles was realized too.

Kľúčové slová:

Polyhydroxyalkanoáty, enkapsulácia, lipozómy, stabilita, cytotoxicita

Keywords:

Polyhydroxyalkanoates, encapsulation, liposomes, stability, cytotoxicity

TARAGEL, M. *Interakce částic a vláken na bázi PHA s lidskými buňkami*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. XY s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

VYHLÁSENIE

Vyhlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne, a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemické VUT v Brně a môže byť využitá na komerčné účely len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študenta

POĎAKOVANIE

Týmto by som sa chcel poďakovať vedúcej mojej bakalárskej práce prof. RNDr. Ivane Márovej, CSc. za všetku pomoc a odborný dohľad. Ďalej sa chcem poďakovať Ing. Renate Pavelkovej za odbornú pomoc, množstvo rád, ochotu a trpezlivosť pri spracovávaní experimentálnej časti. Nakoniec sa chcem poďakovať rodine a všetkým priateľom, ktorý ma vždy podporovali a vytvárali mi skvelé podmienky na spracovanie tejto bakalárskej práce.

Obsah

1. Úvod	7
2. Teoretická časť	8
2.1 Nanovlákná a nanočastice a metódy ich prípra	8
2.2 Polyhydroxyalkanoáty (PHA)	9
2.3 Biokompatibilné nanovlákná na báze polyméru PHA	9
2.4 Lipozomy.....	9
2.4.1 Klasifikácia lipozómov.....	10
2.4.2 Príprava lipozómov	11
2.5 Metódy prípravy nanovláknien.....	11
2.5.1 Elektrostatické zvlákňovanie.....	12
2.5.2 Rotačné zvlákňovanie.....	12
2.5.3 Islands in the sea („Ostrovy v mori“)	12
2.5.4 Rozfukovanie z taveniny	13
2.5.5 Predlžovanie	13
2.5.6 Použitie šablón.....	13
2.5.7 Fázová separácia.....	13
2.6 Metódy charakterizácie nanočastíc.....	13
2.6.1 Dynamický rozptyl svetla.....	14
2.6.2 Stanovenie zeta-potenciálu a stability	14
2.6.3 Analytická centrifugácia.....	15
2.7 Toxicita nanočastíc	16
2.7.1 Cytotoxicita nanočastíc	16
2.7.2 MTT test	17
2.7.3. LDH test	18
2.8 Fytotoxicita nanomateriálov	18
2.9 Kultivácia živých buniek.....	18
2.9.1 HaCat bunečná línia	20
3. Ciele práce	21
4. Experimentálna časť	22
4.1 Použité chemikálie.....	22
4.2 Použité prístroje.....	22
4.3 Použité organizmy	23

4.4 Optimalizácia prípravy PHB nanočastíc	23
4.5 Enkapsulácia PHB nanočastíc s cholesterolom	23
4.6 Príprava koncentračnej rady – kombinované lipozómové častice	24
4.7 Stanovenie veľkosti častíc pomocou DLS a stability pomocou zeta-potenciálu.....	24
4.8 Stanovenie koncentrácie fosfolipidov v lipozómoch	24
4.9 MTT test pre stanovenie cytotoxicity	24
4.10 Test pre stanovenie genotoxicity	25
5. Výsledky a diskusia.....	26
5.1 Charakterizácia pripravených nanočastíc – optimalizácia prípravy.....	26
5.2 Charakterizácia PHB Hydal nanočastíc s cholesterolom – pred a po filtrácii.....	28
5.2 Charakterizácia koncentračnej rady	32
5.4 Meranie cytotoxicity nanočastíc	35
5.5 Meranie cytotoxicity nanovlákien	40
5.6 Genotoxicita	40
6. Záver.....	42
7. Bibliografia:.....	43
8. Zoznam použitých skratiek.....	47

1. Úvod

V dnešnej dobe sa s nanočasticami môžeme stretnúť skoro všade vo svete. Či už sú súčasťou vzduchu, ktorý dýchame, alebo sú obsiahnuté v strave, či nachádzajú využitie v kozmetike alebo medicíne. Napriek tomu, že využívanie týchto častíc stále stúpa, o ich toxicite toho stále nevieme veľa. Pred tým, ako je schválené používanie rôznych produktov na a následne ich využívanie napríklad v kozmetike, musia prebehnúť cytotoxické aj genotoxické testy, aby sa mohli vylúčiť akékoľvek pochybnosti o potenciálnom zdraví škodlivom účinku týchto materiálov.

Z organických častíc sú v súčasnosti najčastejšie používanými lipozómy. Pripravujú sa však častice na báze rôznych polymérov. Jedným z materiálov používaných na prípravu nanočastíc je polyhydroxybutyrát. Tento polyester patrí do skupiny polyhydroxyalkanoátov, ktoré sú vo všeobecnosti biokompatibilné aj biodegradabilné. Avšak vplyv samotného polyhydroxybutyrátu na ľudské bunky ešte nebol poriadne preskúmaný. Preto sa táto práca zameriava na optimalizáciu výroby stabilných nanočastíc a následne testovanie ich účinkov na ľudské kožné bunky za účelom potvrdiť alebo vylúčiť, či sú tieto častice rizikové alebo vhodné pre bežné používanie.

2. Teoretická časť

2.1 Nanovlákná a nanočastice a metódy ich prípra

Nanomateriál musí podľa klauzuly Európskej únie spĺňať aspoň jednu z týchto podmienok: 1) skladá sa z častíc veľkosti 1 až 100 nm s jednou alebo viacerými dimenziami; 2) obsahuje vnútorné alebo povrchové štruktúry jednej alebo viacerých dimenzií v rozmedzí veľkosti 1–100 nm so špecifickým povrchom $> 60 \text{ m}^2 \text{ cm}^{-3}$ s výnimkou materiálov pozostávajúcich z častíc o veľkosti 1 nm [1].

Pod pojmom častica rozumieme časť hmoty s definovanými fyzickými hranicami. Nanočastice boli teda definované ako častice najmenej jednej dimenzie s veľkosťou 1–100 nm. Z hľadiska ekotoxikológie hovoríme o nanomateriáloch aj v prípade agregátov, ktorých veľkosť sa pohybuje rádovo v stovkách nanometrov. Prístupov ku klasifikácii nanočastíc je viacero. Vzhľadom na ich pôvod môžu byť zaradené do troch základných skupín: 1) nanočastice prírodné; 2) umelo syntetizované a 3) náhodne vytvorené ľudskou aktivitou. Nanočastice náhodne vytvorené ľudskou činnosťou sú napr. výfukové plyny, výpary uvoľňované pri zváraní alebo nanočastice prítomné v priemyselných odpadových vodách. Práve nanočastice vytvorené cieľovou ľudskou činnosťou dali základ jednému z najmodernejších odvetví vedy a technológie. Lin a Xing delia skupinu umelo syntetizovaných nanočastíc do štyroch podskupín [1],[2]:

a) Materiály založené na uhlíku zahŕňajúce *fulerény* – zlúčeniny zložené väčšinou z desiatok atómov uhlíka, všeobecne označované ako C_{60} . Majú široké využitie v optike a biomedicíne. Do tejto skupiny patria aj uhlíkové nanorúrky SWCNT tvorené jednou vrstvou grafénu stočenou do cylindrickej štruktúry s priemerom 1 nm a dĺžkou niekoľko μm a nanorúrky MWCNT, ktoré predstavujú niekoľko koncentrických vrstiev rôznej dĺžky a priemeru. Ich využitie v technológiách rôzneho druhu je veľmi bohaté hlavne kvôli ich mechanickým, termickým, fotochemickým a elektrickým vlastnostiam [2].

b) Materiály obsahujúce kov, napr. *nanozlato*, *nanozinok* (nano-Zn), *nanohliník* (nano-Al) a oxidy kovov ako TiO_2 , ZnO a Al_2O_3 . Charakterizuje ich tepelná a elektrická vodivosť. Využívajú sa v potravinárskom priemysle, v rôznych materiáloch, v katalýze, pri transporte látok v živých systémoch, kozmetike ako zložky opaľovacích krémov (nano- TiO_2 , ZnO , Fe_3O_4), v prímiesiach pohonných hmôt (CeO_2) a v posledných rokoch sa výskum zameria aj na ich aplikácie v diagnostike vážnych ochorení ako biosenzory. Do tejto skupiny nanočastíc patria aj takzvané „quantum dots“ (kvantové bodky) známe ako polovodičové nanočastice, ku ktorým zaradíme napríklad častice CdS , CdSe , CdTe , PbS , ZnS , HgS , GaP , GaAs , InP . Ide o častice s veľkosťou od 2–10 nm s výnimočnými elektronickými, optickými, magnetickými a katalytickými vlastnosťami, ktoré sa využívajú napr. v optike ako optické zosilňovače, operačné lasery, pri magnetickej rezonancii (MRI) a v mnohých iných odvetviach [2].

c) *Dendriméry* predstavujú nanopolyméry zložené z množstva rozvetvených polymérnych jednotiek. Používajú sa predovšetkým vo farmácii ako nosiče účinnej látky v liečivách [2].

d) Materiály kombinujúce viacero typov nanočastíc alebo nanočastice v kombinácii s veľkoobjemovými („bulk“) materiálmi. Štúdium toxicity týchto typov kompozitov je veľmi komplikované, lebo v nich dochádza ku kombinácii efektov jednotlivých skupín nanočastíc, ktorých účinky často nie sú dostatočne objasnené ani na individuálnej úrovni [nižšie2].

Ako surovinu je zatiaľ možné využiť približne 50 syntetických a prírodných polymérov. Nanovlákná majú veľkú škálu využitia a majú priniesť revolúciu v medicíne alebo elektronike, ďalej v nanokompozitoch atd., preto sa označujú aj ako materiály tretieho tisícročia. Prvé výrobky z nanomateriálu prišli na trh v 80-tych rokoch minulého storočia, ale vývoj technológie je napriek tomu stále iba v počiatočnom štádiu [2].

2.2 Polyhydroxyalkanoáty (PHA)

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú polyestery, ktoré produkujú mikroorganizmy pri nevyvážených podmienkach pre rast. PHA sú zaujímavé z toho dôvodu, že vďaka ich biodegradabilite, biokompatibilite spoločne s inými mechanickými vlastnosťami založenými na štruktúre a obsahu monomérov, môžu byť využité v tkanivovom inžinierstve. Aplikácie PHA v medicíne sa rozrastajú z toho dôvodu, že sa dajú využiť pri ošetrovaní rán, regenerácie kostí a v dodávaní liečiv do organizmu. Niektoré štúdie priradili biokompatibilitu PHA k ich fyzikálnym vlastnostiam (napr. porozita, povrchová hydrofilnosť, povrchová energia a degradácia produktov polyméru). Napríklad 3-hydroxybutyrát (3HB), ktorý je najbežnejším degradačným produktom PHA, hrá dôležitú rolu pri biokompatibilite. Existujú štúdie, ktoré preukázali, že 3HB môže prekonať poruchy pri produkcii bunkovej energie a poskytnúť terapeutickú ochranu proti mnohým ochoreniam. Avšak okrem 3HB, ich prípravy a bunkových reakcií na oligo-hydroxyalkanoáty (OHA), čo sú všetko degradačné produkty PHA, neboli preskúmané [2].

2.3 Biokompatibilné nanovlákná na báze polyméru PHA

Biopolyméry sa nemusia nevyhnutne pripravovať chemickou syntézou, naopak existujú aj ďalšie možnosti. Jednou z najefektívnejších metód je využitie mikrobiálnych biotechnológií. Niektoré druhy baktérií sú schopné premeniť prirodzene potravu na zásobné biopolyméry. Medzi zásobné látky baktérií patria aj polyhydroxyalkanoáty (PHA), ktoré sú mechanickými vlastnosťami podobné polypropylénu, avšak na rozdiel od neho sú polyhydroxyalkanoáty taktiež biokompatibilné (nevyvolávajú žiadne nežiaduce účinky v organizme) a zároveň biodegradabilné (rozložiteľné v prírode). Následne sa dá PHA spracovať do plošných útvarov ale hlavne do nanočastíc a nanovláknien, ktoré sa dajú využiť buď na výrobu fliaš alebo jednorazových plastových pohárov. Na druhú stranu sa dajú využiť na cielený transport liečiv, kožné kryty, cievne náhrady a pod [3].

2.4 Lipozómy

Lipozómy sú syntetické prenášače guľovitého tvaru, ktoré sa vyrábajú z cholesterolu a prirodzených netoxických fosfolipidov. Kvôli ich veľkosti, biokompatibilite, hydrofóbnym a hydrofilným vlastnostiam sú lipozómy výhodné systémy na prenos látok. Navzájom sa líšia napríklad zložením lipidov, povrchovým nábojom, veľkosťou alebo metódami prípravy. Okrem toho výber komponentov dvojvrstvy determinuje rigidita, respektíve fluidita alebo náboj samotnej dvojvrstvy. Napríklad nenasaturovaný fosfatidylcholín z prírodného zdroja

(vaječný alebo sójový fosfatidylcholín) poskytuje viac priepustnú a menej stabilnú dvojvrstvu, zatiaľ čo nasatované fosfolipidy s dlhým acylovým reťazcom (napríklad dipalmitoylfosfatidylcholín) tvorí rigidnú a nepriepustnú dvojvrstevú štruktúru. Ukázalo sa, že fosfolipidy spontánne vytvárajú uzatvorené štruktúry, keď sú hydratované vo vodnom roztoku. Takéto útvary, ktoré majú jednu alebo viac fosfolipidových membrán, môžu transportovať rôzne látky, napríklad liečivá. Z dôvodu amfipatických (hydrofóbnych aj hydrofilných) vlastností lipidov vo vodnom médiu, sú ich termodynamické vlastnosti a samozostavovacie charakteristiky ovplyvnené entropickým transformovaním ich hydrofóbných častí do sférických dvojvrstiev [4].

Vo všeobecnosti sú lipozómy definované ako sférické prenášače o veľkosti častíc od 30 nm po niekoľko mikrometrov. Sú zložené z jednej alebo viacerých lipidových dvojvrstiev, ktoré obkľučujú vodné jednotky, kde polárne hlavičky smerujú von do vodného prostredia a lipofilné zvyšky mastných kyselín sú orientované k sebe vo vnútornej časti membrány. Na druhej strane, samoagregácia polárnych lipidov nie je limitovaná obvyklou dvojvrstevovou štruktúrou, ktorá závisí na tvare molekúl, teplote, prostredia a podmienkach prípravy ale môžu sa zoskupiť do rôznych typov koloidných častíc [4].

Lipozómy sú značne využívané ako nosiče pre množstvo molekúl v kozmetickom a farmaceutickom priemysle. Navyše, v potravinárstve sa čoraz viac skúma enkapsulácia lipozómov na vytvorenie systému, ktorý dokáže zachytiť nestabilné zlúčeniny a zachovať ich funkcie. Lipozómy môžu zachytiť aj hydrofóbné aj hydrofilné zlúčeniny, spomaliť rozklad týchto zachytených kombinácií a následne ich vypustiť na cieľovom mieste [4].

Vďaka ich biokompatibilite, biodegradabilite, nízkej toxicite a schopnosti zachytávať oboje hydrofilné aj lipofilné liečivá a zjednodušiť ich prenos napríklad do nádorového tkaniva, zvýšili lipozómy svoju hodnotu v rámci výskumu a komerčne ako transportný systém liečiv [3].

Technológia lipozomálnej enkapsulácie (LET – liposomal encapsulation technology) je najnovšia prenášačová technika využívaná v medicínskom výskume na transport liečiv, ktoré vystupujú ako nápravné promotory v konkrétnych orgánoch ľudského tela. LET je metóda, ktorou sa tvoria sub-mikroskopické častice nazývané lipozómy, ktoré enkapsulujú rozličné materiály. Lipozómy vytvárajú bariéru okolo ich obsahu, ktorá je odolná voči enzýmom v ústach a žalúdku, ďalej bázam, tráviacim šťavám, vnútrotelovej flóre a aj voči voľným radikálom. Obsah lipozómov je teda chránený aj voči oxidácii a redukcii. Táto ochranná fosfolipidová bariéra zostáva nepoškodená, až kým obsah lipozómov nie je doručený do presného cieľového miesta, orgánu alebo systému, kde je tento obsah využitý [4],[5].

2.4.1 Klasifikácia lipozómov

Veľkosť lipozómov je rôzna, od veľmi malých (0,025 μm) po veľké (2,5 μm). Navyše, lipozómy môžu mať jednu alebo viac membrán. Na základe veľkosti a množstva dvojvrstiev, sú lipozómy klasifikované do jednej z dvoch kategórií:

- 1) Multilamelárne (MLV – multilamellar vesicles)
- 2) Unilamelárne, ktoré sa tiež delia na dve kategórie:

- Veľke unilamelárne (LUV)
- Malé unilamelárne (SUV)

V unilamelárnych lipozómoch má častica jednu sféricku fosfolipidovú dvojvrstvu, ktorá uzatvára vodný roztok. Pri tvorbe multilamelárnych lipozómov dochádza k vrstveniu jednotlivých dvojvrstiev fosfolipidov za vytvorenia sústrednej (koncentrickej) štruktúry [4],[5].

2.4.2 Príprava lipozómov

Existujú viaceré metódy prípravy lipozómov, ako napríklad sonifikácia, zmrazenie a následne rozmrazenie lipozómov, francúzska tlaková cela („French press“) alebo etanolová injekcia.

Sonifikácia je pravdepodobne najrozšírenejšie používaná metóda na prípravu SUV lipozómov. V tejto metóde sú MLV lipozómy sonifikované vo vaňovom sonifikátore alebo pomocou sondového ultrazvuku. Hlavnou nevýhodou tejto metódy je veľmi nízka efektivita, možné narušenie fosfolipidu a látok, ktoré sa majú enkapsulovať, eliminácia väčších molekúl, kontaminácia kovovou sondou a následne prítomnosť oboch typov lipozómov – MLV spolu s SUV [6],[7].

Existujú 2 typy sonifikačných techník:

a) Sonifikácia sondou je typ sonifikátora, ktorý je priamo ponorený do lipozómového roztoku. V tejto metóde je energia vložená do tohto roztoku veľmi veľká. To spôsobuje veľké zvýšenie teploty, a z tohto dôvodu je nutné mať nádobu s roztokom ponorenú vo vode alebo ľade. Ak táto sonifikácia trvá dlhšie ako 1 hodinu, je veľmi pravdepodobné, že viac ako 5% lipidov sa deesterifikuje. Tak isto môže titánová sonda spôsobiť znečistenie roztoku. Táto metóda je však pre aplikácie nanočastíc oveľa efektívnejšia v porovnaní so sonifikáciou vo vode. Sonifikácia vo vode vyžaduje hodiny na to, čo sonda zvládne za niekoľko minút. Touto metóda sa vyrábajú stabilne disperzné roztoky, ktoré vydržia niekoľko mesiacov [7].

b) Sonifikácia vo vode – roztok lipozómov je vložený do sonikátora vo „vani“. Táto metóda je výhodnejšia kvôli tomu, že je možné jednoduchšie kontrolovať teplotu roztoku. Materiál, ktorý sa sonifikuje môže byť na rozdiel od sonifikácie sondou chránený sterilným prenášačom, alebo inertnou atmosférou [7].

2.5 Metódy prípravy nanovlákien

Existujú metódy na prípravu nanovlákien ako fázová separácia, ťahanie polymérov z kvapiek, šablónová syntéza, samoorganizovanie, rozfukovanie z taveniny, predĺžovanie apod. Najčastejšie používaným spôsobom je elektrostatické zvlákňovanie spolu s rotačným zvlákňovaním a zaujímavá je aj metóda tzv. „Islands in the sea“ [8].

2.5.1 Elektrostatické zvlákňovanie

Je to najbežnejšia metóda na prípravu všetkých submikronových vlákien. Podstatou celého postupu je účinok a jeho využitie elektrostatického poľa na elektricky nabitú viskoelastickú kvapalinu, kedy dôjde k vytvoreniu veľmi tenkých vlákien. Tvorba týchto vlákien sa uskutočňuje medzi dvoma elektródami, ktoré sú opačne nabitú, pričom jedna je v kontakte s kvapalinou, ktorej následne odovzdáva časť náboja. Táto kvapalina je následne vystavená elektrostatickým príťažlivým silám druhej opačne nabitú elektródy – je k nej priťahovaná za vzniku veľmi tenkých vlákien. Samotný mechanizmus vzniku nanovlákn je zložitejší ako prosté predĺženie viskoelastického útvaru v silovom poli. Je potrebné zdôrazniť, že jedna aj druhá elektróda môže nadobudnúť veľa foriem podôb a zároveň s vlastnosťami zvlákňovanej kvapaliny (napr. elektrická vodivosť, tenzia pár rozpúšťadla, povrchové napätie, viskozita atd.) predstavuje tvar týchto elektród základný parameter, ktorý ovplyvňuje vznik nanovlákn [9].

Pri využití tejto metódy majú tieto vlákna priemer väčšinou pár desiatok nanometrov až niekoľko mikrometrov, ale najčastejšie to je práve v intervale medzi 100 až 750 nm. Vlákna sa v závislosti od konštrukcie zariadenia môžu vytvárať kontinuálne (nekonečné vlákno) a ich dĺžka môže byť aj niekoľko 10-tok centimetrov – jedná sa o plošné útvary alebo objemové útvary [9].

Momentálne sa táto metóda využíva na spracovanie polymérov, ktoré sa nedajú spracovať z taveniny, ale iba za použitia rozpúšťadiel, ako napríklad polysacharidy alebo polypeptidy [9].

2.5.2 Rotačné zvlákňovanie

Rotačné zvlákňovanie je metóda, ktorá vytvára z roztoku polyméru pomocou odstredivej sily nanovlákn. Počas rotácie trysky o vysokej rýchlosti sa na ňu pomaly kvapká roztok polyméru, a keď rotačná rýchlosť dosiahne kritickú hodnotu, odstredivá sila prekoná povrchové napätie roztoku polyméru a rozptýli ho. Roztok prechádza procesom rozťahovania zároveň prebieha rýchle vyparovanie kvapalnej časti a následne sa zachytáva na kolektor ako nanovlákn. Keďže v procese rotačného zvlákňovania sa nevyužíva vysokonapäťové elektrické pole, je jeho bezpečnosť oveľa vyššia ako pri elektrostatickom zvlákňovaní. Navyše vysoká rotačná rýchlosť umožňuje oveľa rýchlejšiu a efektívnejšiu výrobu vlákien, čo zvyšuje ich celkovú produkciu o dva až tri rády a zároveň znižuje celkové náklady na výrobu v porovnaní napríklad s elektrostatickým zvlákňovaním. Taktiež táto metóda umožňuje tvorbu nanovlákn z oveľa koncentrovanejších roztokov než elektrostatická metóda. To znižuje náklady používaním menšieho množstva rozpúšťadla [10].

2.5.3 Islands in the sea („Ostrov v mori“)

Táto technológia sa zakladá na princípe tvorby dvojzložkových vlákien z taveniny. Konštrukcia zvlákňovacej trysky je postavená tak, že jeden polymér (napr. polyester alebo PHA) sa pretlačuje cez stovky otvorov (ostrovov), okolo ktorých preteká cez trysku polystyrén ako ďalší komponent a tvorí „more“ [11].

2.5.4 Rozfukovanie z taveniny

Ďalšou významnou metódou s veľkou možnosťou prípravy aj následnej výroby nanovlákien je metóda zvaná rozfukovanie z taveniny („melt blowing“), ktorá slúži takmer výhradne na výrobu štandardných polymérnych mikrovlákien s priemerom medzi 2-7 μm . V tejto metóde je tavenina polyméru privádzaná do trysky s veľkým množstvom otvorov, ku ktorým je súčasne privádzaný ohriaty a stlačený vzduch. Po vytlačení z otvoru zachytáva a predlžuje vzduch taveninu. Vlastnosti vzniknutých vlákien nie sú závislé len na konštrukčných parametroch, ale aj od vlastností polymérnej taveniny (napr. teplota topenia) a parametroch prúdiaceho vzduchu (napr. teplotný gradient). Najväčšou výhodou tejto metódy je príležitosť efektívne narábať a spracovať polyméry z taveniny. Táto metóda poskytuje plošné aj objemové vláknové útvary [12],[13].

2.5.5 Predlžovanie

Pri tejto metóde označovanej aj ako „drawing“, je k povrchu kvapky taveniny polyméru alebo roztoku priložená na pevnej podložke kapilára. Tá sa následne odťahuje konštantnou rýchlosťou 10^{-4} s^{-1} . Medzi ústím kapiláry a kvapkou vzniká vlákno, ktoré môže dosiahnuť pri vhodných parametroch submikrónovú hrúbku. V tejto metóde nie je možné kontrolovať hrúbku pripravovaných vláken a preto ani nie je možné, aby táto metóda bola základom pre výrobu nanovlákien vo väčšej miere. Táto metóda teda poskytuje prednostne jednotlivé nanovláka [12],[13].

2.5.6 Použitie šablón

Táto metóda využíva presne vzorované membrány („Template Synthesis“). Využívajú sa membrány s veľmi malými otvormi, cez ktoré je tlačný kvapalný prekurzor do zrážacej lázne. Táto metóda vyniká skvelou opakovateľnosťou vlastností vyrábaných produktov. Týmto spôsobom sa dajú získať vlákna aj o priemere niekoľkých nanometrov. Avšak v súčasnosti sa tento postup využíva iba v rámci laboratórií[12],[13].

2.5.7 Fázová separácia

Znova sa jedná o laboratórnu metódu. Tá funguje na základe oddeľovania dvoch fyzikálne odlišných fáz. Prvým krokom postupu je príprava homogénnej fáze, ktorá sa následne ochladí na teplotu, pri ktorej sa tvorí gél. Nasleduje postupne odstránenie pôvodného rozpúšťadla zo štruktúry gélu nahradením úplne novým rozpúšťadlom s kompletne inými vlastnosťami (napr. tetrahydrofurán a voda). V tomto stupni dochádza k tvorbe vláknitej nanoporoznej štruktúry v prvotnom géle. Materiál sa následne schladí na teplotu tuhnutia druhého rozpúšťadla, ktoré sa potom odstráni pri zníženom tlaku sublimáciou. Výsledkom je útvar obsahujúci vnútornú nanovláknennú štruktúru, tzv. nanovláknenná pena. Vlákna v tejto pene majú priemer 50–500 nm a dĺžka sa pohybuje v rade mikrometrov[12],[13].

2.6 Metódy charakterizácie nanočastíc

Na stanovenie potenciálnej toxicity pre biologické systémy nanočastíc je nevyhnutné presne definovať veľkosť týchto častíc. Je potrebné vedieť, aké majú mechanické a fyzikálno-chemické vlastnosti, vrátane biokompatibility, priepustnosti alebo chemickej stability. Aby sme mohli tieto vlastnosti (veľkosť a zloženie) zistiť, musíme využiť metódy na ich

stanovenie, ako napríklad svetelná, fluorescenčná alebo elektrónová mikroskopia. Na určenie koncentrácie týchto častíc sa dá využiť spektrofotometria [14].

2.6.1 Dynamický rozptyl svetla

Táto metóda sa využíva na stanovenie veľkosti častíc v roztoku a funguje na princípe merania Brownho pohybu, ktorý sa následne dáva do vzťahu s veľkosťou častíc. Metóda funguje tak, že sa laserom presvetlí roztok s časticami a analyzuje sa fluktuácia intenzity rozptýleného svetla. Systém meraní na základe DLS je zložený zo šiestich hlavných komponentov. Je to laser, ktorý slúži ako zdroj svetla na presvetlenie častíc vo vzorke. Veľká väčšina týchto laserových lúčov prejde roztokom bez zmeny, avšak niektoré sú pohltené a rozptýlené časticami. Na meranie tohto rozptylu svetla slúži detektor [14],[15].

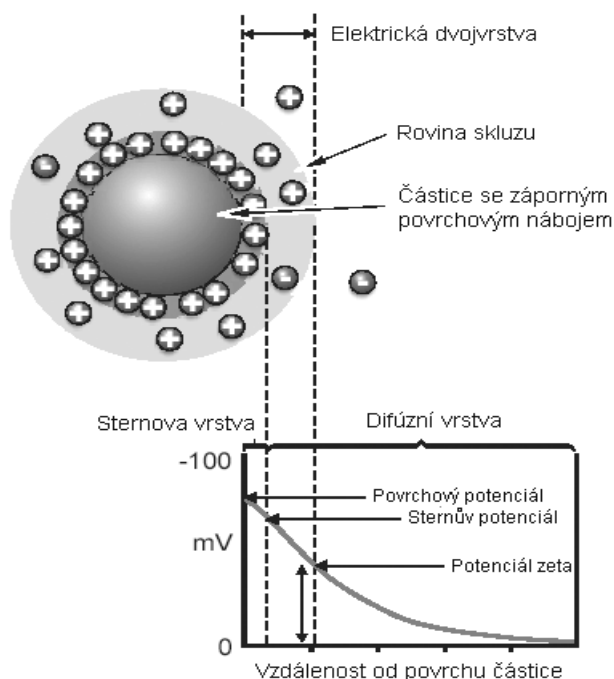
Pri vzorkách, ktoré majú veľmi slabý rozptyl svetla, teda obsahujú veľmi malé častice alebo majú nízku koncentráciu, musíme zvýšiť množstvo rozptýleného svetla, a to tak, že do vzorky vpustíme viac svetla s laseru. Naopak pri vzorkách, ktoré rozptyľujú svetlo viac, pretože častice v nej sú veľmi veľké alebo silno koncentrované, sa musí zmenšiť množstvo rozptyľovaného svetla. To docielime za použitia zoslabovača na zníženie množstva laseru, prechádzajúceho cez vzorku. Signál intenzity rozptylu prejde na korelátor, čo je doska digitálneho spracovania signálu. Korelátor následne porovná túto intenzitu v časových intervaloch, z ktorých následne odvodí rýchlosť, ktorou sa mení intenzita. Táto informácia následne prejde do počítača, kde sa dáta analyzujú, odvodí a vypočítajú zo Stokes-Einsteinovej rovnice informáciou i distribúcií veľkosti častíc. Následný graf distribúcie veľkosti častíc ukazuje na ose x distribúcie veľkostí častíc a osa y zobrazuje relatívnu intenzitu rozptýleného svetla [14],[15].

2.6.2 Stanovenie zeta-potenciálu a stability

Z dôvodu sieťového náboja sa tesne pri povrchu častice zhromažďujú ióny opačne nabité ako ióny častice a preto existuje elektrická dvojvrstva okolo každej častice. V rámci kvapaliny, ktorá obklopuje časticu, sú dve oblasti: 1) Sternová vrstva - vnútorná oblasť, kde ióny sú silno viazané 2) difúzna oblasť – vonkajšia oblasť, kde sú ióny viazané slabo. Vo vnútri vonkajšej oblasti sa nachádza teoretická hranica, kde častice aj ióny vytvárajú stabilnú jednotku. V prípade, keď sa častica pohybuje (napr. kvôli gravitácii), tak sa ióny vo vnútri hranice pohybujú s ňou. Tento prechod alebo hranica sa nazýva rovina sklzu alebo povrch hydrodynamického šmyku a potenciál, ktorý sa nachádza na tejto hranici je volá zeta potenciál. Jeho veľkosť taktiež naznačuje potenciálnu stabilitu systému. Tento koloidný systém vzniká v prípade, ak jedno zo skupenstiev (pevné, kvapalné a plynné) je dispergované v rámci jedného skupenstva [14].

Stroje určené na meranie zeta potenciálu najskôr určia elektroforetickú pohyblivosť častíc a následne za použitia Henryho rovnice sa vypočíta zeta potenciál. Ak majú úplne všetky častice v rámci suspenzie veľmi veľký kladný alebo záporný zeta potenciál, potom budú prevládať odpudivé sily a suspenzia bude v tomto prípade stabilná. Na druhej strane ak sú hodnoty zeta potenciálu častice nízke, nepôsobí medzi nimi dostatočne silná odpudivá sila, ktorá by zabránila časticiam zhlukovať sa a flokulovať. Hranica, ktorá je medzi stabilnými a nestabilnými suspenziami je interval 30 mV do -30 mV [14].

Jeden z najdôležitejších faktorov, ktoré ovplyvňujú zeta potenciál, je hodnota pH. Bez uvedenia pH je hodnota zeta potenciálu len obyčajné číslo, ktoré nedáva absolútne žiaden zmysel. Ak sú v suspenzii častice so záporným zeta potenciálom a pridáme viac zásady, budú mať častice sklon k tomu, aby nadobudli záporný náboj. Následne tejto suspenzii dodáme kyselinu, dosiahneme to, že sa záporný náboj zneutralizuje. V prípade, že by sme pridali viac kyseliny, vytvorí sa kladný náboj. Z tohto dôvodu bude krivka v grafe zeta potenciálu na pH kladná pri malom pH a záporná pri vysokom pH. V bode, kde vynesenie prechádza zeta potenciálom rovnajúcemu sa nule, sa nachádza izoelektrický bod. V tomto bode je za normálnych podmienok koloidný systém najnestabilnejší [14].



Obrázok 1: Znáznornenie častice so záporným povrchovým nábojom. Prevzaté a upravené z [15].

2.6.3 Analytická centrifugácia

Táto metóda je nástroj na kontrolu kvality a charakterizáciu disperzií. V oblasti nanomateriálov má zásadný význam charakterizácia rozptýleného stavu emulzie alebo suspenzie. Príčinou nestability koloidu emulzie je separácia fáz podľa ich hmotností, respektíve usadzovanie alebo sedimentácia. Ide o dej, v ktorom pôsobením hmotnostnej sily vyvolanej gravitáciou, dochádza k rozdeleniu dispergovaných častíc a disperzného prostredia. Smer, ktorým sa budú častice pohybovať, závisí od hustoty daných častíc. Ak je ich hustota väčšia ako hustota disperzného prostredia, tak pôsobením gravitácie klesajú ku dnu. Ak je ich hustota naopak menšia, tak idú práve opačným smerom. Stokesov vzťah vyjadruje rýchlosť pohybu častíc pri pomalom usadzovaní malých častíc. Vzhľadom k tomu, že táto metóda prebieha v gravitačnom poli dosť pomaly, je potrebné nahradiť gravitačnú silu silou odstredivou. Následne sa dá extrapoláciou závislosti usadzovania na odstredivom zrýchlení približne určiť rýchlosť separácie fáz v normálnom gravitačnom poli. Ak predpokladáme

lineárnu závislosť, tak k tomuto odhadu stačí pridať len hodnotu rýchlosti sedimentácie pri pôsobení nami zvolenej odstredivej sily.

Z tohto dôvodu sa na meranie sedimentačnej stability využívajú centrifúgy, ktoré umožňujú fotometrické sledovanie zmien koncentrácie dispergovaných látok vo vzorke vplyvom pôsobenia odstredivej sily. Vzorky umiestňujeme do kyviek, v ktorých je pomocou NIR žiarenia sledovaný profil transmitancie. Zvýšenie a zníženie transmitancie sa prejavuje buď vyčírením vzorky alebo tvorbou sedimentu.

Z nameraných sedimentačných dát sa dá následne odhadnúť veľkosť a tvar častíc, distribúcia samostatných typov častíc a taktiež rovnovážnosť systému spolu s určením rovnovážnych konštánt [14].

2.7 Toxicita nanočastíc

Množstvo otázok na tému o nebezpečenstve a toxicite nanomateriálov narastá s čoraz väčším počtom využitia a aplikácií týchto technológií. Pri posudzovaní týchto vlastností je nevyhnutné vziať do úvahy charakter daného materiálu ako je veľkosť, povrch, tvar, náboj, disperziu častíc, možnosť aglomerácie, agregácie a samozrejme koncentráciu. Taktiež je dôležité vedieť, aký ma daný nanomateriál charakter a taktiež množstvo prímiesí a nečistôt, ktoré sú v ňom obsiahnuté. V neposlednej rade je potrebné vziať do úvahy aj abiotické faktory medzi ktoré patria napríklad náboj iónov, hodnota pH, tvrdosť vody a charakter organických zlúčenín, ktoré pôsobia na stupeň agregácie. Od bežných častíc sa nanočastice líšia svojím veľkým špecifickým povrchom a vysokou reaktivitou, čo môže prispieť aj k zvýšeniu ich toxicity a biologickej dostupnosti. Dôležité vlastnosti sú agregácia a aglomerácia, ktoré prispievajú k zväčšovaniu častíc v systéme a tým aj ku zmenám toxicity [16].

2.7.1 Cytotoxicita nanočastíc

Prítomnosť nanočastíc v komerčne dostupných produktoch sa stáva čoraz bežnejšou praxou. Človek môže byť vystavený nanočasticiam dvoma spôsobmi, a to buď v potravinách alebo pri aplikácii nanočastíc ako nosiče liečiv, biosenzory atď. V biomedicíne, hlavne pri in vivo aplikáciách, je toxicita kritickým faktorom pri ich obrovskom potenciáli. Vzhľadom k tomu, že nanočastice sú cielene navrhnuté na interakciu s bunkami, je dôležité, aby tieto vylepšenia nespôsobovali akékoľvek vedľajšie účinky. Dôležitejšie však je, či tieto nanočastice či už čisté alebo enkapsulované v ďalšej látke podliehajú biodegradácii v bunkovom prostredí a aká je bunková reakcia na degradované nanočastice [16].

Zatiaľ čo na výskum aplikácii nanočastíc in vitro sú potrebné menej prísne toxikologické pravidlá, testovanie in vivo vyžaduje oveľa hlbšie a presnejšie vedomosti o kinetike a toxicite nanočastíc. Existuje veľa štúdií o cytotoxicite nanočastíc, za použitia rôznych bunčných línií, inkubačných dôb atď.. Problém je v tom, že sa používali rôzne koncentrácie nanočastíc, bunky boli kultivované v rôznych podmienkach a boli vystavené nanočasticiam rôzne dlhý čas, a kvôli tomu je ťažké určiť, či sú tieto výsledky fyziologicky relevantné, a taktiež sa nedajú porovnávať dva odlišné výskumy [16].

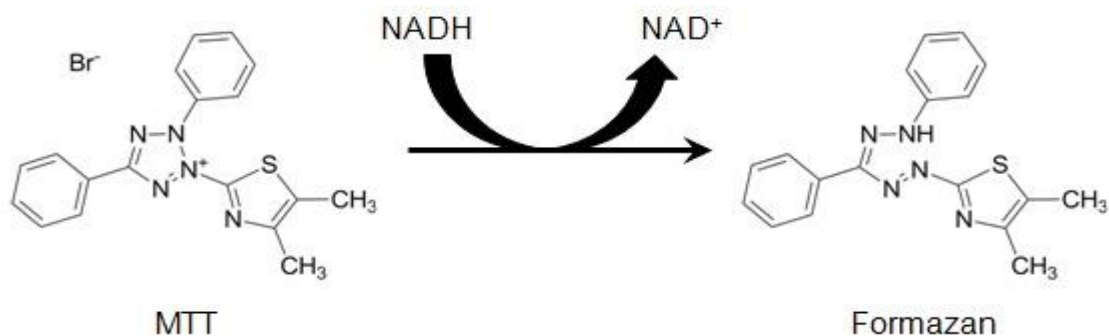
Prvým krokom k pochopeniu ako bude látka alebo materiál reagovať v tele, často zahŕňa štúdiu bunkových kultúr. V porovnaní s pokusmi na zvieratách je testovanie na bunkách menej eticky problematické, jednoduchšie kontrolovateľné a opakovateľné a samozrejme lacnejšie. V prípade cytotoxicity je dôležité uvedomiť si, že bunkové kultúry sú citlivé na zmeny prostredia, v ktorom sa nachádzajú, ako napríklad zmeny teploty, pH, koncentrácia živín a odpadov a taktiež aj na koncentrácie potenciálne toxických látok, ktoré sa testujú. Práve preto je kontrolovanie experimentálnych podmienok nevyhnutelné, aby namerané množstvo mŕtvych buniek korešpondovalo s toxicitou pridaných nanočastíc a nie s nestabilnými kultivačnými podmienkami [16].

Jeden z jednoduchších cytotoxických testov zahŕňa vizuálnu kontrolu buniek v mikroskope, či nastávajú zmeny v bunkovej alebo nukleárnej morfológii. Každopádne hlavné cytotoxické testy využívané v rôznych výskumoch skúmajú množstvo mŕtvych buniek pomocou kolorimetrickej metódy. Tie sa môžu ďalej kategorizovať do ďalších testov, ktoré sa zameriavajú na integritu cytoplazmatickej membrány alebo na aktivitu mitochondrií. Vystavenie buniek určitým cytotoxickým látkam môže narušiť bunkovú membránu, čo zapríčini únik bunkového obsahu. Testy životaschopnosti zahŕňajú testy s toluénovou červenou a traptánovou modrou. Toluénová červená je slabé kationové farbivo, ktoré difúziou prechádza membránou a akumuluje sa v lyzozómoch vo vnútri bunky. Ak je poškodená bunková membrána, tak je príjem farbiva znížený a môže unikáť von, čo umožňuje určiť rozdiel medzi živými a mŕtvymi bunkami. Cytotoxicita môže byť kvantifikovaná spektrofotometrickým stanovením farbiva pri rôznych podmienkach vystavenia. Na podobnom princípe funguje farbivo trypanová modrá. Toto farbivo dokáže preniknúť do bunky len v prípade, že je mŕtva a jej membrána je ťažko poškodená. Takže všetky mŕtve bunky sú zafarbené na modro, zatiaľ čo živé zostávajú bezfarebné. Množstvo mŕtvych buniek sa stanovuje mikroskopicky [16],[17].

2.7.2 MTT test

Okrem rozlíšenia medzi živými a mŕtvymi bunkami detekciou poškodených plazmatických membrán, iné kolorimetrické cytotoxické testy sa pokúšajú určiť mechanizmus za indukovanej smrti buniek. Mitochondriálna aktivita môže byť testovaná za použitia tetrazoliových solí, pretože mitochondriálne dehydrogenázy (napr. sukcinátdehydrogenáza) štiepia tetrazoliový kruh. Tieto enzýmy sa nachádzajú iba v aktívnych mitochondriách a práve preto prebieha reakcia iba v živých bunkách [16],[17].

Na toto stanovenie sa najviac využíva metóda MTT test životaschopnosti, kde sa využíva slabo žltý PBS roztok 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromidu, ktorý produkuje tmavo modrý formazán vo vnútri živých buniek. Dajú sa taktiež využiť aj iné látky, ako napríklad 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium alebo fenazín ethosulfát. Množstvo živých buniek sa následne určuje podobne za použitia spektrofotometrického stanovenia formazánu meraním absorbancie pri vlnovej dĺžke okolo 490 nm [16],[17].



Obrázok 2: Štruktúra žltého MTT a fialového produktu formázanu. Dostupné z[18]

2.7.3. LDH test

LDH test je založený na meraní aktivity laktátovej dehydrogenázy v extracelulárnom médiu. Spoľahlivosť, rýchlosť a jednoduché vyhodnotenie je pár charakteristík tohto testu. Strata intracelulárnej LDH a jej uvoľnenie do kultivačného média je indikátor ireverzibilnej smrti bunky kvôli poškodenej cytoplazmatickej membráne [17].

2.8 Fytotoxicita nanomateriálov

Momentálne nie je presne objasnené, aký je mechanizmus toxicity nanočastíc, avšak predpokladá sa, že súvisí s ich chemickou štruktúrou, zložením, povrchom a veľkosťou častíc. Toxicita môže byť vyvolaná uvoľňovaním toxických iónov (chemická cesta) ako aj stresom, ktorý je spôsobený účinkami samotných nanočastíc. Nanočastice nereagujú nevyhnutne len s abiotickým prostredím, ale interagujú aj s biotickým prostredím. Vzhľadom na to, že rastliny sú základom každého ekosystému, je dôležité pozrieť sa aj na interakciu nanočastíc s vegetáciou. Tieto interakcie sú schopné výrazne ovplyvniť transport ako aj následný „osud“ týchto nanočastíc v prostredí. Rastliny reagujú veľmi prudko na prítomnosť akýchkoľvek kontaminantov a teda samozrejme aj nanočastíc. Jedným z najväčších faktorov, či sa nanočastica dostane cez bunkovú stenu a cytoplazmatickú membránu rastliny alebo nie, je jej veľkosť. Bunková stena obsahuje väčšinou makropóry o veľkosti 3,5 až 5 nm a mikropóry s veľkosťou pod 0,5 nm. Z toho vyplýva že väčšie častice sa do bunky nedostanú. Vplyv samotných častíc závisí od toho, ako efektívne sa transportujú a akumulujú v rastlinných pletivách a organelách buniek [1].

Experimenty nám ukazujú, že samotná toxicita, ktorú vyvolávajú nanočastice, nie je len výsledkom ich reakcie s rastlinami, ale aj vplyvom iónov, ktoré sa z nanočastíc uvoľňujú [1].

2.9 Kultivácia živých buniek

Bunkové kultúry v súčasnosti predstavujú jedny z najpoužívanejších biologických modelov, ktoré sa využívajú vo výskume ale aj v praktických aplikáciách. Ide o kultiváciu buniek (živočíšnych aj rastlinných) in vitro v laboratóriu. Bunkové kultúry sa začali využívať začiatkom 20. storočia prácami Gottleiba Haberlandta (rastliny) a Alexisa Carrela (živočích)

a následne sa v rôznych formách stali dôležitou súčasťou biologických, biochemických a biomedicínskych experimentov [19].

Bunkové kultúry majú v porovnaní s inými experimentálnymi objektmi množstvo výhod ako napríklad: sú veľmi dobre definované, jednoduchšie ovplyvňovanie funkcie cieľových buniek, možná práca len s jedným typom buniek a taktiež sa dá jednoduchšie kontrolovať reakcia a odpoveď bunky na vonkajšie vplyvy ako napríklad toxíny, liečivá a pod. Produktom bunkových kultúr sú klony, ktoré majú všetky rovnaký genotyp. Využitie bunkových kultúr je pri niektorých aplikáciách výhodnejšie ako testovanie in vivo metódami, v rámci ktorých je obtiažnejšie dosiahnuť a získať podrobné informácie (napr. jednotlivé štádia bunkových procesov). Ďalšou výhodou je možnosť uskladniť nakultivované živé bunky v tekutom dusíku na dlhší čas. Aby sa počas zmrazovania nepoškodili bunky, tak sa pridávajú kryokonzervačné látky a zmrazovanie sa uskutočňuje vhodným postupom a samozrejme vhodnou rýchlosťou. Ďalšou výhodou je pri živočíšnych bunkových kultúrach oproti in vivo pokusom s celým živočíchom to, že nemusíme brať do úvahy etiku experimentu (bolesť a usmrtenie) [19].

Použitie bunkových kultúr má však aj svoje obmedzenia, nedá sa napríklad pri nich sledovať procesy v organizme. V rámci tejto metódy sú bunky kultivované bez vplyvu okolia, ktoré je typické pre danú bunku a taktiež pri nefyziologických podmienkach. Z tohto dôvodu počas kultivácie bunky občas zmenia fenotyp alebo dediferencujú. Ďalším problémom je fakt, že pri interpretácii výsledkov si nemôžeme byť na absolútne istí, či je tkanivo, ktoré bolo kultivované v iných podmienkach, zhodné ako v organizme. Konkrétne kultiváciou živočíšneho tkaniva v médiu sa dostane bunkám oveľa viac výživy a iný bude aj samotný metabolizmus v porovnaní so situáciou in vivo pri klasickom krvnom zásobení. A preto využitie bunkových kultúr má svoje výhody aj nevýhody. Či túto metódu využijeme alebo nie záleží na tom, či je vhodná na získanie optimálneho výsledku [19].

Pre úspešnú kultiváciu buniek potrebujeme dodávať presne definované množstvo energie a zdrojov pre metabolizmus. Nevyhnutná je aj absolútna sterilita prostredia, aby sa zabránilo kontaminácii, a taktiež vytvorenie podmienok podobných stavu in vivo. Základom procesu je izolácia konkrétneho typu živočíšnych alebo ľudských buniek, čo je tzv. primárna kultúra. Existujú viaceré techniky na izoláciu, ktoré sú založené buď na enzymatickom alebo mechanickom rozrušení tkaniva. Ďalším spôsobom je odber buniek z telových tekutín. Samotná kultivácia sa uskutočňuje v kultivačnom médiu pri špecifickej vlhkosti a teplote. Kultivačné podmienky by sa čo najviac mali podobať fyziologickým podmienkam in vivo, ktoré zabezpečuje technické vybavenie laboratória a kultivačné média. Tie sú zložené z vyvážených zmesí viacerých látok ako napríklad vitamíny, soli, cukry, aminokyseliny, lipidy, stopové prvky, stabilizátory pH, kofaktory atď.. Ďalšiu dôležitú funkciu majú rastové faktory [19],[20].

Množstvo buniek sa počas procesu exponenciálne zvyšuje až do momentu, keď sa začnú tesne dotýkať. Pomocou svetelného mikroskopu je v určitom čase možné posúdiť stav bunkovej kultúry. Výsledkom je buď počet buniek na 1 ml média alebo v cm^2 povrchu. Kvôli kontaktnej inhibícii sa delenie a rast buniek pomaly zastavuje. Nakoniec väčšina kultúr tvorí na povrchu nádoby vrstvu s hrúbkou jednej bunky – nazývaná monovrstva alebo

„monolayer“ [19],[20]. Nakultivované bunky majú obvykle veľmi obmedzenú životnosť – po niekoľkých pasážovaniach starnú a ďalšie delenie sa úplne zastaví [20].

Nesmrtelné tzv. immortalizované bunky neumierajú ani po viacerých pasážovaniach. Takáto línia môže byť napríklad HaCat [20].

2.9.1 HaCat bunečná línia

HaCat bunky sú immortalizované ľudské keratinocyty a sú využívané na skúmanie epidermálnej homeostázy a jej patofyziológie. Bunky sa využívajú pre ich vysokú kapacitu na diferenciáciu a proliferáciu in vitro [21].

3. Ciele práce

Táto práca je zameraná na optimalizáciu prípravy nanočastíc a nanovláken na báze PHA a ich následnú analýzu. U pripravených nanomateriálov bola sledovaná ich interakcia s kožnými bunkami a ich prípadná toxicita.

V rámci práce budú riešené nasledujúce čiastkové úlohy:

1. literárna rešerš - príprava nanomateriálov na báze PHA, bunkové kultúry
2. optimalizácia metód príprav nanočastíc a nanovláken s obsahom PHA
3. analýza štruktúry a charakterizácia pripravených materiálov
4. optimalizácia kultivácie kultúry ľudských keratínocytov
5. štúdium interakcie častíc a vláken na báze PHA s humánnymi bunkami

4. Experimentálna časť

4.1 Použité chemikálie

- Antibiotic-Antomycotic 100X (Biosera), Biotech (SRN)
- Dodecylsírán sodný – Serva (SRN)
- Ethanol pro UV-spektroskopiu – LachNer (ČR)
- FBS fetálne bovinné sérum – HyClone (USA)
- Cholesterol – zmes hydroxy-5-cholestenu a cholesten-3 β -olu – Serva (SRN)
- L- α -Phosphatidylcholine – Sigma - Aldrich (SRN)
- Médium DME/High Glucose (1X) – Utah, (USA)
- MTT (methyl-thiazolyl-tetrazolium) – Duchefa Biochemie (NL)
- PHB Lot 720 – Biomer (SRN)
- PHB Hydal 7–12/4, FCH VUT v Brně (ČR)
- Trypsin - Versene EDTA – P-Lab (ČR)
- Tetraethylamonium bromid – Aldrich (SRN)
- Komerčný kit SOS–CHROMOTEST™, EBPI (CAN)
- Dihydrogénfosforečnan draselný p.a., Vitrum–LachNer (ČR)
- Chlorid sodný p.a., Vitrum–LachNer (ČR)

4.2 Použité prístroje

- Analytické váhy (AND HR-120)
- CellCulture CO2 Inkubátor, ESCO (SRN)
- Centrifúga – U-32-R, Boeco (SRN)
- ELISA Reader Bio Tek ELx808 (USA)
- IMPLEN Nanophotometer UV-VIS (SRN)
- Inverzný biologický mikroskop I-101 L-Scientific, Laboserv (ČR)
- Laminárny box Aura mini, Bioair
- Magnetická miešačka: Lavat (ČR)
- Mikrocentrifuga – Mikro 200, Hettich Zentrifugen (SRN)

Mikroskop – Intraco Micro (ČR)

Optický mikroskop a software DinoCapture – Intraco Micro (ČR)

Zostava pre elektrospining

- NE-1000 Single Syringe Pump, Labicom (ČR)

- Regulovateľný zdroj napitia

Spektrofotometr – Helios γ , Unicam (VB)

Ultrazvuk – PS 02000 Ultrasonic Compact Cleaner 1,25L, PowerSonic (SR)

Ultrazvukový homogenizátor/dispergátor – Sonopuls, Bandelin (SRN)

Vákuová odparka – HB4 Basic, HBA Labortechnik (SRN)

Vortex – Genius 3, IKA Vortex (SRN)

ZetaSizer Nano ZS – Malvern (GB)

4.3 Použité organizmy

HaCaT (CLS order no. 300493); Human keratinocytes cell line, permanent cell line; adult; firma CLS Cell Lines Service GmbH

4.4 Optimalizácia prípravy PHB nanočastíc

Ako prvá sa uskutočnila optimalizácia prípravy PHB nanočastíc pri rôznych koncentráciách a odlišných teplotách. Pracovalo sa s 3% a 4% roztokom PHA, konkrétne s PHB spoločnosti Biomér a PHB Hydal (Nafigate, a.s.). Tieto roztoky sa vytvorili rozpustením 3 g alebo 4 g PHA v 100 ml chloroformu za intenzívneho miešania na magnetickej miešačke po dobu približne 30 min, a to buď pri 60 °C alebo 75 °C. Následne sa pridala destilovaná voda a takto pripravený roztok sa vložil do ultrazvuku, kde sa pomocou sonifikácie vytvorili nanočastice. Roztok bol následne opäť miešaný na magnetickej miešačke s ohrevom až do momentu, kedy sa z neho vyparil všetok chloroform. Týmto spôsobom sme teda pripravili sériu analytov: 3% alebo 4% PHB a to buď Biomér alebo Hydal, z každého 2 krát po 3 vzorky. Veľkosť a zeta potenciál sa následne merali na Zetasizer Nano ZS – Malvern pre vzorky bez úpravy a po prefiltrovaní cez filter s veľkosťou pórov 400 nm.

4.5 Enkapsulácia PHB nanočastíc s cholesterolom

Najlepšiu veľkosť a stabilitu mali vzorky 3%-ný a 4%-ný PHB Hydal, ktoré sa pre ešte presnejší výsledok enkapsulovali s čistým cholesterolom, ktorý stabilizoval polydisperzitu rovnako ako aj zeta potenciál. Postup práce je identický ako pri optimalizácii prípravy (kap. 4.4). Výsledky ukázali veľký rozdiel vo veľkosti aj v stabilite oproti vzorkám, ktoré sa pripravili pri optimalizácii. Častice mali veľkosť okolo 250 nm a keďže nedošlo k agregácii, stabilita bola tiež veľmi uspokojivá. Najstabilnejšia vzorka s optimálnou veľkosťou častíc aj polydisperzitou bola vzorka so 4% PHB Hydal, ktorá sa v tejto práci už naďalej využívala.

4.6 Príprava koncentračnej rady – kombinované lipozómové častice

Koncentračná rada sa pripravovala z 4% PHB Hydal, pričom pripravované koncentrácie boli 0; 10; 20; 30; 50; 70 a 100% . Tieto roztoky sa pripravovali podľa Tabuľky 1, pričom 1 ml roztoku lecitínu pozostával z 90 mg lecitínu a 1 ml chloroformu. Roztok cholesterolu a chloroformu bol pripravený podľa mierky 10 mg cholesterolu na 100 μ l chloroformu.

Tabuľka 1: Príprava koncentračnej rady PHB Hydal nanočastíc s lecitínom, cholesterolom a vodou

Koncentrácia [%]	Množstvo roztoku PHB Hydal [ml]	Množstvo roztoku lecitínu [ml]	Množstvo roztoku cholesterolu [ml]	Množstvo destilovanej vody [ml]
0	0	1	100 μ l	10
10	0,225	0,9	100 μ l	10
20	0,450	0,8	100 μ l	10
30	0,675	0,7	100 μ l	10
50	1,125	0,5	100 μ l	10
70	1,575	0,3	100 μ l	10
100	2,25	0	100 μ l	10

Vzorky boli pripravené sonifikáciou pomocou tyčového ultrazvuku po dobu 6–10 sekúnd a súčasne boli chladené vodou. Následne boli kadičky so vzorkou prenesené na magnetickú miešačku, kde sa miešali a zahrievali približne na 40°C až do odparenia zvyškového chloroformu.

4.7 Stanovenie veľkosti častíc pomocou DLS a stability pomocou zeta-potenciálu

Vzorky z koncentračnej rady pripravenej pomocou ultrazvuku sa 100 krát zriedili destilovanou vodou a následne sa zmerala ich veľkosť a koloidná stabilita pomocou prístroja ZetaSizer Nano ZS. Následne prebehol celý tento experiment ešte raz, pričom sa pripravila nová koncentračná rada a meranie veľkosti a stability prebehlo v deň prípravy vzoriek, po jednom a po štyroch mesiacoch uchovávaní.

4.8 Stanovenie koncentrácie fosfolipidov v lipozómoch

V prvom rade sa pripravilo činidlo rozpustením 2,7 g hexyhydrátu chloridu železitého spolu s 3,05 g tiokyanatanu amónneho v 100 ml destilovanej vody. Následne sa do centrifugačných skúmaviek napipetovali 3 ml chloroformu, 2 ml činidla, 450 μ l a 50 μ l vzorky. Nasledovalo premiešanie na vortexe (približne 20 s každá vzorka), potom boli vzorky centrifugované 5 min na 1 000 ot/min. Na koniec sa merala absorbancia vzoriek na spektrofotometri pri $\lambda = 450$ nm, pričom ako blank sa použil chloroform. Následne sa vypočítal obsah fosfolipidov v každej vzorke podľa kalibračnej krivky pre sójový lecitín.

4.9 MTT test pre stanovenie cytotoxicity

Na meranie cytotoxicity, ktoré prebiehalo na ľudských keratinocytoch (lína HaCaT) sa využili všetky pripravene vzorky z koncentračnej rady 0; 10; 20; 30; 50; 70; 100% PHB v koncentračnom rozmedzí 2–14 % prídavku roztoku častíc a pri niektorých vzorkách 0,1;

0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 4% . Bunky sa najskôr kultivovali na 96 jamkových doštičkách, v ktorých hustota buniek sa pohybovala okolo $3\text{--}4 \cdot 10^5$ na ml, pričom do každej jamky bolo napipetovaných 100 μl bunkovej kultúry, ktorá bola následne 24 hod v kultivačnom médiu kvôli rastu. Testované vzorky sa najprv zriedili, následne centrifugovali 5 min na 6000 ot/min, následne bola vzniknutý sediment rozsuspendovaný v sterilnej destilovanej vode, nasledovala ďalšia centrifugácia 11 000 ot/min na 1 hodinu. Takto centrifugované vzorky sa už buď používali na testovanie, alebo sa ďalej nariedili na nižšie koncentrácie kultivačným médiom.

Do každej jamky sa potom pridávalo 100 μl pripravenej vzorky, pričom ako kontrola slúžilo používané kultivačné médium („CC – cell control“), a ako pozitívna kontrola sa využíval etanol. Po 24 hodinách sa uskutočnil samotný cytotoxický test. MTT sa rozpustilo na koncentráciu $2,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ v PBS, bolo sterilizované filtráciou a následne sa do každej jamky napipetovalo 20 μl . MTT bolo inkubované s bunkami po dobu 3 hodín. Rozpustnosť formazánových kryštálikov sa urýchlila prídavkom 10% SDS v PBS. Po 24 hodinách sa test vyhodnotil spektrofotometricky pri $\lambda = 543 \text{ nm}$ oproti blanku, ktorým bolo kultivačné médium. Pri poklese absorbancie pod 60 % kontroly je daná vzorka vyhodnotená ako cytotoxická.

4.10 Test pre stanovenie genotoxicity

Stanovenie genotoxicity vybraných vzoriek PHB kombinovaných s lipozómami postupovalo komerčným kitom SOS–chromotest podľa priloženého postupu [22].

5. Výsledky a diskusia

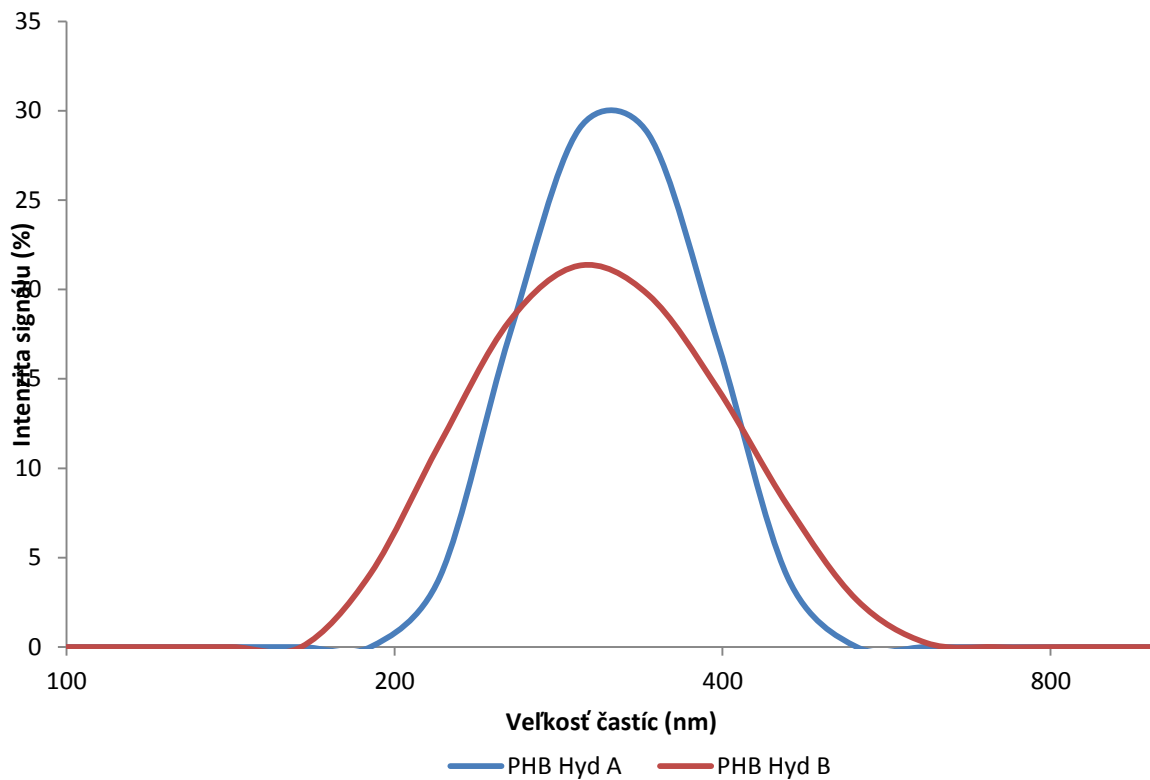
5.1 Charakterizácia pripravených nanočastíc – optimalizácia prípravy

Pre optimalizáciu prípravy častíc boli využité dva zdroje PHB, a to PHB Biomer a PHB Hydal. Pri všetkých študovaných podmienkach bola pri nameraných časticách pomocou dynamického rozptylu svetla zmeraná distribúcia veľkosti častíc a bola stanovená priemerná veľkosť častíc. Následne bol pomocou metódy elektroforetického rozptylu svetla zmeraný zeta potenciál. Jednotlivé merania prebiehali v prostredí destilovanej vody.

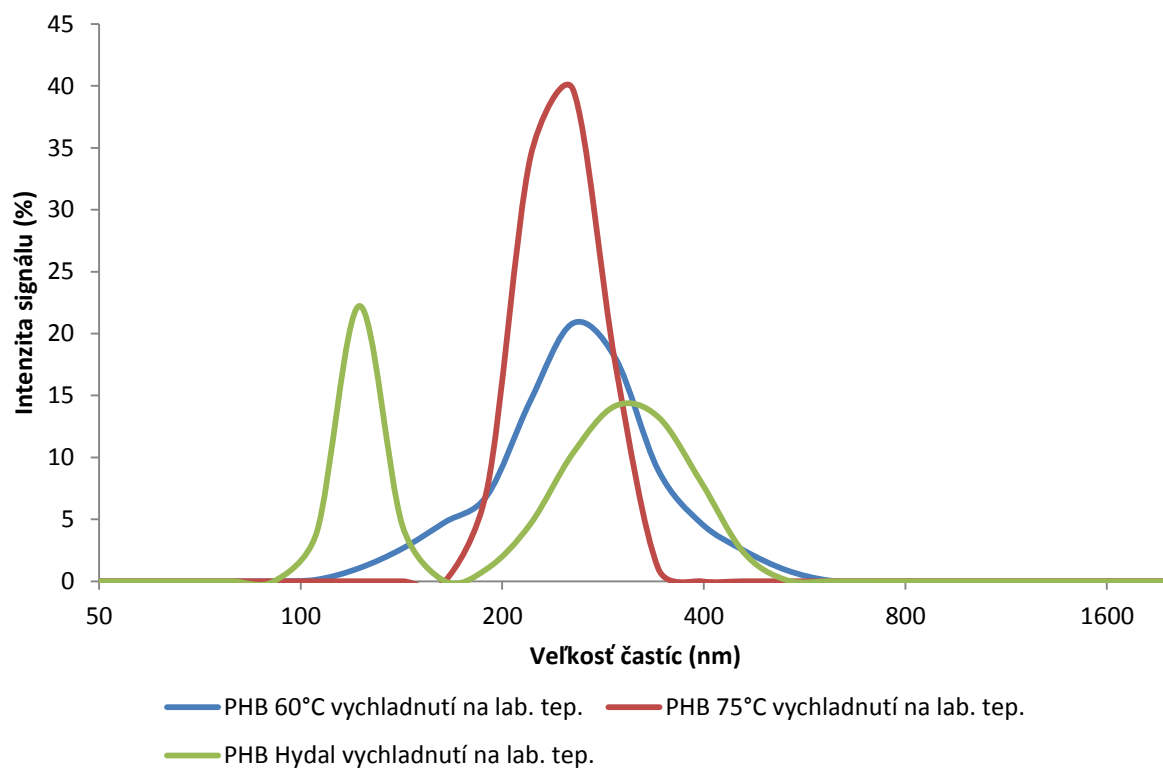
Tabuľka 2: veľkosť, polydisperzita a stabilita nanočastíc

Vzorky PHB Biomer a Hydal	d [nm]	PdI	ZP [mV]
PHB 60°C A	676,9 ± 229,2	0,736 ± 0,19	–
PHB 60°C B 1	4131,3 ± 1868,9	1 ± 0	–
PHB 60°C * 1	2009 ± 268,6	0,995 ± 0,01	-13,6 ± 1,42
PHB 60°C A Prefilt	280,2 ± 97,3	0,615 ± 0,28	0,22 ± 4,14
PHB 60°C B Prefilt	141,7 ± 4,3	0,373 ± 0,03	-17,4 ± 1,04
PHB 75°C A	1074,3 ± 114,6	0,708 ± 0,11	-19,9 ± 1,23
PHB 75°C B	348 ± 4,3	0,144 ± 0,1	
PHB Hyd A	525,5 ± 32,7	0,435 ± 0,03	-29,3 ± 1,79
PHB Hyd B	309 ± 6,92	0,180 ± 0,04	-18,1 ± 2,66
PHB 60°C vychl. na laboratórnu teplotu	1072,2 ± 625,2	0,666 ± 0,24	-19,2 ± 0,87
PHB 75°C vychl. na laboratórnu teplotu	500,6 ± 44,7	0,462 ± 0,04	-24,9 ± 1,24
PHB Hydal vychl.	1752 ± 923,4	0,846 ± 0,11	-12,1 ± 1,51

Z dát v tabuľke 2 vidíme, že veľkosť väčšiny čistých PHB častíc nezodpovedá veľkosti, ktorú sme chceli dosiahnuť a to okolo (250 nm). Spôsobené to bolo polydisperzitou a nízkou stabilitou pripravených roztokov, čo následne spôsobilo agregáciu týchto častíc do väčších zhlukov a stali sa teda nepoužiteľné pre ďalšie meranie. Najlepšia vzorka boli častice PHB pripravené pri 60°C a následne prefiltrované cez nanofilter, avšak opäť kvôli malej hodnote zeta potenciálu veľmi rýchlo agregovali.



Obrázok 3: Porovnanie veľkosti častíc PHB Hydral v dvoch vzorkách – A a B



Obrázok 4: Porovnanie veľkostí častíc PHB biomér a Hydral pripravené pri rôznych teplotách a ponechané vychladnúť na laboratórnu teplotu

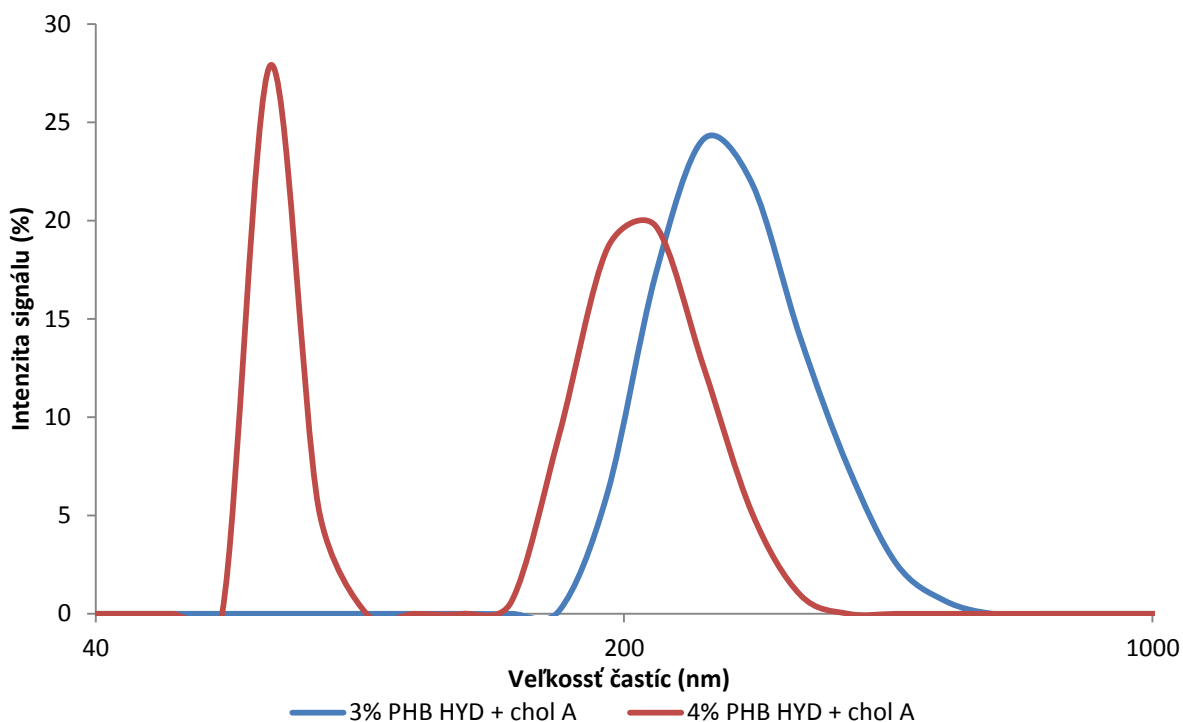
Na obrázkoch 3 a 4 vidíme distribúciu veľkosti pripravených častíc, ktoré sa pohybujú od 130 do 255 nm. Na obrázku 2, na ktorom je zobrazená distribúcia častíc pre vzorky pripravené z PHB Hydal pri teplote zahrievania roztoku 60 °C a 75 °C a po vychladnutí. Z kriviek distribúcie častíc je jasne vidieť, že vzorka PHB 75 °C má najmenšiu distribúciu častíc a je preto z porovnávaných vzoriek pre ďalšiu prácu najvýhodnejšia.

5.2 Charakterizácia PHB Hydal nanočastíc s cholesterolom – pred a po filtrácii

Tabuľka 3: PHB Hydal častice enkapsulované do cholesterolu

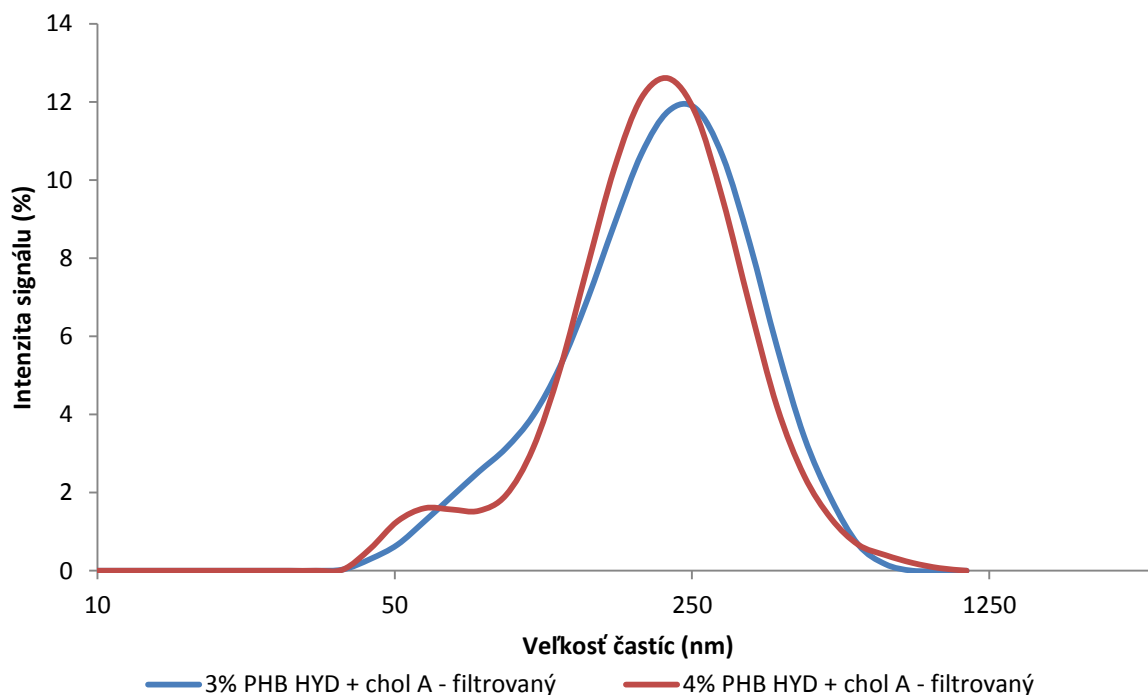
Názov vzorky	d [nm]	PdI	ZP [mV]
3% PHB	690 ± 287,7	0,398 ± 0,326	-33,4 ± 0,94
4% PHB	242,7 ± 8,3	0,212 ± 0,029	-22,5 ± 0,57
3% PHB HYD + Cholesterol	399 ± 82,3	0,408 ± 0,244	-21,5 ± 0,28
4% PHB HYD + Cholesterol	500,5 ± 44,4	0,351 ± 0,089	-22,6 ± 0,98
3% PHB HYD - filtrovaný	4272 ± 519,1	0,529 ± 0,340	-25,4 ± 0,68
4% PHB HYD - filtrovaný	155 ± 8,9	0,259 ± 0,044	-25,8 ± 2
3% PHB HYD + Cholesterol - filtrovaný	232,6 ± 15,2	0,363 ± 0,033	-33,9 ± 1,79
4% PHB HYD + Cholesterol - filtrovaný	220,6 ± 8,9	0,418 ± 0,033	-30,1 ± 0,82

V tabuľke č. 3 už pozorujeme mierne zlepšenie výsledkov, po pridaní roztoku cholesterolu do roztoku PHB častíc. Polydisperzný index spolu so zeta potenciálom narastajú do slabo stabilných hodnôt a veľkosť častíc klesá. Výsledky však stále nie sú ideálne a interval veľkosti častíc sa stále pohybuje od 240 do 4272 nm a zeta potencial je ešte len tesne na hranici stability (-30 mV – +30 mV). Z tejto druhej rady bola vyhodnotená ako najlepšia vzorka 4% PHB Hydal s cholesterolom po filtrácii, s priemernou veľkosťou častíc 220,6 nm, s hodnotou PdI 0,418 a zeta potenciálom -30,1 mV. Táto vzorka bola ďalej používaná pre nasledujúce testy.



Obrázok 5: Veľkosť častíc 3% a 4% PHB Hyd + cholesterol

Na obrázku 5 vidíme priemerné veľkosti častíc 3% a 4% PHB Hyd, pričom častice z 3% roztoku majú veľkosť približne 256 nm a častice 4% PHB Hyd okolo 100 nm. Druhý pík pri 4% časticiach sú pravdepodobne nečistoty vo vzorke, ktoré skresľujú meranie, alebo agregované častice, ktoré vytvorili zrazeninu.



Obrázok 6: Veľkosť častíc 3% a 4% PHB Hyd + cholesterol - prefiltrované vzorky

Na obrázku 6 pozorujeme veľmi malý rozdiel veľkostí častíc. Veľkosť oboch vzoriek sa pohybuje okolo 250 nm.

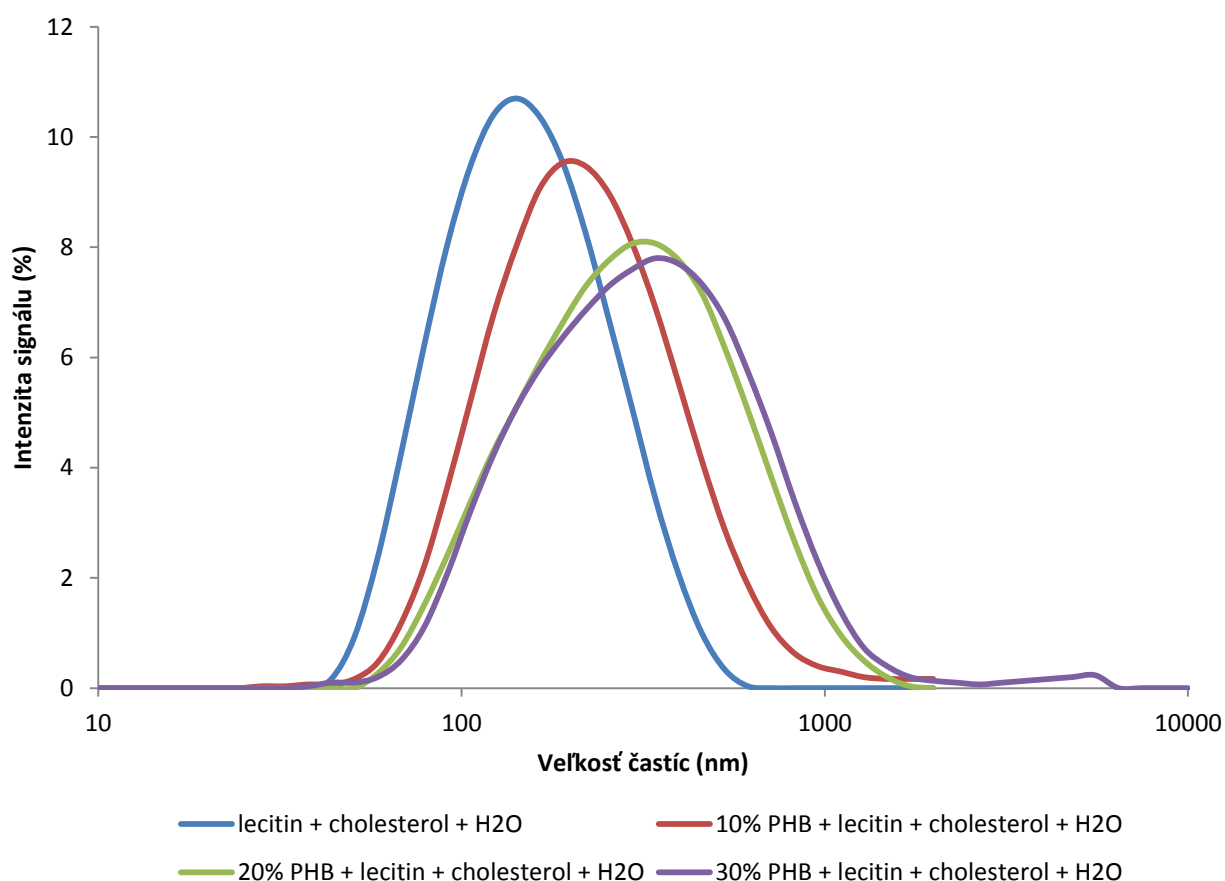
Tabuľka 4: Koncentračná rada PHB enkapsulovaná do lecitínu a cholesterolu

Názov vzorky:	d [nm]	PdI	ZP [mV]	Vzorka:	d [nm]	PdI	ZP [mV]	Názov vzorky:	d [nm]	PdI	ZP [mV]
1. deň				3 mesiace				4. mesiace			
Čisté lipozomy	135,9 ± 1,27	0,207 ± 0,02	-31,3 ± 2,14	Čisté lipozomy	135 ± 1,64	0,198 ± 0,011	-31,9 ± 1,15	Čisté lipozomy	132,7 ± 0,76	0,177 ± 0,01	-24,2 ± 2,67
10% PHB	252,8 ± 3,85	0,365 ± 0,03	-39,6 ± 3,53	10% PHB	194,8 ± 1,71	0,249 ± 0,029	-41,03 ± 4,2	10% PHB	265,8 ± 3,15	0,376 ± 0,06	-35,9 ± 0,95
20% PHB	253,2 ± 1,36	0,263 ± 0,01	-36,9 ± 2,25	20% PHB	263 ± 5,07	0,277 ± 0,015	-44,97 ± 1,6	20% PHB	334,8 ± 6,94	0,433 ± 0,02	-36,1 ± 0,85
30% PHB	159,8 ± 1,64	0,187 ± 0,01	-42,6 ± 0,62	30% PHB	235,7 ± 2,26	0,243 ± 0,013	-46,33 ± 0,5	30% PHB	273,4 ± 2,55	0,231 ± 0,02	-35,3 ± 0,61
50% PHB	336,3 ± 9,96	0,257 ± 0,05	-45,1 ± 0,83	50% PHB	223,9 ± 0,53	0,245 ± 0,011	-37,17 ± 0,7	50% PHB	415,2 ± 5,11	0,437 ± 0,02	-32,6 ± 5,27
70% PHB	245,1 ± 2,45	0,322 ± 0,03	-44,1 ± 0,78	70% PHB	192,7 ± 2,67	0,159 ± 0,011	-37 ± 2,34	70% PHB	357,8 ± 1,13	0,441 ± 0,01	-28,7 ± 4,57
100% PHB	324,1 ± 11,4	0,397 ± 0,05	-25,4 ± 1,53	100% PHB	236,2 ± 0,45	0,272 ± 0,02	-23,7 ± 0,54	100% PHB	334,1 ± 38,1	0,398 ± 0,02	-24,2 ± 0,66

5.2 Charakterizácia koncentračnej rady

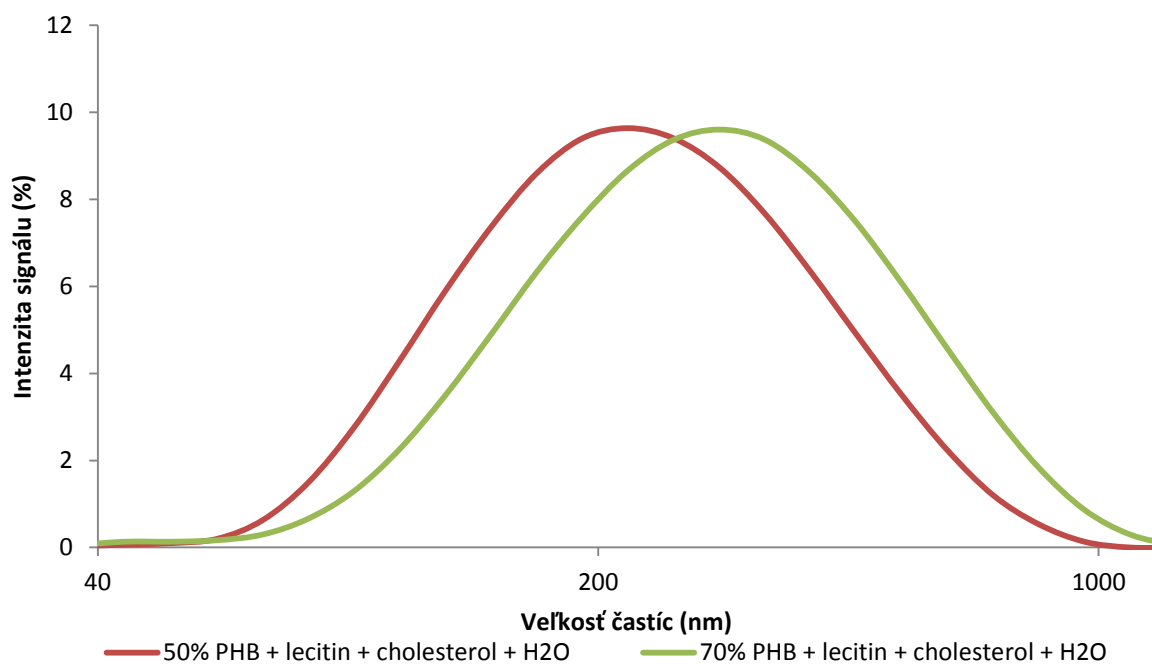
Z dôvodu zvýšenia stability sa PHB častice enkapsulovali do lipozómov. Jednotlivé vzorky boli pripravené v duplikátoch.

V tabuľke 4 vidíme, že po pridaní roztoku lecitínu spolu s cholesterolom sú častice o ideálnej veľkosti od 135 – 260 nm, pričom dané častice sú monodisperzné a ich stabilita sa pohybuje v intervale od -31 mV do -53 mV. Najlepšou vzorkou boli 50% častice aj z hľadiska veľkosti a aj stability. Častice neagregovali a boli stabilné počas celej doby 4 mesiacov. Tabuľka taktiež ukazuje výsledky charakterizácie koncentračnej rady, ktorá bola zameraná po 3 a 4 mesiacoch. Výsledky po 3 mesiacoch sa oproti čerstvo pripraveným vzorkám líšia iba minimálne, avšak po 4 mesiacoch už pozorujeme pokles zeta potenciálu, zvýšenú agregáciu a následný vznik a taktiež aj zväčšenie veľkosti samotných častíc. Tá sa pohybuje v rozmedzí 270 – 420 nm.



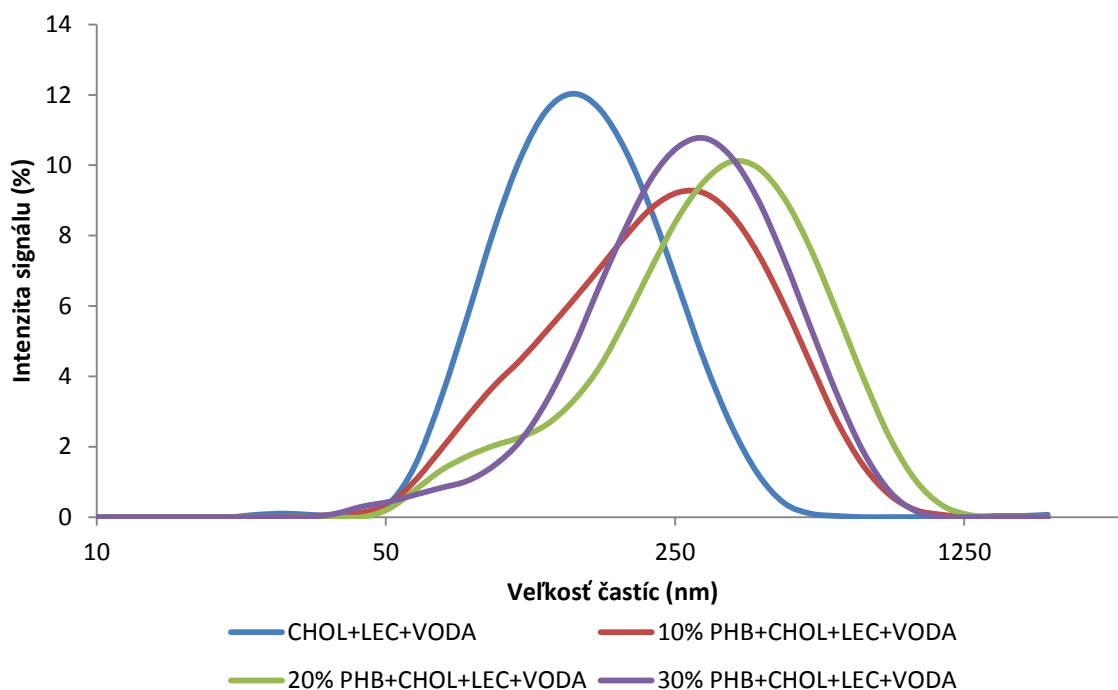
Obrázok 7: Veľkosť častíc koncentračnej rady v lipozómoch

Na obrázku 7 pozorujeme, že so zvyšujúcou sa koncentráciou PHB častíc stúpa veľkosť nanočastíc, avšak ich stabilita sa skoro nemení. Čisté lipozómy bez PHB častíc sú teda najmenšie a 100% roztok PHB obsahuje častice, ktoré už nezodpovedajú požadovanej veľkosti.

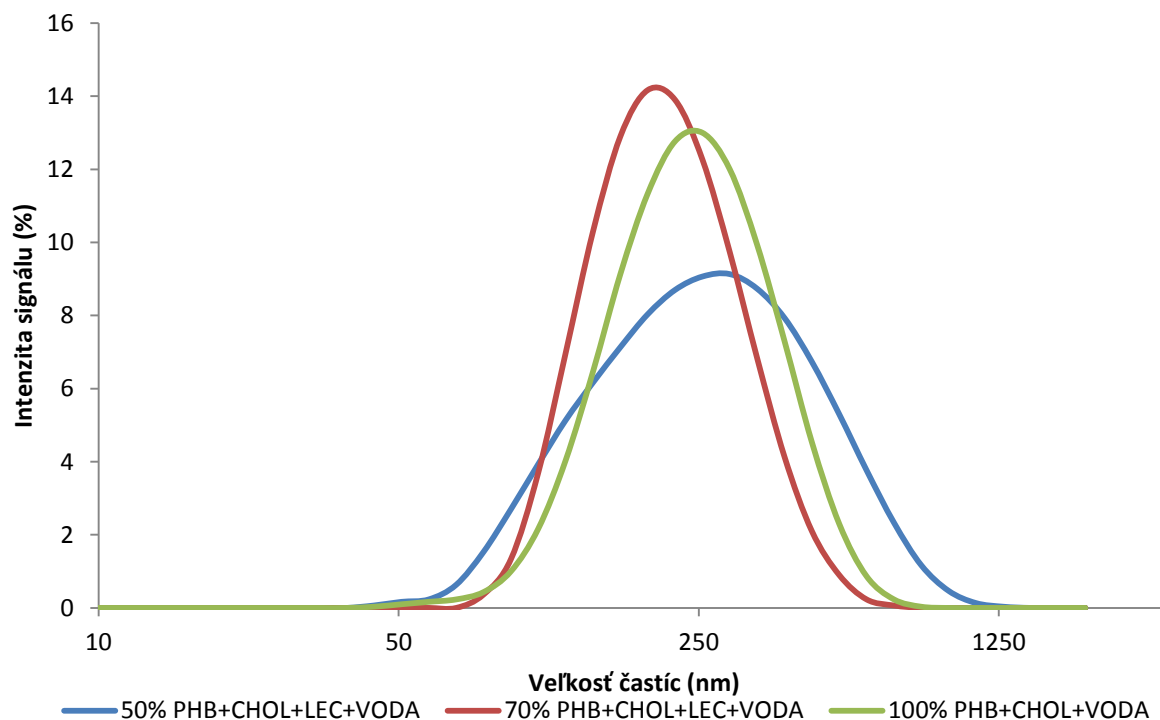


Obrázok 8: Kombinované častice s 50% a 70% prídavkom PHB

Na obrázku 8 pozorujeme trend zväčšovania veľkosti častíc so zvyšujúcim sa podielom PHB.

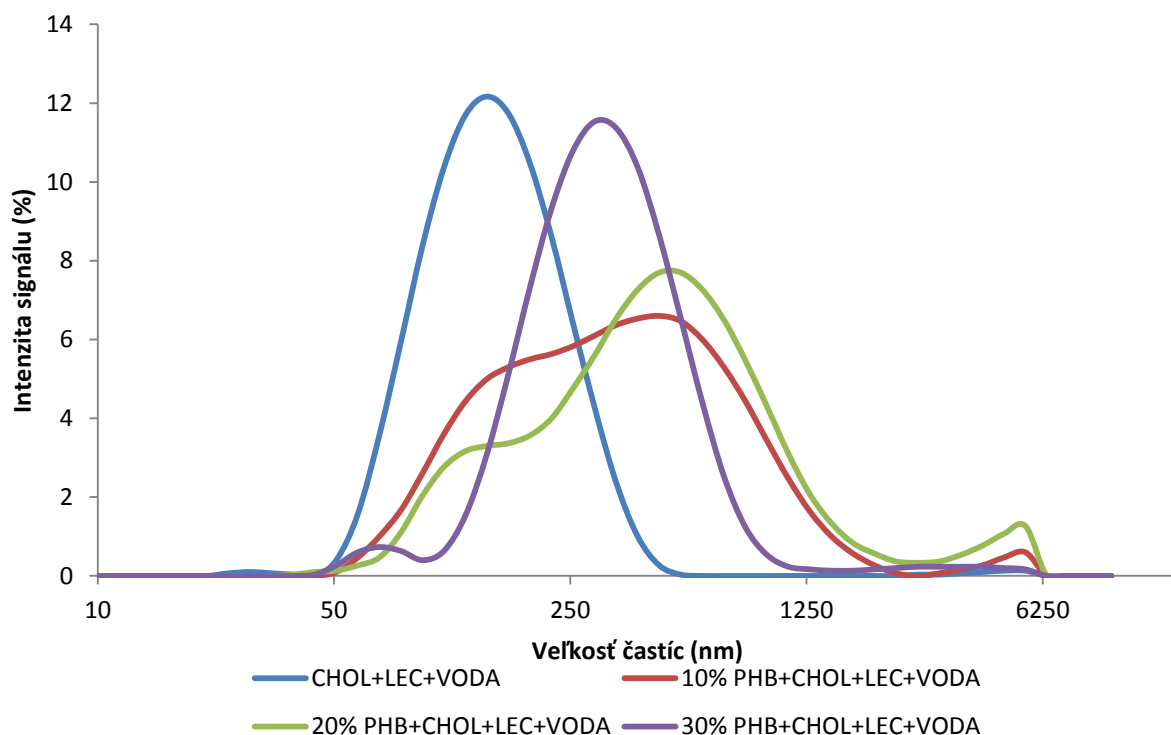


Obrázok 9: Koncentračná rada pri vzorkách lipozómov a kombinovaných častíc s PHB o obsahu 10–30 % po 3 mesiacoch uchovania

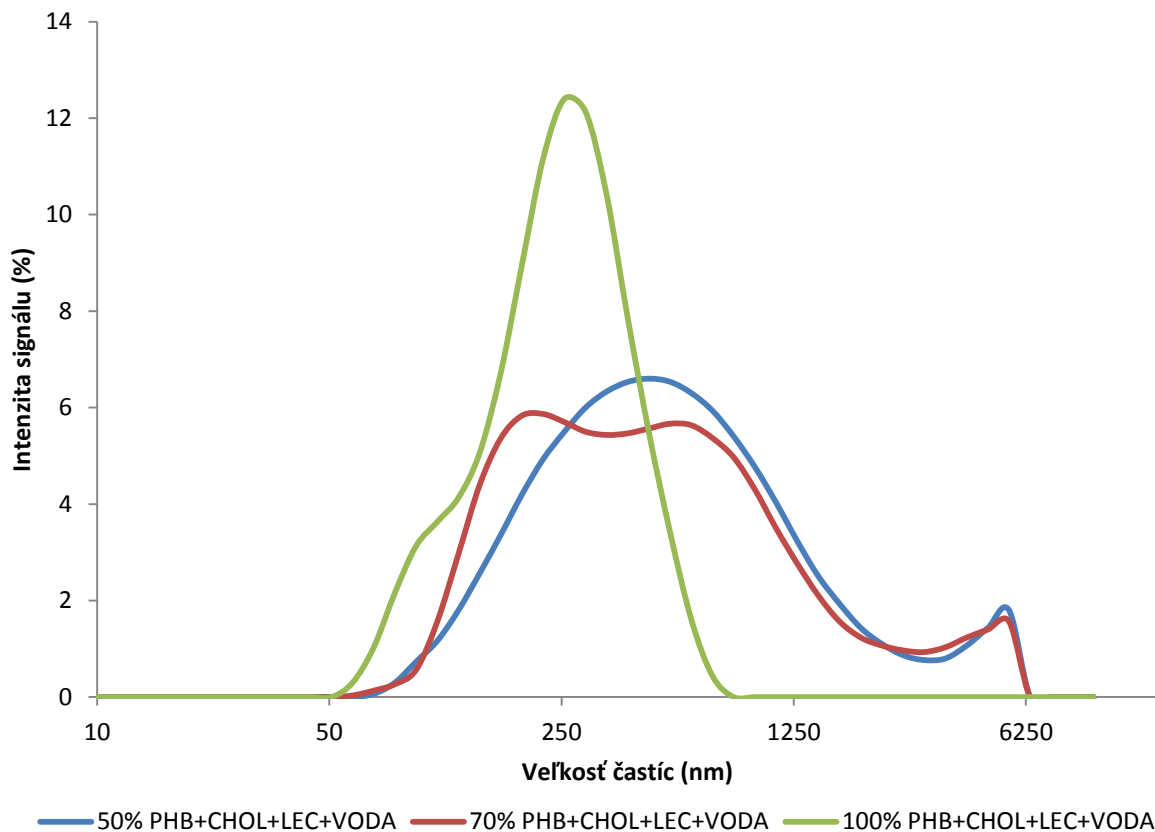


Obrázok 10: Koncentračná rada pri vzorkách lipozómov a kombinovaných častíc s PHB o obsahu 50–100 % po 3 mesiacoch uchovania

Obrázky 9 a 10 ukazujú minimálne zväčšenie častíc oproti meraniu, ktoré sa uskutočnilo pred 3 mesiacmi.



Obrázok 11: Koncentračná rada pri vzorkách lipozómov a kombinovaných častíc s PHB o obsahu 10–30 % po 4 mesiacoch uchovania



Obrázok 12: Koncentračná rada pri vzorkách lipozómov a kombinovaných častíc s PHB o obsahu 50–100 % po 4 mesiacoch uchovania

Po 4 mesiacoch, ako môžeme vidieť na obrázkoch 11 a 12, už pozorujeme agregáciu, zväčšenie veľkosti častíc a teda aj pokles ich stability.

5.4 Meranie cytotoxicity nanočastíc

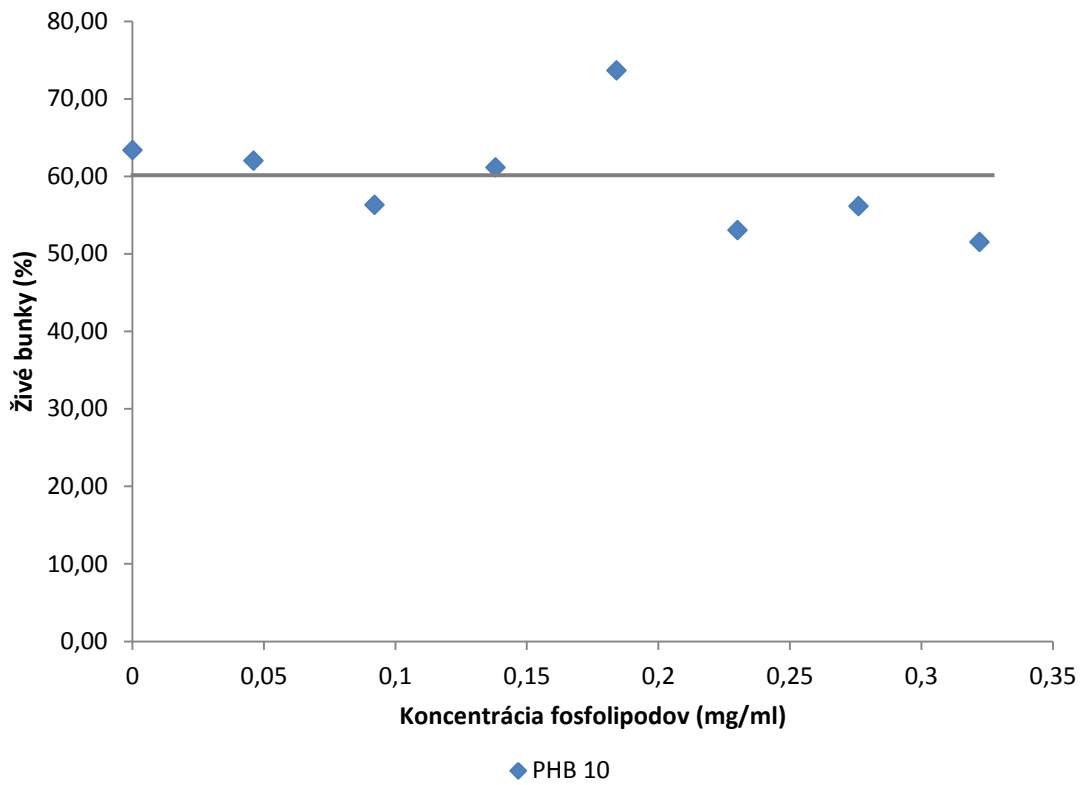
Stanovenie cytotoxicity vybraných vzoriek PHB kombinovaných s lipozómami sa uskutočnilo podľa pracovného postupu popísaného v kapitole 4.9 MTT test pre stanovenie cytotoxicity. V tabuľke č. 6 a 7 sú ukázané presne zloženie testovaných lipozómov – koncentrácia fosfolipidov stanovená pomocou Stewardovej metódy.

V tabuľke 6 vidíme, že vysoké koncentrácie PHB nanočastíc sú pre bunky toxické. Percento živých buniek pri niektorých vzorkách klesá až na 20%. Pre vzorky 10–50 % sa množstvo živých buniek pohybuje v intervale 60–70%. Na obrázkoch 13 a 14 je dokumentovaná závislosť percentuálneho zastúpenia živých buniek na koncentracii zvyškových fosfolipidov v 10% roztoku PHB a v 70% roztoku PHB.

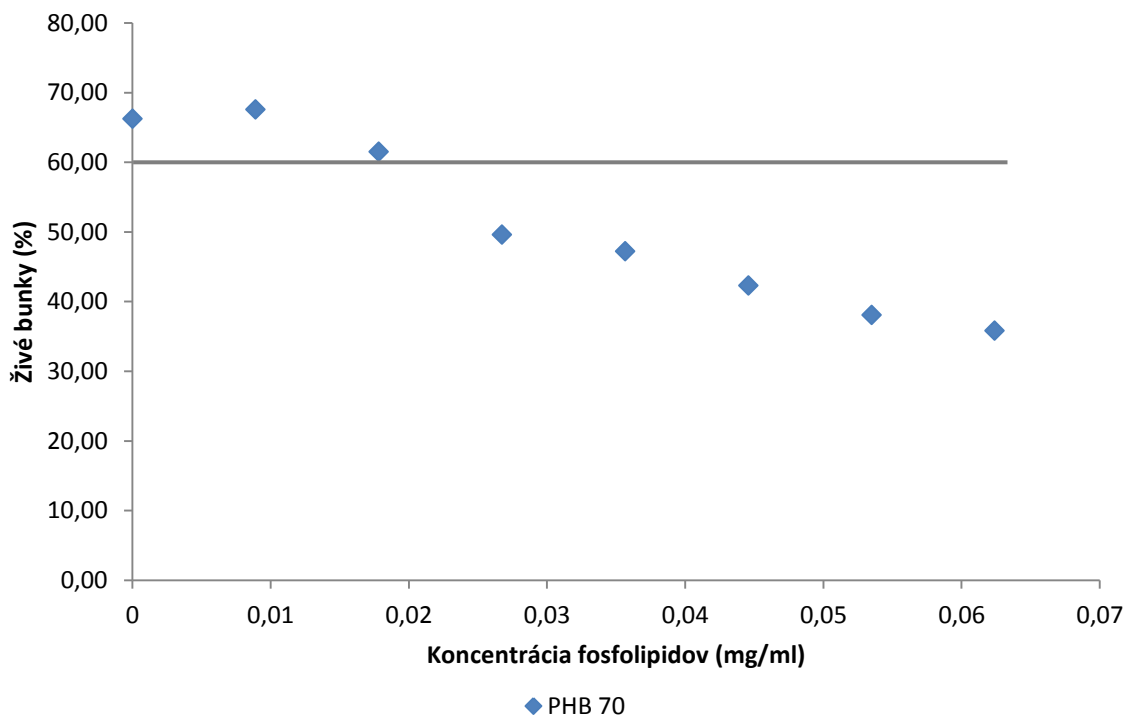
V tabuľke 7 sú výsledky po zopakovaní testu cytotoxicity po znížení koncentrácie pridávaných vzoriek. To zapríčinilo rapídne zvýšenie percentuálneho zastúpenia buniek, ktoré prežili. Toto zastúpenie sa pohybovalo na intervale od 70-95%.

Tabuľka 5: Cytotoxicita koncentračnej rady PHB - 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 14% z pôvodných roztokov

Obsah PHB	c _{vzorky} [%]	Množstvo fosfolipodov [mg/ml]	Viabilita [%]	Obsah PHB	c _{vzorky} [%]	Množstvo fosfolipodov [mg/ml]	Viabilita [%]	Obsah PHB	c _{vzorky} [%]	Množstvo fosfolipodov [mg/ml]	Viabilita [%]
10 %	2	0,046 ± 0,011	63,35	30 %	2	0,028 ± 0,0010	65,20	70 %	2	0,009 ± 0,0006	67,59
	4	0,092 ± 0,022	61,98		4	0,056 ± 0,0020	89,13		4	0,018 ± 0,0012	61,52
	6	0,138 ± 0,034	56,30		6	0,084 ± 0,0031	65,53		6	0,027 ± 0,0018	49,59
	8	0,184 ± 0,045	61,12		8	0,112 ± 0,0041	76,87		8	0,036 ± 0,0024	47,22
	10	0,230 ± 0,056	73,66		10	0,140 ± 0,0051	55,87		10	0,045 ± 0,0031	42,28
	12	0,276 ± 0,067	53,05		12	0,168 ± 0,0061	73,60		12	0,053 ± 0,0037	38,07
	14	0,322 ± 0,079	56,12		14	0,195 ± 0,0071	37,67		14	0,062 ± 0,0043	35,80
20 %	2	0,034 ± 0,011	75,55	50 %	2	0,010 ± 0,0004	59,60	100 %	2	0,003 ± 0,0002	60,71
	4	0,068 ± 0,022	69,21		4	0,020 ± 0,0009	75,69		4	0,007 ± 0,0004	60,09
	6	0,102 ± 0,034	67,62		6	0,030 ± 0,0013	60,51		6	0,010 ± 0,0006	63,84
	8	0,136 ± 0,045	59,88		8	0,041 ± 0,0018	56,05		8	0,014 ± 0,0008	43,57
	10	0,170 ± 0,056	50,55		10	0,051 ± 0,0022	56,92		10	0,017 ± 0,0010	42,68
	12	0,204 ± 0,067	37,38		12	0,061 ± 0,0027	55,36		12	0,020 ± 0,0012	39,82
	14	0,238 ± 0,079	32,07		14	0,071 ± 0,0031	83,04		14	0,024 ± 0,0014	40,09



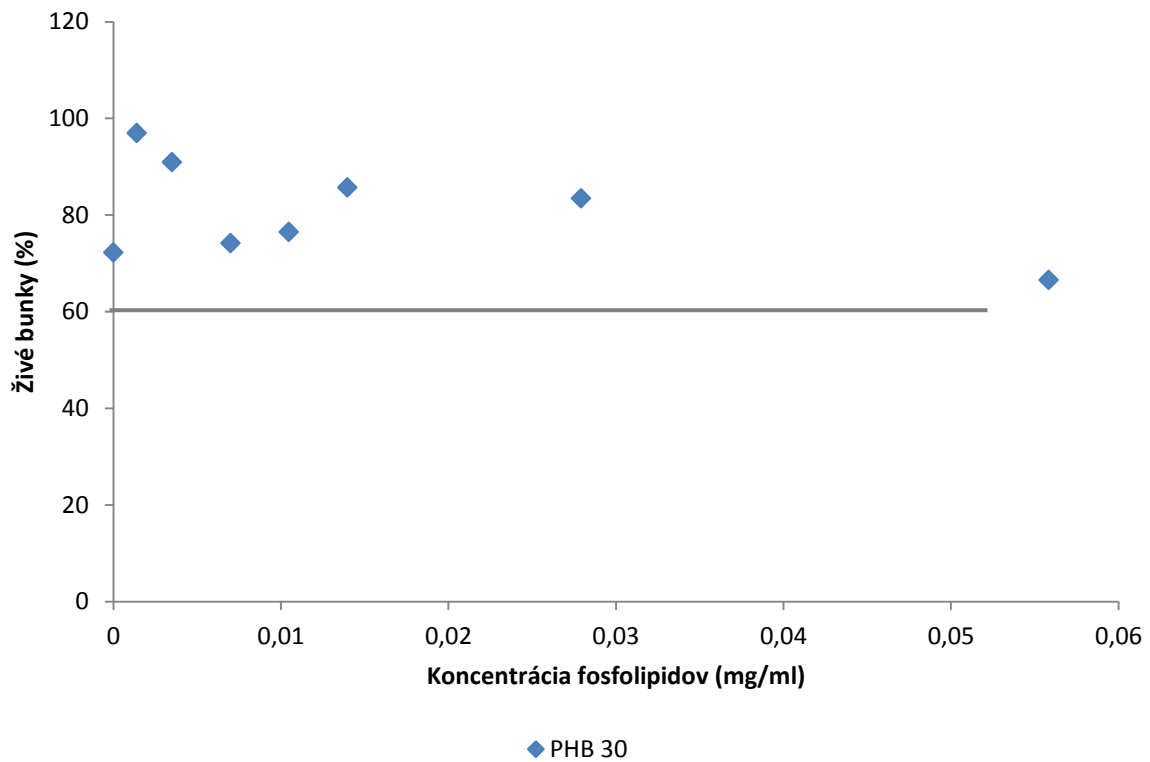
Obrázok 13: Závislosť percentuálneho zastúpenia živých buniek na koncentrácii zvyškových fosfolipidov v 10% roztoku PHB



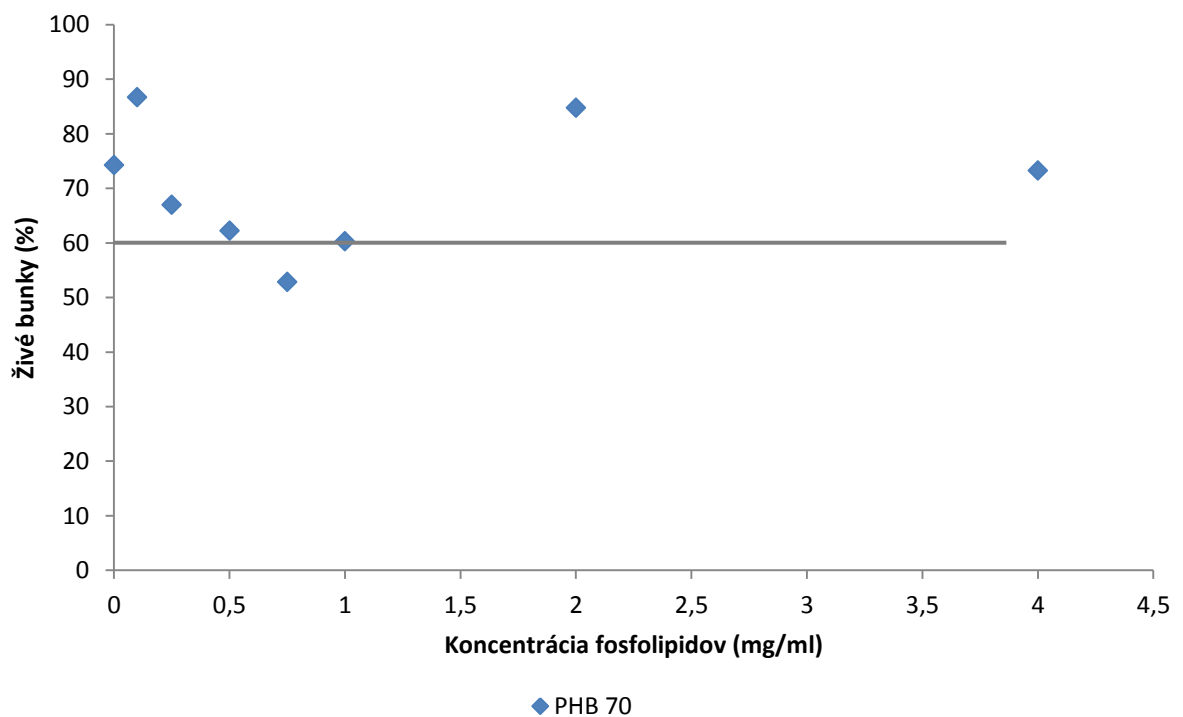
Obrázok 14: Závislosť percentuálneho zastúpenia živých buniek na koncentrácii zvyškových fosfolipidov v 70% roztoku PHB

Tabuľka 6: Cytotoxicita koncentračnej rady PHB 0–70 % pre vzorky – 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2 a 4% z pôvodných roztokov

Obsah PHB	c _{vzorky} [%]	Množstvo fosfolipodov [mg/ml]	Viabilita [%]	Obsah PHB	c _{vzorky} [%]	Množstvo fosfolipodov [mg/ml]	Viabilita [%]	Obsah PHB	c _{vzorky} [%]	Množstvo fosfolipodov [mg/ml]	Viabilita [%]
Čisté lipozómy	2	0,020 ± 0,0027	59,47	20 %	2	0,034 ± 0,0007	96,73	50 %	0,1	0,0005 ± 0,00002	86,71
	4	0,041 ± 0,0054	51,13		4	0,068 ± 0,0015	93,46		0,25	0,0013 ± 0,00006	66,99
	6	0,061 ± 0,0081	47,02		6	0,102 ± 0,0022	87,50		0,5	0,0025 ± 0,00011	62,24
	8	0,081 ± 0,0108	44,03		8	0,136 ± 0,0030	65,96		0,75	0,0038 ± 0,00017	52,87
	10	0,102 ± 0,0135	39,78		10	0,170 ± 0,0037	70,38		1	0,0051 ± 0,00022	60,28
	12	0,122 ± 0,0162	36,11		12	0,204 ± 0,0044	65,58		2	0,0102 ± 0,00045	84,76
	14	0,142 ± 0,0189	35,08		14	0,238 ± 0,0052	45,77		4	0,0203 ± 0,00090	73,29
10 %	2	0,046 ± 0,0112	70,22	30 %	0,1	0,0014 ± 0,00005	96,92	70 %	0,1	0,0004 ± 0,00003	86,71
	4	0,092 ± 0,0225	62,96		0,25	0,0035 ± 0,00023	90,91		0,25	0,0011 ± 0,00008	66,99
	6	0,138 ± 0,0337	58,09		0,5	0,0070 ± 0,00026	74,19		0,5	0,0022 ± 0,00015	62,24
	8	0,184 ± 0,0450	53,55		0,75	0,0105 ± 0,00038	76,46		0,75	0,0033 ± 0,00023	52,87
	10	0,230 ± 0,0562	50,14		1	0,014 ± 0,00051	85,71		1	0,0045 ± 0,00031	60,28
	12	0,276 ± 0,0675	42,66		2	0,0280 ± 0,00102	83,44		2	0,0089 ± 0,00061	84,76
	14	0,322 ± 0,0787	38,92		4	0,0558 ± 0,00204	66,56		4	0,0178 ± 0,00122	73,29



Obrázok 15: Závislosť percentuálneho zastúpenia živých buniek na koncentrácii zvyškových fosfolipidov v 30% roztoku PHB

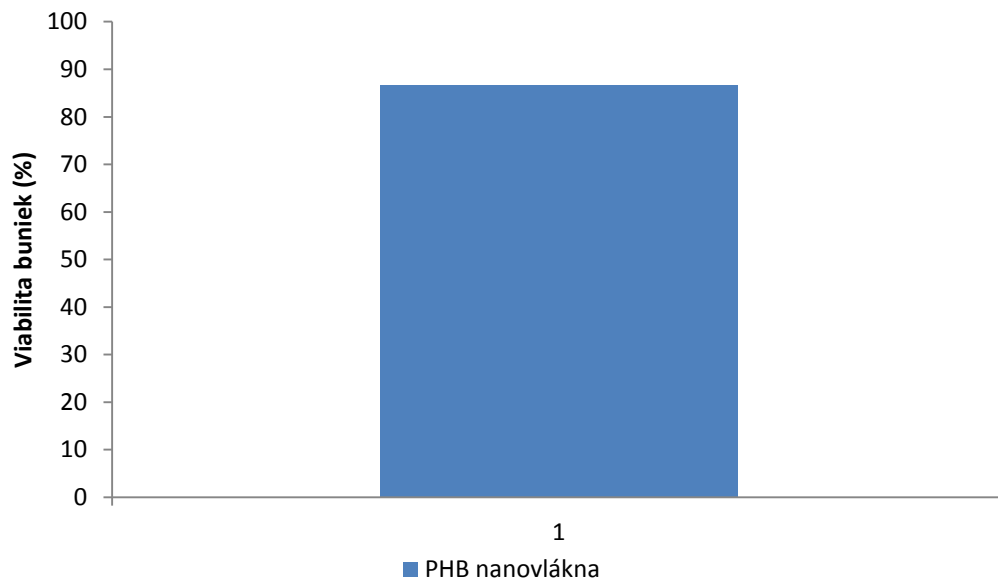


Obrázok 16: Závislosť percentuálneho zastúpenia živých buniek na koncentrácii zvyškových fosfolipidov v 70% roztoku PHB

Na obrázku 15 vidíme, že ani jedna použitá koncentrácia 30% PHB nie je cytotoxická. To isté vidíme rovnako aj na obrázku č. 16, kde len jediná vzorka klesla pod hranicu cytotoxicity (0,75%).

5.5 Meranie cytotoxicity nanovlákien

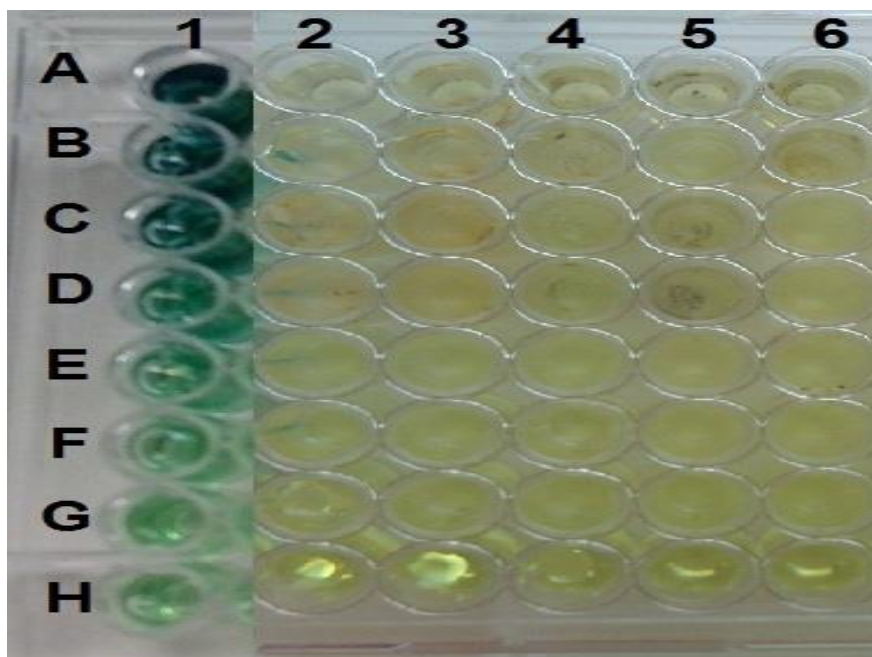
Testovanie nanovlákien fungovalo na podobnom princípe ako testovanie nanočastíc popísané v kapitole 4.9 MTT test pre stanovenie cytotoxicity. Vlákna, ktoré sa testovali, boli pripravené elektrospinnigovou metódou a viabilita buniek po ukončení testu bola 88,6 %, takže vlákna neboli cytotoxické.



Obrázok 17: Percentuálne zastúpenie živých buniek po ukončení testu cytotoxicity

5.6 Genotoxicita

Okrem sledovania viability ľudských keratinocytov bola ďalej skúmaná genotoxicita pripravených častíc. Stanovenie genotoxicity vybraných vzoriek PHB kombinovaných s lipozómami boli prevedené pomocou komerčného kitu SOS–Chromotest podľa priloženého postupu [22].



Obrázok 18: Test genotoxicity nanočastíc – stĺpce: 1-pozitívna kontrola, 2 - 10% PHB, 3 –20% PHB, 4 – 30% PHB, 5 – 50% PHB, 6 – čisté lipozómy. Riadky A–H klesajúce množstvo pridaných baktérií

Test bol prevedený na upravenom kmeni baktérie *E. coli*. Výsledky testu genotoxicity vzoriek častíc (čisté lipozómy, lipozómy s obsahom 10 – 50% PHB) a pozitívnej kontroly sú uvedené na obrázku 18. Miera genotoxicity odpovedá intenzite sfarbenia chromogénu. Vizuálnym porovnaním aj spektrofotometrickým meraním bolo zistené, že žiadna z testovaných vzoriek nebola vyhodnotená ako genotoxická.

6. Záver

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo optimalizovať metódy prípravy nanočastíc a nanovlákien s obsahom PHB a charakterizovať ich vlastnosti ako veľkosť, polydisperzita, koloidná stabilita, dlhodobá stabilita a následne cytotoxicitu a genotoxicitu. Nanočastice boli pripravované z dvoch rôznych typov PHB – PHB Biomer a PHB Hydal, v prostredí destilovanej vody. Pre charakterizáciu častíc sa v tejto práci využívali metódy dynamického rozptylu svetla.

Najsôr sa uskutočnila optimalizácia prípravy nanočastíc za použitia dvoch typov PHB – PHB Biomer a PHB Hydal. V rámci experimentu sa pracovalo s koncentraciami 3 a 4% a s viacerými teplotami. Po charakterizácii častíc sa ako optimálny ukázal roztok 4% PHB Hydal, kvôli jeho väčšej stabilite a menšej veľkosti častíc. Z tohto roztoku sa následne vyrobila koncentračná rada kombinovaných častíc s lecitínom a cholesterolom. Kombinované častice s obsahom PHB 30% vykazovali optimálnu veľkosť a vhodný polydisperzný index. U kombinovaných častíc bola ďalej skúmaná dlhodobá stabilita, kde sa zistilo, že pripravené častice boli po 3 mesiacoch stabilné a ich stabilita sa výrazne nezmenila. Zmeny boli pozorované až po 4 mesiacoch, kedy vzorky agregovali, stabilita klesla a vznikli zrazeniny. Príprava a overenie stabilnej koncentračnej rady častíc boli kľúčové podmienky, aby sa mohlo prejsť k testovaniu cytotoxicity a genotoxicity.

Finálnou časťou tejto práce bolo meranie vplyvu pripravených častíc na živé bunky pomocou testov cytotoxicity voči imortalizovanej bunecnej línii humánnych keratinocytov HaCaT a testu genotoxicity na upravenom kmeni baktérie *E. coli* pomocou komerčného kitu SOS chromotestTM. MTT test cytotoxicity ukázal, prídavok častíc s 10% PHB bol v koncentračnom rozmedzí 2–14% cytotoxický pri vyšších koncentráciách (6%, 12% a 14%). Pri zvyšných vzorkách bola viabilita väčšia ako 60%, čo znamená že vzorky neboli cytotoxické. Hodnota viability pri vzorkách s obsahom 50;70 a 100% PHB už klesli pod 60% a teda vzorky boli cytotoxické. To mohlo byť spôsobené nielen samotnými časticami, ale aj prítomnosťou reziduálneho chloroformu. Z nameraných dát teda vyplýva, že s pribúdajúcim množstvom PHB v časticiach a s rastúcou koncentráciou roztokov PHB nanočastíc stúpa aj úmrtnosť buniek a množstvo buniek, ktoré prežili, sa pohybovalo iba okolo 30%. Menej koncentrované roztoky nejavili žiadne známky cytotoxicity, čo vidieť aj na výsledkoch množstva buniek, ktoré prežili. To sa pohybovalo okolo 90%.

Následne sa previedol test genotoxicity na vzorkách čistých lipozómov a kombinovaných lipozómov s obsahom 10 – 50% PHB v 7 koncentráciách. Na základe získaných výsledkov možno konštatovať, že žiadna zo vzoriek nebola vyhodnotená ako genotoxická.

Celkovo môžeme uzavrieť, že kombinované častice na báze lipozómov s PHB sú stabilné a pri koncentrácii 20-30 % PHB vykazujú optimálnu veľkosť, polydisperzitu aj stabilitu. Tieto častice boli bezpečné pre použitie do určitej limitnej koncentrácie. Problematika bude ďalej študovaná v ďalších prácach so zameraním na použitie týchto častíc k enkapsulácii aktívnych látok.

7. Bibliografia:

1. HRIVNÁKOVÁ, VIERA a AGÁTA FARGAŠOVÁ. *CHARAKTERIZÁCIA NANOČASTÍČ A ICH VPLYV NA EUKARYOTICKÉ BUNKY A VYŠŠIE RASTLINY* [online]. Chemický ústav SAV, Analytické oddelenie, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava; Katedra environmentálnej ekológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, 2016 [cit. 2018-03-16]. Dostupné z: [https://www.google.sk/search?q=CHARAKTERIZ%C3%81CIA+NANO%C4%8CAST%C3%8DC+A+ICH+VPLYV+NA+EUKARYOTICK%C3%89+BUNKY+A+VY%C5%A0%C5%A0IE+RASTLINY.+2016%2C+110\(6\)&oq=CHARAKTERIZ%C3%81CIA+NANO%C4%8CAST%C3%8DC+A+ICH+VPLYV+NA+EUKARYOTICK%C3%89+BUNKY+A+VY%C5%A0%C5%A0IE+RASTLINY.+2016%2C+110\(6\)&aqs=chrome..69i57.446j0j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8](https://www.google.sk/search?q=CHARAKTERIZ%C3%81CIA+NANO%C4%8CAST%C3%8DC+A+ICH+VPLYV+NA+EUKARYOTICK%C3%89+BUNKY+A+VY%C5%A0%C5%A0IE+RASTLINY.+2016%2C+110(6)&oq=CHARAKTERIZ%C3%81CIA+NANO%C4%8CAST%C3%8DC+A+ICH+VPLYV+NA+EUKARYOTICK%C3%89+BUNKY+A+VY%C5%A0%C5%A0IE+RASTLINY.+2016%2C+110(6)&aqs=chrome..69i57.446j0j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8). Referát. SAV, Univerzita Komenského v Bratislave.
2. S0142961207004097CASTRO-MAYORGA, J.L., A. MARTÍNEZ-ABAD, M.J. FABRA, Catarina OLIVERA, M. REIS a J.M. LAGARÓN. Stabilization of antimicrobial silver nanoparticles by a polyhydroxyalkanoate obtained from mixed bacterial culture. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2014, **71**(27), 103-110 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.06.059. ISSN 01418130. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813014004772>
3. CASTRO-MAYORGA, Jinneth, Maria FABRA, Luis CABEDO, Jose LAGARON, M. REIS a J.M. LAGARÓN. On the Use of the Electrospinning Coating Technique to Produce Antimicrobial Polyhydroxyalkanoate Materials Containing In Situ-Stabilized Silver Nanoparticles. *Nanomaterials* [online]. 2017, **7**(1), 4- [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.3390/nano7010004. ISSN 2079-4991. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2079-4991/7/1/4>
4. AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*. 2013, **8**(1), 102-. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. Dostupné také z: <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
5. PATIL, Yogita P. a Sameer JADHAV. Novel methods for liposome preparation: review. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2014, , 8-18. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.01>.

6. VEMURI, Sriram a C.T RHODES. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 1995, 70(2), 95- 111. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0031-6865\(95\)00010-7](http://dx.doi.org/10.1016/0031-6865(95)00010-7).

7. DUA, J.S. 1, A. C. RANA a A. K. BHANDARI. LIPOSOME: METHODS OF PREPARATION AND APPLICATIONS. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*. 2012, (), 14-20. Dostupné také z: <http://www.technicaljournalsonline.com/ijpsr/VOL%20III/IJPSR%20VOL%20III%20ISSUE%20II%20APRIL%20JUNE%202012/Article%204%20April%20June%202012.pdf>

8. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-03-16].

9. RAMAKRISHNA, Seeram, Kazutoshi FUJIHARA, Wee-Eong TEO, Thomas YONG, Zuwei MA a Ramakrishna RAMASESHAN. Electrospun nanofibers: solving global issues. In: *Materials Today* [online]. 2006, 9(3), s. 40-50 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.1016/S1369-7021(06)71389-X. ISSN 13697021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S136970210671389X>

10. ZHAO, Hang, Xin MIN, Xiaowen WU, et al. Microstructure and electrochemical properties of polyacrylonitrile-based carbon micro- and nanofibers fabricated by centrifugal spinning. *Chemical Physics Letters* [online]. 2017, 684, 14-19 [cit. 2018-03-17]. DOI: 10.1016/j.cplett.2017.06.027. ISSN 00092614. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009261417305663>

11. MATHER, R. R. a R. H. WARDMAN. *The chemistry of textile fibres*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, c2011. ISBN 978-1-84755-867-1.

12. *Nanovlákná a electrospinning* [online]. [cit. 2018-03-16]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2015/F3390/um/06_Lekcia_2015_F3390.pdf

13. BELHÁČOVÁ, Michaela. *Příprava nanovláken z vybraných polymerů s fosfazenovými aditivami*. Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 602 00 Brno, Česko, 2012. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká Fakulta, Ústav Chemie.
14. MATOUŠKOVÁ, Petra. *Využití různých technik enkapsulace k řízenému uvolňování aktivních látek v potravinářských a kosmetických přípravcích* [online]. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2015 [cit. 2018-03-18]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/51757>. Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.
15. © MALVERN INSTRUMENTS LTD. 2003, 2004. Zetasizer Nano Series User Manual. 1.1. Anglie, 2004. Dostupné také z: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf
16. LEWINSKI, Nastassja, Vicki COLVIN a Rebekah DREZEK. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small* [online]. 2008, **4**(1), 26-49 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1002/sml.200700595. ISSN 16136810. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/sml.200700595>
17. FOTAKIS, George, John A. TIMBRELL a Rebekah DREZEK. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* [online]. 2006, **160**(2), 171-177 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1016/j.toxlet.2005.07.001. ISSN 03784274. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427405001967>
18. SITTAMPALAM, G. Sitta, ed., Nathan P. COUSSENS, ed. a Kyle BRIMACOMBE, ed. Assay Guidance Manual [online]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004 [cit. 2017-04-10]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/> [67] MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular

19. KULTIVÁCIA BUNIEK - POPIS METÓDY. *Virtuálne laboratórium molekulárnej biológie* [online]. Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: http://www.kbg.fpv.ukf.sk/LMB/VLMB/kultivacia_popis.html
20. HEMEDA, Hatim, Bernd GIEBEL a Wolfgang WAGNER. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* [online]. 2014, **16**(2), 170-180 [cit. 2018-05-23]. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.11.004. ISSN 14653249. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324913007779>
21. SEO, Min-Duk, Tae-Jin KANG, Chang-Hoon LEE, Ai-Young LEE a Min-Soo NOH. HaCaT Keratinocytes and Primary Epidermal Keratinocytes Have Different Transcriptional Profiles of Cornified Envelope-Associated Genes to T Helper Cell Cytokines. *Biomolecules and Therapeutics* [online]. 2012, **20**(2), 171-176 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.4062/biomolther.2012.20.2.171. ISSN 1976-9148.
22. *SOS-ChromoTest Users Guide* [online]. [cit. 2018-05-27]. Dostupné z: <http://www.ebpi-kits.com/images/SOS-ChromoTest.pdf>

8. Zoznam použitých skratiek

UV žiarenie – ultra fialové žiarenie

PHA – polyhydroxyalkanoáty

PHB – poly(3-hydroxybutyrát)

ABTS – 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonová kyselina)

TEAC – „Trolox equivalent antioxidant capacity“

MTT – terazoliovou sůl 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid, methyl-thiazolyl-tetrazolium