



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# Vliv vybraných superpotravin a jejich složek na lidské buňky

Influence of some super-foods and their active components on human cells.

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

Bc. Ivana Maslonková

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2018

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1238/2017  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Ivana Maslonková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název diplomové práce:

Vliv vybraných superpotravin a jejich složek na lidské buňky

### Zadání diplomové práce:

Cílem práce je studium obsahu aktivních látek ve vybraných druzích tzv. superpotravin, zejména rostlinného původu a jejich interakce s lidskými buňkami. V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Literární rešerše (superpotraviny, aktivní látky, buněčné kultury)
- 2) optimalizace metod stanovení aktivních složek vybraných superpotravin a nápojů
- 3) kultivace lidských keratinocytů, optimalizace testů cytotoxicity
- 4) testování vlivu superpotravin a složek na lidské buňky
- 5) vyhodnocení výsledků a diskuse

### 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. Ivana Maslonková  
student(ka)

---

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí práce

---

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

## **ABSTRAKT**

Predložená diplomová práca sa zameriava na charakterizáciu zloženia a biologických účinkov vybraných druhov superpotravín. V teoretickej časti sú uvedené základné informácie o použitých superpotravínach a ich bioaktívnych látkach, ktoré sú predmetom záujmu v experimentálnej časti. Ďalej sú v teoretickej časti popísané základne vezikulárne systémy, ktoré boli použité na enkapsuláciu extraktov a metódy ich štúdia. Taktiež bola spracovaná krátka rešerš o bunkových kultúrach a ich kultivácii a prehľad najpoužívanejších metód stanovovania cytotoxicity a genotoxicity.

V experimentálnej časti boli pripravené vodné a etanolové extrakty vybraných superpotravín. Extrakty boli ďalej enkapsulované do lipozomálnych a kombinovaných PHB častíc. Extrakty potravín boli popísané spektrofotometrickými metódami, pomocou ktorých sa stanovil obsah polyfenolov, flavonoidov, antokyánov, karoténov, chlorofylu, trieslovín a určila sa antioxidačná aktivita. Taktiež sa stanovili základné fyzikálno-chemické parametre pripravených lipozomálnych a kombinovaných častíc. Pripravené častice a v nich enkapsulované vyextrahované látky sa ďalej testovali pomocou MTT testu a SOS chromotestu, kedy sa určil ich cytotoxický a genotoxický charakter.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

keratínocyty, funkčné potraviny, bioaktívne látky, lipozómy, cytotoxicita, genotoxicita

## **ABSTRACT**

The presented diploma thesis is focused on the study of composition and biological effects of some super-foods. Theoretical part deals with basic information about chosen superfoods and their bioactive substances. Further, theoretical part describes the overview of vesicular systems used for encapsulation and the most common methods of particle characterization. A brief review of cell cultures and cultivation of human cells is presented as well as methods for cytotoxicity and genotoxicity testing.

In the experimental section, aqueous and ethanol extracts of super-foods were prepared. These extracts were then encapsulated into liposomal and combined PHB particles. Super-food extracts were characterized by spectrophotometrical methods in order to determine the content of polyphenols, flavonoids, anthocyanins, carotenes, chlorophyll, tannins, and antioxidant activity. The physico-chemical characteristics of prepared liposomal and combined particles were determined too. The particles with encapsulated extracts were further tested using the MTT assay and SOS chromotest to describe their potential cytotoxic and genotoxic effects.

## **KEYWORDS**

keratinocytes, functional food, bioactive compounds, liposomes, cytotoxicity, genotoxicity

MASLONKOVÁ, I. Vliv vybraných superpotravin a jejich složek na lidské buňky. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 64 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

## **PREHLÁSENIE**

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

.....  
podpis študenta

## **POĎAKOVANIE**

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

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

# OBSAH

ÚVOD .....	9
<b>1 TEORETICKÁ ČASŤ .....</b>	<b>10</b>
1.1 FUNKČNÉ POTRAVINY A ICH KOMPONENTY .....	10
1.1.1 Vitamíny a minerály .....	11
1.1.2 Antioxidanty .....	11
1.1.2.1 Fenolické látky.....	11
1.1.2.2 Karotenoidy .....	11
1.1.2.3 Antokyány .....	12
1.1.2.4 Triesloviny .....	12
1.1.3 Chlorofyl .....	13
1.2 VYBRANÉ SUPERPOTRAVINY.....	13
1.2.1 Matcha .....	13
1.2.2 Rooibos.....	14
1.2.3 Fenikel obyčajný .....	15
1.2.4 Echinacea .....	15
1.2.5 Lesné plody .....	16
1.2.5.1 Jahody.....	16
1.2.5.2 Brusnice.....	16
1.2.5.3 Čučoriedky.....	16
1.2.5.4 Ostružina malinová a černicová.....	16
1.2.6 Mrkva .....	16
1.3 LIPOZÓMY .....	17
1.3.1 Príprava lipozómov .....	18
1.3.1.1 Metóda TLE .....	18
1.3.1.2 Injekčná metóda.....	18
1.3.1.3 Odparovanie na reverznej fáze.....	18
1.3.1.4 Ultrazvuková enkapsulácia.....	19
1.3.2 Aplikácie lipozómov .....	19
1.4 BUNKOVÉ KULTÚRY .....	19
1.4.1 Epiteliálne bunky.....	20
1.4.2 Keratínocyty .....	20
1.5 KULTIVÁCIA BUNKOVÝCH KULTÚR.....	21
1.6 TESTOVANIE CYTOTOXICITY A GENOTOXICITY .....	21
1.6.1 LDH test .....	22
1.6.2 MTT test.....	23
1.6.3 XTT test.....	23
1.6.4 Amesov test .....	23
1.6.5 Kométový test .....	24
1.6.6 SOS chromotest.....	24
<b>2 CIEĽ PRÁCE .....</b>	<b>25</b>
<b>3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....</b>	<b>26</b>

3.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE NA CHARAKTERIZÁCIU EXTRAKTOV A PRÍPRAVU ČASTÍC .....	26
3.1.1	Použité potraviny.....	26
3.1.2	Použité chemikálie pri práci s bunkami .....	26
3.2	PRÍSTROJE A POMÔCKY .....	27
3.3	PRÍPRAVA EXTRAKTOV .....	27
3.4	PRÍPRAVA ČASTÍC .....	27
3.4.1	Príprava lipozómov .....	27
3.4.2	Príprava kombinovaných PHB častíc.....	27
3.5	CHARAKTERIZÁCIA EXTRAKTOV.....	28
3.5.1	Stanovenie celkových polyfenolov .....	28
3.5.2	Stanovenie flavonoidov .....	28
3.5.3	Stanovenie antioxidačnej aktivity .....	28
3.5.4	Stanovenie celkových antokyánov .....	28
3.5.5	Stanovenie chlorofylu .....	28
3.5.6	Stanovenie karoténov .....	29
3.5.7	Stanovenie trieslovín .....	29
3.6	CHARAKTERIZÁCIA ČASTÍC.....	29
3.6.1	Stanovenie koncentrácie fosfolipidov pomocou Stewartovho testu .....	29
3.6.2	Stanovenie enkapsulačnej účinnosti.....	29
3.6.3	Stanovenie dlhodobej stability .....	30
3.6.4	Stanovenie zeta potenciálu .....	30
3.6.5	Stanovenie veľkosti častíc a polydisperzity .....	30
3.7	KULTIVÁCIA ĽUDSKÝCH KERATÍNOCYTOV .....	30
3.8	MTT TEST.....	30
3.9	SOS CHROMOTEST.....	31
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSIA .....</b>	<b>32</b>
4.1	CHARAKTERIZÁCIA EXTRAKTOV POTRAVÍN.....	32
4.1.1	Spektrofotometrické stanovenie celkových polyfenolov .....	32
4.1.2	Spektrofotometrické stanovenie flavonoidov.....	33
4.1.3	Spektrofotometrické stanovenie antioxidačnej aktivity .....	35
4.1.4	Spektrofotometrické stanovenie antokyánov .....	38
4.1.5	Spektrofotometrické stanovenie chlorofylu .....	39
4.1.6	Spektrofotometrické stanovenie karoténov .....	40
4.1.7	Spektrofotometrické stanovenie trieslovín.....	41
4.2	STANOVENIE ENKAPSULAČNEJ ÚČINNOSTI.....	42
4.3	STANOVENIE DLHODOBEJ STABILITY .....	43
4.4	CHARAKTERIZÁCIA ČASTÍC.....	43
4.4.1	Veľkosť častíc a polydesperzita .....	43
4.4.2	Zeta potenciál .....	45
4.5	BUNKOVÉ KULTÚRY .....	46
4.5.1	Pasážovanie .....	46
4.5.2	Test cytotoxicity .....	47
4.6	STANOVENIE GENOTOXICITY ČASTÍC .....	54
<b>5</b>	<b>ZÁVER.....</b>	<b>55</b>

<b>6</b>	<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV .....</b>	<b>64</b>



## ÚVOD

V dnešnej dobe sa začali ľudia vo veľkom zaujímať o zdravý životný štýl, k čomu neodmysliteľne patrí aj forma stravovania. Konzumenti dbajú na výdatné zložky jednotlivých potravín, stále objavujú nové potraviny, ktoré by zlepšili fyzickú ale aj mentálnu funkciu organizmu.

Fenoménom nedávnych rokov sú stále komerčne propagované tzv. superpotraviny, potraviny obsahujúce prírodné zložky obohacujúce organizmus, ktoré prekonávajú bežné konzumované potraviny v obsahu daných látok a v prekazateľnom pozitívnom účinku na organizmus. Skúmaním takýchto látok sa začalo vo veľkom v Japonsku, kde s výskumom a ‚vylepšovaním‘ potravín začali už v 90. rokoch 20. storočia. Tieto komodity obsahujú alebo sú vylepšené o rôzne prírodné zložky ako napr. antioxidanty, vitamíny, vlákninu, mastné kyseliny [1], [2]. Superpotraviny, resp. funkčné potraviny vo svete nemajú zatiaľ jednotnú definíciu, no zhodujú sa v jednom, že majú priaznivé účinky na ľudský organizmus a pomáhajú predchádzať vzniku chronických chorôb [5].

Potraviny s vysokým podielom určitých bioaktívnych látok alebo obohatené potraviny o tieto zložky majú význam preventívny, ale aj pre ľudí, ktorí trpia deficitom určitej nutričnej zložky alebo niektorým z tzv. civilizačných ochorení. Taktiež získané bioaktívne látky zo superpotravín môžu byť použité do kozmetických prípravkov v podobe lipozómov, ktoré zaisťujú stabilnejší a ľahší prienik niektorých vybraných prospešných látok do tela človeka [5].

Cieľom práce je štúdium obsahu aktívnych látok vo vybraných druhoch tzv. superpotravín rastlinného pôvodu a ich interakcie s ľudskými bunkami. Táto problematika je skúmaná za použitia MTT testu, ktorý overuje cytotoxicitu častíc s enkapsulovanými extraktami potravín za použitia HaCaT buniek. V práci sa tiež skúma genotoxicita vybraných častíc pomocou SOS chromotestu za použitia buniek *Escherichia coli*.

# 1 TEORETICKÁ ČASŤ

## 1.1 Funkčné potraviny a ich komponenty

Pojem funkčné potraviny bol prvýkrát použitý v 80. rokoch minulého storočia v Japonsku, kedy japonská vláda začala bližšie skúmať potencionálne využitie potravín s cieľom redukovať vysoké náklady na zdravotnú starostlivosť v krajine [1]. V Japonsku roku 1991 bol tento pojem exaktne pomenovaný ako FOSHU (Foods for Specified Health Uses). Táto formula definuje funkčné potraviny ako potraviny, ktoré obsahujú zložky, ktoré na základe vedeckého poznatku majú priaznivý zdravotný účinok na fyziologické alebo biologické aktivity tela a prispievajú k uchovaniu a zlepšeniu zdravia alebo iných špeciálnych zdravotných problémov. Napríklad pomáhajú udržiavať normálnu hladinu glukózy v krvi, podporujú rozkladanie tukov v tele, regulujú pohyb čriev a môžu redukovať vysoké riziko osteoporózy [2]. Hoci pojem funkčné potraviny má dlhú históriu v Japonsku, v ostatných krajinách nie je buď uzákonený, alebo jeho výklad je v legislatíve popísaný rozdielne. Preto jeho formulácia môže byť diskutabilná, keďže nie je pre túto formulu jednotná definícia [3].

V európskej legislatíve pojem funkčné potraviny nezastáva špeciálnu kategóriu potravín, ide skôr o druh konceptu, ktorý spadá pod európsku reguláciu o výžive a zdravotných nárokoch na potraviny (EC č. 1924/2006). No organizácia FuFoSE (Functional Food Science in Europe) koordinovaná inštitútom ILSI (International Life Sciences Institute) definuje funkčné potraviny nasledovne: potraviny môžu byť považované za funkčné potraviny, ak spoločne s výživnou hodnotou majú blahodarný efekt na jednu alebo viac funkcií ľudského organizmu a tiež zdokonaľujú celkové a fyzické podmienky ľudského tela alebo/a znižujú risk rozvíjajúcich sa chorôb [3]. Tieto špeciálne potraviny by nemali byť vo forme kapsúl alebo tabletiék, čo FOSHU potraviny môžu byť, no väčšina je vo forme potravín [5].

V Spojených štátoch amerických sú funkčné potraviny definované ako potraviny alebo potravinové zložky, ktoré zabezpečujú okrem výživnej hodnoty aj zdravotné benefity. Takýmito potravinami môžu byť obyčajné potraviny; fortifikované, obohatené alebo potravinové doplnky. Funkčné potraviny sú regulované pod dohľadom Food and Drug Administration (FDA), ktorý spadá pod autoritu Federal Food, Drug and Cosmetics (FFDCA), ktorý zabezpečuje reguláciu všetkých potravín, potravinových aditív a potravinových doplnkov [3].

Pri pridávaní chemických látok do potravín treba zvážiť, či ide o tzv. GRAS látku (Generally Recognized As Safe), ktorú definuje úrad FDA ako látku všeobecne bezpečnú. Táto látka musí byť podrobená rôznym štúdiám a je dokázané kvalifikovanými expertmi, že je bezpečná v rámci zamýšľaného používania. V prípade, že látka nespĺňa požiadavky GRAS, musí byť pred vydaním na trh schválená orgánom FFDCA. Ak sa už látka nachádza na trhu, bez toho aby bola dokázaná jej bezpečnosť, FDA má právomoc stiahnuť takýto produkt z obehu. Schvaľovanie podmienky GRAS úradom FDA prebieha v niekoľkých krokoch: výrobca látky musí zabezpečiť potrebný výskum danej látky vedeckými pracovníkmi a musí zostaviť vedecké poznatky, ktoré dokazujú bezpečnosť látky; po dôkladnom zhodnotení a výskume látky výrobca zašle potrebné dokumenty úradu, ktorý buď neschváli látku ako vhodnú alebo ju schváli bez pripomenutí a následne výrobca môže danú látku pridávať do potravín [7].

### **1.1.1 Vitamíny a minerály**

Vitamíny sú esenciálne organické zlúčeniny potrebné pre fungovanie ľudského tela. Delia sa na voľne rozpustné a v tukoch rozpustné, medzi prvé spomenuté sa zaraďujú vitamín C a vitamíny B-komplexu ako napr. B6, B12, niacín, riboflavín, biotín, tiamín, kyselina pantoténová a kyselina listová. Vitamíny z tejto skupiny nemôžu byť dlhšie zadržované v tele, nakoľko sú odvádzané ľudskými tekutinami von z tela. Medzi látky, ktoré sa ukladajú v tele, patria vitamíny A, D, E a K [8].

Tieto látky majú rôznorodé funkcie v tele, no najmä regulujú metabolizmus látok, ďalej napr. B12 podporuje formovanie krvných buniek, biotín a pantoténová kyselina pomáhajú regulovať hormonálnu syntézu, vitamíny E a C sú prirodzené antioxidanty, vitamín D redukuje riziko vzniku osteoporózy atď. [9].

Minerály sú anorganické látky potrebné pre správne fungovanie tela. Niektoré minerály pôsobia ako antioxidanty, a to selén, meď a mangán. Významným minerálom medzi funkčnými potravinami je vápnik, ktorý spolu s vitamínom D reguluje zdravie kostí. Minerály Cu, Fe, Se a Zn sú regulátory imunitného systému, minerály I, Mg, K sú spojené so správnym fungovaním mozgu a nervového systému [10].

### **1.1.2 Antioxidanty**

Sú to látky, ktoré pri nízkej koncentrácii oddiaľujú alebo zabraňujú oxidácii bunkových komponentov ako sú proteíny, karbohydráty, lipidy a DNA zachytávaním voľných radikálov v bunke [11]. Niektoré antioxidanty majú nízkomolekulárny charakter a zaraďujú sa do skupiny tzv. fytochemikálií, ktoré podporujú ľudské zdravie a znižujú riziko chorôb. Antioxidačná aktivita bola preukázaná v lesných plodoch, citrusoch, špenáte, rajčinách, zelenom, čiernom čaji atď.

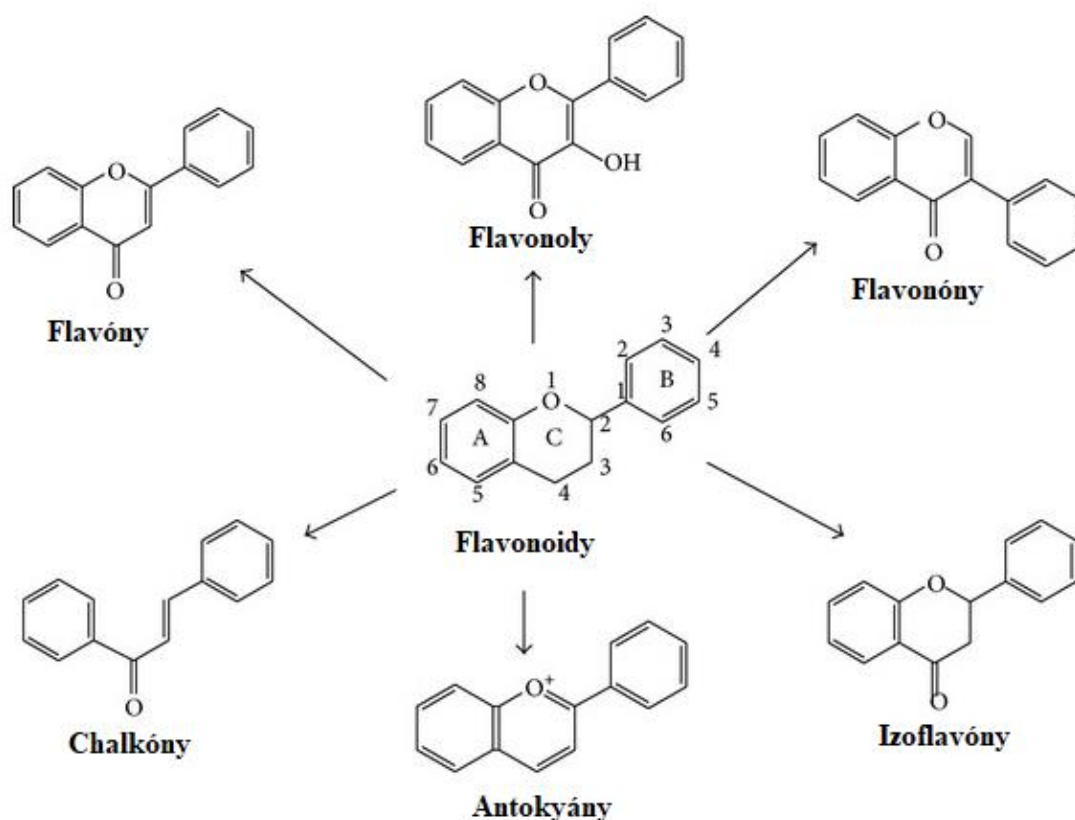
#### **1.1.2.1 Fenolické látky**

Rozsiahle štúdie, ktoré skúmali antioxidačnú aktivitu zeleného a čierneho čaju preukázali, že až 30 % sušiny môžu tvoriť fenolické látky. Najväčšie zastúpenie antioxidantov v rastlinách tvoria polyfenoly (Obrázok 1), ktoré tiež môžu pôsobiť protizápalovo, antialergénne, antivirálne a antikarcinogénne. Medzi fenolické látky, ktorých je známych niekoľko tisíc, patria napríklad kvercetín, epikatechín, rutín, hesperidín, apigenín, kempferol, myricetín, naringenín a mnoho ďalších [12].

#### **1.1.2.2 Karotenoidy**

Ďalšou z významných skupín antioxidantov sú karotenoidy, farebné pigmenty obsiahnuté v rastlinách, ovocí, riasach a vo fotosyntetizujúcich alebo nefotosyntetizujúcich baktériách. Najrozšírenejšími karotenoidmi sú:  $\beta$ -karotén,  $\gamma$ -karotén, lykopen, astaxantín, luteín [8].

Štruktúrne sa tieto zlúčeniny zaraďujú medzi izoprenoidné polyény, ktoré sú rozpustné v tukoch. Delia sa na: (1) prekursor vitamínu A, napr.  $\beta$ -karotén, (2) pigmenty s čiastočnou aktivitou vitamínu A napr. kryptoxantín, (3) látky, ktoré nie sú prekursorom vitamínu A a taktiež sa nesfarbujú alebo farbivá málo, napr. violaxantín a (4) deriváty, ktoré nie sú prekursorom vitamínu A, ktoré farbivá napr. luteín. Karotenoidy zaujímajú v prírode veľké množstvo stereozomérov, nakoľko ich štruktúra obsahuje veľa dvojitého konjugovaného väzieb a cyklické koncové skupiny [13].



**Obrázok 1:** Štruktúrne rozdelenie flavonoidov na podskupiny [12].

### 1.1.2.3 Antokyány

Sú prírodné pigmenty spadajúce pod skupinu flavonoidov (Obrázok 1). Štruktúrne sú to zvyčajne glykozidy polyhydroxy- a polymetoxy- derivátov 2-fenylbenzopyryliových alebo flavyliových solí [12]. Rozdiel medzi viacerými formami antokyánov je v počte hydroxylovaných skupín v molekule a v miere metylácie týchto skupín. Významné je taktiež množstvo cukrových zvyškov a ich miesto priradenia k molekule a množstvo alifatických a aromatických kyselín pripojených k cukornatým zvyškom. Medzi najčastejšie vyskytujúce sa antokyány v prírode zaradíme: pelargonidín, cyanidín, peonidín, delphinidín, petunidín a malvidín. Tieto látky nie sú škodlivé, sú vo vode rozpustné, a preto sa vo vysokej miere používajú ako prírodné farbivá, nakoľko sú zodpovedné za oranžové, ružové, fialové, červené a modré sfarbenie kvetov, niektorých rastlín a ovocia. Pôsobia ako antioxidanty, prevencia pred neurálnymi, kardiovaskulárnymi ochoreniami a cukrovkou [14], [15].

### 1.1.2.4 Triesloviny

Sú látky zaradujúce sa medzi polyfenoly, ktoré majú rôznu relatívnu molekulárnu hmotnosť a vytvárajú komplexy so sacharidmi a bielkovinami. V rámci vyšších rastlín sa tieto metabolity rozdeľujú na dve základné skupiny: hydrolyzovateľné a kondenzované. Avšak ďalšou špecifickou skupinou trieslovín sú flortaníny izolované zo špecifických druhov hnedých rias, ktoré pozostávajú výhradne z jednotiek floriglucínu navzájom oxidatívne

poprepájaných cez väzby C-C a C-O. Základnou štruktúrou hydrolyzovateľných trieslovín je polyol, ku ktorému je jedna alebo viac monomérov kyseliny galovej pripojených esterovou väzbou. Pri kondenzovaných trieslovínach je hlavnou štruktúrnou jednotkou reťazec flaván-3-ol [16].

Tieto prírodné polyméry sa nachádzajú v strukovinách ako napr. hrach a fazuľa, v ovocí ako napr. jablká, banány, ostružiny, jahody a taktiež vo vínach a čajoch. Ich účinok na ľudské zdravie môže byť dvojaký. Bolo preukázané, že pôsobia antikarcinogénne a antimutagénne, avšak na druhej strane môžu pôsobiť antinutrične a môžu mať za následok vznik rakoviny. Ale dávka potrebná na vyvolanie rakoviny je ďaleko vyššia než sa stretávame počas prijímania bežnej stravy. Z toho dôvodu triesloviny nie sú považované za silné karcinogény a preto sa aj kyselina tanínová zaraďuje medzi GRAS aditíva [17].

### 1.1.3 Chlorofyl

Tento pigment je najrozšírenejšie farbivo v prírode nachádzajúce sa nielen v zelených fotosyntetizujúcich rastlinách, ale aj v morských riasach, ktoré sú populárne a využívané ako tradičné jedlo v ázijských kuchyniach. Základný typ chlorofylu je chlorofyl *a*, zodpovedný za transfer svetelnej energie do chemických akceptorov, ktorý dopĺňa chlorofyl *b*, nachádzajúci sa vo vyšších rastlinách, chlorofyl *c*, nachádzajúci sa v hnedých riasach a chlorofyl *d*, nachádzajúci sa v červených riasach. Majú štruktúru porfyrínového kruhu podobne ako štruktúra hemoglobínu, s tým rozdielom, že centrálnym atómom chlorofylu je magnézium [18], [19].

Jeho jedinečnosť spočíva v štruktúre, ktorá mu umožňuje vytvárať komplexy s nebezpečnými mutagénmi a chemickými karcinogénmi a následne predchádzať mechanizmom, ktoré by mohli spôsobovať vznik rakoviny. Hoci v niektorých štúdiách bol chlorofyl prezentovaný ako pre-oxidant, pôsobí aj priaznivo ako antioxidant, záleží na prítomnosti svetla, ktoré naň pôsobí. Ďalšie priaznivé účinky chlorofylu sú: stimuluje imunitný systém, eliminuje vznik plesní v tele, prečisťuje črevá, detoxikuje pečeň, stabilizuje krvný tlak atď. [19].

## 1.2 Vybrané superpotraviny

### 1.2.1 Matcha

Je to mletý zelený prášok používaný pri príprave čaju v Japonsku. Pestuje sa špeciálnou zatieňovanou metódou, kedy rastlina čaju je z 90 % v tieni, naopak pri výrobe zeleného čaju je čajovník vystavený slnečným lúčom [20], [21]. Listy čajovníka sa ponechávajú v tieni približne 20 dní s cieľom zamedziť priamemu slnečnému žiareniu, a tým sa spomalí fotosyntéza v rastline, čo spôsobí vyššiu produkciu theanínu v rastline, ktorá udáva celkovú chuť matchy. Po zbere lístkov čajovníka nasledujú procesy naparovania, ochladzovania a sušenia, kedy vznikne finálny surový produkt nazývaný tencha. Táto surovina je nakoniec pomletá na kamenných mlynoch na výsledný zelený prášok – matcha [20].

Výhodou tohto špeciálneho čaju na rozdiel od ostatných je, že pri jeho užití konzument prehltnie v podstate celé množstvo listov použitých na jeho výrobu a tak dostane do tela všetky výživné látky z listu [21]. Matcha obsahuje odhadom 137-krát viac antioxidantov a 10-krát viac živín ako bežné listové čaje. Okrem theanínu sa vyskytujú v čajových lístkoch aj ďalšie

alkaloidy, a to teofilín a teobromín, ktoré sú účinkovo podobné kofeínu, ktorý sa tam nachádza v menšom množstve než theanín [22]. Flavonoidy ako epigalokatechín, katechín, epikatechín a epikatechíngalát tvoria ďalšiu značnú dominantnú zložku zelených lístkov [20]. V zastúpení vitamínov sa tu nachádzajú: kyselina askorbová, riboflavín, kyselina nikotínová, pantoténová, listová a karotenoidy. Matcha je tiež bohatý zdroj minerálov [22].



**Obrázok 2:** Matcha a tradičné náčinie na prípravu nápoja z tohto rastlinného produktu [23].

### 1.2.2 Rooibos

*Aspalathus linearis*, všeobecne známy ako Rooibos, je ker, z ktorého listov a stoniek sa pripravuje čaj Rooibos. Táto rastlina rastie v provincii Západného Kapska v Južnej Afrike [24], [25]. Vyrába sa v dvoch formách: fermentovaný a nefermentovaný, pričom nefermentovaný obsahuje vyššie množstvo antioxidantov [25]. Narozdiel od vyššie spomínanej matchi, rooibos neobsahuje kofeín a obsahuje nízke množstvo tanínov. Výnimočnosť tejto rastline dodáva antioxidant aspalatín, ktorý sa vyskytuje jedine v tejto rastline [24].

Jeho liečivé vlastnosti pomáhajú pri odľahčení alergií, dermatologických problémoch, astme, detskej kolike a pri nevoľnosti žalúdka a pálení záhy. Uvádza sa tiež, že môže zlepšiť chuť do jedla, znižuje napätie a zlepšuje spánok. Niektoré štúdie poukazujú na jeho antimikrobiálny účinok voči určitým mikroorganizmom, ako sú *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* a *Streptococcus mutans* [26].



*Obrázok 3: Rooibos na prípravu čaju [24].*

### **1.2.3 Fenikel obyčajný**

Fenikel je liečivá rastlina pochádzajúca zo Stredomoria. V našich miernych podmienkach rastie väčšinou v záhradách a na poliach. Môže dorastať až do výšky 2 metrov. Jeho stonka je bohato rozkonárená. Rastlina má charakteristickú arómu a na liečebné účely sa spracovávajú najmä jej plody [27].

Tieto liečivé plody sa používajú v období tehotenstva, pri dojčení, tráviacich ťažkostiach ako mierne spazmolytikum, liek uvoľňujúci kľče, pri nadmernej plynatosti, zápale horných dýchacích ciest. Hlavné obsahové zložky feniklu sú: anetol, fenchón, estragol,  $\alpha$ -pinén,  $\beta$ -pinén, limonén, kampfén, myrcén, sabinén, kyselina kávová, ellagová, a ferulová [28].

### **1.2.4 Echinacea**

*Echinacea purpurea* je severoamerická rastlina, ktorá sa vyskytuje v 9 rôznych prírodných druhoch, no je preukázané, že iba tri z nich majú liečivé účinky, ktoré sa využívajú v tradičnom liečiteľstve. Používanými časťami sú kvety, korene, stonky a listy, najviac obsahových látok sa nachádza v kvetoch. Medzi hlavné účinné látky patria: deriváty kyseliny kávovej (echinakozid, kyselina cichrová, cynarín), polysacharidy, alkaloidy, inulín, glykoproteíny, alkamidy a tiež menšie množstvo silíc [29].

Pôsobí hlavne antibakteriálne a antivírusovo, používa sa pri liečbe infekcie močových ciest, ústnej dutiny, zápale d'asien, pri liečbe angíny a lokálne aplikovanou tinktúrou sa liečia rany a kožné vredy. Predáva sa vo forme kvapiek, sirupu, pastiliek a v sušenej forme (kvety, vňať, koreň) [29].

## 1.2.5 Lesné plody

### 1.2.5.1 Jahody

Jahody sú vynikajúcim zdrojom vitamínu C a K, vlákniny, kyseliny folovej, mangánu a draslíka. Sú tiež zdrojom antokyánov, ktoré sú prevenciou voči zápalovým a srdcovým ochoreniam. Obsahujú málo cukru, a sú teda vhodné na konzumáciu počas držania diéty. Hoci sú jahody prospešné pre zdravie, často pôsobia ako alergény [30].

### 1.2.5.2 Brusnice

Toto červené bobuľovité ovocie je výborným diuretikum, ktoré prečisťuje močové cesty od baktérií, podporuje tvorbu moču a jeho vylučovanie a znižuje tvorbu obličkových kameňov. Konzumácia brusníc je vhodná pre diabetikov, keďže pomáha pri znižovaní glukózy v krvi. Extrakty brusnicových kvetov sa používajú pri reumatických ochoreniach. Taktiež jedenie tohto ovocia má priaznivý vplyv na stav chrupu [31].

### 1.2.5.3 Čučoriedky

Čučoriedky ako aj ostatné lesné plody sú skvelým zdrojom antokyánov a fenolických zlúčenín. Fenolické látky nachádzajúce sa v čučoriedkach sú: kyselina chlorogenová, kvercetín, kempferol, myricetín, katechíny, epikatechíny, resveratrol, proantokyanydy, a vitamín C [32].

### 1.2.5.4 Ostružina malinová a černicová

Ostružina malinová je zdrojom trieslovín (galo- a elagotaníny), flavonoidov, pektínu, vitamínu C a fenolových kyselín. Maliny sú dobrým pomocníkom počas tehotenstva, nakoľko posilňujú svalstvo maternice a podporujú pôrodné sťahy. Majú tiež močopudný účinok, čo pomáha pri zápalových ochoreniach močových ciest a tiež sú účinné pri hnačkách a prechladnutí [33].

Plody ostružiny černicovej sú bohaté na vitamíny C, A, E a kyselinu listovú. Najväčšie zastúpenie z minerálov má Zn, ďalej sú to Cu, Al, Mn, Co a Fe. Zaujímavosťou je, že v listoch tejto plodiny boli nájdené málo vyskytujúce sa prvky La, Lu, Ce, Yb, Tb, Nd a Eu. Hlavné fenolické látky nachádzajúce sa v plodine sú kyselina elagová, galová, myricetín, kempferol a najviac zastúpené flavonoidy sú kvercetín, katechín a epikatechín. Ostružina černicová sa používa pri liečení hnačky, vnútorného krvácania a pri zväčšení štítnej žľazy [34].

## 1.2.6 Mrkva

Rozšírená koreňová zelenina, ktorá pochádza z čeľade mrkvovitej. Pestuje sa viacerými spôsobmi, buď sa seje samostatne alebo sa vyseje medzi ostatné plodiny napr. do maku, hrachu alebo špenátu [35]. Mrkva je zásobárňou karotenoidov (provitamín A), pigmentov, fenolov, vlákniny, polyacetylénov, vitamínu C, D, E, K, B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, vápnika, magnézia, fosforu, železa a ďalších iných stopových minerálov. Najväčšie zastúpenie z karotenoidov má β-karotén, následne α-karotén a luteín [36], [37].

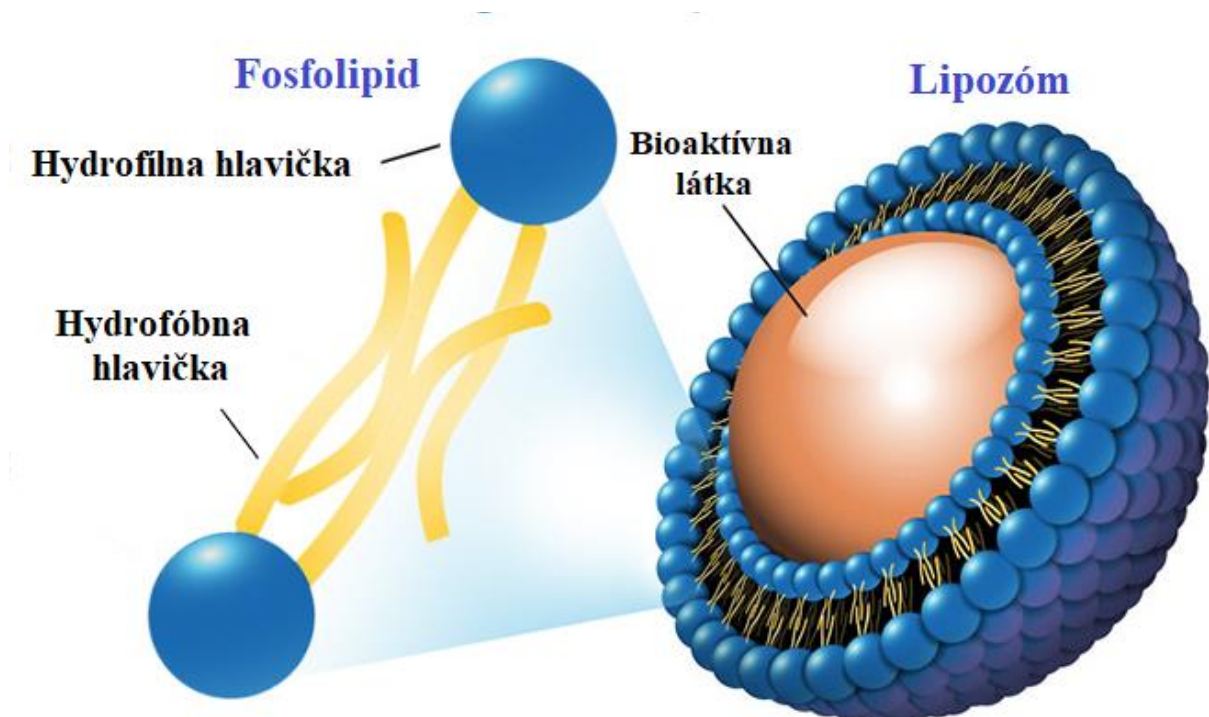
Konzumácia mrkvy je jednoduchý spôsob, ako znížiť hladinu cholesterolu v krvi. Udržiava zdravé oči a zdravý vývoj zubov, zlepšuje trávenie a peristaltiku, pomáha pri migréne a zápalových bolestiach kĺbov. Preferuje sa vo varenej forme, pretože je ľahšie stráviteľná pre



človeka a prevarenie mrkvy zabezpečí účinnejšie vstrebanie potrebných vitamínov do tela. Tiež výbornou formou prijatia vitamínov z mrkvy je pitie mrkvových štiav [38].

### 1.3 Lipozómy

Lipozómy sú malé vezikulárne systémy pripomínajúce dvojvrstvu biologickej membrány fosfolipidov. Na základe tejto štruktúrnej biologickej podobnosti s membránami sú tieto častice vhodné ako dopravné systémy látok, ktoré sú zachytené vo vnútornom vodnom jadre lipozómu alebo imobilizované medzi lipidickou vrstvou, do tela človeka [39], [41]. Tieto systémy sú netoxické, biokompatibilné, biodegradovateľné, zlepšujú rozpustnosť inkorporovanej látky a zabraňujú jej chemickej a biologickej degradácii počas transportu. Najčastejšie používané fosfolipidy na prípravu lipozómov sú fosfatidylcholín, fosfatidylserín, fosfatidyletanolamín, fosfatidylinozitol, dipalmitoylfosfatidylcholín atď. [41]. Fosfolipidy vytvárajú vezikulárny útvar pôsobením hydrofóbných síl acylových reťazcov vo vodnom prostredí, tento spôsob usporiadania je pre nich termodynamicky priaznivý a môže byť ešte vystupňovaný elektrostatickými interakciami a van der Waalsovými silami [41].



*Obrázok 4: Štruktúra lipozómu a fosfolipidu [43].*

Použitie lipozómov ako transportných útvarov môže byť užitočné pri liečbe rakoviny, leishmaniózy, metabolických porúch a hubových ochoreniach. Taktiež sú prísľubom do budúcnosti ako transportéry DNA pri in vivo génej terapii. Je snaha tieto systémy komercializovať v podobe protirakovinových terapeutík ako napr. Doxil, Myocet atď. [43].

Podľa zloženia a mechanizmu intracelulárneho transportu delíme lipozómy do piatich skupín:

- konvenčné lipozómy,
- pH-senzitívne lipozómy,
- kationové lipozómy,
- imunolipozómy,
- a dlho-cirkulujúce lipozómy [39].

Významným faktorom, ktorý ovplyvňuje životnosť lipozómov a enkapsuláciu bioaktívnej látky, je veľkosť lipozómov a počet lipidických vrstiev. A teda lipozómy na základe týchto parametrov delíme na:

- SUV– malé unilamelárne vezikuly: 20-100 nm;
- LUV– veľké lamelárne vezikuly: > 100 nm;
- GUV– obrovské unilamelárne vezikuly: > 1000 nm;
- OLV– oligolamelárne vezikuly: 100-500 nm;
- MLV– multilamelárne vezikuly: > 500 nm [39].

### **1.3.1 Príprava lipozómov**

#### ***1.3.1.1 Metóda TLE***

Tento postup prípravy lipozómov je najbežnejší a jednoduchý pre prípravu multilamelárnych vezikúl rozpustením fosfolipidov v organických rozpúšťadlách, ako sú dichlórmetán, chloroform, etanol a popri prípade zmes chloroformu a metánu. Po vákuovom odparení rozpúšťadla pri teplote jeho varu sa vytvorí tenká homogénna vrstva lipidov na stenách banky. Nasleduje krok hydratácie v rámci, ktorého sa pridá k vytvorenej vrstve destilovaná voda alebo fosfátový pufo. Nevýhodou tejto metódy je, že vzniká nehomogénna zmes lipozómov rôznych veľkostí s nízkou enkapsulačnou účinnosťou [40].

#### ***1.3.1.2 Injekčná metóda***

Poznáme éterovú a etanolovú metódu. Pri éterovej metóde sa roztok lipidov je rozpustený v étere alebo zmesi éter/methanol, ktorý je pomaly injekčne aplikovaný do vodného roztoku látky, ktorá má byť enkapsulovaná. Následne je organické rozpúšťadlo odstránené za zníženého tlaku, čo spôsobí formovanie lipozómov. Pomocou etanolovej metódy je roztok lipidov rýchlo injekčne aplikovaný do nadbytku predhriatej vody alebo tris-HCl pufru a následné vytvorenie lipozómov a začlenenie látky závisí na hydrofóbnej/hydrofilnej interakcie látky s lipidmi [41].

#### ***1.3.1.3 Odparovanie na reverznej fáze***

Pomocou tejto metódy sa dosahuje vysokej enkapsulačnej účinnosti látky. Pri tvorbe lipozómov sa použijú organické rozpúšťadlá, ako napr. éter/isopropyl éter, zmes dietyl éteru /chloroform alebo chloroform/metanol obsahujúce fosfolipidy. Organická fáza by nemala byť miesiteľná s vodnou fázou, čím sa vytvorí emulzia O/V. Následne je do vodnej fáze pridaný citrát-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pufo s cieľom účinného formovania lipozómov [41].

### **1.3.1.4 Ultrazvuková enkapsulácia**

Táto metóda je najrozšírenejšia pre prípravu malých unilamelárných vezikúl, no taktiež sa môžu pomocou tejto metódy pripraviť multilamelárne vezikuly. Pôsobením ultrazvukovej frekvencie na lipidický roztok vzniknú lipozómy. Počas pôsobenia tejto energie sa vytvára teplo a je potreba kadičku s roztokom chladit' [42].

### **1.3.2 Aplikácie lipozómov**

Bolo zistené, že lipozómy majú priaznivý účinok pri liečbe dýchacích problémov, kedy enkapsulácia liečivej látky do lipozómu ju stabilizuje a redukuje toxicitu než pri použití obyčajných aerosólov. Ďalej pomáhajú pri liečení očných chorôb, kedy bolo preukázané, že enkapsulovaný verteprofín v lipozomálnej forme zvýšil humorálnu imunitu. Okrem toho bolo preukázané, že enkapsulovaný amitriptylín, ktorý sa používa na liečenie mentálnych porúch, bol transportovaný cez hematoencefalickú bariéru, čo by nebolo možné, pokiaľ by bol podaný inak než v lipozomálnej forme [43].

Kvôli podobnosti ich štruktúry a ľudskej pokožky sú lipozómy vhodné do kozmetických prípravkov, kde stabilizujú látky ako napr. masné kyseliny, antioxidanty a vitamíny potrebné pre liečbu kožných ochorení alebo prevencii. Úpravou možno docieľiť ich pôsobenie ako biomarkerov v diagnostike. Nedávne štúdie diskutujú možnosti dopravy tkaninových kultúr kostí a svalov pomocou lipozómov [44].

## **1.4 Bunkové kultúry**

Pre izoláciu uniformných buniek z tkaniva, ktoré obsahuje veľa typovo odlišných buniek, je potreba narušiť extracelulárnu maticu, ktorá drží bunky pohromade. To sa docieľi väčšinou použitím proteolytických enzýmov (trypsín, kolagenáza) spolu s činidlami (EDTA), ktoré naviažu vápenaté ióny, na ktorých je závislá vzájomná adherentnosť buniek. Takto získané bunky priamo z tkaniva, ktoré sa kultivujú pri špecifických podmienkach daných buniek a proliferujú *in vitro*, nazývame primárne kultúry [45], [46]. Primárne kultúry sú adherentného a suspenzného typu. Adherentné bunky sa potrebujú pre svoj rast viazať k nejakému povrchu, zatiaľ čo suspenzné bunky nevyžadujú pre svoj rast naviazanie sa k akémukoľvek povrchu. Adherentné bunky môžu byť získané napr. z pečene, kde sú imobilizované medzi spojivovým tkanivom, zatiaľ čo suspenzné bunky sú odvodené z buniek vyskytujúcich sa v krvnom obehú ako napr. lymfocyty [46].

Sekundárne bunky alebo subkultúra sú bunky získané z primárnych buniek pasážovaním, kedy sa už bunky primárnej kultúry natoľko pomnožili v kultivačnej nádobe, že pre svoj rast už nemajú priestor [46].

Bunková kultúra získaná z jednej bunky majúcej jednotné genetické zloženie sa nazýva bunková línia. Na základe životnosti sa delia na ďalšie dva typy: konečné a kontinuálne. Líšia sa v miere a rýchlosti proliferácie [46]. Schopnosť rozmnožovania buniek je limitovaná tzv. Hayflickovým limitom, ktorý zistil, že populácia buniek sa rozmnožuje iba do určitej miery a potom odumiera. No týmto parametrom nie sú limitované bunky, ktoré boli zmutované a ich reprodukcia je neobmedzená. Jedným z najvýznamnejších príkladov takýchto buniek sú tzv. HeLa bunky [47].

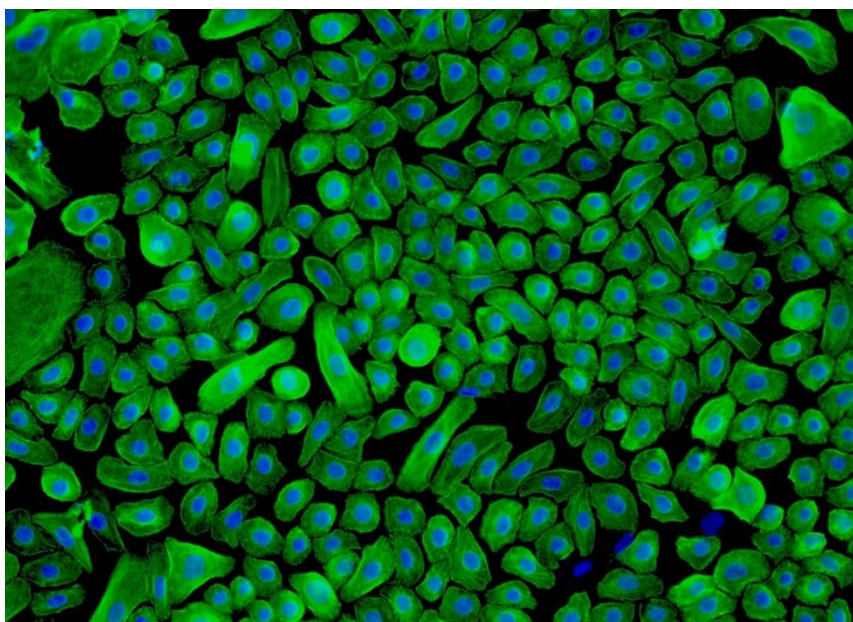
### 1.4.1 Epiteliálne bunky

Epiteliálne bunky tvoria rozsiahle tesne spojujúce sa vrstvy, ktoré vytvárajú kontinuálny list pokrývajúci rôzne časti tela a ľudské orgány (pľúca, močové cesty, pokožku, cievy, ústnu dutinu) [48]. Nachádzajú sa u zvierat, ale aj rastlín. Tieto bunky sú vhodné na štúdium zápalov, rakoviny, génovej regulácie, bunka/matrix interakcie a taktiež sa dajú aplikovať v toxikologickom smere [49].

### 1.4.2 Keratínocyty

Keratínocyty sú špecializované bunky nachádzajúce sa spolu s melanocytmami a Langerhansovými bunkami v pokožke, ktorá má za úlohu vytvárať bariéru tela medzi vonkajším a vnútorným prostredím. Nachádzajú sa v bazálnej vrstve pokožky, z ktorej niektoré bunky putujú k povrchu pokožky, kde sa počas putovania menia biochemicky a morfológicky. Nakoniec sa na povrchu pokožky diferencujú v mŕtve bunky a vytvárajú stratum corneum. Počas procesu diferenciácie keratínocyty syntetizujú dôležité štrukturálne a katalytické proteíny involucrin, keratín, filaggrín a transglutaminázu [50]. Proces dozrievania keratínocytov sa nazýva keratinizácia a trvá približne 3-4 týždne. Tieto bunky sa používajú nielen na testovanie toxicity nebezpečných látok, ale aj na stimuláciu hojenia rán, lebo nie sú schopné trvalého zahojenia a vytvorenie trvalého kožného krytu [51].

Imortalizáciou keratínocytov vzniká nová skupina, a to HaCaT bunky, ktorým normálne funguje metabolizmus aminokyselín a sú citlivé na pôsobenie cytokínov. Používajú sa na štúdium epidermálnej homeostázy a jej patofyziológie [52]. Využívajú sa najmä kvôli ich schopnosti proliferovať dlhšiu dobu než keratínocyty (>140 pasáži) a vysokej kapacite diferenciácie. Imortalizácia keratínocytov sa dosahuje pomocou vírusu SV40 [53].



*Obrázok 5: Morfológia keratínocytov; 200x zväčšenie [54].*

## 1.5 Kultivácia bunkových kultúr

Základom pre kultiváciu buniek je výber správneho média, ktoré poskytuje bunke rastové faktory, nutričné zložky, hormóny a taktiež reguluje pH a osmotický tlak kultúry. Na začiatku vývoja kultivácií buniek sa používali prírodné média získané z telových tekutín a extraktov tkanív. Dnes sa používajú tri základné média: bazálne médium, sérum-redukované médium a médium bez séra, ktoré sa líšia v množstve použitého séra [55].

- bazálne médium – najčastejšie používané, médium podporené sérom, obsahuje aminokyseliny, vitamíny, anorganické soli a zdroje uhlíka napr. glukóza
- sérum redukované médium – sú to bazálne média podporené vyšším obsahom živín a derivovanými živočíšnymi faktormi
- médium bez séra – médium úplne bez séra je nahradené s potrebnými živinami a hormónmi potrebnými pre rast buniek a výhodou je tvorba selektívnych médií pre jednotlivé typy buniek. Nevýhodou je pomalší rast kultúr v týchto médiach.

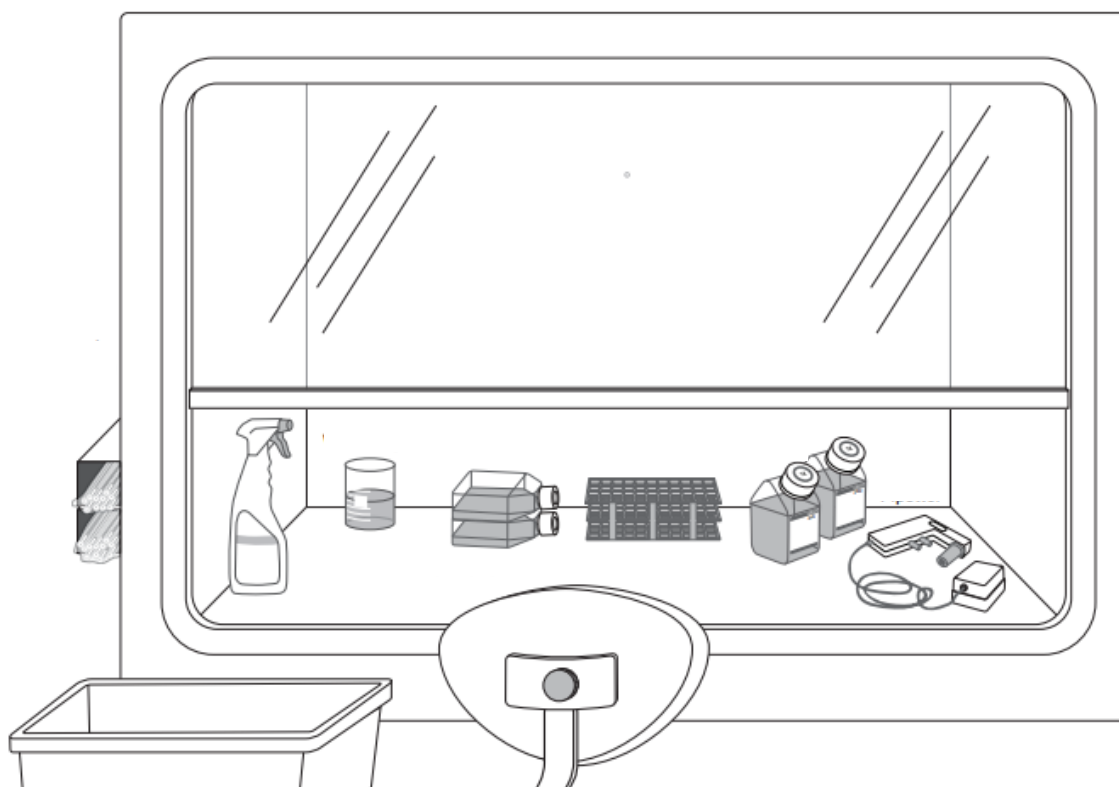
Hoci sú živočíšne séra (hovädzie, teľacie, fetálne) dobrým zdrojom rastových a adhezných faktorov, hormónov, lipidov a minerálov, je však ich cena privysoká, sú problémy s ich štandardizáciou a sú špecifické pre jednotlivé bunky.

Ďalšie faktory ovplyvňujúce správny rast kultúr je pH, teplota a obsah CO<sub>2</sub>. Najoptimálnejšie pH pre rast ľudských buniek je pH 7,4. Avšak pri niektorých líniiach sa o pár desiatín táto hodnota mení. Niektorým bunkovým líniiam vyhovuje kyslé prostredie pri pH 7,0-7,4, fibroblasty preferujú pre svoj rast zas bazické prostredie pri pH 7,4-7,7. Teplota kultivácie buniek závisí na teplote prostredia, z ktorého bunky boli odobrané, čo pri ľudských bunkách je 36-37 °C. Vzduch v termostate je obohatený zvyčajne o 5-7% CO<sub>2</sub>, ktorý zaisťuje vyrovnanie rovnováhy rozpusteného CO<sub>2</sub> v médiu a biuhlíčitanu vo vzduchu, čo následne ovplyvňuje pH v médiu [55].

Každé laboratórium bunkových kultúr by malo byť vybavené nasledujúcimi najdôležitejšími zariadeniami: inkubátorom, laminárny boxom, centrifúgou, chladničkou, mraziakom (do -20°C), autoklávom, vodnou kúpeľou [56].

## 1.6 Testovanie cytotoxicity a genotoxicity

Cytotoxické testy sú široko rozšírené v toxikologických štúdiách. Slúžia k prvotnému ohodnoteniu toxicity určitej látky, čo je pre stanovovanie toxicity rastlinných extraktov a bioaktívnych látok ideálne, nakoľko tieto látky môžu byť ďalej použité pri výrobe liečiv alebo byť súčasťou kozmetických prípravkov. Niektoré látky vykazujú protirakovinové účinky, a teda ich účinnosť môže byť relatívne jednoducho a rýchlo overená v rámci testovania cytotoxicity rakovintvorných buniek [57]. V priebehu testovania cytotoxicity sa sledujú viaceré parametre, na základe ktorých sa testy od seba odlišujú. Sleduje sa enzymatická aktivita buniek, priepustnosť bunkovej membrány, bunková adherencia, produkcia ATP, koenzým produkcia a absorpčná aktivita nukleotidov [58]. S používaním prírodných extraktov v kozmetike alebo vo farmácii vo forme liečiv, potravinových doplnkov sa rozvinuli aj genotoxické a karcinogénne testy, nakoľko bolo preukázané, že medzi genotoxicitou a karcinogenitou a mutagenitou je korelácia. Genotoxické testy sú založené na schopnosti látky interagovať s nukleovými kyselinami pri nízkych koncentráciách [59].



**Obrázok 6:** Ilustrácia základného vybavenia laminárneho boxu pri práci s ľudskými bunkovými kultúrami [56].

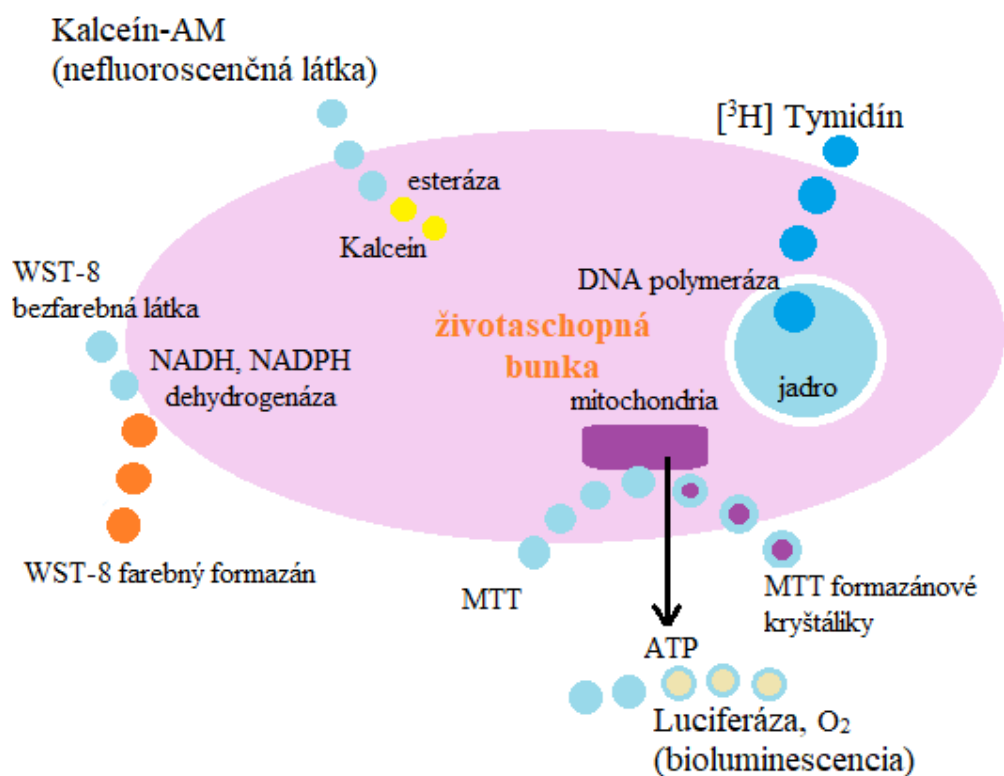
Ak je látka toxická, reaguje s DNA a dochádza k chromozonálnej aberácii alebo štruktúrnym zmenám DNA, čo vedie k ireverzibilným zmenám v bunke. Tieto zmeny sú predispozície pre vznik chorôb, narušenie reprodukcie a zvyšujú mortalitu. Najpoužívanejšie genotoxické testy uvedené v Európskej legislatíve sú Amesov test, mikrojadrový test na ľudských bunkách, test chromozonálnej aberácie, ktoré prebiehajú spôsobom *in vitro* a test génovej mutácie, alkalický kometový test, mikrojadrový test erytrocytov, ktoré prebiehajú spôsobom *in vivo*. Prvé tri podkapitoly (1.6.1, 1.6.2, 1.6.3) uvádzajú príklady cytotoxických testov, zatiaľ čo posledné tri podkapitoly (1.6.4 – 1.6.6) popisujú základné genotoxické testy [60].

### 1.6.1 LDH test

Tento test funguje na princípe sledovania nekrózy buniek, počas ktorej sa uvoľňuje laktátdehydrogenáza z poškodených buniek do okolia. Tento enzým sa vyskytuje skoro vo všetkých typoch buniek a dôležitým faktorom je, že počas nekrózy buniek nestráca svoju aktivitu na rozdiel od adenylátkinázy a glukóza-fosfátdehydrogenázy. Laktátdehydrogenáza je rozpustný cytoplazmatický enzým, ktorý redukuje oxidovanú formu NAD na NADH, kedy katalyzuje oxidáciu laktátu na pyruvát. Následne pyruvát reaguje s 2,4-dinitrofenylhydrazínom za vzniku dinitrofenylhydrazín- pyrohroznovej kyseliny, ktorá má červenohnedé sfarbenie, na základe ktorého sa zmeria spektrofotometricky aktivita LDH [61], [62].

### 1.6.2 MTT test

MTT test je kolometrický test ako aj LDH test. Pomocou neho sa určuje metabolická aktivita buniek v kultúre, konkrétne aktivita sukcinátdehydrogenázy, ktorá redukuje tetrazóliovú soľ na nerozpustný formazán, ktorý sa uvoľní z bunky pomocou detergentu a okyslenia. Následné sa rozpustená látka stanoví spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke medzi 500 – 600 nm. Tento spôsob testovania cytotoxicity je najrozšírenejší, avšak je potrebné ho optimalizovať, nakoľko bolo preukázané, že MTT farbivo by mohlo aktivovať faktory ovplyvňujúce apoptózu buniek, ako sú kaspáza-8 a kaspáza-3 [62].



Obrázok 7: Mechanizmy jednotlivých testov cytotoxicity [57].

### 1.6.3 XTT test

Tento postup testovania cytotoxicity je principiálne rovnaký ako MTT test, keď sa sleduje extracelulárna redukcia látky XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazólium-5-karboxyanilid) produkovaným NADH v mitochondriálnej membráne. Avšak použitá zlúčenina vytvára vo vode rozpustný formazán, ktorý sa uvoľňuje priamo do média, a teda odpadá krok, kedy sa pridáva látka na rozpustenie formazánu. Taktiež je tento test citlivejší, nakoľko dokáže detegovať najmenej 500 buniek na jamku testovanej dosičky [63].

### 1.6.4 Amesov test

Pomocou testu sa určuje mutagénny potenciál zlúčenín. Pri tomto experimente sa používa špeciálny kmeň baktérie *Salmonella typhimurium*, ktorý obsahuje zmutovaný gén pre syntézu aminokyseliny histidínu. Tento kmeň je vystavený potenciálnym genotoxickým látkam na živnej pôde bez histidínu. Ak látka nie je toxická, kolónie baktérii neprežívajú, ale naopak ak

sú genotoxické, nastáva spätná mutácia zmutovaného génu a kolónie sú znova schopné produkovať aminokyselinu a dokážu rásť na živnej pôde bez histidínu [64].

### **1.6.5 Kométový test**

Genotoxický kométový test prebieha v alkalickom prostredí a skúma poškodenú DNA, konkrétne jedno- a dvojreťazové zlomy na DNA. V alkalickom prostredí denaturuje DNA a pri elektroforéze DNA putuje ako polyanión ku kladnej elektróde. Čím je viac poškodenej DNA, tým viac DNA migruje z jadra a po sfarbení vytvárajú jej fragmenty útvary pripomínajúce kométy [65].

### **1.6.6 SOS chromotest**

Tento test sa stanovuje na bakteriálnom organizme, a to konkrétne pomocou *Escherichia coli* – kmeň PQ 37. Hoci toto testovanie neprebieha s ľudskými bunkami, mnohými štúdiami bolo dokázané, že je silná korelácia medzi genotoxickým účinkom na bakteriálnych bunkách a mutagénym účinkom na ľudských bunkách. Výhoda použitia bakteriálnych buniek spočíva v ich rýchlom raste na médiu, čo šetrí dobu trvania experimentu a predstavuje aj úsporu finančných nákladov [66].

Po vystavení bakteriálnych buniek testovaným látkam počas 2 hodín sa sleduje aktivita alkalickéj fosfatázy a  $\beta$ -galaktozidázy. Enzým  $\beta$ -galaktozidáza je markerom indukcie SOS reparačného systému vyvolaného poškodením genetickej informácie a alkalická fosfatáza poukazuje na viabilitu buniek a slúži ako normalizačný faktor pri stanovovaní  $\beta$ -galaktozidázovej aktivity. Aktivita enzýmov sa stanovuje spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 405 a 630 nm. Výsledná miera genotoxicity vystavenej látky sa určí pomocou tzv indukčného faktoru (SOSIF), ktorý sa vypočíta ako pomer normalizovaných hodnôt  $\beta$ -galaktozidázových aktivít a negatívnej kontroly. Minimálna genotoxická koncentrácia má hodnotu SOSIF vyššiu ako 1,5 [67].



## 2 CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce je štúdium obsahu aktívnych látok vo vybraných druhoch tzv. superpotravín, najmä rastlinného pôvodu a ich interakcie s ľudskými bunkami. V rámci práce budú riešené nasledujúce čiastkové úlohy:

- literárna rešerš (superpotraviny, aktívne látky, bunkové kultúry)
- optimalizácia metód stanovenia aktívnych zložiek vybraných superpotravín a nápojov
- kultivácie ľudských keratínocytov, optimalizácia testov cytotoxicity
- testovanie vplyvu superpotravín a zložiek na ľudské bunky
- vyhodnotenie výsledkov a diskusia

### 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

#### 3.1 Použité chemikálie na charakterizáciu extraktov a prípravu častíc

ABTS (2,2'- azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonát)), Sigma-Aldrich (SRN)  
Acetón, Lach-Ner (CZE)  
Albumín vaječný, Serva (SRN)  
Dodecylsírán sodný, Serva (SRN)  
Etanol 96%, Lach-Ner (CZE)  
Folin-Ciocalteu roztok, Penta s.r.o., (CZE)  
Hydrogenfosforečnan disodný, Vitrum-LachNer (ČR)  
Hydroxid sodný p.a., Lach-Ner (CZE)  
Chlorid hlinitý p.a., Lach-Ner (CZE)  
Chlorid sodný p.a., Lach-Ner (CZE)  
Chloroform-VWR Chemicals BDH PROLABO (IRL)  
Cholesterol, Serva (SRN)  
Katechín p.a., Sigma-Aldrich (SRN)  
Kyselina gallová p.a., Sigma-Aldrich (SRN)  
Kyselina chlorovodíková, Vitrum-LachNer (ČR)  
Kyselina octová p.a., Lach-Ner (CZE)  
L- $\alpha$ -fosfatidylcholín, Sigma-Aldrich (SRN)  
Metanol p.a., Lach-Ner (CZE)  
Peroxo­sírán draselný, Sigma-Aldrich (SRN)  
Polyhydroxybutyrát Lot 120 Biomer, Fakulta Chemická v Brne  
Sírán železitý hydrát, Lach-Ner (CZE)  
Thiokyanatan amonný p.a., Lach-Ner (CZE)  
Trietanolamín p.a., Lach-Ner (CZE)  
Trolox, Sigma-Aldrich (SRN)  
Trypanová modrá, Biotech (SRN)  
Uhlíčan sodný bezvodý, Lach-Ner (CZE)

##### 3.1.1 Použité potraviny

BIO Matcha Tea Harmony, mletý zelený čaj, výrobca: Kyosun s.r.o.  
Rooibos prírodný, bylinný čaj bio, predajca: Sonnetor, Brno  
Mrkva voľná, krajina pôvodu: Maďarsko, predajca: Supermarket Albert, Brno  
Mrazené lesné plody, predajca: Lidl, Brno  
Třapatka nachová nat' (Echinacea nat'), výrobca a distribútor: Valdemar Grešík – Natura s.r.o.  
Fenikel bylinný čaj, výrobca: Megafyt Pharma s.r.o

##### 3.1.2 Použité chemikálie pri práci s bunkami

3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid, Sigma-Aldrich (SRN)  
Antibiotic -Antymycotic 100X (Biosera), Biotech (SRN)  
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner (CZE)  
FBS, HyClone (USA)  
Gibco™ DMEM, ThermoFisher Scientific (USA)

Trypsin Versene EDTA, P-Lab (CZE)

Ostatné použité bežné chemikálie boli p.a. čistoty a boli získané od lokálnych distribútorov.

### **3.2 Prístroje a pomôcky**

Analytické váhy – Boeco (SRN)

Automatické pipety v rôznom rozsahu objemu – Discovery (SRN) a Biohit (SRN)

CelCulture CO<sub>2</sub> inkubátor – ESCO, Biotech (SRN)

ELISA ReaderBioTek ELx808 (USA)

Inverzní biologický mikroskop, Laboserv (ČR)

Koloidní DLS analyzátor ZetaSizer Nano ZS, Malvern (UK)

Mikrocentrifuga Sartorius – Sigma (SRN)

Optický mikroskop a Software Dino –Capture 2.0 (ČR)

Spektrofotometer S-220, Boeco (SRN)

Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls, Bandelin (SRN)

Univerzálna chladená centrifúga, Hermle (SRN)

Vortex Rex Top, Heidolph (SRN)

Nanophotometer P-Class P 300 – Implen (DE)

### **3.3 Príprava extraktov**

Jednotlivé potraviny boli navážené do Erlenmeyerovej banky v množstve 1 g a bolo pridaných 10 ml rozpúšťadla - buď vody alebo vodného roztoku etanolu v koncentráciách (20%, 40%, 60%, 80%, 96%). Nechali sa extrahovať po dobu 24 h.

Ovocné šťavy mrkvy a lesných plodov boli pripravené v odšťavovači. Tieto šťavy aj extrakty boli následne preliate do centrifugačných skúmaviek a zcentrifugované pri 7500 rpm na 5 minút.

### **3.4 Príprava častíc**

#### **3.4.1 Príprava lipozómov**

Navážilo sa 90 mg lecitínu a 10 mg cholesterolu, pridalo sa 10 ml destilovanej vody a tento roztok sa nechal ultrazvukovať po dobu 1 minúty, pričom každých 15 s sa obsah v kadičke jemným krúživým pohybom premiešal. Kadička počas ultrazvukácie roztoku bola čiastočne ponorená do Petriho misky s vodou, aby nenastalo prehriatie kadičky.

#### **3.4.2 Príprava kombinovaných PHB častíc**

Pri kombinovaných časticiach bolo navážené 20 mg PHB, 70 mg lecitínu a 10 mg cholesterolu a následne táto zmes bola rozsuspendovaná v 1 ml chloroformu a zahrievaná pri 50-60 °C vo vodnom kúpeli. Po rozpustení PHB v chloroforme sa obsah Eppendorfovej skúmavky vylial do kadičky, kde bolo napipetovaných 10 ml s extraktu potraviny alebo vody a obsah kadičky sa nechal ultrazvukovať na 1 minútu. Potom sa nechal odpariť chloroform v kadičke pri 50 °C za stáleho miešania na magnetickej miešačke.

### 3.5 Charakterizácia extraktov

#### 3.5.1 Stanovenie celkových polyfenolov

K 1 ml Folin-Ciocalteu činidlu zriedenému vodou desaťkrát bol pridaný 1 ml vody a 50  $\mu$ l vzorky. Roztok bol premiešaný pomocou vortexu a po 5 minútach bol pridaný nasýtený roztok uhličitanu sodného v množstve 1 ml. Po premiešaní a 15 min státi bola zmeraná absorbancia pri 750 nm. Ako kalibračný roztok bola použitá kyselina gallová v koncentračnom rozmedzí 0,1–0,5 mg/ml. Slepá vzorka obsahovala namiesto extraktu vodu.

#### 3.5.2 Stanovenie flavonoidov

Pri stanovovaní flavonoidov v extraktoch sa ako zásobný roztok použil katechín v koncentračnej rade 0,05–0,3 mg/ml. Bol rozpustený v 96% etanole. Pri stanovovaní vzoriek bolo do skúmavky pridané 0,5 ml stanovovanej vzorky, 1,5 ml destilovanej vody a 0,2 ml 5% roztoku dusitanu sodného. Obsah sa premiešal a nechal sa 5 minút stáť. Po tejto dobe sa do skúmavky pridalo 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého a zase sa obsah v skúmavke nechal stáť 5 minút. Následne sa pridalo 1,5 ml roztoku hydroxidu sodného (1 mol/l) a 1 ml destilovanej vody, po premiešaní obsahu sa nechal stáť ďalších 15 minút a po tejto dobe sa zmerala absorbancia pri 510 nm. V slepej vzorke sa namiesto extraktu použila destilovaná voda.

#### 3.5.3 Stanovenie antioxidačnej aktivity

Ako štandard pri stanovení antioxidačnej aktivity bol použitý roztok Troloxu v koncentračnom rozmedzí 50–400  $\mu$ g/ml. Ďalej sa pripravil roztok radikálového aniónu ABTS<sup>•+</sup>, ktorý sa získal reakciou ABTS o koncentrácii 7 mmol/l s 2,45 mmol/l peroxidisíranom draselným. Roztok sa ponechal v tme najmenej na 12 hodín pri laboratórnej teplote. Pred meraním sa ABTS<sup>•+</sup> zriedil s etanolom na absorbanciu približne 0,700  $\pm$  0,02 pri 734 nm oproti etanolu. Do zúženej kyvety sa napipetoval 1 ml zriedeného ABTS<sup>•+</sup> a 10  $\mu$ l destilovanej vody alebo etanolu a bola hneď zmeraná absorbancia v čase 0. Do skúmavky typu Eppendorf sa namiesto vody napipetovalo 10  $\mu$ l vzorky kyvety a 1 ml zriedeného radikálu, tento obsah sa premiešal a nechal sa stáť 10 minút v tme a následne sa zmerala absorbancia pri 734 nm. Výsledná absorbancia bola vypočítaná pomocou vzorca:  $A = A_0 - A_{10}$ .

#### 3.5.4 Stanovenie celkových antokyánov

Vzorky boli extrahované v 10 ml destilovanej vody po dobu 24 hodín. Z týchto extraktov sa odobrali 2 ml do Eppendorfových skúmaviek a upravilo sa ich pH na 2–3,5 použitím 0,1% kyseliny chlorovodíkovej. Následne boli extrakty zmerané spektrofotometricky pri 528 nm. Ako blank bola použitá kyselinou chlorovodíkovou okyslená destilovaná voda s pH na 2–3,5.

#### 3.5.5 Stanovenie chlorofylu

Navážil sa 1 g vzorky a ako rozpúšťadlo bol použitý 60% etanol. Extrakcia vzorky prebiehala 24 h za laboratórnej teploty v tme. Po tejto dobe sa extrakt sa napipetoval do sklenenej skúmavky a premeralo sa absorpčné spektrum od 200–800 nm na Nanophotometer P-Class P 300 – Implen. Hodnoty absorbancie sa odčítali pri vlnovej dĺžke 666 nm. Ako blank

bol použitý 60% etanol. Ako štandard pre zhotovenie kalibračnej závislosti bol použitý roztok chlorofylu *a*.

### 3.5.6 Stanovenie karoténov

Navážil sa 1 g vzorky a ako rozpúšťadlo bol použitý 60% etanol. Extrakcia vzorky prebiehala 24 h za laboratórnej teploty v tme. Po tejto dobe sa extrakt sa napipetoval do sklenenej kyvety a premeralo sa absorpčné spektrum od 200-800 nm na Nanophotometer P-Class P 300 – Implen. Hodnoty absorbancie sa odčítali pri vlnovej dĺžke 480 nm. Ako blank bol použitý 60% etanol. Ako štandard pre zhotovenie kalibračnej závislosti bol použitý roztok  $\beta$ -karoténu.

### 3.5.7 Stanovenie trieslovín

Pripravil sa pufor, ktorý obsahoval 0,20 M ľadovej kyseliny octovej, 0,17 M chloridu sodného rozpustených v destilovanej vode v 250 ml a jeho pH bolo upravené na hodnotu 4,9. Tento pufor sa použil na prípravu zásobného roztoku albumínu zo slepačieho vajička o koncentrácii 1 mg/ml. Ďalej sa pripravil roztok, obsahujúci 5% TEA a 1% SDS do 250 ml odmernej banky. Posledným pripraveným činidlom bol 0,01 M chlorid železitý rozpustený v 0,01 HCl a destilovanej vode. Pri stanovovaní boli použité 50% metanolové extrakty.

Do centrifugačných skúmaviek sa napipetovali 2 ml roztoku albumínu a 1 ml vzorky a celý obsah bol premiešaný na vortexe a uskladnený na 24 h do chladničky. Po tejto dobe sa vzorky zcentrifugovali pri 3000g na 15 minút a supernatant sa odliat. K peletke vytvorenej na dne skúmavky sa pridali 4 ml SDS/TEA a bola rozsuspendovaná. K peletke sa pridal 1 ml roztoku chloridu železitého a po 15 minútach bola zmeraná absorbancia pri 510 nm. Ako slepá vzorka bol použitý chlorid železitý v SDS/TEA. Ako kalibračný roztok bola použitá kyselina tanínová v koncentračnom rozmedzí 0,1–1,0 mg/ml.

## 3.6 Charakterizácia častíc

### 3.6.1 Stanovenie koncentrácie fosfolipidov pomocou Stewartovho testu

Ako štandardný roztok na toto stanovovanie bol použitý lecitín rozpustený v chloroforme o koncentrácii 0,1 mg/ml. Ďalej bol pripravený roztok činidla do 200 ml Erlenmeyerovej banky, ktorý obsahoval 5,4 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a 6,1 g  $\text{NH}_4\text{SCN}$  v destilovanej vode. Na stanovenie vzoriek bolo napipetované do centrifugačných skúmaviek: 50  $\mu\text{l}$  vzorky, 450  $\mu\text{l}$  destilovanej vody, 3 ml chloroformu a 2 ml reakčného činidla. Obsah skúmaviek bol premiešaný na vortexe a následne zcentrifugovaný pri 1000 rpm na 5 minút. Skúmavky sa ponechali na 15 minút v tme. Po tejto dobe boli vzorky zmerané na spektrofotometri pri  $\lambda = 430$  nm v sklenenej kyvete (pipetovalo sa zo spodnej fáze). Ako blank sa použil chloroform. Rovnica kalibračnej krivky bola  $y = 3,8591x$ .

### 3.6.2 Stanovenie enkapsulačnej účinnosti

Z roztoku pripravených lipozómov bol napipetovaný objem 0,5 ml do Eppendorfových skúmaviek a ich obsah sa nechal stočiť pri 11000 ot./min na 1 hodinu. Po tejto dobe sa odobralo 50  $\mu\text{l}$  supernatantu a stanovil sa u neho obsah polyfenolov spektrofotometricky. Výsledná hodnota sa vypočítala ako percentuálny rozdiel medzi množstvom polyfenolov vo vodnom extrakte a množstve polyfenolov v supernatante po centrifugácii.

### 3.6.3 Stanovenie dlhodobej stability

Pri tomto stanovovaní sa pracovalo so vzorkami uchovávanými pri 4 °C. Výpočet dlhodobej stability bol vyhodnotený z uvoľnenia polyfenolov do vodného prostredia v čase 0 a po mesiaci.

### 3.6.4 Stanovenie zeta potenciálu

Zeta potenciál bol zmeraný na prístroji Malvern Zetasizer ZS. Zmerané boli 100x nariadené roztoky lipozómov a PHB častíc. Do kyvety bol následne tento nariadený odliaty objem 1 ml a do kyvety bola vsunutá elektróda, ktorá merala daný potenciál.

### 3.6.5 Stanovenie veľkosti častíc a polydisperzity

Toto stanovovanie prebiehalo taktiež na prístroji Malvern Zetasizer ZS a boli pri tom použité 100x nariadené vzorky, avšak už sa nepoužila elektróda.

## 3.7 Kultivácia ľudských keratínocytov

HaCaT bunky boli kultivované v komerčnom médiu DMEM s 10% FBS a 1% ATB, ktoré sa skladovalo v chladničke pri 4°C. Médium pred použitím bolo vybrané z chladničky, aby sa jeho teplota stabilizovala na okolitú teplotu a tým sa predišlo teplotnému šoku, ktorému by mohli byť bunky vystavené. Bunky sa kultivovali v termoboxe pri teplote 37 °C 5% CO<sub>2</sub> a pri práci s nimi sa používali laboratórne rukavice, aby sa predišlo kontaminácii.

Bunky v kultivačnej nádobe boli skontrolované pod inverzným mikroskopom, či náhodou nie sú kontaminované a do akej miery pokryli dno nádoby a tiež sa skontrolovala morfológia buniek. Ak dno nádoby nebolo dostatočne porastené bunkami, tak sa vylialo staré médium a do nádoby bolo napipetované 15 ml nového média. Ak konfluencia buniek bola 70-80%, tak sa kultivované bunky pasážovali.

Pri pasážovaní sa taktiež vylialo staré médium a následne nádoba bola dvakrát prepláchnutá fosfátovým pufrom s objemom 5 ml. Následne sa pridal 1 ml enzýmu trypsín a nádobkou sa pomaly otáčalo, aby sa enzým rovnomerne rozliat cez celú plochu nádoby. Potom sa nádoba dala naspäť do inkubátora približne na 10 minút. Po tejto dobe sa skontrolovalo, či sa bunky odlúčili z dna nádoby, ak nie, boli naspäť vrátené do inkubátora na pár minút. Do centrifugačných skúmaviek sa napipetovalo 5 ml fosfátového pufru. Týmto pufrom bolo dno nádoby s bunkami viackrát prepláchnuté a potom sa odpipetovali bunky v roztoku naspäť do centrifugačných skúmaviek a nechali sa stáčať na 5 minút pri 360g. Po stočení sa supernatant opatrne vylial a k peletke buniek sa pridalo médium, v ktorom sa bunky rozsuspendovali a boli vyliate do jednej novej kultivačnej nádoby alebo viacerých nových kultivačných nádob. Skontrolovali sa znovu pod mikroskopom a boli vrátené naspäť do inkubátora.

## 3.8 MTT test

Na MTT testovanie cytotoxicity bolo potrebné, aby v kultivačných nádobkách narástol dostatočný počet buniek. Prvotné kroky pri spracovaní buniek boli obdobné ako pri pasážovaní, ako je uvedené v kapitole 3.7. Po zcentrifugovaní buniek a vyliatí média bol k peletke buniek pridaný malý objem média a počet buniek bol vypočítaný na Bürkerovej komôrke. Ak bol počet buniek vyšší, tak sa k rozsuspendovaným bunkám pridalo médium, aby sa dosiahol optimálny počet buniek na testovanie, čo predstavovalo  $2 \cdot 10^4$  buniek na jamku (100  $\mu$ l). Do krajných jamiek doštičky bolo napipetované 100  $\mu$ l pufru a do zvyšných

60 jamiek bolo napipetovaných 100  $\mu$ l rozuspendovaných buniek v médiu. Hneď nato sa skontrolovali bunky v jamkách pod inverzným mikroskopom a vložili sa do termoboxu na 24 h pri teplote 37 °C.

Na druhý deň sa odpipetovalo médium z jamiek a pridalo sa 100  $\mu$ l vzorky v rôznych koncentráciách a opäť bola doštička vrátená okamžite do inkubátora na 24 h. Na tretí deň sa odpipetovali vzorky z jamiek a do každej jamky sa pridalo 20  $\mu$ l MTT s koncentráciou 2,5 mg/ml v PBS. Doštička sa vrátila do inkubátora na 3 hodiny a po tejto dobe sa pridalo nakoniec do jamiek 100  $\mu$ l 10% SDS rozpusteného v PBS pufri. Potom sa doštička dala do tmy a na druhý deň sa zmerala absorbancia jednotlivých jamiek na ELISA readeri pri vlnovej dĺžke 562 nm.

Pri MTT testovaní boli použité upravené častice. Do Eppendorfových skúmaviek sa napipetoval 1 ml lipozómov alebo kombinovaných PHB častíc a nechali sa stočiť pri 6000 ot./5 min, potom sa odpipetovalo 0,5 ml supernatantu do ďalšej mikroskúmavky a nechal sa stáčať pri 11000 ot./60 min. Po tejto dobe sa supernatant odpipetoval a stočené častice boli 2x nariedené, čiže sa napipetovalo do mikroskúmavky 1 ml sterilnej vody. Takto pripravené častice sa prefiltrovali cez bakteriálny filter s pórmami o veľkosti 0,2  $\mu$ m.

### **3.9 SOS chromotest**

Tento test genotoxicity bol stanovovaný pomocou komerčne dostupného kitu EBPI SOS-CHROMOTEST™. Ako testovaný kmeň bol použitý kmeň *Escherichia coli*, ktorý bol kultivovaný po dobu 14 hodín v dodanom kultivačnom médiu pri 37 °C. Do mikrotitračnej doštičky bolo napipetované 10  $\mu$ l testovanej vzorky a ako pozitívna kontrola bol použitý roztok 4-NQO (4-nitroquinolin-1-oxid) v 10% DMSO o koncentrácii 10  $\mu$ g/ml, ako negatívna kontrola bolo použité samotné rozpúšťadlo (10% DMSO). K testovaným látkam bola pridaná bunečná suspenzia o objeme 100  $\mu$ l a všetko sa nechalo inkubovať na 2 h pri 37 °C. Po tejto dobe sa pridalo do jamiek 100  $\mu$ l alkalickéj fosfatázy rozpustenej v modrom chromogénnom činidle a na ELISA readeri bola zameraná absorbancia pri 405 a 630 nm. Potom sa doštička nechala inkubovať ďalších 90 minút pri 37 °C. Po tejto dobe sa pridal stop roztok a opäť sa zmerala absorbancia pri 405 a 630 nm [69].

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 4.1 Charakterizácia extraktov potravín

#### 4.1.1 Spektrofotometrické stanovenie celkových polyfenolov

Celkové polyfenoly boli stanovené v extraktoch potravín podľa postupu uvedeného v kapitole 3.5.1. Každá vzorka sa merala vždy trikrát, určil sa priemer merania a výsledky boli vyhodnotené v MS Exceli. Ako štandardný roztok pre zostavenie kalibračnej závislosti bola použitá kyselina gallová a obsah celkových polyfenolov bol vo vzorkách vypočítaný pomocou rovnice  $y = 0,9645x$ , kde výsledná koncentrácia v jednotkách v mg/ml bola prevedená na jednotky mg/g vzorky. Je treba pripomenúť, že východzie vzorky pred extrakciou mali odlišné množstvo vody a teda aktívne látky boli v navážke rôzne zriedené. Pretože však ako potraviny sú dané látky používané v prírodnej forme, boli výsledky vzťahované na 1g natívnej vzorky. Všetky výsledné koncentrácie jednotlivých vzoriek sú uvedené v Tabuľke 1.

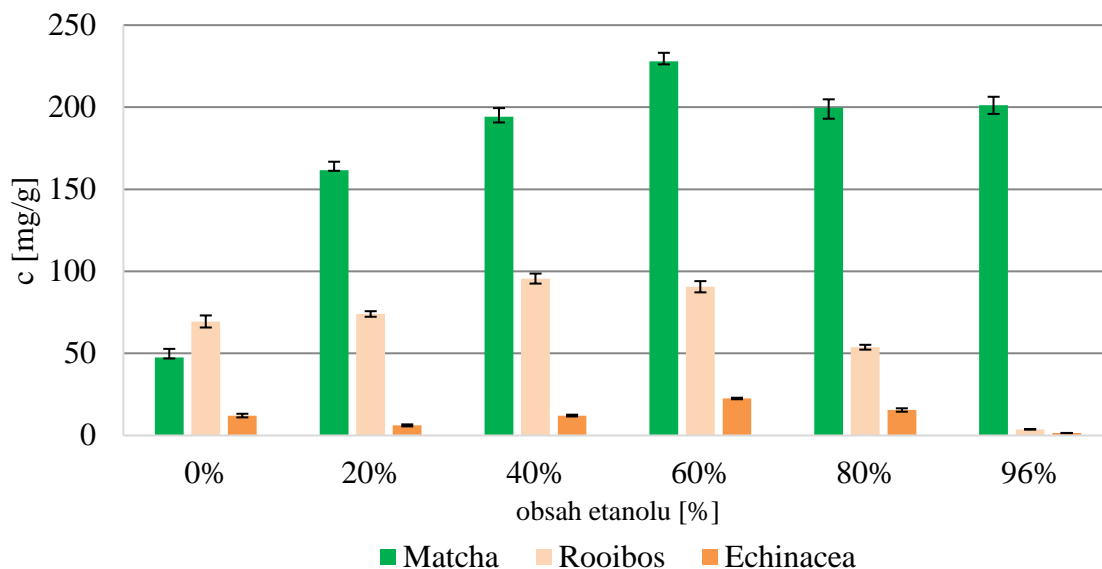
Ako aj v pri stanovovaní flavonoidov, aj pri stanovovaní celkových polyfenolov sa ukázalo, že najväčší obsah polyfenolov obsahujú prevažne 40% a 60% etanolové extrakty vzoriek. Najvyššie množstvo celkových polyfenolov obsahuje 60% etanolový extrakt matchi ( $227,92 \pm 1,83$  mg/g), čo v porovnaní s najnižším množstvom, ktoré je v 96% etanolovom extrakte mrkvy ( $0,46$  mg/g), čo je o takmer 500x viac, vypovedá akou výnimočnou potravinou vzhľadom na obsah polyfenolov matcha je. Mrkva prevažne však obsahuje provitamíny A, ktoré sú rozpustné v tukoch a tak nemôžu byť konkurenciou, čo sa týka vodných extraktov. Avšak obsah polyfenolov v mrkvovej šťave bol o približne o 4-krát väčší ( $3,59 \pm 0,11$  mg/g), nakoľko potravina bola spracovaná v šťavu rozmixovaním a nie extrahovaním.

Ako je v Grafe 1 znázornené, druhé najvyššie množstvo polyfenolov obsahujú vodné a etanolové extrakty rooibosu. Extrakty echinacei a fenikla obsahujú pod 20 mg/g celkových polyfenolov, výnimka je iba 60% etanolový extrakt echinacei ( $22,53 \pm 0,47$  mg/g) a ostatné extrakty potravín obsahujú už iba polyfenolické látky množstve menšom než 10 mg/g.

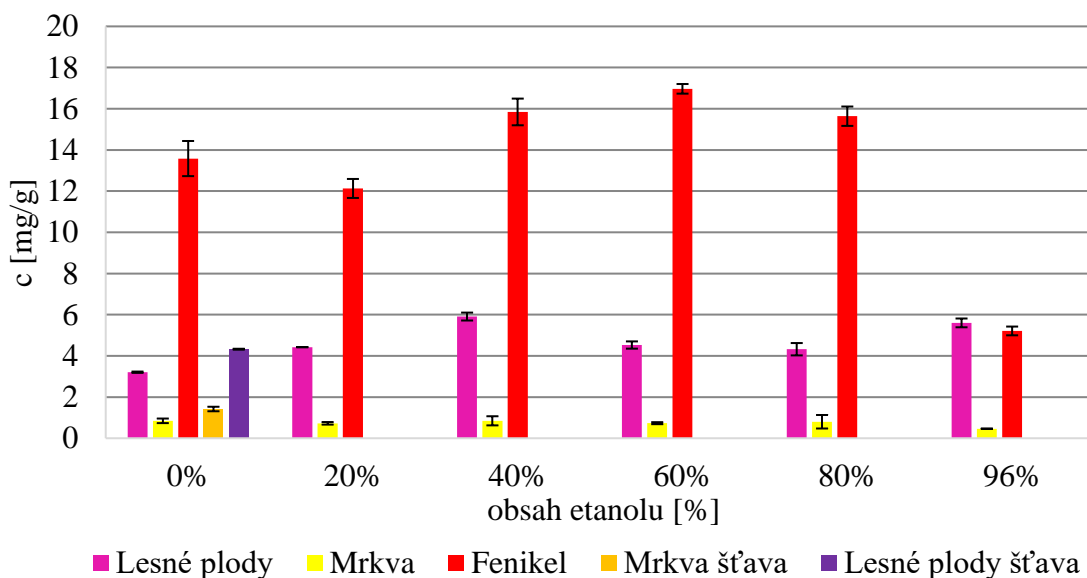
*Tabuľka 1: Množstvo celkových polyfenolov v extraktoch.*

Vzorka	Obsah etanolu vo vodnom extrakte					
	0%	20%	40%	60%	80%	96%
	<b>c [mg/g]</b>					
Matcha	$47,55 \pm 0,63$	$161,57 \pm 0,30$	$194,23 \pm 3,53$	$227,92 \pm 1,83$	$199,59 \pm 6,60$	$201,14 \pm 5,22$
Rooibos	$69,47 \pm 3,67$	$74,03 \pm 1,70$	$95,59 \pm 3,05$	$90,62 \pm 3,43$	$53,78 \pm 1,47$	$3,75 \pm 0,15$
Echinacea	$12,13 \pm 1,10$	$6,15 \pm 0,61$	$12,13 \pm 0,55$	$22,53 \pm 0,47$	$15,52 \pm 1,04$	$1,49 \pm 0,07$
Lesné plody	$3,21 \pm 0,03$	$4,42 \pm 0,01$	$5,91 \pm 0,19$	$4,53 \pm 0,18$	$4,32 \pm 0,30$	$5,6 \pm 0,21$
Mrkva	$0,85 \pm 0,11$	$0,73 \pm 0,06$	$0,85 \pm 0,22$	$0,73 \pm 0,05$	$0,8 \pm 0,33$	$0,46 \pm 0,01$
Fenikel	$13,58 \pm 0,85$	$12,13 \pm 0,46$	$15,85 \pm 0,65$	$16,97 \pm 0,23$	$15,64 \pm 0,47$	$5,21 \pm 0,21$
Mrkva šťava	$3,59 \pm 0,11$					
Lesné plody šťava	$4,32 \pm 0,02$					





**Graf 1:** Množstvo celkových polyfenolov v matchi, rooibose a echinacei.



**Graf 2:** Množstvo celkových polyfenolov v lesných plodoch, mrkve, fenikli a šťavách mrkvy a lesných plodoch.

#### 4.1.2 Spektrofotometrické stanovenie flavonoidov

Množstvo flavonoidov vo vzorkách sa stanovilo podľa postupu uvedeného v kapitole 3.5.2. Každá vzorka sa merala vždy trikrát, určil sa priemer merania a všetky výsledky boli spracované v MS Exceli. Ako štandardný roztok pre zostavenie kalibračnej krivky sa použil katechín a následne pre vyhodnotenie množstva flavonoidov vo vzorkách sa použila rovnica  $y = 2,5902x$ , kde koncentrácia bola v uvedená v jednotkách mg/ml. Všetky spracované výsledky sú sumárne uvedené v Tabuľka 2 a prepočítané na koncentráciu v jednotkách mg/g vzorky.

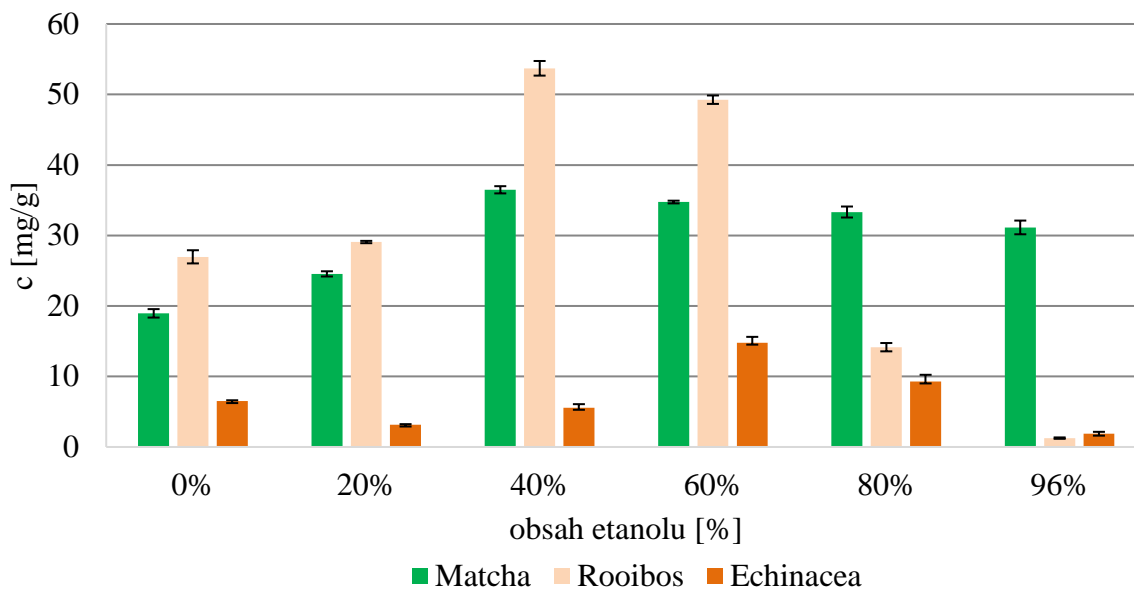
Najväčšie množstvo flavonoidov sa všeobecne najviac nachádzalo v extraktoch s obsahom etanolu 40 a 60 %, výnimkou je iba extrakt z feniklu, kde najväčšie množstvo obsahuje 80% etanolvý extrakt. Spomedzi všetkých vzoriek bolo namerané najväčšie množstvo

flavonoidov v 40% etanolovom extrakte rooibosu ( $53,72 \pm 1,04$  mg/g) a naopak najmenej flavonoidov obsahoval vodný extrakt mrkvy ( $0,08 \pm 0,11$  mg/g). Taktiež možno vidieť pri vzorke mrkvy v Graf 4, že minimálne množstvo flavonoidov sa vyextrahovalo do vodného ale aj etanolového extraktu. Zároveň, keď sa porovnajú výsledky v Graf 3, tak extrakty lesných plodov, mrkvy, fenikla a šťavy lesných plodov a mrkvy majú obsah flavonoidov pod hranicu 10 mg/g, zatiaľ čo extrakty matchi a rooibosu výrazne túto hranicu prekračujú. Obsah flavonoidov v extrakte echinacei sa pohybuje v okolí 10 mg/g a menej.

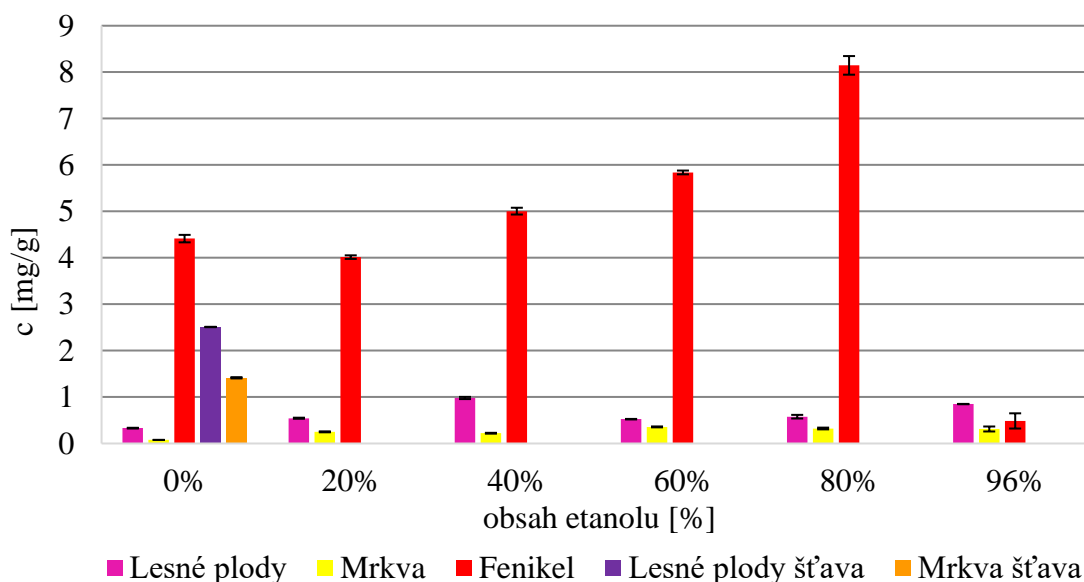
Je treba pripomenúť, že vzorky mrkvy a lesných plodov boli extrahované v natívnom stave, zatiaľ čo ostatné vzorky boli získané vo forme sušeného prášku alebo byliny. Pre zrovnanie by bol vhodný prepočet na sušinu u všetkých vzoriek, bola však snaha analyzovať vzorky v tom stave, v ktorom sa konzumujú. Obsah vody v mrkve a lesných plodoch je prirodzene vyšší a tak sú aktívne látky zriedené a vykazujú nižšiu koncentráciu ako u väčšiny sušených preparátov. Konzumuje sa ich však podstatne vyššie množstvo (aspoň 100-násobné), takže sú vlastne výborným zdrojom fenolických látok. Extrahovateľnosť do rozpúšťadiel závisí ale najmä od zostavy a typu hlavných zastúpených aktívnych látok.

*Tabuľka 2: Množstvo flavonoidov v extraktoch.*

Vzorka	Obsah etanolu vo vodnom extrakte					
	0%	20%	40%	60%	80%	96%
	<b>c [mg/g]</b>					
<b>Matcha</b>	$18,96 \pm 0,06$	$24,55 \pm 0,37$	$36,48 \pm 1,04$	$34,75 \pm 0,19$	$33,33 \pm 0,78$	$31,14 \pm 0,97$
<b>Rooibos</b>	$26,97 \pm 0,93$	$29,07 \pm 0,16$	$53,72 \pm 1,04$	$49,26 \pm 0,60$	$14,16 \pm 0,59$	$1,26 \pm 0,10$
<b>Echinacea</b>	$6,50 \pm 0,13$	$3,17 \pm 0,07$	$5,55 \pm 0,53$	$14,79 \pm 0,84$	$9,28 \pm 0,59$	$1,88 \pm 0,27$
<b>Lesné plody</b>	$0,33 \pm 0,01$	$0,54 \pm 0,01$	$0,98 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,01$	$0,58 \pm 0,04$	$0,85 \pm 0,00$
<b>Mrkva</b>	$0,08 \pm 0,00$	$0,25 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,05$
<b>Fenikel</b>	$4,41 \pm 0,08$	$4,02 \pm 0,04$	$5,00 \pm 0,07$	$5,84 \pm 0,04$	$8,15 \pm 0,2$	$0,49 \pm 0,16$
<b>Mrkva šťava</b>	$1,42 \pm 0,00$					
<b>Lesné plody šťava</b>	$2,51 \pm 0,01$					



**Graf 3:** Množstvo flavonoidov v matchi a rooibose.



**Graf 4:** Množstvo flavonoidov v lesných plodoch, mrkve, fenikli, šťavách lesných plodov a mrkvi.

#### 4.1.3 Spektrofotometrické stanovenie antioxidačnej aktivity

Antioxidačná aktivita extraktov sa stanovila podľa postupu uvedeného v kapitole 3.5.3. Každá vzorka bola premeraná trikrát, vypočítal sa priemer z týchto troch meraní a všetky výsledky sa vyhodnotili v MS Exceli. Ako zásobný roztok na zostavenie kalibračnej krivky bol použitý roztok Troloxu. Výsledky sa počítali z výslednej rovnice kalibračnej krivky  $y = 0,0012x$ . Výsledná koncentrácia bola prepočítaná na jednotky mg/g vzorky. Všetky vypočítané koncentrácie sú uvedené v Tabuľka 3 a ich antioxidačná aktivita sa dá interpretovať ako ekvivaletné množstvo Troloxu v mg/g danej vzorky.

Najvyššie hodnoty antioxidačnej aktivity dosiahol 60% etanolový extrakt matchi ( $275,00 \pm 5,89$  mg/g) a najnižší vodný extrakt mrkvy ( $0,27 \pm 0,03$  mg/g). Hoci vodný extrakt

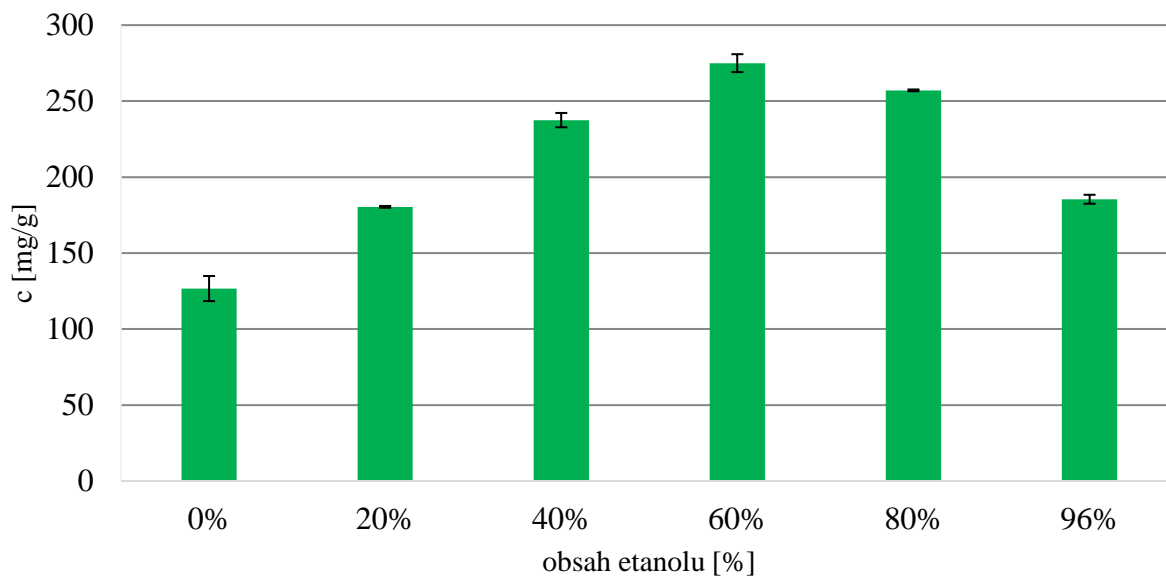
mrkvy dosiahol najnižšiu hranicu antioxidačnej aktivity, mrkva obsahuje vysoké množstvo  $\beta$ -karoténu, ktorý je rozpustný v tukoch a teda pri extrakcii za použitia vody a etanolu neprejdú kvantitatívne do rozpúšťadla.

Už na základe výsledkov z meraní celkových polyfenolov sa dalo odhadnúť, že najsilnejšiu antioxidačnú kapacitu bude mať rooibos a matcha, nakoľko tieto dve potraviny obsahovali najvyššie množstvá polyfenolov, ktoré pôsobia ako silné antioxidanty. Treba podotknúť, že najnižšia antioxidačná aktivita vo vodnom extrakte matchi ( $126,67 \pm 8,25$  mg/g) je vyššia približne o 10 mg/g než najvyššia antioxidačná aktivita extraktu rooibosu v 40% etanole ( $90,33 \pm 2,36$  mg/g).

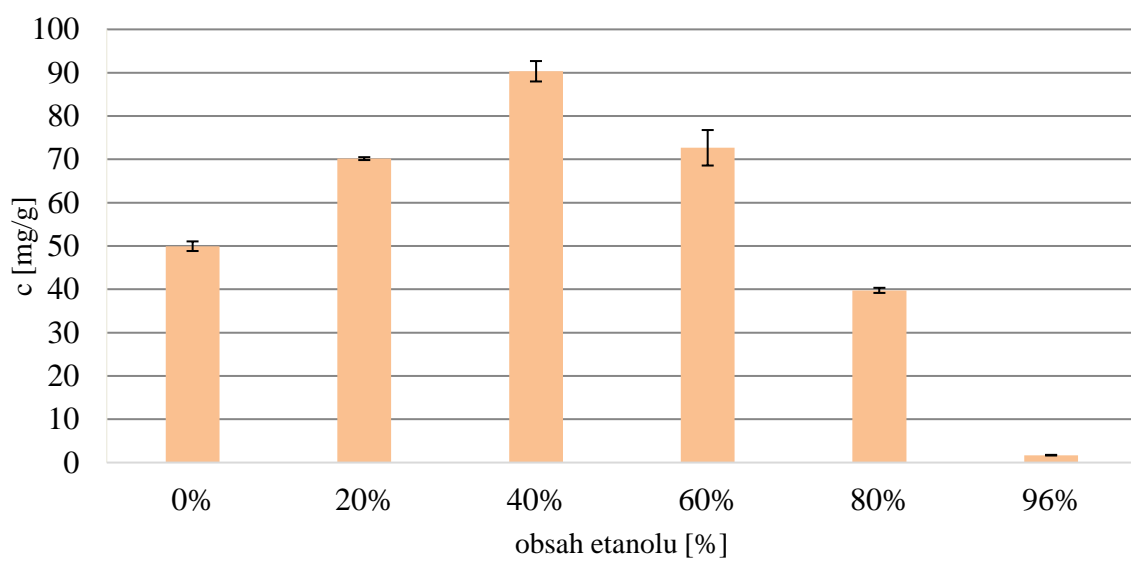
Ostatné potraviny nedisponujú takou silnou antioxidačnou aktivitou ako tieto dve spomínané potraviny, nakoľko ich antioxidačná aktivita dosahuje hodnoty pod hranicou 20 mg/g, čo je znázornené v Graf 7. Je treba pripomenúť problém s obsahom vody v pôvodnej vzorke (kap. 4.1.2).

*Tabuľka 3: Antioxidačná aktivita extraktov.*

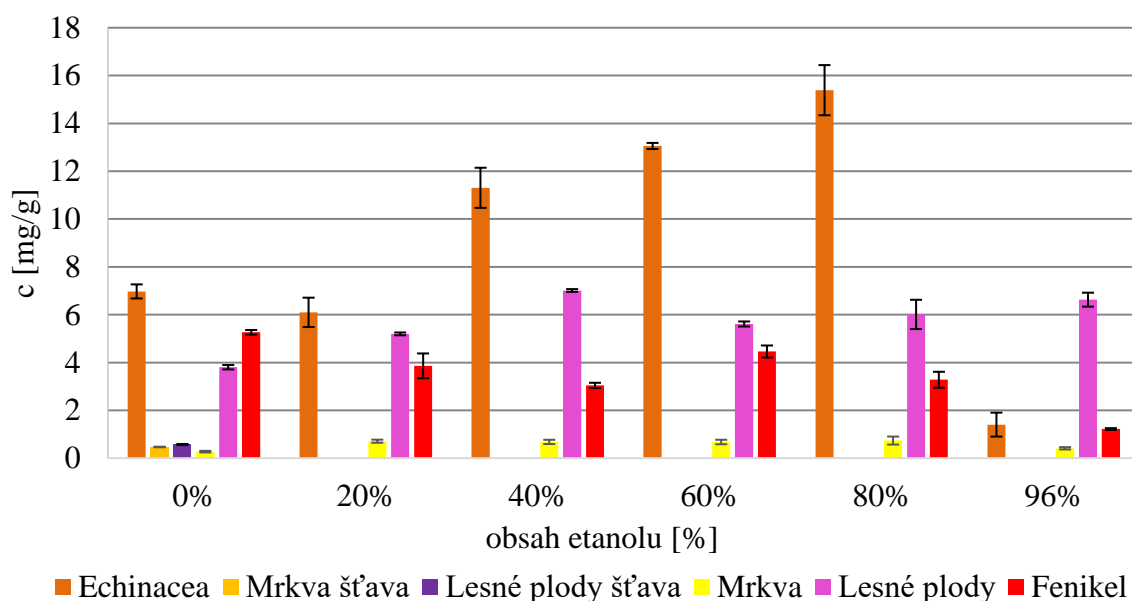
Vzorka	Obsah etanolu vo vodnom extrakte					
	0%	20%	40%	60%	80%	96%
	<b>c [mg/g]</b>					
<b>Matcha</b>	$126,67 \pm 8,25$	$180,42 \pm 0,59$	$237,50 \pm 4,71$	$275,00 \pm 5,89$	$257,08 \pm 0,59$	$185,42 \pm 2,95$
<b>Rooibos</b>	$49,94 \pm 1,11$	$70,17 \pm 0,33$	$90,33 \pm 2,36$	$72,67 \pm 4,10$	$39,75 \pm 0,59$	$1,70 \pm 0,10$
<b>Echinacea</b>	$6,97 \pm 0,30$	$6,10 \pm 0,61$	$11,31 \pm 0,84$	$13,10 \pm 0,13$	$15,39 \pm 1,05$	$1,40 \pm 0,50$
<b>Lesné plody</b>	$3,80 \pm 0,09$	$5,20 \pm 0,06$	$7,01 \pm 0,06$	$5,61 \pm 0,11$	$6,01 \pm 0,62$	$6,63 \pm 0,29$
<b>Mrkva</b>	$0,27 \pm 0,03$	$0,71 \pm 0,07$	$0,68 \pm 0,10$	$0,70 \pm 0,1$	$0,74 \pm 0,17$	$0,41 \pm 0,05$
<b>Fenikel</b>	$5,26 \pm 0,0,09$	$3,86 \pm 0,52$	$3,04 \pm 0,11$	$4,46 \pm 0,25$	$3,28 \pm 0,33$	$1,21 \pm 0,04$
<b>Mrkva šťava</b>	$0,47 \pm 0,01$					
<b>Lesné plody šťava</b>	$0,57 \pm 0,02$					



**Graf 5:** Antioxidačná aktivita extraktu matchi.



**Graf 6:** Antioxidačná aktivita extraktu rooibosu.



**Graf 7:** Antioxidačná aktivita extraktov echinacei, lesných plodov, fenikla, štiav mrkvy a lesných plodov.

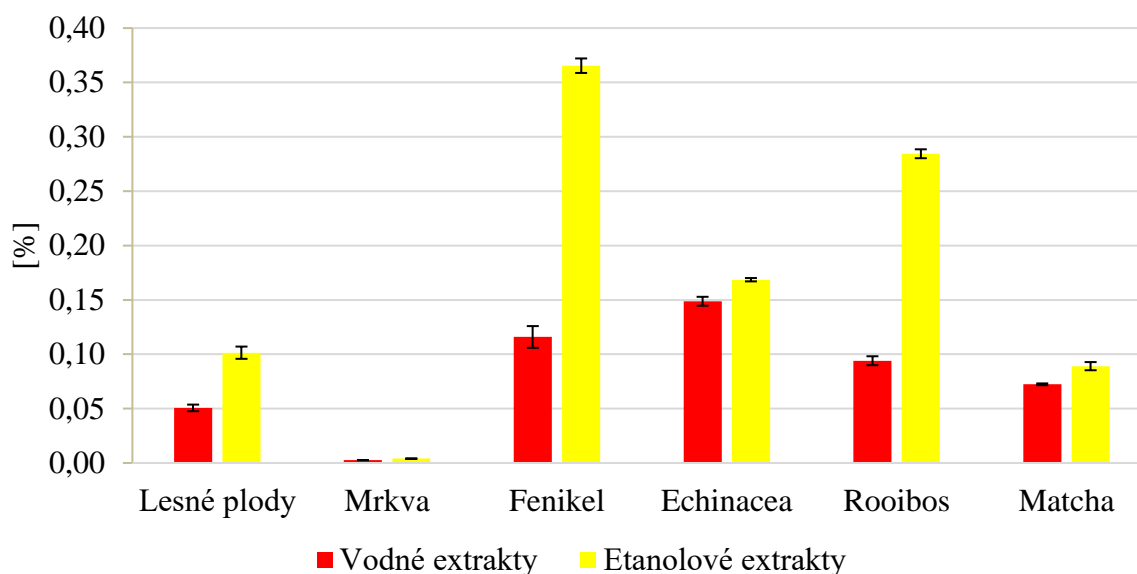
#### 4.1.4 Spektrofotometrické stanovenie antokyánov

Obsah antokyánov vo vzorkách bol zmeraný podľa postupu uvedeného v kapitole 3.5.4. Ako v predchádzajúcich kapitolách spomenuté vzorky sa merali trikrát, spriemerovali sa a boli vyhodnotené v MS Exceli. Výsledná rovnica kalibračnej závislosti absorbancie na koncentrácii kyanidínchloridu ako ekvivalentu obsahu antokyánov je  $y = 60,3368x$ .

Obsah antokyánov sa meral vo vodných extraktoch a v etanolových extraktoch s najvyšším obsahom polyfenolov pri jednotlivých vzorkách, ktorých hodnoty sú uvedené v Tabuľke 1. Z porovnania hodnôt zobrazených v Graf 8 vyplýva, že väčšie množstvo antokyánov sa vyextrahovalo do etanolového prostredia než iba výhradne do vodného. V rámci vodných extraktov mala najvyššie množstvo antokyánov echinacea, a to  $0,15 \pm 0,00$  % a najnižší resp. žiadny obsah antokyánov bol v extrakte mrkvy. V etanolovom extrakte fenikla sa namerl najvyšší obsah  $0,37 \pm 0,01$  % a etanolový extrakt opäť neobsahoval žiadne antokyány. Pri stanovovaní pomocou tejto metódy mohlo dôjsť k chybe riedenia alebo pipetovania, nakoľko vzťah medzi obsahom antokyánov vo vodných a etanolových extraktoch nie je jednotný. Pravdepodobnejšie je však odlišné zloženie extraktov a teda aj rozdielna extrahovateľnosť aktívnych zložiek. Napr. u lesných plodov sa obsah antokyánov v etanole zvýšil dvakrát, za to u fenikla badať navýšenie množstva o viac než 3-krát a pri matchi sa obsah iba nebadane zvýšil.

**Tabuľka 4:** Množstvo antokyánov vo vodných a etanolových extraktoch potravín.

Vzorka	vodné extrakty [%]	etanolové extrakty [%]
Lesné plody	$0,05 \pm 0,00$	$0,10 \pm 0,00$
Mrkva	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
Fenikel	$0,12 \pm 0,00$	$0,37 \pm 0,01$
Echinacea	$0,15 \pm 0,00$	$0,17 \pm 0,00$
Rooibos	$0,09 \pm 0,00$	$0,28 \pm 0,00$
Matcha	$0,07 \pm 0,00$	$0,09 \pm 0,00$



*Graf 8: Množstvo antokyánov vo vodných a etanolových extraktoch..*

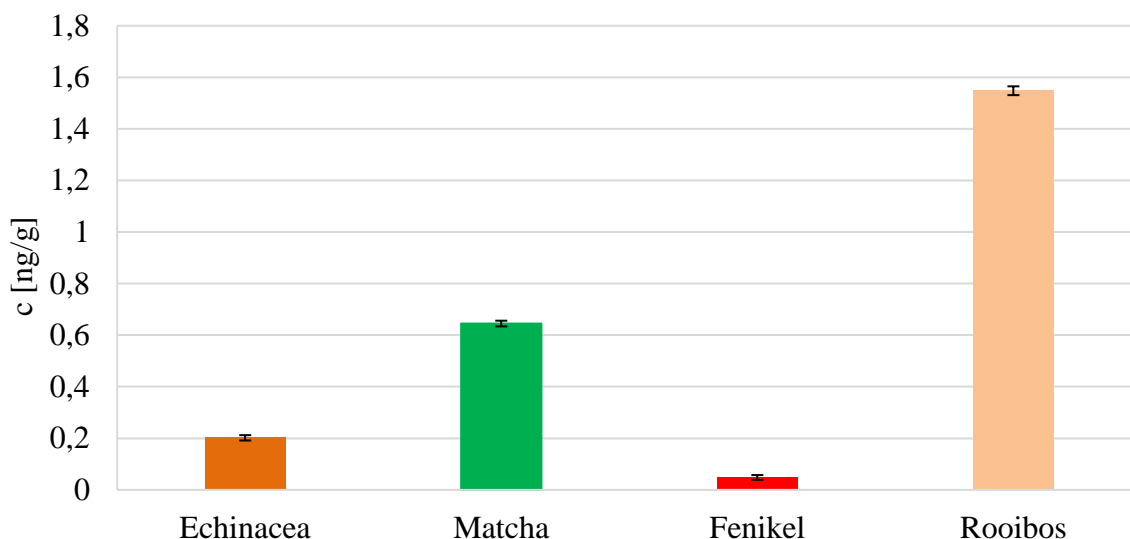
#### 4.1.5 Spektrofotometrické stanovenie chlorofylu

Vzorky sa merali v triplikátoch, boli spriemerované a vyhodnotené v MS Exceli. Postupovalo sa metódou uvedenou v kapitole 3.5.5. Rovnica kalibračnej krivky je  $y = 122,90 - 0,1043x$ .

Najvyššie množstvo chlorofylu  $1,55 \pm 0,02$  ng/g obsahoval rooibos a najnižšie množstvo pigmentu  $0,05 \pm 0,00$  ng/g bolo namerané pri vzorke feniklu. V Tabuľke 5 sú spracované výsledky obsahu chlorofylu vo vzorkách. Matcha obsahovala polovičné množstvo pigmentu než rooibos. Nakoľko boli použité 60% etanolové extrakty a chlorofyl sa zaraďuje medzi lipofilné farbivá, ktoré sa rozpúšťajú najmä v nepolárnych organických rozpúšťadlách ako napr. chloroform, dietyléter, tak výtazok chlorofylu nie je vysoký. Optimálnejšie by bolo vhodné zvoliť acetón, no zas výtazok polyfenolov by nebol tak vysoký ako vo vodnom a etanolovom prostredí. Hoci acetón sa zaraďuje medzi GRAS látky používané pri určitých koncentráciách, tak je stále vhodnejšie použiť prídavné látky do potravín, ktoré boli získané extrakciou vo vodnom prostredí.

*Tabuľka 5: Množstvo chlorofylu v extraktoch potravín.*

Vzorka	Chlorofyl [ng/g]
<b>Rooibos</b>	$1,55 \pm 0,02$
<b>Fenikel</b>	$0,05 \pm 0,00$
<b>Echineea</b>	$0,20 \pm 0,01$
<b>Matcha</b>	$0,65 \pm 0,01$



*Graf 9: Obsah chlorofylu v extraktoch vybraných potravín.*

#### 4.1.6 Spektrofotometrické stanovenie karoténov

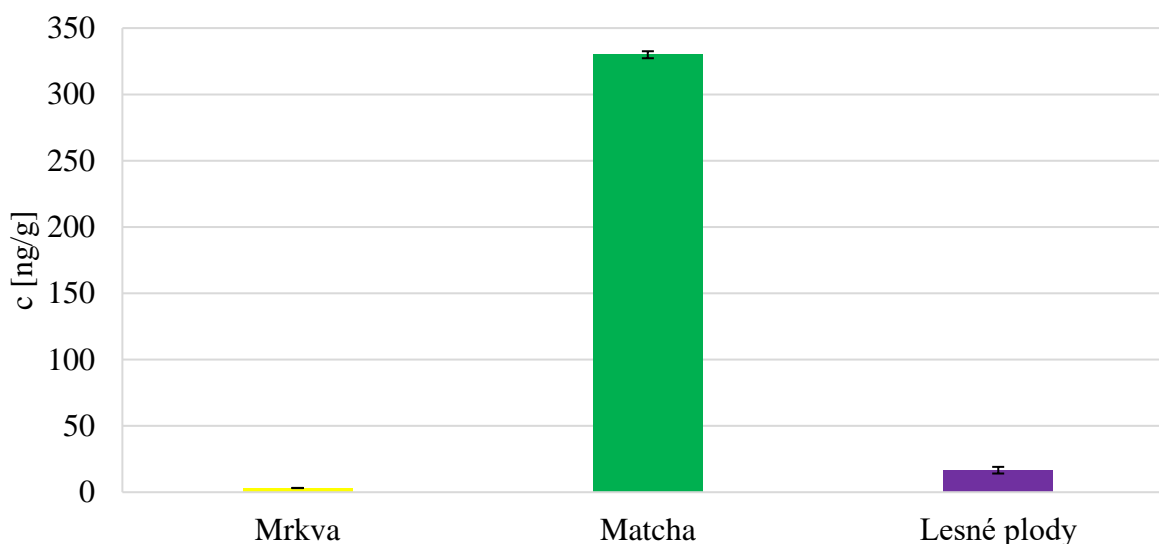
Vzorky sa merali v triplikátoch, boli sprimerované a vyhodnotené v MS Exceli. Postupovalo sa metódou uvedenou v kapitole 3.5.5. Rovnica kalibračnej krivky je  $y = 0,1566x - 0,0306$ .

Najvyššie množstvo karoténov obsahoval extrakt matchi  $16,61 \pm 0,03$  ng/g, ktorá je nielen bohatá na obsah chlorofylu, ale aj karoténov. Prekvapujúce je, že najnižšie množstvo pigmentu obsahovala mrkva, a to  $3,18 \pm 0,81$  ng/g. Ako už bolo spomenuté v predošlej podkapitole, bude hrať významnú úlohu aj obsah vody v pôvodnom materiáli. Tiež použitá metóda spektrofotometrického stanovenia je orientačná. Pretože karotény sú lipofilné pigmenty, najlepšie je extrahovať ich do vhodných rozpúšťadiel, ktoré majú charakter GRAS a môžu byť použité do potravín alebo kozmetických prípravkov.

*Tabuľka 6: Množstvo karoténov v extraktoch potravín.*

Vzorka	Karotény c [ng/g]
Mrkva	$3,18 \pm 0,81$
Lesné plody	$16,61 \pm 0,03$
Matcha	$329,90 \pm 2,6$





**Graf 10:** Obsah karoténov v extraktoch vybraných potravín.

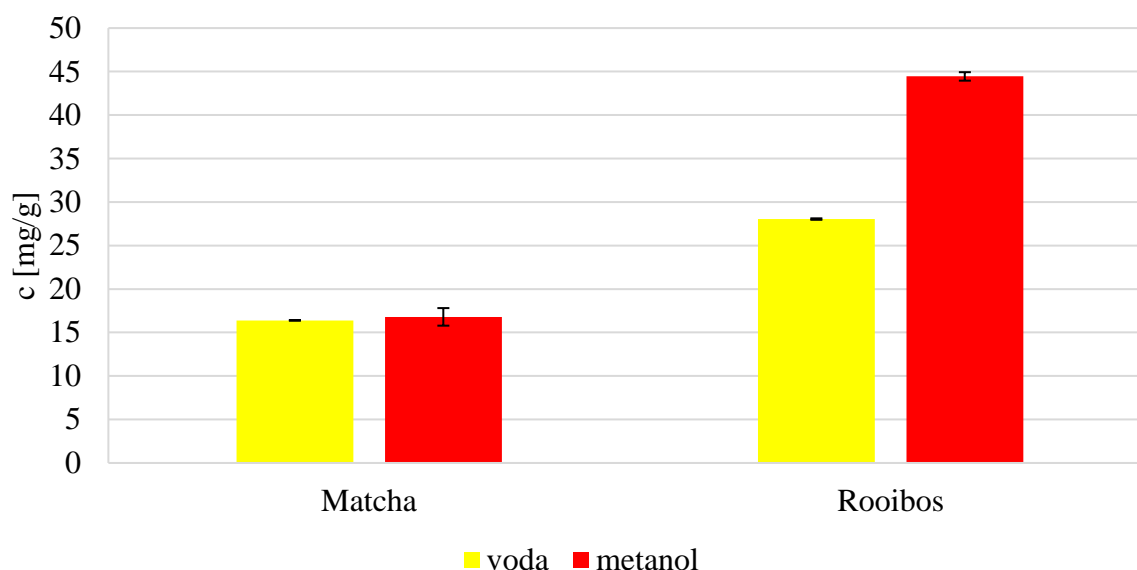
#### 4.1.7 Spektrofotometrické stanovenie trieslovín

Triesloviny sa stanovili pri potravinách, ktoré sa používajú na prípravu čajov alebo chladených nápojov. Postup stanovenia je uvedený v kapitole 4.1.7, vzorky sa merali trikrát a ich spriemerované hodnoty boli vyhodnotené v MS Exceli. Výsledné hodnoty boli vypočítané z rovnice  $y = 0,8725x$  a prepočítané na mg/g vzorky.

Prírodný rooibos obsahoval  $44,44 \pm 0,49$  mg/g vzorky trieslovín, zatiaľ čo u matchi bol zistený nižší obsah trieslovín  $16,80 \pm 0,69$  mg/g vzorky. Obe potraviny dosiahli najvyššie hodnoty trieslovín v metanolových extraktoch, zatiaľ čo pri vodných extraktoch bol obsah v rooibose takmer dvakrát nižší, no u matchi obsahový rozdiel nebol badateľný. Čaje obvykle obsahujú 2-15 % tanínov v celkovom množstve, pričom ich obsah závisí od množstva faktorov. Prítomnosť týchto látok je ovplyvnená najmä spôsobom výroby, vyzretia čajových lístkov, klímy a štruktúre pôdy. Hoci triesloviny sa zaraďujú medzi antioxidanty a tým prospešne pôsobia v organizme, avšak zároveň negatívne ovplyvňujú absorpciu bielkovín a železa v tele, a teda matcha je vhodný čajový nápoj na základe nižšieho obsahu trieslovín než v rooibose.

**Tabuľka 7:** Množstvo trieslovín v extraktoch.

Vzorka	Vodný extrakt [mg/g]	Metanolový extrakt [mg/g]
<b>Matcha</b>	$16,40 \pm 0,01$	$16,80 \pm 0,49$
<b>Rooibos</b>	$28,04 \pm 1,01$	$44,44 \pm 0,82$



*Graf 11: Stanovenie trieslovín v matchi a rooibose.*

#### 4.2 Stanovenie enkapsulačnej účinnosti

Enkapsulačná účinnosť u pripravených lipozómov a kombinovaných lipozómov s PHB sa stanovila podľa postupu uvedeného v kapitole 3.6.2. Každá vzorka bola premeraná trikrát, hodnoty sa spriemerovali a boli vyhodnotené za použitia MS Excelu.

Najvyššiu enkapsulačnú účinnosť spomedzi lipozómov mala matcha a to  $64,9 \pm 1,2$  % a nad 50 % sa taktiež dostal rooibos. Najmenšiu enkapsulačnú účinnosť vykazovala mrkva  $12,6 \pm 1,2$  %. Väčšina kombinovaných PHB častíc mala enkapsulačnú účinnosť pod 30 %, výnimkou bol iba rooibos, ktorého enkapsulačná účinnosť bola  $57,5 \pm 0,1$  %. Pri kombinovaných časticiach s mrkvou sa enkapsulačná účinnosť zvýšila na  $24 \pm 3,7$  % a naopak pri echinacei poklesla enkapsulačná účinnosť na  $15 \pm 0,8$  %.

*Tabuľka 8: Enkapsulačná účinnosť lipozómov a PHB častíc.*

Lipozómy	EÚ (%)
Mrkva	$12,6 \pm 1,2$
Fenikel	$42,1 \pm 0,5$
Matcha	$64,9 \pm 0,3$
Rooibos	$57,5 \pm 0,1$
Lesne plody	$45,6 \pm 0,5$
Echinacea	$36,6 \pm 0,8$
<b>Lipozómy + PHB</b>	
Mrkva	$24,0 \pm 3,7$
Fenikel	$22,0 \pm 0,3$
Matcha	$8,7 \pm 0,8$
Rooibos	$55,5 \pm 0,7$
Lesné plody	$29,6 \pm 0,5$
Echinacea	$16,3 \pm 2,2$

### 4.3 Stanovenie dlhodobej stability

Dlhodobá stabilita bola stanovená na základe postupu v kapitole 4.3, kedy spriemerované hodnoty absorbancií boli vyhodnotené pomocou MS Excelu. Pri sledovaní 1-mesačnej stability neboli v supernatante detegované polyfenoly u žiadnych častíc okrem PHB častíc s extraktom echinacei, kde sa uvoľnilo veľmi málo polyfenolov. Stabilita častíc bola tiež overená pomocou DLS analyzátoru a výsledky ukázali, že častice boli stabilné aj v prípade tohto merania.

Tabuľka 9: Vyhodnotenie dlhodobej stability.

Lipozómy	Množstvo uvoľnených polyfenolov [mg/ml]
Mrkva	-0,0 ± 0,0
Fenikel	-0,4 ± 0,5
Matcha	-0,9 ± 0,3
Rooibos	-3,8 ± 0,1
Lesné plody	-0,0 ± 0,0
Echinacea	-0,2 ± 0,8
<b>Lipozómy + PHB</b>	
Mrkva	0,0 ± 3,7
Fenikel	-0,2 ± 0,3
Matcha	-0,5 ± 0,8
Rooibos	-4,0 ± 0,7
Lesné plody	-0,0 ± 0,0
Echinacea	0,2 ± 0,0

### 4.4 Charakterizácia častíc

#### 4.4.1 Veľkosť častíc a polydesperzita

Veľkosť lipozomálnych častíc sa pohybovala v rozmedzí od približne 134 – 519 nm a pri kombinovaných časticiach v rozmedzí od približne 200 – 570 nm. V priebehu uchovávanía častíc sa u väčšiny vzoriek veľkosť výrazne nemenila. Najväčšie zmeny veľkosti nastali pri lipozómoch s enkapsulovaným extraktom echinacei a feniklu. Pri lipozómoch s echinaceou sa veľkosť v priebehu uchovávanía zmenila zo 170 nm na 519 nm, z čoho vyplýva že časom tieto častice začali agregovať.

Veľkosť kombinovaných PHB častíc bola vyššia než 200 nm, zatiaľ čo veľkosť lipozómov sa pohybovala väčšinou do 200 nm. Pri kombinovaných časticiach bola agregácia spozorovaná pri vzorkách s echinaceou a feniklom, kedy pri echinacei veľkosť koloidného systému sa zvýšila z približne 500 nm na 2309 nm.

**Tabuľka 10 :** Hodnoty veľkosti lipozomálnych a kombinovaných častíc.

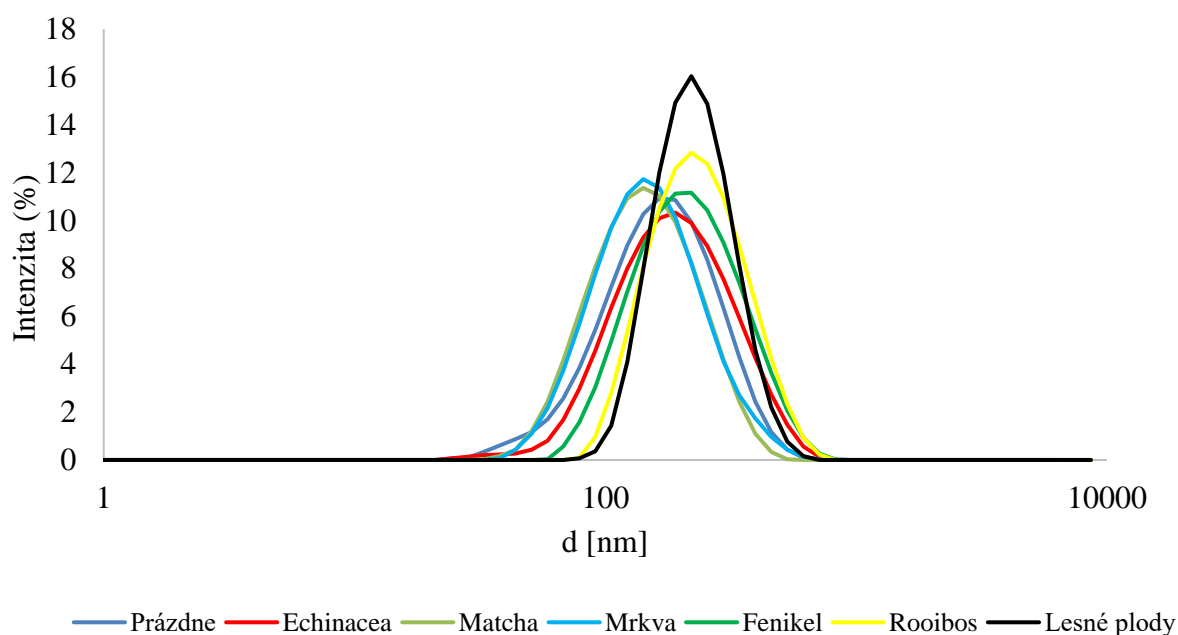
Častice	Veľkosť (nm)			
	1. deň	1. mesiac	2. mesiac	Filtrované (14.deň)
Lipozómy prázdne	135,9 ± 2,2	138,1 ± 0,3	134,7 ± 1,6	296,8 ± 2,1
Lipozómy (mrkva)	157,8 ± 1,3	173,7 ± 2,5	169,8 ± 1,0	254,3 ± 1,3
Lipozómy (lesné plody)	237,0 ± 1,9	195,6 ± 0,7	203 ± 0,9	237,0 ± 4,5
Lipozómy (rooibos)	205,0 ± 1,1	263,6 ± 3,1	253,8 ± 3,3	448,4 ± 6,2
Lipozómy (matcha)	176,2 ± 4,2	171,2 ± 3,0	195,1 ± 1,1	187,1 ± 1,1
Lipozómy (echinacea)	170,0 ± 0,3	420,1 ± 1,4	519,7 ± 8,0	489,5 ± 0,9
Lipozómy (fenikel)	219,3 ± 2,4	408,6 ± 3,5	326,3 ± 1,3	526,4 ± 2,5
PHB prázdne	225,8 ± 0,6	264,2 ± 3,3	202,1 ± 0,1	275,9 ± 1,7
PHB (mrkva)	427,0 ± 12,9	346,8 ± 3,6	364,1 ± 0,8	320,4 ± 1,5
PHB (lesné plody)	564,8 ± 1,6	609 ± 2,6	773,9 ± 0,7	607,1 ± 4,8
PHB (rooibos)	402,8 ± 3,2	346,7 ± 3,2	561,7 ± 0,3	475,1 ± 2,2
PHB (matcha)	377,3 ± 2,0	511,7 ± 3,5	544,7 ± 3,3	367,4 ± 3,0
PHB (echinacea)	499,8 ± 4,3	578,3 ± 8,5	2309 ± 120,7	425,5 ± 5,1
PHB (fenikel)	507,2 ± 9,4	517,1 ± 0,3	939,5 ± 73,4	447,9 ± 1,5

Koloidné systémy lipozómov boli relatívne málo polydisperzné, keďže neprekročili hodnotu indexu polydisperzity (PDI) 0,5. Taktiež PHB častice mali hodnoty polydisperzity menšie než 0,5. Ako možno v tabuľke 11 vidieť, zvýšená polydisperzita bola nameraná pri vzorkách kombinovaných PHB častíc s extraktami feniklu a echinacei, keď hodnota dosahovala takmer 1,0. Zvýšenie polydisperzity sa odzrkadlilo aj na stabilite častíc, ktorá je popísaná o kapitole nižšie.

**Tabuľka 11:** Hodnoty polydisperzity lipozomálnych a kombinovaných častíc.

Častice	Pdl			
	1. deň	1. mesiac	2. mesiac	Filtrované (14.deň)
Lipozómy prázdne	0,227 ± 0,006	0,219 ± 0,013	0,253 ± 0,005	0,358 ± 0,0013
Lipozómy (mrkva)	0,233 ± 0,002	0,284 ± 0,016	0,260 ± 0,010	0,323 ± 0,010
Lipozómy (lesné plody)	0,199 ± 0,0	0,176 ± 0,020	0,231 ± 0,006	0,239 ± 0,018
Lipozómy (rooibos)	0,273 ± 0,014	0,223 ± 0,035	0,183 ± 0,014	0,381 ± 0,034
Lipozómy (matcha)	0,334 ± 0,005	0,234 ± 0,019	0,256 ± 0,022	0,150 ± 0,011
Lipozómy (echinacea)	0,347 ± 0,004	0,381 ± 0,023	0,439 ± 0,011	0,374 ± 0,011
Lipozómy (fenikel)	0,231 ± 0,015	0,218 ± 0,015	0,236 ± 0,021	0,301 ± 0,027
PHB prázdne	0,313 ± 0,0	0,417 ± 0,026	0,253 ± 0,005	0,253 ± 0,009
PHB (mrkva)	0,450 ± 0,123	0,394 ± 0,024	0,326 ± 0,006	0,346 ± 0,020
PHB (lesné plody)	0,224 ± 0,013	0,248 ± 0,018	0,546 ± 0,030	0,21 ± 0,016
PHB (rooibos)	0,322 ± 0,038	0,238 ± 0,018	0,345 ± 0,049	0,185 ± 0,010
PHB (matcha)	0,212 ± 0,000	0,365 ± 0,060	0,294 ± 0,015	0,342 ± 0,005

PHB (echinacea)	$0,342 \pm 0,029$	$0,392 \pm 0,021$	$0,878 \pm 0,121$	$0,294 \pm 0,041$
7. PHB (fenikel)	$0,218 \pm 0,083$	$0,292 \pm 0,012$	$0,927 \pm 0,05$	$0,235 \pm 0,009$



**Graf 12:** Distribúcia veľkosti lipozomálnych častíc v 1. deň merania.

#### 4.4.2 Zeta potenciál

Tento parameter vypovedá o stabilite meraného koloidného systému. Ak je zeta potenciál častíc v systéme kladne alebo záporne vysoký, častice majú tendenciu sa odpudzovať a tak sa predchádza agregácii častíc do väčších celkov. Ak sa hodnota potenciálu nachádza v rozmedzí od +30 mV do -30mV, tak systém je nestabilný. Naopak, ak sú hodnoty zeta potenciálu vyššie v kladnom aj zápornom smere, tak koloidný systém sa považuje za stabilný [70].

U všetkých pripravených častíc bol zeta potenciál zmeraný v prvý deň (= deň prípravy častíc), po 1 mesiaci a 2 mesiacoch uchovávaní. Častice boli uchovávané pri 4 °C v chladničke, aby sa zvýšila ich stabilita. V štúdiu Wei Zhou et al. poukazuje na to ako ovplyvní teplota uchovávaní stabilitu častíc. Pri niektorých pripravených časticiach skladovaných pri 25 °C bolo pozorované, že sa stabilita výrazne zmenila po mesiaci a taktiež farba roztoku lipozómov sa zmenila. A preto je najlepšie uchovávať lipozomálne častice v chladnejších podmienkach [71].

Stabilita všetkých častíc sa po mesiaci skladovania výrazne nezmenila (viď Tabuľka 12) a teda častice boli stabilné, no po 2 mesiacoch stabilita u niektorých častíc vzrástla nad hranicu -30 mV. Častice pripravené z extraktov feniklu a echinacei boli po 2 mesiacoch nestabilné. Pravdepodobne príčinu ich nestabilnej povahy mohli spôsobiť látky nachádzajúce v extrakte potravín, ktoré spôsobili ich agregáciu a tieto agregáty, ktoré mali väčšiu veľkosť sa postupne začali usadzovať na dno skúmavky. Zeta potenciál prázdnych lipozómov taktiež klesol pod stabilitnú hranicu. Mohlo to byť spôsobené zlým odpipetovaním častíc a riedením, nakoľko vo vode sa nenachádzali žiadne bioaktívne látky, ktoré by narušili membránu lipozómov. Stabilita prázdnych lipozómov by sa dala prirovnať k stabilite lipozómov

s extraktom mrkvy, nakoľko z mrkvy sa nevyextrahovali skoro žiadne polyfenoly a teda by sa dalo predpokladať, že žiadne bioaktívne látky nenarušili stabilitu častíc. Tiež ale mohlo dojsť k tomu, že z mrkvy sa naopak vyextrahovali látky, ktoré lipozómy stabilizovali. Efekt by mohol byť podobný ako u prázdnych lipozómov s PHB, ktorých stabilita bola podstatne vyššia ako lipozómov bez PHB a tiež v priebehu uchovávaní klesala, ale neklesla pod stabilitnú hranicu.

Ďalej sa zmerala stabilita častíc, ktoré boli priamo aplikované v testovaní cytotoxicity. Tieto častice boli najprv centrifugované na 6000 ot./ 5min a následne scentrifugované pri 11000 ot./1h. Ako vidieť niektoré častice neboli stabilné, čo mohli spôsobiť sily, ktoré na ne pôsobili počas centrifugácie. Tieto častice sa zmerali po 2 týždňoch prípravy.

*Tabuľka 12: Zeta potenciál častíc.*

Častice	1.deň	1. mesiac	2. mesiac	Filtrované (14. deň)
Lipozómy prázdne	-41,4 ± 1,9	-37,3 ± 2,8	-27,8 ± 0,9	-55,5 ± 1,4
Lipozómy (mrkva)	-41,7 ± 0,7	-49,9 ± 1,8	-40,2 ± 2,1	-32,3 ± 0,6
Lipozómy (lesné plody)	-37,9 ± 0,6	-55,2 ± 0,9	-24,0 ± 0,7	-35,5 ± 0,7
Lipozómy (rooibos)	-33,0 ± 1,4	-45,0 ± 1,5	-32,3 ± 1,1	-28,7 ± 1,3
Lipozómy (matcha)	-41,8 ± 0,3	-36,1 ± 1,1	-35,0 ± 0,9	-28,2 ± 1,2
Lipozómy (echinacea)	-35,0 ± 3,5	-34,7 ± 3,3	-26,8 ± 2,8	-55,6 ± 0,6
Lipozómy (fenikel)	-32,5 ± 0,3	-34,4 ± 0,7	-28,9 ± 1,5	-61,1 ± 1,9
Lipozómy + PHB prázdne	-42,4 ± 0,3	-51,3 ± 1,1	-37,1 ± 2,8	-56,1 ± 0,9
+ PHB (mrkva)	-50,6 ± 1,9	-57,4 ± 1,3	-43,1 ± 0,5	-44,3 ± 0,5
+ PHB (lesné plody)	-40,4 ± 2,3	-53,4 ± 0,9	-31,4 ± 1,3	-55,2 ± 2,2
+ PHB (rooibos)	-39,0 ± 1,9	-42,9 ± 0,3	-32,5 ± 2,0	-30,4 ± 0,7
+ PHB (matcha)	-34,9 ± 0,6	-41,6 ± 0,5	-32,5 ± 0,8	-54,3 ± 0,5
+ PHB (echinacea)	-31,8 ± 1,0	-42,4 ± 0,4	-22,9 ± 1,8	-22,6 ± 0,9
+ PHB (fenikel)	-33,3 ± 0,7	-37,6 ± 0,4	-23,1 ± 0,8	-28,9 ± 1,1

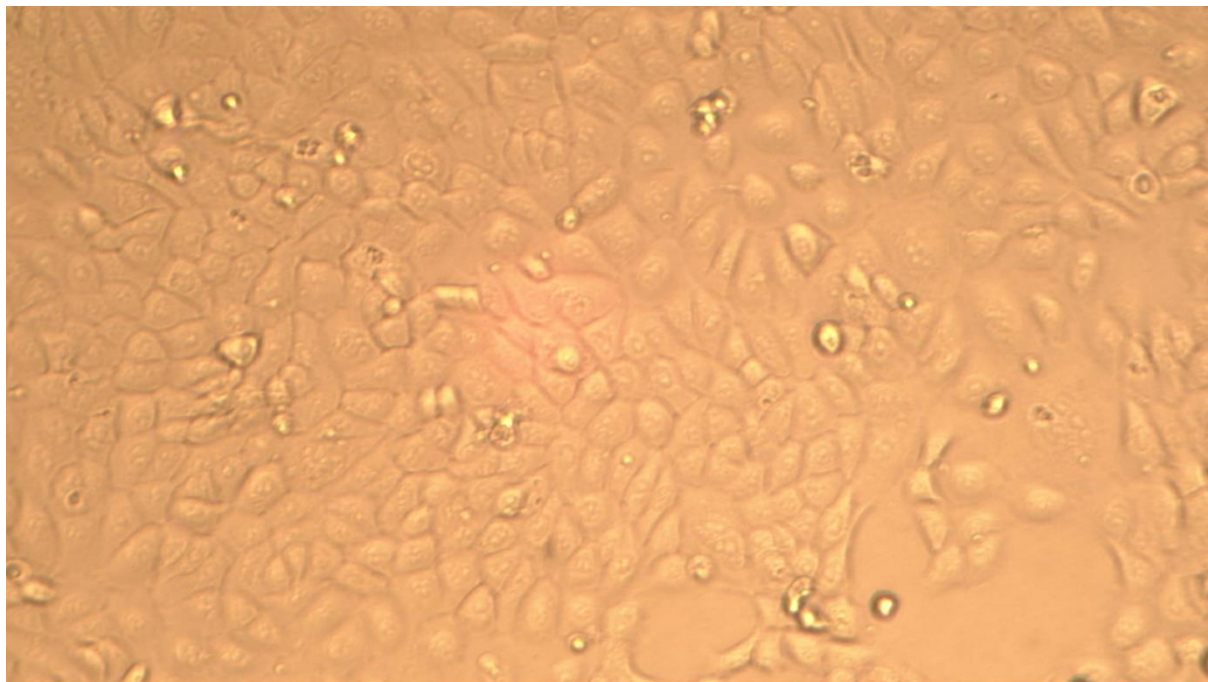
## 4.5 Bunkové kultúry

### 4.5.1 Pasážovanie

Pasážovanie buniek prebiehalo podľa postupu uvedeného v kapitole 3.7. Časť z tohto postupu bola vykonaná tiež pri testovaní cytotoxicity častíc. Kultivované keratínocyty, konkrétne HaCaT bunky (imortalizované keratínocyty) sa zaraďujú medzi adhezívne bunky, čo znamená, že pri ich proliferácii sú naviazané na nejaký podklad, v tomto prípade dno nádoby. Bunky v priebehu proliferácie zaplnili dno nádoby, čo je znázornené na Obrázku 8. Ak bol povrch nádoby takto porastený bunkami, tak bunky sa podrobili pasážovaniu.

Bunky sa prichytili na dno nádoby pomocou bielkovinových častí, ktoré boli v komplexe s Ca<sup>+</sup> iónmi, ktoré boli vymyté pomocou pufru. Následne odtrhnutie bielkovinových častí buniek bolo dosiahnuté pomocou enzýmu trypsín (proteáza), ktorý rozštiepil bielkoviny a tak už bunky neboli prichytené o podklad. Po odtrhnutí buniek o podklad sa ich morfológia náhle

zmenila. Kým boli bunky prichytené o dno nádoby, vytvárali hustú sieť ‚dlaždičiek‘ (Obrázok 8) a po spasážovaní sa ich tvar zmenil na gulôčkový.



*Obrázok 8: Morfológia buniek pred pasážovaním; 100x zväčšenie.*

#### 4.5.2 Test cytotoxicity

Pri testovaní cytotoxicity častíc na humánnych bunkách sa použil MTT test, ktorého postup je uvedený v kapitole 3.8. Testovanie prebiehalo, keď v kultivačných nádobkách bol rozrastený dostatočný počet buniek. Bunky, ktoré boli použité na test boli z 40.– 44. pasáže a ich počet a viabilita sa pozorovala pomocou inverzného mikroskopu.

Koncentrácia lecitínu u lipozomálnych a kombinovaných častíc bola vypočítaná pomocou postupu uvedeného v kapitole 3.6.1. Testované častice sa aplikovali na keratínocyty v nasledovnom riedení: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 %. Na základe tohto riedenia sa vypočítalo taktiež množstvo enkapsulovaných polyfenolov, ktoré boli testované na bunkách. Sumárne výsledky sú uvedené v Tabuľka 13 a Tabuľka 14.

*Tabuľka 13: Základné parametre testovaných lipozómov.*

Lipozómy	Riedenie [%]	Viabilita buniek [%]	Koncentrácia lecitínu [mg/ml]	Enkapsulované polyfenoly [mg/ml]
Prázdne	2	98,43 ± 2,58	0,025 ± 0,002	–
	4	126,90 ± 6,51	0,061 ± 0,004	–
	6	131,70 ± 6,24	0,078 ± 0,006	–
	8	125,70 ± 1,34	0,102 ± 0,008	–
	10	120,30 ± 5,44	0,127 ± 0,010	–
	12	105,00 ± 2,98	0,153 ± 0,012	–
	14	91,39 ± 1,34	0,178 ± 0,014	–

<b>Rooibos</b>	2	100,00 ± 3,57	0,017 ± 0,001	0,160 ± 0,011
	4	100,00 ± 5,30	0,033 ± 0,001	0,320 ± 0,021
	6	91,67 ± 6,09	0,050 ± 0,002	0,479 ± 0,032
	8	88,52 ± 4,76	0,066 ± 0,003	0,639 ± 0,042
	10	79,37 ± 4,66	0,083 ± 0,004	0,799 ± 0,053
	12	74,52 ± 5,88	0,100 ± 0,004	0,959 ± 0,064
	14	76,61 ± 5,87	0,116 ± 0,005	1,118 ± 0,074
<b>Lesné plody</b>	2	86,24 ± 2,43	0,025 ± 0,001	0,006 ± 0,001
	4	83,51 ± 2,78	0,049 ± 0,001	0,012 ± 0,003
	6	81,76 ± 1,37	0,074 ± 0,002	0,018 ± 0,004
	8	78,56 ± 0,45	0,098 ± 0,002	0,023 ± 0,005
	10	72,63 ± 1,25	0,123 ± 0,003	0,029 ± 0,007
	12	68,40 ± 2,20	0,148 ± 0,004	0,035 ± 0,008
	14	59,00 ± 3,65	0,172 ± 0,004	0,041 ± 0,009
<b>Matcha</b>	2	93,93 ± 5,73	0,029 ± 0,000	0,123 ± 0,003
	4	92,97 ± 6,36	0,058 ± 0,000	0,247 ± 0,005
	6	83,98 ± 9,04	0,087 ± 0,001	0,370 ± 0,008
	8	84,03 ± 3,11	0,116 ± 0,001	0,494 ± 0,011
	10	76,81 ± 1,20	0,145 ± 0,001	0,617 ± 0,013
	12	70,02 ± 4,24	0,174 ± 0,001	0,741 ± 0,016
	14	–	0,203 ± 0,001	0,864 ± 0,019
<b>Mrkva</b>	2	100,00 ± 2,25	0,023 ± 0,003	0,000 ± 0,000
	4	95,33 ± 1,98	0,046 ± 0,005	0,001 ± 0,000
	6	83,89 ± 2,84	0,070 ± 0,008	0,001 ± 0,000
	8	77,98 ± 2,83	0,093 ± 0,010	0,002 ± 0,000
	10	69,02 ± 3,60	0,116 ± 0,013	0,002 ± 0,000
	12	54,40 ± 2,17	0,139 ± 0,016	0,003 ± 0,000
	14	30,69 ± 3,33	0,163 ± 0,018	0,003 ± 0,000
<b>Fenikel</b>	2	100,00 ± 5,93	0,013 ± 0,000	0,023 ± 0,002
	4	96,02 ± 0,35	0,025 ± 0,001	0,046 ± 0,005
	6	91,38 ± 6,03	0,038 ± 0,001	0,069 ± 0,007
	8	87,27 ± 4,89	0,050 ± 0,001	0,091 ± 0,010
	10	85,56 ± 4,89	0,063 ± 0,002	0,114 ± 0,012
	12	74,08 ± 6,84	0,075 ± 0,002	0,137 ± 0,014
	14	58,25 ± 8,35	0,088 ± 0,002	0,160 ± 0,017
<b>Echinacea</b>	2	85,87 ± 5,93	0,011 ± 0,004	0,018 ± 0,004
	4	117,90 ± 0,35	0,023 ± 0,008	0,036 ± 0,009
	6	123,80 ± 6,03	0,034 ± 0,012	0,053 ± 0,013
	8	109,40 ± 4,89	0,045 ± 0,016	0,071 ± 0,018
	10	81,54 ± 4,89	0,056 ± 0,020	0,089 ± 0,022
	12	75,64 ± 6,84	0,068 ± 0,024	0,107 ± 0,027



	14	68,23 ± 8,35	0,079 ± 0,028	0,124 ± 0,031
--	----	--------------	---------------	---------------

Tabuľka 14: Základné parametre testovaných kombinovaných PHB častíc.

Kombinované PHB	Riedenie [%]	Viabilita buniek [%]	Koncentrácia lecitínu [mg/ml]	Enkapsulované polyfenoly [mg/ml]
Prázdne	2	100,00 ± 11,6	0,026 ± 0,002	–
	4	117,30 ± 4,10	0,053 ± 0,005	–
	6	108,30 ± 5,53	0,079 ± 0,007	–
	8	101,10 ± 0,80	0,105 ± 0,009	–
	10	112,30 ± 8,10	0,132 ± 0,012	–
	12	71,77 ± 0,46	0,158 ± 0,014	–
	14	53,37 ± 10,94	0,184 ± 0,016	–
Rooibos	2	45,50 ± 3,89	0,032 ± 0,005	0,154 ± 0,009
	4	53,95 ± 5,37	0,065 ± 0,010	0,308 ± 0,017
	6	62,87 ± 6,15	0,097 ± 0,014	0,463 ± 0,026
	8	72,56 ± 5,16	0,130 ± 0,019	0,617 ± 0,034
	10	59,15 ± 10,25	0,162 ± 0,024	0,771 ± 0,043
	12	47,36 ± 6,43	0,195 ± 0,029	0,925 ± 0,052
	14	48,86 ± 10,04	0,227 ± 0,033	1,079 ± 0,060
Lesné plody	2	83,94 ± 9,12	0,029 ± 0,007	0,004 ± 0,001
	4	84,51 ± 9,48	0,057 ± 0,015	0,008 ± 0,001
	6	80,65 ± 8,96	0,086 ± 0,022	0,011 ± 0,002
	8	75,34 ± 6,10	0,114 ± 0,029	0,015 ± 0,003
	10	58,28 ± 12,30	0,143 ± 0,036	0,019 ± 0,004
	12	68,40 ± 9,55	0,171 ± 0,044	0,023 ± 0,005
	14	48,90 ± 5,41	0,200 ± 0,051	0,027 ± 0,006
Matcha	2	92,54 ± 5,73	0,023 ± 0,001	0,016 ± 0,003
	4	92,18 ± 6,36	0,046 ± 0,002	0,033 ± 0,006
	6	76,62 ± 9,04	0,069 ± 0,003	0,049 ± 0,009
	8	59,26 ± 3,11	0,092 ± 0,003	0,066 ± 0,013
	10	54,59 ± 1,20	0,115 ± 0,004	0,082 ± 0,016
	12	28,68 ± 4,24	0,137 ± 0,005	0,099 ± 0,019
	14	19,79 ± 3,29	0,160 ± 0,006	0,115 ± 0,022
Mrkva	2	62,22 ± 0,85	0,026 ± 0,003	0,001 ± 0,000
	4	50,34 ± 3,18	0,053 ± 0,009	0,002 ± 0,000
	6	46,64 ± 2,55	0,079 ± 0,013	0,002 ± 0,000
	8	47,65 ± 6,58	0,106 ± 0,015	0,003 ± 0,000
	10	38,45 ± 9,26	0,132 ± 0,021	0,004 ± 0,000
	12	21,38 ± 2,47	0,159 ± 0,026	0,005 ± 0,000

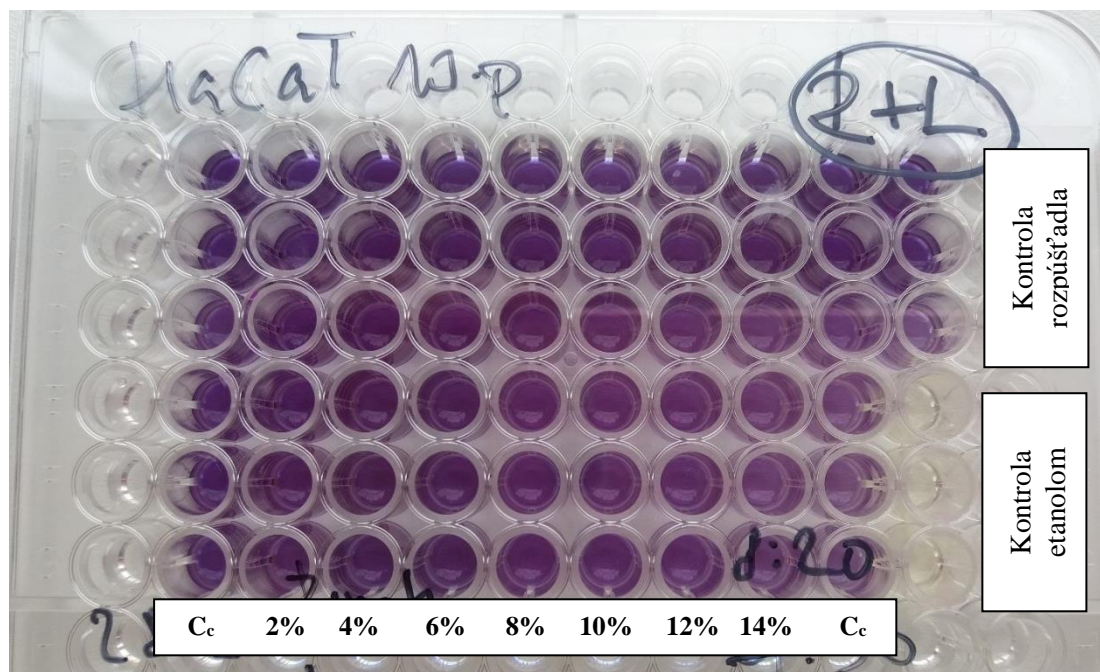
	14	17,07 ± 1,27	0,185 ± 0,030	0,006 ± 0,000
<b>Fenikel</b>	2	67,70 ± 0,42	0,017 ± 0,005	0,012 ± 0,002
	4	55,97 ± 7,14	0,034 ± 0,010	0,024 ± 0,004
	6	58,85 ± 7,21	0,051 ± 0,015	0,036 ± 0,005
	8	50,59 ± 9,33	0,068 ± 0,020	0,048 ± 0,007
	10	38,57 ± 6,08	0,086 ± 0,025	0,060 ± 0,009
	12	42,04 ± 3,11	0,103 ± 0,029	0,072 ± 0,011
	14	36,58 ± 5,52	0,120 ± 0,034	0,084 ± 0,013
	<b>Echinacea</b>	2	66,58 ± 8,70	0,014 ± 0,004
4		73,70 ± 1,13	0,027 ± 0,009	0,016 ± 0,004
6		96,62 ± 1,91	0,041 ± 0,013	0,024 ± 0,006
8		74,33 ± 4,31	0,054 ± 0,018	0,032 ± 0,008
10		48,41 ± 10,11	0,068 ± 0,022	0,040 ± 0,010
12		64,29 ± 6,79	0,081 ± 0,027	0,048 ± 0,013
14		37,87 ± 2,80	0,095 ± 0,031	0,055 ± 0,015

Interakcia pripravených častíc z vodných extraktov a HaCaT buniek bola otestovaná pomocou MTT testu. Častice, pri ktorých poklesla viabilita buniek pod hranicu 50 % boli cytotoxické. Z porovnania Graf 13 a Graf 14 vyplýva, že kombinované PHB častice sa javili ako viac toxické než tie lipozomálne. Zaujímavé je, že spomedzi lipozomálnych častíc sa najviac cytotoxická javila mrkva, nakoľko sa z nej do vodného extraktu uvoľnilo menej než 1 mg/g polyfenolických látok a tak sa nepredpokladalo, že by mali byť najviac cytotoxické. Pravdepodobne povrch mrkvi nebol vhodne ošetrovaný a do vody sa dostali škodlivé látky, ktoré sa mohli nachádzať v hnojive alebo pôde. Dôkazom toho bolo aj ľahké sčernenie mrkvy počas prípravy extraktu. Okrem lipozómov s prídavkom mrkvy sa pod cytotoxickú hranicu 50% nedostali ostatné lipozómy. Z toho plynie, že lipozómy s vodnými extraktami jednotlivých potravín boli z pohľadu cytotoxicity bezpečné.

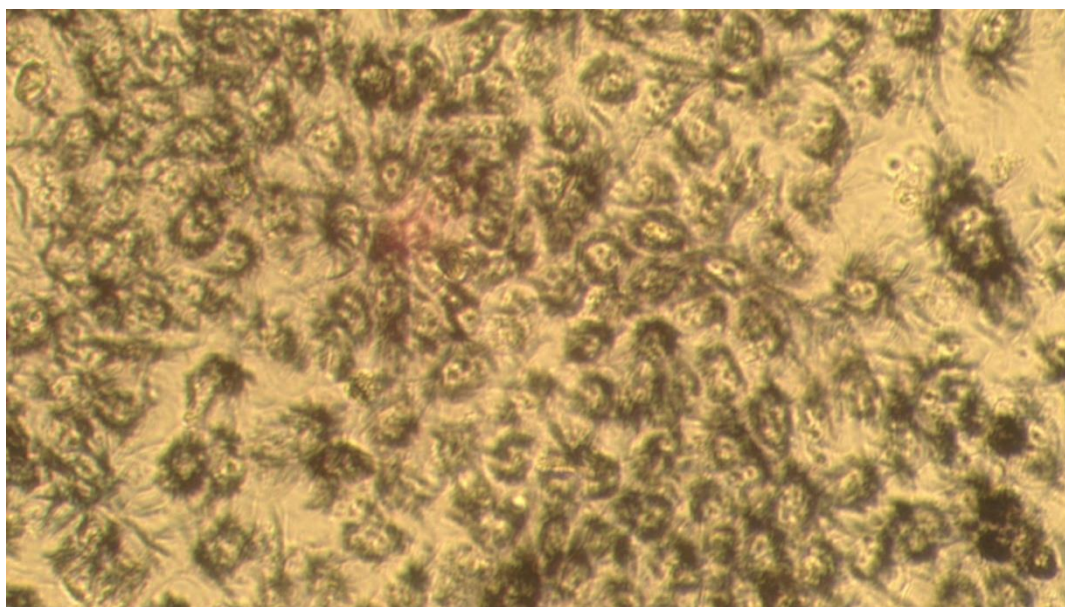
Naopak niektoré PHB častice boli z pohľadu cytotoxicity nebezpečné, avšak prázdne PHB častice neboli cytotoxické. Aj pri PHB časticiach boli najtoxickéjšie tie s prívkom v mrkvy, ale ako je vyššie spomenuté, bolo to pravdepodobne spôsobené prítomnosťou nežiadúcich látok z nesprávneho ošetrovania potraviny. Väčšina PHB častíc sa javila toxická pri vyšších koncentráciách - pri 12% a 14% riedení. Takmer netoxické boli PHB s lesnými plodmi, kedy viabilita buniek pri 14% dosiahla hodnotu 48,90 ± 5,41 %.

Pri časticiach s vodným extraktom echinacei a rooibosu sú hodnoty viability buniek mierne rozptýlené, čo bolo pravdepodobne spôsobené chybami v manipulácii počas testovania.

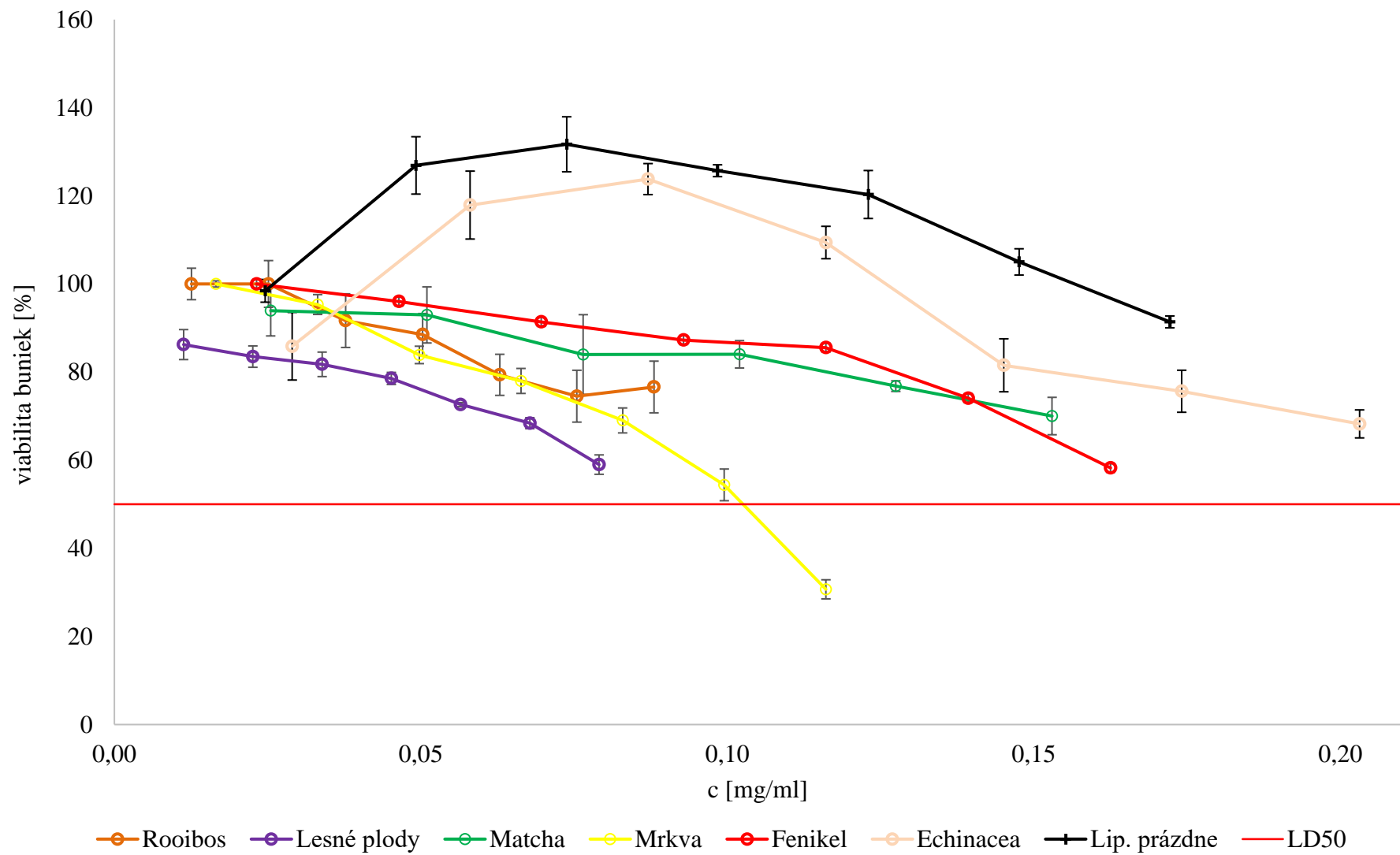
Testované častice boli rozpipetované do 42 jamiek, v druhom stĺpci sa nachádzalo čisté médium s bunkami ako pozitívna kontrola, v pravom hornom rohu bola meraná kontrola rozpúšťadla. Pre kontrolu usmrtenia buniek bol použitý 40% etanol (cytotoxické činidlo), ktorý spôsobil nekrozu buniek, čo je zobrazené na Obrázku 9, kedy žlté farbivo MTT nebolo zredukované na fialový formazán, čo indikuje usmrtené bunky, ktoré nemali aktívne príslušné enzýmy.



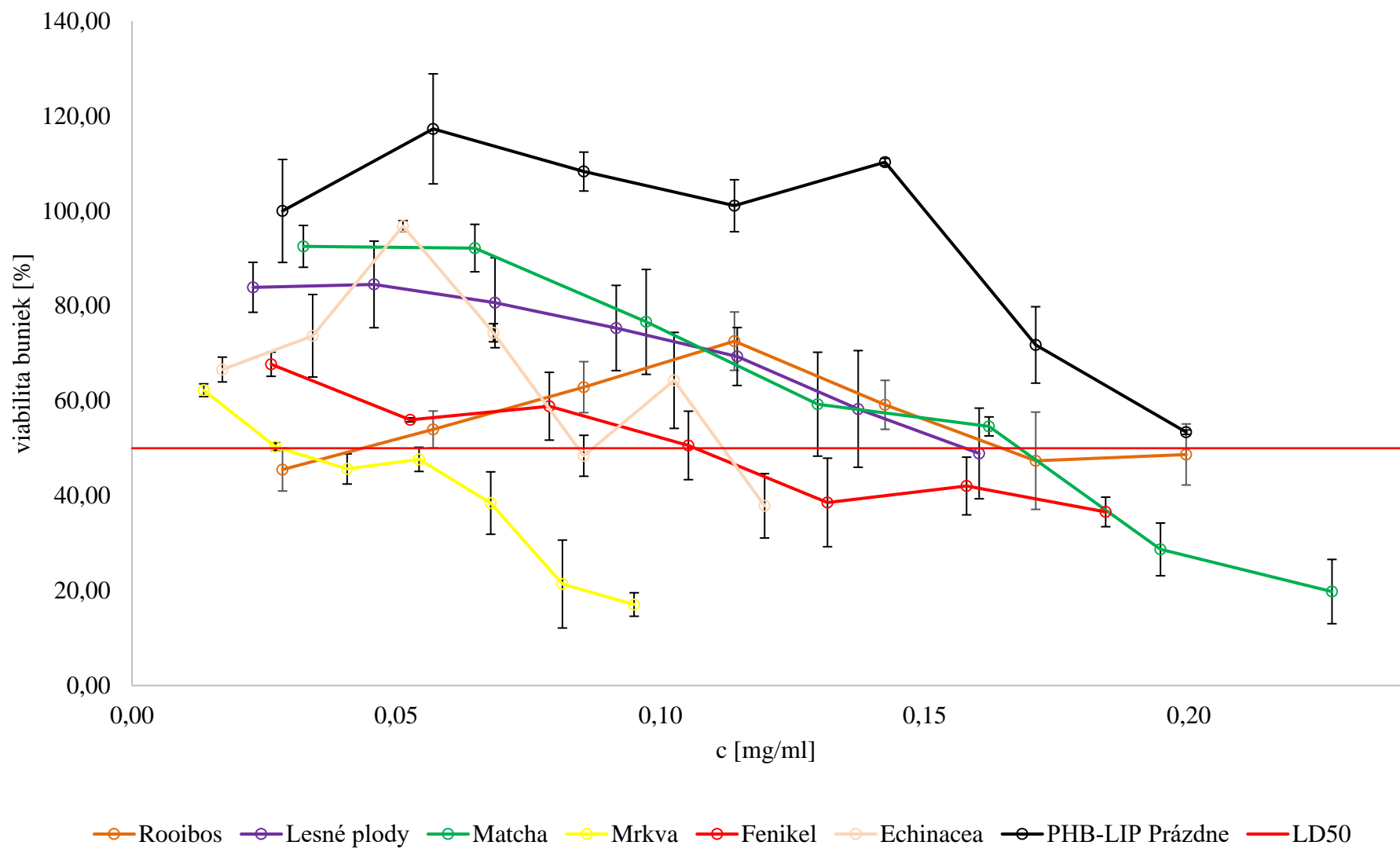
**Obrázok 9:** Doštička na 4.deň po aplikovaní MTT. Boli testované lipozómy rooibosu a lesných plodov.



**Obrázok 10:** Bunky po aplikovaní MTT, ktorý životaschopné bunky premenili na fialový formazán.



**Graf 13:** Závislosť viability buniek na koncentrácii lecitínu pri použití lipozomálnych častíc.



**Graf 14:** Závislosť viability buniek na koncentrácii lecitínu pri použití kombinovaných PHB častíc.

#### 4.6 Stanovenie genotoxicity častíc

Pri stanovovaní genotoxicity bol použitý postup uvedený v kapitole 3.9. Pri každej testovanej vzorke bol vypočítaný SOS indukčný faktor (SOSIF). Najskôr bola vypočítaná aktivita enzýmu beta-galaktozidázy z nameraných hodnôt pri 630 nm a potom aktivita alkalickéj fosfatázy pri 405 nm. Ako ďalší parameter bola vypočítaná špecifická aktivita beta-galaktozidázy ako pomer aktivity oboch enzýmov. Z týchto výsledkov bol nakoniec vypočítaný SOSIF ako pomer špecifickej aktivity galaktozidázy a aktivita pre negatívnu kontrolu. Výpočetné rovnice sú nasledovné:

$$a_{\text{gal.}} = \frac{1000 \cdot \Delta A_{630}}{t}, \quad (1)$$

$$a_{\text{fos.}} = \frac{1000 \cdot \Delta A_{405}}{t}, \quad (2)$$

$$a_{\text{spec.gal.}} = \frac{a_{\text{gal.}}}{a_{\text{fos.}}}, \quad (3)$$

$$\text{SOSIF} = \frac{a_{\text{spec.gal.}}}{a_{\text{spec.gal.NK}}}, \quad (4)$$

kde  $\Delta A$  je zmena absorbancie po 90 minútach a  $a_{\text{spec.gal.NK}}$  je aktivita pre negatívnu kontrolu.

Všetky vyhodnotené SOSIF hodnoty testovaných vzoriek boli blízko nule, z čoho vyplýva, že žiadna testovaná vzorka nebola genotoxická, keďže genotoxické látky nadobúdajú SOSIF hodnoty vyššie než 1,5 [69]. Boli testované prázdne lipozómy a s extraktom fenikla, matchi, rooibosu, echinacei a prázdne PHB kombinované častice s extraktom fenikla, matchi, rooibosu a echinacei.

## 5 ZÁVER

Diplomová práca bola zameraná na štúdium bioaktívnych látok vo vybraných tzv. superpotravinách rastlinného pôvodu a ich interakcie s keratinocytmi. Taktiež testovanie cytotoxicity a genotoxicity bolo optimalizované.

V teoretickej časti bola spracovaná krátka rešerš o jednotlivých potravinách a ich bioaktívnych látkach. Boli tiež popísané vezikulárne systémy na prenos bioaktívnych látok. V rámci bunkových kultúr bola v rešerši spomenutá manipulácia s humánnymi bunkami a ich ďalšie využitie pri zhodnotení cytotoxicity lipozomálnych a kombinovaných PHB častíc. Taktiež v práci boli uvedené základné genotoxické testy, pomocou ktorých pripravené častice boli otestované.

Ako prvé v rámci experimentálnej časti sa stanovili spektrofotometrickými metódami vybrané bioaktívne látky v potravinách: mrkve, fenikli, echinacei, lesných plodoch a nápojoch: rooibose a matchi. Na tieto stanovenia boli používané vodné a etanolové extrakty potravín. Jednalo sa najmä o stanovenie antioxidantov, ktoré predstavovali polyfenolické látky. Bolo zistené, že najväčšie množstvo polyfenolických látok obsahovala matcha  $227,92 \pm 1,83$  mg/g a najmenšie množstvo mrkva  $0,85 \pm 0,22$  mg/g, ktorá je bohatá na lipofilný pigment  $\beta$ -karotén rozpustný najmä v nepolárnych organických rozpúšťadlách. Ako najvhodnejšie prostredie pre extrakciu polyfenolických látok boli preukázané 40% a 60% roztoky etanolu vo vode. Dalej pri nápojoch matchi a rooibose boli stanovené triesloviny vo vodnom a 50% metanolovom prostredí, kde ich obsah bol najvyšší. Triesloviny pôsobia ako antioxidanty, no môžu v určitých prípadoch pôsobiť antinutrične, pričom ich matcha obsahovala menej vo vodnom prostredí  $16,40 \pm 0,01$  mg/g než rooibos vo vodnom prostredí  $28,04 \pm 1,01$  mg/g.

Vodné extrakty každej potraviny a nápoja boli enkapsulované do lipozómov a kombinovaných lipozomálnych častíc s obsahom 20% PHB namiesto lecitínu. Enkapsulačná účinnosť bola najvyššia pri lipozómoch s obsahom rooibosu ( $64,9 \pm 0,3$  %) a najmenšia pri lipozómoch s obsahom mrkvy ( $12,6 \pm 1,2$  %), čo odpovedalo tomu, že vo vodnom extrakte mrkvy sa nachádzalo najmenej bioaktívnych látok. Z hľadiska stability boli častice aj po mesiaci ich prípravy stále stabilné, čo bolo overené spektrofotometricky, ale aj meraním zeta potenciálu na analyzátore ZetaSizer (Malvern). No po 2 mesiacoch už niektoré častice boli nestabilné, čo sa prejavilo ich postupnou agregáciou, následkom čoho sa veľké zhluky v lipozomálnych suspenziách začali usadzovať na dne centrifugačnej skúmavky. Tými najmenej stabilnými časticami boli lipozomálne častice s obsahom feniklu a echinacei. Veľkostne sa lipozómy pohybovali od približne 130–200 nm, zatiaľ čo veľkosť kombinovaných lipozóm/PHB častíc bola v rozmedzí približne 200–600 nm. Po 2 mesiacoch sa veľkosť u nestabilných častíc zmenila, pri echinacei až na približne na 2000 nm, čo opäť dokazovalo, že dané častice začali agregovať.

Ako bunkové línie pre skúmanie cytotoxicity daných častíc s enkapsulovanými bioaktívnymi látkami boli vybrané HaCaT bunky. Kultivovali sa v CO<sub>2</sub>-termoboxe pri teplote 37 °C a s 5% koncentráciou oxidu uhličitého. Bunkám sa každý tretí deň vymieňalo médium a ak ich konfluencia v nádobe dosiahla 70–80 %, boli pasážované. Pre testovanie cytotoxicity bol zvolený MTT test, ktorého princípom je skúmanie viability buniek na základe aktivity mitochondriálneho enzýmu sukcinátdehydrogenázy, ktorý premieňa látku MTT na fialový

formazán. Všeobecne viac cytotoxické boli kombinované lipozóm/PHB častice, zatiaľ čo čisto lipozomálne častice boli netoxické okrem lipozómov s extraktom mrkvy pri 14% riedení, kedy viabilita buniek bola  $30,69 \pm 3,33$  %. Najpravdepodobnejšie je, že v priebehu úpravy tejto suroviny nebola mrkva dostatočne hygienicky ošetrovaná a nejaká nevhodná látka sa dostala z povrchu do extraktu mrkvi.

Z pohľadu genotoxicity sa lipozomálne a aj kombinované lipozóm/PHB častice javili ako netoxické, nakoľko SOSIF faktor bol pri všetkých časticiach blízky nule, pričom pri toxických látkach nadobúda hodnoty vyššie ako 1,5.

Účelom predloženej práce bolo otestovať niektoré potraviny označované ako „superpotraviny“ z hľadiska zloženia, obsahu aktívnych látok a biologického účinku. Bolo overené, že niektoré z analyzovaných potravín skutočne obsahujú vysoké množstvo antioxidantov. Enkapsuláciou do lipozómov a kombinovaných častíc lipozóm/PHB bola potvrdená zvýšená dlhodobá stabilita aktívnych látok prírodných extraktov v enkapsulovanej forme. Testy na ľudských bunkách potvrdili, že častice s obsahom extraktov sú netoxické do koncentrácie aspoň 10%, čo je dostačujúce pre bezpečné použitie.

Prínosom tejto práce by mohlo byť do budúcnosti využitie lipozomálnych častíc s enkapsulovanými látkami alebo samotnými extraktami v upravených potravinách, liekoch alebo kozmetických prípravkoch. Napríklad je už komerčne dostupný vitamín C v lipozomálnej forme, a tiež existujú opaľovacie krémy s extraktami zeleného čaju. V tomto ohľade je perspektívna najmä matcha, nakoľko má extrémne vysokú antioxidačnú aktivitu. Samotné analyzované potraviny v sušenej forme vykazujú vlastnosti, ktoré by sa mohli pozitívne prejaviť na ľudskom organizme. Z analyzovaných natívnych potravín spĺňa charakter superpotraviny najmä lesné ovocie, a to jednak vysokým obsahom aktívnych látok, vysokou stabilitou v enkapsulovanej forme a príjemnou arómou pre aplikáciu do potravín aj do kozmetických prípravkov.



## 6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] PRAVST, I. Functional Foods in Europe: A Focus on Health Claims, Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry, Dr. Benjamin Valdez (Ed.). 2012. ISBN: 978-953-307-916-5, InTech, Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/scientific-health-and-social-aspects-of-the-food-industry/functional-foods-in-europe-a-focus-on-health-claims>
- [2] HAMANO, Hiroaki. Regulations/Guidelines relating to functional foods in Japan. <https://www.slideshare.net> [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://www.slideshare.net/Adrienna/japan-regulations-guidelines-for-functional-foods>
- [3] SERAFINI, M., A. STANZIONE a S. FODDAI. Functional foods: traditional use and European legislation. International Journal of Food Sciences and Nutrition [online]. 2012, 63(sup1), 7-9 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.3109/09637486.2011.637488. ISSN 0963-7486. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/09637486.2011.637488>
- [4] LIERS, H. Benefits of liposomal nutrients (liposomes) [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <http://www.integratedhealthblog.com/benefits-of-liposomal-nutrients-liposomes-2/>
- [5] SIRÓ, I., E. KÁPOLNA, B. KÁPOLNA a A. LUGASI. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review: traditional use and European legislation. Appetite [online]. 2008, 51(3), 456-467 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1016/j.appet.2008.05.060. ISSN 01956663. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195666308004923>
- [6] Generally Recognized as Safe (GRAS) [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>
- [7] BURDOCK, G. A. Fenaroli's handbook of flavor ingredients. 6th ed. Boca Raton: CRC Press, c2010. ISBN 978-142-0090-772.
- [8] GUINE, R., LIMA, M. J., a M. J BARROCA. Role and health benefits of different functional food components [online]. 2009, [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <http://www.ipv.pt/millenium/Millenium37/3.pdf>
- [9] Functional Foods [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <http://www.foodinsight.org/Content/3842/Final%20Functional%20Foods%20Background.pdf>
- [10] PRAVST I.. Funcional Food in Europe: A Focus on Health Claims [online]. 2009, [cit. 2018-02-04]. 2012. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.467.1747&rep=rep1&type=pdf>
- [11] VIVEK K. G. a S. KUMAR SHARMA. Plants as natural antioxidants. Dostupné z: <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/7962/1/NPR%205%284%29%20326-334.pdf>
- [12] LOBO, V., A. PATIL, A. PHATAK a N. CHANDRA. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Reviews [online]. 2010,

- 4(8), 118- [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.4103/0973-7847.70902. ISSN 0973-7847. Dostupné z: <http://www.phcogrev.com/text.asp?2010/4/8/118/70902>
- [13] TANAKA, T., M. SHNIMIZU a H. MORIWAKI. Cancer Chemoprevention by Carotenoids. *Molecules* [online]. 2012, **17**(3), 3202-3242 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.3390/molecules17033202. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/3/3202>
- [14] CASTAÑEDA-OVANDO, A., M. de L. PACHECO-HERNÁNDEZ, E. PÁEZ-HERNÁNDEZ, J. A. RODRÍGUEZ a C. A. GALÁN-VIDAL. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* [online]. 2009, **113**(4), 859-871 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.001. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608010674>
- [15] BÖHM, H., Ma. de Lourdes PACHECO-HERNÁNDEZ, Ma. Elena PÁEZ-HERNÁNDEZ, José A. RODRÍGUEZ a Carlos Andrés GALÁN-VIDAL. G. Mazza und E. Miniati: Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains. 362 Seiten, zahlr. Abb. und Tab. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo 1993. Preis. *Food Chemistry*[online]. 2009, **113**(4), 859-871 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1002/food.19940380317. ISBN 10.1002/food.19940380317. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/food.19940380317>
- [16] Eddited by J.B. HARBORNE. *Plant phenolics* [online]. 2.pr. London [u.a.]: Academ. Press, 1993 [cit. 2018-04-07]. ISBN 01-246-1011-0. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?hl=sk&lr=&id=6UbRS4p56coC&oi=fnd&pg=PA389&dq=tannins&ots=qKFOu7SKLh&sig=iJpBEn39skJ4MFxriD7MiSUOM90&redir\\_esc=y#v=onepage&q=tannins&f=false](https://books.google.cz/books?hl=sk&lr=&id=6UbRS4p56coC&oi=fnd&pg=PA389&dq=tannins&ots=qKFOu7SKLh&sig=iJpBEn39skJ4MFxriD7MiSUOM90&redir_esc=y#v=onepage&q=tannins&f=false)
- [17] CHUNG, K.T., T.Y. WONG, C.I. WEI, Yao-Wen HUANG a Y. LIN. Tannins and Human Health: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 1998, **38**(6), 421-464 [cit. 2018-04-07]. DOI: 10.1080/10408699891274273. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408699891274273>
- [18] CHEN, K. a M. ROCA. In vitro bioavailability of chlorophyll pigments from edible seaweeds. *Journal of Functional Foods* [online]. 2018, **41**, 25-33 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.jff.2017.12.029. ISSN 17564646. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464617307508>
- [19] İnanç A. L. Chlorophyll: structural properties, health benefits and its occurrence in virgin olive oils. *Akademik Gıda*. 2011;9:26–32 [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <http://www.academicfoodjournal.com/archive/2011/issue2/26-32.pdf>
- [20] WEISS, D. J. a C. R. ANDERTON. Determination of catechins in matcha green tea by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2003, 1011(1-2), 173-180 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)01133-6. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967303011336>
- [21] Health benefits of matcha tea [online]. [cit 2018-02-04]. Dostupné z: <http://matchasource.com/health-benefits-of-matcha-tea/>
- [22] THI, V., I. MGEBRISHVILI, V. HRAMOVA, A. KOROTKOVA, I. GORLOV. The analysis of the using efficiency Japanese matcha tea in the fermented milk products

- production. 2007, Vol. 20, pp. 86-91. *Journal of Hygienic Engineering and Design*.  
Dostupné z: <http://jhed.mk/filemanager/JHED%20Vol.%2020/03.%20FPP/09.%20Full%20paper%20-%20Thi%20Vu.pdf>
- [23] Matcha green tea powder [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <http://www.matchaconnection.com/wp-content/uploads/2016/07/matcha-green-tea-powder-712x560.jpg>
- [24] JAGANYI, D. a P. J. WHEELER. Rooibos tea: equilibrium and extraction kinetics of aspalathin. *Food Chemistry* [online]. 2003, 83(1), 121-126 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1016/S0308-8146(03)00065-7. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814603000657>
- [25] MONSEES, T.K. a C.S. OPUWARI. Effect of rooibos (*Aspalathus linearis*) on the female rat reproductive tract and liver and kidney functions in vivo: equilibrium and extraction kinetics of aspalathin. *South African Journal of Botany* [online]. 2017, 110(1), 208-215 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1016/j.sajb.2016.11.013. ISSN 02546299. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254629916305257>
- [26] HÜBSCH, Z., S.F. VAN VUUREN a R.L. VAN ZYL. Can rooibos (*Aspalathus linearis*) tea have an effect on conventional antimicrobial therapies?: equilibrium and extraction kinetics of aspalathin. *South African Journal of Botany* [online]. 2014, 93(1), 148-156 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1016/j.sajb.2014.04.004. ISSN 02546299. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254629914000726>
- [27] Fenikel obyčajný [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <http://www.herbar.org/liecive-rastliny/rastlina/fenikel-obycajny/>
- [28] FIALOVÁ, S.. Fytoterapia v období tehotenstva a pri dojčení [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <http://www.solen.sk/pdf/ece58c584cca5b8c59378e402486cd60.pdf>
- [29] Echinacea [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://encyklopedia.akv.sk/podpora-liecby/echinacea/>
- [30] The health benefits of strawberries [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://www.bbcgoodfood.com/howto/guide/ingredient-focus-strawberries>
- [31] Brusnica obyčajná [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://zdravoteka.webnoviny.sk/byliny/brusnica-obycajna/>
- [32] ISTEK, N., O. GURBUZ, X. LI, Qiu LU, J.H. WONG a H. GUO. Investigation of the impact of blueberries on metabolic factors influencing health: equilibrium and extraction kinetics of aspalathin. *Journal of Functional Foods* [online]. Elsevier, 2017, 2016, 38(11), 298-307 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1016/j.jff.2017.09.039. ISBN 9780124166417. ISSN 17564646. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464617305613>
- [33] KUBICOVÁ, D. a kol. 2004. *Náuka o požívatinách*. Martin: Vydavateľstvo Osveta, 2004. 159 s. ISBN 80 - 8063 - 165 - 4.
- [34] ZIA-UL-HAQ, M., M. RIAZ, V. de FEO, H. JAAFAR a M. MOGA. *Rubus Fruticosus L: Constituents, Biological Activities and Health Related Uses*. *Molecules* [online]. 2014, 19(12), 10998-11029 [cit. 2018-02-11]. DOI: 10.3390/molecules190810998. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/8/10998>

- [35] Mrkva obyčajná [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://www.ludovakultura.sk/polozka-encyklopedie/mrkva-obycajna/>
- [36] KOCA, N., F. KARADENIZ a R.L. VAN ZYL. Changes of bioactive compounds and anti-oxidant activity during cold storage of carrots: equilibrium and extraction kinetics of aspalathin. *South African Journal of Botany* [online]. 2008, 43(11), 2019-2025 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2008.01811.x. ISSN 09505423. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2008.01811.x>
- [37] NG, T.B., E. F. FANG, X. LI, Q. LU, J. H. WONG a H.GUO. Carrot (*Daucus carota*) Oils: equilibrium and extraction kinetics of aspalathin. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* [online]. Elsevier, 2016, 2016, 43(11), 303-308 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1016/B978-0-12-416641-7.00034-1. ISBN 9780124166417. ISSN 09505423. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124166417000341>
- [38] ŠAFARÍN, M.. Mrkva má silu [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://stromzdravia.sk/zdrave-potraviny/mrkva-ma-silu/>
- [39] LAOUINI, A., C. JAAFAR-MAALEJ, I. LIMAYEM-BLOUZA, S. SFAR, C. CHARCOSSET a H. FESSI. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology* [online]. Elsevier, 2016, 1(2), 147-168 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1166/jcsb.2012.1020. ISBN 9780124166417. ISSN 2164-9634. Dostupné z: <http://www.ingentaconnect.com/content/10.1166/jcsb.2012.1020>
- [40] KANÁSOVÁ, M., K. NESMĚŘÁK, I. LIMAYEM-BLOUZA, S. SFAR, C. CHARCOSSET a H. FESSI. Systematic review of liposomes' characterization methods: State of the Art. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* [online]. Elsevier, 2017, 2016, 148(9), 1581-1593 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1007/s00706-017-1994-9. ISBN 9780124166417. ISSN 0026-9247. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00706-017-1994-9>
- [41] POPOVSKA, O., J. SIMONOVSKA, R. BOSKOVIC, Z. KAVRAKOVSKI, V. RAFAJLOVSKA. An overview: methods for preparation and characterization of liposomes as drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*. 2013, [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/profile/Zoran\\_Kavrovski/publication/279195704\\_An\\_Overview\\_Methods\\_for\\_Preparation\\_and\\_Characterization\\_of\\_Liposomes\\_as\\_Drug\\_Delivery\\_Systems/links/558e579608ae1e1f9bab35ef/An-Overview-Methods-for-Preparation-and-Characterization-of-Liposomes-as-Drug-Delivery-Systems.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Zoran_Kavrovski/publication/279195704_An_Overview_Methods_for_Preparation_and_Characterization_of_Liposomes_as_Drug_Delivery_Systems/links/558e579608ae1e1f9bab35ef/An-Overview-Methods-for-Preparation-and-Characterization-of-Liposomes-as-Drug-Delivery-Systems.pdf)
- [42] Ultrasonic liposome preparation. *Heilscher – Ultrasound Technology* [online]. 2016 [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://www.hielscher.com/ultrasonic-liposome-preparation.htm>
- [43] LIERS, H. Benefits of liposomal nutrients (liposomes) [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <http://www.integratedhealthblog.com/benefits-of-liposomal-nutrients-liposomes-2/>
- [44] Dostupné z: <http://www.ijddr.in/drug-development/10-liposomes-preparations-and-applications.php?aid=5113>

- [45] ALBERTS, B.. Molecular biology of the cell. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. ISBN 08-153-4072-9.
- [46] Primary Cell Culture. *Sigma-Aldrich*. [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/primary-cell-culture.html>
- [47] Tkanivové kultúry používané pre výrobu súčasných vakcín [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://odbornost.avenier.cz/cz/tkanivove-kultury-pouzivane-pre-vyrobu-sucasnych-vakcin>
- [48] Epithelium [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/epithelium>
- [49] Epithelial cells [online]. 2016 [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells\\_and\\_Microorganisms/Human\\_Primary\\_Cells/Cell\\_Type/Epithelial\\_Cells.aspx?geo\\_country=cz](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Human_Primary_Cells/Cell_Type/Epithelial_Cells.aspx?geo_country=cz)
- [50] ECKERT, R. L., a E. A. RORKE. Molecular Biology of keratinocyte differentiation [online]. *Environmental Health Perspectives*. 1989, 80, 109-116 [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1567608/pdf/envhper00424-0110.pdf>
- [51] ORSÁG, M., J. KOLLER. Dočasné biologické náhrady kože [online]. *Miniinvazívna chirurgia a endoskopia*. 2011, [cit. 2018-02-04]. ISSN: 1336-6572. Dostupné z: <http://laparoskopia.info/pdf/CASO-2-2011.pdf#page=31>
- [52] SEO, M.D., T.J. KANG, C.H. LEE, A.Y. LEE, M.S. NOH a H. FESSI. HaCaT Keratinocytes and Primary Epidermal Keratinocytes Have Different Transcriptional Profiles of Cornified Envelope-Associated Genes to T Helper Cell Cytokines: State of the Art. *Biomolecules and Therapeutics* [online]. Elsevier, 2012, 20(2), 171-176 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.4062/biomolther.2012.20.2.171. ISBN 9780124166417. ISSN 1976-9148. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00706-017-1994-9>
- [53] BOUKAMP, P. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology* [online]. 1988, **106**(3), 761-771 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1083/jcb.106.3.761. ISSN 0021-9525. Dostupné z: <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.106.3.761>
- [54] Human Epidermal Keratinocytes-neonatal [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <http://www.sciencellonline.com/products-services/stem-cells/human-epidermal-keratinocytes-neonatal.html>
- [55] Cell culture basics. [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>
- [56] Cell culture basics. [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: [https://www.ptglab.com/media/1806/1503405\\_cell-culture-basics-slideshow\\_v2.pdf](https://www.ptglab.com/media/1806/1503405_cell-culture-basics-slideshow_v2.pdf)
- [57] MCGAW, L. J., E. E. ELGORASHI, J. N. ELOFF, A.Y. LEE, M.S. NOH a H. FESSI. Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal Animal and Human Cells: State of the Art. *Toxicological Survey of African Medicinal Plants* [online]. Elsevier, 2014, 20(2), 181-233 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1016/B978-0-12-800018-2.00008-X. ISBN 9780128000182. ISSN 1976-9148. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012800018200008X>

- [58] Measuring Cell Viability / Cytotoxicity [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: [https://www.dojindo.com/Protocol/Cell\\_Proliferation\\_Protocol\\_Colorimetric.pdf](https://www.dojindo.com/Protocol/Cell_Proliferation_Protocol_Colorimetric.pdf)
- [59] SPONCHIADO, G., M.L. ADAM, C.D. SILVA, B. SILVA SOLEY, C. de MELLO-SAMPAYO, D.A. CABRINI, C.J. CORRER a M.F. OTUKI. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. Elsevier, 2016, 2014, 178(2), 289-296 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1016/j.jep.2015.10.026. ISBN 9780128000182. ISSN 03788741. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874115301859>
- [60] Genotoxicity [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://eur-lexvam.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance/systemic-toxicity/genotoxicity>
- [61] CHAN, F. Ka-Ming, K. MORIWAKI, M.J. de ROSA, B.S. SOLEY, C. de MELLO-SAMPAYO, D.A. CABRINI, C.J. CORRER a M.F. OTUKI. Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase Activity: A systematic review. *Immune Homeostasis* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2013, 2013-1-4, 178(2), 65-70 [cit. 2018-02-04]. *Methods in Molecular Biology*. DOI: 10.1007/978-1-62703-290-2\_7. ISBN 978-1-62703-289-6. ISSN 03788741. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-290-2\\_7](http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-290-2_7)
- [62] Lactate Dehydrogenase (LDH) Assay Kit [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: [https://www.elabscience.com/Manual/biochemical\\_kits/E-BC-K046.pdf](https://www.elabscience.com/Manual/biochemical_kits/E-BC-K046.pdf)
- [63] MTT Cell Proliferation Assay [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://www.atcc.org/~media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx>
- [64] XTT Cell Proliferation Assay Kit [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: [http://www.abnova.com/products/products\\_detail.asp?catalog\\_id=KA1387&gclid=CjwK\\_CAIa8P\\_TBRA9EiwAJrpHM6652uU4WQZoZYkgcLI5F5oqn63Y3cezI-Ad\\_bJJIx9mKezz3D8nNhoC7\\_oQAvD\\_BwE](http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?catalog_id=KA1387&gclid=CjwK_CAIa8P_TBRA9EiwAJrpHM6652uU4WQZoZYkgcLI5F5oqn63Y3cezI-Ad_bJJIx9mKezz3D8nNhoC7_oQAvD_BwE)
- [65] LI, Y., D. H. CHEN, J. YAN, et al. Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* [online]. 2012, 745(1-2), 4-10 [cit. 2018-02-09]. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2011.11.010. ISSN 13835718. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383571811003469>
- [66] COLLINS, A. R., D. H. CHEN, J. YAN, et al. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology* [online]. 2004, 26(3), 249-261 [cit. 2018-02-09]. DOI: 10.1385/MB:26:3:249. ISSN 1073-6085. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1385/MB:26:3:249>
- [67] QUILLARDET, P., M. HOFNUNG a L. FERGUSON. The SOS chromotest: a review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* [online]. 1993, 297(3), 235-279 [cit. 2018-02-08]. DOI: 10.1016/0165-1110(93)90019-J. ISSN 01651110. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016511109390019J>
- [68] ODRÁŠKA, P., R. ZOUNKOVÁ, L. DOLEŽALOVÁ, K. HILSCHEROVÁ, L. BLÁHA. Ekotoxická a genotoxická vybraných protinádorových léčiv [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: [http://web.frov.jcu.cz/files/bulletin/2007/Bul3\\_2007.pdf#page=93](http://web.frov.jcu.cz/files/bulletin/2007/Bul3_2007.pdf#page=93)

- [69] SOS CHROMOTEST kit [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: [http://ebpi.ca/index.php?option=com\\_content&view=article&id=47&Itemid=37](http://ebpi.ca/index.php?option=com_content&view=article&id=47&Itemid=37)
- [70] Zetasizer Nano Series User Manual [online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: [http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer\\_Nano\\_user\\_manual\\_Man0317-1.1.pdf](http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf)
- [71] ZHOU, Wei, W. LIU, L. ZOU, W. LIU, Ch. LIU, R. LIANG a J. CHEN. Storage stability and skin permeation of vitamin C liposomes improved by pectin coating: A Novel Drug Delivery System. *SSRN Electronic Journal* [online]. 2009, **113**(4), - [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.02.036. ISBN 10.1016/j.colsurfb.2014.02.036. ISSN 1556-5068. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776514001039>

## 7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

PHB	polyhydroxybutyrát
PBS	fosfátový pufor (Phosphate Buffered Saline)
MTT	3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
SDS	dodecylsírán sodný
ABTS	2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonát
TEA	triethanolamín
PdI	polydisperzita
FBS	fetálne bovinne sérum
ATB	antibiotikum