

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2017

KATEŘINA VAŠÍČKOVÁ



**Využití nanomateriálů pro zvýšení biodostupnosti
doplňků stravy**
Bakalářská práce

Vedoucí práce:
prof. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.

Vypracovala:
Kateřina Vašíčková

Konzultant:
Ing. Simona Dostálová

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci Využití nanomateriálů pro zvýšení biodostupnosti doplňků stravy vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis



Tato práce vznikla v rámci projektu CEITEC - Středoevropského technologického institutu s pomocí výzkumné infrastruktury financované projektem CZ.1.05/1.1.00/02.0068 z Evropského fondu regionálního rozvoje.



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat prof. RNDr. Vojtěchu Adamovi, Ph.D., vedoucímu mé bakalářské práce. Dále bych chtěla velmi poděkovat mé školitelce Ing. Simoně Dostálové, za výborné vedení a veškerou pomoc při zpracování této práce, bez ní by těžko vznikla. Rovněž děkuji Mgr. Markétě Vaculovičové, Ph.D. za její ochotu a trpělivost při získávání výsledků měření. Další velké díky patří Mgr. Ing. Vladimíru Sýkorovi za jeho vstřícnost a pomoc, co se týče formální stránky práce, dále bych ráda poděkovala mému kamarádovi Bc. Michalu Kačírkovi za jeho odborné rady a Linditě Filipiové za pomoc při gramatické úpravě práce. Také děkuji mé rodině a kamarádům za veškerou podporu během celého studia.

ABSTRAKT

Bakalářská práce s názvem Využití nanomateriálů pro zvýšení biodostupnosti doplňků stravy se zabývá efektem vybraných doplňků stravy na lidský organismus a schopností zvýšení jejich biologické využitelnosti pro organismus pomocí nanotransportérů. Literární rešerše je zaměřena na zhodnocení problematiky biodostupnosti aktivních složek potravy. Dále jsou diskutovány přínosy i rizika užívání doplňků stravy, včetně konkrétních modelových doplňků, kterými byly kyseliny askorbová a listová. V praktické části byla dlouhodobě sledována stabilita komplexu bílkovinného nanotransportéru apoferritinu s přenášenou molekulou v různých světelných podmínkách (světlo, tma), teplotách (-20; 4; 20 a 37 °C) a rozpouštědlech (ACS voda, PBS). Míra stability komplexu a předčasného uvolnění molekul byla detekována měřením absorbance a fluorescence. Změny velikosti a tvaru nanotransportéru byly sledovány pomocí dynamického rozptylu světla a transmisní elektronové mikroskopie. Jako optimální bylo stanoveno skladování ve tmě, při 4 °C a v ACS vodě. Mimo to byla sledována schopnost vazby doplňku stravy na apoferritin. Kyselina askorbová o několika koncentracích (615; 308; 154; 77 a 38 µg/ml) byla úspěšně enkapsulována do apoferritinu, přičemž došlo k enkapsulaci až 39 % aplikovaných molekul. Kyselina listová byla navázána na povrch apoferritinu v pěti různých koncentracích (200; 100; 50; 25 a 13 µM) s vazebnou kapacitou až 61 %. Na závěr byl prokazatelně stabilní komplex apoferritinu s kyselinou listovou aplikován na buněčnou linii neuroblastomu UKF-NB4. Bylo zjištěno, že se vzrůstající koncentrací kyseliny listové na povrchu apoferritinu se zvyšovala internalizace tohoto komplexu do buněk. Bylo tak prokázáno zvýšení biologické využitelnosti navázané kyseliny listové a enkapsulovaných molekul buňkami prostřednictvím nanotransportéru. Výsledky této práce dokazují, že využití nanomateriálů je aplikovatelné na potravinářský sektor, přičemž lze dosáhnout zvýšení biodostupnosti aktivní látky při užívání doplňků stravy.

Klíčová slova

Apoferritin, biologická využitelnost, kyselina askorbová, kyselina listová, nanotechnologie

ABSTRACT

Bachelor thesis with the name “Application of nanomaterials for enhancement of food supplements bioavailability” deals with the effect of selected food supplements on human organism and the use of nanocarriers to improve their biological availability for organism. Literary part of this work is focused on the evaluation of problems of bioavailability of active food components. Then, the benefits and risks of taking food supplements are discussed, including model dietary supplements such as ascorbic and folic acids. The practical part of this work serves to evaluate the long-term stability of complex formed by protein nanocarrier (based on natural iron-storage protein apoferritin) with encapsulated molecules in various light conditions (ambient light, dark), temperatures (-20; 4; 20 and 37 °C) and solvents (ACS water, PBS). Stability of this complex, the amount of prematurely released molecules and the size and shape of the nanocarrier were detected using absorbance and fluorescence of the encapsulated fluorescent tag, dynamic light scattering and transmission electron microscopy. The optimal storage conditions were dark, temperature of 4 °C and ACS water as a solvent. Moreover, the capability of apoferritin to bind food supplements to apoferritin was researched. Different concentrations of ascorbic acid (615; 308; 154; 77 a 38 µg/ml) were successfully encapsulated to apoferritin when 39 % of all applied molecules were encapsulated. Folic acid was bonded on the surface of apoferritin in five different concentrations (200; 100; 50; 25 a 13 µM) using zero-length linker with 61 % efficiency. Finally, the stable complex of apoferritin with folic acid was applied to cellular line of neuroblastom UKF-NB4. It was discovered that higher concentration of encapsulated folic acid increased the amount of its internalization to cells. Therefore, the increase in bioavailability of folic acid and encapsulated molecules *via* nanocarriers was proved. The results of this work prove that the use of nanomaterials is applicable to food sector and at the same time can serve to improve the bioavailability of active substances during taking of dietary supplements.

Keywords

Apoferritin, bioavailability, ascorbic acid, folic acid, nanotechnology

OBSAH

1	ÚVOD	11
2	DOPLŇKY STRAVY	12
2.1	Obecně o doplňcích stravy	12
2.2	Doporučená denní dávka	13
2.3	Biologická využitelnost	14
2.4	Přínosy doplňků stravy	15
2.5	Rizika užívání doplňků stravy	15
2.6	Vitamín C	16
2.7	Vitamín B9	19
3	NANOTECHNOLOGIE	21
3.1	Nanočástice a nanomateriály	21
3.2	Využití v potravinářství	24
3.2.1	Aplikace do obalových materiálů	25
3.2.2	Enkapsulace biologicky aktivních molekul	26
3.3	Využití při čištění vody	27
3.4	Nanotransportéry	27
3.4.1	Anorganické nanotransportéry	28
3.4.2	Polymerní nanotransportéry	29
3.4.3	Lipidové nanotransportéry	29
3.4.4	Organické nanotransportéry	30
3.5	Způsoby konjugace s přenášenými molekulami	31
4	CÍLE PRÁCE	34
5	MATERIÁL A METODY	34
5.1	Chemikálie	34
5.2	Buněčné linie	35
5.3	Přístrojové vybavení	35
5.4	Metody	35
5.4.1	Schopnost enkapsulace kyseliny askorbové do apoferritinu	35
5.4.2	Určení stability komplexu	36
5.4.3	Konjugace povrchu apoferritinu s kyselinou listovou	37
5.4.4	Kultivace buněčných linií	37
5.4.5	Internalizace komplexu do živých buněk a zvýšení biodostupnosti	38

6	VÝSLEDKY A DISKUZE	39
6.1	Enkapsulace kyseliny askorbové do apoferritinu.....	39
6.2	Stanovení stability komplexu.....	41
6.3	Konjugace apoferritinu s kyselinou listovou.....	47
6.4	Vliv kyseliny listové na povrchu apoferritinu na změnu její biodostupnosti v eukaryotických buňkách.....	48
7	ZÁVĚR	51
8	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	52
9	SEZNAM TABULEK.....	57
10	SEZNAM OBRÁZKŮ	57
11	SEZNAM ZKRATEK.....	58

1 ÚVOD

Zdraví – jediné skutečné bohatství v našem životě a v dnešní době často diskutované téma. Může být ovlivněno několika faktory. Když pomineme různé genetické predispozice, tak tím nejpodstatnějším a zároveň nejvíce ovlivnitelným faktorem je zdravý životní styl. Ten je spjat nejen s optimální pohybovou aktivitou, ale v první řadě s příjmem vyvážené a plnohodnotné stravy, která vyživuje veškeré tělní buňky a zajišťuje tak jejich správnou funkci.

Problém nastává u některých složek potravin, jejichž doporučenou denní dávku nelze v běžném jídelníčku pokrýt, nebo jejichž aktivita se při průchodu trávicím traktem výrazně snižuje, a tím dochází k nedostatečné výživě buněk. Tento stav může působit jak drobné zdravotní problémy, tak i závažná onemocnění. Jako prevence je často doporučováno přijímat biologicky využitelné složky v koncentrované formě doplňků stravy, které jsou rychlým zdrojem požadovaných potravních složek. Velkou výhodou některých syntetických potravních doplňků je lepší vstřebatelnost pro tělo. Mezi takové patří například kyselina listová, známá jako vitamín B9.

Současné nanotechnologie mají široké uplatnění v potravinářství jako aditiva, modifikátory a rovněž umožňují zapouzdření aktivní látky do nanotransportérů, které zajišťují jejich ochranu před degradací okolním prostředím a zvyšují tak jejich biologickou dostupnost. Tento fakt by mohl být klíčový pro zefektivnění příjmu potravy a v konečné fázi i zlepšení lidského zdraví.

2 DOPLŇKY STRAVY

2.1 Obecně o doplňcích stravy

Podle zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, je „*doplňkem stravy potravina, jejímž účelem je doplňovat běžnou stravu a která je koncentrovaným zdrojem vitamínů a minerálních látek nebo dalších látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem, obsažených v potravine samostatně nebo v kombinaci, určená k přímé spotřebě v malých odměřených množstvích.*“

Cílem užívání doplňků stravy není léčit, ale pomáhat při prevenci, především u lidí s predispozicemi k určitému onemocnění. Často se využívají pro posílení efektu podávaných léčiv a jako ochrana před vedlejšími účinky. Dokážou dokonce podpořit rychlost rekonvalescence a zkrátit dobu potřebnou k léčbě (Fořt, 2005b).

Doplňky stravy jsou produkty, které obsahují různé potravní doplňky (Fořt, 2005a), jako jsou vitamíny, minerály, aminokyseliny a ochranné látky (Fořt, 2005b). Často jsou užívány pro zajištění doporučeného příjmu dané biologicky aktivní látky (Fořt, 2005a) či jako součást samoléčby (Slíva, 2009). Příjmem doplňků s přírodními extrakty léčivých nebo stimulujících bylin je možné významně posílit přirozenou imunitu (Fořt, 2005b).

Podle vyhlášky č. 225/2008 Sb., musí být na obale potravinových doplňků, včetně běžných požadavků na označování obalu potravin, uvedeno:

„a) v názvu potraviny slovo „doplňek stravy“

b) název vitamínů, minerálních látek nebo dalších látek charakterizujících výrobek

c) číselný údaj o množství vitamínů, minerálních látek nebo dalších látek vztažený na doporučenou denní dávku

d) údaje o obsahu vitamínů a minerálních látek i v procentech doporučené denní dávky

e) doporučené denní dávkování a popřípadě další podmínky použití

f) varování před překročením doporučeného denního dávkování

g) upozornění, aby byly výrobky uloženy mimo dosah dětí

h) upozornění, že doplňky stravy nejsou náhradou pestré stravy

i) upozornění „Nevhodné pro těhotné ženy“ u doplňků stravy obsahujících více než 800 µg (RE) vitamínu A v denní dávce“

Podle vyhlášky č. 225/2008 Sb., dále nesmí být při označování doplňků stravy na obalu uvedena informace o jejich preventivních či léčebných účincích. Rovněž nesmí obsahovat tvrzení, že z vyvážené a pestré stravy nelze získat dostatečné množství vitamínů a minerálů.

2.2 Doporučená denní dávka

Vyhláška č. 225/2008 Sb., pro doplňky stravy, ve své příloze uvádí seznam vitamínů a minerálních látek, které lze použít pro výrobu doplňků stravy, včetně jejich doporučených denních dávek (DDD) (viz Tabulka 1).

„Doporučené denní dávky vitamínů a minerálních látek se vztahují na celkový denní příjem vitamínů a minerálních látek. Za zdroj vitamínů a minerálních látek lze považovat doplňky stravy s obsahem alespoň významného množství vitamínů a minerálních látek, za které se považuje nejméně 15 % z hodnot doporučených denních dávek uvedených v tabulce, které je obsaženo ve 100 g nebo ve 100 ml nebo v jednom balení, pokud toto balení obsahuje jednu porci.“

Tabulka 1- Doporučené denní dávky vitamínů a minerálních látek podle vyhlášky č. 225/2008 Sb.

Vitamín	DDD	Minerální látka	DDD
Vitamín A	800 µg	Draslík	2000 mg
Vitamín B1	1,1 mg	Fosfor	700 mg
Vitamín B2	1,4 mg	Fluoridy	3,5 mg
Vitamín B6	1,4 mg	Hořčík	375 mg
Vitamín B12	2,5 µg	Chloridy	800 mg
Vitamín B5	6 mg	Chrom	40 µg
Vitamín C	800 mg	Jód	150 µg
Vitamín D	5 µg	Mangan	2 mg
Vitamín E	12 mg	Měď	1 mg
Vitamín K	75 µg	Selen	55 µg
Vitamín B7	50 µg	Vápník	800 mg
Vitamín B9	200 µg	Zinek	10 mg
Vitamín B3	16 mg	Železo	14 mg

2.3 Biologická využitelnost

Biologická využitelnost, nebo také biologická dostupnost, je vyjádřením podílu aktivní složky, která přestoupila do tělního oběhu. Ideální biologická dostupnost je 1, což by znamenalo, že do systémové cirkulace přestoupilo 100 % účinné látky, tudíž se žádná nevyloučila (Mach, 2012).

Okolo 40–90 % vitamínů je absorbováno v tenkém střevě. Na biologickou využitelnost vitamínů má vliv jejich rozpustnost. Vitamíny rozpustné v tucích se při nízkém obsahu tuku ve stravě hůře vstřebávají do těla. Pro správný transport ze střeva do krve dochází k začlenění vitamínů do lipoproteinů nebo k vazbě na transportní proteiny (chylomikrony). Takto upravené vitamíny nejprve přechází do lymfy a až poté do krve. Samotná absorpce do krve probíhá prostou difúzí. Vitamín A, skladovaný v játrech, musí být navázaný na specifický transportní protein, aby došlo k jeho transportu k dalším tkáním. Míra biologické využitelnosti pak závisí na dostupnosti transportního proteinu. Na druhou stranu vitamíny rozpustné ve vodě potřebují k absorpci specifickou molekulu v gastrointestinálním traktu, na kterou se mohou navázat, či potřebnou energii k uskutečnění transportu. Například thiamin a vitamín C jsou absorbovány energetickým transportním systémem, kdežto riboflavin a niacin vyžadují transportní proteiny. Vitamín B12 musí být nejprve navázan na protein produkovaný v žaludku, a až poté může být absorbován ve střevě. Tyto vitamíny pak přechází ze střeva přímo do krve. Většina vitamínů rozpustných ve vodě využívá pro svůj transport krevní proteiny. K uvolnění vitamínů z potravy napomáhá celý trávicí trakt, včetně dutiny ústní a žaludku. Ke zvýšení absorpce vitamínů rozpustných v tucích napomáhá žluč díky svým emulgačním schopnostem (Smolin, Grosvenor, 2010).

Při vysoké koncentraci účinné látky v doplňku většinou není tělo schopno absorbovat veškerý obsah najednou, a tak je přebytek odváděn močí. Příkladem mohou být doplňky stravy s vitamínem C. Vitamín C je rozváděn krví po těle do jednotlivých orgánů a tkání. Transport této účinné látky je limitován, na 1 ml krevní plazmy je absorbováno do krve maximálně 14 mg vitamínu C a nadbytek je vyloučen z těla močí. Řešením jsou tablety s postupným uvolňováním, z nichž se obsah účinné látky vyplavuje do těla pozvolna a ve velmi dobře vstřebatelné formě. Tím lze docílit příjmu menších dávek vitamínu C během celého dne, kdy se optimálně využívá resorpční kapacita tenkého střeva (Mach, 2012).

2.4 Přínosy doplňků stravy

Doplňky stravy jsou užívány pro tlumení vedlejších účinků podávaných léčiv. Významnou roli hrají při prevenci, ve stavech podvýživy a při vysoké fyzické a psychické námaze. Doplnky často vyhledávají sportovci, kteří se věnují kondičnímu, výkonnostnímu i vrcholovému sportu (Mach, 2012). Pro podporu tvorby svalové hmoty a dosažení maximálního výkonu se často užívá látka zvaná kreatin. Klinické studie dokonce potvrdily, že příjem kreatinu v malých dávkách je účinným léčivem u celé řady onemocnění, jako je například Huntingtonova choroba, Parkinsonova choroba či amyotrofická laterální skleróza. Vhodný je rovněž k posílení funkce srdečního svalu a činnosti mozku (Fořt, 2005b). Doplnky stravy obsahující vitamíny skupiny B jsou doporučovány sportovcům pro podporu zvýšení produkce ATP, který je důležitý v energetickém metabolismu svalů (Smolin, Grosvenor, 2010). Užívání doplňků stravy je vhodné zejména při redukční dietě, kdy je tělo díky nízkokalorickým potravinám ochuzeno o vitamíny rozpustné v tucích (McGuire, Beerman, 2013a). Vegané by měli přijímat více železa a vitamínu B12, který je přítomný především v živočišných produktech (Percival, 2013; Smolin, Grosvenor, 2010) Pro lidi, kteří nekonzumují mléčné produkty, je doporučeno doplňovat příjem vápníku. Kyselina listová je vhodná pro těhotné ženy jako ochrana plodu před tělesnými deformitami (Percival, 2013). Niacin, ve formě kyseliny nikotinové, přispívá ke snížení krevního cholesterolu, bohužel ale mívá často i toxické účinky na organismus, jako je například brnění, nevolnost či vyrážka (Smolin, Grosvenor, 2010).

2.5 Rizika užívání doplňků stravy

Užívání doplňků stravy nemusí mít na organismus pouze pozitivní účinky. Existuje i řada rizik, která je nutno zvážit před začátkem jejich užívání. Doplnky stravy mohou nepříznivě reagovat se současně užívanými léky (Fořt, 2005b), například extrakt z třezalky snižuje účinnost některých léků (Mach, 2012), při příjmu vitamínu C vyšším než 3 g denně může dojít k interferenci s léky, určenými ke snížení srážlivosti krve, či testy moči, používané k monitorování množství glukózy (Smolin, Grosvenor, 2010). Může také dojít k nesnášenlivosti organismu vůči přírodní surovině nebo inertnímu aditivu, či k akutnímu předávkování (Fořt, 2005b). Zřídka dochází k vedlejším účinkům jako je zvýšená krvácivost při poranění nebo operaci (Mach, 2012). Vysoký příjem

vitamínu B6 ve formě doplňku stravy může vést k vážným toxickým příznakům, jako jsou nervové poruchy (zejména senzoričtých orgánů). Vitamíny skupiny B, působící jako koenzymy, mohou při zvýšeném příjmu způsobit zvýšenou syntézu příslušných apoenzymů, což vede k nefyziologickému zvýšení intenzity některých metabolických pochodů (Golian, 2011).

Vysokému příjmu vitamínu C by se měli vyhnout jedinci, kteří jsou náchylní k tvorbě ledvinových kamenů, to platí i pro osoby neschopné regulace absorpce železa, protože vitamín C zvyšuje jeho absorpci. U osob trpících sideropenickou anémií může dojít ke zhoršení příznaků. Vysoké dávky kyseliny askorbové mohou také ničit zubní sklovinu. Nadměrný příjem vitamínu E inhibuje aktivitu vitamínu K (Smolin, Grosvenor). U kojenců je rizikový vysoký příjem vitamínu K, který může způsobit anémii, poškození mozku a hyperkoagulaci. Vysoké dávky vitamínu A mají za následek bolesti hlavy, zvracení, poškození jater a mohou zapříčinit i teratogenní účinky. Vysoký příjem vitamínu D způsobuje ukládání vápníku do měkkých tkání, zpomalení růstu či poškození ledvin. Podle studií může dokonce zvyšovat riziko vzniku diabetu typu I., roztroušené sklerózy a vysokého krevního tlaku u osob žijících ve vyšších zeměpisných šířkách (Smolin, Grosvenor, 2010; Golian, 2011). Klinické studie ukazují, že karotenoidové doplňky stravy mohou být škodlivé zvláště pro kuřáky, jelikož u nich podle průzkumu, zvyšují pravděpodobnost výskytu rakoviny plic. Pro tyto jedince je doporučováno přijímání β -karotenu pouze z přírodních zdrojů (Smolin, Grosvenor, 2010).

2.6 Vitamín C

Vitamín C, rovněž známý jako kyselina askorbová, patří do skupiny vitamínů rozpustných ve vodě (Mindell, Mundis, 2006). Jeho název, kyselina askorbová, původně vznikl ze slov *a*, které vyjadřuje zápor a slova *scorbuticus*, což je překládáno jako kurděje (tedy „bez kurdějí“) (Slíva, 2009). Aktivitu tohoto vitamínu vykazují pouze jeden ze čtyř stereoisomerů, a tím je L-askorbová kyselina (Velíšek, 2009). Kyselina askorbová je v přírodě syntetizována všemi fotoautotrofními rostlinami. V živočišném organismu je syntetizována ledvinami či játry s pomocí enzymu L-gulonolaktonoxidázy (Slíva, 2009). Většina živočichů je schopna syntetizovat si svoji vlastní kyselinu askorbovou, pouze u lidí, lidoopů a morčat tato funkce chybí. Proto jsou nuceni ji přijímat v potravě (Mindell, Mundis, 2006). Kyselina askorbová má široké spektrum využití. Často se používá v potravinářství jako potravinářské aditivum E 300 a je součástí prevence nežádoucích změn aroma, způsobeného oxidací při skladování a zpracování surovin. Přída-

vek askorbové kyseliny také slouží jako prostředek zlepšující pekařské vlastnosti mouky (Velíšek, 2009).

Kyselina askorbová rovněž příznivě působí na lidský organismus schopností snižovat LDL (nízkodenzitní lipoprotein) cholesterol a blokovat tvorbu nitrosaminů, které jsou považovány za karcinogenní (Fořt, 2005a) a působí i jako antioxidant (Smolin, Grosvenor, 2010). To znamená, že chrání buňky před působením volných radikálů neutralizací. Tím chrání ostatní molekuly (McGuire, Beerman, 2013a), jako jsou bílkoviny, DNA či membránové lipidy (Wiseman, 2007), před poškozováním oxidací. To by mohlo vést ke vzniku řady různých nemocí (McGuire, Beerman, 2013a). Kyselina askorbová je ze zdravotního hlediska prospěšná pro naše tělo zejména při léčbě nachlazení a stimulaci imunity. Snižuje riziko vzniku krevních sraženin a alergických reakcí (Mindell, Mundis, 2006). Mimo jiné je důležitá při tvorbě kolagenu a dalších pojivových tkání, což je prospěšné při parodontitidě či hojení ran (Fořt, 2005a). Také zvyšuje absorpci anorganického železa z potravin (Mascitelli et al., 2015). Bylo dokonce prokázáno snížené riziko vzniku rakoviny žaludku při pravidelné konzumaci kyseliny askorbové při denním příjmu 1–10 g až o 75 % (Fořt, 2005a; Golian, 2011).

Za významné přírodní zdroje se považují citrusové plody, jahody (Mindell & Mundis, 2006), brambory, zelí, rajčata nebo paprika (Mach, 2012).

Tabulka 2 - Průměrný obsah kyseliny askorbové ve vybraných potravinách (Velíšek, 1999)

Potravina	Obsah (mg/kg)	Potravina	Obsah (mg/kg)
Citrony	300–640	Maso	20
Šípky	2500–10000	Šunka	300–500
Paprika	620–3000	Zelí	170–700
Brokolice	1100–1130	Petržel kadeřavá	1500–2700
Kapusta růžičková	1000–1030	Fazolové lusky	90–300
Rybíz černý	1100–3000	Hroznové víno	20–50
Kiwi	700–1270	Grapefruit	240–700
Jahody	400–700	Květák	47–1610
Špenát	350–840	Česnek	150–160
Brambory	80–400	Křen	450–1200
Kedluben	280–700	Papája	2500–10000

Doporučená denní dávka kyseliny askorbové se podle vyhlášky pohybuje okolo 80 mg. Příliš vysoké dávky tohoto vitamínu mohou vést až k podráždění sliznice některých orgánů (žaludek, jícn), zvracení, průjmu či nespavosti. Naopak mohou zlepšit vstřebávání některých látek, jako je vitamín B12 nebo železo (Slíva, 2009). Při nadměrném příjmu kyseliny askorbové (více než 1 g denně) se mohou utvářet ledvinové kameny, dále může interferovat s některými léky či snižovat odolnost proti infekcím. Bylo dokázáno i zvýšené riziko potratů (Maček et al., 2011).

Za příznak deficiencie tohoto vitamínu se považuje nechutenství, špatné hojení ran, hematomy, krvácení dásní, opakované infekce či snížení svalového výkonu (Fořt, 2005a). Tento stav je znám jako tzv. jarní únava (Velíšek, 2009), který získal svůj název po relativně sníženém příjmu ovoce a zeleniny v jarních měsících (Maček et al., 2011). Akutní avitaminóza se projevuje nemocí kurděje neboli skorbut (odvozeno od kyseliny askorbové), která je způsobena dlouhodobým nedostatkem ve stravě (Velíšek, 2009). Za prvotní příznaky tohoto onemocnění se považuje slabost, únava a apatie, které předchází perifolikulární hyperkeratóze, krvácení do podkožní tkáně, kůže, svalů nebo kloubů, horečky, oteklým dásním, vypadávání zubů a anémii. Toto onemocnění může končit až smrtí jedince (Padayatty, 2002; Maček et al., 2011).

Kyselina askorbová je ničena vysokou teplotou nebo vystavením vzdušnému kyslíku (McGuire, Beerman, 2013a). Její znehodnocení podporuje rovněž zásadité prostředí či přítomnost některých minerálních látek (zinek, železo, částečně měď). Oxidaci podporuje enzym askorbát oxidasa, který se aktivuje po narušení buněk při zmrazení nebo mechanickou úpravou suroviny. Lze ho inaktivovat při teplotách nad 60 °C, přičemž se výrazně zpomalí oxidace kyseliny askorbové (Maček et al., 2011). Z těchto důvodů jí čerstvé ovoce a zelenina obsahuje mnohem více, než vařené, zpracované či skladované (McGuire, Beerman, 2013b). Její vstřebávání je obdobné jako u jednoduchých cukrů. Při vyšší dávce (okolo 10 g) je tělo schopno vstřebat pouze 15 %, a proto jsou v současné době velmi oblíbené postupně vstřebatelné doplňky stravy (Fořt, 2005a). Na druhou stranu syntetická kyselina askorbová je v těle hůře využitelná, jelikož na rozdíl od rostlinných zdrojů neobsahuje bioflavonoidy (vitamín P), které zvyšují její účinnost a mají protektivní účinky na samotný vitamín. Vhodnou alternativou je kyselina askorbová ve formě rostlinných výtažků, jež bioflavonoidy obsahují (Maček et al., 2011).

2.7 Vitamín B9

Vitamín B9, označovaný též jako vitamín M nebo kyselina listová, je rozpustný ve vodě a je jedním z vitamínů tzv. B-komplexu (Mindell, Mundis, 2006). Biologicky aktivním derivátem kyseliny listové (folové či pteroylglutamové) je folacin (Velíšek, 2009). Běžně používané termíny folacin, folát či foláty jsou zaměnitelné za výraz kyselina listová (Deshpande, 2002). Její název je odvozen od latinského slova *folia*, což v překladu znamená list. To je spjato s jejím vysokým obsahem v listové zelenině, především v listovém špenátu (Truswell, 2007). Kyselina je syntetizována mikroorganismy a vyššími rostlinami. Pro savce je esenciálním vitamínem, který musí přijímat v potravě (Miller, 2013).

Kyselina listová se uplatňuje jako kofaktor enzymů (Velíšek, 2009), které zajišťují především metabolismus bílkovin (Mindell, Mundis, 2006). Je důležitá rovněž při tvorbě červených krvinek, dělení buněk a pro tvorbu protilátek při nemoci (Mindell, Mundis, 2006; Kalač, 2003). Jde o velmi významnou složku potravy těhotných žen a žen před početím. Zajišťuje správný průběh zárodečného dělení a vývoje plodu (Mach, 2012), čímž chrání plod před deformitami nervového systému (Mindell, Mundis, 2006). Dokáže snížit riziko vrozených vad, které jsou příčinou částečného či úplného ochrnutí novorozenců, až o 70 %. Užíváním kyseliny listové lze také předejít i jiným defektům jako jsou například vrozené srdeční vady, rozštěp parta či rtu. Přijímáním kyseliny listové v kombinaci se železem je možné snížit riziko akutní lymfoblastické leukémie u novorozenců, která ve většině případů končí smrtí, až o 60 % (Mach, 2012).

Existuje rovněž spojení mezi vysokou hladinou homocysteinu a sníženou hladinou kyseliny listové v krvi. Úkolem kyseliny listové v organismu je převést škodlivý homocystein na neškodný methionin. Při jejím nedostatečném množství dochází k hromadění homocysteinu v krvi a jeho zvýšený obsah je spojen se vznikem kardiovaskulárních chorob, jako jsou ateroskleróza, infarkt či zvýšená krevní srážlivost. Kyselina listová podávaná se zinkem dokáže dokonce zvýšit počet aktivních spermií u mužů s poruchou plodnosti až o 74 % (Mach, 2012). Mimo jiné bylo také prokázáno, že nízká hladina kyseliny listové zvyšuje riziko vzniku rakoviny vaječnicků, prsu, slinivky břišní a tlustého střeva (Smolin, Grosvenor, 2010; Kalač, 2003). Zvýšený příjem se doporučuje při vyšší spotřebě alkoholu, ženám užívajícím hormonální antikoncepci nebo při poruše vstřebávání potravy ze střev (Kalač, 2003).

Jako významné přírodní zdroje tohoto vitamínu se konzumují především pomeranče, čerstvé maso, obiloviny, luštěniny, vnitřnosti, droždí (Velíšek, 2009), zelená listová zelenina či semena (Mach, 2012).

Tabulka 3 - Průměrný obsah kyseliny listové ve vybraných potravinách (Kalač, 2003)

Potravina	Obsah (µg/kg)	Potravina	Obsah (µg/kg)
Maso vepřové	10–40	Zelí	160–450
Maso hovězí	20–180	Špenát	500–1920
Maso kuřecí	100–120	Rajčata	60–300
Játra vepřová	1360–2210	Mrkev	400
Ryby	120	Brambory	80–200
Mléko	30–280	Jablka	60
Sýry	80–820	Citrusové plody	50–400
Vejece	50–800	Banány	280–360
Mouka pšeničná	600–1460	Droždí	15000
Chléb	260–540	Luštěniny	550–1590

Příjem kyseliny listové v běžném jídelníčku je ve většině případů nedostatečný (Fořt, 2005a). Za doporučenou denní dávku se dle vyhlášky považuje příjem 200 µg. DDD pro těhotné se pohybuje v rozmezí 400–600 µg (Mach, 2012). Přijímáním vysokého množství výjimečně dochází až k předávkování, což může způsobit alergii či anafylaktický šok. Nejčastějšími projevy nedostatku kyseliny listové jsou záněty v dutině ústní, slabost, únava, anémie a bledost kůže či sliznic (Fořt, 2005a).

Kyselina listová je ničena vysokou teplotou, tudíž vařené potraviny jí obsahují méně než syrové (McGuire, Beerman, 2013b). K vysokým ztrátám dochází výluhem, přítomností vzdušného kyslíku či při vystavení světelnému záření. Při nešetrném způsobu skladování potravin mohou být ztráty kyseliny listové dokonce 90 %. Naproti tomu například v některých kysaných mléčných výrobcích (jogurty) může její obsah vzrůst, a to díky přítomnosti mléčných bakterií, které ji syntetizují (Kalač, 2003).

V běžných potravinách se s ní setkáme velmi zřídka, proto je často využívána k jejich fortifikaci či k výrobě vitamínových doplňků. Schopnost jejího vstřebávání v organismu je vyšší při užívání již zmíněných doplňků stravy (McGuire, Beerman, 2013a) či při konzumaci fortifikovaných potravin (Truswell, 2007), na rozdíl od příjmu v její přírodní formě, přičemž se biodostupnost podstatně snižuje (McGuire, Beerman, 2013a). Ve formě doplňku se v těle vstřebá zcela úplně (do množství 5 mg),

kdežto vstřebatelnost z potravin se pohybuje pouze mezi 30–50 % (Fořt, 2005a). Nedo- statečná vstřebatelnost se může vyskytovat například u osob závislých na alkoholu či při hemolytické anémii (Golian, 2011).

3 NANOTECHNOLOGIE

3.1 Nanočástice a nanomateriály

Nanočástice jsou částice, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí 1–100 nm (Barabaszová et al., 2010). Předpona nano- má původ v řeckém slově *νανο*, což znamená trpaslík (Kolářová, 2014). Pojem nanočástice je definován jako samostatná trojrozměrná jednotka v nano velikosti (Kvasničková, 2011). Nanočástice mají značně větší plochu povrchu než tytéž částice v makro měřítku, čímž často dochází ke změnám jejich fyzikálních a chemických vlastností, jako je reaktivita, povrchový náboj (FSAI, 2010), barva či pevnost (Kolářová, 2014). Zlato v makro měřítku vede elektřinu, chemicky je neaktivní a má žlutou barvu. Oproti tomu zlato ve velikosti nanometrů je velmi reaktivní polovodič a jeho barva se pohybuje mezi růžovou, červenou a oranžovou v závislosti na velikosti částic (FSAI, 2010). Stříbro je obecně netoxické, ale jeho nanočástice jsou při kontaktu s viry schopny je usmrtit (Kolářová, 2014). Přímým důkazem zvýšení reaktivity nanomateriálů je využití zeolitů jako katalyzátorů (Hájková, 2011).

Nanomateriály jsou jakoukoliv formou materiálu o jednom nebo více rozměrech ve velikosti nano (Kvasničková, 2011). Mají inovativní vlastnosti a charakteristické struktury, jako jsou jednoduché nanočástice, klastry (shluky) či dutiny. Tyto struktury jsou definovány několika vlastnostmi – rozměr, tvar, atomová struktura, krystalinita, mezifázové rozhraní a chemické složení. Podle dimenzionality lze nanomateriály dělit na 1D – jednorozměrné (nanovrstvy, povlaky, tenké filmy), 2D – dvojrozměrné (nanodrátky, nanotrubičky, nanovlákná) a 3D – trojrozměrné (nanočástice, nanoprášky, kvantové tečky) (Barabaszová et al., 2010). Obecně nanočástice jsou tedy trojdimenzionální nanoobjekty, které ve všech třech souřadných osách dosahují nanorozměrů. Existuje několik typů nanočástic lišících se strukturou, chemickými vlastnostmi a jejich využitím (Vysloužil, 2011). Lze je také různě kombinovat, a tak vytvářet větší struktury, použitelné v makro měřítku (Hošek, 2010). Jejich chování, které je ovlivněno atomovými silami, vlastnostmi chemických vazeb a kvantovými jevy, se projevuje neobvyklými fyzikálními, biologickými a chemickými vlastnostmi využitelnými v praxi. Například dochází

ke změnám pevnosti u uhlíkových nanotrubic, které jsou stokrát pevnější než ocel, ale šestkrát lehčí. Může dojít i ke změně tvrdosti. Toho se využívá v metalurgii, přičemž používané nanočástice jsou odpovědné za zvýšení životnosti a tvrdosti kovů. Dále může být ovlivněna tažnost, plasticita a magnetické, elektrické či optické vlastnosti (Hájková, 2011).

Nanočástice mohou vznikat buďto přírodními procesy nebo lidskou činností řízenou či neřízenou (Smolkova et al., 2015). Nanotechnologie se primárně zaměřují na uměle vytvořené nanočástice, ale přirozeně se vyskytující částice jsou zde přítomny miliony let. Přírodně vyskytující se nanočástice jsou většinou seskupením molekul či atomů, syntetizovaných biologickým systémem. S těmito částicemi se lze setkat v intracelulárních strukturách (například magnetosomy). Nanočástice vyskytující se extracelulárně jsou například lipoproteiny nebo viry. Mají rozmanité funkce, mezi nejvýznamnější patří skladování minerálních látek či mezibuněčná komunikace (Stanley, 2014). Dokonce i DNA nebo proteiny mohou vytvářet organizované nanočástice. Přírodní nanočástice mohou být také anorganického původu. Ty nejčastěji vznikají sopečnou činností, ale mohou být přítomny i v prachu, jemném mořském aerosolu, písku či půdních koloidech. Jsou velmi rozmanité. Nanočástice vznikající řízenou lidskou činností jsou snadno definovatelné a uniformní. Pokud však nanočástice vznikají náhodným procesem při lidské činnosti, jsou velmi variabilní ve svojí struktuře i velikosti. Jejich nejvýznamnějším zdrojem je automobilová doprava. Nejčastěji vznikají spalováním v dieselových motorech či svařováním. Za vznik nanočástic jsou odpovědné nejen nukleační, koagulační či kondenzační procesy, ale často vznikají i mechanickou destrukcí větších částic (Dohnalová, Dohnal, 2015). Proces homogenizace, který je používán v potravinářství pro zlepšení chuti, vůně a textury mléka, lze rovněž považovat za nanotechnologickou úpravu, přičemž dochází k destrukci tukových globulí za účelem zmenšení jejich velikosti (Kvasničková, 2011).

V dnešní době rapidně vzrostla produkce a využití nanočástic. Jejich aplikace zasahuje téměř do všech odvětví (Dohnalová, Dohnal, 2015). Mezi ně patří například potravinářství (obaly), zdravotnictví (umělé klouby, cílená doprava léčiv), textilní průmysl (nemačkávé, hydrofobní a nešpinící se materiály), chemický průmysl (nanokompozity, aerogely) a v neposlední řadě i dekontaminace životního prostředí (biodegradace) (Kvasničková, 2011). Chemické látky v jejich nano formě mívají často odlišné toxikologické účinky než makro forma. Proto jsou s nimi spjata i rozdílná zdravot-

ní rizika. Účinek nanočástic je různý v závislosti na místě vstupu do organismu, velikosti částic, druhu materiálu, kontaminaci povrchu či pH jednotlivých tkání a orgánů v těle. Působení nanočástic na organismus může dokonce postihnout funkci centrálního nervového systému nebo kardiovaskulárního systému (Dohnalová, Dohnal, 2015).

V současnosti se s aplikací nanomateriálů lze setkat i ve formě nanoprášků jako je například TiO_2 . Tento prášek se využívá v kosmetice, konkrétně při výrobě krémů na obličej, opalovacích krémů a pleťových vod či krémů. Mimo to se TiO_2 přidává do laků s reflexními vlastnostmi (Prnka, Šperlink, 2004) či při výrobě tmavých skel (Barabaszová et al., 2010). Dalším příkladem jsou nanoprášky Fe_2O_3 , které jsou základním materiálem při výrobě rtěnek a líčidel (Prnka, Šperlink, 2004), ale mohou se také použít pro detoxikaci kontaminovaného prostředí (Barabaszová et al., 2010). Nanomateriály se také již několik let využívají jako nanostrukturní otěruvzdorné povlaky rezných nástrojů a komponent. Povrchový film tvořený z nanočástic lze použít na ochranu obkladů před vodou a špínou. Rozsáhlé využití nanočástic se objevuje také v oblasti biomedicíny, kde slouží jako transportéry terapeutických látek (Prnka, Šperlink, 2004), které vyhledávají cílové cizorodé buňky (většinou rakovinné) či viry a ničí je uvolněním léčiva uzavřeného v jejich struktuře. Tento způsob léčby se jeví jako velmi šetrný, jelikož zajišťuje snížení dávky podávaného léčiva, a tím výrazně mírní vedlejší škodlivé účinky na organismus (Adam, 2013b). Rovněž mohou sloužit k diagnóze rakoviny a infekčních onemocnění, což může přispět k včasnému zjištění onemocnění (Šánek et al., 2013). Díky svým malým rozměrům mohou nanočástice prostoupit k místům v lidském těle, která obvykle nejsou přístupná větším částicím (FSAI, 2010).

Nanočástice v podobě uhlíkových nanotrubic mají strukturu válcovitého tvaru a používají se jako pevné a pružné kompozitní materiály (Šánek et al., 2013), nejčastěji však jako biosenzory (Fojtík et al., 2014). Samotné nanotrubice jsou pro transport léčiv nevhodné, ale v kombinaci s jinými látkami (například lipozomy) se dají použít. Dalším příkladem jsou fullereny, což jsou molekuly, které se skládají z uhlíku či uhlíkových sloučenin ve tvaru koule, elipsoidu nebo trubičky. Tyto struktury se často využívají pro transport léčiv (Šánek et al., 2013). Nanočástice stříbra se rozšířily zejména díky jejich antibakteriální aktivitě, čehož se využívá ve výrobě obalových materiálů, lednic, náterů či v medicíně jako léčivo, přičemž napomáhá dozrávání T lymfocytů a tím posiluje imunitní systém organismu (Hošek, 2010). Oxid titaničitý ve formě nanočástic je v dnešní době, díky jeho vysoké stabilitě a odrazivě, nejpoužívanější anorganický na-

nomateriál. Používá se zejména jako plnivo barev či krémů nebo jako barvivo papíru, plastů, léků a potravin. V potravinách je znám jako E 171, což je bílé potravinářské barvivo (Hošek, 2010; Vysloužil, 2011). Historicky nejznámější jsou nanočástice zlata, které se používají jako vodiče, nanosenzory, katalyzátory, cílový absorpční materiál při odstraňování nádorů laserovými metodami či pro vizualizační metody nebo dopravu léčiv. Využívát se může i přímo jako léčivo podávané při revmatické artritidě nebo Alzheimerově chorobě (Hošek, 2010). Populární jsou také kvantové tečky, což jsou polovodičové nanočástice s využitím v elektronice a optice (Vysloužil, 2011; Šánek et al., 2013) či v lékařské diagnostice, pro zviditelnění specifických oblastí v organismu (Chomoucká, 2013).

3.2 Využití v potravinářství

Využití nanomateriálů v potravinářství v posledních letech rapidně vzrostlo. Aplikace nanomateriálů v tomto odvětví může výrazně zlepšit chuť, barvu, texturu a konzistenci potravin. Zvyšuje dokonce absorpci a biologickou využitelnost živin (Marvin et al., 2011; Priestly, 2014). Současné nanotechnologie se používají také pro zvýšení bezpečnosti a nutriční hodnoty potravin (Smolkova et al., 2015) nebo jako senzory pro detekci patogenů, alergenů či kontaminantů (Moraru et al., 2009). Mezi organické nanočástice se řadí vitamíny, antioxidanty, barviva, chuťové přísady a konzervanty. Mohou být zapouzdřeny do nanotransportéru a rozváděny do místa určení. Mezi největší výhody používání nanoorganických aditiv patří lepší disperze nerozpustných látek v potravinách bez potřeby dodání tuku, zvýšení absorpce a zvýšení biologické dostupnosti v těle (Chaudhry et al., 2011). V současnosti se na trhu nejčastěji vyskytuje hned několik organických enkapsulovaných nanomateriálů. Používají se jako přídatné látky (kyselina citronová, askorbová, benzoová) či potravinové doplňky (vitamíny A a E, isoflavony, lutein, β -karoten). Anorganické nanomateriály se používají především jako aditiva a potravinové doplňky. Patří sem například stříbro (E 174), oxid křemičitý (E 551), oxid titaničitý (E 171), železo, selen, vápník, hořčík či sůl (Kvasničková, 2011). Nejčastěji jsou anorganické nanočástice aplikovány v obalových materiálech. Oxidy stříbra a zinku se využívají kvůli jejich antibakteriálnímu účinku, oxid titaničitý chrání produkt před UV zářením. Amorfni oxid křemičitý je používán při technologickém čištění piva a vína. Ve žvýkačkách je možné se setkat s vápenatými solemi. Vápník, hořčík či stříbro se navíc používají jako doplňky stravy (Chaudhry et al., 2011). Některé anorganické nanočástice, včetně zlata, stříbra a titanu, obvykle nejsou součástí

potravin, ale mají celou řadu možností využití v potravinářství, například jako aditiva či konzervanty (FSAI, 2010). Mezi výrobky vyrobené pomocí nanotechnologií patří také kuchyňské náčiní, obaly, zásobníky potravin či kojenecké láhve s antibakteriální úpravou apod. (Kvasničková, 2011).

Nanočástice mohou do lidského těla prostoupit skrz kůži, vdechnutím či konzumací potravin, které je obsahují (Kvasničková, 2011). Výzkumy potenciálního přínosu pro organismus neustále pokračují. Mnoho organických nanočástic vyskytujících se v potravinách pravděpodobně nezpůsobuje zdravotní rizika pro člověka. Naproti tomu anorganické nanomateriály jako je stříbro a titan, obsažené v obalovém materiálu či přímo v potravine, jsou sice reaktivnější než organické, avšak jejich rizikové interakce a osud v organismu nejsou doposud známy (FSAI, 2010). Byla zkoumána pouze migrace železa, hořčíku a křemíku z biologicky odbouratelného materiálu, obsahujícího škrobové a jílové nanočástice, do balené zeleniny (špenát, hlávkový salát). Výsledky prokázaly zanedbatelný nárůst množství železa a hořčíku v této zelenině (Chaudhry et al., 2011).

3.2.1 Aplikace do obalových materiálů

První výzkum zabývající se využitím nanomateriálů v obalech proběhl okolo roku 1990 (Sozer, Kokini, 2012). V současnosti se v tomto sektoru používá hned několik typů nanomateriálů, jako jsou nanokapsle, membrány, nanoemulze, lipozomální nanonosiče, nanotrubky, nanovodiče apod. (Blasco, Picó, 2011). Díky aplikaci nanomateriálů do potravinářského průmyslu již obaly neslouží pouze k balení potravin za účelem ochrany před okolním prostředím, ale zároveň k ochraně lidského zdraví (Silvestre, 2011). Pro kontrolu stavu potravin během přepravy a skladování jsou využívány nanosenzory zabudované do potravinových obalů, které slouží rovněž k detekci bakterií, čerstvosti produktu a také k identifikaci mikrobiálních a chemických kontaminujících látek. Nanosenzory zvyšují biologickou bezpečnost a sledovatelnost potravin (Blasco, Picó, 2011; Marvin et al., 2011). Začleněním krystalických nanočástic, jako jsou například jílové nanočástice, lze zajistit nepropustnost materiálu vůči kyslíku nebo oxidu uhličitému. Při zakomponování nanočástic stříbra do obalového materiálu se zvyšují antibakteriální vlastnosti obalu. Dalším příkladem může být obalový materiál složený z bramborového škrobu a uhličitanu vápenatého. Má výborné tepelně izolační vlastnosti, je lehký a biologicky odbouratelný (Boom, 2011). Do budoucna by se mohly objevovat i obaly obsahující imobilizované enzymy, jako je laktáza či cholesterol reduktáza. Takovéto obaly by pak mohly být používány pro potraviny vyžadující určité enzymové

ošetření pro zákazníky, kteří trpí intolerancí na laktózu či mají zvýšený cholesterol (Sozer, Kokini, 2012).

Mezi největší výhody těchto moderních obalů patří schopnost vylučovat antibakteriální látky, antioxidanty a chutě. Tyto látky zvyšují životnost produktu a jeho senzoričké vlastnosti. Výhodou je rovněž zvýšená ochrana potravin před teplotou a vlhkostí a biologická odbouratelnost obalového materiálu (FSAI, 2010; Silvestre, 2011). Jako jeden z příkladů implementace nanotechnologie do obalového průmyslu je využití hliníkových nanovstev ve většině obalů různých druhů cukrovinek a aseptických obalů nápojů či mléka (Sozer, Kokini, 2012).

3.2.2 Enkapsulace biologicky aktivních molekul

Enkapsulace, neboli zapouzdření, je proces, při němž dochází k začlenění komponentu do nosiče. Tato metoda se používá zejména pro zpomalení uvolňování aktivní složky zapouzdřené do nosiče a ke zvýšení její stability (Ré et al., 2010). Zpočátku se tato technika používala pouze pro lékařské účely. Princip spočívá v zapouzdření aktivní látky do nanotransportéru zacíleného na určitou oblast v lidském těle. Aktivní látka se tímto způsobem dostává ke konkrétnímu místu určení bez zásahu jiných oblastí v organismu (Boom, 2011). Rovněž zvyšuje účinnost aktivní složky a snižuje případné vedlejší účinky (Fojtík et al., 2014).

Později se enkapsulace začala využívat v potravinářství zejména pro fortifikaci potravin a při výrobě funkčních potravin (Moraru et al., 2009). Mimo to zlepšuje absorpci aktivní složky, kontroluje její správné uvolňování, řeší problémy vzniklé limitovanou chemickou a fyzikální stabilitou aktivní složky a také překonává inkompatibilitu mezi aktivní složkou a potravinou (Ré et al., 2010). Mezi nejčastěji enkapsulované složky patří například vitamíny, antioxidanty, barviva, probiotika, konzervanty či dochucovadla (Moraru et al., 2009). Například probiotické bakterie jsou částečně inaktivovány nepříznivými podmínkami v žaludku a v dalších částech gastrointestinálního traktu. Avšak při jejich enkapsulaci mohou být probiotické bakterie chráněny do doby, než se dostanou do tlustého střeva, kde jsou aktivovány (Boom, 2011).

Enkapsulace dokáže vyřešit i problémy orální vakcinace. Vakcína podaná ústy většinou degraduje v prostředí v žaludku. I když by byla schopna překonat toto prostředí, účinná látka by nepostoupila do krve přes stěnu střeva. Ta zabraňuje průchodu patogenů do organismu. Enkapsulací se vakcína stává rezistentní vůči prostředí žaludku, a dokon-

ce je schopna přestoupit do krve, přičemž bývá dopravena do buněk organismu. Zapouzdření některých látek může zvyšovat jejich biologickou dostupnost (Boom, 2011).

3.3 Využití při čištění vody

Nanotechnologie lze využívat k čištění vod, které jsou kontaminovány chemickými látkami z různých zdrojů či mikrobiálně, a jelikož se nanomateriály ve vodě chovají jako inertní látky, jsou vhodné pro čištění pitné vody (Hrdinová, 2013). Současné čištění vody pomocí nanotechnologií se používá v kombinaci s membránovými filtry. Díky nanočásticím mohou filtry disponovat antimikrobiálními vlastnostmi. Jednou z výhod využití tohoto způsobu čištění je snížení množství chemikálií a nákladů na čištění. Avšak nevýhodou membránových filtrů je jejich nízká životnost způsobená ucpáním a často i omezená chemická selektivita (Kazdová, 2012). Tzv. nanofiltrací lze z pitné vody, mimo mikroorganismů, odstraňovat i fluoridy, sinicové toxiny, brom, huminové kyseliny či chrom (Hrdinová, 2013).

Nanovlákna oxidu hlinitého bývají používány k odstraňování bakterií a virů z vody, zatímco nanočástice oxidu železa se používají k odstranění fosfátů a arsenu (FSAI, 2010). Ve vodě nerozpustný oxid titaničitý se při čištění vody využívá ve formě suspenze či nátěru, přičemž představuje levný a netoxický materiál, vhodný pro degradaci organických látek a desinfekci. Využívat lze například i ftalocyaniny ve formě nátěru nebo roztoku, které jsou určeny především k inhibici bakterií a mikroskopických hub. Významné antimikrobiální vlastnosti mají rovněž nanočástice stříbra, jež napadají lipopolysacharidovou membránu bakteriálních buněk, čímž se stává propustnější a tím pádem i méně odolnou, či se přímo inkorporují do buněk, kde zabraňují replikaci DNA. Nanostříbro je nejužívanějším nanomateriálem, který je cílený proti mikroorganismům. Pro úpravu vody se může používat i chitosan, což je hydrofilní biopolymer užívaný jako flokulant a koagulant. Mimo to je užíván i za účelem desinfekce (Hrdinová, 2013).

3.4 Nanotransportéry

Nanotransportéry jsou koloidní nanosystémy, které slouží jako cílené nosiče léčiv, makromolekul (proteiny, geny) (Pérez-Herrero, Fernández-Medarde, 2015) či zobrazovacích prostředků (Peer et al., 2007). Díky zapouzdření, například protinádorových léčiv, do nanotransportéru se léky lépe akumulují v nádoru, a navíc navázání léku na nanotransportér snižuje zasažení ostatních tkání v těle. Nanotrasportéry mají řadu výhod oproti lékům podávaným volně. Chrání léčivou látku před předčasnou degradací, umož-

ňují kontrolu kinetiky uvolňování léčiv a zlepšují rozpustnost těch nerozpustných, zabraňují lékům vytvářet předčasné interakce s biologickým prostředím, zvyšují absorpci léku do vybrané tkáně a zlepšují intracelulární penetraci (Pérez-Herrero, Fernández-Medarde, 2015).

Vhodné nanotransportéry musí splňovat určitá pravidla. Musí být vyrobeny z vhodného biokompatibilního materiálu, vykazovat dlouhou životnost a nízkou míru agregace (Peer et al., 2007). Ideální nanotransportér by neměl aktivovat reakci imunitního systému (Heger et al., 2014). Nanotransportéry lze rozdělit do několika skupin podle materiálu, ze kterého jsou vytvořeny. Mezi základní patří polymerní nanotransportéry, lipidové nanotransportéry, organické nanotransportéry a anorganické nanotransportéry (Peer et al., 2007).

3.4.1 Anorganické nanotransportéry

Anorganické nanotransportéry byly původně rozsáhle studovány pro využití k zobrazování magnetické rezonance. Nyní mohou být rovněž používány k cílení molekul a léčiv (Peer et al., 2007). Dále je lze rozdělit do 4 skupin na kovové (zlaté, stříbrné, platinové či železné nanočástice), polokovové (kvantové tečky), nekovové (hydroxyapatit či nanočástice na bázi oxidu křemičitého) a uhlíkové (nanotrubky a fullereny) (Dostálová, 2014). Anorganickým nanočásticím chybí schopnost biologické odbouratelnosti, což má za následek, u většiny nanočástic, potenciální akumulaci v organismu způsobující dlouhodobou toxicitu (Peer et al., 2007).

V současnosti nejvyužívanějšími anorganickými nanotransportéry jsou uhlíkové nanotrubky. Nanotrubky vznikají srolováním uhlíkových listů a vykazují velký potenciál pro biologické a biomedicínské aplikace jako je doprava léčiv, lékařské senzory DNA či proteinů a prostředky pro tepelnou terapii rakovinných buněk. Chemickou modifikací lze dosáhnout jejich rozpustnosti ve vodě. Rozpustnost uhlíkových nanotrubek zamezuje případné toxicitě (Chowdhury et al., 2016). Velmi užívanými jsou rovněž zlaté nanočástice. Ty mohou sloužit jako nosič inzulínu a jako podpora při radiační terapii, díky jejich schopnosti absorbovat rentgenové paprsky. Při radioterapii lze jejich přítomností v oblasti nádoru výrazně zvýšit absorpci ionizujícího záření, a tím snížit terapeutické dávky záření, což chrání zdravé tkáně (Kopel et al., 2015).

3.4.2 Polymerní nanotransportéry

Polymerní nanotransportéry mohou být vyrobeny ze syntetických polymerů (polymléčná kyselina), či z přírodních polymerů (chitosan, kolagen, albumin, heparin) a mohou být použity k zapouzdření léků bez chemické úpravy (Peer et al., 2007; Chowdhury et al., 2016). Struktura polymerních nanočástic je vhodná pro transport hydrofobních léčiv (Chowdhury et al., 2016).

Při vhodné modifikaci může být chitosan použit jako zobrazovací a terapeutický prostředek. Je biokompatibilní a je užíván v teranostické nanomedicině (Swierczewska et al., 2016).

3.4.3 Lipidové nanotransportéry

Lipidové nanotransportéry jsou biokompatibilní, biodegradabilní, izolují léčivo od okolního prostředí a jsou schopny vázat jak hydrofilní, tak hydrofobní léčiva. Tvar, náboj a funkčnost jejich povrchu může být snadno modifikována. Za lipidové nanotransportéry jsou považovány liposomy, polymerosomy a micely (Peer et al., 2007).

Liposomy jsou sférické, uzavřené struktury tvořené jednou nebo více koncentrickými lipidovými dvojrstvami a s vodní fází uvnitř (Peer et al., 2007). Průměr této struktury se pohybuje v rozmezí 40–50 nm (Chowdhury et al., 2016). V současnosti jsou liposomy schváleny jako přenašeče mnohých chemoterapeutik v klinické praxi (Peer et al., 2007). V současné době je jejich největší výhodou nižší kardiotoxicita a zlepšení léčby multirezistentních druhů rakovin (Chowdhury et al., 2016). Polymerosomy mají podobnou strukturu jako liposomy, ale jsou složeny ze syntetických polymerních amfifilů, včetně kopolymerů polymléčné kyseliny. Avšak neexistují žádné klinicky schválené strategie, které by je využívaly jako nosiče léčiv (Peer et al., 2007). Micely jsou polymerní struktury (Chowdhury et al., 2016), mají uzavřenou strukturu tvořenou jednovrstvou lipidovou membránou. Tvoří je hydrofobní jádro a hydrofilní plášť. Jejich vnitřní hydrofobní část má schopnost vázat léky, které jsou méně rozpustné ve vodním prostředí, zatímco jejich hydrofilní obal ho tvoří hydrofilním (Chowdhury et al., 2016). Proto jsou vhodným farmaceutickým nosičem léčiv nerozpustných ve vodě (Peer et al., 2007).

3.4.4 Organické nanotransportéry

Mezi organické nanotransportéry patří dendrimery, virové kapsidy a biologické nanostruktury jako jsou například proteiny.

Dendrimery jsou syntetické, rozvětvené makromolekuly (Peer et al., 2007). Dendrimery snadno konjugují a lze je modifikovat pro různé funkce. Využívají se jako zobrazovací prostředky či transportéry (Chowdhury et al., 2016). Polyamidoaminové dendrimery mohou snadno konjugovat s cílovými molekulami a léčivy. Jsou dobře rozpustné ve vodě, biokompatibilní a jsou rychle odstraňovány z krve prostřednictvím ledvin, což eliminuje potřebu biodegradability (Peer et al., 2007). Kromě toho poměrně hydrofobní vnitřní vrstva dendrimera je schopna zapouzdřovat hydrofobní léčivo, které je v konečné fázi rozpustné ve vodě a pro tělo dostupnější (Chowdhury et al., 2016).

V současnosti jsou velmi využívaným nanotransportérem virové kapsidy, jež jsou morfologicky uniformní, biokompatibilní a snadno modifikovatelné. Nejčastěji mají sférický či tyčinkovitý tvar o velikosti 10 nm až 1 μm (Dostálová, 2014). Tyto virové částice se skládají z několika stovek až tisíců proteinových molekul, které vytváří dutou strukturu pro nukleovou kyselinu. Mezi zástupce lze zařadit virus tabákové mozaiky, bakteriofág M13, MS2 či Q β (Ma et al., 2012).

Proteinové nanotransportéry tvoří tzv. proteinovou klec. Charakteristickým znakem pro tyto struktury je jejich homogenita. Existuje celá řada proteinových klecí o různých velikostech, sloužících jako nanotransportér pro ionty kovů a minerálních látek. Nejznámější užívané proteiny pro tyto aplikace jsou ferritiny, které jsou součástí téměř všech živých organismů (Ma et al., 2012). Jsou to detoxikační, oligomerní proteiny vyskytující se v tělech rostlin, mikroorganismů, bezobratlých či lidí (Heger et al., 2014). Ferritiny byly objeveny v roce 1937, kdy byly izolovány z koňské sleziny Vilémem Laufbergerem se zjištěním, že obsahují okolo 20 % železa (Douglas et al., 2005).

Do skupiny ferritinů lze zařadit **apoferritin**, což je intracelulární protein, jehož významnou funkcí je skladování železných iontů v těle (Zhao et al., 2012). Chrání tak organismus před škodlivým hromaděním železa sbíráním volného železa ve formě hydratovaných hydroxid-oxidů železitých ve svém jádře pro další využití jako enzymatických kofaktorů (Heger et al., 2014). Tímto lze zabránit toxicitě, způsobené tvorbou volných radikálů. Ty vznikají redukcí iontů železitých na železnaté ionty (Prnka, Šperlink, 2004). Díky jeho velikosti, vysoké stabilitě a speciální struktuře je apoferritin přírodním nanomateriálem s vynikající biokompatibilitou (Zhao et al., 2012). U různých druhů

organismů se jejich struktura pouze nepatrně liší (Heger et al., 2014). V eukaryotických buňkách je apoferritin bílkovinný komplex složený z 24 podjednotek uspořádaných do uzlu, který tvoří čtyři spirály. Má dutou, sférickou strukturu. Jeho vnější průměr je 12 nm (Stanley, 2014), průměr vnitřní dutiny je 8 nm a molekulová hmotnost je 480 kDa (Adam, 2013a). Tato struktura dokáže pojmout až 4500 atomů železa (Stanley, 2014). Struktura apoferritinu je velmi stabilní. Apoferritin dokáže odolávat biologickým extrémům jako je vysoká teplota (až 70 °C) či velkému rozsahu hodnot pH (pH 2,0 až 10,0) po značnou dobu (Heger et al., 2014). Při nízkém pH (2,0) se apoferritin rozkládá na své podjednotky, avšak při zvýšení pH (6,5) dochází k opětovnému sestavení apoferritinu. Této vlastnosti se využívá zejména při enkapsulaci (Zhao et al., 2012).

V přírodě se objevují ferritiny s navázaným železem. Když je však z ferritinu odstraněno železo, vzniká apoferritin s dutou strukturou, schopný vázat různé látky včetně organických a anorganických (Zhen et al., 2013). Díky své duté struktuře a vlastnostem je často apoferritin používán jako tzv. proteinová klec (Zhao et al., 2012), která v organismu slouží k transportu minerálů či iontů kovů (Dostálová, 2014). Apoferritin, jakožto přirozeně se vyskytující protein, se v dnešní době využívá jako nanotransportér při cílené terapii v biomedicínském výzkumu. Tento druh léčby pracuje především s vybranými nanočásticemi, jež jsou využívány pro transport určitých léčivých látek (Heger et al., 2014).

3.5 Způsoby konjugace s přenášenými molekulami

Přenášené molekuly s nanotransportérem je možné konjugovat za využití fyzikálních nebo chemických postupů. Jednou z používaných metod je tzv. **metoda zachycení** (z angl. physical entrapment). Je jednou z imobilizačních technik, která může být definována jako fyzikální omezení molekuly v uzavřené polymerní síti, vyžadující syntézu polymerní sítě v přítomnosti molekuly (Kim et al., 2011). Fyzikální metody jsou rozděleny na tři typy v závislosti na způsobu imobilizace (absorpce, přichycení, enkapsulace) (Chowdary, 2008). Metoda zachycení je založena na absorpci molekul, tak pevně, aby se zabránilo jejich nežádoucímu předčasnému uvolňování, ale zároveň bylo umožněno uvolňování v cílovém místě (Homaei, 2016). Velmi důležité je omezení difúze skrz póry (Chowdary, 2008). Tato metoda se oproti chemickým metodám konjugace liší v tom, že samotná biomolekula se neváže chemickými vazbami do matrice nanotransportéru (Homaei, 2016). Mnoho molekul neobsahuje žádnou reaktivní funkční skupinu pro chemickou konjugaci a proto je tato fyzikální metoda často využívána (Bartakova,

2006). Může být použita pro zachycení jakéhokoli typu biomolekuly, ale někdy dochází k drobnému poškození její biologické aktivity, například vlivem volných radikálů, které mohou vznikat při polymeraci některých nanotransportérů (Homaei, 2016). Za tímto účelem musí být vlastnosti nanotransportéru a podmínky použité pro zapouzdření slučitelné s enkapsulovanou molekulou (Eş et al., 2015). Nanotransportér by měl být netoxický, biodegradabilní, chemicky stabilní a mikrobiálně rezistentní (Homaei, 2016). Forma a povaha nanotransportéru závisí na použitém materiálu (Chowdary, 2008), většinou se používají biopolymery (Homaei, 2016), polyakrylamidové gely, agar, želatina či agaróza. Vlákňité materiály používané pro zachycení v matici vláken jsou například oxid křemičitý či PVC. Tato metoda je průmyslově užitečná a nízkonákladová. Další výhodou je stabilizace a ochrana struktury dané biomolekuly. Metoda probíhá za mírných reakčních podmínek, přičemž nedochází ke změně konformace molekul. (Chowdary, 2008).

Různé aplikace této metody se mohou objevovat v potravinářství (urychlení procesu zrání a kontrola rozvoje chuti), medicíně (enzymová terapie, nanomedicína) či výzkumu. V potravinářství se jako biopolymery pro účely této metody používají proteiny, do kterých jsou v tomto odvětví zapouzdřovány především vitamíny, antioxidanty či chuťové přísady (Homaei, 2016). Jedná především o začleňování přísad do kapslí, slouží rovněž ke stabilizaci a ochraně před zpracovatelskými, nutričními a zdravotními ztrátami (Ghorbanzade et al., 2016).

Druhou používanou metodou je metoda využívající tzv. **cross-linkery**. Principem metody cross-linking (překládáno jako zesíťování či prokřížení) je vznik mezimolekulové vazby molekuly s nosičem či jeho funkčními skupinami (Kaštánek, 2001). Touto chemickou metodou se vytváří zesíťovaný komplex (Müller et al., 2010).

Hlavním cílem zesíťovací reakce je vznik kovalentní vazby mezi dvěma prostorově blízkými funkčními skupinami jednoho nebo dvou řetězců (Leitner et al., 2010). Principem této imobilizační techniky je propojení všech molekul s ostatními chemicky či fyzikálně. Chemické kovalentní prokřížení navzájem spojuje jednotky biokatalyzátoru s bi- a multifunkčními činidly za vzniku nerozpustných vysokomolekulárních agregátů činidla, poskytujících dvě či více skupin vazebných skupin pro biokatalyzátor. Oproti tomu při fyzikálním cross-linkingu dochází ke srážení molekul, což vede k jejich vysoké koncentraci na jednotku objemu. Tento způsob má velký potenciál v imobilizaci molekul v průmyslové technologii. Činidla vedoucí k agregaci molekul jsou například po-

lyaminy či polyethyleniminy (Kennedy, Cabral, 2014). Zesíťovací reakce by měly probíhat za podmínek, které udrží protein či proteinový komplex v nativním stavu. Proto by se mělo pH pufru při stanovování pohybovat v rozmezí pH 6,5–8,5 a pufr nesmí obsahovat žádné funkční skupiny, které by interferovaly s reakcí. Reakce by měla probíhat při teplotě 4–37 °C. Reakční doba se obvykle pohybuje od několika minut až po několik hodin. Díky přesnosti této metody lze identifikovat uspořádání podjednotek proteinových komplexů. Bohužel to není jediný možný reakční produkt. Je velmi pravděpodobné, že bude reagovat pouze jeden konec bifunkčního činidla, protože druhý konec nepřichází do kontaktu s jiným koncem zesíťovadla. Dalším problémem je deaktivace druhé reaktivní skupiny například hydrolýzou před vytvořením vazby. Z tohoto důvodu mohou být pozorovány různé produkty této reakce. Vše ovšem závisí na typu vzorku (Leitner et al., 2010).

Existuje mnoho druhů zesíťovacích činidel, které lze rozdělit do několika kategorií například podle jejich reaktivity nebo začlenění dalších funkčních skupin (Leitner et al., 2010). Homobifunkční činidla mají totožné reaktivní skupiny, kdežto heterobifunkční činidla je mají rozdílné. V současnosti se objevují i trifunkční činidla, které mají dvě reakční skupiny sloužící k propojení proteinů a třetí umožňující detekci a purifikaci propojených proteinů (Wildová, Rumlová, 2008).

Významnou skupinou síťovacích činidel jsou tzv. zero-length cross-linkery. Typickým příkladem takového činidla je 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid (EDC) či *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (Wildová, Rumlová, 2008). Použití linkerů s nulovou délkou síťovadel vyžaduje téměř přímý kontakt síťovatelných míst (Leitner et al., 2010). Největší výhodou těchto činidel je aktivace funkčních skupin u postranních řetězců cílových proteinů. Tím lze docílit vytvoření kovalentní vazby bez linkeru. Linker je část činidla, která spojuje dvě reaktivní skupiny a určuje vzdálenost mezi nimi (Wildová, Rumlová, 2008).

Výhodou metody cross-linking je detekce velmi slabých interakcí a přechodných interakcí. Tato metoda je proveditelná jak *in vivo*, tak *in vitro*. Za nevýhodu je považována nízká specifita, jelikož u delších bifunkčních činidel dochází k prokřížení proteinů nacházejících se blízko sebe, aniž by spolu reagovaly (Wildová, Rumlová, 2008).

4 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce byla analýza využití nanomateriálů a jejich aplikace v potravinářství, a to zejména pro zvýšení biologické dostupnosti vybraných molekul, kterými byly kyseliny askorbová a listová. Na základě poznatků o schopnosti vazby nanočástic s vybranými molekulami bylo provedeno několik experimentů, zaměřených na sledování stability konjugátu, jeho uvolňování v závislosti na okolním prostředí a sledování internalizace komplexu do živých buněk.

Dílčí cíle závěrečné práce byly následující:

- Shrnutí současného stavu poznatků v oblasti doplňků stravy a nanomateriálů formou literární rešerše
- Enkapsulace doplňku stravy do nanotransportéru a způsob detekce
- Stanovení míry stability komplexu
- Stanovení zvýšení biodostupnosti doplňků stravy
- Analýza a grafické zpracování získaných dat

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Chemikálie

Všechny chemikálie použité v této práci byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), pokud není uvedeno jinak.

- Enkapsulace kyseliny askorbové do apoferritinu: kyselina askorbová (PENTA, Praha, Česká republika), 1M hydroxid sodný, 1M kyselina chlorovodíková, apoferritin, voda v ACS kvalitě
- Test stability komplexu: doxorubicin (1 mg/ml), apoferritin, 1M kyselina chlorovodíková, 1M hydroxid sodný, voda v ACS kvalitě, pufovaný fyziologický roztok (PBS)
- Konjugace povrchu apoferritinu s kyselinou listovou: kyselina listová (250mM v 1M NaOH), 1M kyselina chlorovodíková, 1M hydroxid sodný, 1M *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimid (DCC), apoferritin, voda v ACS kvalitě

- Kultivace buněčných linií: buněčné linie (PNT1A, LNCaP, PC-3, 22RV1, MDA, A2780, HACAT, UKF-NB4), médium RPMI, 10% FBS (fetální hovězí sérum), médium IMDM, inhibitor proteáz, SDS (dodecylsírán sodný)
- Internalizace komplexu do živých buněk: protilátka proti GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza), protilátka proti buněčnému receptoru pro vazbu folátu, apoferritin, voda v ACS kvalitě, doxorubicin, 1M kyselina chlorovodíková, 1M hydroxid sodný, 1M *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimid (DCC), buněčná linie UKF-NB4

5.2 Buněčné linie

PNT1A reprezentují prostatické buněčné linie, LNCaP je epitelární buněčná linie získaná z lidského adenokarcinomu prostaty. PC-3 jsou buněčné linie karcinomu prostaty, 22RV1 jsou buňky izolované z karcinomu prostaty. MDA představují buňky získané z lidského adenokarcinomu prsu, A2780 jsou nádorové buňky vaječníku. Buněčná linie HACAT jsou spontánně transformované aneuploidní keratinocyty získané z kůže. Buněčná linie UKF-NB4 jsou buňky neuroblastomu, maligního nádoru v raném dětském věku.

5.3 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy BAS 31 (BOECO, Hamburg, Německo)
- Centrifuga 5424 R (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Fluorimetr Infinite M200 PRO (TECAN, Männedorf, Švýcarsko)
- Mikroskop Olympus IX 71S8F-3 (Olympus, Tokyo, Japonsko)
- Transmisní elektronový mikroskop Tecnai F20 (FEI, Hillsboro, OR, USA)
- Inkubátor Galaxy 170 R (New Brunswick, Německo)
- Zetasizer Nano ZS (Malvern, Spojené království)
- Analyzátor 797 VA Computrace (Metrohm, Švýcarsko)
- Rotátor Multi RS-60 (Biosan, Lotyšsko)

5.4 Metody

5.4.1 Schopnost enkapsulace kyseliny askorbové do apoferritinu

200 μ l kyseliny askorbové o různých koncentracích (1000; 500; 250; 125 a 62,5 μ g/ml) se smíchalo s 20 μ l apoferritinu a 100 μ l ACS vody. Po přidavku 2,15 μ l 1M kyseliny chlorovodíkové došlo ke snížení pH na 2,45 a ke změně struktury apoferriti-

tinu, která se rozvolnila. Následným třepáním po dobu 15 min došlo k vazbě kyseliny askorbové na apoferritin. Pro opětovné zvýšení pH na 8,4 se přidalo 2,3 μl 1M hydroxidu sodného s následným třepáním 15 min. Díky této změně pH došlo k obnovení struktury apoferritinu a k uzavření kyseliny askorbové do dutiny tohoto nanotransportéru. Přebytké molekuly kyseliny askorbové byly odstraněny 3 \times diafiltrací s vodou (6000 \times g, 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$).

Vizualizace apoferritinu byla provedena za použití transmisního elektronového mikroskopu s technikou negativního barvení. Za tímto účelem byly 4 μl apoferritinu naneseny na měděnou mřížku s kontinuální uhlíkovou vrstvou. Po vysušení byly mřížky pozorovány při 80000 \times zvětšení.

Enkapsulační výtěžnost apoferritinu pro různé koncentrace kyseliny askorbové byla ověřena elektrochemicky. Elektrochemická analýza byla provedena pomocí metody diferenční pulzní voltametrie na analyzátoru 797 VA Computrace. Pro měření bylo použito standardní tříelektrodové zapojení, kde jako pracovní elektroda sloužila visící rtuťová kapková elektroda, pomocná elektroda byla platinová a jako referenční byla použita argentchloridová elektroda. Jako elektrolyt sloužil 0,1M acetátový pufr, pH 4,6. Analýza proběhla za následujících parametrů: počáteční potenciál -0,2 V, koncový potenciál 0,2 V, potenciálový krok 0,005 V, rychlost skenování 0,0084 V/s použitá amplituda 0,05 V a čas 0,04 s.

5.4.2 Určení stability komplexu

Pro určení dlouhodobé stability komplexu byla při enkapsulaci použita fluorescenční molekula doxorubicin. 9600 μl doxorubicinu bylo smícháno s 960 μl apoferritinu a 4800 μl ACS vody. Pro snížení pH bylo přidáno 120 μl 1M kyseliny chlorovodíkové. Takto připravený roztok byl třepán 15 min. Poté bylo přidáno 120 μl 1M hydroxidu sodného, čímž se pH opětovně zvýšilo a došlo k enkapsulaci doxorubicinu do apoferritinu. Roztok byl třepán 15 min a následně rozdělen na dvě části. Neenkapsulované molekuly doxorubicinu byly odstraněny 3 \times diafiltrací. Během diafiltrace byla u jedné části zachována jako rozpouštědlo ACS voda, u druhé byla vyměněna za PBS. Po filtraci byly vzorky doplněny do objemu 2400 μl stejným rozpouštědlem, jako bylo použito při filtraci. Vzorky se rozdělily do Eppendorfových zkumavek po 300 μl a uskladnily do příslušných podmínek (viz Tabulka 4).

Tabulka 4 - Podmínky skladování komplexu apoferritin–doxorubicin

Rozpouštědlo	Teplota (°C)	Světelné podmínky
voda	-20	tma
voda	4	tma
voda	20	tma
voda	37	tma
voda	4	světlo
voda	20	světlo
PBS	-20	tma
PBS	4	tma
PBS	20	tma
PBS	37	tma
PBS	4	světlo
PBS	20	světlo

Změny ve vlastnostech komplexu byly sledovány 1× týdně po dobu dvanácti týdnů. U každého vzorku byla měřena absorbance a fluorescence celého komplexu a množství předčasně uvolněného doxorubicinu bylo určeno po diafiltraci za využití fluorescence. Fluorescence byla měřena při excitaci vlnovou délkou 480 nm a emisi 515–815 nm. Absorbance se měřila v rozmezí vlnových délek 230–850 nm. U každého vzorku byla také sledována změna velikosti komplexu.

5.4.3 Konjugace povrchu apoferritinu s kyselinou listovou

250mM kyselina listová byla připravena v 1M NaOH. Pro modifikaci povrchu apoferritinu s enkapsulovanou kyselinou listovou nebo enkapsulovaným doxorubicinem o objemu 325 μ l bylo použito 12,5 μ l kyseliny listové (o koncentracích 5,6; 2,8; 1,4; 0,7 nebo 0,35mM) a 12,5 μ l DCC (o koncentracích 28; 14; 7; 3,5 nebo 1,75mM). Směs byla třepána po dobu 2 hod při 20 °C a 600 rpm. Nenavázaná kyselina listová byla odstraněna 3× diafiltrací s vodou. Množství navázané kyseliny listové bylo ověřeno měřením absorbance v jejím absorpčním maximu, tedy při vlnové délce 365 nm.

5.4.4 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie PNT1A, LNCaP, PC-3, 22RV1, MDA, A2780 a HACAT byly kultivovány v médiu RPMI 1640 (Gibco, Waltham, MA, USA), suplementovaném 10% fetálním bovinním sérem (FBS, Gibco, Waltham, MA, USA). Buněčná linie UKF-NB4 byla kultivována v médiu IMDM (Gibco, Waltham, MA, USA), suplementovaném 10%

FBS (fetální bovinní sérum). Všechny linie byly kultivovány v atmosféře obsahující 5% CO₂ a 90% vlhkost a při 37 °C.

1 000 000 buněk od každé linie byl lyzován v 99 µl RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay) lyzačního pufru s 1 µl inhibitoru proteáz na ledu po dobu 45 min, s následnou sonikací nukleových kyselin 5× 3 s a centrifugací zbytků buněčného obsahu při 22 000× g a 4 °C po dobu 20 min.

Expres folátových receptorů byla studována metodou western blot. Proteiny buněčných lyzátů byly separovány po dobu 35 min při 200 V na 12,5% SDS PAGE (polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsíránem sodným) gelu. Proteiny byly transferovány na polyvinylidenefluoridovou membránu při elektrickém proudu 0,9 mA/cm² membrány po dobu 50 min. Jako housekeeping protein byl použit glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH). Jeho exprese byla studována použitím protilátky anti-GAPDH (G-9, sc-365062, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), s ředěním 1:700. Expres folátového receptoru byla studována s použitím protilátky anti-folate binding protein (LK26, ab3361, Abcam, Cambridge, UK), ředění 1:500.

5.4.5 Internalizace komplexu do živých buněk a zvýšení biodostupnosti

Komplex vznikl smícháním 20 µl apoferritinu, 100 µl ACS vody a 200 µl doxorubicinu. Za účelem enkapsulace doxorubicinu do apoferritinu, došlo ke snížení pH pomocí 2,5 µl kyseliny chlorovodíkové a k opětovnému zvýšení přidávkem 2,5 µl hydroxidu sodného. Pro navázání kyseliny listové bylo použito množství 12,5 µl o několika koncentracích (5,6; 2,8 a 1,4mM) a 12,5 µl DCC (28; 14 a 7mM). Směs byla třepána 2 hod při 20 °C a 600 rpm. Volná kyselina listová byla odfiltrována a její množství bylo zjištěno fluorescenčně při excitační vlnové délce 365 nm a emisi 390–850 nm. Takto vzniklý komplex (naředěný médiem pro zisk 34 µM doxorubicinu v apoferritinu) byl aplikován na adherované buňky buněčné linie UKF-NB4. Po 2 hod inkubace byly neinternalizované molekuly nanotransportéru odstraněny promytím PBS a internalizace komplexu byla mikroskopicky pozorována. Morfologie buněk byla sledována v ambientním světle. Pro sledování fluorescence doxorubicinu byl použit fluorescenční filtr TxRed (excitace 545-580 nm, emise 610-800 nm, dichroické zrcadlo 600 nm) při 200× zvětšení.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Enkapsulace kyseliny askorbové do apoferritinu

V této práci byla jako modelový doplněk stravy použita kyselina askorbová, jakožto esenciální a velmi důležitá složka potravy, která se nejčastěji konzumuje právě ve formě doplňků stravy. Kyselina askorbová byla enkapsulována do nanotransportéru apoferritinu v pěti různých koncentracích (615; 308; 154; 77 a 38 $\mu\text{g/ml}$). Neenkapsulované molekuly kyseliny askorbové byly odstraněny diafiltrací. Poté byla elektrochemicky stanovena její koncentrace po filtraci a byla vypočítána enkapsulační výtěžnost (viz Tabulka 5).

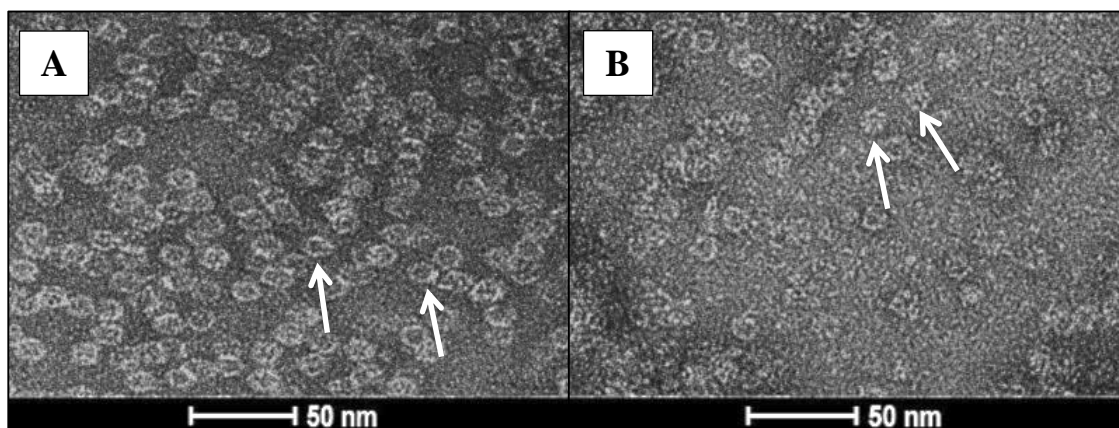
V experimentu byla úspěšně prokázána schopnost apoferritinu enkapsulovat kyselinu askorbovou. Při aplikaci kyseliny askorbové o nejvyšší koncentraci, tedy 615 $\mu\text{g/ml}$, byla detekována nejnižší výtěžnost enkapsulace molekul, pouhých 12 %, přičemž došlo k největším ztrátám kyseliny askorbové. 23% enkapsulační výtěžnost aplikovaných molekul byla zaznamenána při použití koncentrace kyseliny askorbové o 308 $\mu\text{g/ml}$ a 154 $\mu\text{g/ml}$. Nejúčinnější enkapsulace (tzn. enkapsulace s nejvyšší výtěžností) bylo dosaženo při aplikované koncentraci kyseliny askorbové 77 $\mu\text{g/ml}$, kdy bylo do apoferritinu enkapsulováno 39 % aplikovaných molekul. Oproti tomu při aplikaci kyseliny askorbové o koncentraci 38 $\mu\text{g/ml}$ již nebylo možné detekovat žádné množství enkapsulovaných molekul.

Jiné práce ukazují, že do apoferritinu je možné enkapsulovat pouze látky polární s molární hmotností 18–7500 g/mol (Beletti et al., 2016). Kyselina askorbová splňuje obě tyto podmínky a naše výsledky potvrzují, že je možné ji do apoferritinu enkapsulovat. Kromě toho je ale za významnou vlastnost považován i náboj enkapsulované látky, jelikož difúze látky do proteinové struktury apoferritinu neprobíhá pouze pasivně. Aktivní difúze je podmíněna kladným nábojem enkapsulované látky (Beletti et al., 2016). Protože má kyselina askorbová nulový náboj, nedošlo k aktivnímu transportu molekul do struktury apoferritinu, což má s největší pravděpodobností za následek i nižší enkapsulační výtěžnost (maximálně 39 %).

Tabulka 5 - Enkapsulační výtěžnost apoferritinu pro kyselinu askorbovou

Aplikovaná koncentrace kyseliny askorbové ve směsi s apoferritinem (µg/ml)	Koncentrace kyseliny askorbové po filtraci (µg/ml)	Výtěžnost (%)
615	74	12
308	70	23
154	36	23
77	30	39
38	0	0

Apoferritin používaný k enkapsulaci a cílenému transportu molekul má podle publikací dutou strukturu (Heger et al., 2014). Tuto strukturu duté proteinové klece je možné pozorovat při 80000-násobném zvětšení při transmisní elektronové mikroskopii (Obrázek 1A). Enkapsulace kyseliny askorbové do apoferritinu probíhala na principu změny pH, přičemž při snížení pH došlo k rozpadu apoferritinu na podjednotky. V této fázi byla aplikována kyselina askorbová. Po opětovném zvýšení pH došlo k obnovení struktury apoferritinu (Heger et al., 2014). Z mikrofotografií získaných z transmisního elektronového mikroskopu (viz Obrázek 1B) je zřejmé, že došlo k vyplnění dutiny apoferritinu molekulami kyseliny askorbové a nenachází se na jeho povrchu. Tím se potvrdila schopnost enkapsulace kyseliny askorbové do apoferritinu a tedy možnost jejího uplatnění v cíleném transportu aktivních molekul do živých buněk. Navázání kyseliny askorbové do apoferritinu bylo zároveň ověřeno měřeními velikosti apoferritinu před a po enkapsulaci, přičemž se velikost apoferritinu výrazně nezměnila. Naměřená velikost apoferritinu se v obou případech pohybovala okolo 15,7 nm. Z toho lze usoudit, že se kyselina askorbová nenavázala na povrch nanotransportéru, nýbrž do jeho původně duté struktury.

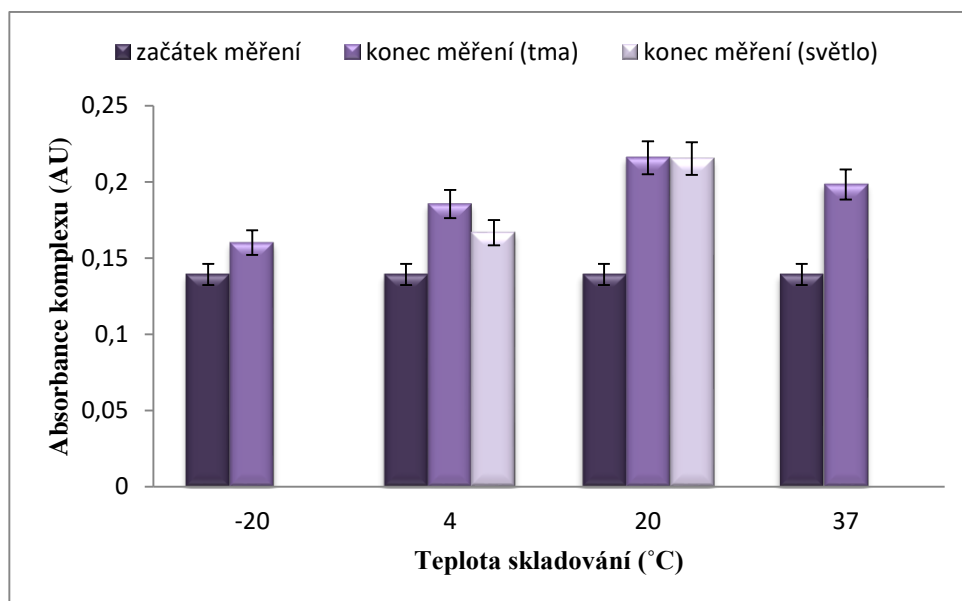


Obrázek 1 - Mikrofotografie prázdné proteinové klece apoferritinu (A) v porovnání s apoferritinem po enkapsulaci kyseliny askorbové (B)

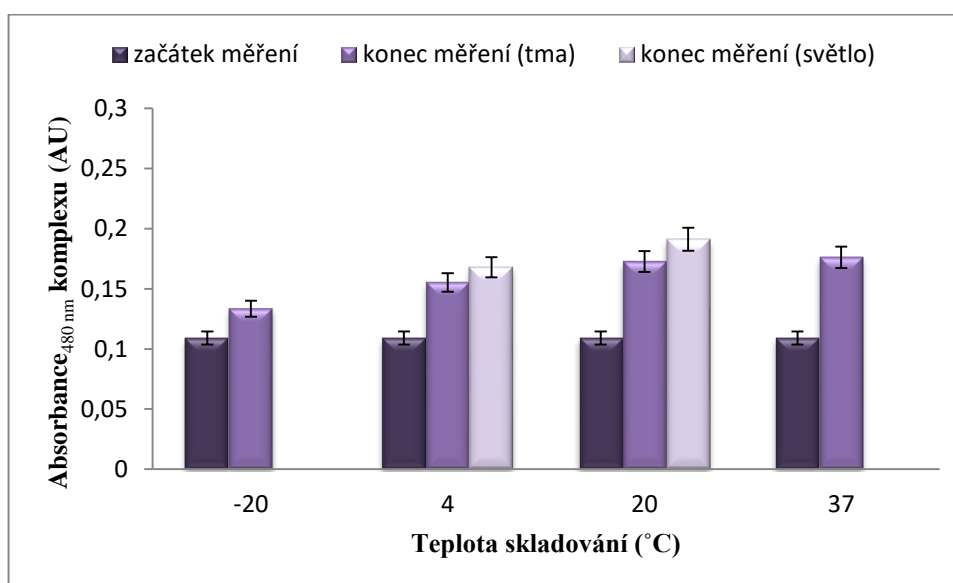
6.2 Stanovení stability komplexu

Zjištění míry stability komplexu apoferritinu s přenášenou molekulou je klíčové zejména pro aplikaci komplexu v potravinářském průmyslu a posouzení maximální doby skladování, přičemž dojde k zachování jeho vlastností. Pro zjištění stability apoferritinu s enkapsulovanými molekulami, byly do jeho struktury enkapsulovány molekuly doxorubicinu. Doxorubicin má dobré fluorescenční vlastnosti, díky kterým je možné sledovat jeho uvolňování při dlouhodobém skladování a internalizaci celého komplexu do cílových buněk. Komplex byl skladován v různých podmínkách po dobu 12 týdnů, během kterých byla v pravidelných intervalech zaznamenána změna jeho absorbance a fluorescence, a množství nežádoucích uvolněných molekul ze struktury apoferritinu.

Jako rozpouštědla byly během skladování použity ACS voda a PBS, jako model fyziologického prostředí. Absorbance změřená u vzorků skladovaných ve vodě a v PBS se výrazně lišila (viz Obrázek 2 a 3). U všech vzorků byl pozorován nárůst absorbance během skladování. Tento nárůst značí sníženou míru uvolňování enkapsulovaných molekul během skladování nebo některých strukturních změn. Komplex apoferritin–doxorubicin skladovaný ve vodě byl ve všech případech stabilnější než ty, které byly skladovány v PBS. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo, pokud byl komplex skladovaný ve vodě a tmě při teplotě 20 °C, kdy došlo k nárůstu absorbance o 55 %. Naopak nejhůře dopadl vzorek, u kterého byl komplex skladován v PBS a tmě při teplotě -20 °C.



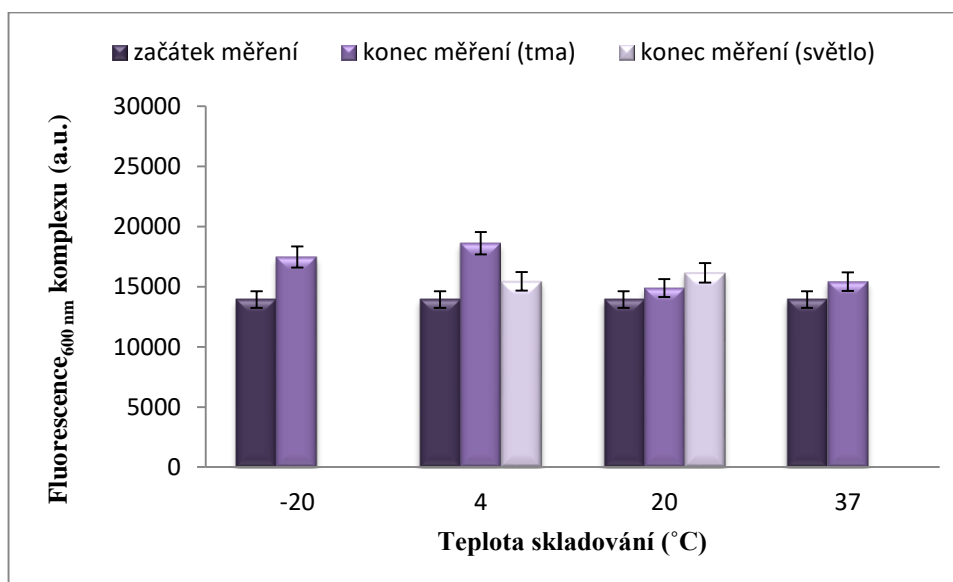
Obrázek 2 - Změny v absorbanci komplexu apoferritin–doxorubicin skladovaného ve vodě



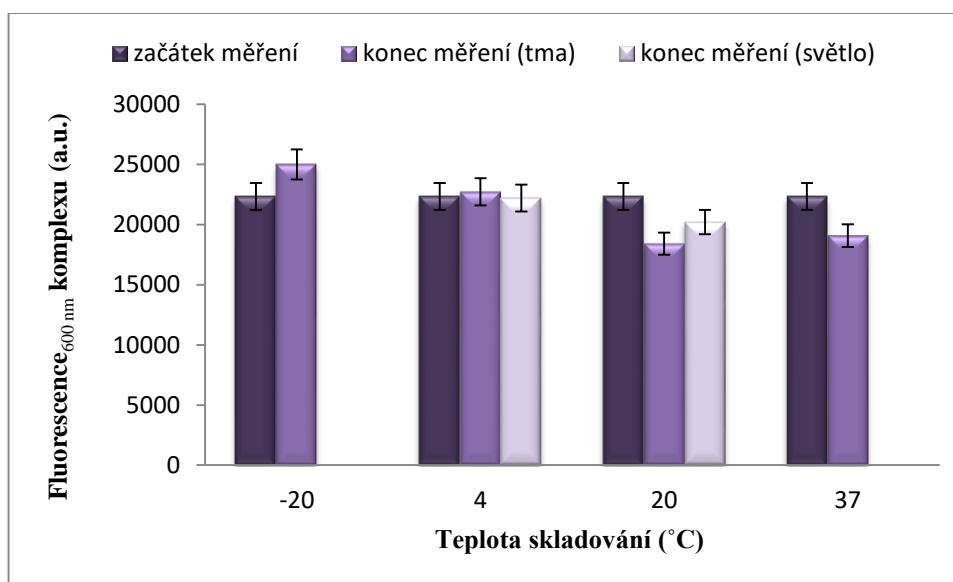
Obrázek 3 - Změny v absorbanci komplexu apoferritin–doxorubicin skladovaného v PBS

Měření fluorescence ukázalo, že u vzorků skladovaných ve vodě v každém případě došlo k jejímu nárůstu v porovnání se vzorky na začátku měření (viz Obrázek 4). Nárůst fluorescence rovněž detekuje sníženou míru uvolňování účinné látky či strukturních změn nanotransportéru. Na druhou stranu, u vzorků uchovávaných v PBS byla zaznamenána sice vyšší fluorescence, než u těch skladovaných ve vodě, ale i přesto téměř v každém případě došlo ke snížení fluorescence oproti začátku měření. Jako jediný vzo-

rek skladovaný v PBS, u kterého došlo k nárůstu fluorescence během skladování, byl komplex uchovávaný při teplotě -20 °C ve tmě (viz Obrázek 5). Nejlepšího výsledku, co se týče měření fluorescence, dosáhl vzorek skladovaný při teplotě 4 °C, ve tmě a ve vodě. Nejhorších výsledků bylo dosaženo při skladování v 20 °C, ve tmě a v PBS.



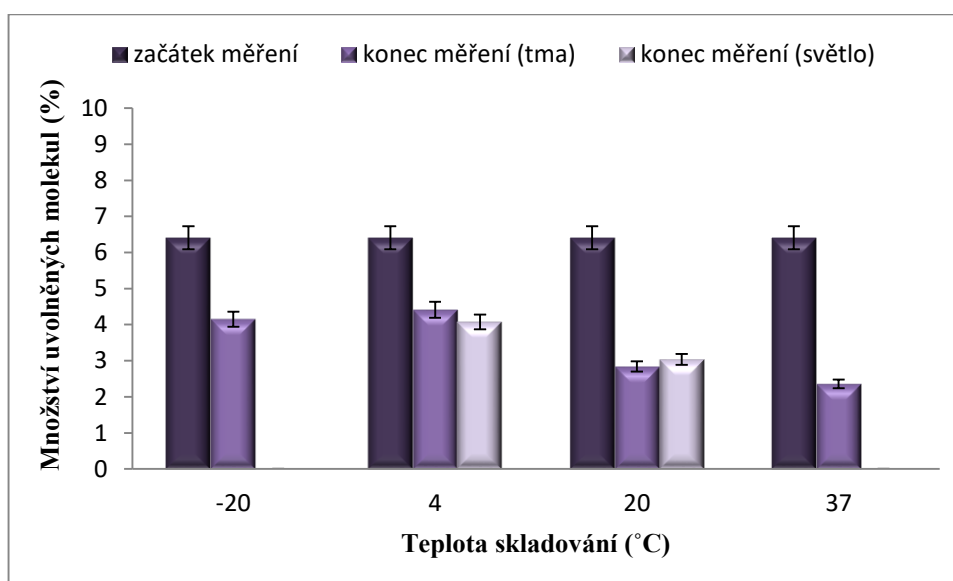
Obrázek 4 - Změny ve fluorescenci komplexu apoferritin–doxorubicin skladovaného ve vodě



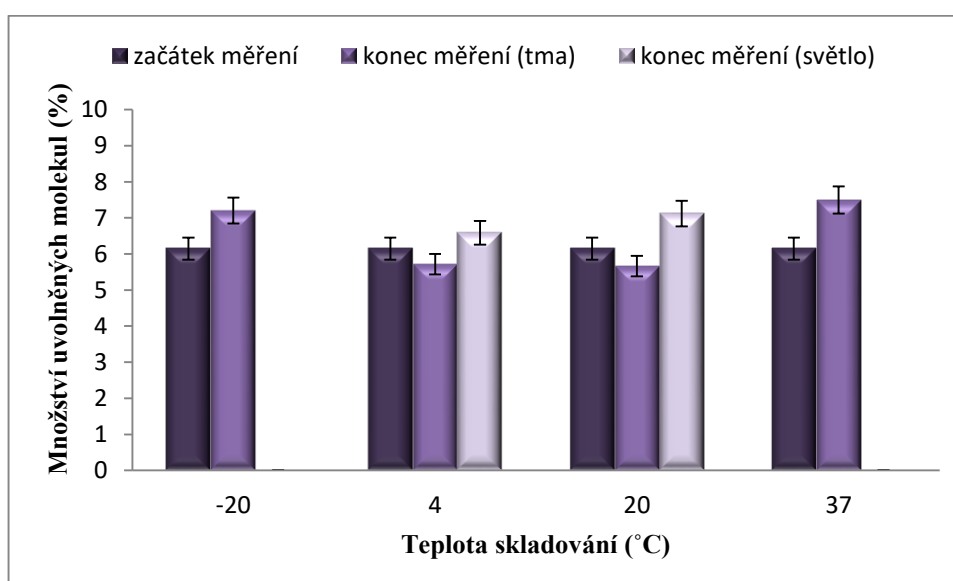
Obrázek 5 - Změny ve fluorescenci komplexu apoferritin–doxorubicin skladovaného v PBS

V průběhu skladování může docházet k postupnému uvolňování navázané molekuly z nanotransportéru, což je nežádoucí, protože se snižuje její obsah v nanotransportéru a tím i potenciální možnost využití organismem (Dostálová et al., 2017). Nejhoršího vý-

sledku dosáhl vzorek s nejvyšším množstvím uvolněných molekul z komplexu, tedy vzorek skladovaný v PBS a ve tmě při 37 °C. Naopak nejlépe byl vyhodnocen vzorek skladovaný ve vodě a ve tmě při 37 °C, u tohoto vzorku došlo k nejnižšímu uvolnění zapouzdřených molekul. K vyšším ztrátám došlo ve všech případech v prostředí PBS, kdežto při skladování ve vodě se u každého vzorku snížila míra předčasného uvolnění enkapsulované látky z apoferritinu oproti vzorku na začátku měření (viz Obrázek 6 a 7). Pro zamezení předčasného uvolňování aktivní molekuly z komplexu je tedy jednoznačně vhodnější skladování ve vodném prostředí.

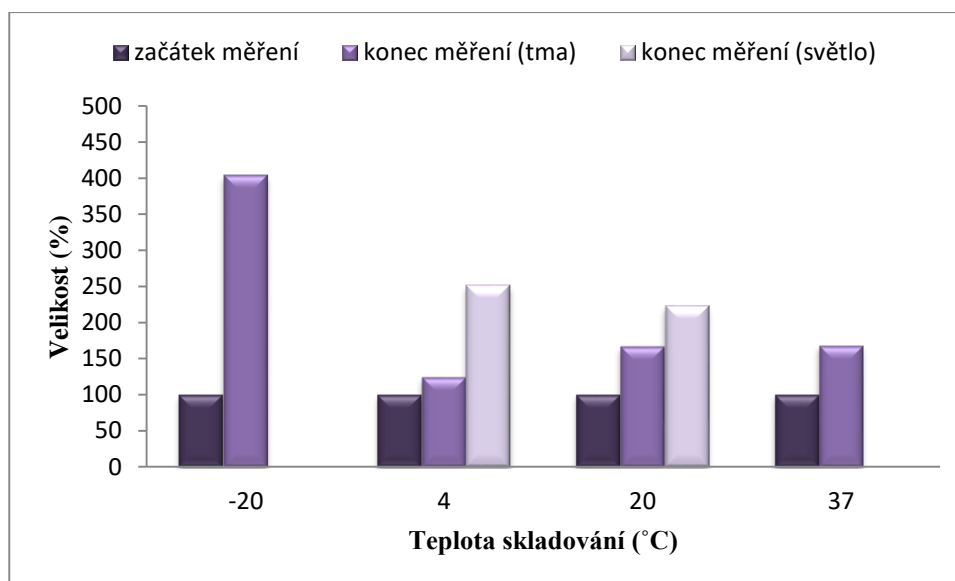


Obrázek 6 - Míra uvolnění enkapsulované molekuly z komplexu skladovaného ve vodě

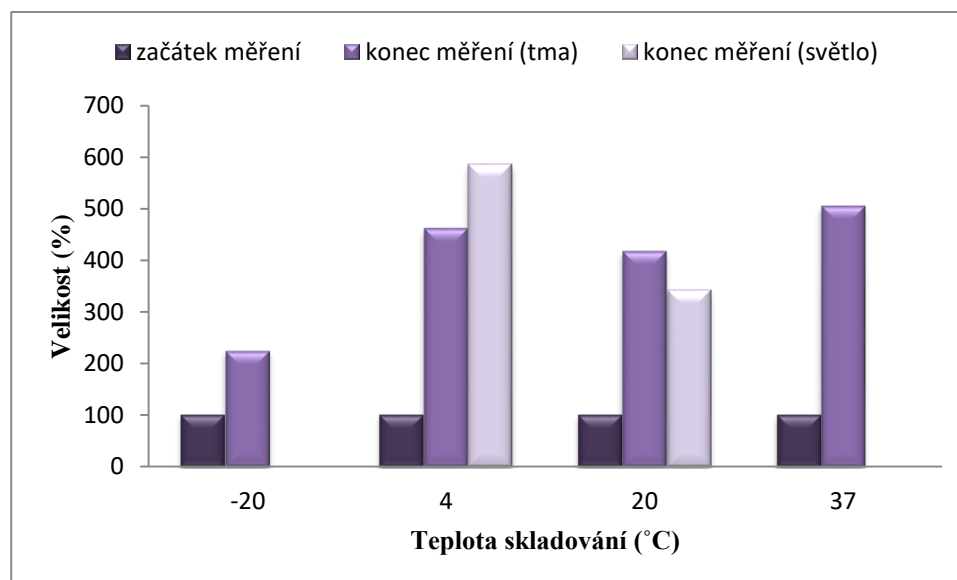


Obrázek 7 - Míra uvolnění enkapsulované molekuly z komplexu skladovaného v PBS

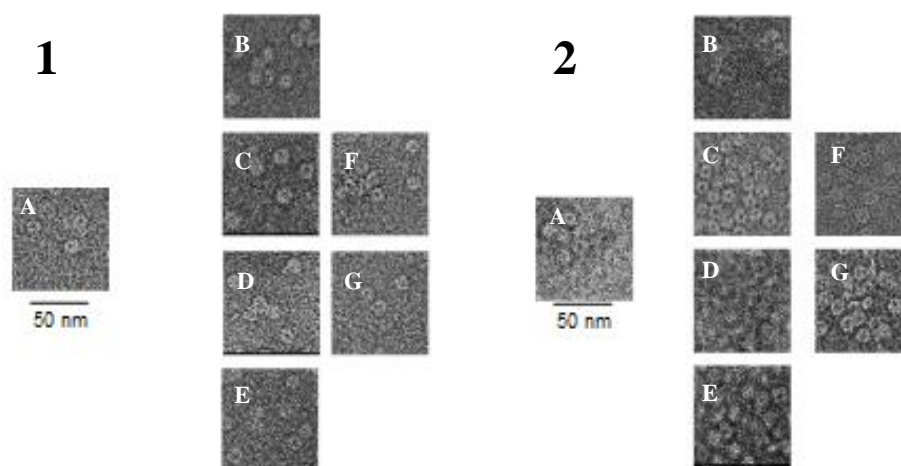
Změny ve velikosti a tvaru skladovaných vzorků ukázaly, že jediný komplex schopný udržet si po dobu skladování svoji velikost a tvar byl vzorek skladovaný ve vodě a tmě při teplotě 4 °C. U ostatních skladovacích teplot docházelo ve větší míře k tvorbě agregátů a ke změně velikosti komplexu (viz obrázek 8, 9 a 10). Byl také zaznamenán významný rozdíl mezi vzorky skladovanými ve stejných teplotách, ale při rozdílných světelných podmínkách, přičemž při skladování ve tmě docházelo ke změnám struktury v menší míře a prokázalo se jako efektivnější. U vzorků skladovaných ve vodě při teplotě -20 °C došlo k rozsáhlému vzniku agregátů a změnil se i tvar komplexu. V teplotách 20 a 37 °C rovněž vznikaly agregáty, ale byly zaznamenány i nanotransportéry mimo agregát. I v tomto případě došlo ke změnám tvaru komplexu. Tyto změny byly nejspíše zapříčiněny sníženou stabilitou komplexu ve vyšších teplotách. Kdežto vzorky skladované v PBS utvářely ve všech případech agregáty po celou dobu měření, což svědčí o nízké stabilitě komplexu skladovaného za těchto podmínek.



Obrázek 8 - Změna velikosti komplexu apoferritin–doxorubicin během skladování ve vodě



Obrázek 9 - Změna velikosti komplexu apoferritin–doxorubicin během skladování v PBS



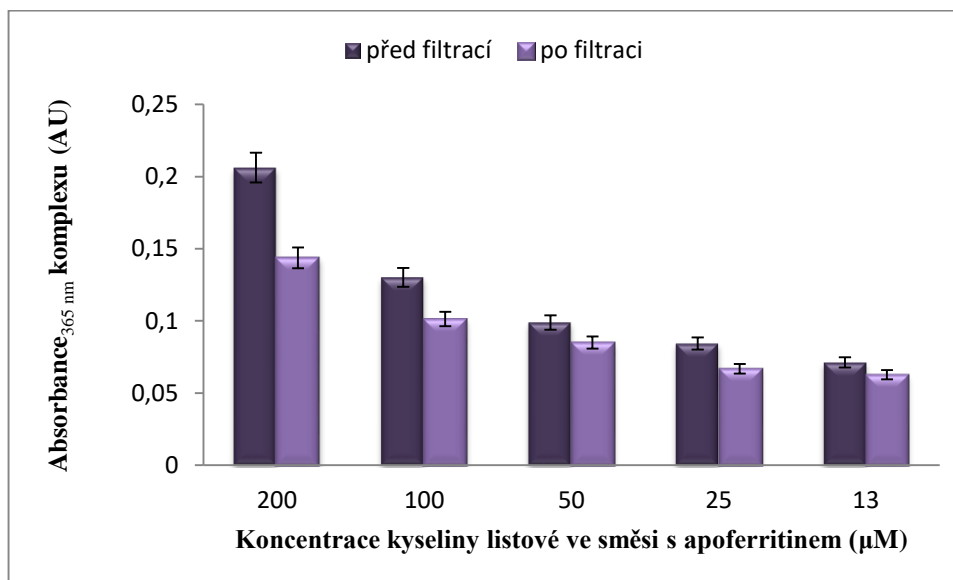
Obrázek 10 - Mikrofotografie zaznamenávající změnu struktury komplexu apoferritin–doxorubicin ve vodě (1) a v PBS (2), skladovaného při -20 °C (B), 4 °C (C), 20 °C (D) a 37 °C (E) za různých světelných podmínek (**tma**: B, C, D, E; **světlo**: F, G). Mikrofotografie 1A a 2A zobrazují strukturu komplexu na začátku experimentu.

Většina vzorků, u nichž byla jako rozpouštědlo použita voda, byly i po dvanácti týdnech skladování schopny udržet svoji stabilitu. Co se týče výsledků z měření absorbance a fluorescence, u vzorků skladovaných ve stejných teplotách, ale v rozdílných světelných podmínkách, se výsledky významně nelišily. Ze získaných výsledků je možné za nejstabilnější komplex považovat ten, který byl skladován ve vodě a ve tmě při 4 °C.

6.3 Konjugace apoferritinu s kyselinou listovou

Pro zvýšení biodostupnosti apoferritinu s enkapsulovanou kyselinou askorbovou byl modifikován povrch apoferritinu kyselinou listovou v pěti různých koncentracích (200; 100; 50; 25 a 13 μM). Kyselina listová byla použita zejména kvůli skutečnosti, že velké množství metabolicky aktivních buněk obsahuje vysoké množství právě folátových receptorů, což usnadňuje internalizaci komplexu do buněk (Zhao et al., 2008).

Cílem experimentu byla optimalizace vazby kyseliny listové na apoferritin a byla stanovena vazebná kapacita apoferritinu pro každou aplikovanou koncentraci kyseliny listové (viz Tabulka 6). Nejvyšší vazebná kapacita apoferritinu (61 %) byla zaznamenána při aplikaci 50 μM kyseliny listové, přičemž došlo k nejnižším poměrovým ztrátám této látky. Lze ji tedy označit za nejefektivnější. Po aplikaci 200 μM kyseliny listové bylo detekováno 57 % navázaných molekul kyseliny listové, obdobného výsledku bylo dosaženo i u koncentrace 100 μM kyseliny listové, kdy byla zjištěna vazebná kapacita 54 %. Nejnižší měřitelný výsledek byl zaznamenán u aplikace 25 μM kyseliny listové, tedy 19% vazebná kapacita. U nejnižší aplikované koncentrace (13 μM) již nebyla detekována žádná vazba molekul kyseliny listové na nanotransportér (viz Obrázek 11).



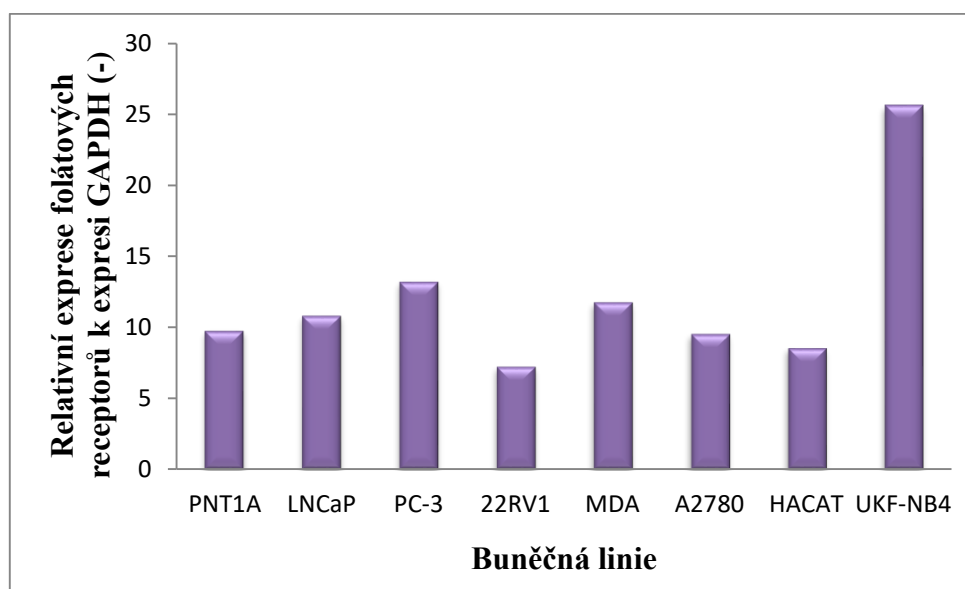
Obrázek 11 - Změny konjugátu apoferritinu s kyselinou listovou před a po filtraci

Tabulka 6 – Výpočet schopnosti vazby kyseliny listové na povrch apoferritinu

Aplikovaná koncentrace kyseliny listové ve směsi s apoferritinem (μM)	Koncentrace kyseliny listové po filtraci (μM)	Vazebná kapacita (%)
200	113	57
100	54	54
50	30	61
25	5	19
13	0	0

6.4 Vliv kyseliny listové na povrchu apoferritinu na změnu její biodostupnosti v eukaryotických buňkách

Před samotným studiem internalizace komplexu apoferritinu s kyselinou listovou do buněk, byla nejprve vybrána vhodná buněčná linie s vysokou expresí folátových receptorů. Porovnána byla relativní exprese folátových receptorů u několika buněčných linií k expresi housekeeping proteinu GAPDH (viz Obrázek 12). Nejvyšší relativní exprese těchto receptorů byla pozorována u buněčné linie UKF-NB4, která byla proto použita pro následné experimenty.

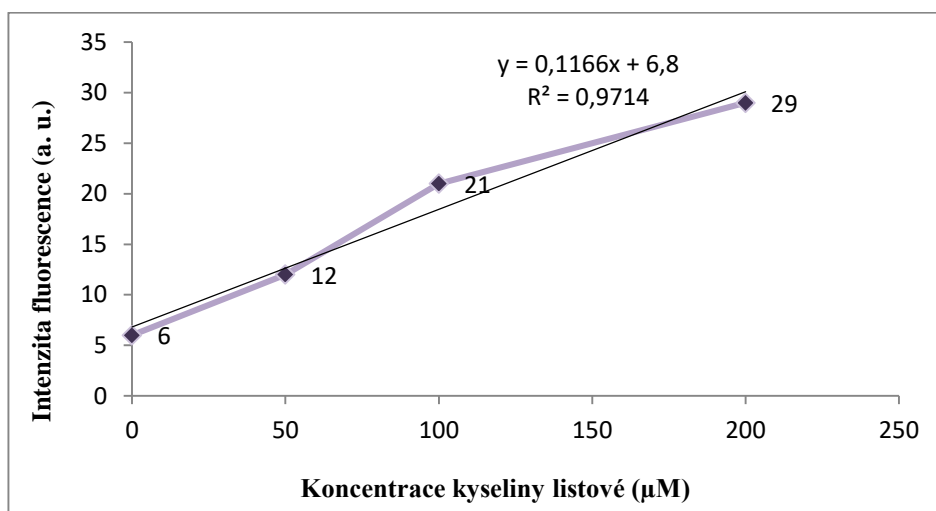


Obrázek 12 - Relativní exprese folátových receptorů u konkrétních buněčných linií

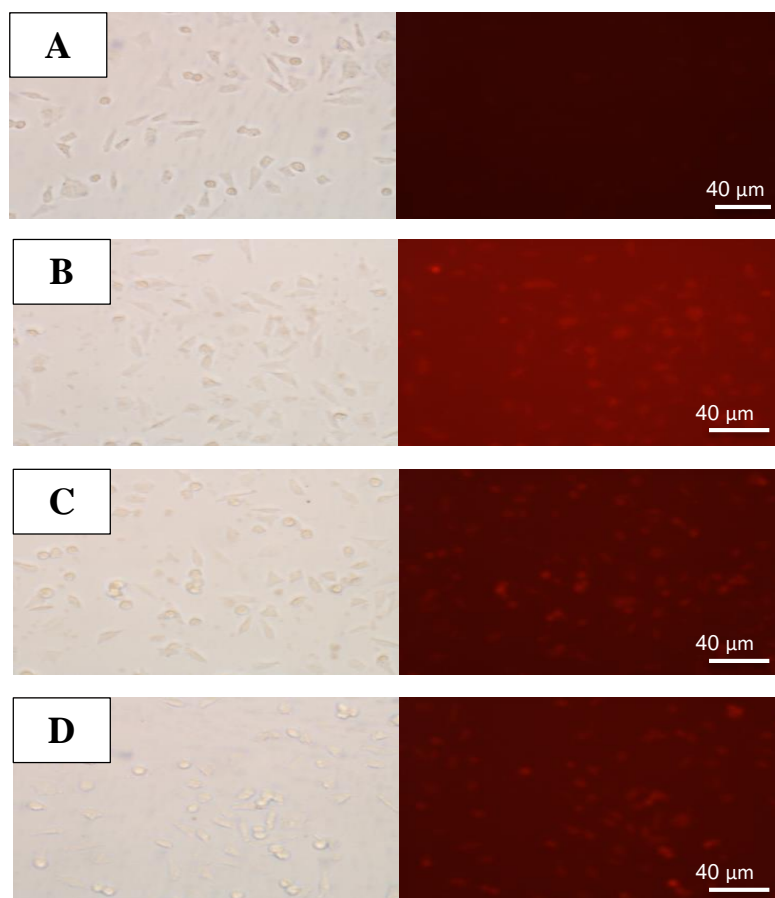
Schopnost internalizace komplexu do buněk, je zásadní pro možnost uplatnění experimentu v potravinářství, konkrétně pro zlepšení biologické využitelnosti kyseliny listové a kyseliny askorbové, jakožto doplňku stravy. Pro studium vlivu kyseliny listové na

povrchu apoferritinu na jeho schopnost internalizovat do buněk s vysokou mírou exprese folátových receptorů byla do apoferritinu opět enkapsulována fluorescenční značka doxorubicin.

Po kultivaci buněčné linie UKF-NB4, byl na buňky aplikován komplex apoferritinu s kyselinou listovou o různých koncentracích (0; 50; 100 a 200 μ M). Vazba kyseliny listové a apoferritinu byla umožněna cross-linkerem DCC. Jak je možné vidět ze snímků z fluorescenčního mikroskopu (viz Obrázek 14), samotný komplex bez modifikace povrchu kyselinou listovou internalizoval do buněk velmi neochotně. Po modifikaci byl komplex úspěšně internalizován do nitra buněk, přičemž s rostoucí koncentrací kyseliny listové v aplikovaném komplexu rostlo nejen množství kyseliny listové, která pronikla do buněk, ale i množství obsahu apoferritinu, tedy případně i enkapsulované kyseliny askorbové (viz Obrázek 13 a 14). Internalizaci tedy lze považovat za úspěšnou a celý komplex aplikovatelný pro zvýšení biodostupnosti aktivních molekul v potravinářském průmyslu.



Obrázek 13 - Intenzita fluorescence internalizovaného komplexu



Obrázek 14 - Aplikace komplexu apoferritin–kyselina listová o různých koncentracích kyseliny listové (**A**: 0 μM , **B**: 50 μM , **C**: 100 μM , **D**: 200 μM) na buněčnou linii UKF-NB4. Internalizace do buněk sledována pomocí fluorescenční značky enkapsulované v apoferritinu.

7 ZÁVĚR

Výzkumu v oblasti využití nanomateriálů v potravinářství se v poslední době věnuje vysoká pozornost. Různé typy nanomateriálů lze totiž mimo jiné aplikovat i pro zlepšení údržnosti a kvality potravin. Základem pro zvýšení kvality potravin je ochrana a zvýšení využitelnosti biologicky aktivních látek v nich obsažených, na což byla zaměřena i tato práce.

Bylo provedeno několik experimentů, které potvrdily schopnost využití nanomateriálů pro zvýšení biologické dostupnosti kyseliny askorbové a kyseliny listové. Nejprve byla zkoumána dlouhodobá stabilita komplexu nanomateriálu a přenášené aktivní molekuly, a také množství uvolněné aktivní molekuly z nanotransportéru v průběhu celého dlouhodobého skladování. Bylo dokázáno, že při tříměsíčním skladování při 4 °C si tento komplex dokáže zachovat svoji stabilitu v takové míře, aby mohl být aplikovatelný v praxi. Mimo to byla optimalizována a stanovena schopnost vazby aktivních molekul – kyseliny listové a askorbové – do nanotransportéru apoferritinu. Detekce vazby byla provedena měřením fluorescence a absorbance komplexu. Na závěr byla sledována schopnost internalizace tohoto komplexu do buněk buněčné linie UKF-NB4. Bylo prokázáno, že komplex je schopen internalizovat do živých buněk, čímž se zvýší biodostupnost kyseliny listové a enkapsulovaných aktivních molekul. Hladina kyseliny listové v buňkách vzrostla společně s aplikovanou koncentrací kyseliny listové v komplexu s apoferritinem.

Na základě výsledků získaných v této bakalářské práci lze dospět k názoru, že nanotransportéry jsou vhodné pro transport doplňků stravy a jsou schopné zvýšit jejich biodostupnost.

8 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

1. Adam V., 2013a: Apoferritin. In: OSEL: Objective Source E-Learning [online]. [vid. 2017_01_10]. Dostupné z: <http://www.osel.cz/6722-apoferritin.html>.
2. Adam V., 2013b: Cílený transport léčiv pomocí pokročilých nanotechnologií. In: Zítka O., ed. Moderní nanotechnologie na počátku 21. století. Brno: Vysoké učení technické v Brně; Mendelova univerzita v Brně, s. 97-102. ISBN 978-80-214-4802-5.
3. Barabaszová K., Holešová S., Čech P., Slíva A., 2010: Nanotechnologie. Brno: CERM, 88 s. ISBN 978-80-7204-713-0.
4. Bartakova E. V., Bronich T. K., Vetro J. A., Kabanov A. V., 2006: Polymer Micelles as Drug Carriers. In: Torchilin V. P., ed. Nanoparticulates as Drug Carriers. Londýn: Imperial College Press, s. 57-78. ISBN 1-86094-630-5.
5. Belletti D., Pederzoli F., Forni F., Vandelli M. A., Tosi G., Ruozi B., 2016: Protein cage nanostructure as drug delivery system: magnifying glass on apoferritin. In: Expert Opinion on Drug Delivery [online]. s. 1-16. [vid. 2017_04_01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27690258>.
6. Blasco C., Picó Y., 2011: Determining nanomaterials in food. In: Trends in Analytical Chemistry. Vol. 30 (1), s. 84-99.
7. Boom R. M., 2011: Nanotechnology in Food Production. In: Frewer L. J., Norde W., Fischer A., Kampers F., eds. Nanotechnology in the Agri-Food Sector. Weinheim: Wiley, s. 39-57. ISBN 978-3-527-33060-7.
8. Chaudhry Q., Castle L., Watkins R., 2011: Nanomaterials in Food and Food Contact Materials – Potential Implications for Consumer Safety and Regulatory Controls. In: Frewer L. J., Norde W., Fischer A., Kampers F., eds. Nanotechnology in the Agri-Food Sector. Weinheim: Wiley, s. 191-208. ISBN 978-3-527-33060-7.
9. Chomoucká J., 2013: Syntéza nanostruktur moderními metodami: Magnetické nanočástice, kvantové tečky. In: Zítka O., ed. Moderní nanotechnologie na počátku 21. století. Brno: Vysoké učení technické v Brně; Mendelova univerzita v Brně, s. 54-62. ISBN 978-80-214-4802-5.
10. Chowdary M. S., 2008: Physical Methods of Immobilization. In: Biotechnology Blog 4 JNTU B.Tech Students [online]. [vid 2017_01_22]. Dostupné z: <http://4jntubiotech.blogspot.cz/2008/11/physical-methods-of-immobilization.html>.
11. Chowdhury S., Yusof F., Salim W. W. A. W., Sulaiman N., Faruck M. O., 2016: An overview of drug delivery vehicles for cancer treatment: Nanocarriers and nanoparticles including photovoltaic nanoparticles. In: Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. Vol. 164, s. 151-159.
12. Deshpande S. S., 2002: Handbook of Food Toxicology. New York: Marcel Dekker, 903s. ISBN 978-0-8247-0760-6.
13. Dohnalová L., Dohnal V., 2015. Nanočástice a jejich toxicita. In: Chemické listy. Vol. 109, s. 444-450.
14. Dostálová S., 2014: Nanotransportéry pro teranostické aplikace. Brno. Diplomová práce (nepubl.). Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce prof. Ing. René Kizek, Ph.D.

15. Dostálová S., Vašíčková K., Hynek D., Křížková S., Richtera L., Vaculovičová M., Eckschlager T., Stiborová M., Heger Z., Adam V., 2017: Apoferritin as ubiquitous nanocarrier with excellent shelf life. In: *International Journal of Nanomedicine*. Vol. 12, s. 2265-2278.
16. Douglas T., Allen M., Young M., 2005: Self-assembling Protein Cage Systems and Applications in Nanotechnology. In: *Biopolymers online* [online]. s.405-421. [vid. 2017_01_30]. Dostupné z: http://application.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf_v08/vol08_10.pdf.
17. Eş I., Vieira J. D. G., Amaral A. C., 2015: Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. Springer, s. 2065-2082. [vid 2017_01_22]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-015-6390-y>.
18. Fojtík A., Kálal M, Prnka T., Šperlink K., Mašláň M., Zbořil R., Bencko V., Šiňor M., 2014: NANO fascinující fenomén současnosti: nanočástice, nanostruktury a nanotechnologie – důmyslné formy hmoty: od objevu fenoménu po biomedicínské aplikace. Praha: COMTES FHT, 288 s. ISBN 978-80-260-7135-8.
19. Fořt P., 2005a: Výživa pro dokonalou kondici a zdraví. Praha: Grada Publishing, 181 s. ISBN 80-247-1057-9.
20. Fořt P., 2005b: Zdraví a potravní doplňky. Praha: Ikar, 398 s. ISBN 80-249-0612-0.
21. FSAI (Food Safety Authority of Ireland), 2010: Nanotechnology and food. In: Food Safety Authority of Ireland [online]. [vid. 2017_01_22]. Dostupné z: <http://www.fsai.ie/nanotechologyandfood.html>.
22. Ghorbanzade T., Jafari S. M., Akhavan S., Hadavi R., 2017: Nanoencapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. In: *Food Chemistry*. Vol. 216, s. 146-152.
23. Hájková Z., 2011: Návrh implementace nových poznatků z interdisciplinárního oboru „nanotechnologie“ do výuky přírodovědných předmětů na SŠ a příspěvek k edukaci studentů učitelství chemie v tomto oboru. Praha. Rigorózní práce (nepubl.). Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra učitelství a didaktiky chemie. Vedoucí práce RNDr. Petr Šmejkal, Ph.D.
24. Heger Z., Skaličková S., Zítka O., Adam V., Kizek R., 2014: Apoferritin applications in nanomedicine. In: *Nanomedicine*. Vol. 9 (14), s. 2233-2245.
25. Homaei A., 2016: Enzyme Immobilization and its Application in the Food Industry. In: Ravishankar R. V., ed. *Advances in Food Biotechnology* [online]. Wiley, s. 145-164. [vid 2017_01_20]. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=09obCQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>.
26. Hošek J., 2010: Úvod do nanotechnologie. Praha: České vysoké učení technické, 170 s. ISBN 978-80-01-04555-8.
27. Hrdinová Z., 2013: Využití nanomateriálů pro čištění vody. Brno. Diplomová práce (nepubl.). Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin. Vedoucí práce Ing. Libor Kalhotka, Ph.D.
28. Golian J., 2011: Esenciálne anorganické (minerálne) látky a vitamíny. In: Keresteš et al., eds. *Zdravie a výživa ľudí*. Bratislava: CAD Press, s. 241-253. ISBN 978-80-88969-57-0.
29. Kaláč P., 2003: Funkční potraviny. České Budějovice: DONA, 170 s. ISBN 80-7322-029-6.

30. Kaštánek F., 2001: Bioinženýrství. Praha: ACADEMIA, 334 s. ISBN 80-200-0768-7.
31. Kazdová K., 2012: Slibná řešení pro úpravu vody s využitím nanotechnologií. In: Gate2Biotech [online]. [vid. 2017_01_21]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/slibna-reseni-pro-upravu-vody-s-vyuzitim-nanotechnologii/>.
32. Kennedy J. F., Cabral J. M. S., 2014: Immobilized Living Cells and Their Applications. In: Chibata I., Wingard L. B., eds. Applied Biochemistry and Bioengineering: Immobilized Microbial Cells [online]. Elsevier, s. 190-280. [vid 2017_01_22]. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=PjeaBQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=c#v=onepage&q&f=false>.
33. Kim M. H., An S., Won K., Kim H. J., Lee S. H., 2012: Entrapment of enzymes into cellulose–biopolymer composite hydrogel beads using biocompatible ionic liquid. In: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 75, s. 68-72.
34. Kolářová L., 2014: Úvod do nanovědy a nanotechnologií. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 45 s. ISBN 978-80-244-4179-5.
35. Kopel P., Wawrzak D., Milosavljevic V., Moulick A., Vaculovicova M., Kizek R., Adam V., 2015: Nanotransporters for anticancer drug delivery. In: Bartul Z., Trenor J., eds. Advances in Nanotechnology [online]. Nova Science Publishers, s. 1-50. ISBN 978-1-63482-971-7. [vid. 2017_01_15]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/data/pub/mv-book.pdf.
36. Kvasničková A., 2011: Nanotechnologie v potravinářství. Praha: Sdružení českých spotřebitelů, 14 s. ISBN 978-80-904633-2-5.
37. Leitner A., Walzthoeni T., Kahraman A., Herzog F., Rinner O., Beck M., Aebbersold R., 2010: Probing Native Protein Structures by Chemical Cross-linking, Mass Spectrometry, and Bioinformatics. In: Mol Cell Proteomics. Vol.9 (8), s. 1634-1649.
38. Ma Y., Nolte R. J. M., Cornelissen J. J. L. M., 2012: Virus-based nanocarriers for drug delivery. In: Advanced Drug Delivery Reviews. Vol. 64 (9), s. 811-825.
39. Mach I., 2012: Doplnky stravy: jaké si vybrat při sportu i v každodenním životě. Praha: Grada, 175 s. ISBN 978-80-247-4353-0.
40. Maček J., Tóth Z., Hamadová Z., 2011: Základy teorie správné výživy. In: Keresteš et al., eds. Zdravie a výživa ľudí. Bratislava: CAD Press, s. 77-111. ISBN 978-80-88969-57-0.
41. Marvin H. J. P., Bouwmeester H., Kleter G. A., Frewer L. J., Wentholt T. A., 2011: Evolving Best Practice in Governance Policy – Developing Consumer Confidence in Risk Analysis Applied to Emerging Technologies. In: Frewer L. J., Norde W., Fischer A., Kampers F., eds. Nanotechnology in the Agri-Food Sector. Weinheim: Wiley, s. 393-395. ISBN 978-3-527-33060-7.
42. Mascitelli L., Goldstein M. R., Zacharski L. R., 2015: The Mediterranean Diet and Body Iron Stores. In: The Mediterranean Diet: An Evidence-Based Approach [online]. Academic Press, s. 259-269. [vid. 2017_03_01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124078499000245>.
43. McGuire M. K., Beerman K. A., 2013a: NUTR. Belmont: Wadsworth, 387 s. ISBN 978-1-111-57892-3.
44. McGuire M. K., Beerman K. A., 2013b: Nutritional Sciences: from fundamentals to food. Belmont: Wadsworth, 647 s. ISBN 978-0-8400-5839-3.

45. Miller J. W., 2013: Folic acid. In: Allen L., Prentice A., eds. *Encyclopedia of Human Nutrition: Vol. 2, 3. vydání*. Amsterdam: Academic Press, s. 262-269. ISBN 978-0-08-097770-6.
46. Mindell E., Mundis H., 2006: *Nová vitaminová bible*. Praha: Ikar, 572 s. ISBN 80-249-0744-5.
47. Moraru C., Huang Q., Takhistov P., Dogan H., Kokini J., 2009: Food nanotechnology: Current Developments and Future Prospects. In: Barbosa-Cánovas G., Mortimer A., Lineback D., Spiess W., Buckle K., Colonna P., eds. *Global Issues in Food Science and Technology*. Londýn: Elsevier, s. 382-383. ISBN 978-0-12-374124-0.
48. Müller M. Q., Dreiocker F., Ihling C. H., Schäfer, Sinz A., 2010: Cleavable Cross-Linker for Protein Structure Analysis: Reliable Identification of Cross-Linking Products by Tandem MS. In: *Analytical Chemistry*. Vol. 82 (16), s. 6958-6968.
49. Padayatty S. J., Daruwala R., Wang Y., Eck P. K., Song J., Koh W. S., Levine M., 2002: Vitamin C: From Molecular Actions to Optimum Intake. In: Cadenas E., Packer L., eds. *Handbook of Antioxidants, 2. vydání*. New York: Marcel Dekker, s. 117-145. ISBN 978-0-8247-0547-3.
50. Peer D., Karp J. M., Hong S., Farokhzad O. C., Margalit R., Langer R., 2007: Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. In: *Nature Nanotechnology*. Vol. 2 (12), s. 751-760.
51. Percival S. S., 2013: Dietary Supplements. In: Allen L., Prentice A., eds. *Encyclopedia of Human Nutrition: Vol. 4, 3. vydání*. Amsterdam: Academic Press, s. 246-250. ISBN 978-0-08-097770-6.
52. Pérez-Herrero E., Fernández-Medarde A., 2015: Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of Chemotherapy. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Vol. 93, s. 52-79.
53. Priestly B. G., Bartholomaeus A., Drew R., 2014: Hazards of Food Contact Material: Nanotechnologies and nanomaterials. In: *Encyclopedia of Food Safety*. Vol. 2, s. 444-448.
54. Prnka T., Šperlink K., 2004: *Nanotechnologie* [online]. Ostrava: Repronis. ISBN 80-7329-070-7 [vid. 2017_01_25]. Dostupné z: <http://www.nanotechnologie.cz/storage/nanotechnologie6.pdf>.
55. Ré M. I., Santana M. H. A., d'Ávila M. A., 2010: Encapsulation Technologies for Modifying Food Performance. In: Passos M. L., Ribeiro C. P., eds. *Innovation in Food Engineering: New Techniques and Products*. Boca Raton: CRP Press, s. 223-275. ISBN 978-1-4200-8606-5.
56. Silvestre C., Duraccio D., Cimmino S., 2011: Food packaging based on polymer nanomaterials. In: *Progress in Polymer Science*. Vol. 36 (12), s. 1766-1782.
57. Slíva J. & Minárik J., 2009: *Doplňky stravy*. Praha: Triton, 124 s. ISBN 978-80-7387-169-7.
58. Smolin L. A., Grosvenor M. B., 2010: *NUTRITION: Science and Applications*. 2. vydání. Hoboken: Wiley, 783 s. ISBN 978-0-470-52474-9.
59. Smolkova B., Yamani N. E., Collins A. R., Gutleb A. C., Dusinska M., 2015: Nanoparticles in food. Epigenetic changes induced by nanomaterials and possible impact on health. In: *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 77, s. 64-73.
60. Sozer N., Kokini J. L., 2012: The Applications of Nanotechnology. In: Picó Y., ed. *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*. Elsevier, 812 s. ISBN 978-0-12-384862-8.

61. Stanley S., 2014: Biological nanoparticles and their influence on organism. In: *Current Opinion in Biotechnology* [online]. Elsevier, s. 69-74. [vid. 2017_01_10]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166913007155>.
62. Swierczewska M., Han H. S., Kim K., Park J. H., Lee S., 2016: Polysaccharide-based nanoparticles for theranostic nanomedicine. In: *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 99, s. 70-84.
63. Šánek J., Tinkla Z., Urban F., 2013: Nanotechnologie v medicíně. In: Tománek P., ed. *Nanovědy pro elektroinženýry – Inovace studijních programů Studentský workshop 2013*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav fyziky, s. 166-170. ISBN 978-80-214-4734-9.
64. Truswell S., 2007: The B vitamins. In: Mann J., Truswell A. S., eds. *Essentials of Human Nutrition*, 3. vydání. New York: Oxford University Press, s. 184-200. ISBN 978-0-19-929097-0.
65. Velíšek J., 1999: *Chemie potravin 2*. Tábor: OSSIS, 304 s. ISBN 80-902391-4-5.
66. Velíšek J., Hajšlová J., 2009: *Chemie potravin 1*. Tábor: OSSIS, 580 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
67. Vyhláška č. 225/2008 Sb., kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin.
68. Vysloužil L., 2011: Vliv nanočástic na živé organismy. Brno. Bakalářská práce (nepubl.). Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce doc. Mgr. Vít Kudrle, Ph.D.
69. Wildová M., Rumlová M., 2008: Metody studia vzájemných interakcí proteinů. In: *Chemické listy*. Vol. 10 s. 28-34.
70. Wiseman M., 2007: Nutrition and cancer. In: Mann J., Truswell A. S., eds. *Essentials of Human Nutrition*, 3. vydání. New York: Oxford University Press, s. 313-326. ISBN 978-0-9-929097-0.
71. Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích.
72. Zhao J., Liu M., Zhang Y., Li H., Lin Y., Yao S., 2012: Apoferritin protein nanoparticles dually labeled with aptamer and horseradish peroxidase as a sensing probe for thrombin detection. In: *Analytica Chimica Acta*. Vol. 759, s. 53-60.
73. Zhao X., Li H., Lee R., 2008: Targeted drug delivery via folate receptors. In: *Expert Opinion on Drug Delivery*. Vol. 5 (3), s. 309-319.
74. Zhen Z., Tang W., Chen H., Lin X., Todd T., Wang G., Cowger T., Chen X., Xie J., 2013: RGD-Modified Apoferritin Nanoparticles for Efficient Drug Delivery to Tumors. In: *ACS NANO*. Vol. 7 (6), s. 4830-4837.

9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1- Doporučené denní dávky vitamínů a minerálních látek podle vyhlášky č. 225/2008 Sb.	13
Tabulka 2 - Průměrný obsah kyseliny askorbové ve vybraných potravinách	17
Tabulka 3 - Průměrný obsah kyseliny listové ve vybraných potravinách	20
Tabulka 4 - Podmínky skladování komplexu apoferritin–doxorubicin	37
Tabulka 5 - Enkapsulační výtěžnost apoferritinu pro kyselinu askorbovou.....	40
Tabulka 6 – Výpočet schopnosti vazby kyseliny listové na povrch apoferritinu	48

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Mikrofotografie prázdné proteinové klece apoferritinu (A) v porovnání s apoferritinem po enkapsulaci kyseliny askorbové (B)	41
Obrázek 2 - Změny v absorbanci komplexu apoferritin–doxorubicin skladovaného ve vodě.....	42
Obrázek 3 - Změny v absorbanci komplexu apoferritin–doxorubicin skladovaného v PBS	42
Obrázek 4 - Změny ve fluorescenci komplexu apoferritin–doxorubicin skladovaného ve vodě.....	43
Obrázek 5 - Změny ve fluorescenci komplexu apoferritin–doxorubicin skladovaného v PBS	43
Obrázek 6 - Míra uvolnění enkapsulované molekuly z komplexu skladovaného ve vodě	44
Obrázek 7 - Míra uvolnění enkapsulované molekuly z komplexu skladovaného v PBS.....	44
Obrázek 8 - Změna velikosti komplexu apoferritin–doxorubicin během skladování ve vodě.....	45
Obrázek 9 - Změna velikosti komplexu apoferritin–doxorubicin během skladování v PBS	46
Obrázek 10 - Mikrofotografie zaznamenávající změnu struktury komplexu apoferritin–doxorubicin ve vodě (1) a v PBS (2), skladovaného při -20 °C (B), 4 °C (C), 20 °C (D) a 37 °C (E) za různých světelných podmínek (tma : B, C, D, E; světlo : F, G). Mikrofotografie 1A a 2A zobrazují strukturu komplexu na začátku experimentu.....	46
Obrázek 11 - Změny konjugátu apoferritinu s kyselinou listovou před a po filtraci.....	47
Obrázek 12 - Relativní exprese folátových receptorů u konkrétních buněčných linií....	48
Obrázek 13 - Intenzita fluorescence internalizovaného komplexu.....	49
Obrázek 14 - Aplikace komplexu apoferritin–kyselina listová o různých koncentracích kyseliny listové (A: 0 μM, B: 50 μM, C: 100 μM, D: 200 μM) na buněčnou linii UKF-NB4. Internalizace do buněk sledována pomocí fluorescenční značky enkapsulované v apoferritinu.....	50

11 SEZNAM ZKRATEK

ACS	Kvalita podle parametrů Americké chemické společnosti
ATP	Adenosintrifosfát
DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimid
DDD	Doporučená denní dávka
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)
FBS	Fetální bovinní sérum (fetal bovine serum)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
PBS	Pufrovaný fyziologický roztok (phosphate buffered saline)
SDS	Dodecylsírán sodný