

Studium cytotoxicity a protizánětlivých účinků zlata a stříbra

Jitka Ulrichová

Seminář Českého nanotechnologického klastru

Olomouc, 10. 12. 2014



Univerzita Palackého v Olomouci

Laboratoř buněčných kultur Lékařské fakulty

Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Zkušební laboratoř č. 1308, akreditovaná Českým institutem pro akreditaci, o.p.s.

Biologické hodnocení prostředků zdravotnické techniky – Zkoušky cytotoxicity *in vitro*



Test přímého kontaktu

Test extraktu

Test rozpustných vzorků

Kontakt:

Prof. RNDr. Jitka Ulrichová, CSc.

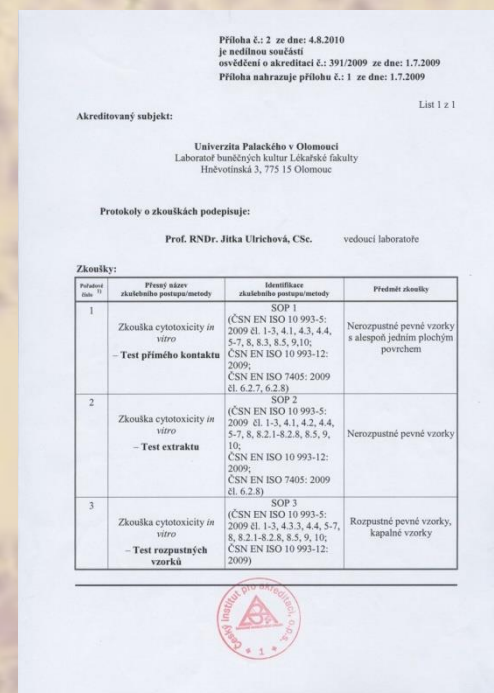
Vedoucí LBK LF

Tel: +420-585 632 312

Fax: +420-585 632 302

e-mail: jitka.ulrichova@upol.cz

www.medchem.upol.cz



Příloha č. 2 ze dne: 4.8.2010
je nedílnou součástí
ověření o akreditaci č. 391/2009 ze dne: 1.7.2009
Příloha nahrazuje přílohu č. 1 ze dne: 1.7.2009

Akreditovaný subjekt: List 1 z 1

Univerzita Palackého v Olomouci
Laboratoř buněčných kultur Lékařské fakulty
Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Protokoly o zkouškách podepisuje:

Prof. RNDr. Jitka Ulrichová, CSc. vedoucí laboratoře

Podání (viz. 3)	První název zkušební postupu/metody	Identifikace zkušební postupu/metody	Předmět zkoušky
1	Zkouška cytotoxicity <i>in vitro</i> – Test přímého kontaktu	SOP 1 (ČSN EN ISO 10 993-5: 2009 čl. 1-3, 4.1, 4.3, 4.4, 5-7, 8, 8.3, 8.5, 9, 10; ČSN EN ISO 10 993-12: 2009; ČSN EN ISO 7405: 2009 čl. 6.2.7, 6.2.8)	Nerozpustné pevné vzorky s alespoň jedním plochým povrchem
2	Zkouška cytotoxicity <i>in vitro</i> – Test extraktu	SOP 2 (ČSN EN ISO 10 993-5: 2009 čl. 1-3, 4.1, 4.2, 4.4, 5-7, 8, 8.2.1-8.2.8, 8.5, 9, 10; ČSN EN ISO 10 993-12: 2009; ČSN EN ISO 7405: 2009 čl. 6.2.8)	Nerozpustné pevné vzorky
3	Zkouška cytotoxicity <i>in vitro</i> – Test rozpustných vzorků	SOP 3 (ČSN EN ISO 10 993-5: 2009 čl. 1-3, 4.3.3, 4.4, 5-7, 8, 8.2.1-8.2.8, 8.5, 9, 10; ČSN EN ISO 10 993-12: 2009)	Rozpustné pevné vzorky, kapalně vzorky



**3.
fáze**

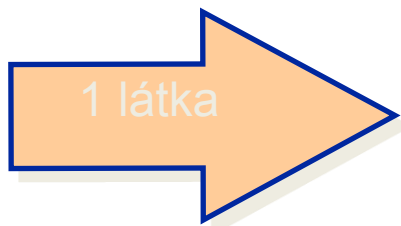
skupiny pacientů: srovnání se standardní terapií

**2.
fáze**

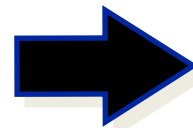
vybrání pacienti: bezpečnost, účinnost, dávka, farmakokinetika

**1.
fáze**

zdraví dobrovolníci, účinek na tělesné funkce, určení dávky, farmakokinetika



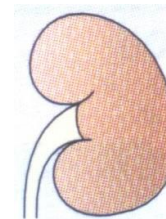
povolovací řízení



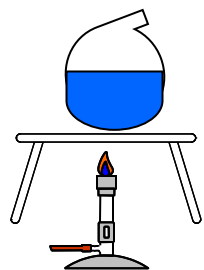
všeobecné používání



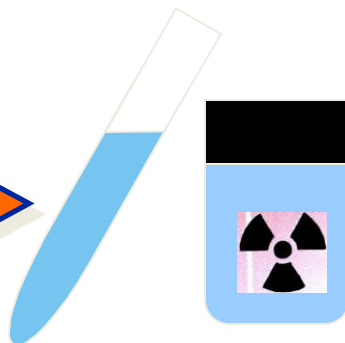
zvířata



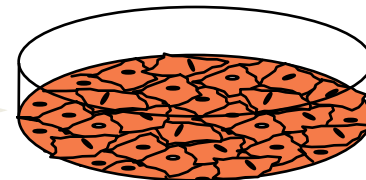
izolované orgány



10 000 látek



tkáňové homogenáty



buňky

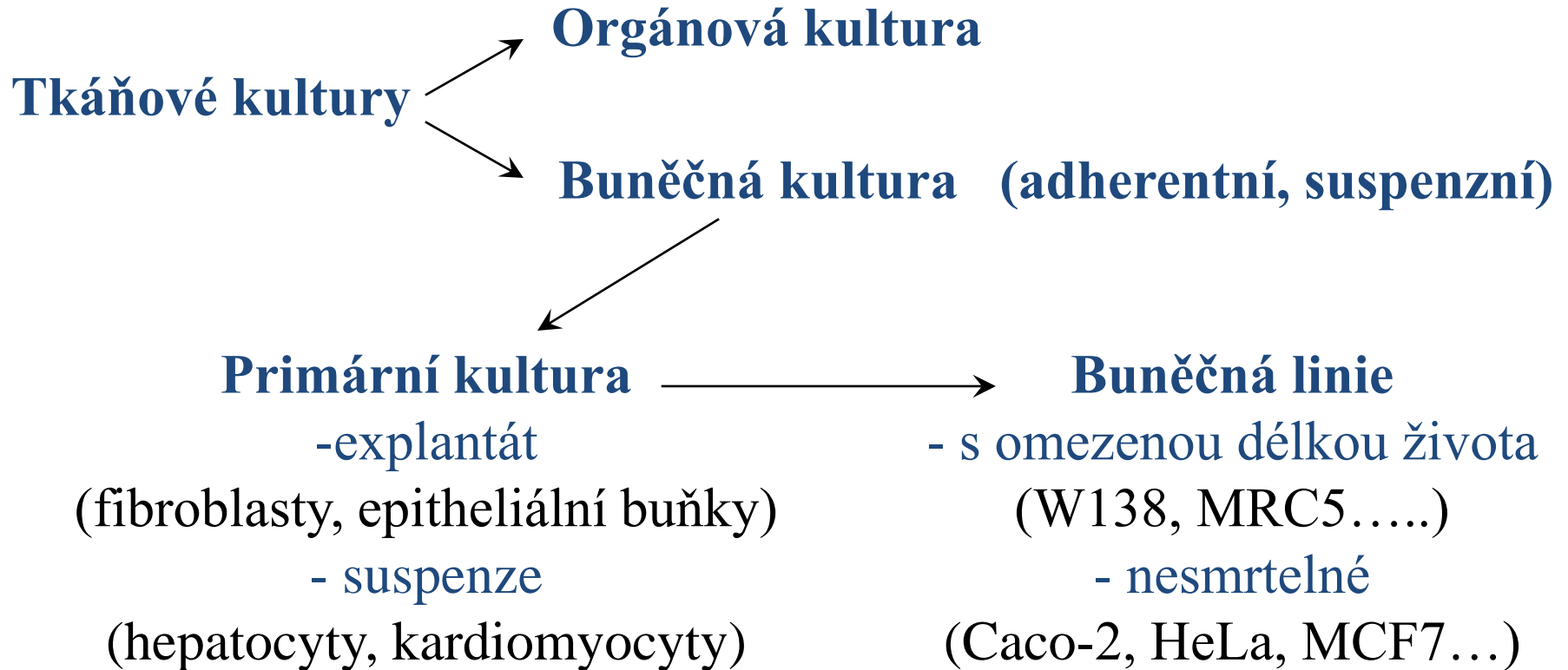
preklinické zkoušení: *in vitro*

(bio)chemická syntéza

In vitro modely

- Evropská legislativa → **směrnice Rady 76/768/EHS** (směrnice o kosmetických prostředcích)
 - zákaz testování konečných kosmetických přípravků **(2004)** a jejich přísad **(2009)** na zvířatech a jejich uvádění na trh **(2009-2013)**
- alternativní zkušební metody *in vitro*

Tkáňové kultury



Modely pro studium hojení ran

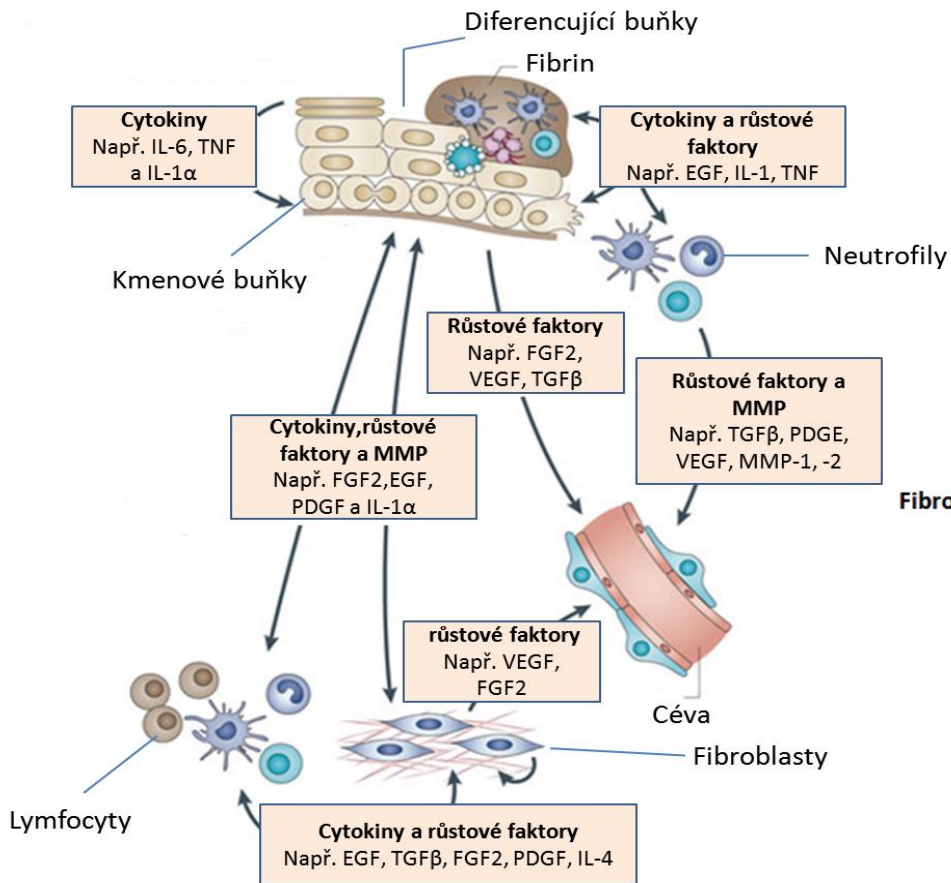


Schéma hojení ran (upraveno podle Arwert a kol., 2012)

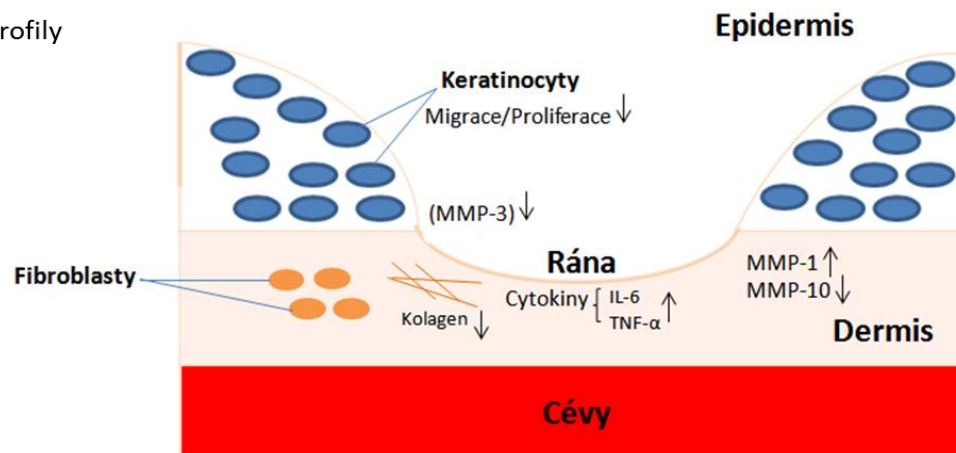
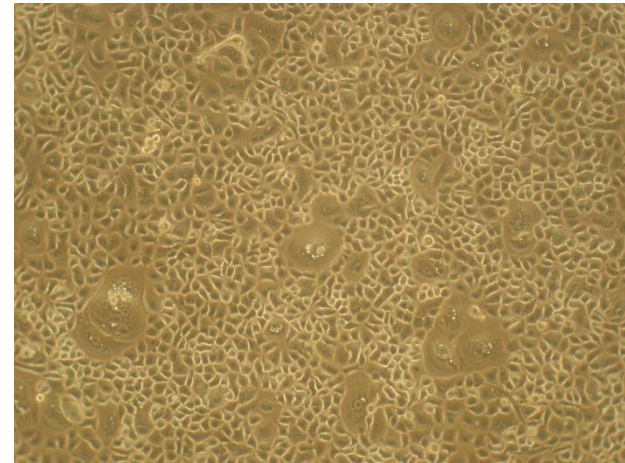


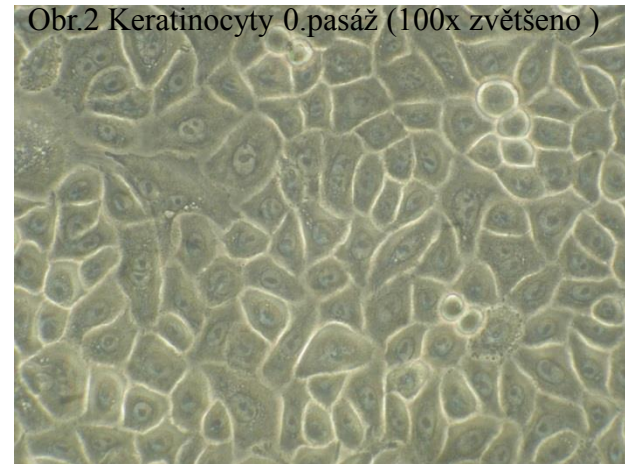
Schéma poraněné kůže během 24 hodin (upraveno podle Xu a kol., 2013)

LIDSKÉ EPIDERMÁLNÍ FIBROBLASTY A KERATINOCYTY

- Izolace z lidské kůže.
- Vzorky kůže z oddělení
Plastické a estetické chirurgie
nebo Porodnicko-
gynekologického oddělení
Fakultní nemocnice Olomouc.
- Vzorky odebírány se souhlasem
etické komise.



Obr.2 Keratinocyty 0.pasáž (100x zvětšeno)

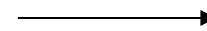
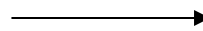
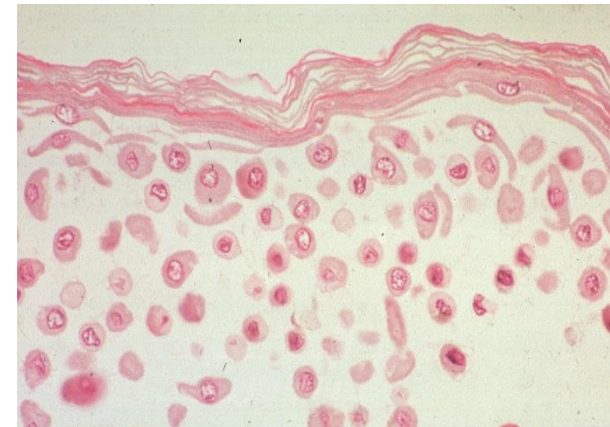
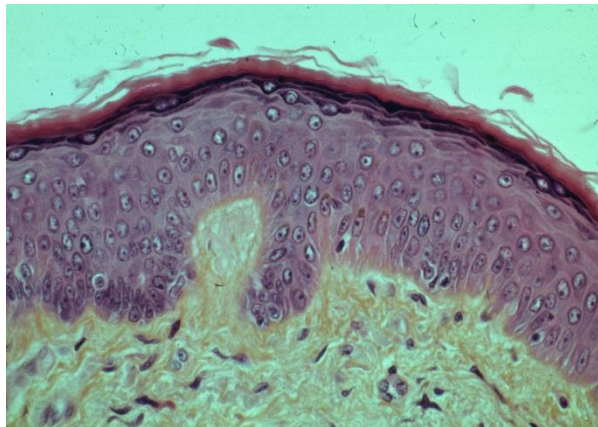
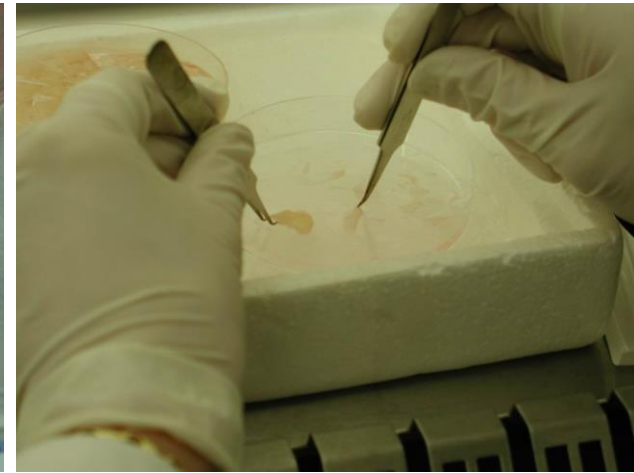


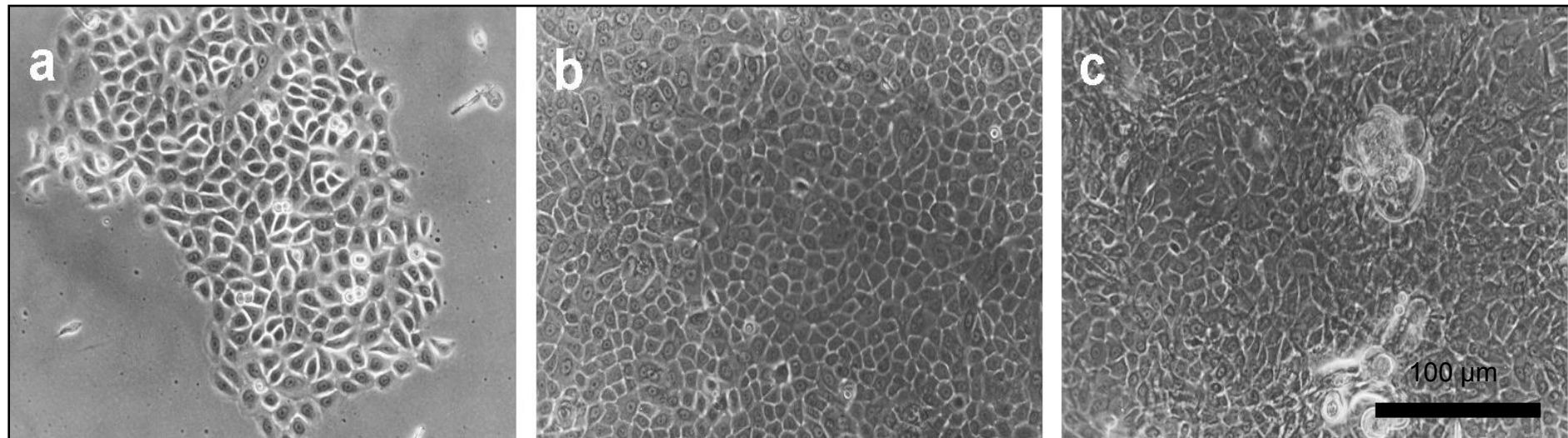
Obr.3 Keratinocyty 1.pasáž (400x zvětšeno)

Izolace dle protokolu:

Minner F., Herphelin F., Poumay Y.: Study of epidermal differentiation in human keratinocytes cultured in autocrine conditions. In *Epidermal Cells, Methods Biology* 585, Springer, 2009, Chapter 6, p. 71-82.

Lidské epidermální keratinocyty

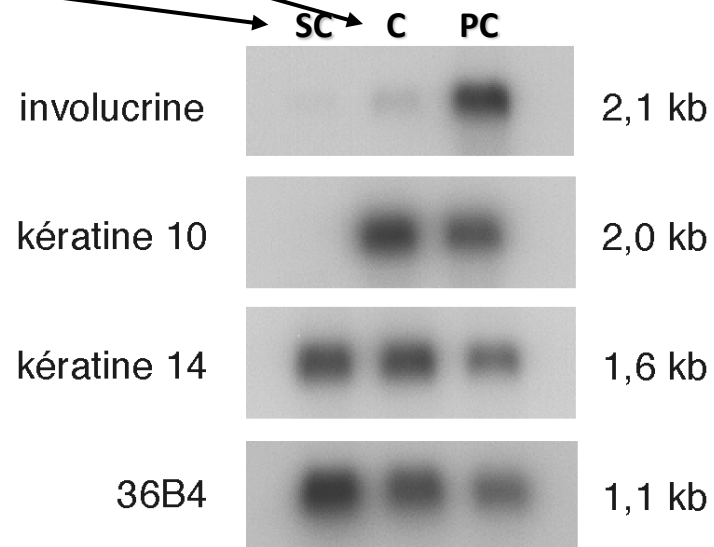
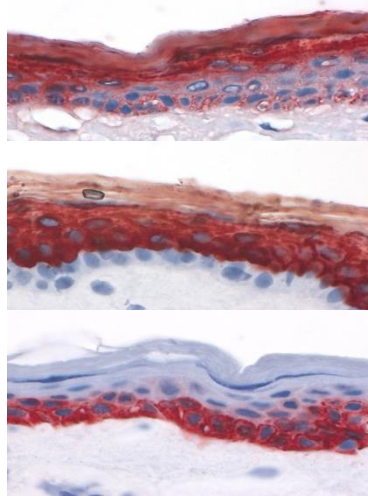




subconfluence

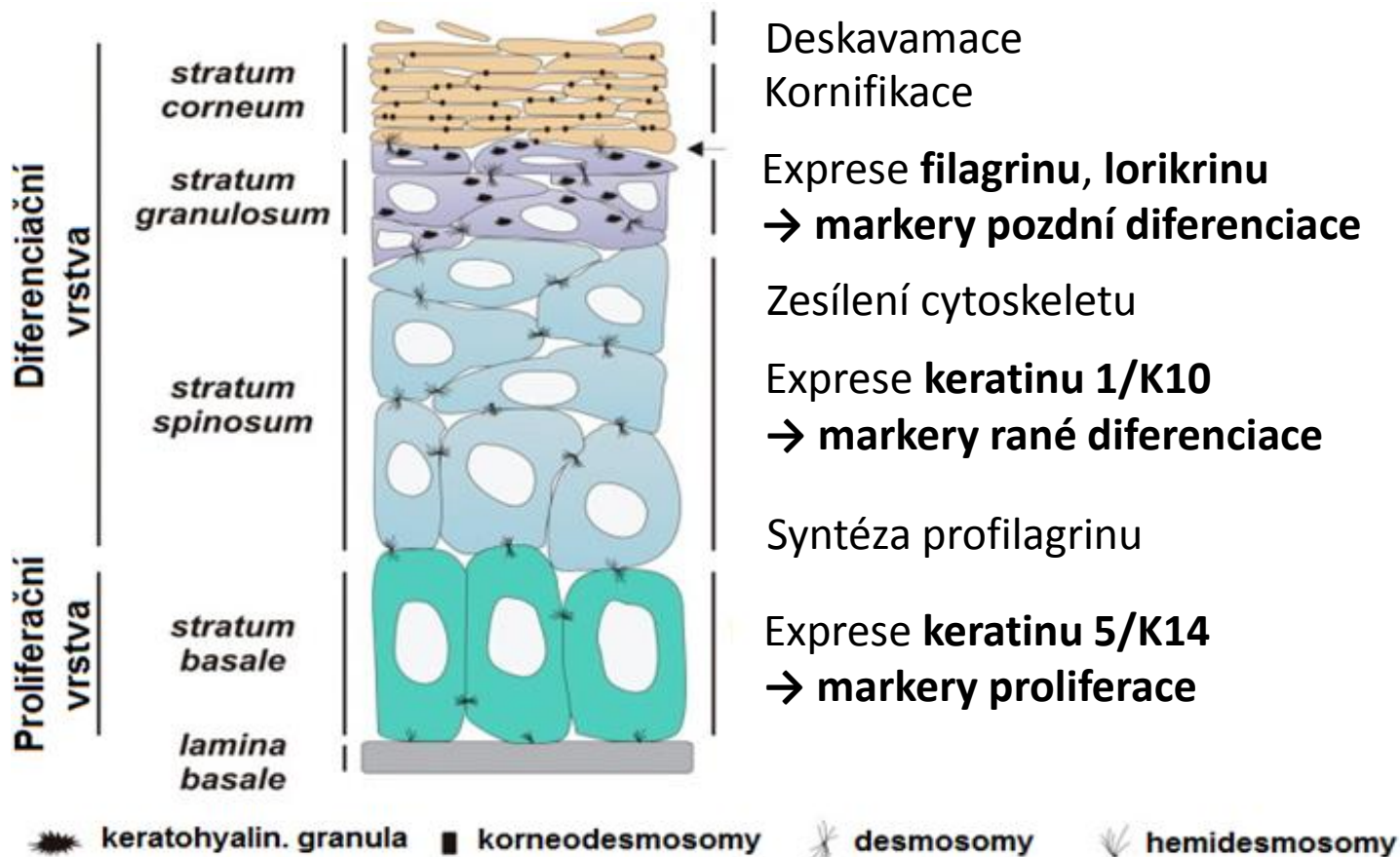
konfluence

postkonfluence

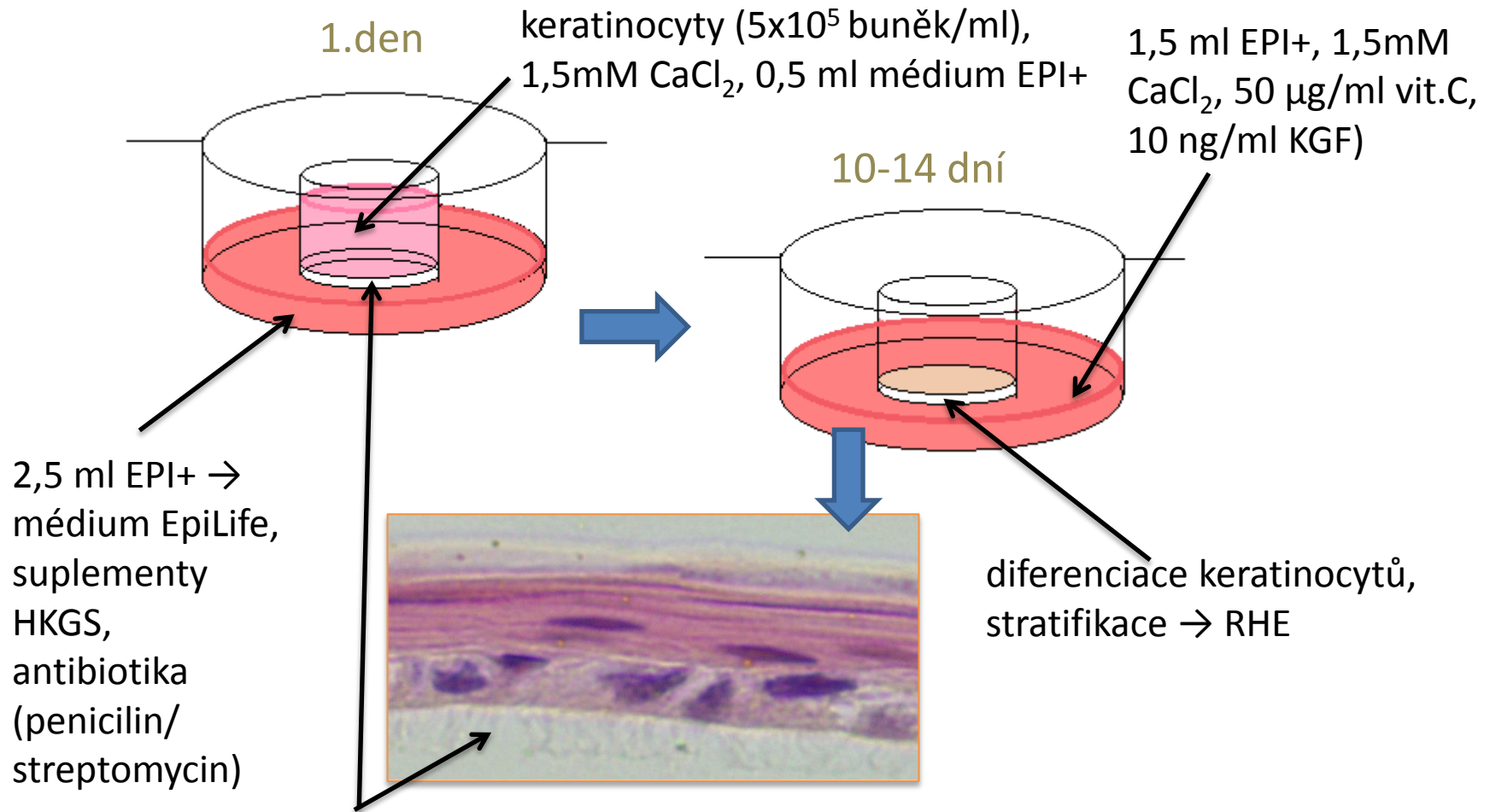


Epidermis

- vrstevnatý dlaždicový rohovějící epitel



RHE *in vitro* model

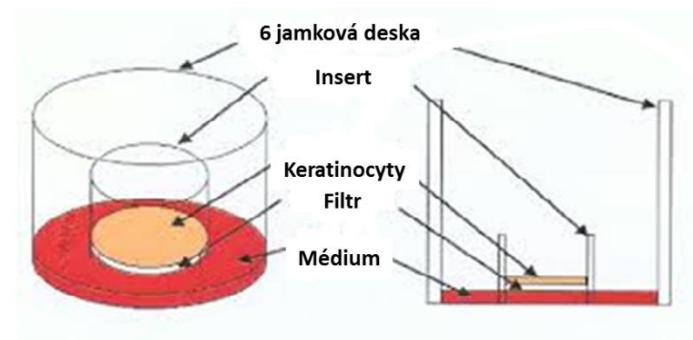
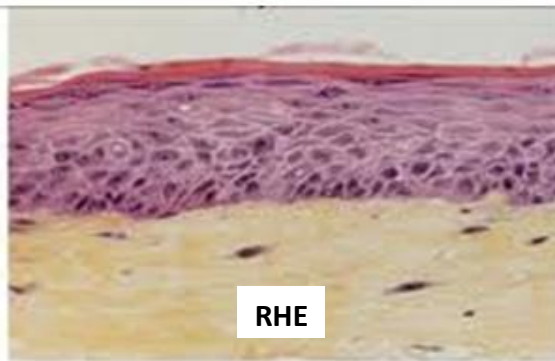


Modely pro studium hojení ran

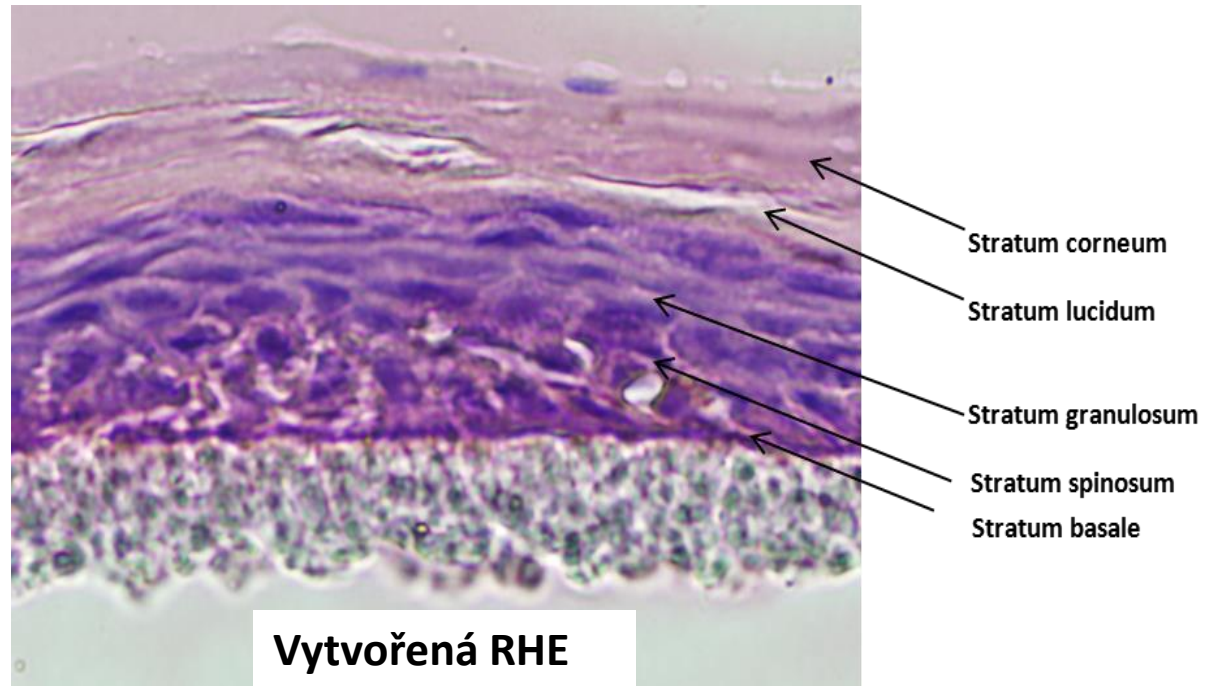
Rekonstruovaná lidská epidermis (RHE)



www.ijdvl.com



www.iivs.org



EXPERIMENTÁLNÍ POSTUPY

- Studium cytotoxicity (MTT test)
- Stanovení produkce kolagenu I (nepřímá ELISA)
- Stanovení produkce MMP-1, 3,.. (ELISA kit, R&D systems)
- Stanovení produkce IL-6,-8,-10,-12, FGF, GM-CSF, TNF- α , VEGF... (Bio-Plex Pro Assays)

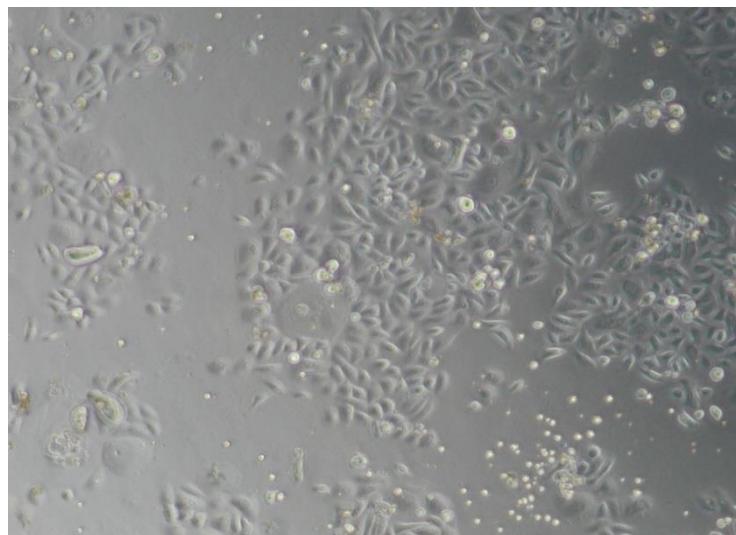
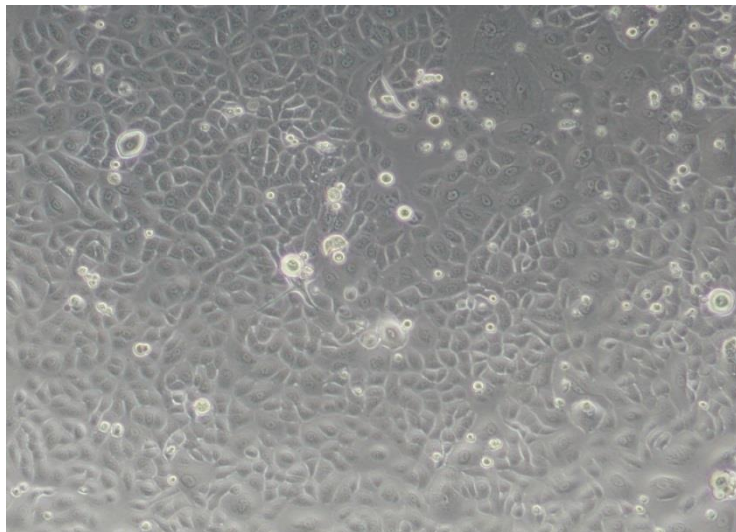
Podmínky

- koncentrace buněk/1cm²
- inkubační doba 24h, 48h a 72h
- koncentrace testovaných látek
- koncentrace látek indukujících poškození, zánět,

Cytotoxicita-roztok metalického stříbra ve vodě

Fotodokumentace

Ctrl 72h

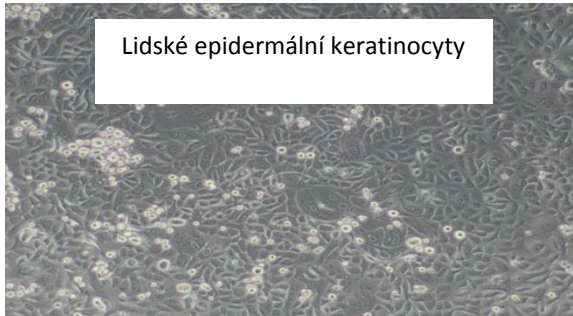


cytotoxicita 72h

Modely pro studium hojení ran

Experimentální model zánětu

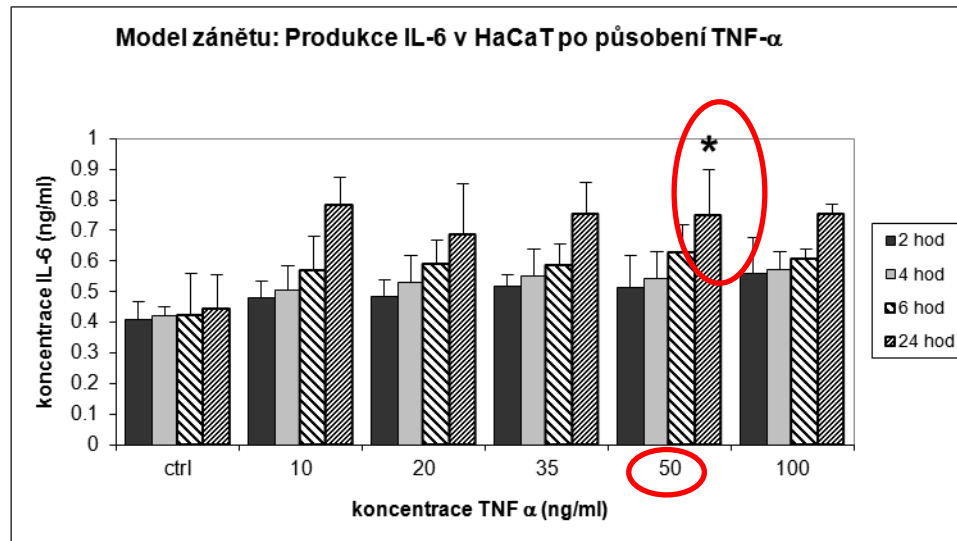
LPS z *Escherichia coli* (10-50 $\mu\text{g/ml}$)
TNF- α (10-100 ng/ml)



Hodnocení zánětu stanovením IL-6

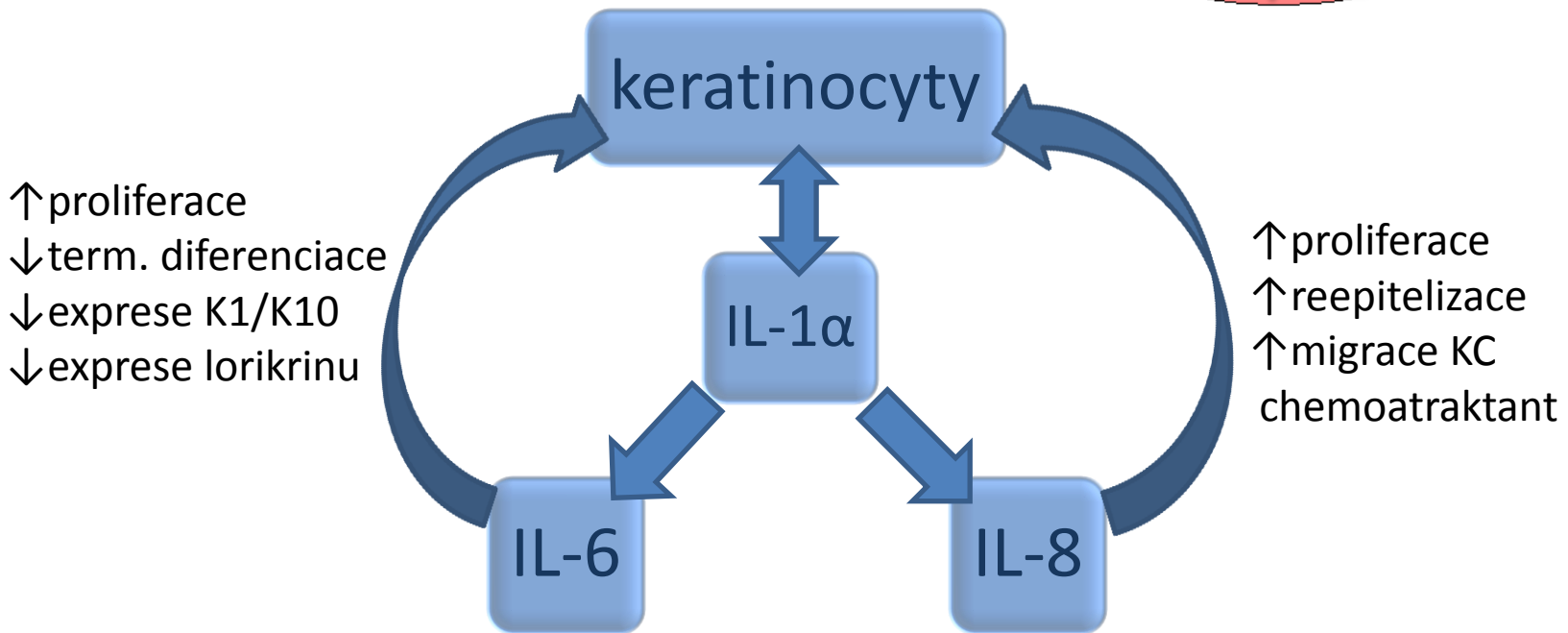
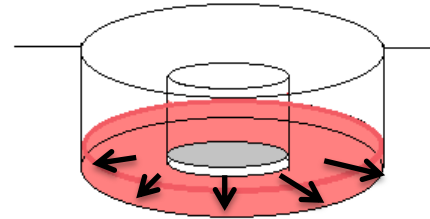
Žádná reakce

Reakce u TNF- α



Prozánětlivé markery

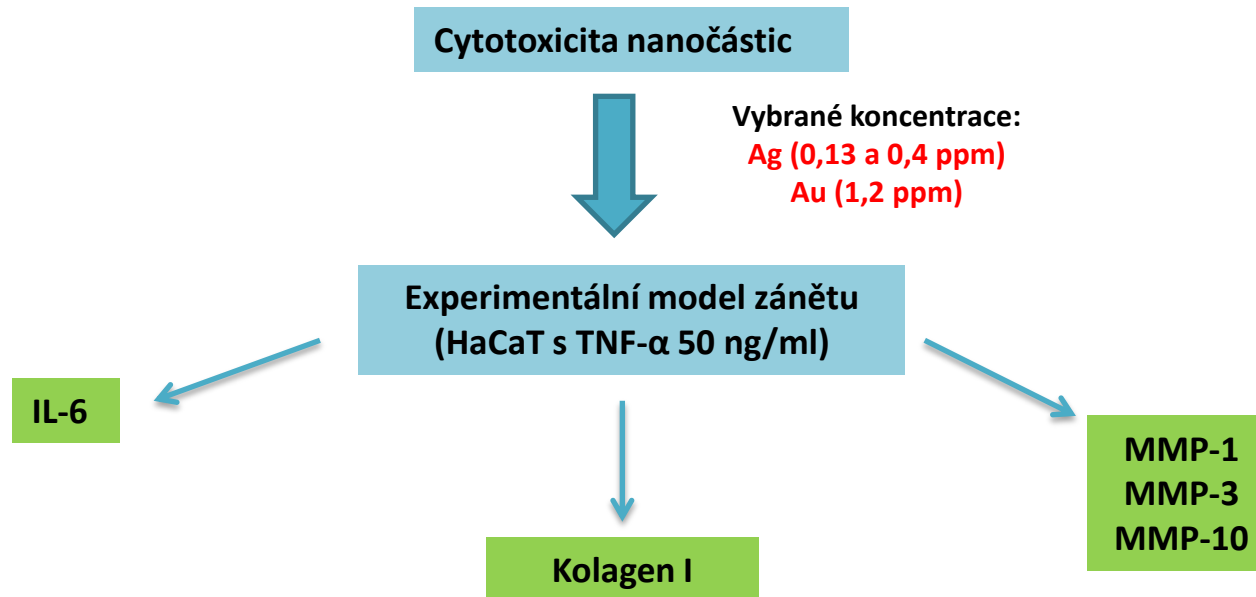
Interleukin-6/Interleukin-8



Modely pro studium hojení ran

Tab. 2 Popis testovaných vzorků nanočástic stříbra a zlata

Vzorek	Složení vzorku	Koncentrace
NaNo GOLD	Voda, nanoprášek Au	1000 ppm
Metalické Ag	Voda, metalické Ag	1000 ppm
Iontové Ag	Voda, iontové Ag	2 000 ppm



Vliv nanočástic stříbra a zlata na markery indukované po škrábnutí dna konfluentních lidských epidermálních keratinocytů a lidských dermálních fibroblastů

Parametr	Metalické stříbro koncentrace (ppm)			Iontové stříbro koncentrace (ppm)			Nanozlato koncentrace (ppm)		
	0,25	2,5	25	0,025	0,1	0,25	0,25	2,5	25
IL-6									
IL-10			↓	↓	↓	↓			
IL-12	↑			↓	↓ ↑			↓	
TNF-α	↓	↓	↓ ↓	↓ ↓	↓	↓ ↓			↓
Cox-2									
FGF basic	↓		↓					↓	
GM-CSF		↓	↓	↓	↓	↓			
VEGF	↓ ↓	↓	↓	↓	↓	↓		↓	↓ ↓

— Lidské dermální fibroblasty — Lidské epidermální keratinocyty

↓ ↑ Signifikantní pokles nebo nárůst v porovnání s kontrolou buněk (bez nanočástic) po 24 hodinách.

Po dosažení 100% konfluencie kožních fibroblastů a keratinocytů byla přes dno kultivační jamky provedena rýha a k buňkám byly přidány nanočástice v příslušných koncentracích. Po 24 hodinové inkubaci buněk s nanočásticemi byl sesbíráán supernatant, ve kterém byly stanoveny markery uvedené v tabulce.

Vliv nanočástic stříbra a zlata na proliferaci a životnost lidských dermálních fibroblastů ozářených UVA a UVB zářením

Parametr	Metalické stříbro koncentrace (ppm)		Iontové stříbro koncentrace (ppm)		Nanozlato koncentrace (ppm)	
	0,25	25	0,025	0,25	0,25	25
Ochrana před UVA zářením	-	-	+	+	-	-
Ochrana před UVB zářením	+	-	+	+	-	-

(+) protektivní účinek nanočástic

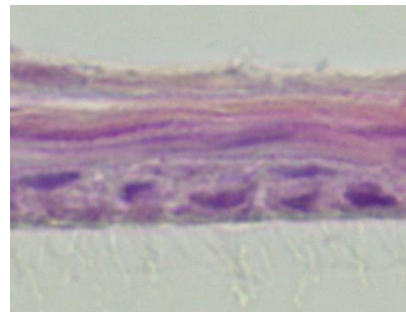
(-) žádný účinek nanočástic

Výsledky RHE

Hematoxylin-eosin

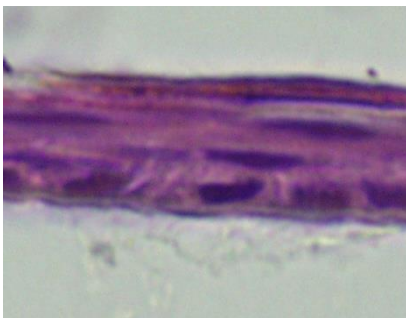
- histologie – barvení
 - jádra modrá, cytoplasmata růžová
 - zvětšení 40x

kontrola (bez Ag)

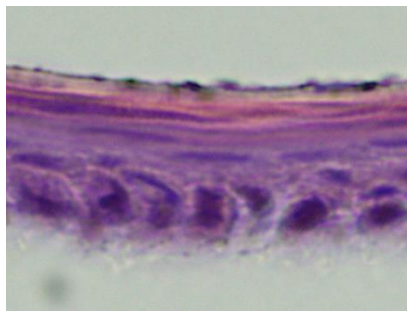


metalické stříbro

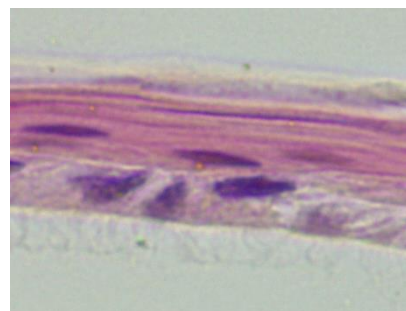
25 ppm



2,5 ppm



0,25 ppm



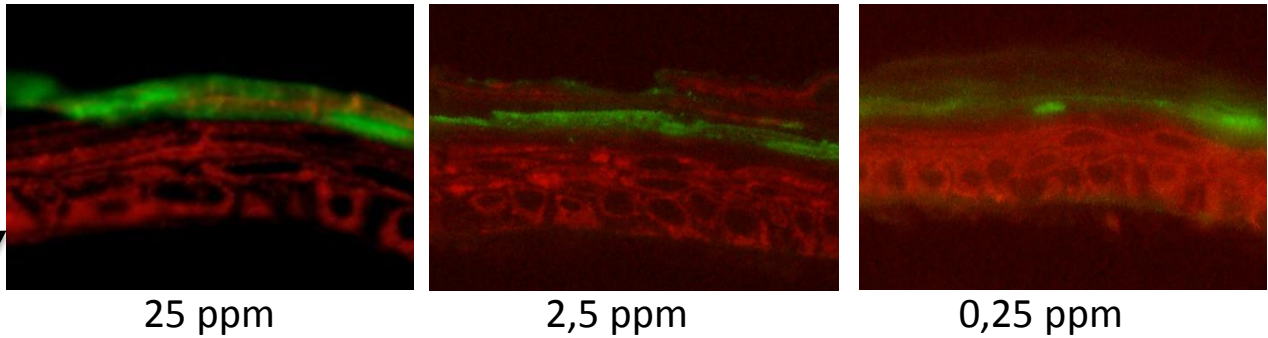
Výsledky RHE

Imunofluorescenční barvení

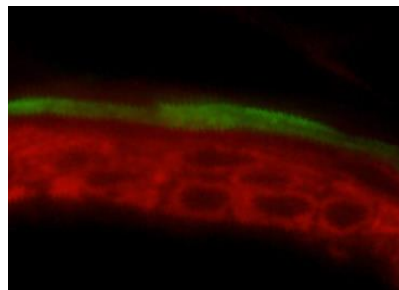
- primární protilátky
 - myší monoklonální protilátka ke keratinu 14 (1:1000)
 - králičí polyklonální protilátka k lorikrinu (1:1000), Dako
- sekundární protilátky Alexa Fluor®
 - kozí anti-mouse IgG (1:3000)
 - kozí anti-rabbit IgG (1:3000)
- zvětšení 40x

- **lorikrin**
 - S. corneum
- **keratin 14**
 - S. basale

metalické stříbro



kontrola



www.medchem.upol.cz